

Miftahul Mushlih

Buku Ajar

BIOLOGI MOLEKULAR

Aplikasi Dasar Di Dunia Kesehatan



**BUKU AJAR MATA KULIAH
BIOLOGI MOLEKULER
“Aplikasi Dasar di Dunia Kesehatan”**

Oleh
Miftahul Mushlih



Diterbitkan oleh
UMSIDA PRESS

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SIDOARJO

2019

Biologi Molekular “*Aplikasi Di Dunia Kesehatan*”

BUKU AJAR

BIOLOGI MOLEKULER I “Aplikasi Dasar di Dunia Kesehatan”

Penulis :

Miftahul Mushlih, M.Sc.

ISBN :

978-623-6081-07-5

Editor :

Septi Budi Sartika, M.Pd.

Design Sampul dan Tata Letak :

Mochammad Nasrullah, S.Pd.

Penerbit :

UMSIDA Press

Anggota IKAPI No. 218/Anggota Luar Biasa/JTI/2019

Anggota APPTI No. 002 018 1 09 2017

Redaksi :

Universitas Muhammadiyah Sidoarjo

Jl. Mojopahit No 666B

Sidoarjo, Jawa TImur

Cetakan pertama, Agustus 2019

© Hak cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dengan suatu apapun tanpa ijin tertulis dari penerbit.

Biologi Molekular “*Aplikasi Di Dunia Kesehatan*”

Capaian Pembelajaran

Biologi Molekular

Capaian Pembelajaran pada Biologi Molekular adalah Memahami Biomemran dan organel sel, Integrasi sel ke dalam jaringan, Struktur dan fungsi protein, Struktur asam nukleat, Struktur DNA, Kromosom, Organisasi Genom, Replikasi dan Perbaikan DNA, Hubungan Gen dan Protein Sintesis dan Pemrosesan RMA (Transkripsi), Sintesis Protein (Translasi), Perbedaan transkripsi dan translasi dan prokariot, Ekspresi gen pada Eukariota, Kontrol Ekspresi Gen, Pengetahuan keamanan dan keselamatan kerja di lab Biologi Molekular, teknik Isolasi DNA, Uji Kualitas DNA secara kualitatif dan Kuantitatif

Kata Pengantar

Biologi Molekuler merupakan cabang ilmu Biologi yang sekarang mulai mendapat perhatian serius guna meningkatkan kesejahteraan manusia. Biologi Molekuler sendiri hampir selalu digunakan bagi cabang-cabang keilmuan yang bersentuhan dengan jasad hidup baik itu tumbuhan, hewan, bakteri, jamur dan tidak lepas didalamnya adalah Manusia.

Pemanfaatan bidang Biologi Molekuler di dunia kesehatan dapat dikatakan masing-masing sangat terbatas. Namun demikian para ahli memperkirakan kedudukan Biologi molekuler di dunia kesehatan akan menjadi solusi di masa depan, hal ini berkaitan dengan deteksi penyakit, tindakan preventif, diagnosis, therapy gen, finger printing bahkan pada rekayasa genetika.

Pada akhirnya penulis berharap bahwa buku ini menjadi salah satu batu loncatan bagi para praktisi khususnya di bidang Ahli Teknologi Laboratorium Medis (ATLM) baik di tingkat praktisi maupun akademisi untuk memahami biologi molekuler secara lebih mendalam.

Pada akhir kata, penulis ingin menyampaikan banyak terimakasih atas terselesainya penulisan ini kepada pihak-pihak terkait, khususnya istri (Dian Delta), kolega Universitas Muhammadiyah Sidoarjo dan teman-teman yang memberi saran guna menyempurnakan buku ini.

Miftahul Mushlih, S.Si., M.Sc

Daftar isi

PENDAHULUAN: PENGANTAR BIOLOGI MOLEKULAR	1
1.1 SEJARAH PERKEMBANGAN BIOLOGI MOLEKULAR	1
1.2 RUANG LINGKUP BIOLOGI MOLEKULAR	5
1.3 HUMAN GENOM PROJECT	8
1.4 PERSAINGAN AKURASI, PRESISI DAN HARGA	10
1.5 LATIHAN SOAL	12
SEL DAN ISINYA	13
2.1 PENGERTIAN SEL	13
2.2 PEMBAGIAN ORGANISME MAKHLUK HIDUP	16
2.3 ORGANEL-ORGANEL SEL	19
2.3.1 <i>Membrane sel</i>	19
2.3.2 <i>Inti sel</i>	25
2.3.3 <i>Mitokondria dan Kloroplas, organel yang mempunyai DNA mandiri</i>	26
2.3.4 <i>Retikulum Endoplasma, tempat berlabuhnya mRNA</i>	28
2.3.5 <i>Ribosom</i>	29
2.3.6 <i>Kompleks Golgi</i>	30
2.3.7 <i>Lisosom, organel pencernaan intrasellular</i>	30
2.4 LATIHAN SOAL	34
SIFAT DASAR MATERI GENETIK	36
3.1 PENGERTIAN MATERI GENETIK	36
3.2 MENGENAL LEBIH DEKAT DNA	39
3.3 STRUKTUR DNA DAN RNA	41
3.4 POLIMORFISME VS KELAINAN GENETIC	45
3.5 LATIHAN SOAL	47
KROMOSOM	48
4.1 PENGERTIAN KROMOSOM	48

4.2 BAGIAN DAN PERAN PENGENDALIAN KROMOSOM	50
4.3 KELAINAN KROMOSOM.....	52
4.4 KETERKAITAN KELAINAN KROMOSOM DENGAN KELAINAN GEN.....	53
4.5 LATIHAN SOAL.....	54
EKSPRESI GEN	55
5.1 STRUKTUR DAN BAGIAN BAGIAN GEN.....	55
5.2 SIKLUS SEL.....	59
5.3 REPLIKASI	60
5.4 TRANSKRIPSI	64
5.4.1 Transkripsi Pada Prokariot	64
5.4.2 Transkripsi pada eukaryota	66
5.5 TRANSLASI.....	72
5.6 LATIHAN SOAL	74
PEMANFAATAN BIOLOGI MOLEKULAR.....	75
6.1 APLIKASI BIOLOGI MOLEKULAR.....	75
6.2 MUTASI GENETIK.....	78
6.3 SNP (<i>SINGLE NUCLEOTIDE POLIMORFISME</i>)	80
6.4 LATIHAN SOAL.....	84
ISOLASI DNA	85
7.1 PENGERTIAN ISOLASI DNA	85
7.2 PERKEMBANGAN ISOLASI DNA.....	88
7.3 LATIHAN SOAL	90
POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	91
8.1 KONSEP DASAR PCR.....	91
8.2 THERMOCYCLER DAN TAHAPAN PCR.....	92
8.2.1 <i>Pre-denaturasi</i>	93
8.2.2 <i>Denaturasi</i>	93
8.2.3 <i>Annealing</i>	93
8.2.4 <i>Elongasi</i>	94
8.2.5 <i>Siklus PCR</i>	94
8.3 BAHAN BAHAN PCR	96
8.3.1 <i>Enzim Taq DNA Polimerase</i>	96
8.3.2 <i>DNA Template</i>	96
8.3.3 <i>Primer Spesifik</i>	96
8.3.4 <i>mg²⁺</i>	98

8.3.5 dNTP	98
8.4 LATIHAN SOAL.....	98
UJI KUALITAS DNA	100
9.1 UJI KUALITATIF MENGGUNAKAN ELEKTROFORESIS	101
9.2 FAKTOR FACTOR YANG MEMPENGARUHI ELEKTROFORESIS.....	103
9.3 CARA KERJA ELEKTROFORESIS	106
9.4 ANALISIS HASIL ISOLASI DNA SECARA KUALITATIF.....	107
9.4 UJI KUALITAS DNA SECARA KUANTITATIF	113
<i>Kemurnian DNA</i>	<i>113</i>
BIBLIOGRAFI	117

Pendahuluan: Pengantar Biologi Molekular

- 1.1 Sejarah perkembangan biologi molekular
- 1.2 Cakupan Biologi Molekular
- 1.3 Pengaruh Human Genom Project
- 1.4 Persaingan Akurasi, Presisi dan Harga



1.1 Sejarah Perkembangan Biologi Molekular

Mendengar kata biologi molekular mungkin akan menimbulkan beberapa prasangka, beberapa menganggap ini adalah metode yang rumit, mahal atau ada yang menganggap ini adalah metode terbaru dan kekinian. Semua tergantung dari pengalaman dan pengetahuan awal dari penggunaanya. Apabila menilik dari mulai berkembangnya ilmu di dunia molecular, biologi molekular masih bisa dikatakan ilmu yang masih seumuran jagung (berkembang pesat sejak 1953). Namun demikian sumbangsih penelitian yang mendalam dan keakuratannya bisa diandalkan karena menyentuh dari inti sebuah pengatur kehidupan yaitu materi genetik baik berupa DNA maupun RNA. Hal ini membuat ilmu biologi molekular berkebang sangat pesat, bahkan mengalahkan primadona pada cabang cabang keilmuan biology lainnya.

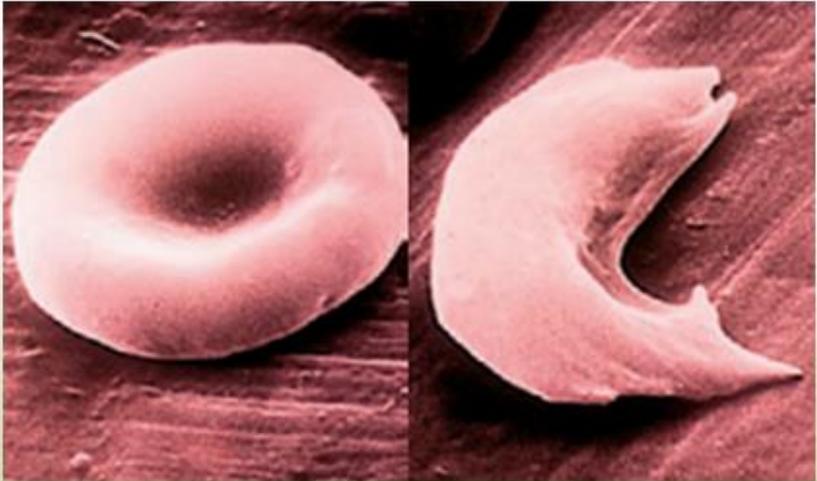
Perkembangan ilmu Biologi Molekular tidak lepas dari sejarah panjang ilmu pengetahuan khususnya dibidang hayati.

Bermula pada tahun 1665 sejak Robert Hooke memperkenalkan istilah **sel** yang merupakan hasil pengamatannya menggunakan microscope sederhana dengan perbesaran 30X. Sel dibuat dari irisan melintang tumbuhan, yang sejatinya nampak adalah dinding sel. Pengetahuan tersebut bertahan lebih dari satu abad sampai akhirnya Anton van Leeuwenhoek (1680) menemukan sebuah mikroskop yang mampu melihat benda-benda kecil yang membuktikan secara lebih mendetail apa yang dimaksud oleh Hooke. Anton van Leeuwenhoek juga menemukan adanya aktivitas sel, berupa cairan kental yang berputar-putar, mulanya Anton menamai cairan tersebut dengan "*Juice*". Dan seiring dengan berkembangnya ilmu pengetahuan "*Juice*" ini adalah sitoplasma.

Pada tahun 1833 Robert Brown memperkenalkan istilah *nuclei* sebagai inti sel. Pengamatan tersebut berdasarkan adanya titik hitam yang tampak pada setiap pengamatan yang dia lakukan. Pada tahun 1839, Schleiden dan Schwann memperkenalkan istilah sel sebagai unit dasar penyusun kehidupan. Berlanjut dengan penelitian Mendel 1865 memperkenalkan teori persilangan dengan menerangkan istilah "*factor* pewarisan" sebagai suatu unit yang diwariskan dari *parental* (orang tua) ke keturunannya. Faktor pewarisan ini yang mengontrol morfologi anakan dari induknya. Empat tahun selanjutnya (1869) F Miescher memperkenalkan istilah *Nuclein* sebagai sesuatu yang sebelumnya dijelaskan oleh Mendel.

Tahun 1879 W. Flemming memperlihatkan adanya chromosome pada proses mitosis, namun demikian Flemming sendiri belum mengetahui dan memberi nama istilah chromosome. Chromosome diperkenalkan oleh Waldeyer pada tahun (1888). Setahun kemudian Altmann memperkenalkan istilah baru yang merupakan bagian dari kromosom yaitu asam nukleat. Morgan, Sturtevant, Muller, dan Bridges (1915) mencoba menjelaskan secara lebih mendetail mengenai gen, dan menyatakan gen terletak pada

kromosom yang ikut terwariskan oleh kromosom. Sampai pada tahun 1950-an pengetahuan ini masih bersifat stagnan dan berkembang pada lingkup deksripsi dan aktifitas chromosome.



**Gambar 1. Sel Hemoglobin normal (kiri) Hemoglobin sel sabit (Kanan)
(diadaptasi dari Hardwell et al., 2011)**

Avery dkk. (1944) membuat gagasan bahwa DNA adalah materi dasar pembawa informasi genetik. Sampai akhirnya Chargaff mengidentifikasi bahwa terdapat jumlah yang sama pada basa nukleotida yang diduga berpasangan, yaitu timin dengan adenine dan guanin dengan sitosin. Pauling beserta tim pada tahun 1949 mengenalkan terjadinya kesalahan konformasi salah satu protein pada sel darah merah, kesalahan konformasi tersebut mengakibatkan kurangnya kebutuhan oksigen tubuh akibat pengikatan oksigen oleh sel darah merah (eritrosit) kurang optimal. Namun demikian penggambaran terjadinya kelainan tersebut masih

sangat sulit dibayangkan karena kesimpangsiuran asumsi kenapa hal kesalahan bisa terjadi (lihat Gambar 1).

Perkembangan Biologi molekular mulai berkembang pesat pada era 1953 yaitu pada saat Watson dan crick menemukan struktur *Deoxiribo Nucleic Acid (DNA)*. Penemuan ini sebenarnya sungguh amat tidak terduga mengingat kedua orang ini masih muda belia. Karya yang benar benar mengubah segala tatanan diilmu pengetahuan dan seluruh cabang yang menjadikan MakhluK hidup sebagai objek kajian. Ilmu ilmu lain yang turut berdampak adalah baik itu biologi, kedokteran, pertanian, peternakan, perikanan, kesehatan dan ilmu ilmu lain yang berkecimpung dengannya.



Gambar 2. Francis Crick and James Watson (Sumber: Snustad & Simmons, 2012)

Pada tahun 1960 telah berhasil ditemukan enzim yang berfungsi sebagai pemutus rantai DNA yang bernama Enzim restriksi. Selain itu ditemukan pula enzim *reverse transcriptase* pada waktu yang sama. Sampai saat ini kedua enzim ini memiliki fungsi yang signifikan di dunia kesehatan. Enzim *reverse transcriptase* digunakan untuk mengubah konformasi RNA menjadi rantai ganda DNA. Aplikasi Enzim restriksi dimodifikasi menjadi suatu metode yang disebut *Restriction Fragment Length Polymorphism* dan saat itu mampu digunakan untuk mendeteksi kelainan yan

Perkembangan dunia molekular selanjutnya dilanjutkan oleh Maxam, Gilbert dan Sanger, yang mengembangkan metode sequencing (1977). Dengan metode ini memungkinkan mengetahui

urutan basa nukleotida dari suatu sekuen. Pada tahun 1978, pertama kalinya dilakukannya rekayasa genetika dengan cara memasukkan gen pengkode insulin kedalam bagteriophage, ini menjadi tolak awal pemanfaatan di dunia kesehatan, mulai saat itu para penderita diabetes type I tidak perlu khawatir karena hormone yang mereka butuhkan sudah dapat disintesis secara buatan. Pengembangan alat sequencer secara otomatis selesai dikerjakan pada tahun 1986. Beberapa tahun kemudian muncul ide yang merupakan gagasan awal sebagai tolak ukur perkembangan pengetahuan fungsi dan mekanisme DNA yaitu *Human Genom Project* (HGP).

Tahun 1989 mulai didirikan *National Center for Human Genom Project* (HGP), yang diketuai langsung oleh James Watson. HPG ditargetkan selesai tahun 2005, namun akibat dari cepatnya perkembangan Bioinformatik dan teknologi mega proyek tersebut justru selesai pada tahun 2001 yang berupa draf lengkap sekuen genom manusia. Perayaan HPG disepakati dilakukan dua tahun berikutnya yaitu 2003 bertepatan pada peringatan ditemukannya DNA yang ke 50 tahun. Seiring dengan perjalanan HGP terselesaikan pula proyek genomik lainnya, diantaranya yang telah selesai adalah Human Influenzae virus yang slesai pada tahun 1995, *Drosophila melanogaster* (lalat buah) telah slesai pada kromosom 5, 16, 19 dan 21.

1.2 Ruang Lingkup Biologi Molekular

Biologi molekular memiliki cakupan yang cukup luas, pada awal perkembangannya. biologi molecular juga sulit dipisahkan dari biokimia dan merupakan ketimpangan. Akan tetapi sejak Biokimia mengkhususnya diri sebagai sebuah cabang ilmu biologi yang

membahas mengenai reaksi-reaksi kimia yang terjadi di dalam sebuah sel atau pun Makhluk hidup maka Biologi molekular memiliki kesempatan untuk masuk kedalam sebuah kesatuan ilmu tersendiri. Sebenarnya dari segi keterkaitan dengan cabang ilmu lain maka biologi molekular bisa masuk kesalam seluruh aspek selagi yang ditinjau berkaitan dengan DNA, RNA, asam amino atau protein. Sebelum melangkah lebih lanjut sebaiknya kita pahami dulu pengertian biologi molekular.

Secara istilah biologi molekular merupakan ilmu yang membahas mengenai *struktur, proses, dan mekanisme yang terjadi pada tingkat DNA, RNA, asam amino, & Protein*. Secara garis besar Biologi molekular dipisah berdasarkan kajian yang diamati yaitu genomic dan proteomik. Genomic membahas mengenai struktur, proses dan mekanisme yang berkaitan dengan DNA dan RNA, secara lebih luas dimulai dari struktur, proses transkripsi, proses modifikasi DNA, Alternatif splicing, transformasi dari inti sel ke sitoplasma, proses terjadi pengikatan mRNA oleh ribosom, sampai pada pelepasan mRNA dari Ribosom. Proteomik membahas mengenai struktur asam amino, modifikasi rantai asam amino, dan struktur protein.

Diatas dijelaskan bahwa semua cabang makhluk hidup dapat ditinjau melalui biologi molekular, disini kita ambil contoh kelainan diabetes mellitus, yang berkaitan dengan disfungsi atau resistensi insulin, diabetes bisa dilihat sebagai cabang ilmu kimia klinik kalau dikaitkan dengan diagnose, akan tetapi apabila dikaitkan dengan mutasi yang terjadi pada pasien diabetes mellitus maka hal tersebut akan masuk kedalam bahasan biologi molekular. Toxoplasma yang merupakan gangguan kehamilan yang diakibatkan oleh protozoa apabila dikaitkan dengan morfologi dan tahapan organisme tersebut masuk kedalam manusia sehingga mampu membuat gangguan kehamilan maka dapat dikatagorikan sebagai

bagian dari ilmu parasitology, akan tetapi apabila dikaitkan dengan cara deteksi dengan menggunakan deteksi DNA pada pathogen maka bahasan ini masuk kedalam ranah biologi molekular.

Penelitian mengenai malaria, apabila ditinjau dari gejala yang ada dan pemeriksaan dilaksanakan maka dapat masuk dalam bidang kimia klinik atau parasitology, apabila kajian difokuskan kedalam persebaran kejadian malaria maka masuk kesalam kajian epidemiologi. Malaria ditinjau dari deteksi molecular atau untuk mengetahui strain dari protozoa tersebut bisa dimasukkan kedalam cakupan biologi molecular. Diantara harapan terhadap HGP adalah

1. Pengembangan pengobatan secara molecular, ksesalahan genetic seperti kelainan pada penyakit alzheimer, kanker payudara, dll merupakan beberapa penyakit yang diakibatkan oleh berbagai macam genetic.
2. Pemahaman fungsi genom pada manusia, implikasi dari pemahaman ini menjadi dasar didalam berbagai macam pengobatan. Beberapa modifikasi sel pluri potent sangat memerlukan pemahaman fungsi genom dan ini sudah mulai dilirik dan dilakukan oleh para ilmuwan. Kelainan sedikit saja pada gen ini mengakibatkan suatu kelainan fenotip yang fatal. Penelitian seperti ini juga meliputi akibat dari tinggi dan rendahnya suatu ekspresi gen.
3. Memahami evolusi organisme. Salah satu misteri yang sampai saat ini belum terpecahkan adalah bagaimana makhluk hidup seperti manusia berevolusi. HGP menjadi salah satu kunci mengingat pemahaman evolusi pada manusia tentu tidak bisa menggunakan beberapa gen saja.
4. Identifikasi Penyakit infeksi. Semenjak diketahuinya bahwa manusia mampu diserang penyakit dari beberapa microorganism, penanganan terutama metode untuk identifikasi berusaha untuk dikembangkan. Beberapa metode

manual yang sudah ada seperti menggunakan basic immunology, microscopy, uv spectrofotometry dan lain sebagainya dianggap banyak menyita waktu dan memiliki keakuratan yang rendah. Dengan HGP sangat diharapkan mampu menjadi terobosan untuk mendeteksi lebih akurat.

5. Skreening potensi kelainan. Banyak gen yang tidak dapat bekerja sendiri dan harus distimulasi oleh lingkungan. Kelainan seperti ini harus ada dua factor yang mendukung, factor pertama adalah genetic dan kedua adalah kebiasaan hidup. dengan diketahuinya potensi terhadap suatu kelainan maka seseorang bisa menjaga pola hidup supaya kelainan tidak terekspresi / terjadi.
6. aplikasi forensik, tidak disangka HGP membuat perkembangan semakin cepat, salah satunya yaitu teknologi fingerprinting, atau analisa DNA.

1.3 Human Genom Project

Alasan yang paling fundamental terhadap adanya *Human Genome Project* adalah demi kemaslahatan kesehatan manusia. Berdasarkan penelitian-penelitian yang terhadulu bahwasannya gen (teori yang diutarakan mendel) merupakan unit hereditas dan terdapat kelainan yang secara eksplisit diwariskan dari kedua orang tua kepada keturunan maka muncullah sebuah gagasan perlu dilakukan identifikasi kode genetic pada manusia.

Penataan begitu banyak data dari berbagai laboratorium didunia memicu adanya mekanisme pengolahan bioinformatik yang memadahi, selain itu alat alat pendukung seperti alat sekuensing yang merupakan kunci keberhasilan HGP juga mengikuti perkembangan yang jauh dari perkiraan. Kesuksesan HGP

sebenarnya juga tidak lepas dari berkembangnya sarana dan prasarana di bidang internet. Yang mana media ini mampu memberi tempat atau wadah mengumpulkan data dari seluruh dunia untuk dijadikan satu dan dapat diakses secara bebas oleh siapapun. Akses ini yang kemudian kita kenal sebagai Gene Bank. Inilah yang mengakibatkan HGP berlangsung dua tahun lebih cepat dari waktu yang telah dialokasikan. Selain itu, proyek ini juga memicu tumbuhnya perusahaan perusahaan untuk menyediakan kebutuhan molekular, sejak saat itu pula mulai muncul kit kit kemikalia untuk mempermudah proses molekular.

Pengaruh lain yang dirasakan cukup signifikan. Segala sesuatu sekarang selalu dikaitkan dengan struktur dan mekanisme materi genetic. Sebagai contoh seseorang yang dulu terkena Tuberculosis (TB) akan diperiksa menggunakan metode kultur yang membutuhkan waktu yang lama, dengan munculnya penelitian dan teknologi dibidang molekular pemeriksaan berubah lebih cepat dengan memanfaatkan Real time PCR. Bahkan pemerintah mencanangkan pengadaan mesin otomatis pendeteksi TB secara besar besaran.

Sebenarnya aplikasi Metode Biomol memberikan kelebihan yang tidak dimiliki oleh metode lain (akan di bahas pada sub bab berikutnya). Biomol juga mampu menjadi metode screening untuk kelainan kelainan tertentu yang bersifat mutasi atau sindromik. Sebagai contoh kelainan diabetes yang disebabkan oleh kerjasama oleh beberapa gen serta harus ada dukungan dari factor lingkungan. Kini seseorang memungkinkan untuk melakukan screening yang bertujuan apakah seseorang tersebut memiliki potensi terkena kelainan tersebut. Ketika seseorang dinyatakan telah mewarisi kelainan tersebut sehingga ada kemungkinan dikemudian hari orang tersebut terkena sindroma maka ia harus berusaha menjaga gaya hidup dan terus berfikir positif.

Para ilmuwan juga mampu memprediksikan bentuk obat-obatan yang cocok untuk mengandalkan, baik mempercepat atau menghambat ekspresi genetik melalui aplikasi, metode ini lebih lazim disebut dengan *insilico*. Metode ini memungkinkan untuk menemukan zat yang cocok dan efektif untuk penyembuhan penyakit. Setelah itu zat tersebut kemudian dicari di Alam. *Insilico* di claim menjadi inovasi teknologi masa depan.

Berbagai kepustakaan dikumpulkan secara konperhensive sehingga para ilmuwan akan dengan mudah untuk menentukan apakah gen target pada suatu kelainan tersebut mempunyai kelainan atau tidak. Dengan ini pula seseorang dapat mengetahui penyebab penyakit secara lebih mendetail mengenai pathogen baik bakteri virus, protozoa atau annelida. Beberapa penelitian mengungkapkan mampu mengidentifikasi suatu bakteri apakah bakteri ini telah resisten atau belum terhadap beberapa jenis obat atau digunakan pula untuk mengetahui golongan (baca:strain) mana bakteri ini berasal. Pendeskripsian seperti ini penting untuk tindakan curative atau pengobatan yang tepat. Perkembangan HGP juga mengarah terhadap teknologi teknologi dalam dunia kesehatan. Salah satu inovasi yang sekarang berkembang adalah Stem cell yang mengembangkan modifikasi untuk differensiasi. Teknologi ini memungkinkan supaya membentuk sel yang baru.

1.4 Persaingan Akurasi, Presisi dan Harga

Dengan memanfaatkan metode biologi molekular untuk mendeteksi atau mendiagnosa suatu penyakit tentu ada kelebihan dan kekurangan yang ditawarkan. Urusan yang berkaitan dengan biologi molekular berkaitan langsung dengan blue print kehidupan yaitu materi genetik (DNA dan RNA). Metode ini masih di anggap

baru dan belum familiar dikalangan pemeriksaan klinik. Hal ini terbukti bahwa analisa ini belum digunakan secara luas. Hanya beberapa klinik kesehatan saja yang menawarkan dan baru beberapa penyakit atau infeksi yang dianalisis.

Identifikasi kelainan genetik atau suatu penyakit yang diwariskan dapat dilakukan dengan cara menganalisa gen spesifik yang mengkode atau berperan didalam kelainan tersebut, sedangkan untuk mengidentifikasi sebuah pathogen maka gen yang harus dianalisa adalah gen spesifik yang mampu menunjukkan keberadaan pathogen spesifik tersebut.

Identifikasi secara molekular menjanjikan kecepatan, keakuratan serta biaya yang terjangkau. Molekular menjadi sangat penting karena memiliki keseragaman di bagian metode. Mesin yang digunakan juga relative sama sehingga hemat didalam pengadaan alat operational (multifungsi). Metode yang sering digunakan didalam diagnosis antara lain polymerase chain reaction, real-time polymerase chain reaction, probe-based assays, bioluminescence real-time amplification, dan microarray atau micropump technologies

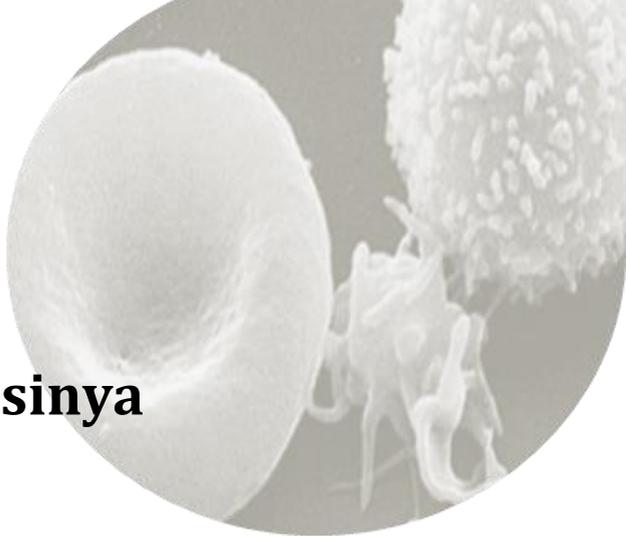
Banyak orang menganggap bahwa pemeriksaan molekular selalu mahal, dan membutuhkan alat alat canggih. Anggapan ini tentu tidak sepenuhnya benar. Mahalnya bahan bahan molekular tentu tidak terlepas dari produsen yang kesemuanya berasal dari luar negeri. Sehingga barang yang dibutuhkan bersifat impor, tentu dengan demikian maka tidak akan terlepas pula dengan pajak yang harus di tanggung. Selain itu pembelian juga tidak dapat dilakukan dengan jumlah yang sedikit, sebagai contoh pembelian pcr mix, minimal pembelian biasanya sekitar 1 ml sedangkan untuk menggunakan hanya berkisar 12.5 μ l atau lebih kecil. Bahan bahan yang lain juga harus di beli dalam jumlah yang besar dengan pemakaian yang relative sedikit.

Keunggulan metode biologi molekular dibandingkan dengan metode lain adalah keseragaman alat. Dengan alat yang relative sama pada setiap pemeriksaan, dan berbagai macam perlakuan yang dapat dilakukan maka dalam jangka panjang ini dapat menjadi sangat murah dan efisien. Terlebih telah dikembangkan pula alat alat yang memiliki keunggulan yang semakin mempermudah pengguna untuk melakukan pemeriksaan.

1.5 Latihan Soal

1. Jelaskan Perbandingan Cakupan Biologi Molekular dengan ilmu ilmu lainnya seperti genetika, Biokimia dll!
2. Jelaskan Bagaimana Pengaruh dan Potensi Human Genome Project terhadap dunia kesehatan di masa mendatang!
3. Dimasa yang akan mendatang, Biologi Molekular digadang gadang menjadi metode yang sangat menjanjikan, jelaskan alasan dan faktor apa saja yang mendukung pernyataan tersebut!

Sel dan Isinya



- 1.1 Pengertian sel
- 1.2 Pembagian Organisme Makhluk Hidup
- 1.3 Struktur sel Prokariotik
- 1.4 Struktur sel Eukariotik
- 1.5 Organel Organel sel
- 1.6 Hubungan antara reticulum endoplasma dan kompleks golgi berkaitan dengan sintesis protein

2.1 Pengertian sel

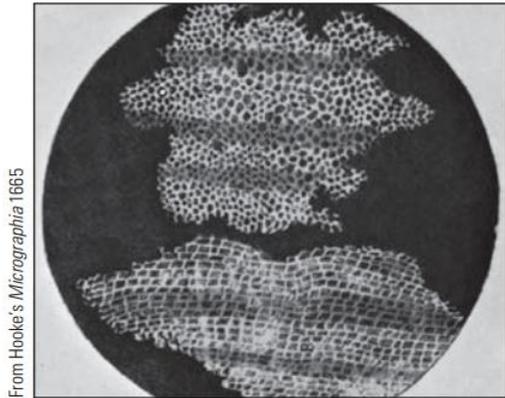
Sejak dari pendidikan sebelumnya Sekolah dasar (SD), Sekolah menengah pertama (SMP), Sekolah Menengah Atas (SMA) kita telah dikenalkan dengan istilah sel, apabila kita ditanya mengenai pengertian sel maka mayoritas kita akan menjawab

“sel adalah struktur terkecil penyusun makhluk hidup”.

Tidak salah memang kita menjawab demikian karena dari dulu kita ditatanamkan pemahaman seperti itu. Namun demikian kita perlu diskusikan, apabila penyusun terkecil dari makhluk hidup adalah sel apakah tidak ada struktur yang lebih kecil dibandingkan dengan sel. Padahal sel sendiri memiliki bagian bagian yang kecil dan rumit. Di dalam sel kita temukan organel organel, didalam

organel ada struktur yang lebih kecil lagi baik berupa materi genetik atau protein structural. Lalu kenapa bagian yang lebih kecil tersebut tidak disebut dengan istilah sel.

Apabila dilihat dari segi ukuran, apakah setiap sel itu berukuran kecil? Tentu kalo kita melihat dari kenyataan kehidupan sehari hari, sel tidak selalu kecil sehingga kita membutuhkan alat bantu baik berupa kaca pembesar atau mikroskop hanya untuk melihat sel.



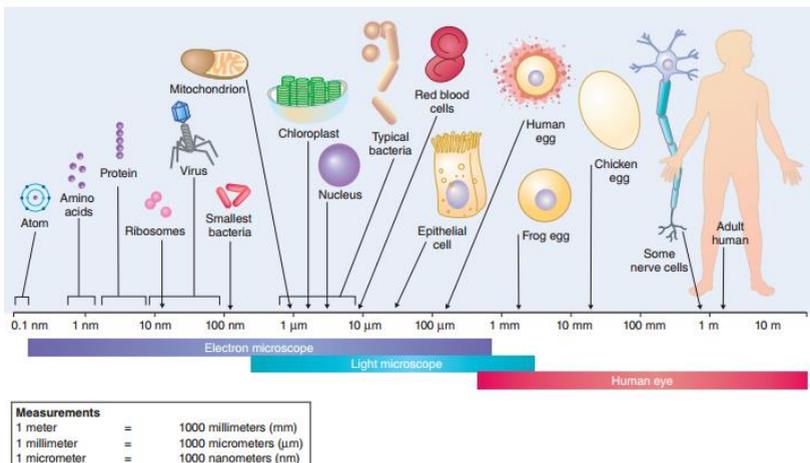
Gambar 4. Pengamatan sel oleh Robert Hooke (Sumber: Solomon, 2011)

Dilihat dari pengertian sel memang sulit untuk menemukan pengertian yang paling tepat. Dikatakan kecil, sel belum tentu memiliki ukuran yang kecil. Dikatakan sederhana, sel memiliki mekanisme yang luar biasa didalamnya yang bahkan sampai saat ini para ilmuwan belum paham sepenuhnya. Masih banyak misteri dari sel yang perlu diungkap. Kesulitan ini diakibatkan oleh begitu banyak mekanisme, dan beranekaragamannya bentuk dan fungsi pada setiap sel. Setidaknya kita paham sel bukan hanya sesederhana pengertian yang selama ini diutarakan.

Sel pertama kali kemukakan oleh Robert Hook pada tahun 1665 memang pertama kali dideteksi sangat kecil sehingga pada waktu itu membutuhkan kaca pembesar. Disebut “cell” karena bentuknya mirip dengan bilik bilik yang teratur mirip dengan ruang tahanan (Gambar 4). Beberapa sel memang memiliki ukuran yang sangat kecil seperti pada beberapa bakteri yang hanya 0.2–0.3 μm

saja. Akan tetapi beberapa sel juga memiliki ukuran yang sangat panjang mencapai 1 meter lebih yaitu sel saraf. Telur cicak yang berukuran kecil dan bisa kita raba dan pegang adalah sebuah sel. Telur ayam yang biasa kita makan sebetulnya adalah sebuah sel, yaitu sel telur. Sehingga dengan demikian kita perlu merubah mainset yang ada. Pengetahuan mengenai sel baru disadari pada saat sudah diketahui sel tidak sesederhana asal mula penamaannya.

Suatu zat dikatakan sebuah sel apabila dia adalah **struktur terkecil dan fungsional penyusun makhluk hidup**. dalam beberapa buku dikatakan sel merupakan unit organisasi structural yang mampu mengendalikan kegiatan sebagai sebuah kegiatan kehidupan. Kegiatan yang dimaksud adalah metabolisme (baik anabolisme maupun katabolisme), respon terhadap lingkungan (respon fisik maupun kimiawi), tumbuh dan berkembang. Meskipun tidak semua sel mampu melakukan itu semua setidaknya memberi gambaran tentang. Beberapa buku mengatakan bahwa sel



Gambar 5. Berbagai ukuran molekul dan makhluk hidup (Sumber: Solomon, 2011)

merupakan struktur fundamental kehidupan. Fundamental dalam artikata dasar yang berarti bentukan yang paling sederhana dan mendasar.

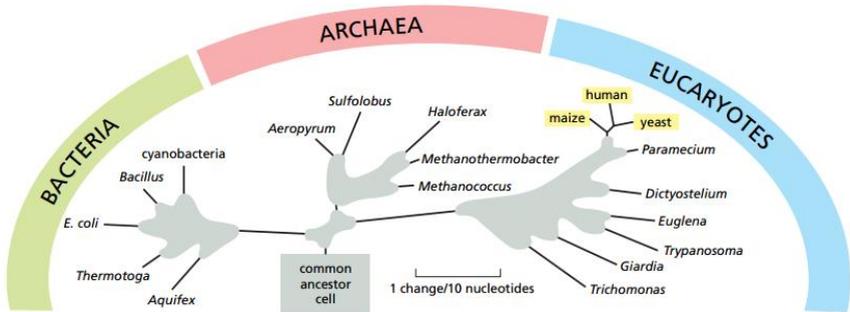
Mayoritas ilmuwan dan buku terbaru menyebutkan *cell is the basic unit of biology* yang berarti sel adalah unit dasar pada kehidupan. Meskipun penjelasan ini terkesan sangat luas namun tentu definisi ini mempertimbangkan banyak hal. Sel Protista tentu memiliki kekompleksitasan yang sangat tinggi karena harus mengatur seluruh kegiatan sel untuk menghidupi kegiatan organisme selular.

2.2 Pembagian Organisme Makhluk Hidup

Seperti yang telah dijelaskan diawal, sel merupakan bagian yang sangat rumit dan kompleks sehingga sepertinya belum ada istilah yang tepat untuk menggambarkannya. Namun ditinjau dari struktur dari sel, para ilmuwan menggolongkan Makhluk Hidup menjadi **selular** dan **aselular (Non-selular)**. Virus seringkali di jadikan sebagai contoh organisme peralihan antara hidup dan mati, aktifitas virus hanya bisa dilihat ketika berada di makhluk hidup lain atau berperan sebagai parasit. Makhluk hidup selular dimulai dari kelompok bakteri yang sudah memiliki komponen yang menjadi dasar dari sebuah sel mulai dari sitoplasma, membran sel, dan materi genetik inti.

Pembagian makhluk hidup ditinjau dari kompleksitas sel dapat dibagi menjadi **prokariot** dan **eukariot**. Sel prokariot merupakan sel yang relative lebih sederhana, belum memiliki membrane intraselular (inti sel dan organel lainnya selain ribosom). Sel eukariot memiliki bentukan lebih maju dibandingkan dengan prokariot karena dilengkapi dengan struktur membrane dalam,

sehingga jenis sel ini sudah memiliki inti sel, mitokondria, kloroplas, retikulum endoplasma, kompleks golgi dan lainnya. Anggota dari eukariot lebih banyak termasuk dalamnya, fungi, plantae, protozoa, Animalia.



Gambar 6. Filogenetik tiga domain (Albert, 2001)

Pembagian makhluk hidup ditinjau dari jumlah sel untuk menjadi sebuah individu maka di bagi menjadi **Unisellular** dan **multisellular**, makhluk hidup unisellular adalah makhluk hidup yang hanya terdiri dari satu sel. Kelompok ini adalah sebagian besar makhluk yang ada yaitu Eubacter, Archaeobacter, dan Protista. Sedangkan berdasarkan pembagian atau pengelompokan system domain, makhluk hidup dibagi menjadi tiga yaitu Eubacteria, Archaeobacteria dan Eukariota. Eubacteria merupakan kelompok dari bakteri, didalamnya dapat dibagi menjadi cyanobacter, bacteria gram positive, bakteri gram negative, flavobacter dan bacteria ungu. Sedangkan Archaeobacter merupakan bakteri yang hidup pada lingkungan ekstrem, dan di bagi menjadi halophile, Metanogen dan thermophiles.

Tabel 1. Karakter Pembidaan karakter anggota tiga domain

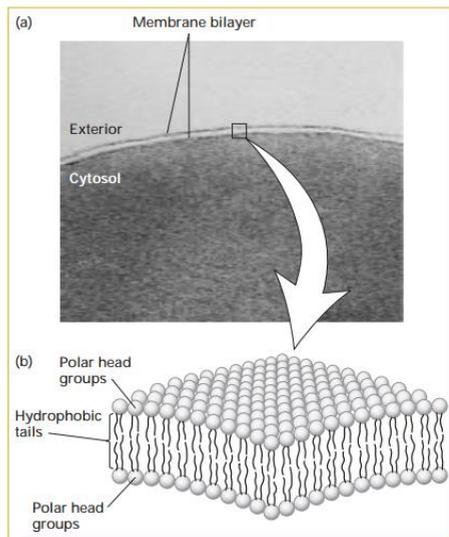
KARAKTERISTIK	DOMAIN		
	Bacteria	Archaea	Eukarya
Pembungkus Inti (Nukleus)	Tidak Ada	Tidak ada	Ada
Membran yang membungkus organel dalam sel	Tidak ada	Tidak ada	Ada
Keberadaan peptidoglikan pada dinding sel	Ada	Tidak ada	Tidak ada
Lemak membran	Hidrokarbon tidak bercabang	Hidrokarbon bercabang beberapa	Hidrokarbon tidak bercabang
RNA polimerase	Satu jenis	Beberapa jenis	Beberapa jenis
Asam amino penginisiasi untuk sintesis protein	Formylmethionine	Methionine	Methionine
Keberadaan intron di dalam gen	Sangat jarang	Ada pada beberapa gen	Ada
Respon terhadap antibiotik (streptomycin & chloramphenol)	Pertumbuhan terhambat	Pertumbuhan tidak terhambat	Pertumbuhan tidak terhambat
Keberadaan histon yang terasosiasi dengan dna	Tidak ada	Ada pada beberapa spesies	Ada
Kromosom berbentuk cirkular	Ada	Ada	Tidak ada
Tumbuh pada suhu > 100 oC	Tidak	Beberapa Spesies	Tidak

Manusia dikelompokkan pada eucariota, Animalia, yaitu kelompok organisme yang memiliki ciri memiliki membran inti sel (nukleus). Perlu perjalanan panjang penggolongan makhluk hidup seperti yang ada sekarang, dimulai klasifikasi sederhana yaitu tumbuhan dan hewan sampai dengan yang sekarang ada. Klasifikasi didasarkan pada kemiripan organisme. Karakter karakter yang dijadikan pembeda antara ketiga domain bacteria, Archaea, dan eukariota antara lain ada tidaknya Pembungkus inti (nukleus), Membran yang membungkus organel dalam sel, Lemak Membran, jenis jenis RNA Polimerase, jenis Asam amino penginisiasi untuk sintesis protein, Keberadaan Intron di dalam gen, keberadaan intron, kemampuan hidup didalam lingkungan ekstrem dan lain-lain.

2.3 Organel-organel sel

2.3.1 Membrane sel

Membrane sel merupakan bagian yang paling luar pada sel. Selain melindungi isi sel, membrane sel juga berfungsi sebagai media untuk transportasi suatu zat, memisahkan bagian internal dan eksternal sel. Bentuk dari membrane mirip dengan kue terang bulan yang dilipat menjadi dua, sehingga terbentuk bentukan dwi-layer atau



Gambar 5. Struktur Membran sel
(Lodish et al, 2001)

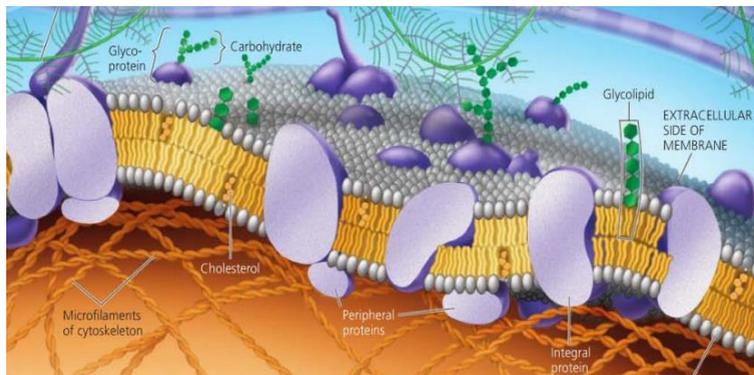
berlapis dua dengan ketebalan 2 nm. Berdasarkan struktur tersebut, membrane sel pada seluruh organisme memiliki kemiripan sifat. Bagian luar bersifat hidrofilik (larut dengan air) yang tersusun atas fosfat dan bagian dalam bersifat hidrofobik (tidak larut dengan air) yang tersusun atas lipid, ini sebabnya sifat membrane lebih cenderung mudah bersatu dengan sitosol (cairan sel) yang memiliki struktur non polar. Begitu juga dengan membrane membrane yang berada didalam organel-organel sel, seperti retikulum endoplasma, kompleks golgi, vakuola, lisosom dan kloroplas, strukturnya mirip dengan membran luar sel. Membran sel menjaga bentuk sel dan organel organel tetap solid.

Dengan lipid yang terdapat dibagian tengahnya, membran sel bersifat sangat fleksibel. Di dukung pula oleh protein-protein yang membentang memuat bentukan membrane sel bersifat multifungsi. Membran sel mampu menyeleksi molekul yang akan masuk dan keluar sel. Protein yang ada disela sela dengan besar sekitar 6 nm menjadi pembeda fungsi pada setiap membran. Pada prokariotik bagian membran termodifikasi khusus untuk membentuk ATP. Sel sel membran lain termodifikasi untuk mengantarkan impuls seperti terdapat pada sel sel saraf. Pada seluruh sel, terdapat pula protein yang berfungsi sebagai reseptor. Berguna untuk pengendalian dan pengenalan antara yang ada didalam sel dan di luar sel, termasuk koordinasi dengan sel sel lain.

Gula yang mengandung molekul lipid maka disebut sebagai glikolipid. Bentukan seperti ini ditemukan hampir diseluruh permukaan membran sel. Memiliki bentuk yang tidak simetris. Pada hewan termasuk mamalia tersusun atas spongiosine, yaitu bentukan yang mirip dengan sphingomyelin. Meskipun konformasi dari membran sel sudah solid dengan struktur doble membran (*bi-layer*) di sela-sela bentuk tersebut terdapat Protein membran yang massanya dapat mencapai 25%. Bahkan pada beberapa organel

penghasil ATP seperti mitokondria massa protein dapat mencapai 75% dari massa membran sel total.

1. Protein integral, yaitu molekul protein yang membentang melewati dua lapis (bilayer) membran sel. Protein tersebut memiliki sifat hidrofilik dan hidrofobik sesuai dengan sifat membran. Bagian hidrofilik terdapat pada bagian yang mengarah ke dalam sitosol dan bagian yang mengarah ke luar sitosol. Sedangkan bagian yang ditengah memiliki sifat hidrofobik sesuai dengan membran dalam sel.
2. Protein eksternal, Biasanya terletak di luar dwilapisan fosfolipid. Protein ini terikat dengan ikatan kovalen pada molekul fosfolipid membran bagian luar, seringkali menerobos hingga pertengahan dan menyentuh bagian hidrofobik.
3. Protein yang terikat pada membran plasma secara tidak langsung, di sambungkan oleh molekul lain. Modifikasi protein ini juga bermacam macam, bisa berupa lipid, polisakarida, glikosa dan lain sebagainya. Pada dasarnya modifikasi ini berfungsi untuk dua hal yaitu komunikasi selular dan yang kedua adalah sebagai jalur transportasi (untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 6).



**Gambar 6. Macam macam Komponen pada membran sel
(Cambel et al, 2012)**

Secara sederhana protein tersebut dapat dikategorikan berdasarkan fungsinya diantaranya:

1. Transportasi

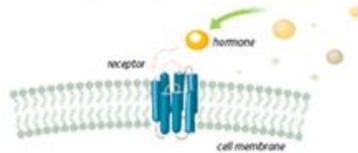
Membran sel berfungsi sebagai tempat keluar masuknya material baik itu sumber energy, distribusi hormone, perpindahan ion atau yang lainnya, beberapa aktivitas embutuhkan ATP untuk

pengeluaran atau pemasukan molekul. Sebagai contoh masuknya

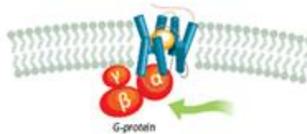
glukosa kedalam sel akan melewati protein membran.

Namun demikian sebelum masuk ke dalam sel konformasi akan dipicu untuk berubah terlebih dahulu oleh hormone insulin.

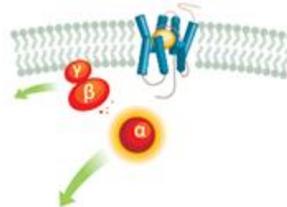
1. Hormone mengikat reseptor



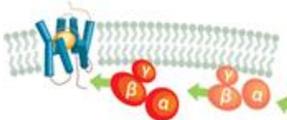
2. Susunan protein didalam sel berubah konformasi



3. Konformasi protein intrasellular mulai berubah, dan mengubah aktifitas didalam sel



4. Reseptor dapat mengaktifkan beratus ratus G coupled Protein selagi konformasi protein dan hormone belum terlepas



Gambar 7. Mekanisme kinerja Hormon dalam mengubah konformasi G-Coupled Membran Protein (diadaptasi dari Lefkowitz dan Kobilka, 2012).

2. Proses Enzimatik

Protein yang terbentang didalam membran sel dapat sebagai media untuk pengatipan proses enzimatik, biasanya berlangsung pada proses metabolisme.

3. Transduksi signal

Transduksi sinal bisa dilakukan melalui media ekstra sellular. Sebagai contoh aktifitas hormone adrenalin yang mana hormone tidak perlu masuk kedalam sel. Akan tetapi cukup dengan mengaktifkan sel dari protein yang ada di luar membran kemudian protein yang didalam intrasellular akan berubah konformasi dan mengaktifkan kegiatan didalam sel.

4. Pengenalan sel

Pada beberapa sel, pengenalan ini penting khususnya bagi sel yang bertugas sebagai antibody.

5. Penggabungan dengan sel lain

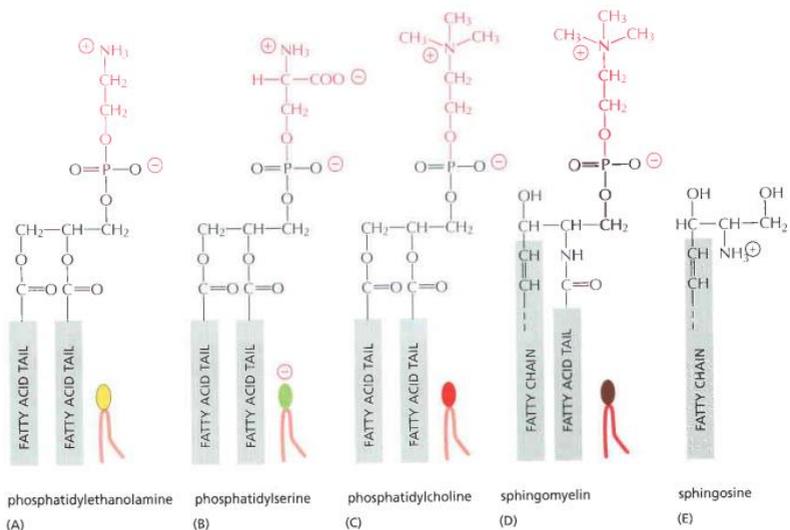
Sel sel yang memiliki bentuk dan fungsi yang sama, khususnya pada sel hewan membutuhkan hubungan yang sangat erat dengan sel lainnya. Bahkan akibat terlalu eratnya hubungan tersebut maka terjadi penggabungan sel.

6. Penggabungan dengan cytoskeleton dan matriks ekstrasellular

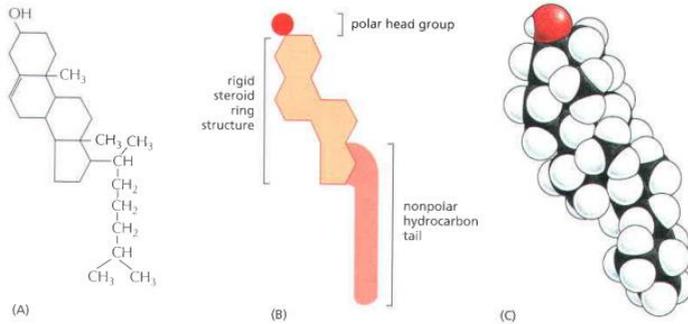
Elemen element lain yang berada di ekstrasullular yang merupakan anggota dari cytoskeleton mungkin membentuk asosiasi yang kuat dengan protein transmembrane. Fungsi utama menjaga bentuk sel dan menjaga sel supaya tetap pada posisinya (lihat gambar 6).

Akibat dari banyaknya fungsi membran sel yang terkait dengan transportasi, koordinasi, dan ekspresi dengan lingkungan maupun sel lain maka diduga 30% dari genom mengkode protein transmembrane. Ada sekitar 5×10^6 molekul lipid pada setiap $1 \mu\text{m}^2$ atau sekitar 10.000.000.000 molekul lipid pada sel hewan yang berukuran kecil.

Komponen lipid yang ada dimembran memiliki massa 50% dari tubuh sel dan yang paling banyak ditemukan adalah fosfolipid. Fosfolipid memiliki kepala polar dan ekor yang tersusun dari hydrocarbon hidrofobik. Pada hewan, tumbuhan dan bakteri ekor dari fosfolipid adalah asam lemak yang berbeda-beda adalah panjang ekor karbon yang biasanya berkisar antara 14 sampai 24 atom karbon. Fosfolipid yang mayoritas terdapat pada hewan adalah fosfogliserida. Komponen lain yang ditemukan pada mamalia adalah fosfoglycerida, fosfatidylethanolamine, dan fosfatidylserine dan fosfatidylcholine. Selain itu, terdapat pula spingomyelin yang terbentuk dari *spingosine* bukan dari *gliserol*. *Spingosine* terdiri dari rantai acyl yang panjang dengan satu kelompok asam amino (NH_2) dan dua kelompok hydroxyl (OH) pada ujung molekul. Di sisi lain seringkali ditemukan kolesterol dan glikolipid pada bagian fosfolipid.



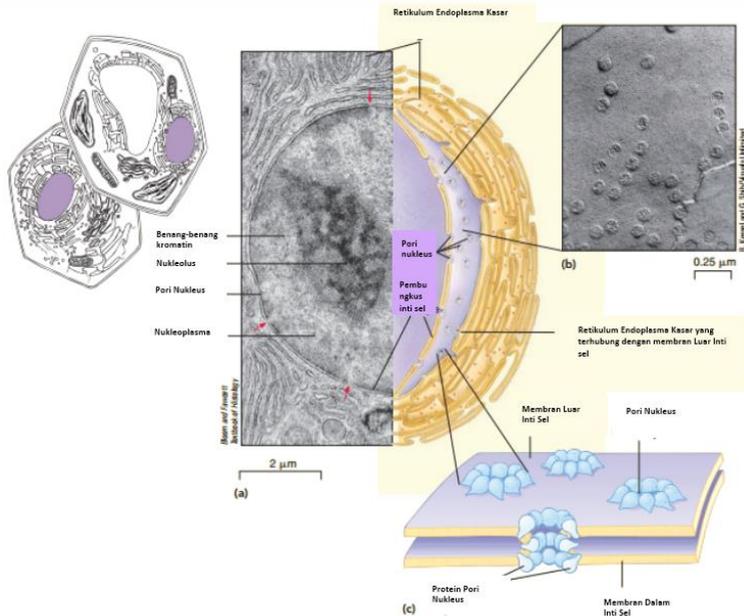
Gambar 8. macam macam fosfolipid pada membran dwi layer (Lodish et al, 2001)



Gambar 9. struktur kolesterol A) Formula ; B) Gambar Skematik C) Model

2.3.2 Inti sel

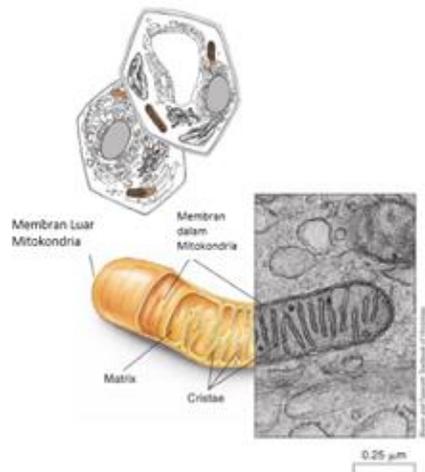
Inti sel atau nukleus merupakan organel yang pertama kali diketahui dan diperkenalkan lebih dari 200 tahun yang lalu oleh by Fontana pada 1781. Ibarat seperti manusia, inti sel atau sering disebut nukleus merupakan bagian inti dari pengatur pusat kegiatan sel. Didalam inti terdapat kumpulan materi genetik (DNA/RNA) atau untai DNA/RNA yang sangat panjang tergantung dari spesies. Materi genetik yang ada tidak terkemas secara rapi mirip dengan ikalan benang yang kusut. Bentuk ini disebut dengan **benang-benang kromatin**. Pada Eukariotik, Benang benang kromatin ini adakalanya terdapat penampakkan yang padat sehingga seolah terdapat sebuah atau beberapa titik, titik ini sering disebut sebagai **anak inti sel** atau nukleous. Dalam perkembangannya sebutan ini mulai dikesampingkan karena studi terbaru nucleus bukan merupakan sebuah organel. Aktifitas nucleus didalam ini bertugas membuat struktur ribosom yang kemudian dikeluarkan ke sitoplasma.



Gambar 10. Inti sel (Nukleus) dan bagian bagiannya (diadaptasi dari Solomon, 2011)

2.3.3 Mitokondria dan Kloroplas, organel yang mempunyai DNA mandiri

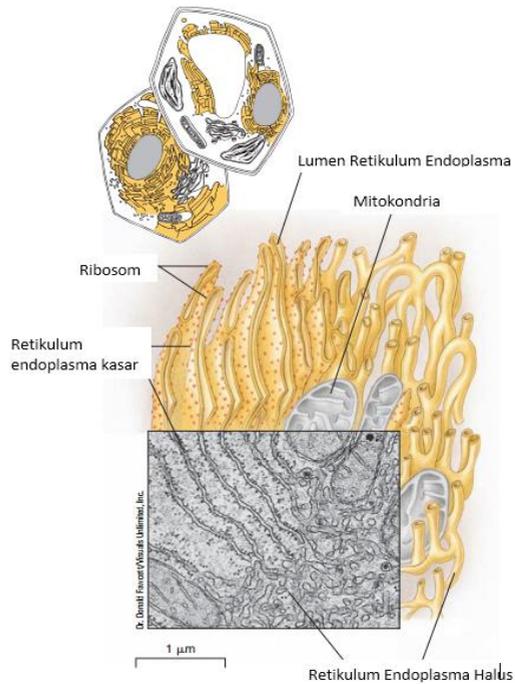
Bentukan organel Mitokondria mirip dengan sosis bakar, terdiri dari dua membrane, yaitu membrane dalam dan membrane luar. Membran dalam digunakan sebagai pusat produksi ATP



Gambar 11. Struktur Mitokondria (diadaptasi dari Solomon 2011)

2.3.4 Retikulum Endoplasma, tempat berlabuhnya mRNA

Retikulum endoplasma merupakan organel yang biasanya terletak paling dekat dengan nucleus, bentuk membrane yang berlipat lipatan membuat organel ini mudah dikenali. Lipatan lipatan ini memiliki fungsi sebagai perluasan permukaan untuk dapat menangkap mRNA yang di transformasikan dari intisel. Terdapat dua bentuk pada organel ini, yang pertama adalah Retikulum Endoplasma halus (*Smooth Reticulum Endoplasm*) dan yang kedua adalah Retikulum Endoplasma kasar (*Rough Reticulum endoplasm*). Istilah kasar atau halus pada Retikulum endoplasma didasarkan ada tidaknya ribosom. Penampakan rebosom yang membentang dari membrane luar sampai membrane dalam membentuk bentuk seperti kasar. Sedangkan RE Halus tidak ditemukan atau ditemukan pula tapi dalam jumlah sedikit pada RE.



Gambar 13. Retikulum Endoplasma (Solomon, 2011)

Mayoritas produk di RE adalah produk setengah jadi yang masih membutuhkan modifikasi. Modifikasi dilakukan didalam kompleks Golgi

2.3.5 Ribosom

Ribosom merupakan organel kecil yang terletak bebas didalam sitplasma atau terdapat pada membran organel (banyak ditemukan pada reticulum endoplasma kasar). Ribosom terdiri dari 2 komponen protein (sub-unit besar (*large subunit*) dan sub-unitkecil (*small subunit*)) dan satu rRNA yang diproduksi oleh nukleus. Ketika sub unit besar dan sub unit kecil bergabung, maka ribosom akan menjadi pabrik memproduksi ranta asam amino. Terdapat perbedaan mitokondria pada organisme eukariotik dan prokariotik. Prokariotik tersusun atas sub unit 30S dan 50S sedangkan eukariotik tersusun atas sub unit 40S dan 60S. Selain itu, pada eukariotik ditemukan pula RNA dengan 16S, 5S, 5,8S dan 28S. Pada Prokariotik RNA hanya ditemukan 16S, dan 5S dengan tambahan 23S.

Tabel 2. Komposisi Ribosom pada prokariot dan eukariot (Yuwono, 2005)

	SUB UNIT	RNA	PROTEIN
PROKARIOT	30S	16S	21 macam
	50S	5S	31 macam
		23S	
EUKARIOT	40S	16S	33 macam
	60S	5S	49 macam
		5,8S	
		28S	

2.3.6 Kompleks Golgi

Kompleks Golgi sering juga disebut dengan badan Golgi or *Golgi apparatus* terdiri dari tiga bagian yaitu bagian cis, medial dan trans. Fungsi utama dari kompleks golgi adalah untuk memodifikasi protein hasil pelipatan rantai asam amino di retikulum endoplasma.

2.3.7 Lisosom, organel pencernaan intrasellular

Lisosom merupakan organel yang bertugas sebagai system pencernaan intrasellular. Terdapat lebih dari 40 jenis enzim didalamnya yang digunakan untuk system pencernaan. Beberapa sel yang bertugas sebagai fagositosis mempunyai lisosom dalam jumlah yang besar. Karena fungsinya sebagai pencernaan maka pH didalam lisosom dapat menjadi sangat asam (mencapai angka 5.0). Lisosom primer terbentuk melalui Kompleks Golgi sedangkan enzim pencernaan dikeluarkan dari Retikulum endoplasma.

Bakteri (pathogen atau pengganggu) yang ditelan oleh sel maka akan diselubungi oleh plasma membran. Plasma membran tersebut nantinya akan digabungkan dengan enzim pencernaan yang disebut dengan lisosom sekunder. Dengan menggunakan enzim pencernaan tersebut bakteri akan dihancurkan dan bahan bahannya akan digunakan dan diolah sebagai energy atau disesuaikan dengan kebutuhan sel.

Beberapa kelainan seperti *lysosomal storage diseases*, merupakan kelaianan yang ternyata diakibatkan oleh tidak adanya salah satu enzim di lisosom. Sehingga zat yang seharusnya dihasilkan menjadi berlimpah dan mengganggu aktifitas sel. Tay-Sachs disease, merupakan kelainan yang diakibatkan tidak dapat terpecahnya lipid. Sehingga penderita akan mengalami retardasi mental, kebutaan dan meninggal pada waktu muda. Sesungguhnya masih banyak organel organel yang belum dibahas secara lebih mendetail. Namun demikian fungsi organel organel tersebut akan diringkas pada Tabel 3.

Tabel 3. Organel Organel didalam sel beserta fungsinya

Organel	Deskripsi	Fungsi
Nukleus		
nukleus	Struktur besar yang diselubungi oleh membran dwi lapis yang berisikan nukleolus dan kromosom	Terdapat materi genetik DNA yang nantinya ditranskripsikan untuk membentuk RNA.
nukleolus	Bentukan granular yang berada didalam nukleus yang terdiri atas RNA dan protein	Tempat pembentukan dan perakitan ribosom
Kromosom	Kompleks antara DNA dan protein hasil pepadatan benang benang kromatin dan akan kelihatan jelas ketika sel melakukan pembelahan	Pusat informasi genetik yang nantinya akan diwariskan; gen mengatur seluruh aktivitas sel
Organel Sitoplasma		
Membran plasma	Membran yang membungkus sel	Melindungi seluruh bagian sel, menjadi media pergerakan pada beberapa sel, membantuk menjaga bentuk sel, mengatur keluar masuknya zat didalam sel, media komunikasi sel
Ribosom	Kompleks yang terbentuk dari RNA dan Protein, pada eukariotik banyak	Mensintesis rantai asam amino yang merupakan asal bentuk dari protein

Organel	Deskripsi	Fungsi
	ditemukan menempel pada retikulum endoplasma, beberapa ditemukan bebas didalam sitoplasma	
Retikulum Endoplasma	Merupakan membran internal didalam sel	Mensintesis lipid dan membentuk lipid; dapat membentuk vesikel yang membawa protein
halus	Dipermukaan membran tidak ada atau sedikit ribosom	Berfungsi untuk mensintesis lipid, detoksifikasi racun, mensuplai ion kalsium.
kasar	Dipermukaan membran banyak terdapat ribosom	Tempat produksi protein
Kompleks Golgi	Merupakan kantong membran yang biasanya berbentuk mendatar	Memodifikasi Protein, membungkus protein yang telah disekresikan, memisahkan dan mensortir protein yang akan didistribusikan kedalam atau keluar sel
Lisosom	Kantong membran (pada hewan)	Pencernaan intraselular; mengandung enzim pencernaan yang mampu memecah material yang tidak diinginkan dan protein
Vakuola	Kantong membran (lebih banyak ditemukan pada tumbuhan, jamur, dan	Sebagai tempat penyimpanan material seperti air, cadangan

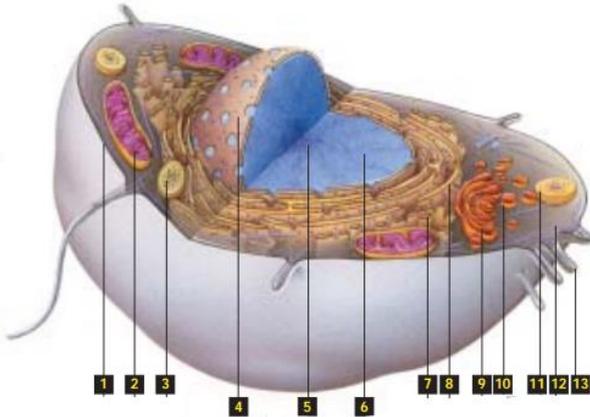
Organel	Deskripsi	Fungsi
	alga)	makanan, minyak, atau bahan buangan; mengontrol tekanan hidrostatik
Peroksisom	Kantong membran yang didalamnya terdapat banyak enzim	Bagian yang banyak berfungsi pada metabolisme sel. Seperti memecah asam lemak, protein
mitokondria	Kantong yang tersusun atas dua membran; membran dalam dan membran luar. Membran dalam membentuk lipatan lipatan berbentuk krista, bagian dalam disebut matriks; memiliki DNA sirkular	Organel yang berfungsi sebagai reaksi
Sitoskeleton		
Mikrotubulus	Bentukan seperti pipa yang memiliki lubang di bagian tengahnya dan tersusun dari protein tubulin	Menjadi penyokong sel; berperan juga didalam pergerakan sel; merupakan struktur dasar dari cilia, flagella, sentriol, badan basal
Filamen intermediet	Berbentuk solid, tersusun atas protein	Menjadi penyokong sel; berperan dalam pergerakan dan pembelahan sel
Sentriol	Sepasang dari bentukan pipa berongga, terdiri dari sembilan mikrotubulus triplet (9X3)	Spindel mitotik terbentuk diantara sentriol selama pembelahan sel pada hewan. Kebanyakan tidak ditemukan pada sel

Organel	Deskripsi	Fungsi
		tumbuhan
silia	Memiliki bentukan relatif lebih pendek dari permukaan membran sel. Terselubungi dengan plasma membran; terdiri dari 2 di pusat dan 9 pada bagian samping (pheripheral) sehingga konstruksi (9+2)	Digunakan Pergerakan untuk beberapa makhluk hidup renik (protista), untuk transportasi substrat pada permukaan membran (contoh pada tuba falopi manusia); penting untuk komunikasi
flagella	Memiliki bentukan relatif lebih Panjang dari permukaan membran sel. Terselubungi dengan plasma membran; terdiri dari 2 di pusat dan 9 pada bagian samping (pheripheral) sehingga konstruksi (9+2)	Digunakan pergerakan untuk beberapa makhluk hidup renik (protista); digunakan untuk pergerakan sperma

2.4 Latihan Soal

1. Jelaskan Pengertian sel !
2. Sebutkan pembagian Organisme berdasarkan 3 Domain! Jelaskan ciri ciri mendasar yang membedakan 3 Domain tersebut!
3. Jelaskan Pengertian dari Ekstrachomosomal DNA! Dimana sajakah Ekstra Chromosomal DNA dapat ditemukan?

4. Berikut adalah gambar sel.



Isilah tabel kosong di bawan ini sesuai dengan petunjuk gambar di atas!

No	Nama Organel	Fungsi
1		
2		
3	Lisosom	
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		Mensekresikan Protein dengan cara memfusikan dengan membran sehingga dapat mengeluarkan isinya
11	Peroksisom	
12		
13		

Sifat Dasar Materi Genetik

- 3.1 Pengertian Materi Genetik
- 3.2 Perbedaan DNA dan RNA
- 3.3 Pengemasan Materi Genetik
- 3.4 Pewarisan Materi Genetik

3.1 Pengertian Materi Genetik

Suatu bahasan yang akhir akhir ini seringkali dijadikan sebagai “*kambing hitam*” pada berbagai macam kasus adalah DNA. Ketika ada suatu kecelakaan dan para korbannya dinyatakan tidak utuh, maka yang cari adalah DNA, suatu kecelakaan asusila atau tindak kejahatan yang mengakibatkan seseorang hamil dan tidak ada solusi siapa yang bertanggung jawab maka yang dicari adalah DNA. Ketika ada perebutan anak maka yang dicari adalah DNA. Pernahkan anda berfikir betapa pentingnya sebuah DNA? Lalu Apa sebenarnya DNA tersebut? Dalam bab ini kita akan bahas secara perlahan lahan.

Salah satu syarat sebuah materi dikatakan sebagai sebuah sel dan melakukan aktivitas kehidupan adalah adanya materi genetik. Materi genetik sendiri dibagi menjadi dua yaitu *Deoxyribonecleat acid* (DNA) dan *Ribonukleat acid* (RNA). Makhluk hidup tingkat tinggi mayoritas memiliki materi genetik berupa DNA.

Pada bab sebelumnya telah diketahui bahwa DNA terdapat pada tiga tempat, yaitu berada di nucleus atau DNA inti (*intrachromosomal DNA*) dan DNA yang berada di Mitokondria atau Chloroplas (DNA luar inti/ *extrachromosomal DNA*).

Salah satu ciri makhluk hidup seperti manusia (multiselular) yaitu terdiri dari banyak sel. DNA dapat ditemukan pada tiap sel yang ada di manusia (kecuali eritrosit). Pertanyannya, karena DNA terdapat pada setiap sel, Apakah Struktur DNA yang ada di tangan sama dengan yang ada di kaki? Apakah DNA yang ada di jantung sama dengan yang di pankreas, atau sebaliknya kenapa sel sel yang ada di Beta sel pancreas mampu untuk memproduksi insulin sedangkan sel yang di hati tidak mampu?.

Pada hakekatnya sel sel yang berada di organ spesifik sudah terspesifikasi menjadi sel sel khusus yang memiliki fungsi dan ciri khusus, sel ini disebut **berdeferensiasi**. DNA yang berada pada setiap organ (kecuali organ reproduksi) adalah sama, yang membedakan kemampuan setiap sel tersebut adalah ekspresi dari gen tersebut. Contoh ekstrem yang bisa kita ambil adalah kupu kupu yang begitu indahya sebenarnya memiliki struktur dan komponen gen yang sama apabila dibandingkan dengan masa larvanya yaitu ulat. Ketika menjadi ulat maka gen-gen yang bersinggungan dengan kupu kupu akan dinon-aktifkan. Sedangkan gen gen yang berfungsi sebagai ulat akan aktif. Begitu juga sebaliknya ketika menjadi kupu kupu maka gen gen yang bersinggungan dengan ulat akan dinon aktifkan.

Contoh si kupu kupu tentu sudah dapat menuntun kita berlogika, gen yang ada di tangan tentu akan sama dengan gen gen yang ada di kaki bahkan di satu untai rambut akan sama juga. Itu sebabnya seluruh informasi pada seseorang sebenarnya dapat di deteksi hanya dengan memanfaatkan genom pada sebuah sel.

Lalu bagaimana dengan sel reproduksi, sel reproduksi memiliki ciri yang lebih bervariasi sesuai dengan tujuannya yaitu untuk membentuk organisme baru. Sel sel tersebut akan menjadi acak dari segi alel, dan akan bertemu dengan pasangannya. Pertemuan tersebut akan membentuk variasi yang merupakan gabungan dari kedua orang tuanya. Bisa jadi sifat atau ciri anak akan dominan kepada bapak atau dominan kepada ibunya. Beberapa sifat justru cenderung merupakan gabungan dari sifat bapak dan ibu. Kejadian ini tidak terlepas dari peristiwa segregasi bebas.

Gen-gen yang diwariskan dari orang tua ke anaknya tidak hanya gen gen yang bagus saja, terkadang gen gen yang tidak menguntungkan ikut terwariskan. Apabila gen gen yang terwariskan bersifat tidak menguntungkan maka seringkali gen tersebut akan mengakibatkan kelainan atau tidak mengakibatkan kelainan sesuai dengan sifat gen tersebut. Gen yang tidak menguntungkan dapat menjadi tidak terekspresi apabila terdapat gen lain yang bersifat lebih dominan. Penyakit genetik yang muncul karena adanya gen kurang menguntungkan mungkin sampai saat ini tidak dapat disembuhkan seperti alzheimer, thalassemia, dll. Ada pula gen yang dalam perjalanan ekspresinya harus distimulus supaya aktif sebagai contoh seorang penyandang diabetes type II sebenarnya sudah terdapat pada dirinya potensi gen penyandi diabetes, akan tetapi gen tersebut tidak akan aktif dan menjadi masalah kesehatan yang serius kecuali gen tersebut dipicu oleh faktor lingkungan seperti sinar radiasi, polusi, bahkan pola makanan dan pola kegiatan.

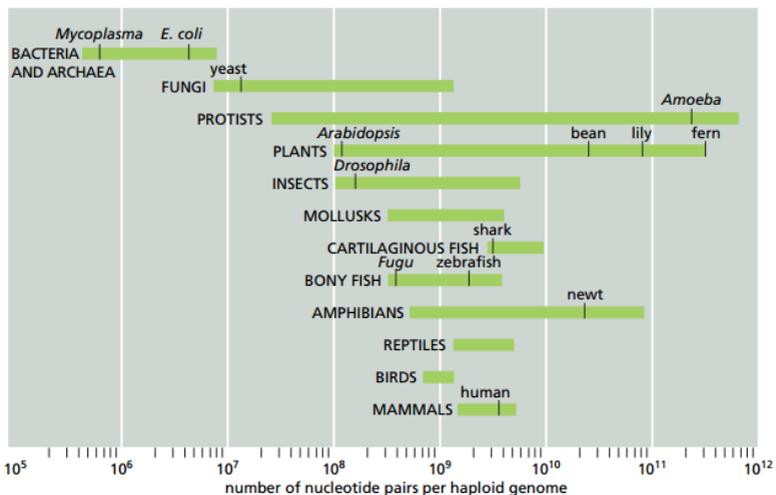
3.2 Mengetahui lebih dekat DNA

DNA menjadi primadona baru didalam dunia sains memicu perubahan paradigma yang baru, yaitu segala sesuatu diatur oleh materi yang satu ini, yaitu DNA. Bahkan beberapa ilmu yang berkaitan dengan makhluk hidup pasti melihat DNA. DNA dianggap sakral karena merupakan *Blue print* kehidupan. DNA suatu organisme akan memiliki panjang yang berbeda-beda tergantung dari jenisnya. Lalu apakah organisme yang lebih kompleks akan memiliki DNA yang lebih panjang? Anggapan pada awal mulanya ditemukan DNA tentu demikian, akan tetapi seiring dengan perkembangan penelitian dan ilmu pengetahuan anggapan tersebut terbantahkan. Tidak semua DNA adalah sebuah gen. gen merupakan bagian kecil (sekitar 200-4500 bp) dari sekuens (potongan) DNA yang mampu mengkode satu atau lebih protein.

Tabel 4. statistik Genom Manusia

GENOM MANUSIA	
Panjang dna	$3,2 \times 10^9$ atau 3,200,000,000 bp
Jumlah gen	Mendekati angka 25,000
Gen terbesar	$2,4 \times 10^9$ bp
Jumlah exon terkecil	1
Jumlah exon terbesar	178
Rata rata jumlah exon pada gen	10,4
Exon terbesar	17,106 bp
Rata rata jumlah exon	145 bp
Jumlah pseudogen	Lebih dari 20,000
Prosentase jumlah dna di exon (yang mengkode protein)	1,5%
Prosentase dna yang bersifat tetap (conserved)	3,5%

Total genom manusia terdiri dari lebih dari 3 milyar pasang basa (3×10^9 bp) yang ada pada sel haploid. DNA yang terkode atau yang lebih dikenal sebagai exon hanya 1.2% (34.000.000 bp) sedangkan bagian yang tidak mengkode sesuatu (untranslated region) mencapai 0.7% (21.000.000 bp). Teori *one gen one protein* pernah dicetuskan pada awal pemahaman DNA, artinya satu gen hanya mampu mengkode satu protein saja. Penelitian yang membandingkan antara DNA genom pada lalat buah (*Drosophila melanogaster*) yang dibandingkan dengan Manusia (*Homo sapien*) menunjukkan hasil yang mengejutkan. Jumlah gen pada lalat buah hanya terputut sedikit saja dengan manusia. Tentu ini tidak sebanding dengan bentukan fenotipik (penampakan organisme) yang ada, manusia memiliki bentukan yang kompleks, memiliki kemampuan berfikir yang cerdas dan lain sebagainya. Penelitian lebih lanjut menunjukkan setiap gen akan mampu melakukan modifikasi ketika akan terekspresi. Mekanisme modifikasi ini disebut dengan Alternative splicing (BAB V).



Gambar 14. Ukuran Gonom Pada Beberapa Makhluk Hidup

3.3 Struktur DNA dan RNA

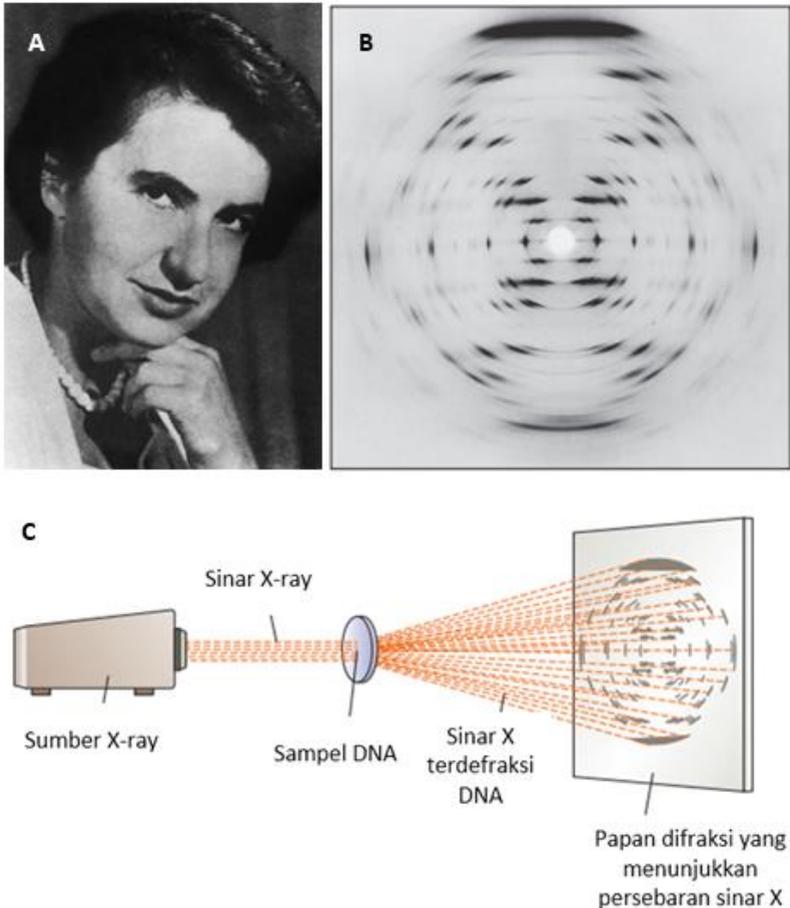
Pekerjaan rumah yang dimulai dari tahun 1920an akhirnya terselesaikan. Pekerjaan tersebut adalah memecahkan misteri dengan suatu pertanyaan. Pertanyaan tersebut adalah “*Bagaimana suatu sifat dapat di turunkan dari suatu generasi ke generasi berikutnya?*”.

Di mulai dari Penelitian yang mengagumkan yaitu penelitian Frederick Griffith yang menguji coba bakteri strain kasar dengan strain halus yang diinjeksikan ke hewan coba tikus. Dia menemukan bahwa strain kasar tidak membuat tikus menjadi mati sedangkan strain halus mengakibatkan tikus mati. Kemudian Griffith membakar strain halus sebelum diinjeksikan ke tikus akibatnya tikus tidak mati. Masih penasaran dengan hasilnya strain halus hasil pemanasan kemudian di campur dengan strain kasar yang selanjutnya diinjeksikan ke tikus dan hasilnya tikus mati. Penelitian kritis Griffith menjadikan terobosan baru bahwa ada sesuatu telah berpindah dari hasil pemanasan bakteri strain kasar ke strain halus. Sehingga Griffith berkesimpulan ada molekul yang mengatur aktivitas sel sehingga bakteri strain halus bisa membunuh tikus.

Pada tahun 1944, Oswald T. Avery beserta temannya Colin M. MacLeod dan Maclyn McCarty penasaran dengan penelitian Griffith. Mereka mengidentifikasi kira kira apa yang membuat si tikus mati. Sehingga ia memindahkan komponen komponen bakteri menjadi beberapa substansi murni yaitu lipid, karbohidrat, protein, dan Materi genetik (DNA dan RNA). Mereka memindahkan setiap materi dari strain kasar ke halus satu persatu dan hasilnya adalah suatu substansi yang berpindah dari strain kasar ke strain halus dan menyebabkan tikus mati adalah Materi genetik (DNA/RNA).

Edwin Chargaff menemukan bahwa struktur komponen DNA memiliki jumlah yang sama antara Timin dengan Adenin, dan

guanine dan Cytosin. Penelitian Rosalind Franklin dan Maurice Wilkins menganggap bahwa DNA bersifat double helix, namun demikian mereka tidak dapat menggambarkan dengan baik bentuk DNA. Alfred Hershey dan Martha Chase (1952) mendemonstrasikan bahwa hanya DNA (tidak protein) yang terlibat pada reproduksi virus.



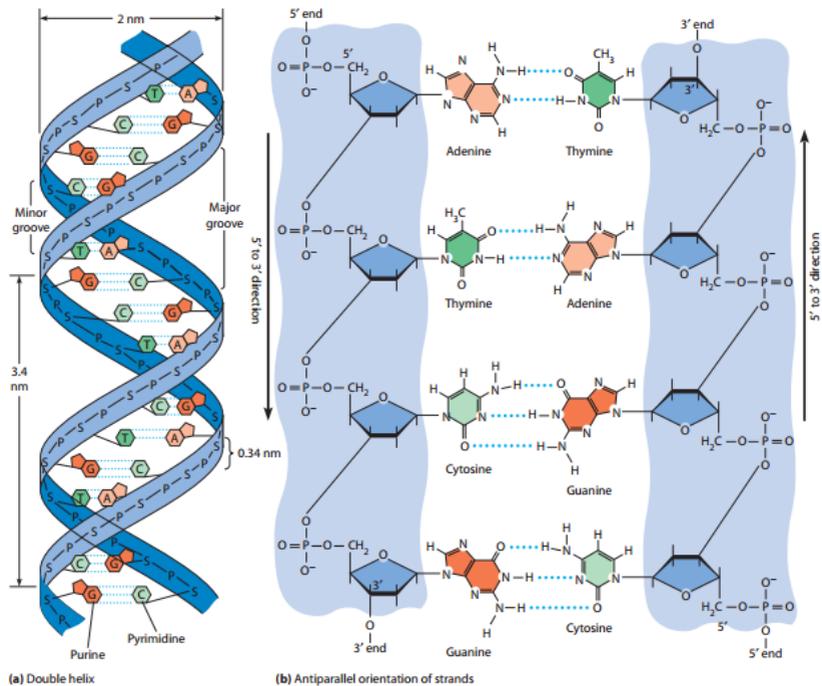
Gambar 15. Difraksi DNA menggunakan sinar X. A) Rosaline Franklin. 2) Hasil difraksi DNA. 3) Proses difraksi X Ray

Struktur DNA dideksripsikan secara jelas pada tahun 1953 oleh Watson dan Crick. Hasil penemuan ini sangat mengejutkan karena Watson dan Crick bukan merupakan orang tersohor di masanya. Pada dasarnya bentuk DNA adalah **polymere** yang tersusun atas monomer monomer yang disebut dengan **nukleotida**. Nukleotida penyusun DNA terdiri dari tiga komponen, Gula Pentosa, Fosfor, dan Basa Nitrogen. Basa Nitrogen terdiri dari Purin dan Pirimidin, Purin terdiri dari Adenin (A) dan Timin (T), Pirimidin terdiri dari Cytosin (C) dan Guanine (G). Nukleotida nukleotida tadi akan tersusun secara rapi dengan bantuan ikatan fosfodiester. Suatu ikatan yang menghubungkan antara dua gugus phosphate.

Basa Adenin akan selalu Berikatan dengan Timin dengan dua ikatan Hidrogen, sedangkan Basa Guanin akan selalu berikatan dengan Cytosin dengan tiga ikatan hydrogen. Meskipun ikatan hydrogen dikenal sangatlah tidak stabil (rentan terhadap perubahan suhu), ikatan hydrogen merupakan ikatan yang paling fleksibel ketika DNA akan didenaturasi (dipisahkan pada setiap rantainya) guna keperluan transkripsi ataupun replikasi.

Gugus pentose menjadi tulang punggung bagi nukleotida. Arah DNA selalu di tunjukkan dari gugus 5 ke gugus 3. Hal ini mengacu berdasarkan ikatan Hidroksil yang di mulai dari gugus 5 dan dilanjutkan ke nukleotida selanjutnya pada gugus ke 3 melalui ikatan phosphodiester. Bentuk DNA mirip dengan Protein yang nantinya akan membentuk untaian tiga dimensi yang akan distabilkan oleh beberapa ikatan non kovalent. Bentuk untaian yang dihasilkan secara tiga dimensi pada DNA dan RNA relative berbeda. Hal ini berkaitan dengan dasar fungsi pada kedua materi genetic tersebut. DNA yang berantai akan membentuk dua lekukan yaitu lekukan mayor (minor groove) dan lekukan minor (major groove). Kedua lekukan tersebut memiliki panjang sekitar 3.4 nm (Gambar 16)

DNA yang dijelaskan oleh Watson dan Crick selalu berorientasi memutar dari kiri ke kanan, bentuknya seperti ini sering disebut dengan DNA type B, sedangkan pada beberapa kasus telah ditemukan DNA dengan melakukan ulir dari kanan ke kiri (left handed). Bentuknya seperti ini pertama kali ditemukan oleh Alexander Rich dan tim berdasarkan analisis kristalografi sinar X. Konformasi ulir X sering kali ditemukan ketika urutan purin dan pirimidin bergantian, sebagai contoh ACACACACACACACACAC maka bagian tersebut dapat dipastikan akan memiliki type Z sedangkan bagian lainnya tetap (konformasi type B).



Gambar 16. DNA, A) struktur DNA Doble Helix, B) stuktur antiparael pada DNA

3.4 Polimorfisme Vs Kelainan Genetic

Seringkali kita melihat dan mendengar bahwa bagaimana makhluk hidup dalam satu spesies memiliki keanekaragaman yang sangat luar biasa, bahkan dari segi sidik jari tidak ada yang sama antara manusia yang satu dengan yang lain. Dari segi penampakan wajah. Mungkin manusia yang satu dan manusia yang lain ada yang memiliki kecenderungan mirip, bahkan kita sulit membedakan pada seseorang yang bersifat kembar identik. Tapi perlu diketahui kalimat yang digunakan adalah mungkin sehingga pasti ada sesuatu yang dapat digunakan untuk membedakan. Pada contoh yang lebih ekstrim ada seseorang yang terlahir dengan tinggi 2 meter dan ada pula yang terlahir normal normal saja dengan tinggi 170 cm. dan ada pula yang hanya memiliki tinggi 60 cm ketika dewasa. Dengan contoh contoh tersebut manakah yang disebut dengan polimerofisme dan manakah yang disebut dengan kelainan genetik.



Gambar 17. Polimorfisme Warna Kulit Pada Manusia (sumber gambar:

@hijabfashion

Polimorfisme berasal dari kata poly yang berarti banyak dan fisme yang berarti morfologi. Kita tentu sudah mengetahui bahwa memang segala sesuatu yang ada pada fisik manusia diatur oleh gen. gen yang diwariskan oleh orang tua sehingga kita cenderung memiliki kemiripan dengan orang tua baik dari bapak maupun dari ibu atau mungkin dari kakek/nenek dari bapak atau kakek/nenek dari ibu. Itu semua mungkin terjadi. Segala sesuatu dikatakan polimorfisme ketika segala sesuatu memiliki bentuk biasa yang terdapat pada dua atau lebih alel yang berbeda baik secara fisik maupun genomik (yang terkode di DNA). Sifat polimorfisme biasanya muncul lebih dari 1 persen didalam suatu populasi.

Pertanyaan yang selama berabad abad adalah bagaimana suatu kelainan atau penyakit bisa terjadi? Apakah penyakit terjadi akibat kelainan atau lingkungan yang menyebabkan kelainan. Banyak bukti kongkret yang menunjukkan kelainan yang berasal dari bawaan lahir merupakan akibat dari kelainan genetik, seperti, thalassemia, cystic fibroctic dll.

Kelainan lainnya seperti serangan jantung, diabetes mellitus, artheroskerosis terjadi secara berkala, banyak bukti kelainan tersebut tidak terjadi bagi para penderita yang mengalami kelainan genetik sama dengan yang menderita. Meskipun sekarang pertanyaan tersebut sebagian besar sudah mulai terjawab, namun demikian kajian tersebut tetap saja menarik. Ada beberapa alasan kajian ini menjadi menarik, 1. Gen gen yang menyebabkan kelainan biasanya berbeda beda pada tiap etnik, 2. Tidak jarang kelainan tersebut diakibatkan oleh bebera gen yang saling berinteraksi (multigenomik)

3.5 Latihan Soal

1. Jelaskan pengertian DNA?
2. Sebutkan Molekul penyusun komponen DNA dan RNA!
3. Jelaskan Hubungan antara gen, Genom, dan kromosom!
4. Apa perbedaan antara polimorfisme dan Kelainan Genetik?

Kromosom

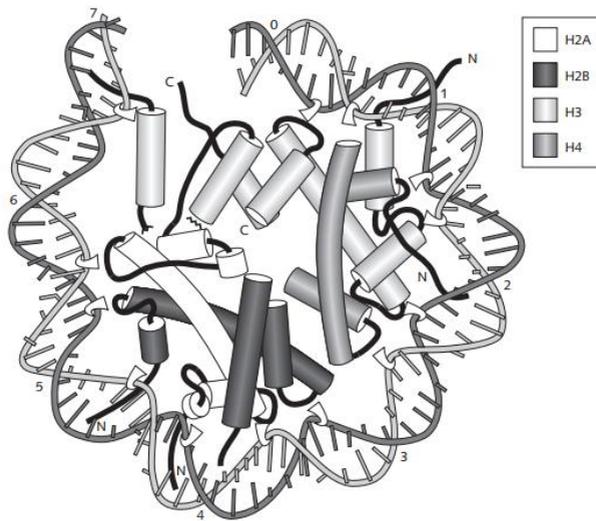
- 4.1 Pengertian Kromosom
- 4.2 Bagian dan Peran Pengendalian Kromosom
- 4.3 Kelainan Kromosom
- 4.4 Keterkaitan antara kelainan kromosom dan kelainan gen

4.1 Pengertian kromosom

Panjang Materi genetik pada makhluk hidup khususnya yang bersifat eukariotik tentu tidak sebanding dengan ukuran sel yang ada. Pada manusia, materi genetik satu sel saja apabila direntangkan akan mencapai panjang 1,74 cm yang terdiri atas 300,000,000 pasang basa, sedangkan ukuran sel hanya sekitar beberapa micron tergantung dari jenis sel. Oleh karena itu, pengemasan materi genetik memerlukan mekanisme yang efektif dan efisien. Seperti yang telah kita pelajari diatas bahwa pengemasan materi genetik pada sel eukariotik akan dikemas pada beberapa tempat, yang pertama didalam inti sel (*intrachromosomal DNA*) dan diluar inti (didalam mitokondria dan atau di kloroplas) yang lazim disebut *extra chromosomal DNA*. Pengemasan di bantu dengan berbagai macam protein, protein yang sangat erat kaitannya dengan fungsi tersebut adalah protein histon.

Protein histon terdiri atas beberapa jenis, diantaranya H1, H2A, H2B, H3, dan H4. Protein histon yang berbagai macam ini akan

membentuk suatu kompleks. Kompleks akan mengikat DNA secara sistematis. Pengikatan protein histon didasarkan atas sifat elektromagnetik yang ada didalamnya, yang mana protein histon bermuatan positif. Sifat ini sangat cocok untuk mengikat DNA yang bersifat negative pada sisi gugus fosfat yang ada. Satu kompleks protein histon akan mengikat DNA sebanyak dua kali putaran, yaitu sekitar 200 bp. Suatu kompleks yang terdiri atas DNA dan histon tadi disebut nukleosom (Gambar 18).



Gambar 18. Struktur Nukleosom pada resolusi 2.8 Å. Terlihat DNA mengelilingi proten histon

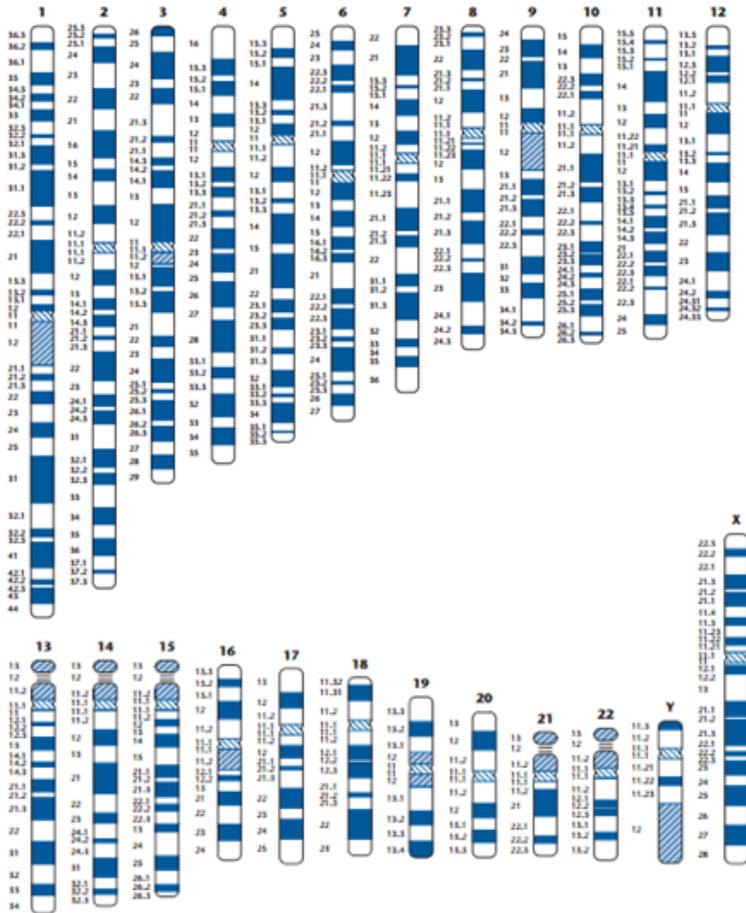
4.2 Bagian dan Peran Pengendalian Kromosom

Pada Keadaan normal atau ketika sel tidak sedang akan melakukan pembelahan, pada hakekatnya kromosom tidak dapat dilihat. Hal tersebut dikarenakan materi genetik yang belum terkondensasi dan masih terurai bebas. Uraian untaian DNA ini sering disebut dengan **Benang-benang kromatin**. Kromosom mulai dapat dilihat ketika sel akan melakukan pembelahan baik meiosis maupun mitosis. Pada saat tersebut benang-benang kromatin akan memadat sedemikian rupa sehingga benang benang yang duhulunya sangat kecil dan tidak kasat mata sekarang akan mengeumpul sehingga akan tampak menebal dan dapat diamati. Pemadatan tersebut juga tidak berlangsung seragam, terdapat seolah olah garis garis yang terbentang pada seluruh bagian kromosom. Garis yang terang disebut dengan eukromatin dan garis yang gelap disebut heterokromatin.

Bentukan Eukromatin dan heterokromatin tidak terlepas dari erat tidaknya pemadatan yang terbentuk. Semakin renggang maka akan semakin tidak jelas sehingga akan tampak terang. Beberapa ahli menyatakan bahwa bentukan tersebut juga berkorelasi dengan fungsi bagian yang ada. Apabila terlihat tidak kompak, dengan demikian akan mempermudah untuk transkripsi atau ekspresi gen. bentukan eukromatin yang notabene membentuk garis yang agak tebal biasanya mengandung gen-gen yang kebetulan tidak sedang dibutuhkan untuk terekspresi. Bentukan Kromosom manusia beserta eukromatin dan heterokromatin dapat diamati pada Gambar 19.

Kromosom juga memiliki bagian bagian, dalam penatanamaannya, Bagian yang pendek (dari titik centromere) selalu terletak di bagian atas sedangkan yang bawah selalu

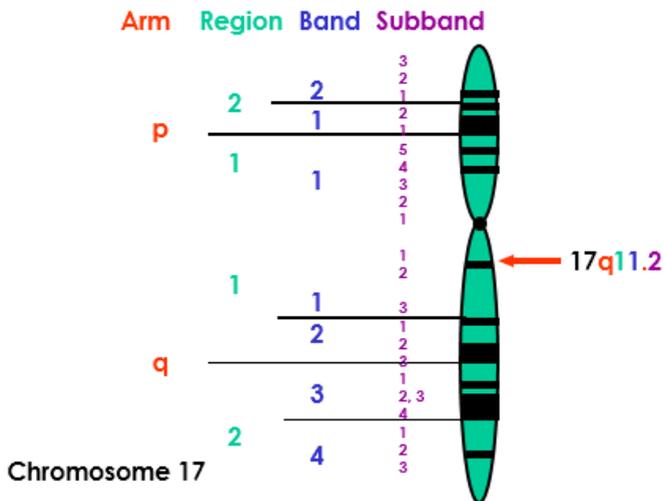
berukuran lebih panjang. Bagian atas disebut dengan lengan pendek atau *petit* (lengan p). Lengan panjang disebut dengan lengan q.



Gambar 19. Kromosom Manusia. Bentuk gelap menunjukkan eukromatin dan heterokromatin

lengan q sendiri tidak memiliki pengertian khusus karena untuk mempermudah kelanjutan dari huruf p (yang berarti *petit*) dalam

bahasa latin. Di masing masing lengan kemudian dibagi lagi menjadi regio, disetiap region di bagi menjadi band, dan pada band di bagi menjadi sub band. Gambar menunjukkan lokus sebuah gen yang terletak pada 17q11.2 yang artinya lokeus tersebut terletak pada kromosom no 17 lengan panjang region 1 band 1 dan sub band 2. Pemahaman ini penting untuk mengenali setiap kelainan yang ada pada kromosom.



Gambar 20. Peta Kromosom dan Bagian Bagiannya

4.3 Kelainan kromosom

Kelainan kromosom dapat terjadi akibat kesalahan pembelahan meiosis. Kelainan ini dapat berupa delesi, duplikasi, translokasi, dan inversi. Laporan dari kejadian, kelainan yang diakibatkan oleh delesi biasanya lebih banyak dibandingkan dengan kejadian lainnya.

Syndrome down adalah kelainan yang pertama kali di deteksi pada manusia, kelainan ini disebabkan kelebihan kromosom pada kromosom no 21, sehingga mengubah konformasi dari jumlah kromosom normal 46 menjadi 47. Satu kromosom yang membawa beribu ribu gen berakibat terhadap fenotipe dari manusia itu sendiri, termasuk ciri-ciri umum seperti muka yang terkesan lebar. Kejadian syndrome down juga menjadi pelajaran bagi kita, ketika terdapat kelebihan kromosom bukan berarti orang tersebut menjadi sempurna, justru terjadi ketidakseimbangan dan membuat mental dan IQ terbelakang, lidah yang berukuran lebih lebar, dan sbertai pula kelainanlainnya.

Lalu bagaimana syndrome down bisa terjadi? Pertanyaan tersebut tentu berkaitan dengan aktifitas gene, kromosom yang mengganda berarti membawa sifat-sifat tertentu yang turut serta mengkode fenotipe, dan yang kedua adalah kemampuan sel mengatur organisasi kromosom harus sangat akurat, kesalahan sedikit saja dapat mengakibatkan kelainan yang fatal

4.4 Keterkaitan kelainan kromosom dengan kelainan gen

Seperti yang telah diketahui sebelumnya, bahwasannya gen merupakan potongan kecil dari rantai DNA yang mengkode satu atau beberapa protein. Pada satu bagian kromosom atau satu sub band kromosom tentu mungkin terdapat satu bahkan ratusan gen. oleh karena itu kelainan kromosom akan mengakibatkan hal yang berefek lebih besar dibandingkan terjadinya mutasi pada satu gen saja. Kelainan yang terjadi secara besar-besaran seperti duplikasi kromosom atau kekuarangan satu set kromosom akan menyebabkan kelaian yang fatal bahkan kematian.

Kelebihan kromosom pada satu kromosom yang homolog tidak membuat suatu individu menjadi normal. Sehingga sama saja

dengan kejadian pengurangan kromosom. Biasanya menjadi kelainan fatal. Beberapa kejadian hanya kelebihan dan kekurangan kromosom tertentu saja yang mampu bertahan hidup, itupun dalam umur yang terbatas. Diantara kelainan kromosom tersebut terjadi pada

4.5 Latihan Soal

1. Jelaskan pengertian Kromosom!
2. Jelaskan perbedaan system pengemasan materi genetik pada prokariotik dan eukariotik
3. suatu kelainan klinefelter Syndrome pada anak laki laki dengan Karyotype 47,XXY Karyotype dan Del 15q11.2-q13. Jelaskan apa yang dimaksud dengan Karyotype 47,XXY Karyotype dan Del 15q11.2-q13!

Ekspresi Gen

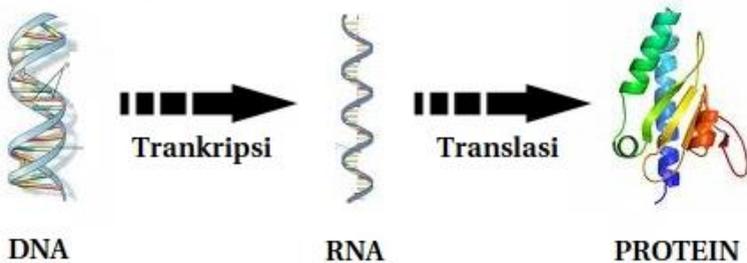
- 5.1 Struktur dan Bagian Bagian Gen
- 5.2 Siklus Sel
- 5.3 Replikasi
- 5.4 Transkripsi
- 5.5 Translasi

5.1 Struktur dan Bagian Bagian gen

Fungsi dari sebuah inti sel adalah untuk mengatur seluruh kegiatan sel. Lalu bagaimana mekanisme sebuah materi yang posisinya menetap dalam satu organel bisa mengatur kegiatan yang sedemikian rumit. Kromosom sendiri tersusun atas Materi genetik yang terkemas secara rapih. Pada keadaan normal kromosom akan terurai dan tidak menampakkan adanya bentukan kompak seperti yang selama ini kita lihat. Bentukan kromosom yang terurai seperti ini disebut benang benang kromatin. Benang benang kromatin tertata rapi membentuk pilinan yang terhubung oleh protein histone, pilinan ini terjadi akibat adanya muatan negative pada gugus phosphor nukleotida. Bagian dari rantai DNA yang mengkode protein disebut sebagai GEN. selain berfungsi untuk mengkode protein, gen juga berperan penting didalam proses reproduksi.

W. Johannsen pada tahun 1909 memperkenalkan istilah gen yang mana gen merupakan partikel yang sifat suatu organisme. Akan tetapi jauh sebelum itu George Mendel 1860an menjelaskan

konsep pewarisan sifat dengan sangat mendetail namun Mendel hanya memperkenalkan istilah faktor pewarisan. Francis Crick *et al* (1962) memperkenalkan istilah Dogma central Biologi. Dogma central biologi terdiri dari tiga proses utama yaitu replikasi, transkripsi, dan translasi. Replikasi memungkinkan terjadinya duplikasi kromosom dari ganda menjadi ganda dengan struktur yang sama. Transkripsi merupakan proses perubahan DNA doble helix menjadi RNA single helix yang nantinya di lanjutkan dengan proses translasi. Translasi merupakan proses penerjemahan dari mRNA menjadi rantai asam amino yang kemudian terjadi penyempurnaan struktur menjadi asam amino.



Gambar 21. Dogma Centra Biologi

Pada eukariot, Gen akan mengkode satu atau lebih protein spesifik, pengkodean ini tergantung dari alternative splicing yang spesifik pada tiap organisme. Gen akan di transkripsikan menjadi mRNA (masanger RNA) dan akan menjadi dua katagori. Katagri pertama adalah non coding mRNA (ncRNA) dan coding mRNA. non coding mRNA belakangan memiliki fungsi fungsi secara khusus yang dapat langsung dilakukan. Sedangkan coding mRNA harus melalui proses lebih lanjut untuk dapat ditranslasikan menjadi protein. Setiap gen membutuhkan beberapa element untuk menjadikan gen

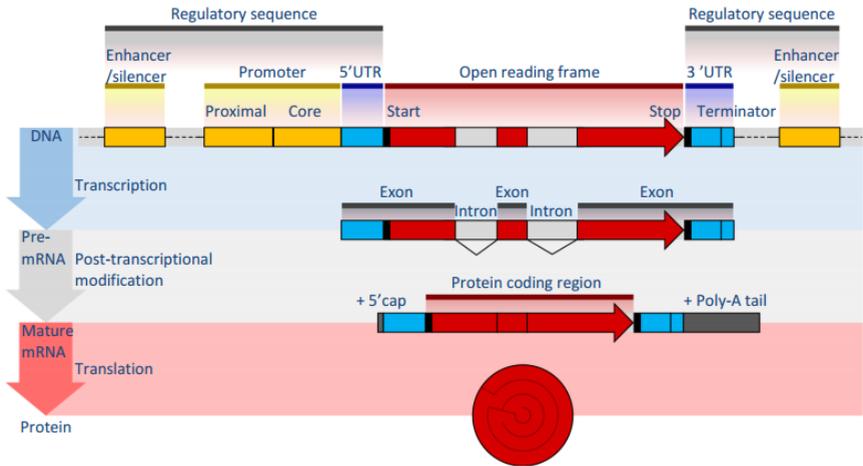
menjadi fungsional. ncRNA dapat berupa beberapa puluh base pair atau bahkan ribuan base pair.

Mayoritas gen tidak berbeda antara gen yang berada pada prokariot dan gen pada eukariot. Hal inilah yang dapat dimanfaatkan untuk menyusun kekerabatan makhluk hidup. Perbedaan mendasar gen pada prokariot dan eukariot terletak pada proses dan mekanisme transkripsi dan translasi. Ukuran pada setiap gen juga sangat beragam tergantung dari gen itu sendiri. Ketika proses transkripsi DNA hanya satu saja bagian DNA yang akan dijadikan kopi DNA (mRNA). Bagian tersebut biasanya di mulai dari gugus 5 ke gugus 3 Sehingga akan menghasilkan salinan yang sama dengan bagian lagging strand (lihat bagian 5.4).

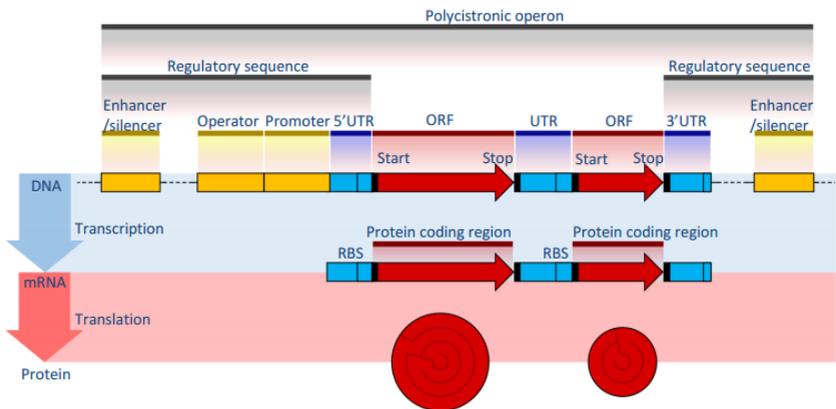
Gen terdiri atas dua komponen utama yaitu sekuen regulator dan sekuen Open Reading Frame. Sekuen regulator terletak pada bagian bagian ujung gen, dan didalamnya terdapat enhancer dan silencer. Enhancer dan silencer bisa terletak jauh dari bagian utama gen yang dipisahkan oleh beberapa ribu base pair (bp). Suatu gen dapat pula memiliki satu atau beberapa bahkan banyak enhancer. Bagian sekuen regulator lainnya adalah promotor yang terletak padabagian depan. Bagian promotor berfungsi untuk mengikat DNA polimerase sehingga terjadi transkripsi. Bagian regulator dapat berfungsi tumpang tindih antara protein. Protein tersebut dapat berfungsi untuk memperkuat atau bahkan menghambat proses transkripsi.

Perbedaan yang mencolok antara prokariot dengan eukariot pada bagian regulator ini adalah prokariot pada dasarnya tersetting selalu aktif (on), sedangkan pada prokariot tersetting selalu tidak aktif (off). Bagian yang akan ditranslasikan hanyalah dari start codon sampai dengan stop codon. Bagian Untranslated Region (UTR) pada ujung 5' berfungsi sebagai penarik ribosom ketika translasi.

Sedangkan UTR pada ujung 3' berfungsi sebagai pelepas enzim polymer ase ketika proses transkripsi.



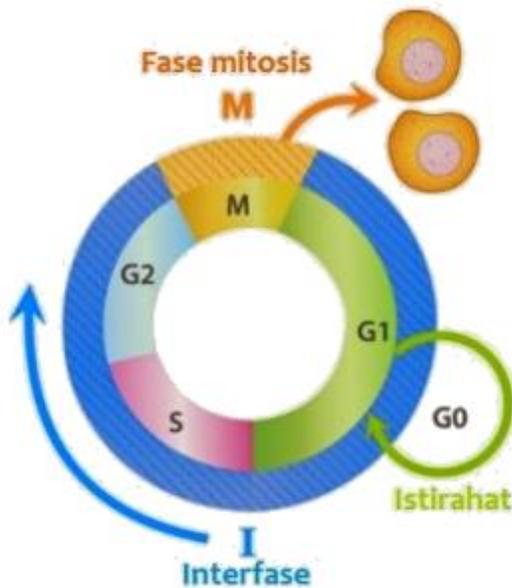
Gambar 22. Struktur Gen pada Eukariot



Gambar 23. Struktur Gen pada Prokariot

5.2 Siklus Sel

Siklus sel terdiri dari beberapa tahapan. Dimulai dari G1 (Gap 1), Sintesis (S), G2 (Gap 2), & M (Mitosis). Fase G1 merupakan fase pertumbuhan sebuah sel. Fase ini menjaga pada keadaan konstan. Tanpa interupsi atau stimulus tahapan G1 tidak akan dilanjutkan ke fase Sintesis. Fase sintesis merupakan fase dimana terjadi duplikasi materi genetik yang nantinya digunakan untuk pembelahan sel. Fase G2 merupakan fase perbanyakan organel. Sedangkan fase M merupakan fase pembelahan. Persiapan fase M dimulai dari fase S dan fase G2. Fase M berlangsung lebih singkat dan terdiri dari tahapan Profase, Metafase, Anafase dan Telofase.



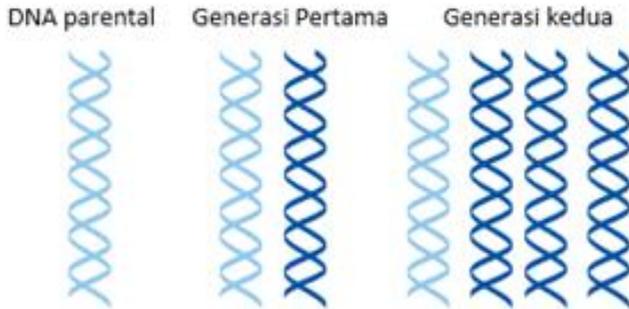
Gambar 24. Siklus Sel (Sumber: Sridianti.com)

5.3 Replikasi

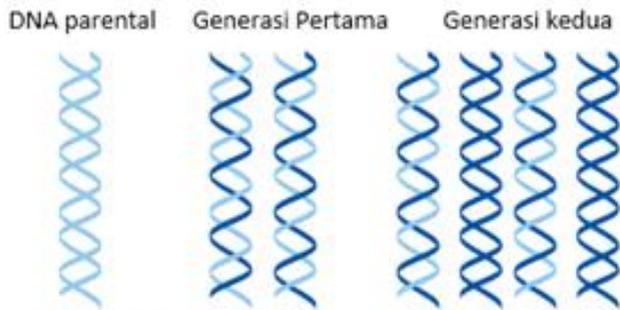
Replikasi merupakan proses penggandaan materi genetik (DNA/RNA). Tujuan utama dari proses ini adalah didapatkan dua kopi DNA yang selanjutnya diturunkan ke kedua anakan sel yang akan dihasilkan. Replikasi membutuhkan ketelitian yang sangat tinggi untuk mendapatkan kopian yang sama persis dengan template asal. Replikasi dilakukan jauh sebelum waktu pembelahan sel yaitu pada fase S (sintesis). Kesalahan didalam proses replikasi akan menyebabkan mutasi. Mutasi tidak selamanya menyebabkan kelainan genetik. Beberapa mutasi disinyalir menjadi penyebab tetap bertahannya suatu makhluk hidup terhadap suatu kondisi.

Hipotesis yang berkembang mengenai replikasi dimasa itu adalah konservatif, semi konservatif, dan dispertif. Konservatif menunjukkan bahwa DNA yang baru seratus persen terbentuk dari bahan baru. Teori semi konseritatif menunjukkan DNA terdiri dari bahan lama dengan bahan baru sedangkan teori dispertif menunjukkan dna baru memiliki komponen yang berseling antara komponen baru dan lama (Gambar 25). Pemasalahan ini kemudian diselesaikan dengan sengat mendetail oleh Meselson-stahl yang menggunakan nitrogen (N^{14} & N^{15}) sebagai media pendeteksi.

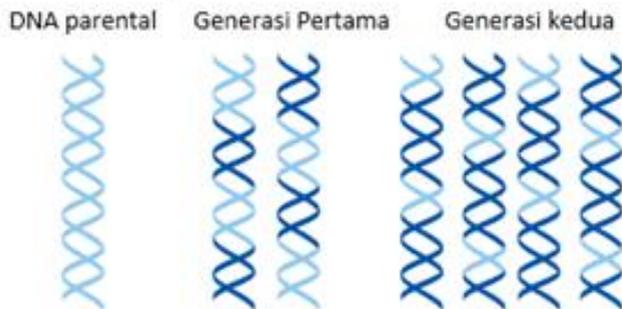
A. Model Konservatif



B. Model Semi-konservatif

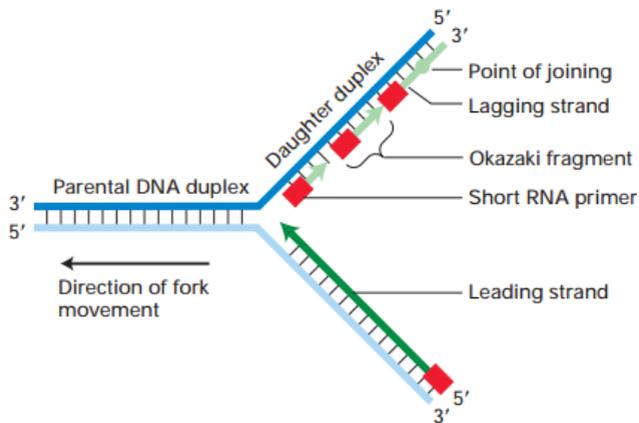


A. Model Dispersif



Gambar 25. Hipotesis dari Replikasi DNA

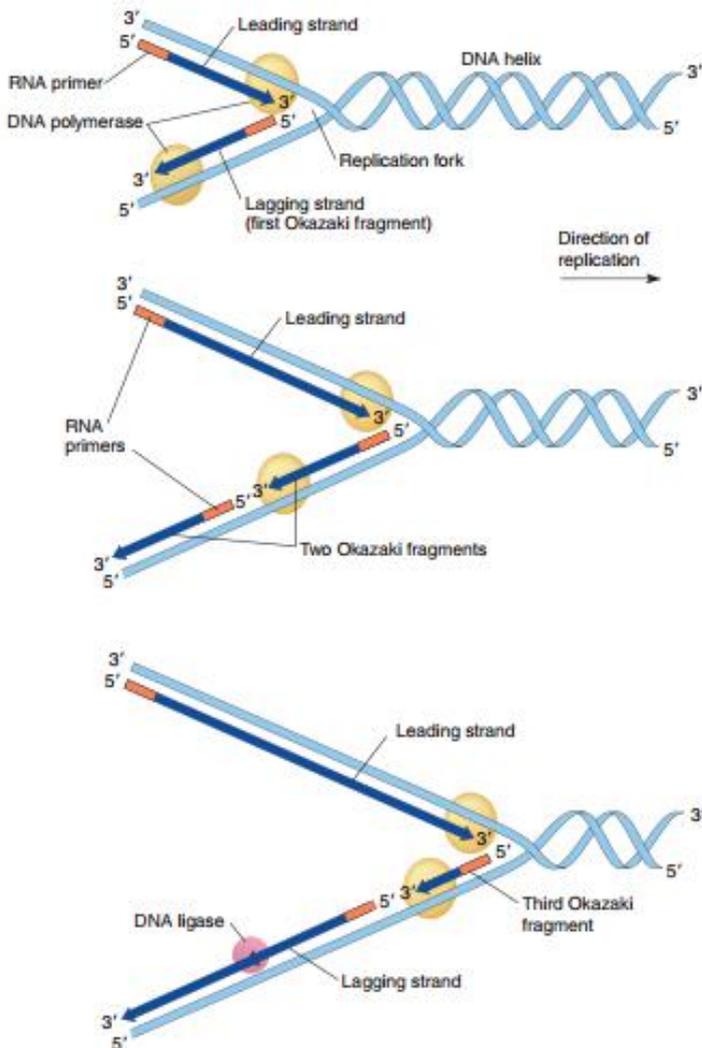
Terdapat beberapa protein yang terlibat didalam replikasi. Protein yang pertama bekerja adalah topoisomerase. Topoisomerase bertugas supaya DNA menjadi tidak berpilin. Dengan demikian, maka replikasi dapat di mulai. Setelah lenggang atau tidak terjadi pilinan enzim helicase bekerja dengan cara membuka pilinan DNA menjadi single helix yang dilakukan dengan cara memutus ikatan hydrogen. Protein *Single-strand binding* (SSB) bertugas menjadga Posisi DNA yang telah menjadi single helix tetap pada keadaan tetap. Pada proses replikasi *Single-strand binding* dapat terjadidalam jumlah yang sangat banyak.



Gambar 26. Mekanisme Replikasi

DNA Poymerase bertugas untuk menggabungkan DNA sub unit untuk membentuk rantai DNA baru. DNA yang lama digunakan sebagai DNA Template. Enzim primase bertujuan untuk membentuk RNA primer. RNA primer berfungsi untuk mengawali atau menginisiasi pemanjangan DNA copi. Pada sisi lain DNA digandakan dengan cara terbalik karena replikasi hanya bisa berjalan dari sisi 5 ke 3 sehingga DNA polymerase harus meunggu kerja enzim helicase. Setelah membuka maka akan dilakukan penggandaan secara

bertahap dan menjadikan fragment fragment DNA yang disebut dengan fragmen okazaki. Fragmen fragmen ini nantinya akan digabungkan dengan menggunakan enzim ligase.



Gambar 27. Tahap- Tahap Replikasi

Tabel 5. Fungsi Enzim Yang Berperan

ENZIM	FUNGSI
HELICASE	Membuka DNA menjadi single helix dengan cara memutus ikatan hidrogen
PROTEI SINGLE-STRAND BINDING (SSB)	Mengikat bagian single strand yang telah terbentuk supaya DNA tidak kembali pada posisi semula sampai akhirnya terjadi replikasi
TOPOISOMERASE	Membantu DNA supaya dalam keadaan lenggang dan tidak terpilin dan mengembalikan kedalam konfigurasi sebelumnya setelah replikasi selesai
DNA POLYMERASE	Menggabungkan DNA sub unit untuk membentuk DNA baru sesuai dengan DNA template
DNA PRIMASE	Mensintesis RNA Primer pada bagian langging strand. Memulai replikasi pada bagian leading strand
DNA LIGASE	Menghubungkan fragmen Okazaki dengan menggabungkan ujung 3' dengan ujung 5' DNA.

5.4 Transkripsi

5.4.1 Transkripsi Pada Prokariot

Pada bakteri, semua molekul RNA (mRNA, r RNA, dan t RNA) disintesis oleh enzim yang sama, yaitu RNA polymerase. Holoenzim RNA polymerase terdiri dari lima rantai polipeptida yang berbeda; β , β' , α , ω , dan σ . Setiap gen yang akan ditranskripsi memiliki daerah yang mengawalinya yang disebut promoter. Kompleks RNA polymerase akan berikatan dengan promoter untuk memulai transkripsi. Sub unit sigma (σ) terlibat proses inisiasi, sub unit tersebut mengenali dan berikatan dengan dua sekuen DNA yang berbeda didaerah promoter: yang pertama pada 10 bp **upstream**, yang disebut **kotak Pribnow**, dan yang kedua ke arah **downsteam**, sekuen yang paling umum ditemui pada kotak Pribnow pada

berbagai gen adalah TTGACA. Rantai-rantai RNA biasanya dimulai oleh 5' adenosine trifosfat (pppA), atau guanine trifosfat (pppG). Setelah transkripsi dimulai, factor zigma melepaskan diri dari enzim inti dan nantinya akan berasosiasi kembali dengan enzim inti yang sama ataupun yang lain agar enzim itu bisa melekat ke promoter.

Saat pemanjangan molekul RNA, ribonuklease trifosfat dari basa-basa A, U, G dan C berpasangan dengan basa-basa komplementer pada untai sense DNA, kemudian digabungkan dengan ikatan 3'-5' fofodiester oleh RNA polymerase. Dengan demikian, molekul RNA tumbuh dari ujung 5'-nya ke ujung 3' (5'-3'). Ulir ganda DNA membuka didepan DNA polymerase yang bergerak maju untuk memaparkan semakin banyak bagian untai sense guna memanjangkan rantai RNA. Setelah enzim tersebut telah melalui suatu daerah tertentu, DNA di daerah itu kembali ke bentuk ulir gandanya.

RNA polymerase pada bakteri menghentikan transkripsi rantai RNA pada sekuen DNA yang disebut dengan terminator, dan melepaskan diri dari DNA. Agar bisa berfungsi secara benar, sejumlah terminator memerlukan sebuah protein aksesoris yang disebut dengan **factor rho** (ρ). Terminator-terminator tidak tergantung ρ memiliki simetri diad dalam DNA ulir ganda, terpusat kira-kira 15-20 nukletida sebelum ujung RNA. Transkrip RNA bersimetri *diad* melipat balik untuk membentuk struktur "jepit rambut" (*hair pin*), yaitu kira-kira diakhiri oleh urasil. Karena hybrid RNA-DNA yang terdiri atas poliribo-U dan polideoksiribo-A sangatlah tidak setabil, rantai RNA biasanya dilepaskan dengan cepat dari dupleks DNA. Terminator tergantung protein ρ yang tidak memiliki daerah poli A tersebut. Diduga apabila struktur hairpin yang lemah sekalipun menyebabkan RNA polymerase berhenti sejenak, membiarkan factor ρ melekat ke terminator dan menyebabkan disosiasi antara RNA dan RNA polymerase.

Pada bakteri, satu transkrip tunggal RNA seringkali mengandung daerah-daerah pengkode bagi gen-gen ganda. Tipe RNA tersebut disebut dengan polisistronik atau poligenik. Satu gen tunggal dapat ditranskripsikan secara bersamaan oleh beberapa molekul RNA polimerase, dan RNA yang dihasilkan akan terlepas pada setiap polimerase, kejadian tersebut akan meningkatkan jumlah mRNA yang ditranskripsi dari gen target, yang membantu sebuah sel untuk memproduksi protein dalam jumlah yang besar. Pada bakteri, transkripsi berlanjut melalui suatu sekuens terminator pada DNA, terminator yang ditranskripsikan (suatu gen RNA) berfungsi sebagai sinyal terminasi, menyebabkan polimerase melepaskan diri dari DNA dan melepaskan transkrip, yang dapat digunakan langsung sebagai mRNA.

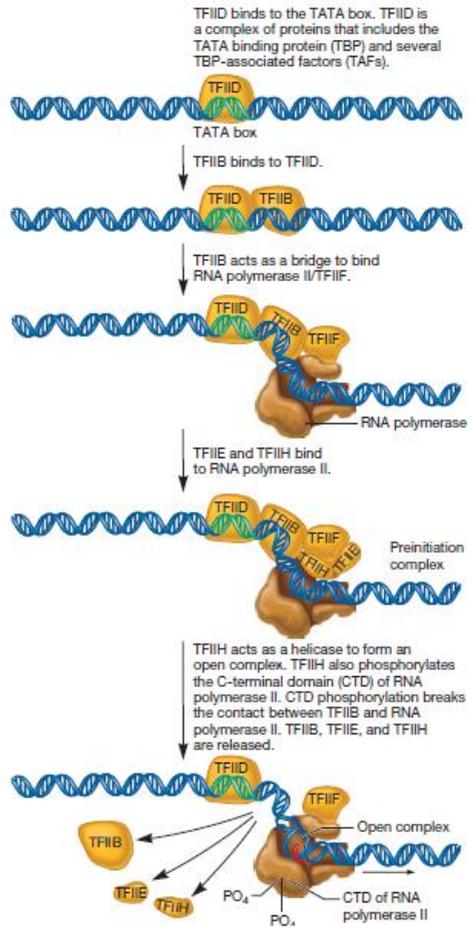
5.4.2 Transkripsi pada eukaryota

Apabila gen-gen bakteri yang berkerabat seringkali mengelompok dalam operon, sehingga menghasilkan mRNA Polisistronik maka pada eucariota hanya memiliki mRNA monosistronik dan gen-gennya tidak terkoordinasi menjadi operon-operon. Banyak gen yang mengalami pengulangan dan memiliki salinan yang identik (misalnya gen-gen rRNA dan tRNA) mengelompok pada kromosom-kromosom yang spesifik.

Transkripsi pada mikroorganisme eukariot mempunyai beberapa perbedaan apabila dibandingkan dengan transkripsi pada bakteri. Ada tiga jenis utama RNA polimerase yang berperan (pada bakteri hanya satu), yaitu RNA polymerase II yang bertanggung jawab terhadap sintesis mRNA, sedangkan RNA polimerase I dan III masing-masing bertanggung jawab terhadap sintesis rRNA dan tRNA. Sintesis dan pemrosesan rRNA terjadi dalam satu atau lebih daerah-daerah terspesialisasi pada nukleolus. Daerah-daerah promotor untuk pol I, terletak ke arah upstream dari *start*

transcription point. Inisiasi sintesis RNA sangatlah spesifik pada tiap spesies. Satu atau lebih protein (protein tersebut sangat penting bagi proses transkripsi) mengenali promotor-promotor hanya pada rDNA pada spesies yang sama.

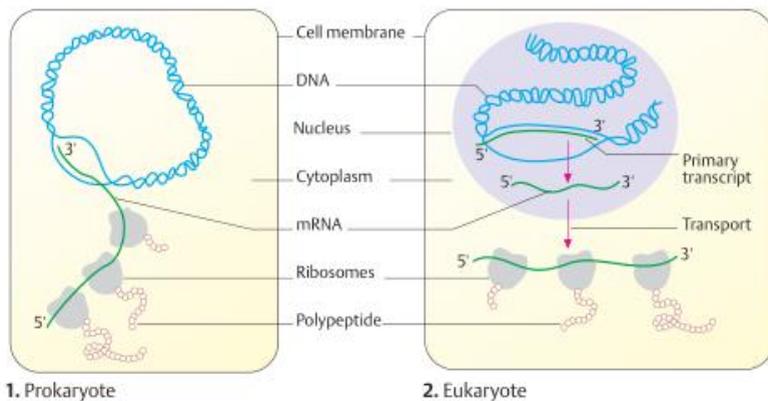
RNA polimerase II (pol II) merupakan agregat yang besar, memiliki ukuran sekurang-kurangnya 500.000 dalton dan memiliki sekurang-kurangnya 10 atau lebih sub unit. Inisiasi RNA Polimerase II di mulai pada suatu titik yang disebut sebagai *promotor*, berjalan ke arah *downstream* $5' \rightarrow 3'$, sedangkan rentangan DNA yang akan di transkripsi disebut *transcription unit*, Ketika RNA polimerase bergerak disepanjang DNA, enzim tersebut terus membuka puntiran helix ganda, mengekspose sekitar 10-20 base DNA dalam satu perpasangan dengan nukleotida RNA. RNA polimerase menambahkan nukleotida ke ujung 3' RNA yang sedang terbentuk sambil terus menyusuri heliks ganda. Molekul RNA baru



Gambar 28. Tahap Tahap Transkripsi

akan melepaskan diri dari cetakan DNA-nya Setelah gelombang sintesis RNA berlanjut dan heliks ganda DNA akan kembali, transkripsi berlangsung 40 nukleotide/ detik pada eukariota.

RNA pol II. Membutuhkan beberapa transcription factor untuk mengenali promotor. Promotor ini berbeda dengan protein pada bakteri. Tiga dari yang paling umum ditemui adalah TATA box (terletak sekitar 30 pasangan basa upstream dari titik awal), GC dan CAAT box (terletak antara 50 sampai 100 pasang basa upstream situs start). Contoh yang sering ditemui adalah Transkripsi umum Faktor TFIID memainkan peran penting dalam inisiasi transkripsi di eucaryotes. Kompleks multiprotein berisi TATA-binding protein (TBP). TBP telah memperlihatkan perlekatan pada DNA, sehingga membuat DNA lebih mudah diakses oleh *faktor transkripsi* yang lainnya. Berbagai faktor transkripsi umum lainnya, faktor promotor spesifik, dan elemen promotor telah ditemukan dalam sel eukariot yang berbeda. Setiap gen eukariotik tampaknya diatur secara



Gambar 29. Perbedaan Transkripsi Antara Prokariot Dan Eukariot (Solomon, 2011)

berbeda, dan penelitian lebih lanjut akan diperlukan untuk memahami sepenuhnya regulasi transkripsi gen eukariotik. Penggabungan antara kompleks faktor transkripsi dan RNA polimerase II yang terikat di promotor disebut kompleks inisiasi transkripsi (*transcription initiation complex*).

Mekanisme transkripsi pada eukariota berbeda dengan bakteri. Pada eukariota, RNA polimerase II mentranskripsikan sekuen pada DNA yang disebut poliadenilasi, yang mengkodekan suatu sinyal poliadenilasi (AAUAA) pada pre-mRNA, kemudian pada suatu titik sekitar 10-35 nukleotida yang mengarah ke *downstream* dari sinyal poliadenilasi protein-protein berasosiasi dengan transkrip RNA yang sedang tumbuh memotong bagian itu hingga terlepas dari polimerase, dan pre-mRNA dilepaskan. Akan tetapi polimerase akan terus mentranskripsikan DNA sebanyak ratusan nukleotida setelah tempat pre-mRNA dilepaskan.

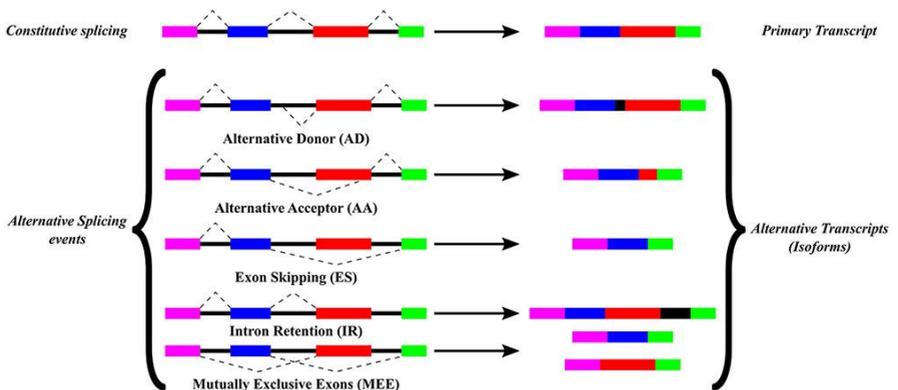
Struktur gen pada eukarita mengandung ekson (sekuen yang diekspresikan), yang akan ditemukan pada molekul mRNA dan akan ditranslasikan menjadi protein, dan intron. Struktura yang di transkripsi akan tetapi tidak di translasi. Intron akan di buang meri mRNA yang prosesnya disebut *RNA splicing*. Pengenalan titik potong dilakukan oleh *small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)*, yang terletak pada nukleus sel dan tersusun atas molekul-molekul RNA dan protein, RNA didalamnya disebut *small nucleus RNA (snRNA)*, Dan memiliki panjang 60-300 nukleotide. Rangkaian ini akan berasosiasi dengan protein besar lain sehingga membentuk *spliceosome* yang ukurannya hampir setara dengan ribosom. snRNPs mengenali dan mengikat simpangan antara ekson-intron. simpangan antara ekson-intron mempunyai sekuen GU pada ujung intron dan sekuen AG pada ujung 3', sehingga dapat dipisahkan secara akurat.

Tidak seperti mRNA pada bakteri, eukariota terbentuk dari post-transcriptional modification yang memiliki struktur DNA yang sangat panjang yaitu sekitar 5.000-50.000 nukleotida, yang sering disebut sebagai pre-mRNA. Pre-mRNA kemudian disintesis dengan penambahan cap pada ujung 5', biasanya merupakan bentukan 7-methylguanosine, yang diletakkan pada gugus 5'-hydroxil dengan penghubung triphosphate. Setelah proses sintesis selesai, pre-mRNA dimodifikasi dengan dengan penambahan ekor poly-A pada ujung ke 3', yaitu sekitar 200 bp., dalam beberapa literatur penjumlahan berkisar antara 50-250 nukleotida. Tudung 5' dan ekor poli-A memiliki beberapa fungsi penting. Pertama, keduanya tampak memfasilitasi ekspor mRNA matang dari nukleous. Kedua, membantu melindungi mRNA dari degradasi oleh enzim-enzim hidrolitik. Ketiga, keduanya membantu ribosom untuk melekat ke ujung 5' mRNA setelah mRNA mencapai sitoplasma. Pada wilayah *upstream* sebelum start codon menuju daerah 5'- cup dan dan daerah *downstream* menuju ekor poly A merupakan daerah *Untranslated region* (UTR). UTR merupakan daerah yang tidak di translasi namun memiliki fungsi lain, misalnya pengikatan ribosom. Pengurangan struktur pre- mRNA menjadi mRNA dapat mengemas gen menjadi jauh lebih pendek dari struktur asalnya. Sebagai contoh 27.000 pre-mRNA menjadi 1200 mRNA saja.

Pada beberapa organisme, penyambungan RNA dapat terjadi tanpa adanya protein atau bahkan molekul-molekul RNA tambahan. RNA intron dapat berfungsi sebagai *ribozim* dan mengkatalisis pemotongan dirinya sendiri, contohnya terjadi pada *Tetrahymena*, penemuan ribozim membuat gagasan bahwa protein tidak selalu menjadi katalis biologi. Beberapa alasan mengapa RNA ini dapat berfungsi sebagai enzim, pertama, karena RNA merupakan untai tunggal. kedua, RNA mengandung gugus-gugus fungsional yang mungkin berpartisipasi dalam katalisis, ketiga,

kemampuan RNA yang dapat berikatan hidrogen dengan molekul asam nukleat lainnya baik berupa RNA atau DNA. Adakalanya ekson tersplicing pada daerah ekson yang berbeda, akibatnya pada satu DNA template akan dapat menghasilkan protein yang lebih dari satu, peristiwa semacam ini sering disebut *alternative RNA splicing*. Kejadian ini juga memperkuat dugaan adanya kemungkinan domain yang berbeda pada pada satu jenis produk transkripsi, dan menjadi alasan mengapa manusia memiliki struktur yang kompleks dari pada *Drosophyla* padahal gen-gen yang dimiliki tidak sampai dua kali lebih banyak.

RNA polimerase III bertanggung jawab tidak hanya atas sintesis semua tRNA, melainkan juga RNA ribosomal 5S dan RNA kecil lainnya yang panjangnya biasanya kurang dari 300 nukleotida. Sekuen-sekuen dalam gen-gen tRNA di perlukan bagi transkripsi bagi pol III. Daerah-daerah kontrol internal (terletak didalam gen itu sendiri) juga mengarahkan terminasi transkripsi oleh pol III. Dengan demikian daerah yang sama dapat berfungsi dalam biosintesis (dalam gen) maupun struktural (dalam produk RNA).



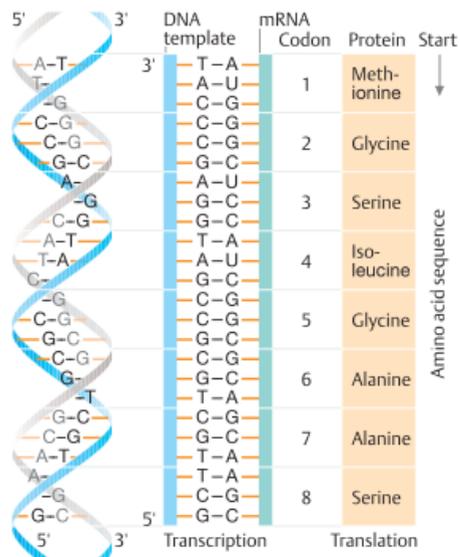
Gambar 30. Alternative Splicing (sumber: www.frontiersin.org)

5.5 Translasi

Translasi merupakan proses penerjemahan mRNA menjadi rantai asam amino. Organel yang bertugas untuk melakukan translasi adalah **Ribosom**. **Didalam proses translasi melibatkan banyak unit diantaranya tRNA, sub unit ribosom, protein protein yang membantu dari proses penempelan, pemanjangan maupun pelepasan pada proses pembuatan rantai polipeptida.**

Pada eukariotik, Pre-mRNA yang telah ditranskripsi dan telah mengalami modifikasi (capping, Poli Adenilation dan spising) kemudian ditransportasi ke sitoplasma. mRNA yang berada bebas di sitoplasma kemudian ditangkap dan berikatan dengan inisiator tRNA-unit kecil ribosom yang melekat pada ujung 5'. Pada eukariot inisiasi tersebut di mulai dari start codon AUG yang Kemudian anti kodon UAC yang membawa asam amino methionin akan melekat kuat dan memicu datangnya subunit besar ribosom sehingga proses akan berlanjut ke elongasi.

Proses elongasi berlangsung dengan menggabungkan asam amino- asam amino dan membentuk



Gambar 30. Alternative Splicing
(sumber: www.frontiersin.org)

rantai polipeptida secara berurutan sesuai dengan kode codon pada mRNA. Apabila urutan selanjutnya adalah CUU maka anti kodon GTT yang mengkode asam amino Leusin (lihat Tabel) dan apabila kode selanjutnya adalah CGU maka anti kodon yang datang adalah GCA yang mengkode asam amino Arginin begitu seterusnya. Proses tersebut akan terus berlangsung sampai menemukan stop codon yang UAA, UGA, dan UAG. Beberapa litelature menunjukkan jumlah komponent stop kodon akan berbeda pada tiap organisme. Jumlah perbandingan UAA UAA, UGA, dan UAG pada mamalia adalah 0.22, 0.61, dan 0.17, sedangkan jumlah UAA, UGA, dan UAG pada bakteri Echericia coli adalah 0.62, 0.30, dan 0.09.

Tabel 6. Kode Genetik Pada Saat Translasi

Basa No 1	Basa No 2				Basa No 3
	U	C	A	G	
U	UUU } Phe	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr	UGU } Cys	U C A G
	UUA } Leu		UAA } Stop	UGA } Stop	
	UUG }		UAG }	UGA } Trp	
C	CUU } Leu	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His	CGU } Arg	U C A G
	CUC }		CAC }	CGC }	
	CUA }		CAA } Gln	CGA }	
	CUG }		CAG }	CGG }	
A	AUU } Ile	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn	AGU } Ser	U C A G
	AUC }		AAC }	AGC }	
	AUA }		AAA } Lys	AGA } Arg	
	AUG } Met atau start		AAG }	AGG }	
G	GUU } Val	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp	GGU } Gly	U C A G
	GUC }		GAC }	GGC }	
	GUA }		GAA } Glu	GGA }	
	GUG }		GAG }	GGG }	

Tabel 7. Kode Asam Amino Menggunakan Satu Atau Tiga Huruf

Asam amino	Menggunakan tiga huruf	Menggunakan satu huruf
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	Q
Aspartic acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamic acid	Glu	E
Glutamine	Gln	N
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Iso	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Apabila kode koden di Penggabungan asam amino berlangsung dengan ikatan peptida. Translasi melibatkan beberapa RNA lain didalam prosesnya, RNA tersebut adalah rRNA (ribosomal RNA) dan tRNA (transfer RNA). rRNA merupakan RNA yang terdapat para ribosom sedangkan t RNA merupakan unit RNA yang bertugas membawa asam amino.

5. 6 Latihan Soal

1. Jelaskan Sturktur Gen pada eukariotik dan fungsi dari masing masing bagian tersebut!
2. Jelaskan perbedaan Replikasi yang terjadi pada prokariot dengan eukariot!

Pemanfaatan Biologi Molekular

6.1 *Aplikasi Biologi Molekular*

6.2 *Mutasi Genetik*

6.3 *SNP (Single Nucleotide Polymorphism)*

6.1 Aplikasi Biologi Molekular

Harapan dari *Human Genom Project* (HGP) sebenarnya sangatlah tinggi khususnya untuk pendalaman fungsi, struktur dan deteksi kelainan yang ada pada manusia. Hasil yang didapat merupakan titik terang untuk menganalisa jenis jenis kelainan yang berkaitan dengan masalah genomic. Sampai saat ini berbagai macam penyakit turunan, kelainan metabolisme, pewarisan fenotipik yang biasanya dikaitkan dengan estetika telah banyak diketahui.

Penggunaan ilmu genetika yang menjadi induk di biologi molekular telah digunakan tidak lama setelah hukum mendel dipublikasikan. Pada tahun 1906 seorang kewarganegaraan inggris bernama Archibald Garold, seorang ahli Fisika dan biokimia mempublikasikan buku yang berjudul "*Inborn Errors of Metabolism*". Melalui buku tersebut Garold mendeskripsikan penurunan kelainan dari orang tua ke anak anaknya. Penurunan tersebut diakibatkan adanya alel yang berpotensi menjadikan sebuah kelainan. Meskipun pada tahun tersebut istilah gen masih belum populer namun mendel masih menyebutnya dengan istilah faktor pewarisan. Penelitian sejenis mulai sangat diminati pada

beberapa dekade kemudian terbukti pulikasi pada bidang tersebut ramai bermunculan. Panelusuran kelainan genetik melalui suatu studi kasus suatu keluarga yang memiliki kelainan menjadi langkah penting untuk mengetahui pola pewarisan suatu gen.

Saat ini dengan berkembangnya teknologi molekular di memungkinkan dilakukannya screening untuk mengetahui kemungkinan seseorang memiliki keturunan. Keadaan seperti ini dirasa penting untuk mendeteksi kelainan yang diakibatkan oleh satu gen. sehingga dapat diketahui secara pasti berapa kemungkinan anak lahir dengan keadaan tidak normal membawa suatu kelainan. Ada cerita menarik mengenai kejadian ini. Seorang mahasiswa S2 (nama tidak disebutkan) di salah satu perguruan tinggi terkemuka, ikut projek penelitian oleh dosennya mengenai thalassemia. Sehingga dia mengambil judul mengenai mutasi dan kemungkinan-kemungkinan alel yang dapat menimbulkan mutasi. Dia paham betul seluk beluk mengenai thalassemia mulai dari gejala, ciri ciri, kemungkinan hidup, biaya pengobatan dan lainnya. Suatu hari mahasiswa ini secara iseng mengecek dirinya sendiri. Dan dia terkejut kalau dirinya sendiri memiliki alel pembawa sifat thalassemia. Memang dia sendiri tidak menderita thalassemia karena alel yang ada pada dirinya sendiri berfat resesif.

Singkat cerita ketika dia ingin menikah dengan calon pasangannya yang telah lama menjalin hubungan. Dia menginginkan pasangannya juga melakukan tes sesuai dengan metode yang telah dikuasainya. Betapa terkejut ketika pasangannya juga memiliki alel resesif pembawa sifat thalassemia. Kekhawatiran dan perdebatan muncul sebelum pernikahan. Sehingga kedua orang tersebut memutuskan untuk tetap menikah tetapi membuat kesepakatan untuk tidak memiliki keturunan.

Cerita tersebut adalah salah satu aplikasi kegunaan ilmu biologi molekular dan genetika. Saat ini rumah sakit diluar negeri

banyak yang menambahkan ahli genetika sebagai consultant kesehatan.

Pemanfaatan biologi molekular dapat ditinjau dari berbagai macam sudut, berikut adalah paparan pemanfaatan Biologi molecular didunia kesehatan:

1. Untuk mendeteksi penyebab dasar dan mekanisme kelainan suatu penyakit. Sebagai contoh penyakit tertentu yang diakibatkan oleh kesalahan satu gen saja seperti albino (kekurangan pigmen), Alkaptonuria (kelainan dalam metabolisme suatu asam amino), Ataxia telangiectasia (kelainan saraf), Cystic fibrosis (kelainan pernafasan), *Duchenne muscular dystrophy Galactosemia* (kelainan metabolisme karbohidrat), Phenylketonuria (kelainan metabolisme asam amino), *Sickle-cell disease* (kelainan bentuk sel darah), kelainan Tay-Sachs/ Tay-Sachs syndrome (kelainan penyimpanan lemak) dan lain lain. Kelainan kelainan tersebut dapat diketahui ternyata akibat mutasi suatu gen.
2. Deteksi pathogen, sebagai contoh dengan menscreening (memindai) ada tidaknya gen penanda khusus bagi penginfeksi, pathogen disini bisa berupa bakteri seperti, virus (*Human Immunodefisiensi Virus* (HIV), infeksi Helminthes seperti Ascariasis, maupun Protista (*Toxoplasma gondii*).
3. Mengetahui suatu ekspresi, yang bertujuan untuk mendeteksi perubahan mekanisme selular baik yang dikode (coding) maupun yang tidak dikode (non coding). Frekwensi ekspresi suatu gen tidak hanya dapat berdiri sendiri. Meskipun gen tersebut normal namun faktor ekspresi lainnya tidak berfungsi tidak baik maka gen tersebut bisa menjadi over ekspresi atau bahkan tidak berfungsi.

4. Mendeteksi kelainan melalui Skrening dan kelainan kromosom. Diagnose screening digunakan untuk mendeteksi apakah terdapat kelainan pada pasien berdasarkan ciri ciri fisik. Screening juga bisa digunakan sebagai langkah awal untuk mengidentifikasi kemungkinan adanya penyakit yang kemudian hari akan terekspresi. Screening penting dilakukan pada kasus kasus kelainan yang diakibatkan oleh satu gen.
5. Perancangan pengobatan. Salah satu yang populer adalah perancangan vaksin. Pada populasi tertentu terkadang memiliki keunikan genetik tersendiri. Sebagai contoh suatu suku dipedalaman di Kalimantan ada yang memiliki resistensi terhadap malaria. kejadian ini bisa dikembangkan untuk menemukan jenis alel yang mampu memproduksi anti bodi. Selain itu dengan diketahuinya mutasi pada suatu penyakit (seperti pada point 1) maka sekarang dimungkinkan untuk dilakukannya terapi gen.

6.2 Mutasi Genetik

Pada Point 3.4 telah dijelaskan perbedaan antara polimorfisme dengan kelainan genetik. Baik polimorfisme maupun kelainan genetik sama sama berawal dari mutasi genetik. Sebenarnya mutasi genetik tidak hanya menyebabkan kelainan genetik atau mutasi yang tidak menguntungkan. Mutasi justru lebih banyak terjadi kearah positif yaitu penyesuaian makhluk hidup dengan lingkungan. Namun demikian mutasi genetik tidaklah semudah yang dibayangkan yaitu hanya perubahan basa nukleotida. Di balik itu semua ada mekanisme panjang yang harus dilalui. Beberapa rujukan mengatakan bahwa mutasi genetik adalah perubahan kode DNA yang memicu adanya suatu perubahan

fenotip. Namun demikian mayoritas ilmuwan sekarang percaya bahwa tidak semua mutasi menyebabkan suatu kelainan. Di sisi lain mutasi juga tidak terjadi pada bagian gen aktif di kromosom. Pada manusia 95% bagian kromosom adalah bagian bukan gen. sehingga kemungkinan kejadian mutasi yang tampak secara fenotip akan sangat sedikit. Meskipun mutasi terjadi pada bagian gen dan mutasi tersebut terletak pada bagian intron tentu tidak akan menimbulkan efek yang berarti.

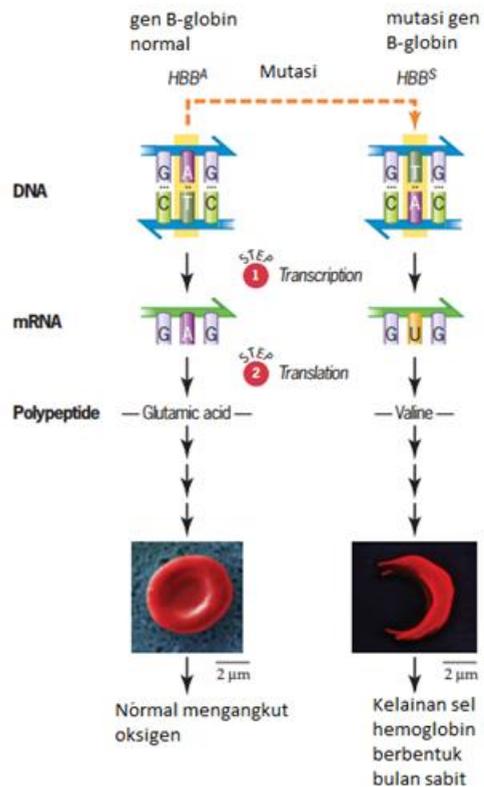
Apabila mutasi terletak pada bagian exon (bagian yang akan ditranslasi) dan mutasi merupakan jenis mutasi diam (silent mutation) hal tersebut juga tidak mengubah konformasi protein hasil translasi. Penyebab mutasi dapat berasal dari faktor eksternal maupun faktor internal. Faktor eksternal adalah faktor lingkungan seperti adanya radiasi, paparan bahan kimia atau perlakuan fisik tertentu. Sedangkan penyebab internal adalah kesalahan dari replikasi DNA. Sehingga berdasarkan uraian diatas pengertian mutasi sepertinya hanya cukup dideskripsikan sebagai **“perubahan nukleotida pada materi genetik”**.

Mutasi ini terjadi karena perubahan struktur DNA akan tetapi tidak memicu adanya perubahan pada asam amino yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan beberapa asam amino dikode oleh beberapa jenis kodon. Mutasi yang terjadi pada suatu individu dan tidak diwariskan kepada keturunannya disebut dengan mutasi somatik (*autosomal mutation*) sedangkan mutasi yang terjadi pada pada sel sel reproduksi dan diwariskan kepada keturunannya disebut mutasi genosom (*genosomal mutation*). Mutasi dapat terjadi secara sederhana (nukleotida) sampai pada hilangnya kromosom (*chromosomal aberration*).

6.3 SNP (*Single Nucleotide Polimorfisme*)

Secara sederhana pengertian *Single Nucleotide Polimorfisme (SNP)* adalah variasi yang terjadi pada satu basa nukleotida (adenin, timin, sitosin, dan guanin). Sebagai contoh pada suatu potongan DNA pada keadaan normal adalah guanine, akan tetapi ditemukan pada organisme lain ternyata adalah timin. SNP terjadi 1/1000 nukleotida yang artinya setiap 100 bp maka kemungkinan terjadi SNP adalah satu buah. Dengan demikian maka SNP yang ada pada manusia adalah 2 sampai 5 juta pada genom manusia. Meskipun jumlahnya banyak SNP seringkali ditemukan diantara gen-gen sehingga jarang terekspresi.

SNP seringkali digunakan untuk melacak sebuah penyakit atau kelainan. Seringkali juga SNP tidak bersinggungan dengan sebuah kelainan. Bukti



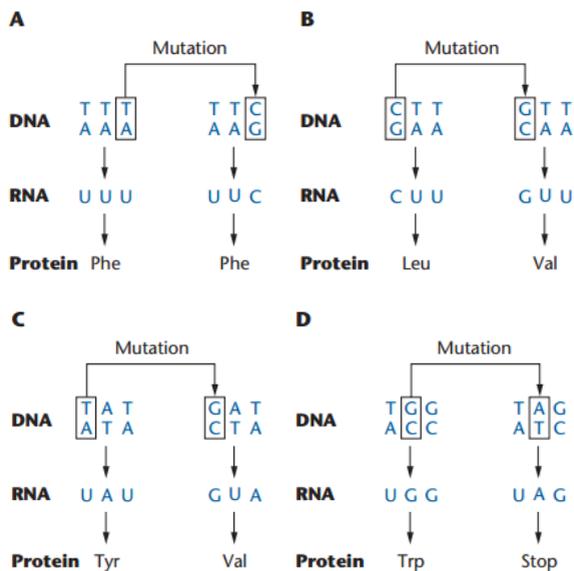
Gambar 31. SNP i pada sel darah merah yang mengakibatkan kelainan bentuk

lainnya menunjukkan adanya keterkaitan SNP dengan penyakit penyakit yang kompleks seperti diabetes, serangan jantung, atau kanker. Contoh SNP yang terkenal yang dapat menjadi kajian pertama kali adalah kejadian sel hemoglobin dengan bentuk sel sabit. Setelah penelitian menunjukkan gen B-globin terdiri dari 146 asam amino. Dan pada suatu individu terdapat kelainan DNA dengan keadaan Adenin berpasangan dengan Timin, namun pada kasus ini ditemukan Timin bertemu dengan Adenin.

Keadaan ini semula memiliki prevalensi yang cukup sedikit. Namun karena berkembang terus menerus akibat adanya pernikahan internal (dalam satu suku) maka prevalensi semakin meningkat. Meningkatnya kejadian tersebut dikarenakan pemahaman mengenai pewarisan belum sepenuhnya dipahami. Secara sekilas dari gambaran diatas kejadian mutasi memberi dampak negative terhadap kesehatan. Namun disisi lain mutasi tersebut merupakan bentuk adaptasi dengan lingkungan. Seseorang yang menderita hemoglobin dengan bentuk sel sabit terbukti lebih tahan terhadap malaria.

Mutasi pada tingkat nukleotida dapat berupa transisi atau transversi. Transisi terjadi ketika terjadi perubahan basa nukleotida dari purin ke purin atau pirimidin ke pirimidin. Sebagai contoh terjadinya perubahan satu nukleotida dari Adenin ke guanine. Sedangkan transversi merupakan perubahan nukleotida dari purin ke pirimidin atau sebaliknya. Berdasarkan akibatnya maka dapat dikelompokkan lagi menjadi 1) *silent mutation* (mutasi diam) yaitu perubahan basa nukleotida tetapi tidak diikuti oleh perubahan asam amino. Silent mutation di mungkinkan karena adanya kesamaan asam amino yang dikode oleh beberapa codon. Kesamaan kose asam amino terlebih pada basa para urutan ke tiga 2) *Neutral mutation* (mutasi netral)

yaitu mutasi basa nukleotida yang mengakibatkan perubahan asam amino namun tetap mempunyai fungsi tidak jauh berbeda (ekivalen). Misalnya, kodon penentu asam amino lisin (AAG) berubah menjadi kodon penentu asam amino arginin (CGG). 3) *Missense mutation* (mutasi salah arti) yaitu mutasi basa nukleotida yang mengakibatkan perubahan asam amino. 4) *Non sense mutation* (mutasi tanpa arti) yaitu perubahan nukleotida yang mengakibatkan perubahan kode asam amino menjadi stop codon (Gambar 32)

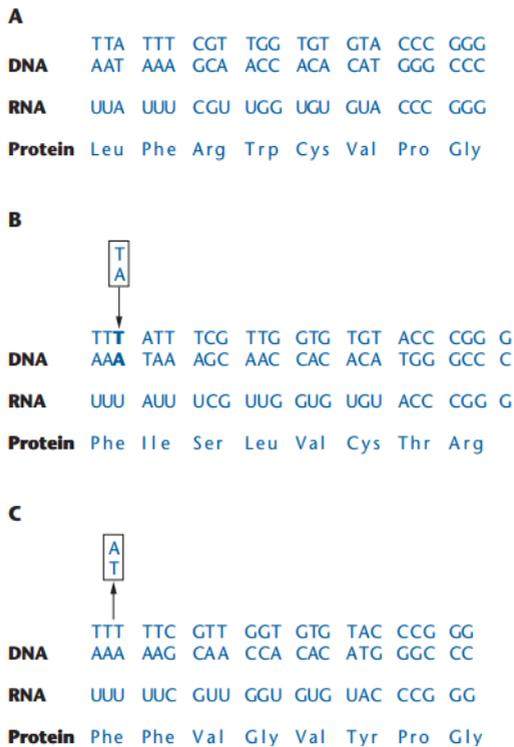


Gambar 31. Jenis jenis mutasi dan akibatnya pada perubahan asam amino

Mutasi juga dapat diakibatkan oleh adanya insersi maupun delesi. Insersi merupakan masuknya nukleotida baru kedalam urutan polinukleotida atau gen yang ada. Sedangkan delesi merupakan hilangnya nukleotida pada urutan nukleotida yang

ada. Kejadian insersi maupun delesi dapat mengakibatkan masalah yang serius pada urutan asam amino.

Perubahan urutan asam amino secara drastis seperti disebut dengan frame shift mutation. Perubahan tersebut juga memungkinkan protein tidak berfungsi sama sekali. Pada gambar 32 mendemonstrasikan adanya insersi yang mana mengubah urutan asam amino dari Leu-Phe-Arg-Trp-Cys-Val-Pro-Gly (keadaan normal) menjadi Phe-Ile-Ser-Leu-Val-Thr-Arg.



Gambar 32. Frame Shift mutation akibat adanya insersi dan delesi. A. sekuen normal DNA. B. sekuen yang mengalami insersi dan merubah urutan asam amino yang dihasilkan. B. Sekuen yang mengalami delesi dan merubah urutan asam amino yang dihasilkan

Pada gambar 32 bagian C menunjukkan adanya suatu delesi pada suatu bagian tertentu urutan basa 5'-T-3' menghilang sehingga terjadi perpindahan kerangka nukleotida.

Kejadian insersi dan delesi juga mampu mengakibatkan adanya codon baru yang memungkinkan munculnya stop codon baru maupun hilangnya stop codon. Pada kejadian lain frame shift mutation dapat membuah kesalahan pada proses alternaive splising. Alternative splising merupakan pemotongan intron dan pada bagian tertentu. Apabila bagian yang dipotong ini mengkode basa nukleotida yang berbeda maka bisa jadi bagian pemotongan tidak ditemukan sehingga menjadi bagian lain pada ujung ke 3'. Kejadian kegagalan pemotongan pada sisi altelnative splising menjadikan bentukan ekspresi yang berbeda dengan protein yang di butuhkan.

6.4 Latihan Soal

1. Jelaskan Pemanfaatan Biologi Molekular di dunia Kesehatan?
2. Apa yang di maksud dengan mutasi genetik?
3. Jelaskan bagaimana suatu mutasi dapat berakibat frame shift mutation? Dan bagaimana efek yang diakibatkan?

Isolasi DNA

7.1 Pengertian Isolasi DNA

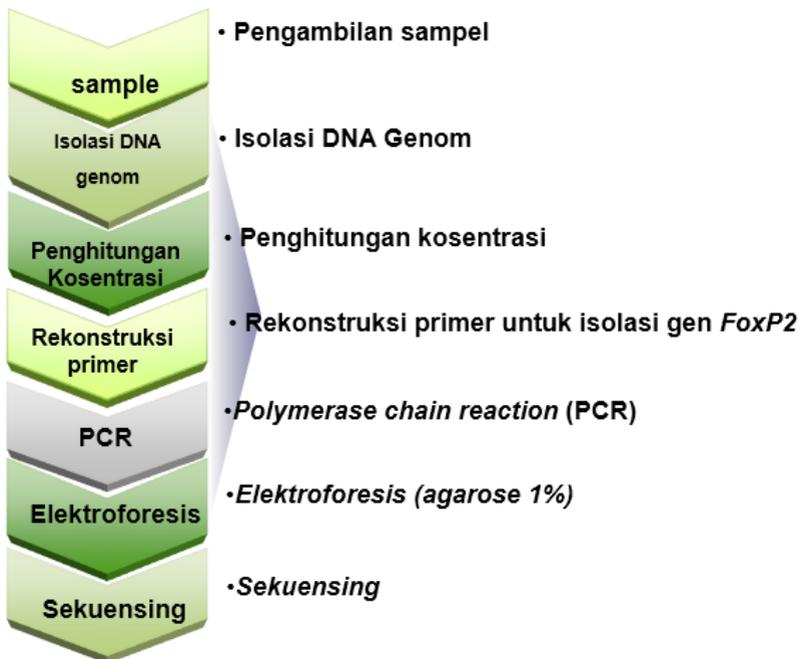
7.2 Perkembangan Isolasi DNA

7.1 Pengertian isolasi DNA

Analisis molekular yang berhubungan dengan genomic secara umum memiliki tahapan yang sama, dimulai dari isolasi DNA, dilanjutkan dengan pengecekan kualitas DNA, PCR dan analisis. Pengecekan kualitas DNA dapat dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Secara kuantitatif menggunakan UV VIS Spectrofotometer, dan secara kualitatif menggunakan elektroforesis. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan molekul DNA dari molekul molekul lain (protein, asam amino, RNA, karbohidrat, lipid dan lain sebagainya).

Isolasi DNA dapat dilakukan secara sederhana atau menggunakan KIT (DNA Isolation KIT). Isolasi secara sederhana dapat menggunakan metode metode yang sebelumnya telah dikembangkan, segala sesuatunya dipersiapkan sendiri. Kelemahan dimetode ini tentu memiliki membutuhkan waktu untuk penyiapan dan kegiatan isolasi lebih lama, hasil atau kualitas berbeda beda tergantung dari keahlian, biasanya harus disiapkan dalam jumlah banyak. Sedangkan keunggulan dari metode ini adalah biaya yang

relative lebih murah, apabila metode ini sudah teruji oleh laboratorium memiliki kualitas yang bagus dapat dijadikan menjadi formula laboratorium, peneliti bebas memodifikasi sesuai dengan keinginan supaya mendapatkan hasil yang optimal/ yang di inginkan aik volume, kosentrasi, atau component di setiap reagent yang digunakan.



Gambar 33. Tahapan Umum Kerja Molekular Genomik

Isolasi DNA dengan menggunakan DNA isolation kit memiliki prosedur yang jelas Secara sederhana isolasi DNA dapat dibagi menjadi tiga tahapan, yaitu Lisis, Ekstraksi, dan pemurnian. Lisis merupakan tahapan mengeluarkan isi sel. Metode yang digunakan dapat berbeda beda sesuai dengan karakteristik sampel. Misanya

sampel dari darah tentu berbeda apabila dibandingkan dari tulang atau dari jaringan.

Baik menggunakan metode Isolasi DNA sederhana maupun menggunakan kit memiliki prinsip tahapan yang sama. Tahap pertama dalam isolasi DNA, Isolasi DNA adalah proses pemecahan sel atau jaringan sampel. Pemecahan sel tersebut dapat dilakukan secara fisik, kimiawi, maupun enzimatik. Secara fisik dapat dilakukan dengan 1) freeze-thawing yaitu dengan cara pengejutkan kondisi dan biasanya dilakukan menggunakan nitrogen cair kemudian digerus didalam lumping alu dengan sesegera mungkin. Kondisi sampel yang beku memungkinkan penghancuran lebih mudah. 2) ultrasonikasi, yaitu dengan menggunakan getaran ultrasonik.

Pelisisan juga dapat dilakukan secara kimiawi, yaitu dengan homogenasi dalam buffer yang mengandung detergen seperti Triton X-100 dan *sodium deodecyl sulphate* (SDS) yang bersifat merusak sel dan mendisasosiasi kompleks DNA-protein. Selanjutnya, protein dan RNA dibuang melalui runtutan inkubasi dengan enzim proteolitik (umumnya *Proteinase K*) dan ribonuklease. Pada sampel pada kondisi tertentu. Seperti kondisi dimana dinding spora yang kuat dan susah untuk dipecah atau pada kondisi dimana kandungan protein yang sangat tinggi dan memicu adanya kontaminasi maka ekstraksi perlu dilakukan lebih dari sekali Jaringan tanaman yang umumnya karbohidratnya cukup tinggi tidak bisa hanya diekstraksi menggunakan fenol. Biasanya digunakan detergen *Cetyl Teimethyl ammonium Bromida* (CTAB) yang membentuk kompleks taklarut dengan asam nukleat.

DNA kemudian diekstraksi atau dipisahkan dari komponen penyusun sel lainnya dengan penambahan bahan-bahan lainnya yaitu fenol, kloroform dan atau isoamil alkohol yang akan mengikat kompleks protein dan lipid, sehingga memisahkan dengan DNA. DNA hasil ekstraksi dalam keadaan *aqueous compound* lalu dipresipitasi

dengan etanol yang akan mengendapkan asam nukleat rantai panjang saja.

7.2 Perkembangan Isolasi DNA

Metode isolasi DNA berkembang dari waktu ke waktu. DNA pertama kali berhasil di isolasi oleh Ahli fisikawan dari Swiss, Friedrich Miescher (1869). Dia berharap dapat menemukan suatu materi dasar pengatur kehidupan. Untuk pertama kalinya ia mencoba dari sampel limpa akan tetapi kontaminannya sangat tinggi dan jumlah DNA nya terlalu sedikit. Kemudian dia beralih menggunakan lymphosit yang ia dapat dari sampel pus bekas pembedaan. Pada dasarnya Miescher fokus pada beberapa protein yang menjadi mayoritas komponen penyusun sel lymphosit. Akan tetapi ada yang memisah ketika diberi asam dan dipisahkan menggunakan alkali. Dari sinilah untuk pertama kalinya DNA dimurnikan. Dari sini dia mengembangkan lagi protokol yang mampu menghasilkan lebih banyak DNA yang ia sebut sebagai nuclein yang kemudian nama tersebut diganti menjadi nucleic acid oleh anak didiknya sendiri (Richard Altman).

Sedangkan protein sebagai molekul kajian biologi molekular pertama kali di isolasi pada tahun 1893 oleh Gerhardus Johannes Mulder seorang ilmuan kimia dari belanda. Studinya fokus pada pemeriksaan molekul molekul pada beberapa jaringan. Ia juga yang berhasil merumuskan katagori katagori protein yang masuk kedalam makromolekul dan micromolekul. Pada awalnya kajian mengenai protein ini hanya fokus pada protein protein yang memiliki jumlah yang cukup besar pada suatu jaringan. Protein-protein dengan jumlah yang sangat sedikit lebih susah untuk dipurifikasi. Namun seiring dengan perkembangan teknologi pada saat ini pemurnian protein dalam jumlah yang relative sedikit pun mampu untuk dilakukan.

Dimulai saat Human Genom Project berlangsung akibat dibutuhkannya suatu metode yang lebih cepat, efektif, dan efisien. Berbagai perusahaan menawarkan produk untuk membantu. Pada saat ini mulai dari metode colloum, resin bahkan ada suatu jenis PCR secara langsung yang tidak membutuhkan isolasi (untuk jenis sampel sampel khusus).

Pada dasarnya kesuksesan dalam isolasi DNA dibutuhkan empat tahapan penting yaitu; (1) penghancuran sel secara sempurna, (2) denaturasi nucleoprotein kompleks secara sempurna, nucleases tidak berfungsi (RNase tidak aktif ketika isolasi RNA atau DNase tidak aktif ketika isolasi RNA) (3) dan Nucleic Acid terbebas pada materi materi lain yaitu karbohidrat, protein, lemak dan lainnya (4). Selain kreteria diatas biasanya jumlah DNA juga di pertimbangkan, kosentrasi menentukan kesuksesan analisis molekular berikutnya.

Metode konvensional dalam isolasi DNA berlahan telah ditinggalkan. Metode tersebut banyak mengalami metode sesuai dengan bahan yang dijadikan sampel. Metode konvensional sendiri juga dikenal banyak macam seperti metode ekstraksi Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform, metode ekstraksi alkaline, metode ekstraksi CTAB, metode ekstraksi gradiasi Ethidium Bromide (EtBr)-Cesium Chloride (CsCl), Pemurnian Poly (A) + RNA dengan menggunakan Oligp(dT)-Cellulose Chromatography. Metode saat ini yang sering digunakan adalah *column-based* protocol dan *solution-based* protocol yang biasanya disediakan oleh pabrikan. Masing masing memiliki keunggulan dan kelemahan. *column-based* protocol menghasilkan DNA yang murni tidak ada campuran kontaminant akan tetapi membutuhkan waktu yang lama didalam mengisolasi. Selain itu membutuhkan sentrifugasi berulangkali dan memutuhkan ketelitian yang tinggi karena melibatkan banyak reagen. *solution-based* protocol megmbutuhkan waktu yang relative lebih singkat dan menghasilkan DNA yang kemurniannya tidak setabil karena masih bercampur dengan beberapa komponen lain.

7.3 Latihan Soal

1. Jelaskan Prinsip dasar Isolasi DNA!
2. Jelaskan Perkembangan Isolasi DNA dari cara awal hingga sekarang munculnya kit kit baru pabrikan!

Polimerase Chain Reaction (PCR)

8.1 *Konsep Dasar PCR*

8.2 *Thermocycler dan tahapan tahapannya*

8.3 *Bahan Bahan PCR*

8.1 Konsep Dasar PCR

Perkembangan ilmu pengetahuan menuntun menuju era genomik. Sehingga segala sesuatu langsung menuju pada inti kehidupan yaitu materi genetik. Perkembangan itu mulai di tandainya beberapa metode yang sebelumnya tidak ada. Pemeriksaan-pemeriksaan yang memanfaatkan DNA sebagai rujukan. Hal yang paling familiar bagi kita adalah identifikasi keturunan atau ketika ada kecelakaan pesawat terbang, korban kehatan (mutilasi atau pencarian tersangka) maka yang menjadi primadona adalah DNA. Lalu teknologi seperti apa yang digunakan? Pada bab ini kita akan bahas terlebih metode dasar dalam laboratorium.

Polimerase chain reaction (PCR) yang dikenalkan oleh mullis pada tahun 1983 merupakan kunci dari semua reaksi ini. PCR secara sederhana dapat dideskripsikan sebagai metode untuk melakukan perbanyakan atau penggandaan (amplifikasi) materi genetik pada tingkat laboratorium (*in vitro*). Pemanfaatan Taq polimerase yang di isolasi dari bakteri thermofilik (bakteri yang hidup pada lingkungan panas) menjadikan proses replikasi bisa dilakukan pada tingkat

laboratorium, sehingga pada dasarnya PCR merupakan proses rekayasa apa yang terjadi diproses replikasi dibawa ke tingkat laboratorium. PCR juga dapat digunakan untuk mengamplifikasi RNA. Namun sebelumnya harus dilakukan pembuatan cDNA. Proses tersebut disebut Reverse Transkriptase PCR (RT PCR).

8.2 Thermocycler dan tahapan PCR

Sesuai dengan namanya thermocycler merupakan alat yang mampu melakukan otomatisasi perpindahan suhu. *Thermo* berarti suhu dan *cycler* yang berarti perputaran. Perputaran suhu dibutuhkan untuk mengoptimalkan setiap proses didalam PCR. Proses didalam PCR pada dasarnya adalah denaturasi, annealing, elongasi. Namun demikian alat alat terbaru sudah dilengkapi dengan fitur fitur menarik seperti predenaturation, post elongation, dan holding. Beberapa PCR generasi terbaru juga sudah dilengkapi dengan gradient suhu. Dengan fitur ini para praktisi dapat melakukan optimasi pada beberapa suhu secara bersamaan (biasanya gradient berkisar antara 3-12).



Gambar 34. Thermocycler (sumber: google/image)

Merek merek ternama juga menawarkan fitur 2D gradient. Artinya dalam satu Running memungkinkan sejumlah sampel (96 sampel) bereaksi dengan suhu yang berbeda. Teknologi seperti ini membuat penelitian makin mudah. Thermocycler yang baik akan menghasilkan hasil yang sama pada tiap pengulangannya (stabil).

8.2.1 Predenaturasi

Predenaturasi digunakan untuk mengubah konformasi genom dari rantai ganda menjadi rantai tunggal. Begitu panjangnya genom dan begitu kompleksnya system pengaturan genom menjadikan pertimbangan diperlukannya proses ini, sehingga pada predenaturasi biasanya membutuhkan waktu yang lebih lama di bandingkan dengan denaturasi. Predenaturasi hanya dilakukan sekali dalam proses PCR sehingga tidak mengikuti siklus. Pada proses denaturasi juga mulai aktifnya enzim taq polymerase yang bersifat Hotstart.

8.2.2 Denaturasi

Pada dasarnya prinsip dari denaturasi sama dengan predenaturasi, perbedaan mendasarnya adalah pada denaturasi terlibat didalam siklus PCR. Denaturasi biasanya memiliki waktu yang lebih pendek dibandingkan predenaturasi (sekitar 30 detik sampai 2 menit). °C

8.2.3 Annealing

Annealing merupakan proses penempelan primer ke DNA target. Annealing membutuhkan optimasi untuk mendapatkan suhu yang tepat tergantung dari prosentase keberadaan GC pada primer. Optimasi dilakukan dengan cara suhu berjangka biasanya di

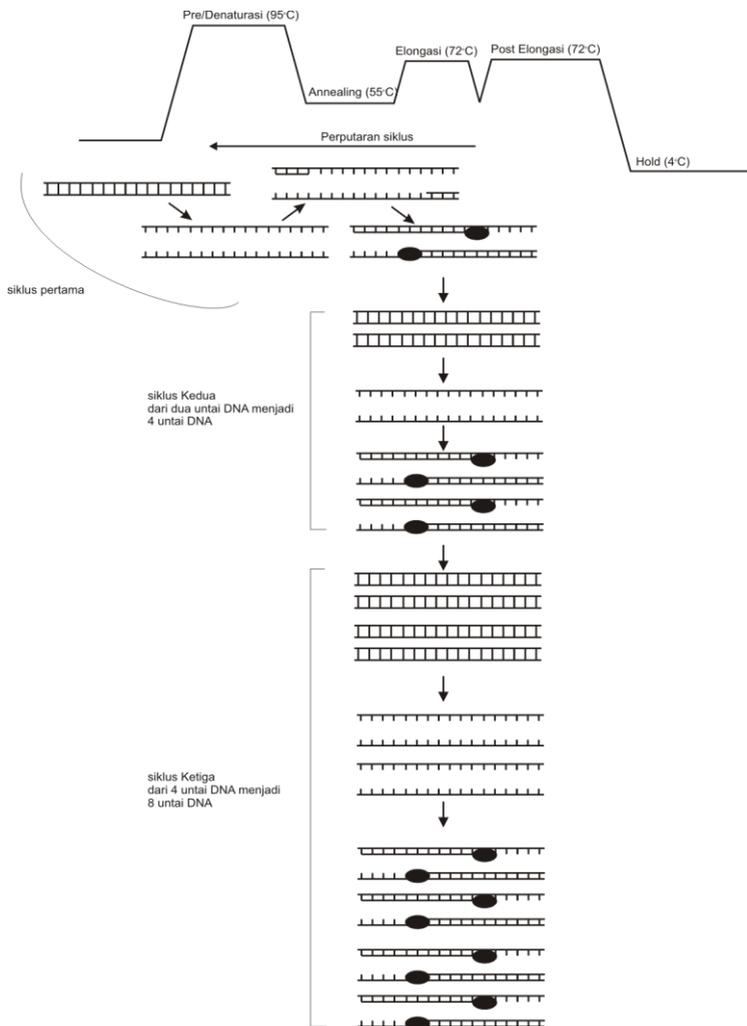
bedakan sekitar 2 C. Perbedaan 1 atau 2 °C sangat mempengaruhi hasil annealing.

8.2.4 ELONGASI

Proses elongasi atau sering disebut sebagai pemanjangan DNA merupakan proses enzim taq polymerase bekerja secara optimal. Suhu yang digunakan adalah 72 °C. Beberapa literatur menyebutkan waktu 1 menit sudah mampu melakukan pemanjangan 2 kb DNA.

8.2.5 SIKLUS PCR

Siklus PCR dapat berlangsung 30-45 kali tergantung dari kebutuhan. Satu untaian DNA pada satu kali siklus akan digandakan menjadi dua. Dua untaian DNA akan menjadi empat. Empat untaian DNA akan digandakan menjadi delapan pada siklus ketiga dan begitu seterusnya. Namun demikian suatu bahan DNA tidak mungkin hanya satu dan dapat dengan jumlah ribuan hingga jutaan. Satu reaksi dimungkinkan dengan mempertimbangkan jumlah DNA template yang dimasukkan kedalam reaksi. Jumlah DNA 10^5 maka dibutuhkan 25 siklus. Apabila jumlah DNA 10^4 maka di butuhkan 30 siklus. Begitu juga seterusnya 10^3 dan 10^2 maka dibutuhkan 35 dan 40 siklus. Sehingga semakin sedikit sample yang digunakan maka dapat dipastikan jumlah siklus yang digunakan semakin banyak. Post elongation digunakan untuk menyempurnakan semua pemanjangan tujuan utamanya juga sebagai menyempurna reaksi sedangkan hold digunakan untuk melindungi sampel ketika reaksi telah selesai.



Gambar 35. Tahapan PCR

8.3 Bahan Bahan PCR

Bahan bahan untuk PCR pun relative sama, yaitu enzim taq polymerase III, DNA template (Sampel) , Primer Spesifik, Mg^{2+} , dNTP dan Buffer. PCR Konvensioal biasanya dilakukan dengan volume total 10-100 μ l. Pada bab ini kita akan bahas satu persatu

8.3.1 Enzim Taq DNA Polimerase

Enzim taq polymerase merupakan enzim yang di isolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* YT1 yang bersifat termofilik (hidup pada lingkungan panas). Penggunaan enzim taq DNA Polimerase yang terlalu banyak memungkinkan mengenali bagian bagian yang tidak diinginkan sedangkan taq DNA Polimerase yang tarlalu sedikit membuat DNA menjadi teramplifikasi dalam jumlah yang sedikit.

8.3.2 DNA Template

DNA template atau DNA cetakan merupakan bahan yang akan lakukan pengujian, pada dunia kesehatan seringkali disebut dengan sampel. DNA template yang digunakan umumnya adalah DNA genom yang diperoleh dari Isolasi DNA. Tingkat kemurnian DNA pada proses PCR sangatlah penting. Kemurnian DNA dapat di uji melalui pengukuran spectrophotometer dengan membandingkan absorbansi A260/A280. DNA dikatakan murni apabila perbandingan menunjukkan angka 1,8-2,0.

8.3.3 Primer Spesifik

Primer digunakan untuk pengenlain titik/ daerah spesifik pada genom. Untuk mengenali daerah khusus, biasanya primer yang digunakan antara 18 sampai 30 bp. Primer dirancang dengan system *Forward* dan *Reverse*. Primer *Forward* melakukan amplifikasi pada

Leading Strand, sedangkan Primer Reverse melakukan amplifikasi pada *Langging strand*. Kandungan Guanin dan Citosine sebaiknya mendekati atau 50% dari total. Untuk menghindari salah target (mis primer) maka sebaiknya ujung 3' dihindarkan dari tiga basa berturut turut pada C dan G. untuk membuat primer tersebut sudah banyak program yang dapat membantu menganalisa. DNA target sebaiknya dibawah 1000 bp. Biasanya untuk target pendek 100-400 lebih sering digunakan untuk memaksimalkan amplifikasi spesifik. Kosentrasi dari perusahaan biasa sebesar 100 μ Mol. Sehingga disarankan untuk diencerkan sesuai dengan kebutuhan rutin laboratorium.

Jumlah Primer yang terlalu banyak dalam suatu reaksi akan menimbulkan mis primer (salah sasaran target DNA). Sedangkan penggunaan primer yang sedikit membuat pita DNA yang tipis. Penggunaan Primer yang lebih dari satu pasang juga di mungkinkan. Keadaan demikian disebut multipleks PCR. Multipleks PCR seringkali digunakan untuk mendeteksi pathogen. Untuk mendapatkan

Pada reaksi PCR, primer berperan dalam proses inisiasi dalam polimerasi. Primer yang digunakan dalam PCR harus memiliki sekuen nukleotida yang komplementer terhadap daerah yang mengakit segmen DNA target pada template. Amplifikasi gen target membutuhkan dua primer yang berikatan secara spesifik pada daerah ujung 5' dan ujung 3' gen target . Hal tersebut menandakan bahwa desain primer sangat menentukan spesifisitas reaksi PCR. Untuk reaksi PCR yang optimal, primer yang digunakan harus memiliki beberapa karakteristik, di antaranya kedua primer yang digunakan sebaiknya memiliki kandungan G-C yang sama sehingga memiliki *temperature melting* (T_m) yang sama .

Selain itu, kedua primer yang digunakan sebaiknya tidak mengandung sekuen yang komplementer antara kedua primer

tersebut untuk menghindari pembentukan dupleks antara kedua primer. Primer yang digunakan sebaiknya tidak mengandung sekuen yang bersifat inverted repeats. Konsentrasi primer yang digunakan harus sesuai dengan jumlah siklus PCR yang dijalankan, konsentrasi yang terlalu tinggi menyebabkan efisiensi reaksi PCR yang rendah dan dihasilkan produk PCR yang tidak spesifik.

8.3.4 Mg^{2+}

Mg^{2+} Merupakan ion logam yang bertugas sebagai co enzim. Taq polymerase tidak dapat bekerja sendiri sehingga untuk mengoptimalkan kinerja di perlukan Mg^{2+} .

8.3.5 dNTP

dNTP merupakan bahan dasar yang nantinya digunakan untuk proses pemanjangan oleh taq polymerase III. dNTP dibagi menjad dATP, dTTP, dGTP dan dCTP. Pada saat reaksi jumlah keempatnya harus memiliki jumlah yang sama untuk menghindari kesalahan reading. Apabila kosentrasi dNTP semakin tinggi maka aktifitas enzim polymerase akan semakin meningkat. Biasanya Perusahaan sudah menyediakan dalam bentuk PCR mix yang berisi dNTP, Mg^{2+} , Tag Polimerase dan Buffer sehingga didalam proses PCR hanya menambahkan DNA template, Primer, dan ddH₂O saja. Namun demikian, Peneliti juga bisa membuat campuran sendiri sesuai dengan kebutuhan.

8.4 Latihan Soal

1. Jelaskan bagaimanakan prinsip kerja dari Polimerase Chain Reaction (PCR)?
2. Sebutkan bahan bahan dan fungsi yang digunakan pada proses PCR?
3. Apabila dalam suatu Reaksi PCR digunakan 150 untai DNA target dan dilakukan sebanyak 30 siklus berapakah jumlah DNA copi yang dihasilkan?



Uji Kualitas DNA

9.1 Uji Kualitatif Menggunakan Elektroforesis

9.2 Faktor Faktor Yang Mempengaruhi Elektroforesis

9.3 Analisis Uji Kualitatif

9.4 Uji Kuantitatif menggunakan UV Vis Spektrofotometer

9.5 Jenis jenis Spektrofotometer

9.6 Analisis uji kuantitatif

Pengujian kualitas DNA setelah dilakukan Isolasi DNA merupakan tahap awal yang penting untuk menentukan langkah pada kegiatan analisis berikutnya baik PCR, qPCR, RFLP dll. Tujuan utama isolasi DNA adalah memurnikan DNA dari materi materi lain, termasuk materi genetik yang tidak diinginkan. Sehingga dengan diketahui kemurnian dan kosentrasi, dapat diambil keputusan untuk melanjutkan analisis berikutnya. Hasil DNA yang dapat digunakan atau dikatakan baik adalah DNA genom yang memiliki jumlah kosentrasi tinggi, tidak ada kontaminasi RNA, Protein atau yang lainnya, memiliki bentuk yang utuh dan tidak putus putus. Oleh karena itu, ketika mengisolasi DNA, DNA genom

yang dihasilkan sebaiknya disimpan dalam buffer sehingga bentuk DNA tetap setabil. Secara sederhana pengujian kualitas DNA dapat dibagi menjadi pengujian secara kualitatif dan kuantitatif. Pengujian kualitatif dilakukan menggunakan metode elektroforesis, sedangkan pengujian secara kuantitatif dapat dilakukan dengan menggunakan metode Uv Vis Spectrofotometer. Kedua metode tersebut memiliki kelemahan dan kelebihan.

Tabel 8. Perbedaan uji kualitas DNA secara kualitatif dan kuantitatif

Uji Kualitatif	Uji Kuantitatif
Lebih simple dan tidak membutuhkan alat yang relative lebih mahal	Membutuhkan alat yang lebih modern dan relative lebih mahal
Dapat mengetahui kualitas langsung dengan mata visual	Kualitas diketahui melalui uji perbandingan serapan sinar UV-Vis dan dikalkulasi secara komputerisasi
Tidak dapat menentukan jumlah DNA secara pasti	Dapat menentukan jumlah DNA secara pasti
Dapat memperkirakan bentuk konformasi DNA	Tidak dapat menentukan bentuk konformasi DNA

9.1 Uji Kualitatif Menggunakan Elektroforesis

Elektroforesis merupakan metode pemisahan molekul berdasarkan panjang atau besar molekul dengan menggunakan arus listrik. Ditinjau dari jenisnya sebenarnya elektroforesis dapat dibagi menjadi bermacam macam, seperti elektroforesis kertas dan selulosa asetat, elektroforesis gel poliakrilamida sodium dodesil sulfat (SDS gel), electrophoresis gel slab, elektroforesis tegangan

tinggi, electkroforesis gel agarose. Namun demikian fokus pada pembahasan buku ini akan dipersempit pada elektroforesis gel agarose, dan elektroforesis gel slab saja.

Elektroforesis gel slab merupakan metode dengan cara membuat gel yang diapit oleh dua buah kaca, yang kemudian di atasnya dibuat sumuran, sumuran ini yang akan digunakan sebagai tempat sampel. Elektroforesis gel agarose mirip dengan gel slab, bedanya terletak pada peletakan gel yang ditaruh di fase gerak cair yaitu TBE atau TAE.



Gambar 36. Mesin Elektroforesis (sumber: www.thermoscience.com)

Ahli biologi menggunakannya elektroforesis untuk memisahkan berbagai jenis molekul, misalnya, DNA pada panjang yang spesifik, DNA dari protein, atau satu jenis protein dari yang lain. Di dalam dunia biologi molekular, elektroforesis seringkali digunakan untuk memisahkan molekul DNA, RNA, atau Protein.

Pemisahan DNA diakibatkan adanya Gugus fosfat yang mengandung muatan listrik negative (-). Jika suatu molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, misalnya gel agarosa, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif.

Elektroforesis DNA umumnya menggunakan metode elektroforesis gel agarose, dan gel poliacrilamit, yang memiliki pori yang relatif lebih kecil, biasanya digunakan untuk menganalisis asam amino atau pada awal perkembangannya sering digunakan sebagai pemisah materi DNA yang memiliki component nukleotida yang sangat pendek, yang aplikasinya digunakan untuk sekuensing. Gel agarosa dibuat dengan melarutkan bubuk agarosa dalam suatu buffer (TBE). Agar dapat larut dengan baik, pelarutannya dapat dibantu dengan pemanasan hingga gel agarosa dalam keadaan cair sehingga mudah dituang ke atas lempeng, dan sebelum mendingin dibuat sumuran dengan menggunakan Perspex/ cetakan menyerupai sisir yang ditancapkan pada salah satu ujung gel yang masih cair. Sehingga ketika gel memadat, terbentuklah sumuran-sumuran kecil. Kedalam sumuran inilah nantinya molekul DNA dimasukkan.

Pada beberapa sampel khususnya DNA, perlu dilakukan pelabelan. Hal ini dilakukan karena pada dasarnya DNA tidak dapat dilihat secara kasat mata. Hibridisasi antara label dan biasanya terdapat pada basa nitrogen, sehingga zat yang digunakan untuk pelabelan seringkali bersifat karsinogenik (pemicu terjadinya kanker) contoh yang sering digunakan adalah EtBr (*Editium Bromida*) Oleh karena itu, penggunaan label atau penanda pada analisis biologi molekular harus sangat hati hati.

9.2 Faktor Factor yang Mempengaruhi Elektroforesis

Banyak factor yang harus diperhatikan dalam elektroforesis, misalnya medium penyangga, sampel, buffer dan medan listrik. Jenis buffer (penyangga/ dapar) yang banyak digunakan antara lain format, asetat, sitrat barbitone, tris, EDTA dan piridin. Buffer yang digunakan tidak harus mengikat senyawa yang akan diamati karena akan mempengaruhi kecepatan gerak, tetapi dalam hal tertentu hal

ini mungkin akan menguntungkan, misalnya buffer borat digunakan untuk memisahkan karbohidrat karena dapat membentuk gabungan yang bermuatan listrik dengan karbohidrat. Karena buffer berperan sebagai pelarut sampel, penyebaran sampel tidak akan dapat dihindari, terutama pada molekul kecil seperti DNA, asam amino atau gula.

1. Medium penyangga

Konsentrasi agarosa yang digunakan biasanya berkisar antara 0,5-2%. Ukuran pori gel yang dihasilkan bergantung pada konsentrasi agarose, semakin tinggi konsentrasi agarosa maka semakin kecil ukuran pori. Sebaliknya, semakin rendah konsentrasi agarosa maka semakin besar ukuran pori. Setelah elektroforesis selesai, gel diinkubasi dengan fluorescent.

Tabel 9. Rentangan persebaran molekul DNA

Konsentrasi agarose (%)	Rentangan atau jarak yang efisien untuk sparasi molekul DNA linear (bp)
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 -3
2.0	0,1 -2

sumber: Theophilus & Rapley, 2003

2. Jenis sampel yang digunakan

Jenis sampel sangat mempengaruhi hasil elektroforesis, sampel yang sama bisa jadi memiliki bentuk yang berbeda mungkin menunjukkan hasil yang berbeda

pula, bentukan ini khususnya DNA yang mungkin bersifat coiled, semi coiled, atau non coiled.

3. Suhu

Suhu mempengaruhi dari konformasi DNA yang dielektroforesis, semakin tinggi suhu maka konformasi dari DNA akan semakin tidak setabil, sebaliknya semakin rendah suhu maka bentuk DNA akan semakin setabil. Keadaan ini berkaitan dengan ikatan hydrogen yang ada pada basa nukleotida yang ma

4. Medan listrik

Elektroforesis memerlukan sumber arus listrik yang setabil, arus listrik ini yang menjadi penarik sampel dan dialirkan melalui larutan buffer. Medan listrik yang tidak setabil akan berakibat tidak lancarnya jalannya sampel melewati poros yang telah ada. Namun demikian kekuatan listrik yang digunakan juga menunjukkan hasil yang berbeda pula, semakin tinggi arus listrik yang mengalir pada buffer maka sampel akan bermigrasi semakin cepat, namun kekompakkan sampel akan berkurang. Sebaliknya, semakin rendah makan kekompakkan akan lebih baik, namun membutuhkan waktu yang lebih lama. Arus yang terla lemah justru membuat sampel bermigrasi pada daerah yang tidak di inginkan

Poliakrilamid terbentuk dari polimerisasi monomer akrilamid dengan adanya *N,N'*-metilen-bisakrilamid. Monomer akrilamid terpolimerisasi pada kepala ke ekor membentuk rantai. Konsentrasi gel akrilamid yang rendah memiliki ukuran pori yang besar sedangkan konsentrasi gel akrilamid yang tinngu memiliki ukuran pori yang kecil. Setelah pewarna terikat telah dicucipergi, mudah untuk memvisualisasikan DNA dengan menempatkan gel di bawah

sinar ultraviolet. Ukuran sebenarnya dapat ditentukan dengan marker yang sudah diketahui panjangnya. Molekul DNA berbagai ukuran dari fragmen kecil yang kurang dari 10 bp atau bahkan kromosom manusia utuh yang memiliki panjang rata-rata 130.000.000 bp. Teknik elektroforesis DNA sudah berkembang sehingga analisis molekul DNA tidak hanya dapat dilakukan dengan prinsip elektroforesis linier.

9.3 Cara Kerja Elektroforesis

Prinsip kerja dari elektroforesis sebenarnya cukup sederhana yaitu memisahkan fragmen atau potongan DNA yang memiliki panjang berbeda dengan menggunakan medan listrik. Buffer yang biasanya digunakan didalam elektroforesis ada dua yaitu Tris-acetate EDTA (TAE) atau Tris-borate EDTA (TBE) pada konsentrasi berkisar 50 mM. Dari segi harga, TBE biasanya agak lebih mahal di bandingkan dengan TAE, akan tetapi TBE memiliki kapasitas buffer yang lebih tinggi. Voltase yang digunakan untuk running antara TBE dan TAE biasanya hamper mirip, akan tetapi TAE bermigrasi 10% lebih cepat dibandingkan dengan TBE.

Visualisasi DNA pada gel agarose tidak bisa dilakukan secara langsung. Visualisasi membutuhkan perwarna dan yang paling sering digunakan adalah dengan menggunakan pewarnaan *dye ethidium bromide* (*3,8-diamino-6-ethyl-5-phenyl-phenanthridium bromide*), ethidium bromide mengikat pada basa nukleotida. Pengikatan tersebut membuat DNA dapat dideteksi menggunakan metode penanda. Radiasi UV yang dapat digunakan dan terikat kuat untuk mendeteksi keberadaan Et-Br berkisar pada rentang panjang gelombang 260–360 nm dan dipantulkan pada panjang gelombang 590 nm. Alat Elektroforesis gel memiliki beberapa komponen yang terdiri dari:

1. *Comb*: digunakan untuk membentuk *well* pada gel agarosa.
2. *Tray*: digunakan untuk sebagai cetakan gel agarosa.
3. *Chamber*: digunakan sebagai wadah gel agarosa.
4. Sumber listrik: digunakan untuk memberi arus saat proses elektroforesis.

9.4 Analisis hasil isolasi DNA secara kualitatif

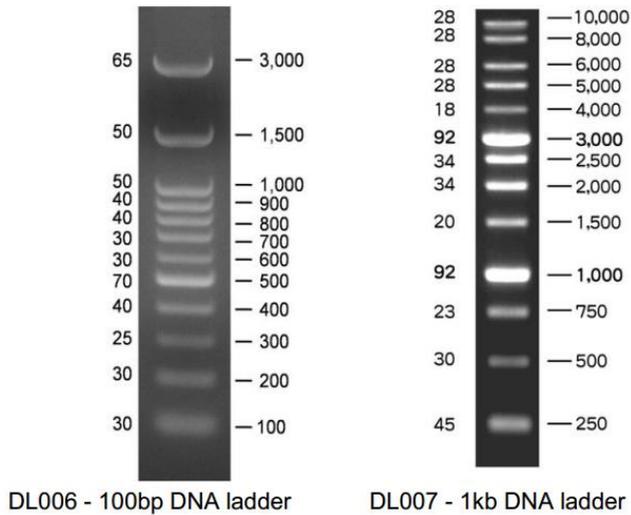
Analisis DNA hasil isolasi DNA secara kualitatif biasanya dilakukan untuk mengecek keberhasilan isolasi DNA secara kasar. Analisis hanya dapat menjelaskan ada tidaknya DNA hasil isolasi DNA Genom. Karena ukuran DNA dgonom sangat besar, biasanya perpindahan molekul tersebut relative leih lama dan sedikit. Hal ini dikarenakan molekul akan kesulitan melewati pori –pori pada gel. Analisa ini juga sering digunakan untuk menentukan banyaknya RNA kontaminant.

Berbagai metode dikembangkan untuk mengoptimalkan penggunaan Elektroforesis menjadi analisis yang berbasis kuantitatif. Hal ini dilakukan mengingat keunggulan dari metode ini tidak dapat diperoleh secara pasti berapa jumlah DNA yang didapat, sedangkan keunggulannya adalah tidak membutuhkan alat yang relative mahal yaitu UV Vis Spectrofotometer. Dengan menggunakan marker DNA yang sudah diketahui kosentrasinya dan dengan melihat tebal tipisnya band/ pita yang dihasilkan pada gel. Maka dapat diperkirakan kuantitas DNA sampel.

Analisis hasil PCR merupakan media pokok selain analisis isolasi DNA secara kualitatif. Melali elektroforesis mapu di bedakan potongan atau sekuen target setelah dilakukan pcr. Didalam visualisasi biasanya membutuhkan bantuan marker untuk mengetahui hasil amplikon yang telah dilakukan. Marker ini memiliki bermacam macam ukuran mulai dari 100bp-1000 bp da

ELEKTROFORESIS GEL AGAROSA

nada pula yang dimulai dari 250 bp -5000 bp atau 500 bp -5000 bp. Visualisasi marker dapat di lihat pada Gambar 37



Gambar 37. Marker/ penanda panjang DNA pada elektroforesis

Bahan yang digunakan:

- Gel agarose
- TBE (Tris Borat EDTA/ Tris –Asam Borat): 89 mM Tris-Cl; 89 mM borat, dan 2 mM larutan EDTA)
- Loading dye: 0.4% Bromphenol Blue, 50% Gliserol, 1mM EDTA pH 8.0

Alat yang digunakan:

- Tank Electroforesis
- Gelas Ukur
- Timbangan analitik
- Pippete dan micropipete
- Microwave atau hotplate
- Erlenmeyer

Cara kerja

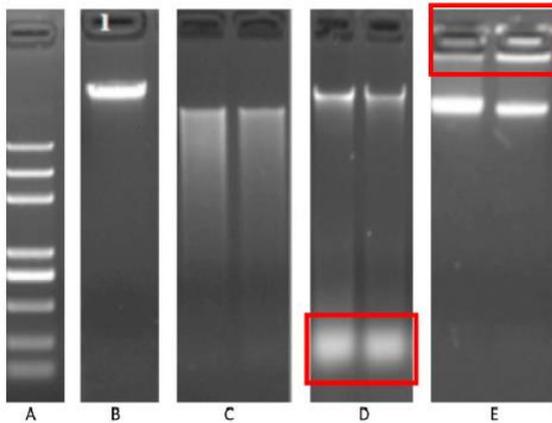
1. Siapkan 1% agarose (volume tank pada tank besar bisa dihitung (berdasarkan buku manual) dan untuk mini tank biasanya memiliki volume 40 ml, sehingga yang agarose yang digunakan adalah 4 gr.
2. Masukkan bubuk agarose kedalam gelas ukur, kemudian tambah TBE 1x sampai volume menuju 40 ml
3. Pindahkan ke Erlenmeyer supaya mempermudah untuk dipegang (pemrosesan)
4. Masukkan kedalam microwave atur kedalam posisi mendidihkan media set waktu selama 1 menit
5. Kemudian keluarkan dan lakukan homogenasi dengan cara menggoyang goyangkan Erlenmeyer
6. Masukkan lagi ke microwave atur waktu selama 2 menit biarkan hingga mendidih, pastikan homogen
7. Tunggu hingga suhu sekitar 45 atau 50 C Masukkan ET Br atau sejenisnya kedalam Erlenmeyer
8. Pastikan homogeny dengan cara digoyang goyang
9. Pasang tray (tatakan) dan jangan lupa pasang sisir (comb)
10. Masukkan cairan agarose secara perlahan dan pastikan tidak ada gelembung
11. Biarkan hingga dingin

12. Apabila sudah mengeras maka lepaskan sisir secara pelan pelan kemudian masukkan ke dalam chamber elektroforesis, pastikan sumuran hasil cetakan dari sisir berada pada sisi negative (biasanya di bagian atas)
13. Masukkan TBE 1x kedalam chamber sampai agarose terendam sekitar 2 mm
14. Masukkan campuran Loading dye dan DNA yang akan dianalisis dengan perbandingan 1 : 1, (loading dye biasanya ready dalam konsentrasi 6x)
15. Masukkan campuran secara hati hati dan rata.
16. Running tergantung keperluan, migrasi dapat dilihat melalui loading day yang telah digunakan
17. Visualisasi gel elektroforesis dapat dilakukan dengan menggunakan UV-transilluminator
18. Abadikan pita pita DNA yang terbentuk menggunakan kamera khusus atau kamera biasa yang kemudian diedit menjadi hitam putih.

Kendala yang sering dihadapi dalam mendapatkan hasil isolasi DNA adalah 1) Sampel DNA rusak, 2) Sampel DNA terdegradasi, 3) Terdapat kontaminasi RNA, 4) Kontaminasi Protein, 5) Kontaminasi genom (pada hasil PCR) atau, 6) Kontaminasi hasil PCR (pada isolasi DNA).

Sampel rusak dapat disebabkan oleh beberapa sebab, bisa jadi memang sampel merupakan bahan yang sulit untuk di ekstrak DNA nya, kegagalan dalam memecah (lisis), metode didalam isolasi DNA (kemampuan DNA isolation KIT) atau keahlian atau kompetensi praktikan yang melakukan isolasi DNA. Kerusakan DNA yang diuji

menggunakan metode elektroforesis terdeteksi dengan adanya smear yang tidak beraturan. Untuk lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 38.



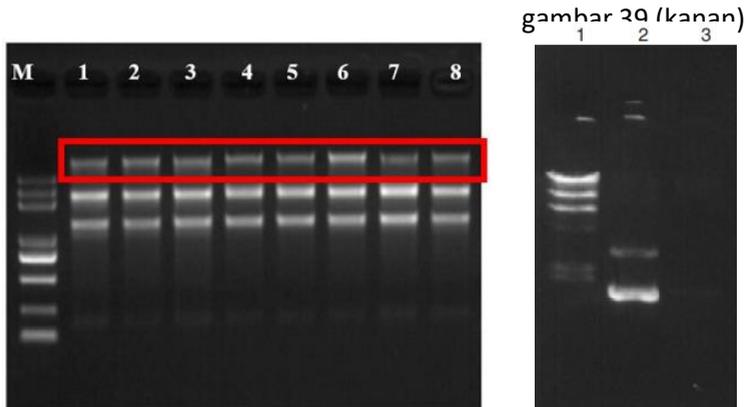
Gambar 38. Visualisasi Elektroforesis genom pada berbagai kondisi
A. Marker B. genom kondisi baik C. DNA terdegradasi D. DNA kontaminasi RNA E. DNA terkontaminasi protein

Selain Rusak, DNA juga dapat terdegradasi. DNA yang terdegradasi kemungkinan diakibatkan terlalu kerasnya perlakuan ketika ekstraksi sehingga DNA ikut hancur dan terpotong potong. Biasanya pada keadaan ini dikarenakan sulitnya bahan yang akan diekstraksi atau terjadi penggumpalan sehingga membutuhkan perlakuan khusus didalam ekstraksi.

Kontaminasi RNA sering menjadi kendala pada tahapan isolasi DNA. Kontaminasi RNA yang diamati menggunakan gel electrophoresis ditandai dengan adanya smear di bagian bawah. Kontaminasi ini dapat terjadi pada isolasi DNA maupun hasil PCR. Kontaminasi protein juga seingkali menjadi permasalahan ketika isolasi DNA maupun RNA. Kontaminasi ini dapat kelihatan

secara nyata melalui visualisasi gel agarose. Kontaminan akan kelihatan disekitar sumuran. Hal ini dikarenakan protein tidak dapat masuk kedalam pori pori gel agarose yang lebih kecil. Kontaminasi Protein dapat diatasi dengan penambahan Proteinase ketika Isolasi DNA, atau hasil isolasi DNA tersebut di Isolasi dengan penambahan Proteinase.

Kontaminasi genom biasanya terjadi pada PCR yang menggunakan jumlah DNA yang terlalu banyak sehingga masih kelihatan ketika divisualiasi menggunakan gel agarose, DNA genom akan tampak smear atau tipis dibandingkan dengan gen target PCR. Posisi berada diatas marker karena panjang genom tentu jauh lebih panjang dari pada panjang gen PCR target. Kontaminasi lainnya yang dimungkinkan adalah kontaminasi produk PCR. Kontaminasi ini dikarenakan kecerobohan peneliti, atau terdapat penggunaan ulang pada microtube/microtipe yang seharusnya bersifat disposable/ Sekali pakai. Ada kemungkinan peneliti juga tanpa sadar kalau tipnya menyentuh zat lain. Kontaminasi Hasil PCR dapat dilihat pada visualisasi



Gambar 39. Visualisasi Kontaminasi Genom Pada Ekeltroforesis Hasil PCR Kiri dan Kontaminasi hasil PCR (kanan). (Dokumentasi Lab. Biomol Umsida)

9.4 Uji Kualitas Dna Secara Kuantitatif

Analisis kualitas DNA secara kuantitatif dapat dilakukan dengan cara metode spectrofotometry. Pada saat ini telah banyak di rancang Spectrofotometer yang didesain khusus untuk analisa sampel DNA dan protein, dengan demikian sampel yang dibutuhkan hanya berkisar 1 – 2 µl saja. Sebenarnya UV Vis Spectrofotometer yang menggunakan cuvette masih dapat digunakan, akan tetapi kelemahan dari metode tersebut harus menghitung sendiri secara manual. Dengan menggunakan rumus

$$c = \text{Abs} * \epsilon * F. p / l$$

c adalah kosentrasi, Abs adalah factor pengali yang tergantung dari sampel (dapat dilihat pada tabel 1). ϵ adalah panjang gelombang (260), F adalah ketetapan nilai pada Materi genetik. p adalah Faktor pengenceran. Sedangkan l sedangkan *Path leght* dalam centimeter (cm). sebagai contoh: pada cuvet micro biasanya minimal sampel yang digunakan adalah 80 µl, dan rata rata path legh yang digunakan adalah 1 cm.

Tabel 10. Konversi nilai absorbansi ke jumlah kosentrasi

Koefisien	Jumlah
DNA rantai ganda	50 ng-cm/ µl
DNA rantai tunggal	33 ng-cm/ µl
RNA	40 ng-cm/ µl

KEMURNIAN DNA

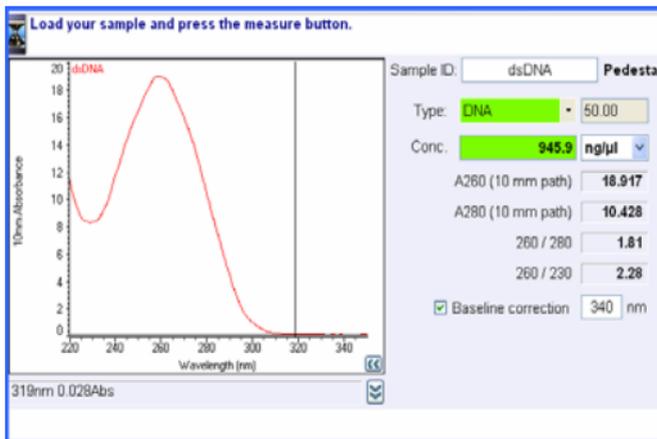
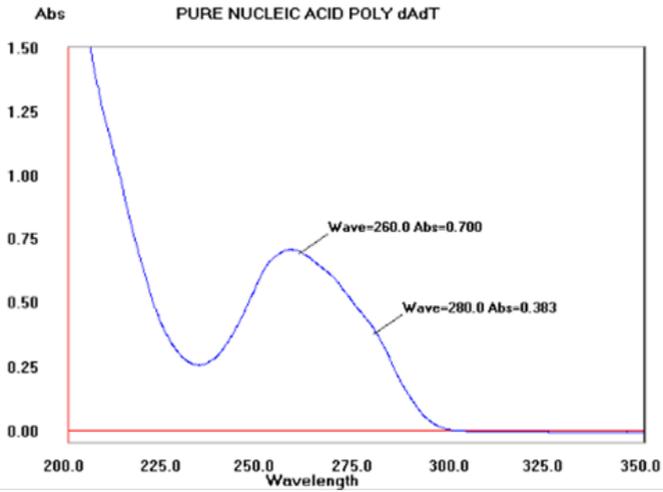
260/280

Kemurnian DNA dapat dihitung dengan menggunakan rasio absorbansi 260/280 nm. DNA dikatakan murni biasanya ketika nilai rasio

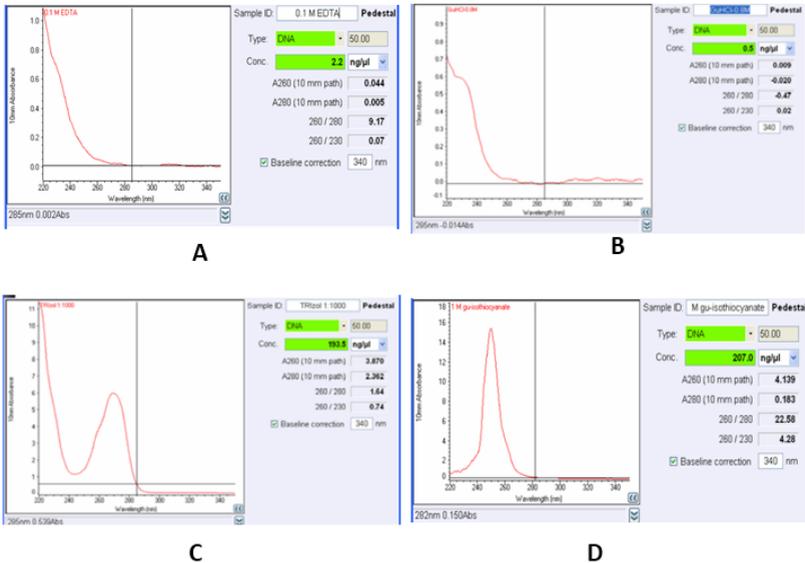
berkisar antara 1.8-2.0. apabila nilai lebih tinggi dari 2.0 maka DNA dapat dikatakan terkontaminasi RNA. Dan apabila rasio di bawah 1,8 maka dapat dikatakan adanya kontaminan lain seperti protein, phenol atau lainnya yang terserap kuat pada panjang gelombang 280 nm. Penggunaan panjang gelombang 260 nm dikarenakan DNA dan RNA menyerap kuat pada panjang gelombang tersebut. Akan tetapi pada panjang gelombang 260 nm tidak dapat membedakan antara DNA dan RNA sehingga beberapa metode terus dikembangkan.

260/230

Penggunaan panjang gelombang 230 merupakan alternatif kedua untuk mendeteksi adanya kontaminan fenol. Karena fenol terserap kuat pada panjang gelombang 230 nm. Tingkat kemurnian DNA dengan menggunakan panjang 260/230 nm lebih tinggi dibandingkan 260/280 yaitu 2.00-2.20. selain itu analisis spectral pada scanning UV Vis Spectrofotometer atau nanodrop spectrophotometer dapat dianalisis untuk mengetahui tingkat kemurnian dan jenis kontaminan. Grafik DNA yang murni akan kelihatan seperti pada gambar seperti pada Gambar 40. Pada gambar 41 merupakan grafik yang menandakan adanya kontaminasi EDTA



Gambar 40. Grafik scan DNA pada spektrofotometer pada panjang gelombang 220 nm sampai 350 nm (sumber:thermoscientific)



Gambar 41. Berbagai bentuk kontaminasi pada analisa kuantitatif
A) Kontaminasi EDTA, B) Kontaminasi Guanidine HCl, C) Kontaminasi
TRIZOL, D) Kontaminasi Guanidine Isothiocyanate
 sumber:thermoscientific)

BIBLIOGRAFI

- Ardiana, D.W. 2009. Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Pepaya dan Jeruk dengan Menggunakan Modifikasi Bufer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian Vol. 14 No. 1 : 12-16.*
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Saidman, J.G., Smith J.A., & Stuhl, K. 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc. New York, pp: 193-196.
- Bremer, B., Anderberg, A. A., & Mari, K. (2002). Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels. 24, 274–301.
- Cambell N. A., Reece J. B., Urry L. A., Cain M. L., Wasserman S. A., Minorsky P. V., & Jackson R. B. 2008. *Biologi, edisi 8, jilid 1*. Jakarta= Erlangga.
- Davis, L., Kuehl, M. & Battey, J. 1994. *Basic method in Molecular Biology, 2nd edition*. America::ibrary of congress Cataloging.
- Elrod S. L. & Stansfield W. D. 2007. Schaum's Outlines Teori dan soal Genetika, edisi ke empat, Jakarta= Erlangga
- Erlich, H. A. 1989. PCR technology: Principle and Applications for DNA Amplification. Britain: Stockton press.
- Garibyan, L. & Avashia, N. 2013 Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. vol. 133:1-4,
- Hardwell (2003). *The Human Genome Project : Its Implications in Clinical Medicine*. 51(April), 373–380.
- Hartwell, L. H., Hood, L., Goldberg, M.L., Reynolds, A.E., & Silver, L. M., (2011). *Genetics: From Genes To Genomes, Fourth Edition*. America: McGraw-Hill.

- Holland, C. A., & Kiechle, F. L. (2005) Point-of-care molecular diagnostic systems — past , present and future. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.001>
- Human Genome Project : Expectations and Current Status.* (2016). 2(4), 2–4. <https://doi.org/10.15406/japlr.2016.02.00029>
- Karp, Gerald. 2008. *Cell and Molekular Biology.* New York: John Willey & Sons, Inc. pp. 567-573.
- Kass, D. H., & Batzer, M. A. (2001). *Genome Organization* /. 1–8.
- Kozel, T. R., & Burnham-marusich, A. R. (2017). crossm Diseases : Past , Present , and Future, 55(8), 2313–2320.
- Lefkowitz R. dan Kobilka K. B. 2012. G-Protein-Coupled receptors. Kungl. Vetenskaps Akademien
- Mattick, J. S., Dziadek, M., Terrill, B., Kaplan, W., Spigelman, A. D., & Dinger, M. E. (2010). The impact of genomics on the future of medicine and1 health. (Figure 1), 1–12.
- Nobel prize committee, 2012. Mature cell can be reprogrammed to become pluripotent.
- Pardo, A. (2004). The Human Genome and Advances in Medicine : Limits and Future Prospects, 133–138.
- Roses, E. W., Jeon, J., & Kim, S. (2019). *Comparative Analysis of the Complete Chloroplast Genome Sequences of Three Closely Related.* 6–8. <https://doi.org/10.3390/genes10010023>
- Shafee, T., & Lowe, R. (2017). Eukaryotic and Prokaryotic Gene Structure. Ssrn, (January). <https://doi.org/10.2139/ssrn.3013506>
- Srivastava, S., Srivastava, P. S., Srivastava, S., & Srivastava, P. S. (2013). Cell Structure and Organization. Understanding Bacteria, 61–95. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0129-7_4
- Steward K. B. 2007. The Human Genetic Code- The Human Genome Project and Beyont. (www. Genetic. Edu. Au).
- Susman, M. (2006). Genes: Definition and Structure. Encyclopedia of Life Sciences, (1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001494>

- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA , RNA , and Protein Extraction : The Past and The Present. 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Vira, H., Bhat, V., & Chavan, P. (2016). Diagnostic molekular microbiology and its applications: Current and future perspectives, *1*(1), 20–31. <https://doi.org/10.15761/CMID.1000105>
- Willey J. M., Sherwood L. M., & Woolverton C. J. 2009. Prescott's Principles of MICROBIOLOGY The McGraw-Hill Companies.
- Yuwono, Triwibowo. 2005. Biologi Molekular. Jakarta: Erlangga.

BIODATA PENULIS



Miftahul Mushlih, M.Sc. Lahir di Lamongan, lulus dari Universitas Negeri Malang (UM) pada tahun 2011, Pada tahun 2014 lulus Program Pascasarjana Biologi, Universitas Gadjah Mada (UGM) dengan fokus penelitian Genetika dan Biologi Molekular. Pada tahun 2015-2017, menjadi Staff pengajar di STIKES Perintis Sumatera Barat Prodi Analisis Kesehatan (sekarang Teknologi Laboratorium Medis (TLM)), dan mengembangkan Laboratorium Biologi Molekular. Pada tahun 2018-sekarang dipercaya mengembangkan Lab Biologi Molekular prodi TLM di Universitas Muhammadiyah Sidoarjo dan menjadi Dosen tetap di Kampus tersebut.

ISBN 978-623-6081-07-5 (PDF)



UMSIDA PRESS
Jln. Mojopahit No 666 B, Sidoarjo