GENETIKA Prinsip Dasar Berbasis Penelitian di Perguruan Tinggi

by Agus Muji Santoso

Submission date: 10-Oct-2021 07:30AM (UTC+0700)

Submission ID: 1669699721

File name: Genetika-Poppy_1.pdf (4.96M)

Word count: 30341

Character count: 188175

GENETIKA

Prinsip Dasar Berbasis Penelitian di Perguruan Tinggi

Penulis: Poppy Rahmatika Primandiri Agus Muji Santoso

Editor:
Prof. Dr.agr. Mohamad Amin, M.Si
Dr. Maftuchah, M.P
Prof. Dr. Hj. Siti Zubaidah, M.Pd



GENETIKA Prinsip Dasar Berbasis Penelitian di Perguruan Tinggi

© Penerbit Kepel Press

Penulis:

Poppy Rahmatika Primandiri Agus Muji Santoso

> 19 Desain Sampul : Winengku Nugroho

Desain Isi : Emanuel Edo M

Cetakan Pertama, 2020

Diterbitkan oleh Penerbit Kepel Press Puri Arsita A-6, Jl. Kalimantan, Ringroad Utara, Yogyakarta Telp/faks : 0274-884500

Hp: 081 227 10912

email: amara_books@yahoo.com

Anggota IKAPI

ISBN: 978-602-356-355-5

Hak cipta dilindungi Undang-Undang Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku, tanpa izin tertulis dari penulis dan penerbit.

Isi di luar tanggung jawab percetakan

KATA PENGANTAR

Alhamdulilah, puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan kesempatan dan kekuatan bagi penulis sehingga buku ajar yang berjudul *Genetika: Prinsip Dasar Berbasis Penelitian di Perguruan Tinggi* telah selesai disusun.

Genetika merupakan salah satu mata kuliah wajib di Universitas Nusantara PGRI Kediri pada Program Studi S1 Pendidikan Biologi. Ketersediaan sarana belajar berupa buku ajar pun menjadi kebutuhan utama dalam perkuliahan. Berdasarkan analisis kebutuhan yang telah dilakukan pada program studi tersebut, buku ajar genetika yang telah tersedia saat ini masih memerlukan perbaikan isi. Khususnya yang berkaitan dengan konsep–konsep dasar genetika itu sendiri. Selain itu, belum dilengkapi dengan contoh gambar yang mendukung dan masih belum bersifat research-based. Oleh karena itu, buku ajar ini hadir untuk membantu dosen dan mahasiswa, agar dapat mendukung mutu proses perkuliahan genetika sehingga dapat mencapai capaian pembelajaran yang telah ditetapkan.

Buku ini memuat enam bagian. Bagian pertama memuat informasi tentang sejarah dan ruang lingkup genetika. Bagian kedua memuat informasi tentang materi genetik dan contoh bagaimana mengisolasi genom/ DNA berdasarkan hasil penelitian. Bagian ketiga memfokuskan pada kajian struktur kromosom. Pada bagian keempat memuat informasi tentang replikasi materi genetik. Pada bagian ini juga didukung dengan contoh aplikasi PCR pada gen TI tanaman J. curcas. Adapun bagaimana mekanisme ekspresi materi genetik bekerja telah disajikan pada bagian kelima. Bagian keenam berisi tentang mutasi dan penyebabnya. Bagian akhir buku ini (bagian ketujuh) memuat bagaimana mengisolasi

gen, mengamplikasi gen target, sekuensing, dan membaca analisis sekuensing. Bagian ini disusun berdasarkan hasil penelitian tentang variasi gen *TI* pada *J. curcas*.

Keberadaan buku ajar ini tidak lepas dari kontribusi beberapa pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepadaProf. Dr. agr. Mohamad Amin, M.Si, Dr. Maftuchah, M.P, Prof. Dr. Hj. Siti Zubaidah, M.Pd yang telah berkenan menjadi editor serta beberapa pihak yang terlibat secara teknis dalam menyediakan gambar pendukung pada buku ini.

Buku ini masih memerlukan penyempurnaan, oleh karena itu saran dari pembaca sangat diharapkan. Semoga buku ajar ini bermanfaat.

Kediri, 5 Mei 2017

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
	111
89 DAFTAR ISI	v
PETUNJUK PENGGUNAAN	ix
BAGIAN I SEJARAH DAN RUANG LINGKUP	
GENETIKA	1
A. Pendahuluan	1
B. Sejarah Genetika	2
C. Ruang Lingkup Kajian Genetika	4
Rangkuman	6
Evaluasi	6
Refleksi Belajar	6
Daftar Rujukan	7
BAGIAN II MATERI GENETIK	9
A. Pendahuluan	9
B. DNA sebagai Materi Genetik	10
C. RNA sebagai Materi Genetik pada Virus Tertentu	15
D. Struktur DNA dan RNA	16
E. Bentuk DNA	22
F. Isolasi DNA	24
Rangkuman	28
Evaluasi	28

Refleksi Belajar	29
Daftar Rujukan	29
BAGIAN III KROMOSOM	31
A. Pendahuluan	31
B. Packaging DNA menjadi Kromosom	32
C. Bagian-bagian Kromosom	36
D. Tipe Kromosom	37
E. Bentuk Kromosom	39
F. Jumlah dan Ukuran Kromosom	40
Rangkuman	42
Evaluasi	43
Refleksi Belajar	43
Daftar Rujukan	44
BAGIAN IV REPLIKASI	45
A. Pendahuluan	45
B. Model Replikasi DNA	46
C. Replikasi Semikonservatif	47
D. Proses Replikasi	49
E. Polymerase Chain Reaction	53
Rangkuman	62
Evaluasi	62
Refleksi Belajar	62
Daftar Rujukan	63
BAGIAN V EKSPRESI MATERI GENETIK	65
A. Pendahuluan	65

Daftar Isi	vii
B. Transkripsi	67
C. Modifikasi Pasca Transkripsi	85
D. Translasi	94
E. Kode Genetika	99
Rangkuman	105
Evaluasi	106
Refleksi Belajar	106
Daftar Rujukan	107
BAGIAN VI MUTASI	109
A. Pendahuluan	109
B. Penyebab Mutasi	109
C. Macam-macam Mutasi Gen	123
D. Mutasi Kromosom	127
Rangkuman	137
Evaluasi	137
Refleksi Belajar	138
Daftar Rujukan	138
BAGIAN VII VARIASI GEN TI PADA J. CURCAS	141
A. Pendahuluan	141
B. Data Molekuler	142
C. Amplifikasi Hasil Isolasi	148
D. Mengolah Data Hasil Sekuensing	150
Rangkuman	155
Evaluasi	156
Refleksi Belajar	156
Daftar Rujukan	156

VIII GENETIKA PRINSIP DASAR BERBASIS PENELITIAN DI PERGURUAN TINGGI	
GLOSARIUM	159

PETUNJUK PENGGUNAAN

A. Deskripsi

Buku ajar ini merupakan salah satu sarana belajar yang dapat digunakan pada perkuliahan genetika pada jenjang S1 Pendidikan Biologi. Buku ajar ini disusun berdasarkan studi referensi maupun hasil penelitian, khususnya penelitian tentang identifikasi dan sekuen gen TI yang telah berhasil dilakukan pada tanaman J. curcas yang dilaksanakan oleh penulis. Buku ajar ini memuat enam bagian. Pada setiap bagian memuat:

1. Indikator capaian pembelajaran

Bagian ini berisi capaian pembelajaran pada setiap bagian materi buku ajar. Rumusan ini dapat dikembangkan sesuai kebutuhan sesuai kaidah yang ada.

2. Uraian materi

Berisi deskripsi materi pada setiap bagian dan terdiri atas sub bagian–sub bagian yang disajikan dengan deskripsi definisi, contoh, serta didukung dengan gambar penjelas untuk membantu memahami materi yang disajikan.

3. Rangkuman

Bagian ini memuat isi ringkas materi yang telah dideskripsikan pada setiap sub bagian.

4. Evaluasi

Berisi pertanyaan-pertanyaan yang bertujuan untuk mengetahui capaian belajar kognitif mahasiswa selama mempelajari bagian materi buku ajar ini. Bagian ini dapat menjadi salah satu bagian penugasan terstruktur maupun tidak terstruktur bagi mahasiswa.

5. Daftar rujukan

Memuat referensi yang digunakan pada setiap bagian. Dosen maupun mahasiswa dapat menelusurnya untuk mendapatkan informasi yang lebih detail pada suatu topik khusus sesuai judul referensi yang disertakan.

6. Refleksi belajar

Pada bagian ini, mahasiswa dipandu untuk melakukan refleksi diri belajar genetika yang telah menggunakan buku ajar ini. Refleksi belajar ini penting dilakukan agar mahasiswa dapat mengevaluasi strategi belajar yang dilakukan dan dosen dapat memberikan bantuan belajar yang sesuai.

B. Prasyarat

Mahasiswa yang menggunakan buku ajar ini harus menempuh mata kuliah prasyarat Biologi Dasar, Biologi Sel, dan Biokimia agar mahasiswa memiliki bekal dasar yang cukup minimal tentang struktur sel, komponen dasar sel, organel dan inti sel, biomolekul, dan ikatan kimia.

C. Penggunaan Buku Ajar

Bagi Dosen

- a. Merencanakan pembelajaran yang berpusat pada mahasiswa
- b. Menyediakan buku ajar dalam kondisi baik
- Menyediakan alokasi waktu untuk mengukur ketercapaian belajar dengan menggunakan sub bagian evaluasi
- d. Menyedikan alokasi waktu untuk memberikan respon dan bantuan belajar kepada mahasiswa yang melaksanakan refleksi belajar

2. Bagi Mahasiswa

a. Bacalah secara seksama petunjuk penggunaan buku ajar ini

- b. Cermati bagian dan sub bagian pada buku ajar ini sehingga membantu memberikan gambaran tentang isi buku dan kebutuhan belajar Saudara
- c. Bacalah secara seksama setiap ulasan materi dan gambar yang disajikan. Apabila membutuhkan deskripsi lebih lanjut, dapat membaca referensi yang diacu.
- d. Disediakan beberapa pertanyaan dalam sub bagian evaluasi. Pada bagian ini Saudara dapat menyelesaikan pertanyaan tersebut sesuai instruksi atau arahan dosen
- e. Setelah selesai mempelajari satu bagian pada buku ajar ini, lakukan refleksi belajar sesuai sub bagian refleksi belajar yang tersedia pada setiap bagian akhir bagian buku ajar ini.
- f. Minta umpan balik dan bantuan belajar dari dosen untuk membantu mencapai indikator pembelajaran yang telah disampaikan oleh dosen.
- g. Pada buku ajar ini tersedia glasarium, Saudara dapat menggunakannya saat Saudara mengalami kesulitan dalam memahami definisi beberapa kata.

BAGIAN I SEJARAH DAN RUANG LINGKUP GENETIKA

Indikator Capaian Pembelajaran

- 1. Mahasiswa dapat menjelaskan sejarah genetika
- Mahasiswa dapat menjelaskan ruang lingkup kajian genetika

A. Pendahuluan

Sejak zaman dahulu, orang sudah menyadari bahwa seorang anak akan mirip dengan ayah dan ibunya. Tetapi seberapa dekat kemiripan itu baru banyak dikaji pada abad ke 19. Penemuan Gregor Mendel (1823-1884) menjadi titik awal dikajinya genetika modern. Mendel menggunakan tanaman kacang polong dan mempelajari karakteristiknya seperti apakah bijinya halus atau berkerut, apakah bunganya berwarna merah atau putih, dan apakah polongnya berwarna kuning atau hijau, dll. Mendel bisa menjawab "ya" atau "tidak" jika ada pertanyaan apakah individu tertentu mewarisi karakter orang tuanya?.

Ilmuwan menghubungkan karakteristik yang ditemukan oleh Mendel ke gen. Gen adalah unit informasi genetik yang mengatur perkembangan dan metabolisme tubuh. Gen juga menentukan sifat keturunan. Setiap gen mungkin ada dalam bentuk alternatif yang dikenal sebagai alel, kode untuk versi yang berbeda dari karakter mewarisi tertentu (seperti warna merah versus putih). Alel yang berbeda dari gen yang sama terkait erat, namun memiliki variasi kimiawi kecil yang dapat menghasilkan hasil yang berbeda secara signifikan.

B. Sejarah Genetika

Sebelum tahun 1860, penemuan yang membuka jalan bagi pemahaman genetika adalah perkembangan mikroskon penjelasan teori sel, dan publikasi pada tahun 1859 dari *The Origin of Species* oleh Charles Darwin. Pada tahun 1665, Robert Hooke menciptakan istilah sel dalam studinya tentang sel gabus. Antara tahun 1674 dan 1683, Anton van Leeuwenhoek menemukan organisme hidup (protozoa dan bakteri) di air hujan. Pada tahun 1833, Robert Brown (penemu gerakan Brown) menemukan inti sel, dan antara tahun 1835 dan 1839, Hugo von Mohl menggambarkan mitosis di nukleus. Era ini berakhir pada tahun 1858, ketika Rudolf Virchow menyimpulkan konsep teori sel *omnis cellula e cellula*: semua sel berasal dari sel yang sudah ada sebelumnya. Jadi, pada tahun 1858, ahli biologi memiliki pemahaman tentang kontinuitas sel dan mengetahui nukleus sel.

Pada tahun 1866, Gregor Mendel dengan menggunakan kacang polong menemukan adanya pewarisan dari tetua pada anakannya. Pada tahun 1879 sampai 1885, dengan teknik pewarnaan baru, W. Flemming menggambarkan kromosom yang pertama kali diketahui oleh C. von Nägeli pada tahun 1842 - termasuk cara kromosom memisah selama pembelahan. Pada tahun 1888, W. Waldeyer pertama kali menggunakan istilah kromosom. Pada tahun 1875, O. Hertwig menggambarkan perpaduan sperma dan telur untuk membentuk zigot. Pada tahun 1880-an, Theodor Boveri, serta K. Rabl dan E. van Breden, berhipotesis bahwa kromosom adalah struktur individu dengan kontinuitas dari satu generasi ke generasi berikutnya meskipun terjadi "penghilangan" antara divisi sel. Pada tahun 1885, August Weismann menyatakan bahwa warisan didasarkan secara eksklusif di dalam nukleus. Pada tahun 1887, dia meramalkan terjadinya pembagian reduktional, yang

sekarang kita sebut meiosis. Pada tahun 1890, O. Hertwig dan T. Boveri telah menggambarkan proses meiosis secara rinci.

Dari tahun 1900 sampai 1944, genetika modern berkembang dengan perkembangan teori kromosom, yang menunjukkan bahwa kromosom adalah susunan gen yang linier. Pada tahun 1900, tiga ahli biologi bekerja secara mandiri yaitu Hugo de Vries, Carl Correns, dan Erich von Tschermak menemukan kembali karya Mendel tentang aturan pewarisan. Pada tahun 1903, Walter Sutton berhipotesis bahwa perilaku kromosom selama meiosis menjelaskan aturan pewarisan Mendel, sehingga mengarah pada penemuan bahwa gen terletak di kromosom. Pada tahun 1913, Alfred Sturtevant menciptakan peta genetik pertama pada lalat buah. Dia menunjukkan bahwa gen ada dalam urutan linear pada kromosom. Pada tahun 1927, L. Stadler dan H. J. Muller menunjukkan bahwa gen dapat bermutasi secara artifisial oleh sinar X. Antara tahun 1930 dan 1932, R. A. Fisher, S. Wright, dan J. B. S. Haldane mengembangkan dasar aljabar untuk pemahaman kita tentang proses evolusi. Pada tahun 1943, S. Luria dan M. Delbrück menunjukkan bahwa bakteri memiliki sistem genetik yang normal dan dengan demikian dapat berfungsi sebagai model untuk mempelajari proses genetik.

Periode dari tahun 1944 sampai sekarang adalah era genetika molekuler, dimulai dengan demonstrasi bahwa DNA adalah bahan genetik dan teknologi DNA rekombinan. Pada tahun 1944, O. Avery dan rekan berdasarkan risetnya, mmenemukan bahwa DNA adalah materi genetik. James Watson dan Francis Crick menyusun struktur DNA pada tahun 1953. Antara tahun 1968 dan 1973, W. Arber, H. Smith, dan D. Nathans, bersama dengan rekan mereka, menemukan dan menjelaskan restriksi endonuklease, enzim untuk memanipulasi DNA melalui teknologi DNA rekombinan. Paul

Berg adalah orang pertama yang menciptakan molekul DNA rekombinan pada tahun 1972.

Sejak 1972, ahli genetika telah mengkloning banyak gen. Para ahli memiliki kemampuan untuk menciptakan organisme transgenik, organisme dengan gen asing. Misalnya, sekarang kita memiliki hewan ternak yang memproduksi obat-obatan dalam susu mereka yang dipanen dengan mudah dan murah. Pada tahun 1997, mamalia pertama dikloning, seekor domba bernama Dolly. Urutan genom manusia mulai dikerjakan pada tahun 2000. Sekarang banyak dikumpulkan informasi di bidang genomik.

C. Ruang Lingkup Kajian Genetika

Menurut Tamarin (2011), ahli genetika bekerja di tiga wilayah yang berbeda yang masing-masing memiliki perbedaan dalam hal masalah, terminologi, dan alat. Wilayah yang dimaksud adalah genetika klasik, genetika molekuler, dan genetika evolusioner. Dalam genetika klasik, kita mengenal teori pewarisan kromosom. Gen berada dalam posisi linier pada kromosom dan posisi gen relatif dapat ditentukan oleh frekuensi keturunannya. Genetika molekuler adalah studi tentang materi genetik: struktur, replikasi, dan ekspresinya, serta revolusi informasi yang berasal dari penemuan teknik DNA rekombinan (rekayasa genetika, termasuk Proyek Genom Manusia). Genetika evolusioner adalah studi tentang mekanisme perubahan evolusioner, atau perubahan frekuensi gen pada populasi. Konsep evolusi Darwin melalui seleksi alam menemukan landasan genetik sebuah gen di bidang studi pewarisan ini. Lebih lanjut pada bukua ajar ini, dibahas tentang Genetika Molekuler.

Materi genetik semua organisme seluler adalah DNA. Molekul heliks ganda DNA berbentuk seperti tangga yang memutar. Tulang punggung untai adalah gula (deoksiribosa) dan fosfat. Anak 164 gganya adalah pasangan basa. Ada empat basa pada DNA: adenin, timin, guanin, dan sitosin, disingkat A, T, G, dan C. Basa-basa tersebut saling berbasangan yaitu guanin berbesangan dengan sitosin, dan adenin berpasangan dengan timin. James Watson dan Francis Crick menyimpulkan struktur ini pada tahun 1953 yang mengantarkan di era genetika molekuler.

Menurut Watson dan Crick, sesuai dengan sifat komplementer dari pasangan basa DNA menunjukkan cara replikasi yaitu setiap untai akan bertindak sebagai templat untaian baru, menghasilkan dua heliks ganda persis seperti induknya. Perubahan pada salah satu basa dapat terjadi akibat kesalahan pemasangan basa selama replikasi atau beberapa kerusakan pada DNA yang tidak diperbaiki pada saat siklus replikasi berikutnya.

Informasi dikodekan pada urutan basa pada satu untai heliks ganda. Salama ekspresi gen, informasi tersebut ditranskripsi menjadi RNA yang berperan dalam sintesis protein. RNA berbeda dari DNA dalam beberapa hal: memiliki gula *ribosa* menggantikan *deoxyribose*, RNA memiliki basa urasil (U) menggantikan timin (T), dan biasanya berbentuk untai tunggal. RNA ditranskripsi dari DNA oleh enzim RNA polimerase. Informasi DNA yang ditranskripsi menjadi mRNA untuk urutan asam amino protein. Tiga nukleotida membentuk sebuah kodon yang menentukan satu dari dua puluh asam amino alami yang digunakan dalam sintesis protein. Urutan basa membentuk kodon disebut sebagai kode genetika. Proses translasi, menerjemahkan urutan mRNA ke dalam rangkaian asam amino yang terjadi pada ribosom, struktur yang ditemukan di semua sel yang terdiri dari rRNA dan protein.

Mekanisme regulasi ekspresi gen biasanya pada tingkat transkripsi. Agar transkripsi berlangsung, enzim RNA polimerase harus bisa berjalan terus pada DNA; jika tidak, transkripsi akan berhenti. Salah satu mekanisme dikenal sebagai model operon

untuk berbagai mekanisme kontrol dalam prokariota dan virus. Eukariota umumnya tidak mengandung operon tetapi pengaturan ekspersi lebih rumit dibanding prokariot.

RANGKUMAN

- 1. Kajian genetika dimulai pada tahun 1860 saat ditemukan mikroskop cahaya yang dapat mengamati sel. Era baru genetika dimulai saat Watson dan Crick membuat permodelan DNA untai ganda. Kajian genetika semakin berkembang diiringi kemajuan teknologi yang sekarang ini sudah pada tahap mengumpulan genomik hampir seluruh spesies.
- 2. Kajian genetika dibagi menjadi genetika klasik, genetika molekuler, dan genetika evolusioner. Pada genetika molekuler dipelajari tentang materi genetik: struktur, replikasi, dan ekspresinya, serta revolusi informasi yang berasal dari penemuan teknik DNA rekombinan (rekayasa genetika, termasuk Proyek Genom Manusia).

EVALUASI

- Buatlah bagan sejarah kajian genetika!
- Buatlah bagan tentang ruang lingkup kajian genetika molekuler!

REFLEKSI BELAJAR

Setelah mempelajari materi ini,

- Tuliskan hal baru apa saja yang Saudara peroleh!
- Bagian mana dari materi ini yang sulit Saudara pahami?
- Apa saja upaya belajar Saudara pada materi ini?
- 4. Apa saja manfaat/ dampak yang Saudara peroleh setelah mempelajari materi ini?

DAFTAR RUJUKAN

- Clark, D. 2005. Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution. Illinois: Elsevier Academic Press.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., Suzuki, D.T., & Miller, J.H. 2007. An Introduction to Genetic 9th Edition. W. H. Freeman and Company.
- Tamarin, R.H. 2001. Principles of Genetics 7th Edition. The McGraw-Hill Companies

BAGIAN II MATERI GENETIK

Indikator Capaian Pembelajaran

- Mahasiswa dapat menjelaskan eksperimen yang membuktikan bahwa materi genetik adalah DNA
- Mahasiswa dapat menjelaskan eksperimen yang membuktikan bahwa materi genetik pada virus tertentu adalah RNA
- 3. Mahasiswa dapat menjelaskan struktur kimia DNA dan RNA
- 4. Mahasiswa dapat menjelaskan struktur untai ganda DNA
- Mahasiswa dapat menjelaskan bentuk lain dari DNA

A. Pendahuluan

Materi genetik harus memiliki syarat-syarat antara lain (a) harus mampu hadir dalam berbagai variasi, (b) harus dapat menyimpan informasi, (c) harus dapat mengekspresikan informasinya, (d) harus dapat melakukan replikasi, (e) harus dapat bermutasi (Irawan, 2008).

Informasi genetik dikodekan oleh molekul yang disebut 'nuclein' karena pada awalnya diisolasi dari nukleus sel eukariotik oleh F. Miescher pada tahun 1869. Ada dua jenis asam nukleat yaitu deoxyribonucleic acid (DNA) dan ribonucleic acid (RNA). Informasi genetik dari setiap genom sel disimpan pada molekul DNA yang panjang, yang masing-masing dapat mengandung ribuan gen. Dengan demikian setiap gen merupakan segmen linier dari sebuah molekul DNA yang panjang. Sebaliknya, molekul RNA jauh lebih pendek, digunakan untuk mentransmisikan informasi genetik ke mesin sel, dan hanya membawa satu atau beberapa gen.

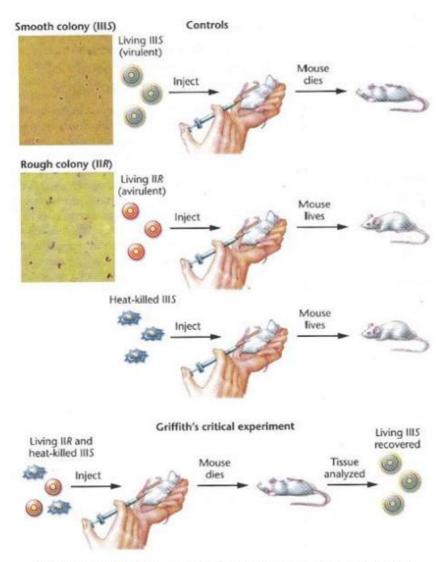
B. DNA sebagai Materi Genetik

Materi genetik bagi kebanyakan organisme adalah DNA, sementara RNA terlibat dalam sintesis protein dan merupakan materi genetik pada sebagian virus. Percobaan-percobaan yang membuktikan bahwa materi genetik adalah DNA antara lain:

Percobaan Transformasi Griffith

Frederick Griffith pada tahun 1928 melakukan eksperimen ini dengan menggunakan Streptococcus pneumoniae. Bakteri ini menyebabkan pneumonia pada manusia dan menyebabkan kematian pada tikus (Griffith et al, 2007). Perhatikan eksperimen Griffith pada Gambar 2.1.

Dalam percobaannya, Griffith menggunakan dua strain yang berbeda yaitu strain S (smooth) yang sel-selnya dilapisi kapsul polisakarida sehingga tampak mulus pada media tumbuhnya. Strain S ini bersifat virulent dan mematikan. Strain lainnya yang digunakan adalah strain R (rough) yang tidak dilapisi polisakarida sehingga tampak kasar pada media tumbuh. Strain R ini bersifat tidak virulen dan tikus tetap hidup meskipun di dalam tubuhnya terdapat strain ini.

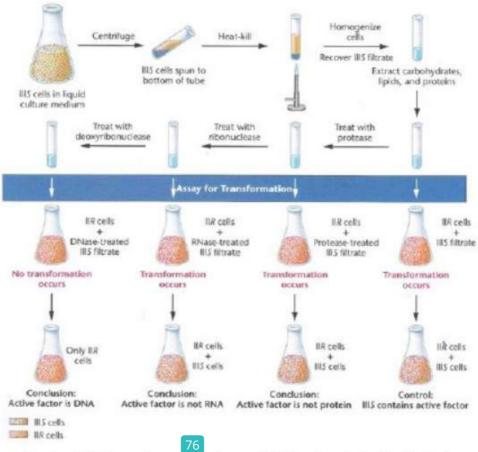


Gambar 2.1 Eksperimen Griffith (Sumber: Klug et al., 2010)

Griffith merebus strain S kemudian memasukkannya ke tubuh tikus, hasilnya tikus tetap hidup. Namun, didapatkan hasil yang mengejutkan saat Griffith memasukkan koloni strain S yang direbus dan koloni R bersama-sama ke dalam tubuh tikus, tikus mati dan ditemukan koloni S pada jaringan tikus yang mati. Griffith menyimpulkan terjadi transformasi sehingga koloni R yang tidak virulen menjadi koloni S yang virulen.

2. Percobaan Avery-MacLeod-McCarty

Bukti langsung pertama yang menunjukkan bahwa materi genetik itu adalah DNA dan bukan protein atau RNA dipublikasikan oleh O.T. Avery, C.M. MacLeoddan M. McCarty pada tahun 1944 (perhatikan eksperimen O.T. Avery, C.M. MacLeoddan M. McCarty pada Gambar 2.2). Dalam melakukan percobaannya, mereka mengekstrak semua bahan kimia pada koloni S. Dugaan awal mereka, karena koloni S memiliki lapisan polisakarida halus, polisakarida merupakan kandidat untuk agen transformasi (Griffitth et al, 2007).

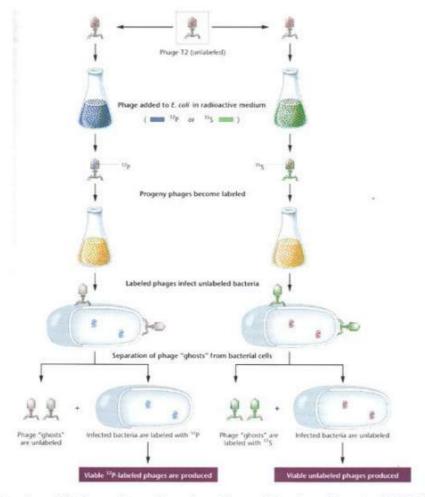


Gambar 2.2 Eksperimen O.T. Avery, C.M. MacLeod dan M. McCarty
(Sumber: Klug et al., 2010)

Karbohidrat, protein, lemak, hasil ekstraksi diperlakukan dengan protease dan ribonuclease menunjukkan masih terjadi transformasi sehingga protein dan RNA bukanlah transformasi. Hasil ekstrak koloni S kehilangan kemampuan transformasi saat diperlakukan dengan enzim deoxyribonuclease (DNAse), yang memecah DNA. Kesimpulan yang didapatkan dari eksperimen adalah komponen sel yang bertanggung jawab bagi aktivitas transformasi dalam bakteri Diplococcus pneumoniae (pneumococcus) adalah DNA. Sehingga eksperimen ini memberikan bukti eksperimental pertama bahwa DNA adalah bahan genetik: DNA mengubah koloni R menjadi koloni S (Tamarin, 2001). Transformasi merupakan sebuah model transfer dari informasi genetik antar organisme atau dari satu organisme ke organisme lainnya yang terjadi dalam beberapa spesies bakteri, tapi tidak pada seluruh spesies. Transformasi tidak melibatkan kontak langsung dengan sel-sel bakteri atau mediasi oleh vektor seperti virus (Gardner et al, 1991).

3. Percobaan Hershey dan Chase

Informasi berharga tentang pembuktian materi genetik juga berasal dari virus. Virus memiliki DNA yang diselubungi suatu lapisan pelindung yang terbuat dari protein sehingga dengan menggunakan virus dapat ditentukan apakah protein atau asam nukleat yang merupakan bahan genetik (Tamarin, 2001).



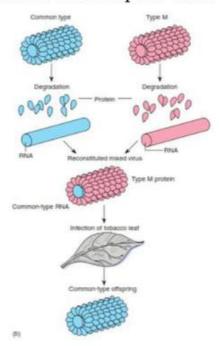
Gambar 2.3 Eksperimen Hershey-Chase (Sumber: Klug et al., 2010)

Penelitian yang menggunakan bacteriophage untuk membuktikan materi genetik dilakukan oleh A. Harshey dan M. Chase menggunakan fag T2. Fag T2 adalah fag yang menginfeksi bakteri Escherichia coli. Semua asam nukleat mengandung fosfor, sedangkan protein mengandung sulfur (dalam asam amino sistein dan metionin). Hershey dan Chase merancang percobaan menggunakan isotop radioaktif sulfur dan fosfor agar tetap terpisah dan bisa melacak protein dan asam nukleat virus selama proses infeksi. Masing-masing medium E. coli diberi isotop radioaktif ³⁵S dan ³²P dan memasukkan fag T2 ke dalam medium-

medium tersebut. Hershey dan Chase kemudian melanjutkan untuk mengidentifikasi bahan yang disuntikkan ke dalam sel oleh fag yang menempel pada dinding bakteri.

Ketika fag berlabel 32P dicampur dengan sel E. coli yang tidak berlabel, Hershey dan Chase menemukan bahwa label 32P memasuki sel bakteri dan turunan fag yang keluar dari sel yang terinfeksi membawa sejumlah besar label ³²P. Ketika fag berlabel ³⁵S dicampur dengan E. coli yang tidak berlabel, ditemukan bahwa label ³⁵S tetap berada di *fag*. Hal ini menunjukkan bahwa protein yang terlabel pada coat fag tidak masuk ke bakteri yang terinfeksi, sedangkan materi di dalam fag, yang terdiri dari DNA, masuk ke sel bakteri. Oleh karena itu, disimpulkan bahwa DNA bertanggung jawab atas produksi fag baru selama proses infeksi, bukan protein (Tamarin, 2001).

C. RNA sebagai Materi Genetik pada Virus Tertentu



Gambar 2.4 Rekonstruksi percobaan Fraenkel-Conrat dan Singer (Sumber: Tamarin, 2001)

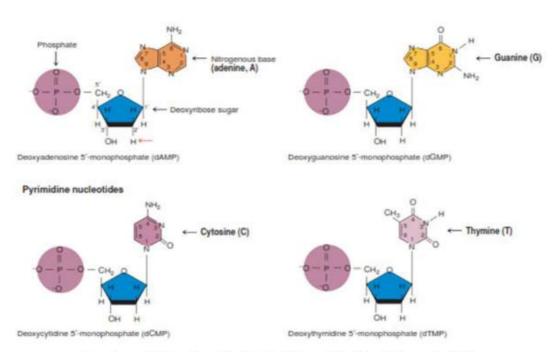
Pada beberapa virus, RNA (*ribonucleic acid*) adalah materi genetik. TMV (*tobacco mosaic virus*) yang menginfeksi tanaman tembakau terdiri dari RNA dan protein. RNA molekul tunggal yang panjang dikemas dalam struktur seperti batang yang dibentuk oleh lebih dari dua ribu salinan protein tunggal. Eksperimen pertama yang mempublikasikan bebwa RNA adalah materi genetik adalah eksperimen rekonstitusi oleh H. Fraenkel-Conrat dan B. Singer pada tahun 1957. Bagan eksperimennya ada pada Gambar 2.4.

Pada tahun 1955, H. Fraenkel-Conrat dan R. Williams menemukan bahwa komponen virus dapat dipisahkan secara in vitro dan dibentuk kembali sebagai virus baru. Penemuan ini menyebabkan Fraenkel-Conrat dan B. Singer menggabungkan RNA dari TMV tipe common dengan protein dari TMV tipe M, dan sebaliknya RNA dari tipe M dengan protein dari TMV tipe common. Pada kedua kasus tersebut, TMV yang dihasilkan selama proses infeksi adalah tipe yang terkait dengan RNA, bukan protein. Jadi, RNA merupakan materi genetik (Fraenkel-Conrat & Singer, 1999; Tamarin, 2001).

D. Struktur DNA dan RNA

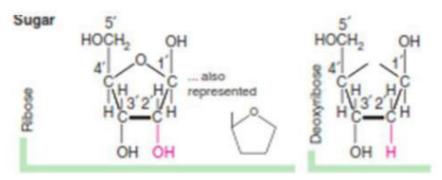
1. Struktur kimia asam nukleat

Struktur kimia DNA dan RNA sangat mirip. Struktur utamanya adalah polimer linier yang terdiri dari monomer yang disebut nukleotida. Nukleotida terdiri dari tiga komponen yaitu fosfat, gula, dan basa nitrogen (Gambar 2.5). Fosfat dan gula membentuk tulang punggung setiap untai DNA atau RNA sedangkan basa nitrogen berikatan dengan gula.



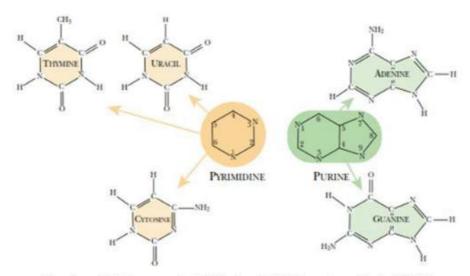
Gambar 2.5 Struktur Kimia dari Empat Nukleotida pada DNA (Sumber: Griffith et al., 2007)

Pada DNA, gulanya adalah 2-deoxyribose, sedangkan pada RNA, gulanya adalah ribose. Keduanya adalah pentosa (gula 5-karbon). Struktur gula pentosa berbentuk cincin. Gula pada DNA disebut "deoxyribose" karena pada atom karbon 2' hanya memiliki atom hidrogen (H), tidak seperti ribosa (RNA) yang memilihi gugus hidroksil (OH) pada posisi tersebut (Gambar 2.6). Fosfat terikat pada atom C nomor 5 dari gula pentosa, sedangkan basa nitrogen terikat pada atom C nomor 1 dari gula pentosa.



Gambar 2.6 Ribosa adalah gula lima-karbon (pentosa) yang ditemukan di RNA. Deoxyribose adalah pentosa DNA. DNA kekurangan satu oksigen jika dibandingkan dengan ribosa karena memiliki hidrogen menggantikan gugus hidroksil pada posisi 2' cincin ribosa (Sumber: Tamarin, 2001)

DNA dan RNA keduanya memiliki empat basa nitrogen (dua purin dan dua pirimidin). Purin merupakan basa cincin-ganda dan pirimidin merupakan basa cincin-tunggal (Gambar 2.5). Kedua molekul tersebut memiliki purin adenin (A) dan guanin (G) dan pirimidin sitosin (C). DNA memiliki pirimidin timin (T) sedangkan RNA memiliki pirimidin urasil (U). Dengan demikian, tiga dari basa nitrogen ditemukan di DNA dan RNA, sedangkan timin khusus untuk DNA, dan urasil khusus untuk RNA.



Gambar 2.7 Basa pada DNA dan RNA (Sumber: Clark, 2005)

2. Komposisi Basa

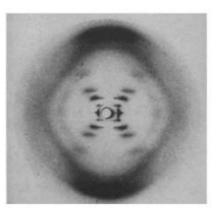
Antara tahun 1949 dan 1953, Erwin Chargaff dan rekan menggunakan metode kromatografi untuk memisahkan empat basa pada DNA dari beberapa sampel. Dia menemukan bahwa meskipun jumlah relatif nukleotida tertentu berbeda antar spesies, jumlah adenin setara dengan timin dan jumlah guanin setara dengan sitosin. Artinya, komposisi basa pada DNA semua organisme yang dipelajari, ada rasio 1:1 antara purin dan pirimidin. Hasilnya memberi wawasan kepada Watson dan Crick dalam gembangan model DNA. Contoh hasil penelitian komposisi basa dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi Basa DNA pada Berbagai Organisme

Organisme	Jaringan	Adenin	Timin	Guanin	Sitosin	3+T G+C
Escherichia coli (K12)	÷	26.0	23.9	24.9	25.2	1.00
Diplococcus pneumoniae		29.8	31.6	20.5	18.0	1.59
Mycobacterium tuberculosis	+	15.1	14.6	34.9	35.4	0.42
Yeast	-	31.3	32.9	18.7	17.1	1.79
Sea urchin	Sperma	32.8	32.1	17.7	18.4	1.85
Herring	Sperma	27.8	27.5	22.2	22.6	1.23
Rat	sumsum tulang	28.6	28.4	21.4	21.5	1.33
Human	Timus	30.9	29.4	19.9	19.8	1.52
Human	Hati	30.3	30.3	19.5	19.9	1.53
Human	Sperma	30.7	31.2	19.3	18.8	1.62

Sumber: Griffith et al, 2007

3. Analisis Difraksi



Gambar 2.8 Pola Difraksi Sinar X pada DNA (Sumber: Watson and Crick, 1953)

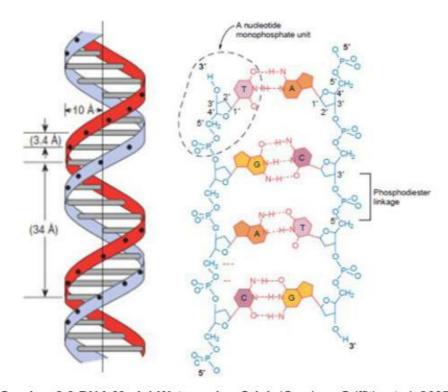
Rosalind Franklin dan M.H.F. Wilkins meneliti DNA dengan menggunakan sinar–X (Gambar 2.8). Sinar X berwarna merah pada serat DNA dan penyebaran sinar dari serat diamati dengan menangkap sinar pada gambar film, di mana sinar X menghasilkan bintik-bintik. Sudut serpihan yang diwakili oleh masing-masing titik pada film memberi informasi tentang posisi atom atau kelompok atom tertentu dalam molekul DNA. Prosedur ini tidak mudah dilakukan (atau untuk dijelaskan), dan interpretasi pola spot sangat sulit. Data yang ada menunjukkan bahwa DNA panjang dan kurus dan memiliki dua bagian serupa yang sejajar satu sama lain dan berjalan sepanjang molekul. Data sinar-X menunjukkan molekul menjadi heliks (spiral-like). Keteraturan lain hadir dalam pola spot, namun belum ada yang memikirkan struktur tiga dimensi yang bisa menjelaskan pola spot tersebut.

4. Model Heliks Ganda

Sebuah makalah pada tahun 1953 oleh J.D. Watson dan F.H.C. Crick di jurnal Nature dimulai dengan dua kalimat yang mengantar era baru biologi: "Kami ingin menyarankan sebuah

struktur untuk garam deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). Struktur ini memiliki bentuk baru yang memiliki kepentingan biologis yang cukup besar". Mereka mengajukan pendapat bahwa struktur DNA adalah double helix yang memiliki sifat sebagai berikut.

- a. dua rantai polinukleotida saling melilit mengitari sumbu,
- b. dua rantai tersebut tersusun antiparalel, ujung 5' dari salah satu rantai berpasangan dengan ujung 3' dari rantai pasangannya,
- c. basa-basa dari kedua rantai tersusun rata dan tegak lurus terhadap sumbu/ mendatar, basa-basa tersebut tersusun bertumpuk satu di atas yang lain, dan jaraknya 3,4 Å (0,34 nm) dan terletak di sebelah dalam heliks.
- d. basa nitrogen dari rantai yang berhadapan membentuk pasangan sebagai akibat adanya ikatan hidrogen. Pada DNA ada pasangan A=T dan G≡C,



Gambar 2.9 DNA Model Watson dan Crick (Sumber: Griffith et al, 2007)

- e. satu putaran lengkap heliks panjangnya 3,4 Å (0,34 nm), dengan demikian dapat disimpulkan bahwa dalam satu putaran terdapat 10 pasangan basa,
- pada setiap segmen molekul terdapat cekungan mayor dan cekungan minor, kedua cekungan ini tersusun bergantian,
- g. diameter heliks ganda ini memiliki ukuran 20 Å (2,0 nm).

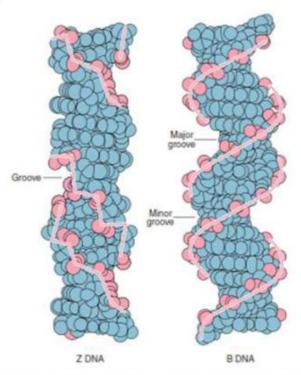
Ketujuh sifat itu adalah adalah sifat heliks ganda yang bertujuan untuk mencapai heliks ganda yang stabil tidak mudah terurai (Irawan, 2008).

Kerangka masing-masing untai terbentuk dari unit gula fosfat dan deoksiribosa bergantian yang dihubungkan oleh hubungan fosfodiester. Ikatan fosfodiester menghubungkan atom karbon nomor 5 ke atom karbon nomor 3 dari deoksiribosa yang berdekatan. Dengan demikian, setiap kerangka gula-fosfat dikatakan memiliki polaritas, atau arah 5' ke 3', dan memahami polaritas ini sangat penting dalam memahami bagaimana DNA memenuhi perannya. Setiap basa melekat pada atom karbon nomor 1 dari gula deoksiribosa di kerangka masing-masing untai dan menghadap ke arah dalam ke arah alas pada untai lainnya. Ikatan hidrogen antara pasang pangkalan menahan dua helai molekul DNA bersama-sama.

E. Bentuk DNA

Bentuk DNA yang telah kita gambarkan sejauh ini disebut B-DNA. Arah pilinannya ke kanan atau berlawanan dengan arah jarum jam bila dilihat di porosnya. Basa bertumpuk hampir persis tegak lurus dengan sumbu utama, dengan sekitar sepuluh pasang basa per putaran (34 Å). Namun, bentuk DNA bisa berubah jika kadar air meningkat sampai sekitar 75% yaitu menjadi bentuk A-DNA. Dalam bentuk ini, basa dalam posisi miring dibandingkan

sumbu dan ada lebih banyak pasangan basa per putaran. Namun, bentuk DNA lain variasinya relatif kecil dibandingkan bentuk lazim B-DNA.



Gambar 2.10 Z (kiri) dan B (kanan) DNA. Garis pink adalah ikatan grup fosfat (Sumber: Tamarin, 2001)

Pada tahun 1979, Alexander Rich dan rekan-rekannya menemukan perputaran heliks ke kiri yang disebut Z-DNA karena kerangkanya membentuk struktur zig zag. Z-DNA ditemukan dengan analisis kristalografi X-ray dari molekul DNA yang sangat kecil yang terdiri ulangan urutan G-C pada satu untai dengan urutan C-G komplementer di sisi lain (purin dan pirimidin). Z-DNA terlihat seperti B-DNA dengan masing-masing basa diputar 180 derajat, menghasilkan struktur zig zag (Gambar 2.10).

Awalnya, Z-DNA tidak menarik minat ahli biologi karena diperlukan konsentrasi garam yang sangat tinggi untuk menjadi stabil. Namun, ditemukan bahwa Z-DNA dapat distabilkan dalam

kondisi normal fisiologis jika gugus metil ditambahkan ke sitosin. Z-DNA mungkin terlibat dalam mengatur ekspresi gen pada eukariot.

Tipe untaian	Pasangan basa/ putaran	Rotasi/ pasangan basa	Diameter untaian	Kondisi terjadinya	
				Kelembaban relatif	Dalam Iarutan
Α	11	+32,7°	23 Å	75%	K⁺ Na⁺
В	10	+36,0°	19 Å	92%	Kadar garam rendah
С	9,33	+ 38,6°	19 Å	66%	
Z	12	-30,0°	18 Å	V 7 8	Kadar garam tinggi

Tabel 2.2 Variasi Struktur DNA

Catatan: Rotasi dinyatakan dengan nilai positif (+) untuk DNA putar kanan dan dinyatakan dengan negatif untuk DNA putar-kiri. Bentuk C kemungkinan tidak ada dalam kondisi in vivo.

Sumber: Yuwono, 2005

Struktur Z-DNA tidak hanya terjadi pada molekul yang mempunyai poli (C-G), melainkan juga terjadi pada bagian polinukleotida yang basa-basa purin pirimidinnya bergantian, misalnya ACACACAC. Terlebih lagi jika basa purin pirimidin bergantian terletak pada molekul DNA yang panjang misalnyaTGATCCGCGCGCGCAGTCTT....., maka rangkaian purinpirimidin tersebut memiliki bentuk Z pada konsentrasi garam 2 M sedangkan bagian DNA yang lain mempunya bentuk B (Yuwono, 2005)

F. Isolasi DNA

Awalnya, mengisolasi DNA adalah proses yang panjang dan sulit untuk mengumpulkan DNA dalam jumlah besar. Dengan kemajuan teknologi cukup nyak DNA yang dapat dikumpulkan dari bahan yang terbatas. DNA manusia dapat dianalisis dengan

menggunakan sedikit sampel darah atau beberapa beberapa sel dari bagian dalam pipi. Penurunan jumlah DNA yang dibutuhkan untuk analisis memungkinkan ilmuwan mempersingkat prosesnya sehingga DNA dapat diisolasi dalam beberapa jam, bukan beberapa hari.

Isolasi DNA adalah pemisahan molekul DNA dari molekul lain seperti dinding sel, membran sel, dan membran inti sehingga strukturnya dapat dilihat dengan jelas. Ada tiga langkah utama dalam isolasi DNA, yaitu perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat sepertizzelulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Ardiana, 2009; Fatchiyah et al., 2011). Prosedur isolasi DNA dapat berbeda-beda tergantung pada tujuan isolasi DNA dan kuantitas yang dibutuhkan.

Misalnya, bakteri adalah sel tunggal dan tidak mengandung tulang, lemak, rawan, dll, sehingga DNAnya relatif mudah diisolasi. Sebaliknya, sampel dari hewan dan tumbuhan harus digerus menjadi fragmen kecil sebelum ke proses selanjutnya, karena sel tumbuhan memiliki dinding sel yang sangat keras, penghancuran sel bisa dengan blender atau menambahkan enzim degradatif khusus untuk mencerna komponen dinding sel (Clark, 2005; Fatchiyah et al., 2011). Hasil isolasi DNA merupakan tahapan penting untuk langkah berikutnya. Oleh sebab itu, dalam pelaksagaannya harus dilakukan dengan baik dan bebas kontaminasi. Selama proses isolasi DNA, beberapa hal yang dapat terjadi antara lain: DNA patah-patah selama proses isolasi, DNA terdegradasi oleh enzim nuklease, terjadi kontaminasi oleh polisakarida, metabolit sekunder ikut terisolasi (Fatchiyah et al., 2011).

Dua jenis prosedur umum digunakan untuk isolasi DNA, sentrifugasi dan ekstraksi kimia. Proses sentrifuge yang dilakukan bertujuan untuk memisahkan campuran menjadi dua fase yaitu fase terlarut dan fase organik. Fase terlarut (supernatan) mengandung DNA genom karena memiliki berat molekul yang lebih ringan dibandingkan dengan fase organiknya. Fase organik (pelet) yang terbentuk berada pada bagian dasar tabung. Menurut Seidman & Moore (2000) dalam Remelia (2008) pelet yang terbentuk tersebut merupakan molekul-molekul protein dan polisakarida yang terdenaturasi.

Bahan kimia yang dibutuhkan untuk isolasi DNA antara lain nitrogen cair dibutuhkan untuk membekukan jaringan sehingga memudahkan dalam proses penggerusan (Ausubel et al, 1998). Penambahan NaCl dalam buffer isolasi bertujuan untuk memisahkan molekul DNA dari komponen lainnya dengan cara membentuk ikatan ionik dengan asam nukleat (kondisi ionik yang lebih stabil). Larutan Tris-HCl berfungsi sebagai larutan penyangga yang menjaga kestabilan pH. Larutan EDTA berfungsi mengikat kation divalen membentuk inhibitor enzim DNAse. Dengan demikian, EDTA berfungsi menjaga struktur DNA supaya tidak terdegradasi (Sambrook & Russel, 2001). EDTA berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium (ion ini berfungsi untuk mempertahankan integritas sel maupun mempertahankan aktivitas enzim nuklease yang merusak asam nukleat).

Senyawa lainnya yang ditambahkan pada buffer isolasi yaitu Na-bisulfit dan CTAB. Na-bisulfit berfungsi untuk penyelubungi ion negatif pada ujung struktur DNA sehingga dapat meningkatkan daya presipitasi DNA terhadap alkohol dingin (Sambrook & Russel, 2001). CTAB merupakan ditergen yang berfungsi merusak membran sel serta membentuk suatu kompleks dengan protein serta polisakarida, tetapi tidak mengendapkan asam nukleat.

Pemberian larutan kloroform:isoamil (24:1) berfungsi untuk memisahkan DNA dari membran sel yang memiliki berat

106 molekul lebih besar. Penambahan senyawa kimia kloroform dapat menyebabkan lisisnya membran sel serta terdenaturasinya protein-protein sel seperti endonuklease. Lisisnya membran sel akan memudahkan molekul DNA terpisah dari kompleks CTAB, protein, dan senyawa-senyawa polisakarida (Ausubel, 1998). Isoamil alkohol digunakan untuk mengurangi pembusaan ekstraksi berlangsung (Sambrook & Russel, 2001).

Senyawa kloroform merupakan senyawa yang tidak larut dalam air sehingga memungkinkan adanya pemisahan antara fasa cair dan fasa organik setelah dilakukan proses sentrifuge. DNA genom yang dihasilkan dari supernatan kemudian dipresipitasi dengan bantuan alkohol absolut. Penambahan senyawa alkohol akan memudahkan tervisualisasinya DNA genom dari supernatan yang terbentuk. Produk genom selanjutnya dipresipitasi kembali dengan bantuan senyawa etanol 70% (Van Heusden dkk., 2000 dalam Remelia, 2008). Menurut Ausubel (1998), presipitasi dengan menggunakan etanol 70% sangat berguna untuk meningkatkan konsentrasi DNA genom yang terbentuk serta dapat memisahkan DNA dari sisa-sisa molekul organik yang tidak dibutuhkan lagi seperti kloroform dan garm-garam organik lainnya.

Sampel DNA genom yang telah berhasil diisolasi dapat disimpan untuk jangka waktu tertentu sehingga sampel tersebut dapat digunakan sesuai dengan keperluan analisis yang dilakukan. Proses penyimpanan sampel DNA genom dapat dilakukan dengan menambahkan Tris-EDTA ke dalam sampel kemudian diletakkan pada suhu -20 C. Penambahan senyawa TE dilakukan untuk menghindari kerusakan DNA genom hasil isolasi dari endonuklease selama proses penyimpanan. Senyawa Tris berfungsi untuk mempertahankan pH, sedangkan senyawa EDTA yang terkandung untuk menghambat aktivitas DNAse.

RANGKUMAN

- 1. Materi genetik terdiri dari Deoxyribonucleic Acid (DNA) dan Ribonucleic Acid (RNA). Materi genetik bagi kebanyakan organisme adalah DNA, sementara RNA terlibat dalam sintesis protein dan merupakan bahan genetik sebagian virus.
- Percobaan-percobaan yang membuktikan bahwa materi genetik adalah DNA antara lain: percobaan transformasi Griffith, percobaan Avery-MacLeod-McCarty, dan percobaan Hershey dan Chase.
- 3. Pada beberapa virus, RNA (ribonucleic acid) adalah materi genetik.
- 4. Struktur DNA dan RNA adalah polimer linier yang terdiri dari monomer yang disebut nukleotida. Nukleotida terdiri dari tiga komponen yaitu fosfat, gula, dan basa nitrogen. Keduanya memiliki empat basa nitrogen (dua purin dan dua pirimidin).
- Bentuk DNA berdasarkan pilinan antara lain B-DNA, A-DNA, dan Z-DNA (berpilin ke kiri).
- 6. Isolasi DNA adalah pemisahan molekul DNA dari molekul lain seperti dinding sel, membran sel, dan membran inti sehingga strukturnya dapat dilihat dengan jelas. Ada tiga langkah utama dalam isolasi DNA, yaitu perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA.

EVALUASI

- 1. Jelaskan percobaan Avery-MacLeod-McCarty untuk membuktikan bahwa materi genetik adalah DNA!
- 2. Bagaimana cara membuktikan bahwa RNA adalah materi genetik untuk virus tertentu?
- Buatlah bagan pembeda struktur kimia DNA dan RNA!

- 4. Bagaimana cara memberi nomor pada atom karbon dan nitrogen yang ada di gula, pirimidin, dan purin?
- 5. Terangkan tentang pilinan ke kiri dan pilinan ke kanan!
- Mengapa dibutuhkan penggerusan pada isolasi DNA tanaman?

REFLEKSI BELAJAR

Setelah mempelajari materi ini,

- Tuliskan hal baru apa saja yang Saudara peroleh!
- 2. Bagian mana dari materi ini yang sulit Saudara pahami?
- Apa saja upaya belajar Saudara pada materi ini?
- 4. Apa saja manfaat/ dampak yang Saudara peroleh setelah mempelajari materi ini?

DAFTAR RUJUKAN

- Ardiana, D.W. 2009. Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Pepaya dan Jeruk dengan Menggunakan Modifikasi Buffer CTAB. Buletin Teknik Pertanian, 14 (1): 12-16.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Stuhl, K. 1994. Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Clark, D. 2005. Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution. Illinois: Elsevier Academic Press.
- Fatchiyah, Arumingtyas, E.L., Widyarti, S., Rahayu, S. 2011. Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis. Malang: Erlangga. 68
- Fraenkel-Conrat, H. and Singer, B. 1999. Virus reconstitution and the proof of the existence of genomic RNA. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 354: 583-586.

- Gardner, E.J., dkk. 1991. *Principle of Genetic 8th Edition*. New York: Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: John Wiley and Sons Inc.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., Suzuki, D.T., & Miller, J.H. 2007. *An Introduction to Genetic* 9th Edition. W. H. Freeman and Company.
- Irawan, B. 2008. *Genetika Molekuler*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A. 2010.

 Essentials of Genetics 7th Edition. San Francisco: Pearson
 Benjamin Cummings.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. 2001. Molecular Cloning A Laboratory Manual Volume I. New York: CSHL Press.
- Tamarin, R.H. 2001. Principles of Genetics 7th Edition. The McGraw-Hill Companies
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C. 1953. The Structure of DNA. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 18: 123-131.
- Yuwono, T. 2005. Biologi Molekular. Yogyakarta: Erlangga.

BAGIAN III KROMOSOM

Indikator Capaian Pembelajaran

- Mahasiswa dapat menjelaskan packaging DNA menjadi kromosom
- 2. Mahasiswa dapat membedakan kromosom pada eukariot, prokariot, dan virus.
- 3. Mahasiswa dapat menjelaskan bagian-bagian kromosom
- 4. Mahasiswa dapat membedakan tipe kromosom
- 5. Mahasiswa dapat membedakan bentuk kromosom
- 6. Mahasiswa dapat menjelaskan jumlah dan ukuran kromosom

A. Pendahuluan

C. Von Nageli mewacanakan istilah kromoson untuk pertama kali pada tahun 1842 (Aristya et al, 2015). Pada tahun 1879, W. Flemming menemukan struktur seperti benang di dalam inti sel salamander selama pembelahan sel yang diyakini adalah kromosom. Kromosom tidak hanya ditemukan pada makhluk hidup eukariot tetapi juga dapat ditemukan di makhluk hidup prokariot bahkan yang makhluk yang tergolong aseluler (virus).

Tanaman dan hewan memiliki DNA yang jauh lebih banyak daripada bakteri sehingga DNA harus mengalami kondensasi agar dapat dimasukkan ke dalam inti sel. Bakteri membawa sekitar 4.000 gen pada satu kromosom tunggal, yang panjangnya sekitar satu milimeter. Kromosom eukariotik berukuran lebih panjang dan harus dilipat sampai lima mikron, memendek 2.000 kali lipat.

Selama interfase, ketika sel tidak membelah, materi genetik sebagai kompleks nukleoprotein yang disebut kromatin yang

tersebar pada sebagian besar nukleus. Selanjutnya pemadatan kromatin selama mitosis menghasilkan kromosom metafase yang dapat dilihat menggunakan mikroskop dengan pewarnaan.

B. Packaging DNA menjadi Kromosom

Dalam proses packaging DNA menjadi kromosom, protein yang menyusun kromatin selain DNA pada eukariotik adalah histon, yang terdiri dari H1, H2A, H2B, H3, dan H4 yang kaya akan asam amino dan bermuatan positif, sehingga dapat berinteraksi dengan kelompok fosfat pada DNA yang bermuatan negatif (Lodish et al, 2003). Komposisi histon dapat dilihat pada Tabel 2.1.

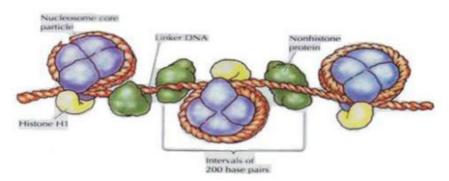
Urutan asam amino histon H2A, H2B, H3, dan H4 sangat mirip di antara spesies. Misalnya, urutan histon H3 dari jaringan landak laut dan thymus sapi berbeda hanya satu asam amino saja. H3 dari spesies kacang dan thymus sapi memiliki perbedaan sebanyak empat asam amino. Variasi urutan asam amino pada H1 lebih banyak daripada urutan histon lainnya. Pada jaringan tertentu, H1 dapat digantikan dengan histon lain. Misalnya, pada sel darah merah burung, histon H5 hadir menggantikan H1 (Lodish et al, 2003).

Tabel 3.1 Komposisi Histon

Macam Histon	Kandungan Lisin- Arginin	Jumlah asam amino	Berat Molekul (dalton)
H1	Kaya lisin	213	23000
H2A	Kaya lisin dan arginin	129	14000
H2B	Sedikit lisin	125	13800
H3	Kaya arginin	135	15300
H4	Kaya arginin dan glisin	102	11300

Sumber: Tamarin, 2001; Corebima, 2008

Bagan asosiasi antara DNA dan protein histon ditunjukkan pada Gambar 3.1. atau dalam bentuk yang lain ditunjukkan pada Gambar 3.2 yang memperlihatkan bentukan serupa manikmanik sepanjang mokelul DNA yang dapat terlihat pada rekaman mikroskop elektron. Jumlah protein histon ekivalen dengan jumlah DNA.



Gambar 3.1 Asosiasi antara DNA dan Protein pada suatu Kromatin Inti Eukariot (Sumber: Klug et al, 2007)

Bentukan serupa manik-manik itu disebut sebagai **nukleosom** (nucleosome). Penggalan DNA yang menghubungkan nukleosom dengan yang lainnya disebut **penghubung** (linker). Pada struktur nukleosom menunjukkan bahwa pada tiap nukleosom terdapat empat macam protein histon yaitu H2A, H2B, H3, dan H4, masingmasingnya sebanyak dua molekul. Jadi pada tiap nukleosom terdapat delapan molekul protein histon atau yang biasa disebut satu oktamer protein histon. Tiap oktamer itu dililiti oleh DNA sebanyak hampir 2 kali (13/4 kali). Ukuran DNA yang meliliti tiap oktamer itu adalah sepanjang 146 pasang nukleotida.

Menurut Clark (2005) H1 memiliki dua lengan yang terbentang dari pusatnya. Bagian tengah H1 mengikat nukleosome dan kedua lengan berikatan dengan nukleosom di kedua sisi. Pendapat lain yang menyatakan bahwa protein histon H1 berperan menstabilkan dua lilitan DNA (sepanjang 166 pasang nukleotida) atas oktamer (perhatikan Gambar 3.2). Ada pula pendapat yang menyatakan bahwa protein histon H1 berperan pada peristiwa pelilitan lanjutan

atau pelipatan (folding) untai nukleosome membentuk benang kromatin berdiameter 110 Å (perhatikan Gambar 3.1).

Tahap selanjutnya kondensasi mencakup pelilitan dan pelipatan lanjutan kromatin hingga terbentuknya benang kromatin berdiamater 300 A (solenoid). Pada tahap ketiga kondensasi, protein-protein kromosom non histon membentuk kerangka yang membantu proses kondensasi lebih lanjut hingga terbentuknya kromosom metafase yang sangat padat.

Struktur kromosom di dalam mitokondria makhluk hidup apapun berupa molekul DNA untai ganda yang sangat melilit, tidak berasosiasi dengan protein-protein semacam histon. Jelaslah bahwa kromosom di dalam mitokondria hanya berupa molekul DNA untai ganda yang telanjang Aleh karena itu pada kromosom mitokondria tidak ditemukan bentukan nukleosom semacam yang ditemukan pada kromosom inti sel eukariot. Seperti halnya kromosom mitokondria, kromosom kloroplas juga berupa DNA untai ganda telanjang tanpa asosiasi dengan protein struktural tertentu dan sangat melilit.

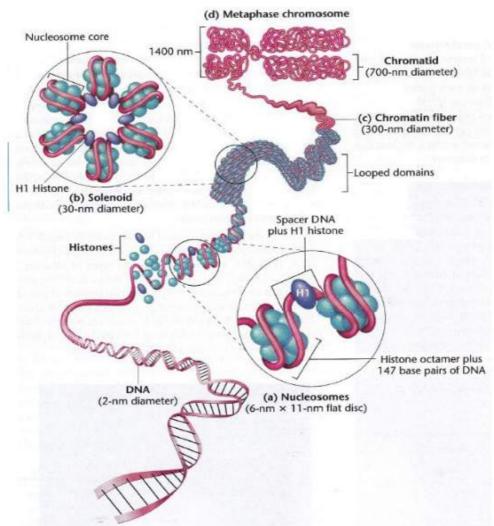


FIGURE 11-10 General model of the association of histones and DNA in the nucleosome, showing how the chromatin fiber can coil into a more condensed structure, ultimately producing a metaphase chromosome.

Gambar 3.2 Model Umum Asosiasi DNA dan Protein Histon serta Pola Kondensasinya pada Kromosom Inti Eukariot (Sumber: Klug et al, 2007)

Kromosom virus dan prokariot lebih sederhana jika dibandingkan dengan kromosom eukariot. Pada virus (bukan retrovirus), kromosom tersusun dari molekul DNA telanjang, tanpa tergabung dengan senyawa lain seperti protein. Pada sebagian besar kelompok virus, molekul DNA merupakan helix rangkap/

ganda, tetapi pada kelompok virus tertentu, molekul DNA tersebut hanya berupa suatu untai tunggal. Kromosom retrovirus tersusun dari molekul RNA telanjang, tanpa bergabung dengan senyawa lain seperti protein dan sebagainya (Corebima, 2008).

Pada makhluk hidup prokariot, kromosom tersusun dari molekul DNA untai ganda (helix rangkap) yang bergabung dengan protein tertentu (bukan histon seperti pada kelompok eukariot) serta RNA (Gardner et al., 1991). Escherichia coli, dijadikan bahan kajian untuk mempelajari kromosom memiliki kromosom sirkular. Kromosom pada bakteri terdiri dari molekul DNA yang bergabung dengan protein yang disebut HU dan H1. Protein tersebut kecil tetapi tersebar di dalam sel. Protein ini memiliki asam-asam amino bermuatan positif yang dapat membentuk ikatan ion dengan fosfat DNA yang bermuatan negatif.

C. Bagian-bagian Kromosom

Setiap kromosom memiliki dua lengan, yang pendek disebut lengan p (dari bahasa Perancis petit yang berarti kecil) dan lengan yang panjang lengan q (q mengikuti p dalam alfabet). Lengan pendek dan lengan panjang dihubungkan oleh suatu struktur yang disebut sentromer. Sentromer merupakan lekukan primer yang di kedua sisinya terdapat kinetokor (tempat benang-benang spindel melekat). Selain lekukan primer, terkadang juga dijumpai lekukan lain yang disebut lekukan sekunder untuk pengaturan nukleolus yang disebut Nucleolus Organizer Regions (NORs). Lekukan sekunder biasanya diikuti dengan satelit (bangunan membulat dan terikat pada pengaturan nukleolus) (Aristya et al., 2015).



Gambar 3.3. Bagian-bagian Kromosom (Sumber: Lodish et al., 2003)

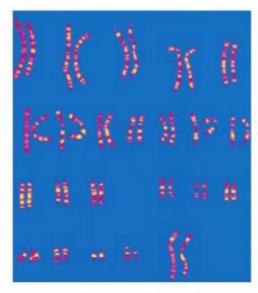
Kromosom dapat diwarnai dengan menggunakan pewarna Dengan pewarnaan semacam ini, dapat diamati perbedaan dalam hal pengikatannya terhadap bahan pewarna tersebut. Bagian kromosom yang tidak terlalu rapat pengemasannya yang ditunjukkan dengan mengikat lebih sedikit pewarna Giemsa disebut eukromatin, sedangkan bagian kromosom yang lebih rapat dan mengikat pewarna Giemsa lebih banyak disebut **heterokromatin** yang tampak padat di mikroskop cahaya dan elektron. Bagian yang aktif melakukan transkripsi adalah eukromatin. Hal itu selama replikasi dan transkripsi, histon sementara lepas dari DNA. Setelah proses transkripsi pada bagian tersebut selasai, histon mengait kembali pada DNA (Clark, 2005).

Kromosom eukariotik memiliki dua ujung yang disebut telomer, yang tidak hanya menandai penghentian kromosom tetapi juga memiliki beberapa fungsi spesifik. Telomer mencegah ujung kromosom terdegradasi oleh eksonuklease dan mengontrol ujung kromosom direplikasi dengan benar (Tamarin, 2001).

D. Tipe Kromosom

Kromosom dibedakan atas autosom dan gonosom. Autosom tidak ada hubungannya dengan penentuan jenis kelamin

sedangkan gonosom menentukan jenis kelamin (sering disebut juga kromosom kelamin). Setiap sel, baik sel tubuh maupun sel kelamin memiliki autosom dan gonosom, yang membedakan adalah jumlahnya, pada sel tubuh selalu diploid dan sel kelamin selalu haploid. Misalnya pada sel tubuh manusia, 46 kromosom atau 23 pasang, maka yang 44 buah (atau 22 pasang) merupakan autosom, sedangkan 2 yang lainnya adalah gonosom (Gambar 3.4). Contoh lain misalnya pada lalat buah (*Drosophila melanogaster*) yang mempunyai 8 buah kromosom, 6 buah diantaranya adalah autosom dan 2 gonosom.



Gambar 3.4 Kromosom pada Manusia (nomor 1 sampai dengan nomor 22 adalah kromosom tubuh, nomor 23 adalah kromosom kelamin)

(Sumber: Griffith et al, 2007)

Gonosom dibedakan atas dua macam, yaitu kromosom X dan kromosom Y. Pada manusia (dan kebanyakan Mamalia) baik yang perempuan (betina) maupun yang laki-laki (jantan) mempunyai sepasang kromosom seks. Seorang perempuan normal mempunyai sepasang kromosom X. Seorang laki-laki normal mempunyai sebuah kromosom X dan sebuah kromosom Y.

Sel telur (ovum) yang dimiliki seorang perempuan normal adalah haploid mengandung 22 autosom + sebuah kromosom X. Sebaliknya, seorang laki-laki normal membentuk 2 macam spermatozoa, yaitu spermatozoa yang membawa 22 autosom + 1 kromosom X (disebut ginospermium) dan spermatozoa yang membawa 22 autosom + 1 kromosom Y (disebut androspermium). Jadi secara teoritis, lahirnya anak perempuan dan laki-laki dalam keadaan normal mempunyai peluang sama besar, yaitu masingmasing 50%.

Bentuk Kromosom

Berdasarkan letak sentromernya kromosom dibedakan menjadi empat macam yaitu:

- 1. Metasentrik jika sentromer terletak di tengah-tengah kromosom sehingga kromosom tampak memiliki dua lengan yang sama panjang, dan mempunyai bentuk seperti huruf V.
- 2. Submetasentrik jika sentromer terletak pada submedian atau kira-kira ke arah salah satu ujung kromosom, sehingga kromosom terbagi menjadi dua lengan yang tak sama panjang dan mempunyai bentuk seperti huruf J.
- 3. Akrosentrik jika sentromer terletak pada subterminal (di dekat ujung kromosom), sehingga bentuk kromosom tidak membengkok melainkan tetap lurus seperti batang, satu lengan kromosom sangat pendek, sedang lengan lainnya sangat panjang.
- Telosentrik apabila sentromernya terletak di ujung kromosom, sehingga kromosom hanya memiliki satu lengan kromosom saja dan berbentuk lurus seperti batang.

Centromere location	Designation	Metaphase shape	Anaphase shape
Middle	Metacentric	Sister chromatids Centromere	→ Migration →
Between middle and end	Submetacentric	p arm————————————————————————————————————	53
Close to end	Acrocentric	ň	69
At end	Telocentric	0	00

Gambar 3.5 Bentuk Kromosom (Sumber: Klug et al, 2010)

F. Jumlah dan Ukuran Kromosom

Setiap jenis makhluk hidup memiliki ukuran kromosom yang bervariasi. Umumnya panjang kromosom berlajar antara 0,2–50 mikron dengan diameter antara 0,2–20 µm. Hewan cenderung memiliki kromosom yang pendek (4-6 µm), sedangkan tumbuhan derung memiliki kromosom yang panjang (mencapai 50 µm). Pada umumnya semakin sedikit jumlah kromosom pada suatu makluk hidup semakin panjang kromosomnya.

Pada lalat buah (*D. melanogaster*) dikenal memiliki kromosom yang berukuran besar atau disebut dengan kromosom raksasa. Karena besarnya, kromosom lalat buah ini bisa diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya biasa. Pengamatan kromosom raksasa dari *D. melanogaster* biasanya diambil dari kelenjar air liurnya pada saat masih menjadi larva. Dengan menggunakan mikroskop cahaya akan tampak seperti benang-benang yang

semuanya berjumlah 8 buah. Sedangkan untuk mengamati secara seksama tidak cukup dengan mikroskop biasa melainkan harus dengan mikroskop elektron yang mampu memperbesar bayangan hingga jutaan kali.

Ukuran kromosom bakteri juga bermacam-macam. Sebagai contoh misalnya kromosom bakteri E.coli adalah sepanjang sekitar 1100 μm sumber lain menyebut sepanjang 1200 μm. Kromosom E. coli tersebut. berukuran panjang 1200 µm dan tersusun dari 4000 pasang basa atau berukuran 4 x 10³ pb. Di lain pihak kromosom bakteri Haemophilus influenzae berukuran 832 µm, sedangkan kromosom Mycoplasma galisepficum tersusun dari 300 kb.

Tabel 3.2 Jumlah kromosom pada beberapa spesies

Jumlah kromosom (pasang)	Spesies	Jumlah kromosom (pasang)	
3	Gandum	21	
6	Manusia	23	
8	Kentang	24	
11	Sapi	30	
12	Keledai	31	
13	Kuda	32	
16	Anjing	39	
19	Ayam	39	
20	Ikan Mas	52	
21			
	(pasang) 3 6 8 11 12 13 16 19 20	(pasang) 3 Gandum 6 Manusia 8 Kentang 11 Sapi 12 Keledai 13 Kuda 16 Anjing 19 Ayam 20 Ikan Mas	

Sumber: Griffith et al., 2007

Jumlah kromosom dalam sel bervariasi, tergantung pada jenis makhluk hidupnya. Namun, jumlah kromosom pada tiap jenis makhluk hidup selalu tetap. Spesies yang memiliki jumlah kromosom yang sama atau hampir sama tidak menggambarkan bahwa spesies-spesies tersebut memiliki banyak kesamaan ciri atau berkerabat dekat. Misalnya antara padi dan pinus sama–sama memiliki 24 kromosom (12 pasang) tetapi keduanya memiliki

ciri-ciri yang jauh berbeda. Demikian pula antara kucing dengan Hydra yang sama-sama memiliki 32 kromosom. Apalagi antara bawang merah dengan Planaria (cacing pipih) yang sama-sama mempunyai 16 kromosom.

Jumlah kromosom pada mitokondria dan kloroplas hanya satu buah yang berbentuk sirkuler ataupun cincin. Ukuran DNA mitokondria maupun kloroplas sangat beranekaragam. Pada tumbuhan tinggi misalnya, ukuran DNA kloroplas berkisar antara 120-160 kb, sedangkan pada Alga berkisar antara 85-292 kb (Gardner et al., 1991).

RANGKUMAN

- 1. Dalam proses packaging DNA menjadi kromosom, protein yang menyusun kromatin calain DNA pada eukariotik adalah histon, yang terdiri dari H1, H2A, H2B, H3, dan H4. tiap nukleosom terdapat empat macam protein histon yaitu H2A, H2B, H3, dan H4, masing-masingnya sebanyak dua molekul. Jadi pada tiap nukleosom terdapat delapan molekul protein histon atau yang biasa disebut satu oktamer protein histon. Tiap oktamer itu dililiti oleh DNA sebanyak hampir 2 kali. selanjutnya kondensasi mencakup pelilitan pelipatan lanjutan kromatin hingga terbentuknya benang kromatin berdiamater 300 Å (solenoid). Pada tahap ketiga kondensasi, protein-protein kromosom non histon membentuk suatu kerangka yang membantu proses kondensasi lebih lanjut hingga terbentuknya kromosom metafase yang sangat padat.
- 2. Setiap kromosom memiliki dua lengan, yang pendek disebut lengan p dan lengan yang panjang lengan g. Lengan pendek dan lengan panjang dihubungkan oleh suatu struktur yang disebut sentromer. Ujung kromosom disebut telomer.

- 3. Lomosom dibedakan atas autosom dan gonosom. Autosom tidak ada hubungannya dengan penentuan jenis kelamin sedangkan gonosom menentukan jenis kelamin (sering disebut iuga kromosom kelamin).
- 4. Berdasarkan letak sentromernya kromosom dibedakan menjadi empat macam yaitu metasentrik, submetasentrik, akrosentrik, dan telosentrk.
- 5. Setiap jenis makhluk hidup memiliki ukuran dan jumlah kromosom yang bervariasi. Umumnya panjang kromosom berkigar antara 0,2–50 mikron dengan diameter antara 0,2–20 μm. Hewan cenderung memiliki kromosom yang pendek (4-6 μm), sedangkan tumbuhan cenderung memiliki kromosom yang panjang (mencapai 50 µm).

EVALUASI

- Apa yang dimaksud kromosom?
- harus mengalami packaging menjadi Mengapa DNA kromosom?
- 3. Apa perbedaan kromosom pada eukariot, prokariot, dan virus?
- 4. Buatlah tabel perbandingan yang memuat perbedaan jenisjenis kromosom berdasarkan sentromernya
- Mengapa transkripsi hanya bisa dilakukan pada eukromatin?
- Carilah jurnal penelitian tentang jumlah dan ukuran kromosom, buatlah tabel perbandingannya!

REFLEKSI BELAJAR

Setelah mempelajari materi ini,

- Tuliskan hal baru apa saja yang Saudara peroleh!
- Bagian mana dari materi ini yang sulit Saudara pahami?
- Apa saja upaya belajar Saudara pada materi ini?

4. Apa saja manfaat/ dampak yang Saudara peroleh setelah mempelajari materi ini?

DAFTAR RUJUKAN

- Aristya, G.R. 2015. Karakterisasi Kromosom Tumbuhan dan Hewan. Yogyakarta: UGM Press.
- Corebima, A.D. 2008. Bahan Ajar Genetika. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Gardner, E.J., dkk. 1991. *Principle of Genetic 8th Edition*. New York: Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: John Wiley and Sons Inc.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., Suzuki, D.T., & Miller, J.H. 2007. *An Introduction to Genetic* 9th Edition. W. H. Freeman and Company.
- Irawan, B. 2008. *Genetika Molekuler*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A. 2010.

 Essentials of Genetics 7th Edition. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L., Darnell, J. 2003. *Molecular Cell Biology* 5th Edition. New York: Freeman, W. H. & Company
- Tamarin, R.H. 2001. Principles of Genetics 7th Edition. The McGraw-Hill Companies

BAGIAN IV REPLIKASI

Indikator Capaian Pembelajaran

- Mahasiswa dapat membedakan model replikasi
- Mahasiswa dapat menjelaskan bukti replikasi DNA yaitu semikonservatif
- 3. Mahasiswa dapat menjelaskan enzim yang berperan pada proses replikasi
- 4. Mahasiswa dapat menjelaskan proses replikasi
- Mahasiswa dapat menjelaskan proses perbanyakan DNA secara in vitro yaitu menggunakan metode PCR

A. Pendahuluan

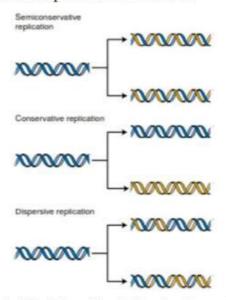
Perbanyakan materi genetik penting dilakukan dalam proses pertumbuhan sel. Proses tersebut dikenal dengan replikasi. Replikasi adalah peristiwa penggandaan DNA. DNA perlu digandakan untuk mempersiapkan terjadinya pembelahan sel, karena tiap sel baru yang terbentuk akan memiliki kopian DNA yang sama. Replikasi membutuhkan bantuan dari beberapa enzim untuk membuka untai DNA, membentuk DNA baru, dan menggabungkan DNA yang terbentuk.

Mekanisme replikasi oleh Watson dan Crick disebut semikonservatif. Setiap basa berpotensi untuk dipasangkan dengan nukleotida bebas. Masing-masing basa hanya akan berpasangan dengan basa komplementernya, A dengan T dan G dengan C. Sehingga, masing-masing dari dua untaian tunggal akan bertindak sebagai templat, atau cetakan, untuk mengarahkan perakitan basa komplementer dan membentuk heliks ganda identik dengan

aslinya. Nukleotida baru yang ditambahkan diasumsikan berasal dari kumpulan nukleotida bebas yang ada di dalam sel. Jika model ini benar, maka masing-masing molekul anakan harus mengandung satu untai nukleotida parental dan satu untai nukleotida yang baru disintesis.

B. Model Replikasi DNA

Ada tiga model replikasi yang dikenal yaitu konservatif, semi konservatif, dan dispersif (Gambar 6.1). Pada model replikasi konservatif, untai ganda DNA induk langsung membentuk salinan berupa untai ganda DNA baru tanpa ada pemisahan untai ganda DNA induk terlebih dahulu. Replikasi pertama menghasilkan dua untai ganda DNA, terdiri dari satu untai ganda DNA induk dan satu untai ganda DNA yang benar-benar baru. Pada replikasi kedua, masing-masing untai ganda DNA tersebut langsung membentuk salinan DNA yang baru lagi. Akhirnya, menghasilkan empat buah DNA. Satu DNA tetap merupakan DNA induk yang utuh dan tiga DNA merupakan DNA baru.



Gambar 4.1 Model replikasi (Sumber Tamarin, 2001)

Hipotesis model semi konservatif ini dikemukakan oleh Watson dan Crick, menyatakan bahwa untai ganda DNA induk membuka atau memisah terlebih dahulu sehingga terbentuk dua buah untai tunggal DNA. Masing-masing untai tunggal tersebut berfungsi sebagai cetakan untuk membentuk untai tunggal DNA baru, melalui pembentukan pasangan basa yang komplementer dengan basa nitrogen DNA induk. Dengan demikian, hasil replikasi pertama adalah dua buah DN

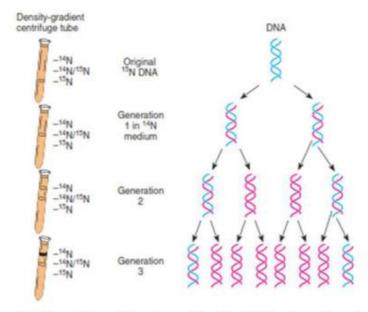
Masing-masing DNA terdiri dari satu untai tunggal induk dan satu untai tunggal yang baru. Pada replikasi kedua, masingmasing untai ganda DNA tersebut membuka kembali sehingga dihasilkan empat buah DNA. Dua buah DNA mengandung untai tunggal induk dan dua buah DNA yang lain merupakan untai DNA baru.

Untai ganda DNA hasil replikasi pertama maupun replikasi ke dua dari DNA induk mengandung segmen campuran antara untai DNA induk dan untai DNA baru. Artinya, untai ganda DNA salinannya terdiri dari dua untai tunggal DNA yang masingmasing mengandung segmen (bagian atau potongan) DNA induk dan segmen DNA baru. Pada akhir tahun 1950-an, Matthew Meselson dan Franklin Stahl melakukan percobaan untuk menguji ketiga hipotesis tersebut. Ternyata, hasil percobaannya mendukung hipotesis atau ide dari Watson dan Crick yaitu model semi konservatif.

C. Replikasi Semikonservatif

Replikasi semikonservatif baru dipastikan pada tahun 1958 dengan eksperimen dari Matthew Meselson dan Franklin Stahl. Mereka menggunakan isotop atom N yaitu isotop ¹⁴N (berat atom 14,008) dan isotop N yang lebih berat yaitu ¹⁵N. Kedua isotop tersebut dapat dibedakan berdasarkan berat atomnya. Meselson dan Stahl menggunakan biakan *E. coli* pada medium yang mengandung isotop ¹⁵N sehingga basa N akan mengandung isotop ¹⁵N. Sel kemudian dipindahkan dari medium ¹⁵N dan dimasukkan ke dalam medium ¹⁴N untuk beberapa generasi. Pada tiap generasi, sel disentrifuse untuk dilihat kandungan N (Gambar 4.2).

Prosedur sentrifugasi gradien cesium klorida digunakan Meselson dan Stahl untuk membedakan DNA. Jika cesium klorida diputar dalam sentrifuse dengan kecepatan sangat tinggi (50.000 rpm) selama berjam-jam, ion cesium dan klorida didorong oleh gaya sentrifugal ke bagian bawah tabung. Pada akhirnya, gradien ion terbentuk di tabung, dengan konsentrasi ion/ kerapatan tertinggi berada di bagian bawah. DNA yang disentrifugasi dengan cesium chloride membentuk sebuah pita pada posisi yang identik dengan densitasnya pada gradien.



Gambar 4.2 Eksperimen Meselson dan Stahl (Sumber: Tamarin, 2001)

DNA dengan kepadatan berbeda akan membentuk pita di tempat yang berbeda. Sel yang awalnya tumbuh di isotop berat ¹⁵N menunjukkan DNA dengan kepadatan tinggi. Setelah menumbuhkan sel-sel ini dalam isotop ¹⁴N selama satu generasi, ditemukan bahwa DNA memiliki kepadatan menengah, ditunjukkan setengah merah (15N) dan setengah biru (14N) di bagian tengahnya. Setelah dua generasi, DNA yang diamati persis seperti yang diperkirakan oleh model Watson-Crick.

D. Proses Replikasi

Arthur Kornberg dan mitranya pada tahun 1957, berhasil mengisolasi DNA polimerase I dari E. coli. Tetapi pada tahun 1969, ditemukan mutan E.coli yang tidak memiliki DNA polimerase I dan mampu melakukan replikasi, hanya saja mutan ini tidak bisa memperbaiki DNA yang rusak. Sehingga dugaan awal yang menyatakan enzim yang terlibat pada proses replikasi adalah DNA polimerase I ternyata bukan enzim yang utama pada proses replikasi (Irawan, 2008).

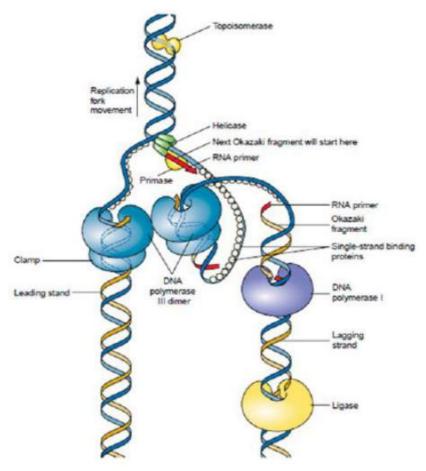
Sekarang dikenal juga enzim DNA polimerase II dan III yang berperan dalam proses replikasi. Enzim DNA polimerase I diduga berperan dalam menghilangkan primer dan menggantinya dengan urutan nukleotida, sedangkan yang berperan dalam sintesis nukleotida adalah DNA polimerase III. DNA polimerase II berperan dalam perbaikan DNA yang rusak akibat pengaruh eksternal, misalnya sinar UV.

Replikasi DNA dimulai pada lokasi spesifik disebut sebagai asal replikasi, yang memiliki urutan tertentu yang bisa dikenali oleh protein yang disebut inisiator DnaA. Mereka mengikat molekul DNA di tempat asal, sehingga mengendur untuk perakitan protein lain dan enzim penting untuk replikasi DNA. Sebuah enzim yang disebut helikase direkrut ke lokasi untuk unwinding (proses penguraian/seperti membuka resleting) heliks dalam alur tunggal.

Helikase melepaskan ikatan hidrogen antara pasangan basa, dengan cara yang tergantung energi. Titik ini atau wilayah DNA yang sekarang dikenal sebagai garpu replikasi (Garpu replikasi atau cabang replikasi adalah struktur yang terbentuk ketika DNA bereplikasi). Setelah heliks yang terbuka, protein yang disebut untai tunggal mengikat protein (SSB) mengikat daerah terbuka dan mencegah mereka untuk menempel kembali. Proses replikasi sehingga dimulai, dan garpu replikasi dilanjutkan dalam dua arah yang berlawanan sepanjang molekul DNA.

Karena adanya ikatan heliks yang terbuka, pilinan yang ada di depannya akan lebih kuat yang disebut *supercoiling*. Supercoiling dengan pilinan yang kuat dapat memutus DNA, untuk menghilangkannya, enzim DNA girase akan memutus salah satu heliks sehingga menjadi mengendur. DNA girase termasuk golongan DNA topoisomerase. Reaksi terbukanya heliks serta *supercoiling* membutuhkan energi dari hidrolisis ATP.

Untuk memulai penambahan nukleotida komplementer, dibutuhkan 3' gugus hidroksil yang dikatalisasi oleh enzim yang disebut DNA primase. Enzim ini mensintesis bentangan pendek RNA ke untai DNA yang ada. Segmen pendek ini disebut primer, terdiri dari 9-12 nukleotida. Hal ini memberikan DNA polimerase platform yang diperlukan untuk mulai menyalin sebuah untai DNA. Setelah primer terbentuk pada kedua untai, DNA polimerase III dapat memperpanjang primer ini menjadi untai DNA baru.



Gambar 4.3 Proses replikasi (Sumber: Tamarin, 2001)

DNA polimerase III dapat menambahkan nukleotida baru hanya untuk ujung 3' dari untai yang ada, dan karenanya dapat mensintesis DNA dalam arah $5' \leftrightarrow 3'$ saja. Tapi untai DNA berjalan di arah yang berlawanan, dan karenanya sintesis DNA pada satu untai dapat terjadi terus menerus. Hal ini dikenal sebagai untaian pengawal (leading strand).

Di sini, DNA polimerase III (DNA pol III) mengenali 3' OH ujung RNA primer, dan menambahkan nukleotida komplementer baru. Saat garpu replikasi berlangsung, nukleotida baru ditambahkan secara terus menerus, sehingga menghasilkan untai baru.

Pada untai berlawanan, DNA disintesis secara terputus dengan menghasilkan serangkaian fragmen kecil dari DNA baru dalam arah 5' ↔ 3'. Fragmen ini disebut fragmen Okazaki, yang kemudian bergabung untuk membentuk sebuah untai terus menerus nukleotida. Untai ini dikenal sebagai lagging Strand (untai tertinggal) sejak proses sintesis DNA pada untai ini hasil pada tingkat yang lebih rendah.

Di sini, primase menambahkan primer di beberapa tempat sepanjang untai terbuka. DNA pol III memperpanjang primer dengan menambahkan nukleotida baru, dan jatuh ketika bertemu fragmen yang terbentuk sebelumnya. Dengan demikian, perlu untuk melepaskan untai DNA, lalu bergeser lebih lanjut kebagian atas untuk memulai perluasan primer RNA lain. Sebuah penjepit geser memegang DNA di tempatnya ketika bergerak melalui proses replikasi.

Meskipun untai DNA baru telah disintesis primer RNA hadir pada untai baru terbentuk harus digantikan oleh DNA. Kegiatan ini dilakukan oleh enzim DNA polimerase I (DNA pol I). Ini khusus menghilangkan primer RNA melalui '5 ke 3' aktivitas eksonuklease nya, dan menggantikan mereka dengan deoksiribonukleotida baru dengan 5' ke 3' aktivitas polimerase DNA.

Setelah penghapusan primer selesai untai tertinggal masih mengandung celah antara fragmen Okazaki berdekatan. Enzim ligase mengidentifikasi dan menyambung celah tersebut dengan menciptakan ikatan fosfodiester antara 5' fosfat dan 3' gugus hidroksil fragmen yang berdekatan.

Replikasi ini terhenti di lokasi terminasi khusus yang terdiri dari urutan nukleotida yang unik. Urutan ini diidentifikasi oleh protein khusus yang disebut tus yang mengikat ke situs tersebut, sehingga secara fisik menghalangi jalur helikase. Ketika helikase

bertemu protein tus itu jatuh bersama dengan untai tunggal protein pengikat terdekat.

Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode enzimatis untuk me-lipatgandakan suatu sekuen nukleotida secara eksponensial dengan cara in vitro (Yuwono, 2008). Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis. Metode ini sekarang telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitasi molekul mRNA.

Teknik PCR sebenarnya mengekploitasi berbagai alami replikasi DNA. Dalam proses tersebut, Polimerase-DNA menggunakan DNA untai tunggal sebagai cetakan mensintesis untai baru yang komplementer. Di laboratorium, cetakan untai tunggal dapat diperoleh dengan mudah melalui pemanasan DNA untai ganda pada temperatur mendekati titik didih. Polimerase-DNA juga memerlukan suatu wilayah untai ganda pendek untuk memulai ("prime") proses sintesis. Pada PCR, posisi awal dan akhir sintesis DNA dapat ditentukan dengan menyediakan suatu oligonukleotida sebagai primer yang menempel secara komplementer pada cetakan sesuai dengan keinginan peneliti. Inilah keunggulan PCR yang pertama yaitu polimerase-DNA dapat diarahkan untuk sintesis wilayah DNA tertentu.

Komponen PCR

Semua komponen PCR dapat mempengaruhi hasil. Sebagian besar dari padanya tidak dapat dioptimasi dengan mudah kecuali konsentrasi MgCl₂. Sekalipun demikian, komponen tersebut hendaknya dipertimbangkan dalam penggunaannya.

Kation

Polimerase-DNA Tag memerlukan kation Mg²⁺ dalam penyangga untuk proses penambahan nukleotida. Parameter ini dapat beragam untuk pasangan primer yang berbeda sekalipun untuk DNA cetakan yang sama. Karena konsentrasi MgCl, dalam penyangga adalah suatu peubah yang dapat sangat mempengaruhi hasil PCR, optimasi komponen ini diperlukan sebelum digunakan sebagai prosedur yang baku.

Reagensia dan Penyangga

Kemurnian semua reagensia merupakan parameter yang paling penting untuk amplifikasi sasaran yang jarang. Peniadaan cemaran pada setiap langkah adalah penting diperhatikan. Untuk berbagai penerapan, reagensia yang berkualitas baik dan peniadaan cemaran nuklease sudah cukup. Tetapi, peniadaan cemaran ini melalui perlakuan dengan dietilpirokarbonat, yang biasa dilakukan, mesti dihindarkan. Adanya bahan kimia ini dalam konsentrasi yang sangat rendah sudah dapat mengacankan reaksi.

Larutan Penyangga PCR umumnya mengandung 10 mM Tris pH 8,4, 50 mM KCl, gelatin 0,01%, detergen NP40 0,01%, dan Tween 20 0,01%. Detergen non-ionik dapat diganti dengan Triton X-100 0,1%. Larutan penyangga ini biasanya sudah disediakan oleh produsen enzim dalam konsentrasi 10X.

c. Primer

Primer merupakan parameter yang paling sulit diduga dan ditangani bila terdapat permasalahan dalam pelaksanaan PCR.

Secara sederhana, beberapa primer memang tidak dapat digunakan dengan alasan yang sulit diungkapkan. Untuk mengoptimumkan kemungkinan bahwa primer yang digunakan akan dapat bekerja dengan baik, beberapa hal perlu diperhatikan.

1) Pertimbangan umum

Satu pasang primer hendaknya menempel ("hybridize") pada urutan yang hendak diperbanyak, sementara kemungkinan penempelan pada posisi lain harus ditekan sekecil mungkin. Bila sasaran terdapat dalam jumlah yang cukup, perlu dilakukan pengujian dengan blot Southern dan hibridisasi oligonukleotida. Jarak antara primer merupakan parameter yang lentur, dan dapat mencapai 10 kbp. Tetapi, efisiensi sintesis biasanya akan menurun pada panjang lebih dari 3 kbp. Jarak yang terlalu kecil juga mengurangi kapasitas PCR untuk memperoleh informasi urutan, atau untuk mengamplifikasi ulang dengan primer yang berposisi pada sebelah dalam posisi pasangan primer yang pertama, bila diperlukan.

hendaknya dirancang untuk memungkinkan pelaksanaan uji kekhasan produk PCR. Hal ini dapat dilakukan bila diantara primer terdapat suatu tempat pemotongan untuk suatu endonuklease pembatas, atau melalui hibridisasi dengan suatu oligonukleotida yang lain dapat melacak produk PCR secara khas.

Komplementeritas terhadap sasaran

Untuk berbagai penerapan, primer disintesis khusus agar komplementer secara sempurna dengan cetakan sasaran. Untuk yang lain, misalnya untuk kreasi mutasi atau penambahan urutan pengenalan suatu endonuklease, atau bahkan urutan khas suatu promotor sehingga produk dapat ditranslasikan secara in vitro, pasangan basa yang tidak sepadan ("mismatch") memang dapat dengan sengaja dilakukan atau tidak dapat

dihindari. Ketidaksepadanan pasangan basa sebaiknya berada pada posisi ujung 5' dari primer. Ketidaktepatan pasangan yang semakin mendekati ujung 3' memperbesar kemungkinan hambatan dalam sintesis DNA oleh polimerase-DNA, yang pada hakekatnya merupakan perpanjangan dari primer tersebut. Bila klon sasaran telah tersedia, pengujian ketepatan primer penting dilakukan dalam reaksi pengurutan dengan polimerase Taq. Kini, berbagai program komputer untuk seleksi primer dari urutan DNA yang telah diketahui telah tersedia. primer dengan Penggunaan urutan beragam, diturunkan dari urutan protein yang disandi oleh gen yang bersangkutan, atau yang merupakan urutan dari spesies yang berbeda, memang sering berhasil, sekalipun juga diperlukan beberapa kali percobaan. Bila bekerja, primer tersebut dapat sangat berarti, tetapi PCR dengan primer seperti itu sering menghasilkan produk yang kelihatannya khas, informasi yang diberikan sering tidak berguna.

Panjang Primer

Primer yang baik mempunyai panjang 20 sampai 30 basa. Pernyataan, bahwa primer yang lebih panjang dapat membantu dalam meningkatkan kekhasan PCR dengan nyata, belum dapat dibuktikan.

4) Urutan primer

Primer hendaknya mempunyai komponen GC yang serupa dengan sasaran. Primer dengan distribusi urutan yang tidak wajar, seperti sederetan polipurin atau polipirimidin, sebaiknya dihindari. Kondisi demikian dapat menyebabkan primer mempunyai struktur sekunder yang mengganggu PCR. Pengecekan berbagai struktur sekunder dari primer dengan menggunakan berbagai program komputer sebaiknya dilakukan.

5) Primer Dimer

Primer dimer merupakan artefak yang paling sering diamati bila sejumlah kecil cetakan digunakan untuk siklus yang banyak. Primer dimer terbentuk bila ujung 3' dari satu primer menempel pada ujung yang sama pada primer yang lain. Enzim polimerase kemudian memperpanjang masing-masing primer sampai ke ujung primer lawannya. Produk ini dapat menghambat reaksi PCR yang diharapkan. Primer dimer dapat dihindari dengan menggunakan primer yang tidak saling komplementer sama sekali, terutama pada ujung 3'. Bila itu terjadi, konsentrasi MgCl, yang tepat dapat meminimumkan primer dimer dibandingkan dengan produk yang diharapkan. Lowe et al. (1990) memberikan kriteria untuk pemilihan primer sebagai berikut panjang berada diantara 18-22 nukleotida, primer mempunyai CC, CG, GG, atau GC pada ujung 3', kandungan GC berkisar antara 45-55%, Forward dan backward primer membatasi urutan yang berkisar antara 100 - 600 bp, suatu primer tidak menunjukkan kesamaan yang lebih dari 4 bp terhadap primer pasangannya.

6) Kemurnian Primer

Tingkat kemurnian primer sangat mempengaruhi efisiensi PCR. Dalam sintesis oligonukleotida sering diperoleh oligo yang lebih pendek dari yang diharapkan. Oligo cemaran ini akan mempengaruhi kekhasan reaksi PCR. Oligo yang diinginkan sebaiknya dipisahkan dari cemaran melalui pemurnian dengan gel poliakrilamid atau, yang terbaik, kromatografi cair berkinerja tinggi ("high performance liquid chromatographie"/ HPLC).

d. Cetakan (template)

Di samping prosedur isolasi DNA yang baku, berbagai prosedur sederhana dan cepat telah dikembangkan untuk berbagai jaringan.

Bahkan DNA yang relatif sudah mengalami degradasi pun dapat digunakan untuk memperoleh produk PCR dengan ukuran yang tidak terlalu panjang. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.

Jumlah cetakan sasaran bila dibandingkan dengan urutan yang tidak spesifik, dapat mempunyai pengaruh yang besar terhadap hasil yang tidak spesifik. Dengan urutan sasaran yang lebih sedikit, kemungkinan adanya produk yang tidak spesifik akan lebih besar. Untuk berbagai penerapan, seperti berbagai prosedur pengurutan DNA, dimana adanya produk tunggal sangat penting, pemurnian produk PCR tertentu dan amplifikasi ulang disarankan.

e. Polimerase-DNA taq

Di antara berbagai kelebihan yang diberikan oleh polimerase Taq adalah ketahanan enzim ini terhadap pemanasan berulang dan kemampuan untuk mensintesis DNA pada temperatur tinggi. Temperatur yang tinggi ini akan melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur skunder. Akan tetapi, enzim ini tidak tahan pada panas yang berlebihan, sehingga untuk efisiensi yang terbaik, hendaknya tidak melakukan pemanasan yang tidak perlu. Untuk tujuan ini, berbagai protokol menyarankan penambahan Polimerase Taq setelah langkah denaturasi yang pertama.

Meningkatkan konsentrasi polimerase Taq diatas 2,5 U untuk satu reaksi kadang-kadang dapat meningkatkan efisiensi PCR, tetapi hanya sampai pada kondisi tertentu saja. Penambahan yang lebih kadang-kadang meningkatkan hasil produk yang tidak khas di luar produk yang diharapkan. Selebihnya, perlu diingat, enzim polimerase Taq bukan merupakan enzim yang tidak mahal.

Suatu sifat polimerase Taq yang penting adalah tingkat kesalahan yang diduga dapat mencapai 2 x 10-4 nukeotida dalam satu siklus. Enzim murni yang dipasarkan oleh berbagai produser

tidak mempunyai aktivitas 3'-5' endonuklease sebagai mekanisme perbaikan kesalahan. Untuk berbagai penerapan, hal ini tidak menjadi masalah. Tetapi, untuk pengurutan klon-klon yang didapatkan dari PCR atau bila memulai dengan cetakan sasaran yang sedikit, ini dapat menjadi masalah besar. Pengurutan produk PCR atau sejumlah klon yang didapatkan dari PCR dengan kontrol negatif yang sesuai dapat membantu mengatasi masalah ini.

Deoksiribonukleosida Trifosfat (dNTPS)

Dalam salah satu usaha untuk meningkatakan efisiensi PCR, kadang-kadang diupayakan untuk meningkatkan konsentrasi masing-masing dNTP (dA-, dC-, dG-, dan dTTP). Ini hendaknya dihindari. Konsentrasi masing-masing dNTP dengan 200 µM sudah cukup untuk mensintesis 12,5 µg DNA bila sebagian ari dNTP tersebut telah digunakan dalam sintesis untai baru. dNTP mengikat ion Mg²⁺, sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion ini yang diperlukan untuk reaksi polimerase. Disamping itu, konsentrasi dNTP yang tinggi (lebih dari 200 μM) meningkatkan tingkat kesalahan polimerase Taq.

g. Parameter dalam Siklus Termal

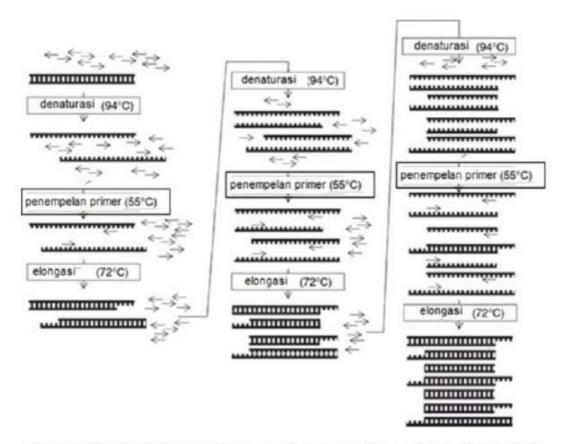
Setiap langkah dalam siklus memerlukan suatu waktu yang minimum untuk berdaya guna, sementara waktu yang terlalu banyak dapat tidak bermanfaat banyak dan dapat merusak polimerase-DNA. Bila waktu dalam masing-masing langkah tersebut dapat dikurangi, hasil yang lebih baik dapat diharapkan.

2. Pelaksanaan PCR

PCR merupakan teknik laboratorium yang relatif mudah, relatif lentur dan rentang penerapannya yang luas, sehingga sulit untuk memberikan contoh reaksi yang khas. Bahan awal dari PCR adalah DNA yang mengandung urutan yang akan diampliflikasi.

DNA tersebut tidak harus diisolasi. Jumlah DNA yang diperlukan juga relatif kecil.

Langkah berikutnya adalah pemanasan dari campuran reaksi pada 94°C selama beberapa menit. Pada temperatur ini, molekul NA untai ganda terpisah dengan sempurna, menjadi untai tunggal yang merupakan cetakan untuk primer dan Polimerase-DNA. Temperatur kemudian diturunkan agar oliganukleotida menempel pada posisi yang sesuai pada cetakan. Temperatur penempelan ("annealing") ini merupakan peubah kunci dalam menentukan kekhasan reaksi PCR. Temperatur dan waktu untuk tahap ini dapat sangat beragam sesuai dengan urutan yang ingin diamplifikasi. Penempelan primer menghasilkan posisi awal untuk aktifitas polimerase-DNA. Langkah berikutnya adalah peningkatan temperatur pada 72°C, yang merupakan temperatur optimum dari enzim polimerase-DNA Taq. Kondisi ini dipertahankan beberapa menit untuk penyelesaian sintesis DNA.



Gambar 4.4 Prinsip PCR (polymerase chain reaction). Langkah 1 (denaturasi):
DNA cetakan dipanaskan sampai 94°C (201°F) dan untai DNA dipisah
menjadi dua. Langkah 2 (penempelan primer): temperatur diturunkan untuk
menempelkan primer. Langkah 3 (pemanjangan): temperatur dinaikkan untuk
mengoptimalkan fungsi polimerase dalam mensintesis untai yang kedua. Pada
akhir siklus, jumlah DNA menjadi dua kali. (Sumber: Mulhardt, 2007)

Setelah satu siklus berakhir, temperatur ditingkatkan lagi sampai 94°C selama beberapa puluh detik, sehingga DNA untai ganda yang pendek (untai aval dan untai baru) terpisah. Untai tunggal tersebut kemudian berfungsi sebagai cetakan untuk siklus sintesis DNA berikutnya. Satu siklus, yang terdiri dari pemanasan untuk pemisahan untai, penempelan primer, dan sintesis oleh polimerase-DNA, diulang sampai 30 - 40 kali.

RANGKUMAN

- Replikasi adalah peristiwa penggandaan DNA yang terjadi pada semua sel hidup.
- Ada tiga model replikasi yang dikenal yaitu konservatif, semi konservatif, dan dispersif. Model replikasi yang diakui adalah model semikonservatif yang dibuktikan dengan eksperimen Meselson-Stahl.
- Enzim yang terlibat pada proses replikasi adalah helikase, DNA polimerase I dan III, DNA primase, dan ligase. Untuk embuka supercoiling dibutuhkan DNA girase.
- Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode enzimatis untuk me-lipatgandakan suatu sekuen nukleotida secara eksponensial dengan cara in vitro.
- Komponen PCR adalah primer, larutan penyangga, kation, DNA polimerase.
- 6. Tahapan PCR yaitu denaturasi, annealing, dan elongasi.

EVALUASI

- 1. Veritakan perbedaan dari ketiga model replikasi!
- 2. Mengapa model replikasi yang dipercaya sekarang adalah semikonservatif?
- Sebutkan dan jelaskan fungsi 3 enzim yang berperan dalam proses replikasi?
- 4. Mengapa fragmen Okazaki terbentuk?
- Bagaimana proses replikasi pada lagging strand?
- 6. Faktor apa saja yang membuat ketidakberhasilan proses PCR?

REFLEKSI BELAJAR

Setelah mempelajari materi ini,

1. Tuliskan hal baru apa saja yang Saudara peroleh!

- Bagian mana dari materi ini yang sulit Saudara pahami?
- 3. Apa saja upaya belajar Saudara pada materi ini?
- 4. Apa saja manfaat/ dampak yang Saudara peroleh setelah mempelajari materi ini?

DAFTAR RUJUKAN

- Gardner, E.J., dkk. 1991. Principle of Genetic 8th Edition. New York: Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: John Wiley and Sons Inc.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., Suzuki, D.T., & Miller, J.H. 2007. An Introduction to Genetic 9th Edition. W. H. Freeman and Company.
- Irawan, B. 2008. Genetika Molekuler. Surabaya: Airlangga University Press.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A. 2010. Essentials of Genetics 7th Edition. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L., Darnell, J. 2003. Molecular Cell Biology 5th Edition. New York: Freeman, W. H. & Company
- Lowe, T., Sharefkin, J., Yang, S. Q. & Dieffenbach, C. W. 1990. A Computer Program for Selection of Oligonucleotide Primers for Polymerase Chain Reactions. Nucl. Acids Res, 18: 1757-1761.
- Tamarin, R.H. 2001. Principles of Genetics 7th Edition. The McGraw-Hill Companies

64	GENETIKA PRINSIP DASAR BERBASIS PENELITIAN DI PERGURUAN TINGGI

BAGIAN V EKSPRESI MATERI GENETIK

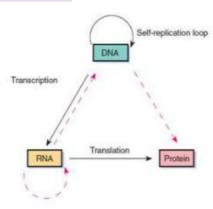
Indikator Capaian Pembelajaran

- Mahasiswa dapat menjelaskan aliran informasi genetik
- Mahasiswa dapat menjelaskan enzim yang berperan dalam proses transkripsi pada prokariot dan eukariot
- Mahasiswa dapat menjelaskan proses transkripsi pada prokariotik dan eukariotik
- Mahasiswa dapat membedakan proses transkripsi pada prokariotik dan eukariotik
- Mahasiswa dapat menjelaskan proses modifikasi pasca transkripsi untuk pemprosesan tRNA, rRNA, dan mRNA eukariotik
- Mahasiswa dapat menjelaskan proses translasi pada prokariotik dan eukariotik
- 7. Mahasiswa dapat membedakan proses translasi pada prokariotik dan eukariotik
- 8. Mahasiswa dapat menjelaskan kode genetika
- 9. Mahasiswa dapat menjelaskan hipotesis wooble

A. Pendahuluan

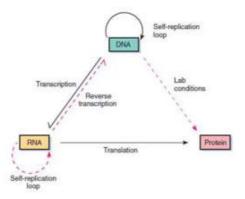
Gen merupakan faktor pengontrol terhadap reaksi biokimia (metabolisme) pada makhluk hidup, baik seluler ataupun aseluler. Reaksi biokimia adalah reaksi kimia yang terjadi dalam tubuh makhluk hidup dengan bantuan enzim. Menurut Gardner et al, (1991) terdapat satu atau lebih gen yang berperan dalam pembentukan tiap enzim. Dalam biologi molekuler terdapat dogma sentral yang meringkas pola perjalanan ekspresi gen hingga

membentuk enzim (protein). Dogma sentral yang dikemukakan oleh Crick pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Model Dogma Sentral Mula-mula (Tamarin, 2001)

Namun dengan pengetahuan yang terus berkembang, ternyata diketahui bentuk-bentuk lain dari aliran informasi genetika, yakni adanya fenomena transkripsi balik maupun replikasi RNA. Maka model central dogma pun mengalami penyempurnaan (Gambar 5.2). Meskipun demikian, tahapan transkripsi tetap memainkan peranan yang penting dalam ekspresi gen dan pengetahuan mengenai hal ini mutlak diperlukan dalam memahami bagaimana kontrol gen terhadap metabolisme dan selanjutnya pada fenotip individu makhluk hidup.



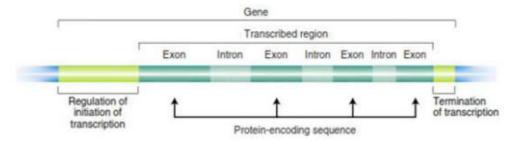
Gambar 5.2 Model Dogma Sentral yang telah mengalami penyempurnaan (Tamarin, 2001)

Transkripsi

Kata transkripsi berasal dari bahasa Inggris transcription atau bahasa latin transcriptio yang berarti penyalinan atau perekaman. Secara fungsional, transkripsi diartikan sebagai transfer informasi genetik yang terdapat dalam urut-urutan nukleotida DNA menuju ke urut-urutan nukleotida RNA atau penyalinan/ perekaman informasi genetik yang ada pada DNA (berupa urutan nukleotida) yang menghasilkan salinan atau rekaman berupa urutan nukleotida RNA dan menggunakan DNA sebagai template (cetakannya) (Corebima, 2008).

Gen terdapat pada untai DNA. Struktur DNA adalah untai ganda. Namun, transkripsi terjadi hanya pada satu untaian DNA saja yaitu untai sense (sense strand). Gen yang berbeda mungkin memiliki untai sense yang berbeda pula. Artinya untai mana yang dibaca sebagai sense akan berbeda untuk gen-gen yang berbeda (Gardner et al, 1991; Griffith et al, 2007).

Gen yang lengkap terdiri dari 3 bagian utama yaitu daerah pengendali (regulatory region) yang disebut promoter yang terletak pada ujung 5', bagian struktural gen yang berisi urutan DNA yang akan ditranskripsikan pada eukariotik, daerah ini terdiri dari intron dan ekson, dan bagian terminator yang terletak di hilir (downstream) daerah struktural (Gambar 5.3).



Gambar 5.3 Struktur gen pada eukariot (berikut contoh pada gambar hanya 3 intron dan 4 ekson) (Sumber: Griffith et al, 2007).

Gen struktural (pengkode protein) pada eukariotik memiliki urutan ekson dan intron, atau hanya intron saja (Gambar 5.3). Hal ini berbeda dari prokariotik karena tidak memiliki susunan intron, sedangkan beberapa gen virus, seperti virus T4 memiliki intron). Hasil transkripsi urutan ekson akan mennjadi bagian mRNA dan ditranslasikan menjadi protein, sedangkan hasil urutan intron akan dipisahkan dan tidak menjadi bagian mRNA sehingga tidak ditranslasikan. Jumlah intron pada organisme eukariotik bervariasi namun terdapat kecenderungan semakin tinggi tingkatan makhluk hidum eukariotik semakin banyak intronnya (Corebima, 2008).

Dalam proses transkripsi, DNA akan diterjemahkan menjadi bentuk RNA. Ada 3 macam RNA hasil transkripsi DNA, yaitu mRNA, tRNA dan rRNA. Molegul tRNA dan rRNA nantinya tidak diproses lebih lanjut pada tahap translasi, melainkan tetap dalam bentuk RNA karena molekul yang digunakan adalah RNA itu sendiri (Yuwono, 2008). Sedangkan mRNA akan diproses pada tahap translasi yaitu penerjemahan kodon menjadi asam amino.

Tabel 5.1 Aktivitas tiga macam RNA polymerase pada sel-sel makhluk hidup eukariotik

RNA Polymerase	Tipe gen yang ditanskripsikan	Proporsi seluruh aktivitas transkripsi (%)	Letak dalam sel	Sensitivitas Terhadap Amanita phalloides
1	Gen-gen rRNA (28S, 18S, dan 5S)	60	Nukleolus	Tidak sensitif
11	Terutama gen-gen yang mengkode protein, atau secara rinci: hnRNA, mRNA	10	Nukleoplasma	Sangat sensitif
III	Gen-gen tRNA, gen-gen rRNA 5S, dan beberapa snRNA*	10	Nukleoplasma	Cukup sensitif

Catatan: snRNA = small nuclear RNA

(diadaptasi dari Brown, 1989 dan Russel, 1994 oleh Corebima, 2008)

Beberapa komponen yang terlibat dalam proses transkripsi adalah (1) urutan DNA yang akan ditranskripsi, (2) enzim RNA polimerase, (3) faktor-faktor transkripsi, (4) prekursor untuk sintesis RNA (Yuwono, 2008). Enzim RNA polimerase atau RNA transcriptase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi polimerisasi nukleotida pada RNA. Pada E. coli, (prokariotik) gennya ditranskripsi menggunakan satu tipe RNA polimerase (Corebima, 2008) sedangkan pada eukariot, terdapat tiga tipe RNA polimerase, yaitu RNA polimerase I, RNA polimerase II dan RNA polimerase III. Terdapat perbedaan RNA polimerase berdasarkan tipe gen yang ditranskripsikan dan proporsi seluruh aktivitas transkripsi (Tabel 5.1).

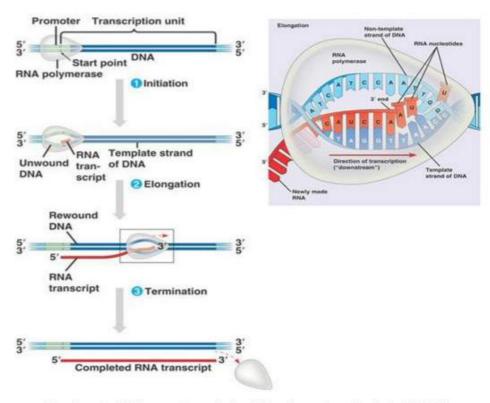
RNA polimerase (holoenzyme) prokariotik terdiri dari 5 unit polipeptida. 4 subunit berupa core enzyme dan satu subunit σ (sigma). Core enzyme terdiri dari 2α , β , dan β' . Subunit β dan β' berperan pada proses enzimatis. Subunit α berperan untuk perakitan dan mengenali promoter (Clark, 2005). Selain enzim RNA polimerase untuk polimerisasi RNA diperlukan pula protein yang dikontrol oleh gen Nus A (protein Nus A) serta protein Q (rho). RNA polimerase pada sel eukariotik terdiri dari beberapa sub unit, yaitu dua sub unit besar dan sekurang-kurangnya empat sub unit kecil. Dinyatakan lebih lanjut temuan yang ditangkap pada berbagai kelompok menunjukkan bahwa sub unit-sub unit dari sesuatu tipe RNA polimerase (I, II dan III) dikonservasi selama proses evolusi, karena ukuran dan aktivitasnya sangat mirip sebagaimana yang ditemukan pada khamir hingga manusia. Pengetahuan untuk RNA polimerase di organisme eukariotik masih sedikit karena sedikitnya mutan RNA polimerase yang ditemukan pada makhluk hidup eukariotik, dan kecilnya volume RNA polimerase, misalnya pada sel thymus sapi, RNA polimerase hanyalah sejumlah 0,05 persen dari keseluruhan protein, sedangkan

pada *E coli* jumlahnya mencapai 1 persen dari keseluruhan protein sel sehingga menyulitkan upaya pemurnian RNA polimerase. Pada organel mitokondria dan kloroplas terdapat RNA polimerase yang berbeda dan mengkatalisis transkripsi gen di masing-masing organel (Corebima, 2008).

1. Transkripsi pada Prokariotik

Transkripsi berlangsung dalam tiga tahap, yaitu: tahap inisiasi, elongasi dan terminasi (Corebima, 2008; Campbell et al., 2008). Gambaran proses transkripsi dapat dilihat pada Gambar 5.4. Tetapi menurut Yuwono (2008) transkripsi terjadi dalam 4 tahap, yaitu tahap pengikatan enzim RNA polymerase, inisiasi, elongasi dan terminasi.

Pada umumnya, gen yang mengkode protein pada prokariot adalah gen dengan kopi tunggal (single copy), sedangkan gen yang mengkode tRNA dan rRNA berupa gen dengan jumlah kopi banyak (ggultiple copies). Organisasi gen dalam organisme prokariot disebut operon. Suatu operon adalah organisasi beberapa gen struktural yang ekspresinya dikendalikan oleh satu promoter yang sama. Contohnya adalah lac operon, operon yang mengendalikan kemampuan metabalisme pada E. coli. Terdapat 3 macam gen dalam lac operon, vaitu gen Z (mengkode β-galaktosidase), gen Y (mengkode permease), dan gen A (mengkode trans-asetilase). Masing-masing gen struktural memiliki kodon inisiasi awal dan kodon terminasi, tetapi ekspresinya dikendalikan oleh satu promoter yang sama. Pada saat transkripsi, terbentuk 1 mRNA yang membawa kodon untuk 3 macam polipeptida yang berbeda (polisistronik). Masing-masing polipeptida akan ditranslasi secara independen dari satu untaian mRNA yang sama (Yuwono, 2008).



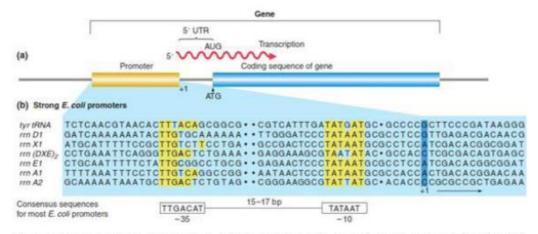
Gambar 5.4 Tahapan transkripsi (Sumber: Campbell et al, 2008)

Ekspresi ketiga gen diatur oleh promoter yang sama. Pada daerah promoter terdapat daerah yang disebut operator. Operator berfungsi sebagai penempelan protein represor yang dikode oleh gen i. Aktivitas promoter diatur oleh gen represor yang mengkode protein represor. Pada organisme prokariot, proses transkripsi dapat diringkas dengan menggunakan E. coli sebagai model.

Tahap Inisiasi

Tahap ini berupa pengenalan holoenzyme (RNA polimerase) pada tapak awal inisiasi (promoter). Promoter adalah urutan DNA spesifik yang berperan dalam mengendalikan transkripsi gen struktural (Yuwono, 2008) dan terletak mengawali (upstream) gen atau kelompok gen yang akan ditranskripsi (Gambar

5.5). Pengenalan promotor ini berlangsung melalui pelekatan/ pengikatan holoenzyme (RNA polimerase) pada posisi promoter. Bagian RNA polimerase yang mengenali promoter adalah subunit σ (sigma) (Corebima, 2008).



Gambar 5.5 Sekuen Promoter. (a) Promoter terletak di "hulu" (menuju 5') dari titik inisiasi dan sekuen gen. (b) promoter memiliki daerah dengan urutan yang sama, seperti ditunjukkan oleh warna kuning pada tujuh rangkaian promoter yang berbeda pada E. coli. Urutan konsensus untuk semua promoter E. coli ada di bagian bawah (Griffith et al., 2007)

Semua promoter pada prokariot mempunyai urut-urutan nukleotida yang sama atau sangat mirip (Gambar 5.5). Pada E. coli diketahui ada dua macam urut-urutan promoter yaitu 5'-TTGACA-3' (-35box) dan 5'-TATAAT-3' (-10 box atau Pribnow box). -10 menunjuk pada lokasi box tersebut terdapat berkaitan dengan posisi awal transkripsi. Urut-urutan promoter sebagai 5'-TTGACA-3' dan 5'-TATAAT-3' ini disebut juga sebagai "consensus sequence" (Corebima, 2008).

Pada awal proses pengikatan RNA polimerase dengan promoter disebut sebagai "kompleks promoter yang tertutup" atau closed promoter complex. Dalam bentuk closed promoter complex, enzim polimerase menutupi sekitar 60 bp (base pairs) dari heliks ganda, bermula dari posisi di depan (upstream) -35 box menuju ke

arah -10 box. Diduga holoenzyme RNA polimerase secara khusus mengenali -35 box sebagai tapak pengikatan DNA, meskipun kesimpulan ini masih kontroversial. Akan tetapi dinyatakan lagi, bahwa -10 box adalah daerah yang jelas-jelas merupakan tempat pemutusan ikatan hidrogen antara basa maupun tempat pertama terbukanya lilitan heliks ganda DNA (Corebima, 2008).

Setelah RNA polimerase berlekatan dengan bagian promoter, selanjutnya akan membentuk formasi open promoter complex, yakni struktur yang terbentuk akibat pemutusan ikatan hidrogen maupun terbukanya lilitan heliks. Dengan terbentuknya open promoter complex tersebut memungkinkan terjadinya proses polimerisasi RNA, setelah terlebih dahulu berlangsung polimerisasi pertama yang menghadirkan dua nukleotida yang pertama.

Tahap Elongasi

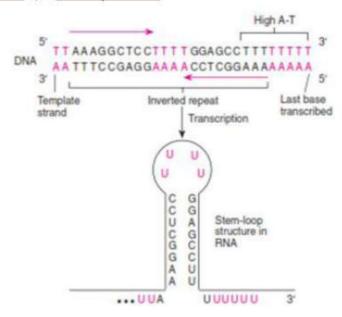
Tahap elongasi terjadi setelah tahap inisiasi berakhir. Selama tahap elongasi, RNA polimerasi bergerak sepanjang DNA, memutuskan ikatan hidrogen dan membuka lilitan heliks ganda di depannya, serta membuat lilitan heliks ganda DNA yang talah ditranskripsi (Griffith et al, 2007). RNA polimerase juga menghubungkan ribonukleotida-ribonukleotida ke ujung 3 pada molekul RNA yang sedang diterjemahkan, sesuai untai template DNA. Dengan demikian terlihat polimerisasi nukleotida berlangsung dalam arah 5' - 3' (Corebima, 2008).

Polimerisasi RNA pada tahap elongasi terjadi pada daerah DNA yang terbatas. Selama berlangsungnya polimerisasi, bagian molekul RNA yang telah terbentuk, secara bertahap terlepas ikatannya dari untaian DNA pengkode, sehingga memungkinkan segera terbentuknya kembali heliks ganda seperti semula. Dalam hubungan ini bagian DNA yang terbuka, atau yang disebut "gelembung transkripsi" hanya mengandung pasangan basa RNA-DNA sejumlah antara 12 sampai 17 (Corebima, 2008).

Selama tahap elongasi, laju polimerisasi nukleotida RNA tidak konstan (Corebima, 2008). Hal ini berkaitan dengan gerakan enzim RNA polimerase (core enzyme) sepanjang molekul DNA. Dinyatakan bahwa kadang-kadang enzim bergerak lambat tetapi kemudian bergerak cepat atau bahkan bergerak balik dalam rentang jarak pendek tertentu. Proses polimerisasi nukleotida RNA dalam berbagai laju tersebut terus berlangsung hingga ke tahap terminasi.

c. Tahap Terminasi

Terminasi terjadi pada posisi tertentu yang seguai, tidak jauh dari ujung akhir gen. Menurut Yuwono (2008), proses terminasi transkripsi pada prokariot dapat dikelompokkan menjadi 2 kelas, yaitu: (1) terminasi yang ditentukan oleh urutan nukleotida tertentu (*rho-independent*) dan (2) terminasi yang diatur oleh suatu protein (faktor q) (*rho-dependent*).



Gambar 5.6 Urutan basa pengulangan-terbalik yang menandai daerah terminator DNA. Struktur loop batang dapat terjadi pada RNA karena urutan komplementer. Pada 3' terdapat ekor poli-U menunjukkan terminator rho-independent (Sumber: Tamarin, 2001)

Pada kelas pertama, terminasi tidak diperantarai oleh suatu urut-urutan nukleotida spesifik, melainkan diperantarai oleh suatu sinyal yang lebih komplek. Pada E. coli sinyal terminasi gen-gen sangat beragam urutan nukleotidanya, tetapi seluruhnya memiliki suatu sifat yang sama, yaitu sinyal-sinyal itu merupakan palindrom-palindrom yang komplementer. Palindrom adalah perpasangan basa yang dapat terjadi tidak hanya antar dua untaian heliks ganda, tetapi juga pada tiap untaian, bahkan juga pada RNA hasil transkripsinya; dan efek dari perpasangan basa di dalam sesuatu untai adalah terbentuknya suatu struktur menyilang (cruciform structure) pada DNA untai ganda, atau pada RNA untai tunggal berupa terbentuknya suatu struktur melingkar seperti tali jerat atau stem-loop structure (Gambar 5.6) (Corebima, 2008; Yuwono, 2008).

Efek palindrom komplementer lebih mungkin terjadi pada molekul RNA dibanding pada molekul DNA. Karena molekul DNA relatif lebih stabil akibat ikatan antara basa-basa komplementer di kedua untai ganda. Karenanya terbentuk struktur melingkar seperti tali jerat (stem-loop structure) pada RNA hasil transkripsi. Corebima (2008) menyatakan bahwa struktur itu dipandang mempunyai peranan penting pada terminasi. Mutasi pada palindrom komplementer ternyata mempengaruhi kemampuan transkrip membentuk struktur melingkar seperti tali jerat; dan keadaan tersebut terbukti mencegah terminasi.

Pada kelas kedua, pengenalan sinyal-sinyal terminasi lain dibutuhkan adanya suatu polipeptida tambahan, yang disebut sebagai faktor o (rho). Faktor o ini membentuk suatu asosiasi temporer dengan core enzyme dari RNA polimerase.

2. Transkripsi pada Eukariotik

gen-gen prokariotik, gen-gen eukariotik memiliki promoter dan terminator yang memegang perangan penting menggerakkan proses transkripsi dan memiliki tiga tahap transkripsi, yaitu inisiasi, elongasi dan terminasi. Namun perbedaannya dengan prokariotik adalah RNA polimerase tidak melekat pada DNA selama proses inisiasi. Inisiasi transkripsi diperantarai oleh faktor-faktor transkripsi yang bersifat spesifik untuk tiap macam RNA polimerase. Segera setelah inisiasi, RNA polimerase langsung berikatan pada DNA. Ketiga macam RNA polimerase pada eukariot membutuhkan prakondisi yang berbeda untuk terlibat dalam transkripsi (Corebima, 2008). Tiga macam RNA polimerase mengenali urutan promoter yang berbeda; dan membutuhkan perangkat protein yang berbeda (disebut "faktor transkripsi" atau "transcription factor").

a. Transkripsi gen-gen pengkode protein yang dikatalisis oleh RNA polimerase II

RNA polimerase II mentranskripsi gen yang mengkode protein, menghasilkan molekul mRNA dan snRNA. Suatu gen pengkode protein dapat memiliki sejumlah elemen regulator transkripsi yang dikatalisis oleh RNA polimerase II. Elemen regulator dapat terletak di bagian hulu atau hilir tapak inisiasi RNA pada DNA. Gen dapat memiliki kombinasi tertentu elemen regulator positif (pengaktivasi transkripsi) dan elemen regulator negatif (penghalang transkripsi) yang letaknya berdekatan dengan gen tersebut. Elemen-elemen regulator adalah urut-urutan DNA yang merupakan tapak pelekatan/pengikatan bagi faktor transkripsi spesifik maupun faktor regulator (Corebima, 2008). Yang dimaksud dengan faktor transkripsi adalah protein yang terlibat pada aktivasi atau represi transkripsi.

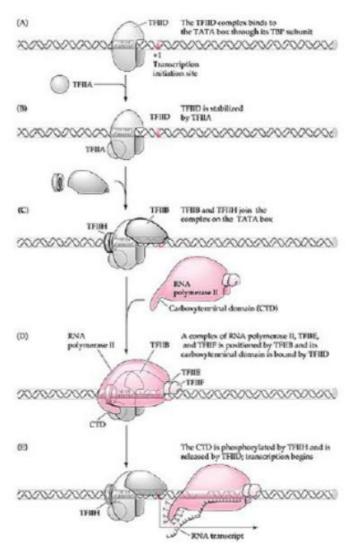
Pada umumnya elemen-elemen regulator terletak dalam jarak beberapa ratus pasang basa dari tapak inisisasi transkripsi, biasanya ke arah hulu. Namun demikian beberapa elemen regulator terletak pada jarak 1000 hingga 30.000 pasang basa dari tapak inisiasi. Pada saat ini elemen regulator yang letaknya berdekatan langsung dengan tapak inisiasi transkripsi disebut promoter; sedangkan yang letaknya jauh disebut enhancer (terkait dengan elemen enhancer dikenal juga elemen silencer yang kerjanya berlawanan dengan elemen enhancer, yaitu menghalang transkripsi).

Peranan promoter adalah untuk menentukan apakah suatu transkripsi dapat terjadi; sedangkan elemen enhancer dibutuhkan untuk menjamin transkripsi gen secara maksimal. Urutan nukleotida promoter eukariotik berbeda dengan urutan nukleotida promoter prokariotik. Promoter yang dikenali RNA polimerase II adalah -75 box 5'-GGNNCAATCT-3' dan -25 box 5'-TATAAAT-3'. Urutan nukleotida -25box disebut sebagai Goldberg-Hogness box (Corebima, 2008). Urutan -25 box berada upstream gen, sedangkan urutan -75 box seringkali tidak ada. Posisi urutan -25 box bervariasi, antara 20-30 sebelum tapak inisiasi (Gardner dkk, 1991). Selain promoter di atas, Corebima (2008) menyatakan adanya promoter GC (5'-GGGCGG-3') yang terletak -60 dan -100 sebelum tapak inisiasi dan CAAT (5'GGCCAATCT-3') yang terletak -80 sebelum tapak inisiasi.

RNA polimerase tidak mampu mengenali promoternya tanpa adanya faktor transkripsi (transcription factor = TF). Penamaan faktor transkripsi disesuaikan dengan macam RNA polimerase yang diperantarainya. TF II merupakan faktor transkripsi untuk RNA polimerase II. Beberapa faktor transkripsi melekat pada urutan spesifik promoter, sedangkan lainnya melekat pada RNA polimerase II. Faktor kunci adalah TF IID karena melekat langsung pada promoter TATA (faktor "TATA"). TF IID juga melekat pada

TF IIA (yang tidak berlekatan langsung dengan molekul DNA) dan berikatan pula dengan "protein pengikat DNA hulu" (upstream DNA binding protein) yang berikatan pada urutan enhancer. Perlekatan yang terakhir inilah yang mengakibatkan struktur lengkung (lipat) antara promoter dengan enhancer. Fenomena ini digunakan untuk menerangkan mengapa enhancer dapat bekerja dari suatu jarak yang jauh dari promoter.

Saat TF IID melekat pada promoter TATA, RNA polymerase II dapat ikut melekat bersama TF IIB, TF IIF dan TF IIE yang membentuk "kompleks inisiasi transkripsi" (Corebima, 2008). Ketiga faktor tersebut berfungsi untuk merangsang transkripsi dan mempermudah insiasi transkripsi dengan tepat. Proses transkripsi yang melibatkan RNA polimerase II ini dapat diamati lebih lanjut pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7 Proses Transkripsi yang melibatkan RNA polimerase II (Sumber: Gilbert, 2003)

Saat terjadi transkripsi dan berlangsung elongasi, terjadi perubahan distribusi faktor transkripsi. TF IIB dan TF IIE terpisah dari RNA polimerase, sedangkan TF IIF masih berikatan. Selama elongasi, TF IIS ikut melekat pada RNA polimerase. Selama proses transkripsi, TF IID melekat terus pada TATA box, karenanya transkripsi dapat terus berlangsung hingga muncul sinyal represi transkripsi.

b. Transkripsi yang dikatalisasi RNA polymerase III

RNA polimerase III berfungsi mengkatalisis transkripsi gengen untuk menghasilkan tRNA, 5S rRNA, serta beberapa snRNA. Kajian pada bagian ini hanya mencakup transkripsi gen-gen 5S rRNA, serta gen-gen tRNA. Secara umum jumlah gen tRNA pada organisme eukariotik jauh lebih banyak daripada yang dijumpai dalam makhluk hidup prokariotik (Corebima, 2008). Pada genom khamir ditemukan sekitar 400 gen tRNA; bahkan pada makhluk hidup eukariotik yang lebih tinggi perulangan (redundancy) gen tRNA cenderung lebih banyak dijumpai. Dalam hal ini dinyatakan bahwa Xenopus laevis memiliki lebih dari 200 kopi tiap gen per genom.

Beberapa gen tRNA berdiri sendiri, beberapa lain berkelompok, baik membentuk kelompok gen "redundan" ataupun "bukan redundan" yang berurutan langsung. Di dalam gen tersebut tedapat 1 kopi tRNA sedangkan gen lain bersifat redundan. Pada transkripsi tRNA juga ditemukan adanya intron yang panjangnya 10-60 bp. Intron terletak antara nukleotida pertama dan kedua dari arah ujung 3' menuju antikodon, bahkan seringkali urutan transkripsi intron berpsangan dengan antikodon (pada tahap molekul pre-tRNA). Urutan intron ini hanya ditemukan pada gen molekul tRNA untuk asam amino tirosin, fenilalanin, triptofan, lisin, prolin, serin, leusin dan isoleusin.

Pada kebanya organisme eukariotik, gen 5S rRNA dapat terletak pada satu lokasi yang sama, atau pada lokasi yang berbeda dari gen rRNA lainnya. Pada manusia, gen 5S rRNA berkelompok terpusat, sedangkan pada Xenopus gen tersebar diseluruh genom dalam kelompok. Pada Khamir dan jamur lendir, gen RNAr5S bercampur dengan perangkat gen rRNA yang lain. Gen 5S rRNA ini mengkode 5S rRNA seukuran 120 nukleotida (Corebima, 2008). 5S rRNA merupakan penyusun subunit ribosom besar.

Posisi promoter gen 5S rRNA berada di dalam gen itu sendiri. Posisi yang semacam itu disebut ICR (Internal Control Region). Pelaksanaan posisi promoter gen 5S rRNA dan gen tRNA dilakukan dengan cara melakukan delesi tumpang tindih atas urutan nukleotida ke arah hulu dan hilir gen di samping di dalam gen itu sendiri. Peniadaan ini secara spesifik mengurangi transkripsi (Corebima, 2008).

Promoter internal (ICR) melalui telaah perubahan pasangan basa secara individual memperlihatkan adanya dua daerah fungsional yang disebut box A dan box C (Corebima, 2008). Promoter internal dapat berfungsi menginisiasi transkripsi apabila terdapat faktor transkripsi untuk RNA polimerase III, yaitu TF IIIA, TF IIIB dan TF IIIC. Untuk transkripsi 5S rRNA diperlukan ketiga faktor, namun dalam transkripsi tRNA hanya diperlukan TF IIIB dan TF IIIC. Pola kerjanya adalah TF IIIA berikatan dengan box C ICR dan mengoptimasi perlekatan TF IIIC pada box A. TF III B berikatan dengan kedua macam TF (TF IIIA dan TF IIIC) dan berfungsi sebagai suatu faktor inisiasi transkripsi atau transcription initiation factor (Corebima, 2008). RNA polymerase III mulai mengkatalisis transkripsi 50 bp ke arah hulu dari awal box A.

Terminasi transkripsi kedua tipe gen (gen untuk 5S rRNA dan gen untuk tRNA) berkaitan dengan urutan nukleotida pada ujung 3' gen tersebut. Untuk gen 5S rRNA, pada untai antisense terdapat sederetan nukleotida berbasa T berjumlah 4 atau lebih, yang dikelilingi oleh urutan nukleotida yang kaya akan GC. Sedangkan untuk DNAt, daerah terminasinya adalah adanya sederetan nukleotida berbasa T. Hal ini didapat dari penelaahan penambahan urutan nukleotida berbasa T sejumlah 4-6 kedalam gen, ternyata menghentikan transkripsi pada daerah tersebut.

Selain ICR, menurut Corebima (2008), terdapat pula urutan nukleotida lain yang berada di luar gen pengkode, bisa dibagian hilir atau hulu, yang mempengaruhi aktivitas transkripsi. Mutasi atau delesi yang melibatkan urutan tersebut biasanya mengurangi aktivitas transkripsi atau pada beberapa kasus meniadakannya.

c. Transkripsi yang dikatalisasi RNA polimerase I

Urut-urutan nukleotida DNA untuk 18S, 5,8S maupun 28S rRNA biasanya terletak berurutan di daerah nukleolus dalam inti, dan ditranskripsikan bersama menghasilkan satu molekul RNA precursor. Urut-urutan gen pada DNA membentuk suatu unit transkripsi (transcription unit). Pada organisme eukariotik, terdapat suatu deretan unit-unit transkripsi yang berjejer berurutan langsung (tandem), yang jumlahnya tergantung pada spesies makhluk hidup; dan setiap unit transkripsi ditranskripsikan oleh RNA polymerase menghasilkan suatu molekul prekusor rRNA (pre-rRNA). Lebih jelasnya, lihat Gambar 5.8.

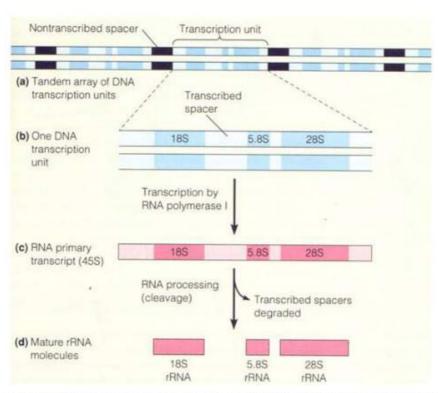
Tiap unit transkripsi dapat berulang banyak kali. Karenanya, terbentuk susunan gen RNAr yang berulang. Jumlah perulangan gen rRNA bervariasi antara berbagai spesies makhluk hidup eukariotik, berkisar 100 sampai dengan 1000 kali. Misalnya pada khamir (140 unit transkripsi), Drosophila (260 unit transkripsi) dan pada sel hela (1250 unit transkripsi).

Molekul prekusor rRNA mengandung 3 urutan rRNA serta urutan penyelanya. Urutan penyela ini disebut sebagai *spacer sequences* (Corebima, 2008). Spacer sequences terdiri dari 2 macam, yaitu ETS (*External transcribed spacer*) dan ITS (*internal transcribed spacer*). Urutan penyela nantinya akan disingkarkan dari prekursor rRNA. Variasi ukuran panjang penyela berkaitan dengan variasi panjang unit transkripsi rDNA. Antar unit-unit transkripsi terdapat NTS (*non transcribed spacer*) yang terletak pada ujung 5' maupun

3' tiap unit transkripsi. Urut-urutan penting yang mengontrol transkripsi rDNA berada di dalam daerah NTS. Ukuran panjang NTS juga bervariasi antara spesies satu dan lainnya, misalnya katak (3-9 kb) sedangkan manusia (sekitar 90 kb).

Intron juga ditemukan pada gen rRNA organisme eukariotik tingkat rendah seperti Physarium, Tetrahymena dan Drosophila. Hasil transkripsi intron akan dipotong dari prekursor rRNA untuk menghasilkan rRNA yang siap pakai. RNA polimerase I hanya mengkatalisis transkripsi dari unit transkripsi prekursor rRNA, sedangkan RNA polimerase II dan III dapat mengkatalisis transkripsi aneka ragam gen (Corebima, 2008).

Urutan promoter RNA polymerase I terletak di hulu tapak inisiasi transkripsi. Terdapat 2 daerah, yaitu (1) elemen promoter inti (core promoter element) yang terlipat menutupi titik awal transkripsi membentang dari posisi +7 hingga -45; dan (2) elemen kontrol hulu (upstream control element) yang membentang dari posisi -107 hingga -186. Pembagian daerah promoter ini terjadi pada promoter rDNA manusia sedangkan pada kodok, daerah promoternya tidak terbagi dengan jelas, hanya membentang dari posisi +6 hingga -141. Urut-urutan promoter ini khas pada tiap spesies. RNA polimerase hanya dapat mengkatalisis transkripsi gen rRNA yang berasal dari spesies berkerabat dekat pada sistem transkripsi in vitro karena berkaitan dengan faktor transkripsi yang dibutuhkan untuk transkripsi rDNA.



Gambar 5.8 Unit transkripsi DNA r pada makhluk hidup yang tersusun berjejer berurutan langsung dan mengalami transkripsi (sumber: Anonim, tanpa tahun)

RNA polimerase I tidak melekat langsung pada promoter (seperti RNA polimerase II dan III). Yang berlekatan langsung pada promoter adalah faktor-faktor transkripsi (Corebima, 2008). Pelekatan faktor transkripsi pada promoter membentuk suatu kompleks dan RNA polimerase I melekat pda kompleks tersebut. Pada manusia ditemukan 2 faktor transkripsi, yaitu hUBF (human upstream binding factor atau faktor pengikatan/pelekatan hulu manusia) melekat langsung pada kedua daerah promoter rDNA manusia dan mengaktifkan transkripsi. Protein lain, SLI dibutuhkan untuk pengenalan promoter serta inisiasi transkripsi yang dikatalisis oleh RNA polimerase I. SLI tidak berlekatan langsung pada promoter, tetapi berinteraksi dengan promoter melalui interaksinya dengan kompleks hUBF-DNA. Apabila hUBF

dan SLI sudah melekat pada promoter, maka RNA polimerase I ikut melekat dan proses transkripsi mulai berlangsung (Corebima, 2008).

Terminasi prekursor rRNA bervariasi pada makhluk hidup. Pada Xenopus terdapat 2 tapak terminasi transkripsi yang penting, yaitu T2 dan T3. Tapak T2 berukuran 235 bp ke arah hilir dari ujung 3' urutan rDNA 28S, sedangkan tapak T3 berukuran 200 bp ke arah hulu tapak inisiasi transkripsi dari unit transkripsi rDNA berikutnya. Tapak T2 dan T3 sama-sama mengandung urutan identik seukuran tujuh nukleotida yaitu 5'-GACTTGC-3'. T2 merupakan tapak primer yang digunakan untuk mengakhiri transkripsi prekursor rRNA, sedangkan T3 merupakan tapak terminasi yang aman dari kegagalan (fail-safe termination site). Unit-unit transkripsi rDNA tersusun dalam suatu deretan berjejer, maka sistem terminasi yang aman dari kegagalan tersebut memungkinkan molekul RNA polimerase secara potensial mulai beraktivitas pada satu unit transkripsi dan diteruskan ke unit transkripsi berikutnya dalam deretan tersebut (Corebima, 2008).

C. Modifikasi Pasca Transkripsi

Pada dasarnya, hasil transkripsi dari gen pengkode protein (mRNA), tRNA maupun rRNA dan snRNA belum siap pakai, baik pada prokariotik maupun eukariotik. Kebanyakan RNA non ribosomal yang disintesis dalam nukleus terdiri dari molekul yang sangat besar. RNA ini merupakan bagian dari heterogenous nuclear RNA (hnRNA) dan disebut pre-mRNA.

RNA pada prokariotik siap pakai

Pada prokariot, RNA hasil transkripsi langsung berfungsi sebagai molekul mRNA yang akan ditranslasikan pada biosintesis protein (Corebima, 2008). Pada organisme prokariotik proses translasi dapat berlangsung ketika transkripsi belum sepenuhnya selesai. Hal ini disebut sebagai coupled transcription and translation atau transkripsi dan translasi berpasangan. Hal ini terjadi karena tidak ada membran inti yang memisahkan transkripsi dan translasi dan arah transkripsi maupun arah translasi sama-sama 5'à 3' (Gardner et al, 1991).

RNA pada eukariotik tidak siap pakai

Hasil transkripsi pada eukariotik tidak dapat langsung ditranslasikan. Kebanyakan, namun tidak semua, gen pada eukariot memiliki intron (intervening sequences) di antara ekson (expressed sequences). Gen yang tidak mengandung intron misalnya gen untuk histon dan interferon. Menurut Gardner et al. (1991) terdapat sekuen yang tetap pada semua ujung intron yaitu ekson-GT.....(intron)....AG-ekson. Dan hal ini yang diperkirakan bertanggungjawab pada proses splicing intron.

Splicing adalah peristiwa pengeluaran intron melalui proses pemotongan dan penggabungan kembali ekson (Gardner et al, 1991). Secara sederhana penyingkiran hasil transkripsi intron setelah lebih dahulu urut-urutan tersebut keluar, dan lengkungan keluar itu terputus oleh enzim nuklease.

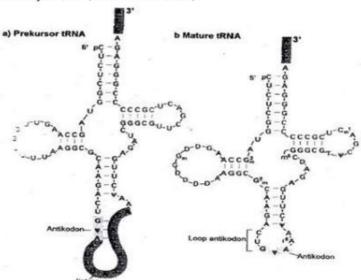
Pada Gardner et al. (1991) dijelaskan terdapat 3 tipe berbeda pada pemotongan intron RNA, yaitu:

- a. Pemotongan intron pada prekursor tRNA menggunakan endonuklease yang diikuti reaksi ligasi oleh aktivitas ligase
- b. Pemotongan intron pada prekursor rRNA secara autokatalitik dengan reaksi unik yang dimediasi oleh molekul RNA itu sendiri tanpa melibatkan aktivitas enzim
- c. Pemotongan intron hasil transkripsi nuclear pre-mRNA (hnRNA) melalui 2 tahapan reaksi yang dilakukan oleh kompleks partikel ribonucleoprotein yang dikenal sebagai spliceosome.

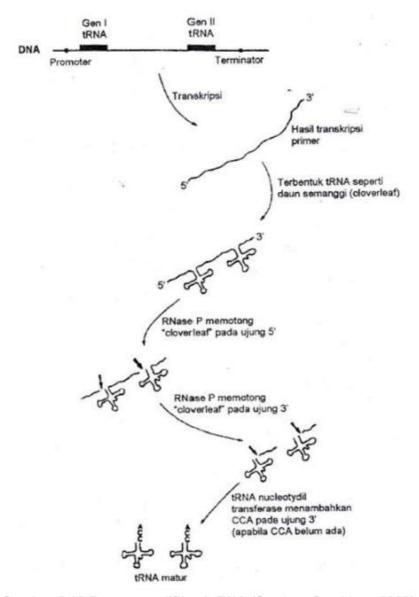
a. Pemrosesan pre-tRNA menjadi tRNA fungsional

Produk awal hasil transkripsi tRNA pada makhluk hidup prokariotik dan eukariotik disebut prekusor tRNA atau pre-tRNA. tRNA ini lebih panjang daripada tRNA siap pakai, memiliki urutan ujung kepala (*leader*) pada ujung 5' dan urutan ekor (*trailer*) pada ujung 3' (Gambar 5.9) (Corebima, 2008). Urutan kepala dan ekor disingkirkan selama proses pembentukan tRNA siap pakai, baik pada eukariotik maupun prokariotik. Proses ini berlangsung di dalam inti pada eukariotik. tRNA siap pakai berukuran sekitar 4S dan terdiri dari untai tunggal berisi 75-90 nukleotida. Urutan nukleotida bervariasi bergantung pada macam tRNA.

Proses modifikasi tRNA berlangsung melalui 3 tahapan, yaitu (1) penyingkiran urutan kepala (oleh enzim RNase P), ekor (oleh enzim Rnase Q/D), dan penyela (spacer), (2) penyingkiran hasil transkripsi intron (diputus oleh enzim endonuklease spesifik dan digabung oleh enzim ligase), dan (3) penambahan urutan nukleotida 5' CCA 3' pada ujung 3' dikatalisasi oleh enzim tRNA nucleotidyl transferase (Gambar 5.10).



Gambar 5.9 Prekusor tRNA (pre-tRNA) (a) dan mature tRNA (tRNA yang siap digunakan saat translasi) (Sumber: Corebima, 2008)



Gambar 5.10 Proses modifikasi tRNA (Sumber: Corebima, 2008)

Gardner et al. (1991) menyatakan proses penyingkiran intron tRNA ini telah dipelajari pada ragi. Proses pemotongan intron ini terjadi dalam 2 tahapan yaitu (1) enzim splicing endonuklease (tRNA endonuklease) yang terikat membran pukleus memotong di dua tempat pada ujung intron prekursor tRNA menghasilkan ujung 5'OH dan 2'-3' gugus fosfat siklik pada ujung 3', dan (2)

enzim splicing ligase (RNA ligase) menghubungkan kedua ujung tRNA melalui 4 tahapan yaitu: (1) penambahan gugus fosfat ke ujung 5'OH dengan bantuan kinase dan ATP; (2) gugus fosfat 5' diaktivasi melalui transfer gugus AMP ke ujung dari AMPligase intermediet; (3) 2'-3' fosfat siklik dibuka oleh aktivitas cyclic phosphodiesterase yang memproduksi 2' fosfat dan 3' hidroksil bebas; (4) ligasi akhir terjadi melalui penyerangan nukleofilik 3'OH bebas ke 5' fosfat dengan pelepasan AMP. Keempat reaksi ini dikatalisis oleh splicing ligase. Proses ini terjadi pada hampir semua eukariot, kecuali pada mamalia. Perbedaan proses terjadi pada langkah keempat yaitu menghubungkan 2'-3' ujung fosfat ke ujung 5'OH.

b. Pemrosesan pre-rRNA

Pada proses *splicing* rRNA, aktivitas *splicing* yang memisahkan intron dari prekursor rRNA adalah karena faktor intrinsik dalam molekul RNA itu sendiri. Proses ini disebut aktivitas autokatalitik atau self excission process. Proses ini juga ditemukan pada sejumlah besar rRNA, tRNA, dan prekursor mRNA pada mitokondria dan kloroplas (Gardner et al, 1991). Pada proses autokatalitik ini tidak diperlukan sumber energi eksternal dan sumber protein (enzim). Sebaliknya, melibatkan serial transfer ikatan phosphoester. Menurut Yuwono (2008), mekanisme pemotongan intron secara autokatalitik dibedakan menjadi 2, yaitu gen-gen yang mengandung intron grup I dan intron grup II

Pada intron grup I, proses splicing melibatkan penambahan nukleotida guanin pada ujung 5' intron (Yuwono, 2008). Atau oleh Gardner et al. (1991), reaksi ini membutuhkan nukleosida guanin atau nukleotida dengan gugus 3'OH bebas (GTP, GDP GMP atau guanosin) sebagai ko-faktor. Nukleotida guanin akan menyerang nukleotida adenin pada ujung 5' intron dan melepaskan ekson

1. Gugus OH pada ekson 1 menyerang ekson 2 dan melepaskan intron yang linier (Yuwono, 2008)

Pada intron grup II penyerangan dilakukan oleh adenin yang ada dalam intron sehingga terbentuk struktur lariat. Mekanisme splicing intron grup II mempunyai kemiripan dengan mekanisme splicing menggunakan spliceosome (pemrosesan mRNA). Hal ini memberikan gambaran adanya kemiripan fungsi antara snRNP (spliceosome) dengan gugus katalitik pada intron grup II. Dugaan lanjutan adalah intron pada mRNAS gen inti secara evolusioner berasal dari intron grup II yang ada pada bakteri.

Jadi, intron dipotong dengan transfer ikatan 2 phosphoester dan intron yang dipotong ini dilingkarkan menggunakan transfer ikatan phosphoester lainnya. Proses autokatalitik splicing ini terdapat intramolekuler secara alami, dan tidak bergantung pada konsentrasi. Lebih lanjut, prekursor RNA mampu membentuk pusat aktif dimana kofaktor guanosin 3'OH berikatan.

Pemrosesan pre-mRNA

Modifikasi pasca transkripsi pada mRNA eukariotik meliputi penyingkiran hasil transkripsi intron (splicing) dan modifikasi ujung mRNA hasil transkripsi (5' capping dan penambahan ekor poly A). Sedangkan menurut Gardner et al (1991) proses modifikasi pasca transkripsi terhadap mRNA berlangsung meliputi tahapan pemotongan prekursor mRNA (pre mRNA) menjadi molekul mRNA yang lebih kecil, penambahan 7-methyl guanosine (mRNA caps) pada ujung 5', penambahan ±200 sekuen adenylate nucleotida (poly A) pada ujung 3', pembentukan kompleks dengan protein tertentu.

5' Capping

Proses ini sebenarnya adalah penambahan nukleotida berbasa guanin (umumnya 7-methyl guanosine) pada nukleotida di ujung

5'. Penambahan tersebut terjadi melalui ikatan tak lazim antara 5' dan 5'. Terjadi pula proses penambahan 2 gugus CH3 pada dua nukleotida pertama dari untai RNA. Tahapan proses 5' capping adalah sebagai berikut: (1) Enzim polimerase II memulai transkripsi pada nukleotida yang memiliki basa tempat penambahan cap (tapak penutup atau cap site), (2) Bila hasil transkripsi mula-mula sepanjang 20-30 nukleotida, suatu struktur penutup (yang telah mengalami metilasi) ditambahkan pada ujung 5' hasil transkripsi tersebut. (3) Penutup (cap) merupakan tempat ujung 5' mRNA tempat berikatan dengan ribosom (Corebima, 2008).

Tudung mRNA menurut Yuwono (2008) memiliki 4 fungsi yaitu: (1) melindungi mRNA dari degradasi, (2) meningkatkan efisiensi translasi mRNA, (3) meningkatkan pengangkutan mRNA dari nukleus ke sitoplasma, dan (4) meningkatkan efisiensi proses splicing mRNA.

Penambahan Ekor Poly A

Pada ujung 3' mRNA eukariotik terjadi penambahan urutan nukleotida yang berjumlah 50-250 nukleotida berbasa adenin. Struktur ini dikenal sebagai ekor poly A. Penambahan ekor poly A ini terjadi pada mRNA semua spesies, kecuali pada mRNA protein kistron pada mamalia. Penambahan ekor poly A merupakan mekanisme yang pemberian sinyal yang menandakan ujung akhir dari mRNA eukariotik (Corebima, 2008).

Pada eukariot, tidak ditemukan nukleotida transkripsi spesifik (seperti protein o pada prokariotik), sehingga proses transkripsi akan berlangsung terus hingga mencapai ratusan bahkan ribuan nukleotida melalui tapak penambahan poly A. Pada suatu saat tertentu terjadi pemutusan pada tapak tersebut (dengan bantuan enzim endonuklease khas RNA) sehingga dihasilkan ujung 3'OH dan selanjutnya pada ujung itu ditambahkan ekor poly A (Corebima, 2008).

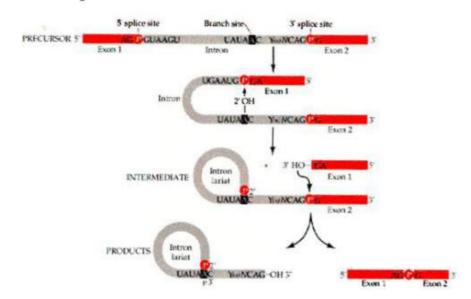
Pada posisi 10-30 nukleotida di hulu tapak poli A terdapat urutan AAUAAA yang bertanggungjawab menandai lokasi tapak poli A, selain urutan nukleotida lain di hilir tapak poli A yang juga ikut berperan. Penambahan ekor poli A dikatalisasi oleh enzim polymerase poly (A). Peranan ekor poly (A) berhubungan dengan stabilitas mRNA (Corebima, 2008). Hal ini diketahui dari percobaan mRNA protein globin yang masih memiliki ekor poly A normal, disuntikkan dalam oosit katak, akan tetap aktif ditranskripsikan selama jangka waktu yang cukup lama, sedangkan jika yang disuntikkan tanpa ekor poly (A), maka mRNA tersebut akan didegradasi.

Pemotongan intron

Proses pemotongan ini dilakukan oleh struktur kompleks RNA/ protein disebut *spliceosome*. Spliceosome adalah struktur/ kompleks penyambungan atau *splicing complex*. Spliceosome mirip dengan ribosom kecil; mengandung set molekul RNA kecil yang disebut snRNA dan set protein yang masih belum diketahui dengan jelas strukturnya. Spliceosome terdiri dari asosiasi beberapa snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particle) yang terikat pada mRNA prekursor. snRNP sendiri merupakan asosiasi antara snRNA (small nuclear RNA) dan protein. Ada 5 jenis snRNA yang terlibat sebagai komponen spliceosome yaitu U1, U2, U4, U5 dan U6 (snRNA U3 dilokalisasi dalam nukleolus dan kemungkinan terlibat dalam pembentukan ribosom). snRNA tidak terdapat bagian molekul RNA bebas melainkan berada pada snRNP.

Salah satu kemungkinan peranan spliceosome penyingkiran intron adalah RNPsn membantu pelipatan prekusor mRNA menjadi struktur tertentu yang mengakibatkan prekursor mRNA dapat mengkatalisasi penyambungan sendiri. Model perakitan spliceosome adalah sebagai berikut. (1) RNPsn U1 berikatan dengan tapak penyambungan di ujung 5' (terjadi akibat perpasangan basa RNPsn U1 dengan urutan tapak penyambungan di ujung 5'), (2) RNPsn U2 berikatan dengan daerah titik cabang, (3) Partikel U4/U6/U5 yang belum dirakit bergabung dengan kompleks yang sedang terbentuk, (4) RNPsn U4 berasosiasi dengan kompleks tadi, dan mengakibatkan terbentuknya spliceosome yang aktif (Corebima, 2008).

Model penyingkatan intron yang lain dikenal dengan mRNA splicing. Proses splicing meliputi tahapan yaitu (1) pemutusan sambungan di ujung 5' intron. Ujung 5' hasil transkripsi intron mempunyai urutan nukleotida berbasa GU, sedangkan ujung 3' memiliki urutan nukleotida berbasa AG. Urutan nukleotida tersebut merupakan nukleotida yang conserved (selalu sama letaknya): ekson-GU...intron...-AG-ekson. Urutan tersebut spesifik untuk intron hasil transkripsi. Terjadi pemutusan sambungan di ujung 5' intron (Gardner et al, 1991). (2) pelengkungan keluar urutan intron. Ujung 5' yang bebas selanjutnya melengkung dan berhubungan dengan suatu nukleotida berbasa A (yakni nukleotida yang merupakan bagian dari suatu urutan titik cabang atau branch point sequence). Nukleotida ini terletak pada hulu ujung 3'. Akibatnya terbentuk struktur lengkungan keluar yang disebut sebagai struktur lariat (lariat structure). Urutan konsensus titik cabang pada mamalia adalah YNCURAY (Y=pirimidin, R= purin, N= basa apapun). Nukleotida berbasa A terletak pada posisi urutan nukleotida ke 18 hingga 38 ke arah hulu ujung sambungan 3'. Sedangkan pada ragi, urutan pada titik cabang ini lebih rigid sekalipun posisinya lebih bervariasi, yaitu urutan UACUAAC. Posisi struktur lariat terjadi karena ikatan ujung 5' dengan basa A (yang ditebalkan). Struktur lariat terjadi karena adanya ikatan fosfodiester 2'-5' yang tak lazim antara ujung 5' dan basa A di titik cabang. Ikatan tersebut tepatnya terjadi antara gugus OH di karbon no.2 nukleotida berbasa A dengan gugus fosfat di atom karbon no. 5 dari nukleotida berbasa G (Corebima, 2008). (3) pemutusan hubungan hasil transkripsi di ujung 3' intron dan penyambungan kedua ekson. Pemutusan hubungan hasil transkripsi ini dilakukan dengan bantuan **enzim nuklease**. Setelah pemutusan ujung 3', urutan intron dikeluarkan dari hasil urutan nukleotida pada mRNA. Hasil transkripsi intron yang tersingkir ini pada mulanya masih tetap bertahan dalam struktur lariat. Dengan bantuan *debranching enzyme*, struktur lariat diubah menjadi struktur linier dan didegradasi. (4) penggabungan hasilhasil transkripsi ekson.



Gambar 5.11 Proses splicing pada sel ragi (sumber: http://8e.devbio.com/images/ ch05/rna21p.GIF)

D. Translasi

Sebelum membahas proses translasi, terlebih dulu kita pahami tentang struktur ribosom alibosom tersusun atas subunit besar dan subunit kecil yang mengandung satu atau lebih molekul rRNA. Subunit kecil memiliki tempat khusus yang disebut tempat P (peptidyl) dan tempat A (aminoacyl). Sub unit besar memiliki

tempat khusus yaitu E, P, dan A. Ribosom prokariot dan eukariot dibedakan berdasarkan ukuran dan kecepatan sedimentasinya, yaitu untuk prokariot adalah 70S dan eukariot adalah 80S.

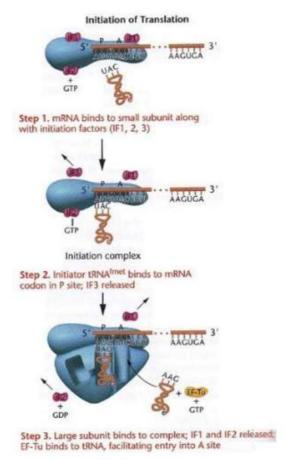
Setelah membahas ribosom, sebelum proses translasi, asam amino harus menempel pada tRNA. Proses penempelan asam amino pada tRNA terjadi dalam dua tahap yaitu mengaktifkan asam amino dan menempelnya asam amino pada tRNA. Proses aktivasi asam amino memerlukan tenaga dari pemecahan ATP menjadi AMP. Reaksi pemecahan ini menghasilkan AMP dan pirofosfat, dan asam amino intermedier atau aminoacyladenylic acid. Asam amino intermedier ini akan terikat pada AMP dan terus terikat sampai AMP diganti oleh molekul tRNA. Setelah itu, asam amino akan melekat pada ujung 3' dari tRNA menjadi aminoasil-tRNA, dan AMP menjadi bebas. Pengikatan itu dikontrol oleh enzim *sintesase t-RNA aminoacyl*. Enzim bekerja spesifik karena hanya mengenal satu jenis asam amino dan hanya dapat mengikatkannya pada tRNA yang cocok.

Proses translasi pada prokariot

Translasi berlangsung dalam 3 tahap yaitu tahap inisiasi, elongasi, dan terminasi (Griffiths et al, 2007; Irawan, 2008; Klug et al, 2010).

Tahap Inisiasi

Sub unit besar dan kecil ribosom selalu terpisah jika tidak sedang melakukan proses translasi. Inisiasi translasi pada bakteri melibatkan beberapa komponen yaitu subunit kecil, mRNA, inisiator tRNA, GTP, Mg²⁺, dan protein inisiator yaitu IF (initiation factors). Pada bakteri terdapat tiga protein inisiator yaitu IF1, IF2, dan IF3 untuk inisiasi yang benar. Peranan IF3 untuk menjaga subunit 30S yang dipisahkan dari subunit 50S, IF1 dan IF2 bertindak untuk memastikan bahwa hanya inisiator tRNA yang memasuki situs P (Griffiths et al, 2007). Langkah inisiasi dapat dijelaskan pada Gambar 5.12.



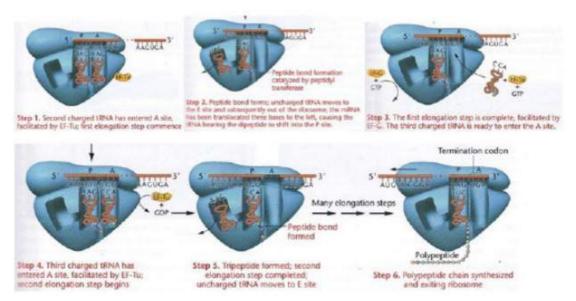
Gambar 5.12 Inisiani translasi (Sumber: Klug et al, 2010)

Langkah pertama inisisasi yaitu subunit kecil ribosom melekat pada mRNA. Pelekatan ini dapat terjadi bila ada IF pada urutan konsensus 5'-AGGAGG-3'. Pada bakteri, asam amino pertama yaitu metionin dimodifikasi dengan substitusi gugus formil (-COH) pada salah satu atom H sehingga menghasilkan N-formylmethionine. Selanjutnya dengan bantuan IF2, tRNA dengan amino acid formylmethionine (fmet) masuk ke tempat P dan IF3 dilepas. Dengan adanya perlekatan tersebut struktur ini disebut kompleks pembukaan (initial complex). Kompleks pembukaan

selanjutnya dikombinasikan dengan subunit besar. Pada proses ini IF2 dan IF1 akan dilepas, sedangkap GTP akan dihidrolisis menjadi GDP. Dengan menempelnya subunit besar, maka pada ribosom terdapat dua tempat yang berhubungan dengan mRNA yaitu tempat peptidyl (P) dan tempat aminoacyl (A), dan tempay ketiga yang tidak dilewati mRNA yaitu E (exit). P sudah diisi oleh tRNAfmet, A akan diisi kodon kedua. Terbentuknya kompleks ini mengakhiri inisiasi.

Tahap elongasi

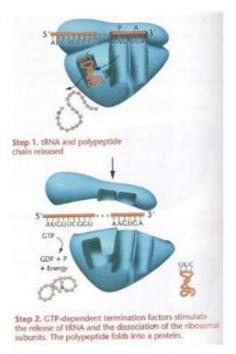
Tahap pemanjangan melibatkan dua protein yaitu elongation factor Tu (EF-Tu) dan elongation factor G (EF-G). Tempat A yang masih kosong saat proses inisiasi akan ditempati oleh tRNA yang sesuai dengan pasangan kodon pada mRNA yang ada di tempat A. bila tempat A sudah ditempati oleh aminoasil tRNA maka enzim peptidyl transferase akan mengkatalisasi pembentukan ikatan peptida antara asam amino yang ada di tempat P dengan asam amino yang ada di tempat A. melalui katalisasi faktor protein kedua, EF-G, yang tampaknya masuk ke dalam situs A, tRNA di tempat A dan P dialihkan ke tempat P dan E dan mRNA bergerak melalui ribosom sehingga kodon berikutnya diposisikan di situs A. Saat EF-G meninggalkan ribosom, situs A terbuka untuk menerima kompleks berikutnya (Gambar 5.13).



Gambar 5.13 Proses elongasi (Sumber: Klug et al, 2010)

c. Terminasi

Siklus berlanjut sampai kodon di situs A adalah satu dari tiga kodon berhenti: UGA, UAA, atau UAG. Ingat bahwa tidak ada tRNA yang mengenali kodon ini. Sebagai gantinya, protein yang disebut faktor pelepasan (RF1, RF2, dan RF3 pada bakteri) mengenali kodon berhenti. Pada bakteri, RF1 mengenali UAA atau UAG, sedangkan RF2 mengenali UAA atau UGA; Keduanya dibantu oleh RF3. Interaksi antara faktor pelepasan 1 dan 2 dan situs A berbeda dari kompleks terner dengan dua cara penting. Pertama, kodon berhenti dikenali oleh tripeptida pada protein RF, bukan oleh antikodon. Kedua, faktor pelepasan masuk ke situs A dari subunit 30S namun tidak berpartisipasi dalam pembentukan ikatan peptida. Sebagai gantinya, molekul air masuk ke pusat peptidyl transferase dan mengarah pada pelepasan polipeptida dari tRNA di situs P. Subunit ribosomal terpisah, dan subunit 30S sekarang siap untuk membentuk kompleks inisiasi baru.



Gambar 5.14 Proses Terminasi (Sumber: Klug et al., 2010)

Proses translasi pada eukariot

Proses translasi pada eukariot pada dasarnya sama seperti pada prokariot hanya saja kebanyakan mRNA pada eukariot memiliki konsensus 5'-ACCAUGG-3' yang berfungsi melekatkan pada subunit kecil tRNA. Amino acid formylmethionine tidak dibutuhkan saat inisiasi, tetapi urutan awalnya tetap AUG sehingga tRNA awal adalah tRNAmet. Faktor inisisasi sama seperti pada prokariot.

Kode Genetika

Tiga Nukleotida per Kodon

Dua puluh asam amino berbeda bergabung selama translasi. Dengan demikian, setidaknya 20 kodon yang berbeda harus dibentuk dengan menggunakan empat simbol yang tersedia dalam pesan mRNA. Oleh karena itu jumlah nukelotida pada satu kode genetika yang menspesifikasi satu macam asam amino, secara teoritik harus dapat memenuhi kebutuhan sebanyak 20 macam asam amino. Dalam hubungan ini adalah tidak mungkin bahwa jumlah nukleotida pada satu kode genetika hanya satu atau dua, jika jumlah tersebut hanya satu maka hanya ada empat macam asam amino saja yang dispesifikasikan (41: yaitu yang masingmasing dispesifikasi oleh A, U, G dan C); dan jika jumlah itu dua maka asam amino yang dispesifikasi baru mencapai 16 macam (4²: yaitu masing-masing sebagai AU, UA, UU, GC, dan sebagainya). Akan tetapi jika jumlah nukleotida pada satu kode genetika itu tiga, maka asam amino yang dispesifikasi mencapai 64 macam asam amino (43: yaitu AAA, AAU, UAU, GCA, dan sebagainya); dan jumlah ini realistik karena sudah melampaui 20 macam asam amino.

Bukti eksperimental pertama yang menunjukkan bahwa jumlah nukleotida pada satu kode genetika adalah tiga ditemukan pada 1961 oleh F.H.C. Crick, dkk. atas dasar percobaan pada virus T₄ Tabel 5.2 menunjukkan hasil pecobaan Crick dkk yang menemukan jumlah tiga nukleotida per kodon.

Tabel 5.2 Bagan analisis genetik yang dilaksanakan Crick, dkk. atas mutasi Proflavin pada locus II T4 yang menghasilkan bukti eksperimental bahwa kode genetika tersusun dari tiga nukleotida

```
CCC AAA GGG TTT
       ATG ATT
                 GTA
                                                CCC TAG
Alel:
                      GGU TTT CCC AAA
       TAG TAA
                 CAT
                                                GGG ATC
m-RNA: AUG AUU
                 GUA
                      GGG AAA GGG UUU
                                                CCC
                                                     UAG
                                           ...
Protein
                                      Pha
       met
            ile
                 Val
                            lys
                                 gly
                                                Prn
                                                     (term)
```

(Sumber: Gardner et al., 1991)

Pengungkapan Kode Genetik

Permasalahan dalam hal pengungkapan kode genetika yaitu menentukan: (1) kodon mana yang menentukan asam amino, (2) berapa banyak kemungkinan 64 kodon digunakan, (3) bagaimana kode tersebut dibaca, dan (4) apakah spesies yang berbeda menggunakan kodon yang sama atau berbeda (Gardner et al, 1991). Berikut akan dijelaskan secara mendetail bagaimana prosesproses di atas terjadi.

Asam amino terdiri atas 20 jenis sebagai penyusun protein, tetapi hanya empat basa yang berbeda pada mRNA. Sehingga pada dasarnya tidak bisa secara sederhana menggunakan satu basa dari asam nukleat untuk mengkode sebuah asam amino ketika membuat sebuah protein. Selama translasi, basa-basa mRNA dibaca dalam kelompok yang terdiri atas 3 basa yang dikenal sebagai kodon. Setiap kodon mewakilkan sebuah bagian dari asam amino. Karena ada 4 basa yang berbeda, ada 64 kemungkinan grup yang terdiri dari tiga basa, sehingga ada 64 kodon yang berbeda pada kode genetik (Clark, 2005).

Kode genetik merupakan kode untuk mengkonversi sekuen basa pada asam nukleat, dibaca dalam grup-grup yang terdiri atas masing-masing 3 basa setiap grup kedalam sekuen untai polipeptida (Clark, 2005). Seperti yang disebutkan di atas, kode genetik digunakan oleh sel dengan kode triplet. Dengan setiap tiga sekuen nukleotida atau kodon, akan "dibaca" dari sebuah titik start pada mRNA. Dari ke 64 kemungkinan kodon pada kode genetik, 61 merupakan asam amino spesifik individu dan 3 kodon (Lodish et al, 2004). Tabel 2 menunjukkan bahwa kebanyakan asam amino dikodekan oleh lebih dari satu kodon. Kode genetik yang ditunjukkan pada Tabel 2 berlaku umum untuk hampir seluruh organisme, dengan beberapa perkecualian seperti yang

akan dijelaskan pada bagian "keuniversalan kode genetik" pada bagian berikutnya.

Protein dibuat oleh 20 asam amino yang berbeda, sehingga beberapa asam amino dikodekan lebih dari satu kodon. Kodon AUG yang mengkode metionin bertindak sebagai kodon start, sehingga untai polipeptida yang baru dibuat berawal dari asama amino metionin. Kodon GUG yang mengkode valin juga bertindak sebagai kodon start tetapi jarang, tetapi jika pembentukan protein dimulai dari kodon ini, maka asam amino pertama yang akan membuat protein juga metionin (Clark, 2005).

Tabel 5.3 Kode Genetik. 64 kodon yang ditemukan pada mRNA ditunjukkan dengan asam amino yang cocok dengannya

		2nd (mid	dle) base		
1st base	U	C	A	G	3rd base
U	UUC Phe UUA Leu	UCC Ser UCA Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA stop UAG stop	UGC Cys UGA stop	U C A G
С	CUC Leu CUA Leu	CCC Pro CCA Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGC Arg CGA Arg	U C A G
A	AUC Ile AUA Ile	ACC Thr ACA Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGC Ser AGA Arg	U C A G
G	GUC Val GUA Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGC Gly GGA Gly	U C A G

(Sumber: Clark, 2005)

Untuk membaca kodon, sepasang molekul adapter diperlukan. Molekul tersebut dikenal dengan RNA transfer (tRNA), yang mengenali kodon pada mRNA pada satu sisi dan membawa asam

amino yang cocok yang ditempelkan pada ujung tRNA yang lain. Adapter tersebut mewakili kelompok ketiga dari RNA yang diberi nama transfer RNA sejak adapter tersebut membawa asam amino ke ribosom untuk mengenali kodon mRNA. Ada sejumlah kodon dan ada beberapa tRNA yang berbeda. Jumlah kodon lebih banyak dibandingkan tRNA, karena ada beberapa molekul tRNA dapat membaca lebih dari satu kodon mRNA. Pada satu sisi, tRNA mempunyai sebuah antikodon yang terdiri atas 3 basa yang melengkapi tiga basa kodon mRNA. Kodon dan antikodon saling mengenal satu sama lain melalui berpasangan basa dan saling mengikat satu sama lain dengan ikatan hidrogen. Pada ujung tRNA yang lain, tRNA membawa asama amino yang cocok atau sesuai dengan kodon yang dikenal.

3. Hipotesis Wobel (Wobble)

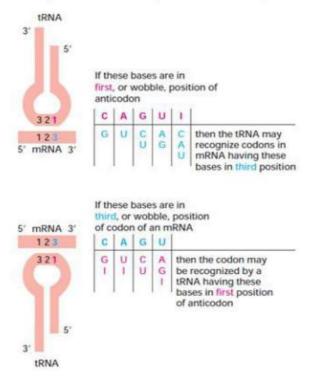
Jika satu macam tRNA tersedia untuk tiap-tiap kodon mRNA yang menentukan satu asam amino, maka akan terdapat 61 tRNA. Jumlah sebenarnya lebih kecil, yaitu sekitar 45. Angka ini mencukupi karena beberapa tRNA mempunyai antikodonantikodon yang dapat mengenali dua atau lebih kodon-kodon yang berbeda. Kemampuan ini mungkin disebabkan karena aturan pemasangan basa antara basa ketiga suatu kodon dan basa yang terkait dari antikodon tRNA tidaklah seketat aturan-aturan untuk kodon-kodon DNA dan mRNA. Pelonggaran aturan pasangan basa ini disebut wobel (wobble). Posisi pasangan basa pada kondisi wobel adalah basa ketiga (3') pada mRNA kodon berikatan dengan hasa pertama (5') antikodonnya pada tRNA (Lodish et al, 2004). Misalnya basa U dari antikodon tRNA dapat berpasangan baik dengan A atau G di posisi ketiga dari kodon mRNA (Campbell et al, 2008). Tabel 5.4 menampilkan pasangan basa pada posisi wobel.

Basa pertama	Pasangan dengan basa ketiga kodon		
antikodon	Normal	Karen 46 obel	
G	С	U	
U	Α	G	
1	(1)	C atau U atau A	
С	G	Tidak mengalami wobe	
Α	U	Tidak mengalami wobel	

Tabel 5.4 Pasangan Basa pada Posisi Wobel

(Sumber: Clark, 2005 dengan modifikasi)

Basa adenin jarang ditemukan pada antikodon dalam posisi wobel, banyak tRNA pada tumbuhan dan hewan memiliki inosin (I) yang merupakan sebuah produk deaminasi dari adenin pada posisi wobel. Inosin dapat berpasangan dengan C, U atau A. sebuah tRNA dengan inosin pada posisi wobel dapat mengenali kodon A, C atau U pada mRNA (Gambar 5.15).



Gambar 5.15 Pasangan basa pada kodon dan antikodon pada posisi wobel (Sumber: Lodish et al, 2004)

4. Keuniversalan Kode genetik

Seperti yang sudah dijelaskan pada bagian sebelumnya, bahwa kode genetik yang ada pada Tabel 2 berlaku untuk hampir seluruh organisme. Namun, ada beberapa pengecualian bahwa kode genetik tersebut tidak sepenuhnya digunakan oleh seluruh organisme, seperti pada beberapa protozoa, mikoplasma, dan genom mitokondria hewan dan jamur. Tabel 5.5 menunjukkan beberapa perbedaan kode genetik yang digunakan pada protozoa, mikoplasma, dan genom mitokondria hewan dan jamur.

Tabel 5.5 Perkecualian Keuniversalan Kode Genetik Pada Beberapa Genom Organisme

Kodon	Universal	Keterangan
UGA	Stop	Pada Mycoplasma mengkode Trp, pada mitokondria jamur, protozoa, mamalia, dan cacing pipih mengkode Trp
UAA	Stop	Pada paramecium mengkode Gln, pada mikotondria cacing pipih mengkode Tyr
CUG	Leu	Pada Candida mengkode Ser
AUA	lle	Pada mitokondria jamur, protozoa, dan mamalia mengkode Met

(Sumber: Clark, 2005).

RANGKUMAN

- 1. Proses kspresi materi genetik yaitu transkripsi, modifikasi pasca transkripsi, dan translasi.
- 2. Transkripsi adalah transfer informasi genetik yang terdapat dalam urut-urutan nukleotida DNA menuju ke urut-urutan nukleotida RNA atau penyalinan/ perekaman informasi genetik yang ada pada DNA (berupa urutan nukleotida) yang menghasilkan salinan atau rekaman berupa urutan nukleotida RNA dan menggunakan DNA sebagai template (cetakannya).

- Enzim pada proses transkripsi pada prokariot adalah holoenzyme, dan pada eukariot berbeda untuk sintesis mRNA, tRNA, dan rRNA.
- Splicing adalah peristiwa pengeluaran intron melalui proses pemotongan dan penggabungan kembali ekson untuk MH eukariotik
- Translasi adalah transfer informasi genetik yang terdapat dalam urut-urutan nukleotida RNA menuju ke urut-urutan asam amino.
- 6. Jumlah nukleotida pada satu kode genetika adalah tiga untuk membentuk 20 macam asam amino.

EVALUASI

- 1. Jelaskan bagaimana transkripsi diawali!
- 2. Apa perbedaan RNA polimerasi pada prokariot dan eukariot?
- 3. Apa perbedaan inisiasi translasi pada prokariot dan eukariot?
- 4. Mengapa dapat terjadi peristiwa wooble?
- 5. Bagaimana proses modifikasi tRNA?

REFLEKSI BELAJAR

Setelah mempelajari materi ini,

- Tuliskan hal baru apa saja yang Saudara peroleh!
- 2. Bagian mana dari materi ini yang sulit Saudara pahami?
- Apa saja upaya belajar Saudara pada materi ini?
- 4. Apa saja manfaat/ dampak yang Saudara peroleh setelah mempelajari materi ini?

DAFTAR RUJUKAN

- Campbell, N.A., Reece, J.B., Urry, L.A., Chain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., Jackson, R.B. 2008. Biology 8th Edition. New York: Pearson Benjamin Cummings.
- Clark, D. 2005. Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution. Illinois: Elsevier Academic Press.
- Gardner, E.J., dkk. 1991. Principle of Genetic 8th Edition. New York: Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: John Wiley and Sons Inc.
- Gilbert, S.F. 2003. Developmental Biology 7th. Sinauer Associates Inc. Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., Suzuki, D.T., & Miller, J.H. 2007. An Introduction to Genetic 9th Edition. W. H. Freeman and Company.
- Irawan, B. 2008. Genetika Molekuler. Surabaya: Airlangga University Press.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A. 2010. Essentials of Genetics 7th Edition. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Tamarin, R.H. 2001. Principles of Genetics 7th Edition. The McGraw-Hill Companies

Yuwono, T. 2005. Biologi Molekular. Yogyakarta: Erlangga.

108	GENETIKA PRINSIP DASAR BERBASIS PENELITIAN DI PERGURUAN TINGGI

BAGIAN VI MUTASI

Indikator Capaian Pembelajaran

- Mahasiswa mampu menjelaskan penyebab mutasi
- 2. Mahasiswa mampu membedakan macam-macam mutasi gen
- 3. Mahasiswa mampu membedakan macam-macam mutasi kromosom

A. Pendahuluan

Materi genetik dapat berubah melalui mutasi, rekombinasi, dan pindahnya satu segmen DNA karena elemen transposabel. Materi genetik dapat mengalami perubahan karena faktor internal dan eksternal. Beberapa definisi mutasi dari berbagai sumber. Menurut Gardner et al. (1991) mutasi sebagai perubahan materi genetik yang dapat diwariskan dan tiba-tiba. Tamarin (2001) menyatakan bahwa mutasi adalah proses perubahan struktur pada gen (atau kromosom). Corebima (2000) menyatakan mutasi merupakan peristiwa yang lumrah terjadi.

B. Penyebab Mutasi

Mutasi yang spontan maupun yang terinduksi dapat disebabkan oleh faktor-faktor lingkungan dan faktor internal materi genetik. Mutasi spontan adalah perubahan materi genetik yang terjadi tanpa sebab-sebab yang jelas, sedangkan mutasi terinduksi ialah terjadi karena pemaparan makhluk hidup yang

disebabkan oleh radiasi pengion, radiasi ultraviolet, dan berbagai senyawa kimia.

1. Keadaan atau Faktor Internal Materi Genetik sebagai Sebab Mutasi

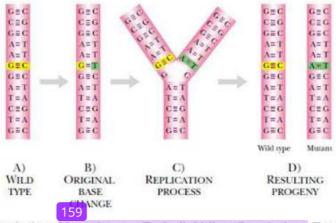
a. Kesalahan pada replikasi DNA

Watson dan Crick mengusulkan bahwa mutasi bisa terjadi secara spontan selama replikasi DNA jika terjadi kesalahan pasangan. Jika basa DNA mengalami perubahan posisi proton yang mengubah sesuatu sifat kimia menjadi salah satu bentuk tautomeriknya (terjadinya langka) selama proses replikasi, pasangan basa yang tidak tepat akan terjadi (Tamarin, 2001).

Pada basa purin dan pirimidin, perubahan tautomerik mengubah sifat perikatan hidrogennya. C* dapat membentuk ikatan hidrogen dengan A, G* dengan T, T* dengan G serta A* dengan C. C*, G*, T*, dan A* adalah bentukan yang jarang dari basa C, G, T, dan A akibat Tautomerisme (C* adalah tautomer dari S, G adalah tautomer dari G, T* adalah tautomir dari T, serta A* adalah tautomer dari A). Lihat Gambar 6.1.

Efek perikatan antara basa-basa purin dan pirimidin dengan pasangan tautomer pada saat replikasi DNA. Sewaktu pasangan tidak lazim memisah pada replikasi berikutnya, masing-masing akan berpasangan dengan basa komplementernya, sehingga terjadilah mutasi. Lihat Gambar 6.2.

Gambar 6.1 Basa yang normal dan yang mengalami tautomerisasi (Sumber: Tamarin, 2001)



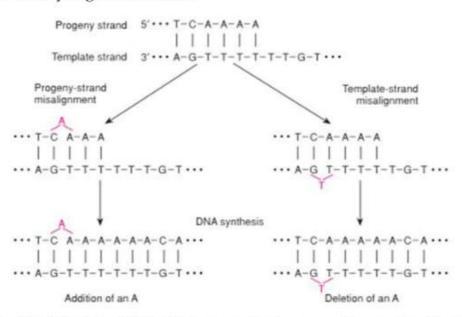
Gambar 6.2 Peristiwa Mutasi yang Terjadi Akibat Perubahan Tautomerik Pada Suatu Basa DNA (Sumber: Clark, 2005)

b. "Penggelembungan" Unting di Saat Replikasi

Dapat terjadi pada unting lama (template) maupun unting baru. Jika berlangsung pada unting lama maka akan terjadi *delesi* pada unting baru, sebaliknya jika penggelembungan terjadi pada unting baru, maka akan terjadi *adisi* pada unting baru tersebut. Perhatikan Gambar 6.3.

c. Perubahan Kimia: Depurinasi dan Deaminasi Basa-Basa Tertentu

Pada depurinasi, suatu purin (adenin dan guanin) tersingkir dari DNA karena terputusnya ikatan kimia antara purin dan gula deoksiribosa. Jika purin tersingkir tidak diperbaiki maka di saat replikasi tidak terbentuk pasangan basa komplementernya yang lazim, melainkan terbentuk secara acak basa apapun (pada unting baru) dan pada proses replikasi berikutnya menimbulkan mutasi (pergantian basa), sehingga basa baru yang terbentuk tidak sama dengan basa yang mula-mula.



Gambar 6.3 Delesi dan Adisi akibat penggelembungan unting saat replikasi (Sumber: Tamarin, 2001)

Deaminasi sitosin dan 5-metilsitosin: Urasil (sebagai hasil deaminasi sitosin) bukan merupakan basa yang lazim pada DNA. Oleh karena itu sebagian besar urasil akan disingkirkan kembali dan diganti dengan sitosin melalui sistem perbaikan. (Proses perbaikan itu meminimkan terjadinya mutasi). Jika suatu urasil tidak diperbaiki maka akan menyebabkan penggandaan adenin pada unting DNA baru hasil replikasi berikutnya, dan akibatnya terjadi mutasi berupa perubahan pasangan basa C-G menjadi T-A.

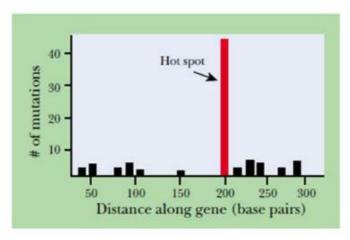
Deaminasi 5-metilsitosin akan menghasilkan timin (basa yang lazim pada DNA) yang tidak dapat diperbaiki akibatnya langsung menimbulkan mutasi perubahan pasangan basa 5-metilsitosin C-G menjadi T-A (Gambar 6.4). DNA makhluk hidup prokariotik maupun eukariotik mengandung sejumlah kecil basa 5-metilsitosin C, maka dampak deaminasi 5-metilsitosin semakin terasa karena perubahan 5-metilsitosin C-G menjadi T-A tidak dapat diperbaiki, sehingga lokasi basa 5-metilsitosin C pada genom sering terlihat sebagai titik-titik panas mutasi atau Mutational hot-spot, pada lokasi itu frekuensi terjadi mutasi lebih tinggi daripada frekuensi rata-rata (Gambar 6.5).

Gambar 6.4 Contoh Deaminasi Pada Molekul DNA (Sumber: Clark, 2005)

114

d. Perpindahan atau Transposisi Elemen Transposabel

Dapat berakibat terjadinya mutasi gen yaitu terjadi insersi ke dalam gen yang dapat mempengaruhi ekspresi gen dengan cara insersi ke dalam urut-urutan pengatur gen, dan menyebabkan mutasi kromosom atau aberasi kromosom. Bukti tentang peran transposisi elemen transposabel sebagai salah satu sebab terjadinya mutasi pada *Drosophila*,. Contoh: alel mutan pada *Drosophila* karena insersi elemen transposabel antara lain: W^{sp}, Wⁿ, W^{hf}, W^{hd} (Gardner et al.,1991) yang merupakan alela ganda yang terletak pada lokus White kromosom.



Gambar 6.5 Sebaran Mutasi Pada Molekul DNA Berdasarkan Panjang Basa (Sumber: Clark, 2005)

e. Gen Mutator

Gen mutator ialah gen yang ekspresinya mempengaruhi frekuensi mutasi gen-gen lain dan frekuensi mutasi gen-gen lain itu biasanya meningkat. Contoh: makhluk hidup yang sudah diketahui memiliki gen mutator adalah *E coli* dan *Drosophila*. Yaitu gen mutator pada E coli ialah *mut D* yang mengubah sub unit E DNA polimerasi III. Dan *mut S* menyebabkan terjadinya pergantian purin dengan purin atau pirimidin dengan pirimidin, maupun pergantian purin dengan pirimidin dan sebaliknya, dan

mutan mut T menyebabkan terjadinya pergantian A-T menjadi C-G.

2. Faktor Lingkungan sebagai Penyebab Mutasi

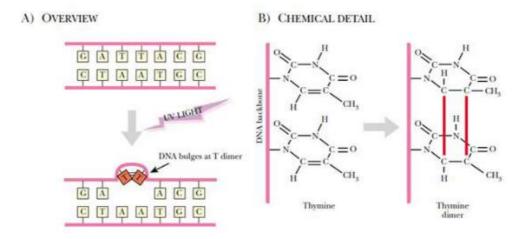
Penyebab mutasi tidak hanya berasal dari internal materi genetik itu sendiri, tetapi juga faktor dalam lingkungan. Penyebab mutasi dari dalam lingkungan dibedakan menjadi beberapa bagian yaitu yang bersifat fisik, kimiawi, dan biologis. Berikut akan dijelaskan satu persatu dari penyebab-penyebab tersebut.

a. Penyebab mutasi yang bersifat fisik

Penyebab mutasi dalam lingkungan yang bersifat fisik adalah radiasi dan suhu. Radiasi sebagai penyebab mutasi dibedakan menjadi radiasi pengion dan radiasi bukan pengion (Gardner et al, 1991). Radiasi pengion berenergi tinggi, sedang radiasi bukan pengion berenergi rendah. Contoh radiasi pengion misalnya radiasi sinar X, radiasi sinar gamma, dan radiasi kosmik. Pada saat ini radiasi pengion diinduksi oleh sinar X, proton dan neutron yang dihasilkan mesin, maupun oleh sinar α , β , dan γ yang dibebaskan isotop radioaktif dari elemen seperti 32P, 35S, cobalt 90, dan sebagainya. Contoh radiasi bukan pengion misalnya radiasi sinar ultraviolet (UV).

Radiasi pengion mampu menembus jaringan/tubuh makhluk hidup karena berenergi tinggi. Selama menembus jaringan/tubuh makhluk hidup, sinar bertenaga tinggi ini berbenturan dengan atom-atom sehingga terjadi pembebasan elektron dan terbentuklah ion-ion positif. Ion-ion positif tersebut selanjutnya berbenturan dengan molekul lain, sehingga terjadi pembebasan elektron dan terbentuklah ion-ion positif lebih lanjut, dan melalui cara ini terbentuklah suatu sumbu ion sepanjang jalur terobosan sinar bertenaga tinggi itu (Gardner et al, 1991).

Radiasi ultraviolet merupakan radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang dari 100-400 nm. Radiasi UV ini berpengaruh langsung pada DNA. Basa-basa DNA menyerap gelombang sampai pada sekitar 254 nm, dan UV sangat dekat dengan panjang gelombang ini, sehingga diserap oleh DNA secara efisien. Sinar UV mengakibatkan basa-basa pirimidin yang saling berdekatan untuk bereaksi silang satu dengan yang lainnya membentuk dimer (Gambar 6.6). Dimer timin secara khusus lebih sering. Meskipun DNA polimerase dapat melakukan prosesing dengan melewati seluruh dimer timin, ini akan meninggalkan sebuah bagian untai tunggal yang membutuhkan perbaikan. Proses perbaikan DNA pada gilirannya menyebabkan insersi dari basa-basa yang tidak tepat pada untai baru yang disintesis. Oleh karena itulah dapat menyebabkan mutasi.



Gambar 6.6 Pembentukan Dimer Timin oleh Sinar UV (Sumber: Clark, 2005)

Pada tumbuhan dan hewan tingkat tinggi sinar UV dapat menembus lapisan sel-sel permukaan karena berenergi rendah, serta tidak menimbulkan ionisasi. Sinar UV membebaskan energinya kepada atom-atom yaga dijumpai, meningkatkan elektron-elektron pada orbit luar ke tingkat energi yang lebih

tinggi. Atom-atom yang memiliki elektron-elektron sedemikian dinyatakan tereksitasi atau tergiatkan.

Molekul-molekul yang mengandung atom yang berada dalam keadaan terionisasi maupun tereksitasi, secara kimiawi lebih reaktif daripada molekul yang memiliki atom-atom yang berada dalam keadaan stabil. Reaktivitas yang meningkat dari atom-atom pada molekul DNA merupakan dasar dari efek mutagenik radiasi sinar UV maupun radiasi sinar pengion. Reaktivitas yang meningkat tersebut mengundang terjadinya sejumlah reaksi kimia, termasuk mutasi. Pada kenyataannya radiasi pengion dapat menyebabkan terjadinya mutasi gen dan pemutusan kromosom yang berakibat delesi, duplikasi, inversi, translokasi, serta fragmentasi kromosom umumnya (Gardner et al, 1991).

Penyebab mutasi dalam lingkungan yang bersifat kimiawi

Penyebab mutasi dalam lingkungan kimiawi disebut juga sebagai mutagen kimiawi. Mutagen-mutagen kimiawi dapat dipilah menjadi 3 kelompok yaitu analog basa, agen pengubah basa (base modifying agent), dan agen penyela (intercalating agent).

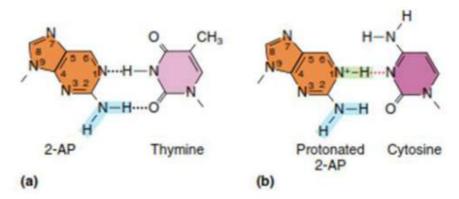
Analog basa

Senyawa-senyawa yang tergolong analog basa adalah yang memiliki struktur molekul sangat mirip dengan yang dimiliki basa yang lazimnya terdapat pada DNA. Dua contoh analog basa adalah 5-bromourasil (5-BU) dan 2-aminopurin (2-AP). 5-bromourasil analog timin. Posisi karbon ke-5 ditempati oleh gugus brom, yang sebelumnya ditempati oleh gugus metil (CH₃). Pada bentuk keto (yang lebih stabil) 5-BU berpasangan dengan adenin, sebaliknya pada bentuk enol (yang lebih jarang) 5-BU berpasangan dengan guanin (Gambar 6.7)

Gambar 6.7 Perpasangan antara 5-BU yang berperan sebagai timin dan 5-BU yang berperan sebagai sitosin (Griffith et al., 2007)

5-BU menginduksi mutasi peralihan antara kedua bentukan 5-BU, sesaat setelah analog basa itu diinkorporasikan dalam bentuk keto (bentuk normal), maka analog basa itu berpasangan dengan adenin. Jika bentuk keto 5-BU beralih ke bentuk enol (bentuk yang jarang) selama replikasi, maka analog basa itu akan berpasangan dengan guanin. Pada proses replikasi, dari pasangan G – 5-BU akan muncul pasangan G-C dan bukan A-T (mutasi transisi dari A-T menjadi G-C). Tetapi jika pertama kali diinkorporasikan ke DNA dalam bentuk enol, dan selanjutnya berralih ke bentuk keto, maka 5-BU akan menginduksi suatu mutasi transisi dari G-C ke A-T.

2-aminopurin juga memiliki 2 bentuk yaitu bentuk amino (bentuk normal) serta bentuk imino (bentuk yang jarang). Pada bentuk amino, 2-AP berperan sebagai adenin dan berpasangan dengan timin. Pada bentuk imino, 2-AP berperan sebagai guanin dan berpasangan dengan sitosin. Seperti 5-Bu, 2-AP juga mengindukasi mutasi transisi yaitu A-C menjadi G-C atau G-C menjadi A-T, tergantung bentuknya (Gambar 6.8).



Gambar 6.8 (a) perpasangan antara 2-AP yang berperan sebagai adenin serta (b) 2-AP yang berperan sebagai guanin (Griffith et al., 2007)

Berkenaan dengan analog basa, dikenal pula AZT (azidothymidine), semacam racun yang diberikan kepada penderita AIDS untuk melawan HIV. AZT dapat diinkorporasikan ke cDNA (hasil transkripsi balik yang dikatalisasi oleh enzim reversetranscriptase. Dalam hal ini AZT berperan sebagai suatu analog timidin, yang dapat menghambat cDNA virus, sehingga menghalangi sintesis virus yang baru.

Agen pengubah basa

Senyawa-senyawa yang tergolong agen pengubah basa adalah mutagen yang secara langsung mengubah struktur maupun sifat kimia dari basa. Yang termasuk kelompok ini adalah agen deaminasi, agen hidroksilasi, serta agen alkilasi.

Salah satu agen deaminasi adalah asam nitrit. Asam nitrit (HNO₂) menyingkirkan gugus amino (-NH₂) dari basa guanin, sitosin, dan adenin. Perlakuan asam nitrit atas guanin menghasilkan xantin (berperilaku seperti guanin sehingga tidak terjadi mutasi). Perlakuan nitrit atas sitosin menghasilkan urasil yang berpasangan dengan adenin (terjadi mutasi transisi CG menjadi TA). Perlakuan nitrit atas adenin menghasilkan hypoxanthin, sehingga lebih berpeluang berpasangan dengan sitosin dibanding dengan timin

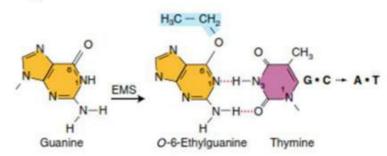
(terjadi mutasi transisi AT menjadi GC). Suatu mutan yang timbul akibat mutasi yang diinduksi oleh asam nitrit dapat berbalik oleh asam nitrit juga. Kerja asam nitrit pada basa guanin, sitosin, dan adenin dapat ditunjukkan pada Gambar 6.9.

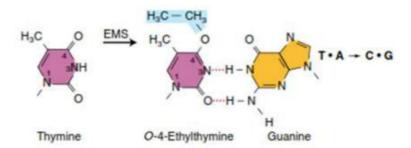
Gambar 6.9 Kerja asam nitrat pada basa DNA (Tamarin, 2001)

Agen hidroksilasi, mutagen hydroxylamine NH,OH bereaksi dengan sitosin, mengubahnya dengan menambah gugus hidroksil (OH), sehingga terbentuk hydroxylaminocytosine yang hanya berpasangan dengan adenin (terjadi mutasi transisi CG menjadi TA). Mutasi yang disebabkan oleh mutagen hydroxylamine NH,OH

berikutnya tidak dapat memulihkan mutan akibat pengaruh mutagen itu sebelumnya, mutan dapat pulih karena pengaruh mutasi yang diinduksi oleh mutagen lain seperti 5 BU, 2 AP, maupun asam nitrit

Agen alkilasi ethyl methane sulfonate (CH,SO,CH,CH,) dan ethyl ethane sulfonate (CH,CH,SO,CH,CH,) adalah agen yang dapat mengubah cincin purin. MMS (methylmetane sulfonate) mengintroduksi gugus alkil (misalnya -CH₃-CH₃-CH₃) ke dalam basa pada sejumlah posisi. Dalam hal ini, agen alkilasi menyebabkan perubahan pada basa yang berakibat terbentuknya pasangan yang tidak lazim. MMS mengubah guanin menjadi O⁶-methylguanine yang berpasangan dengan timin (terjadi mutasi transisi GC menjadi AT). MMS mengubah timin menjadi O4nylpurine (terjadi transisi TA menjadi GC). Secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 6.10.

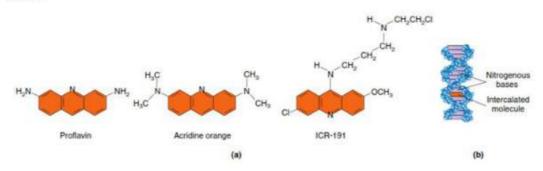




Gambar 6.10 Kemungkinan yang terjadi akibat alkilating agen (Griffith et al, 2007)

Agen interkalasi

Mutagen kimia berupa agen interkalasi bekerja dengan cara melakukan insersi antara basa-basa berdekatan dengan pada satu atau kedua unting DNA. Contoh agen interkalasi antara lain proflavin, acridine, ethidium bromide (EtBr), dioxin, dan ICR-70. Struktur proflavin dan acridine dapat ditunjukkan pada Gambar 6.11.



Gambar 6.11 Struktur molekul proflavin, acridine orange dan ICR-191 serta interaksinya dengan DNA (Griffith et al, 2007)

Jika agen interkalasi melakukan insersi antara pasangan basa yang berdekatan pada DNA templat (pada waktu replikasi) maka suatu basa tambahan dapat diinsersikan pada unting DNA baru berpasangan dengan agen interkalasi.

Setelah satu atau lebih dari satu kali berlangsungnya replikasi, yang diikuti oleh hilangnya agen interkalasi, akibat yang muncul adalah terjadinya suatu mutasi rangka karena insersi suatu pasangan basa. Jika yang terjadi adakah insersi suatu pasangan basa baru maka sewaktu unting ganda DNA tersebut bereplikasi sesudah hilangnya agen interkalasi, akibatnya yang muncul adalah terjadinya suatu mutasi rangka karena delesi satu pasang basa. berkenaan dengan mutasi rangka tersebut, akibat yang muncul selanjutnya adalah bahwa semua asam amino yang dikode sesudah titik mutasi dapat dikatakan menyimpang sehingga protein yang dihasilkan bersifat nonfungsional. Dampak mutasi yang timbul

karena mutasi rangka yang diinduksi oleh agen interkalasi dapat pulih kembali melalui perlakuan dengan agen-agen interkalasi.

Menurut Gardner et al (1991) mutagen kimia dapat dikelompokkan menjadi 2 kelompok, yaitu yang berpengaruh terhadap DNA yang sedang bereplikasi maupun yang tidak bereplikasi dan yang hanya berpengaruh terhadap DNA yang sedang bereplikasi.

c. Penyebab mutasi dalam lingkungan yang bersifat biologis

Mutagen biologis yang sudah dilaporkan adalah fag. Efek mutagenik yang ditimbulkan fag terutama berkaitan dengan integrasi DNA fag, pemutusan, dan delesi DNA inang. Suatu gen bakteri yang diinterupsi oleh DNA Mu biasanya tidak aktif, terjadilah mutasi inang bakteri yang diinsersi. Berkenaan dengan fag λ , sekitar 1% lisogen yang tidak normal menghasilkan fenotip bakteri mutan, sepanjang fag tersebut masih ada. Dalam hubungan dengan pemutusan DNA dan delesi, dikatakan bahwa mutagenesis fag dapat terjadi karena kerusakan DNA akibat pemutusan dan delesi, seperti pada herpes simplex, SV40, rubella, dan chicken pox, yang mungkin timbul oleh efek nuklease atau karena gangguan perbaikan DNA.

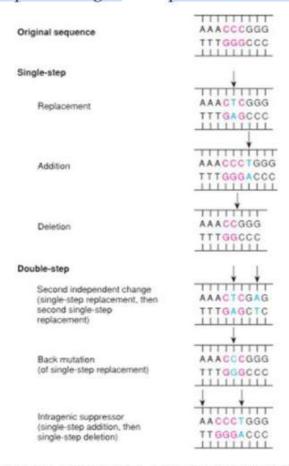
C. Macam-macam Mutasi Gen

Mutasi yang terjadi pada tingkat gen yaitu mutasi titik (point mutation) yang hanya menimpa satu pasang nukleptida pada suatu gen. Mutasi titik terdiri dari dua macam yaitu mutasi ke depan (forward mutation) dan mutasi balik (reverse mutation). Mutasi ke depan (forward mutation) adalah mutasi yang mengubah wild-type. Mutasi balik (reverse mutation) dapat memulihkan polipeptida yang sebelumnya bersifat fungsional sebagian atau tidak fungsional akibat mutasi sebelumnya. Mutasi balik yang memulihkan fungsi protein sepenuhnya terjadi jika mutasi terjadi tepat pada site yang sama (sesuai mutasi sebelumnya).

Macam mutasi titik antara lain:

1. Mutasi pergantian pasangan basa

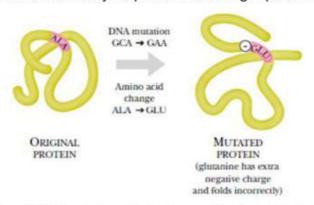
Mutasi pergantian basa adalah perubahan akibat pergantian basa oleh basa lainnya. mutasi pergantian basa terdiri dari mutasi transisi dan mutasi transversi. Mutasi transisi merupakan pergantian basa purin dengan basa purin lainnya atau basa pirimidin dengan basa pirimidin lainnya. Mutasi transversi adalah pergantian basa purin dengan basa pirimidin atau sebaliknya.



Gambar 6.12 Jenis mutasi titik DNA. Perubahan langkah tunggal adalah penggantian, adisi, atau delesi. Mutasi titik kedua pada gen yang sama dapat terjadi baik dalam mutasi ganda, reversion terhadap penekanan asli, atau intragenik. Dalam kasus ini, penekanan intragenik diilustrasikan dengan penambahan satu basa diikuti dengan penghapusan di sebelah bawah basa yang berbeda. (Tamarin, 2001)

2. Mutasi misens

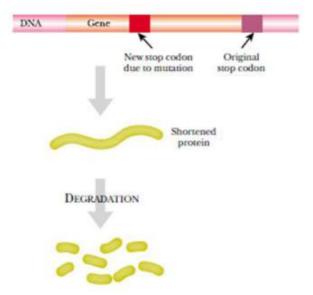
Mutasi misens yaitu perubahan suatu pasangan basa yang mengakibatkan terjadi perubahan satu kode genetika yang mengakibatkan asam amino berubah dan terjadi perubahan fungsi protein.



Gambar 6.13 Contoh mutasi misens (Sumber: Clark, 2005)

3. Mutasi nonsense

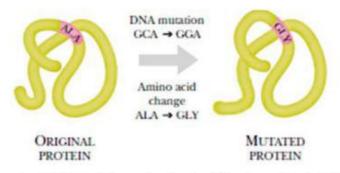
Mutasi nonsense adalah pergantian pasangan basa yang berakibat terjadinya perubahan pengkode asam amino menjadi kode terminasi. Terjadinya mutasi nonsense mengakibatkan polipeptida yang terbentuk tidak lengkap sehingga protein tidak fungsional.



Gambar 6.14 Contoh mutasi nonsense (Sumber: Clark, 2005)

4. Mutasi netral

Mutasi netral adalah pergantian suatu pasangan basa yang merubah kode genetika sehingga asam amino yang juga berubah tetapi tidak menimbulkan perubahan fungsi protein. Fungsi protein tidak berubah karena asam amino baru secara kimia ekivalen dengan asam amino mula-mula.



Gambar 6.15 Contoh mutasi netral (Sumber: Clark, 2005)

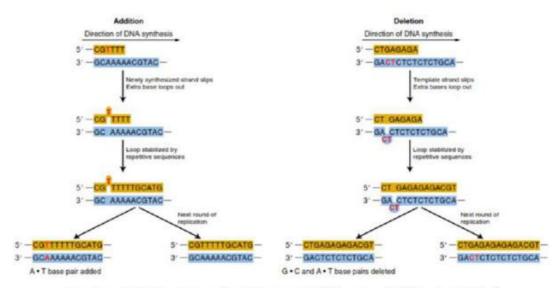
5. Mutasi diam

Mutasi diam adalah pergantian suatu pasangan basa yang merubah kode genetika tetapi tidak merubah asam amino sehingga tidak menimbulkan perubahan fungsi protein.

6. Mutasi frameshift

Mutasi titik dapat terdiri dari penggantian, penambahan, atau penghapusan basa. Mutasi Point yang menambah atau mengurangi basa adalah, berpotensi, efek yang paling menghancurkan pada sel atau organisme karena mereka mengubah kerangka membaca gen dari tempat mutasi dan seterusnya. Sebuah mutasi frameshift menyebabkan dua masalah. Pertama, semua kodon dari frameshift on akan berbeda dan dengan demikian menghasilkan (paling mungkin) protein yang tidak berguna. Kedua, informasi sinyal berhenti akan salah baca. Salah satu kodon baru mungkin kodon nonsense, yang menyebabkan terjemahan berhenti sebelum waktunya. Atau, jika perangkat terjemahan mencapai kodon

nonsense yang asli, maka tidak lagi dikenali karena hal itu dalam bingkai bacaan yang berbeda, dan oleh karena itu, proses penerjemahan berlanjut melampaui akhir gen.



Gambar 6.16 Contoh mutasi frameshift (Sumber: Griffith et al, 2007)

D. Mutasi Kromosom

1. Perubahan struktur

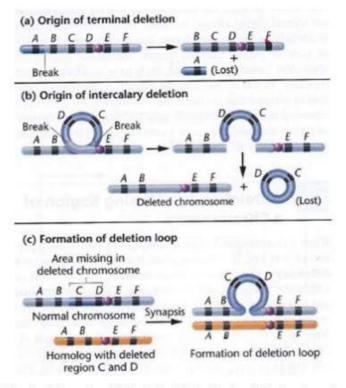
Delesi

Delesi adalah hilangnya suatu segmen materi genetik dari suatu kromosom akibat proses perubahan struktural. Bila delesi terjadi di bagian ujung kromosom maka disebut delesi terminal, sedangkan bila delesi terjadi bukan di ujung kromosom maka disebut delesi interkalar. Delesi dapat disebabkan faktor internal yaitu kesalahan saat proses rekombinasi dan faktor eksternal yaitu panas, radiasi, virus, serta senyawa kimia.

Delesi dapat dideteksi dengan bantuan analisis kariotipe. Jika bagian kromosom yang mengalami delesi cukup besar, dapat terlihat ketika kromosom-kromosom homolog disandingkan.

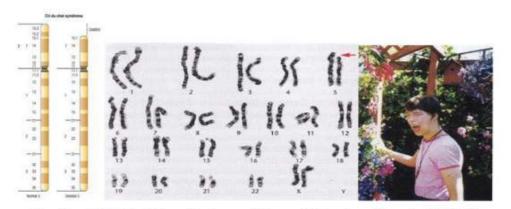
128

Selain itu, juga dapat dilakukan dengan bantuan pengamatan tentang ada tidaknya lengkungan disaat kedua kromosom homolog berpasangan (Gambar 6.17).



Gambar 6.17 Delesi terminal (a), delesi interkalar (b), dan lengkungan delesi saat kromosom homolog dipasangkan (Sumber: Klug et al., 2010)

Contoh delesi yang terkenal pada manusia adalah yang menimbulkan sindrom Cri-du-chat. Delesi penyebab timbulnya sindrom itu bersifat heterozigot. Delesi terjadi pada lengan pendek kromosom 5. Teriakan para bayi pengidap sindrom ini terdengar seperti bunyi meong kucing. Sindrom itu juga ditandai dengan ukuran kepala yang kecil, abnormalitas pertumbuhan yang parah, serta adanya keterbelakangan mental. Para penderita biasanya meninggal pada masa bayi atau awal masa kanak-kanak sekalipun ada juga yang tetap hidup hingga dewasa.

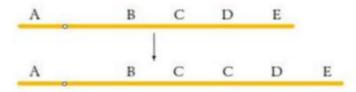


Gambar 6.18 Kariotipe sindrom cri-du-cat (Sumber: Klug et al., 2010)

Contoh delesi lain pada manusia adalah yang menimbulkan leukimia *myelositis* kronis. Delesi tersebut terjadi pada kromosom 22. Sebenarnya delesi pada kromosom 22 menimbulkan leukimia, berkenaan dengan delesi pada kromosom 22 tersebut juga mengalami translokasi menuju kromosom lain. Dalam hal ini sebagian lengan panjang kromosom 22 biasanya ditranslokasikan ke kromosom 9.

b. Duplikasi

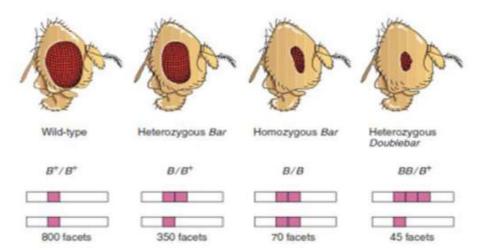
Duplikasi adalah mutasi kromosom yang terjadi karena keberadaan suatu segmen kromosom yang lebih dari satu kali pada kromosom yang sama. Jika segmen yang mengalami duplikasi itu berurutan maka disebut duplikasi tandem. Jika sebaliknya disebut reverse tandem, dan jika duplikasi terletak di ujung kromosom maka disebut duplikasi terminal.



Gambar 6.19 Duplikasi (Sumber: Griffith et al., 2007)

Satu contoh duplikasi adalah yang menimbulkan mata Bar pada *D. melogaster*. Individu *D. melogaster* yang bermata Bar memiliki mata serupa celah akibat berkurangnya faset mata. Pewarisan sifat mata Bar ini memperlihatkan ciri semidominan. Duplikasi yang menimbukan mata Bar terjadi atas segmen kromosom 16 A dari kromosom X.

Berkenaan dengan duplikasi sudah diketahui pula bahwa pada makhluk hidup eukariot, beberapa gen struktural mempunyai dua atau lebih kopi yang identik per genom. Di samping itu ada pula gen-gen struktural lain yang sudah terbentuk melalui duplikasi atas sesuatu gen purba, tetapi sudah berubah dan sekarang mengkode polinukleotida-polinukleotida yang agak berbeda. Contoh-contoh gen semacam itu adalah kelompok gen imonoglobulin dan kelompok gen globulin. Dalam hal ini sudah diketahui bahwa urut-urutan pada kelompok gen globulin α sangat mirip dengan yang terdapat pada kelompok gen globulin β .

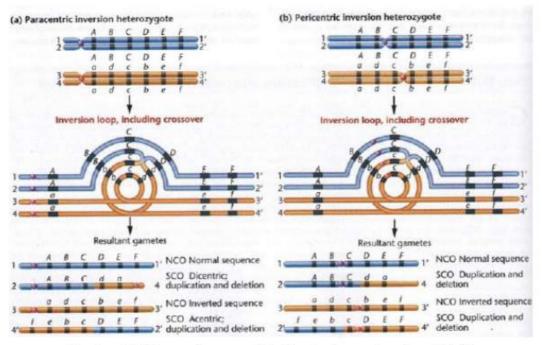


Gambar 6.20 Duplikasi yang menyebabkan mata bar pada *D. melanogaster* (Sumber: Tamarin, 2001)

c. Inversi

Inversi adalah pembalikan 180° segmen-segmen kromosom. Pada inversi ada materi genetik yang hilang. Dalam hal ini yang

terjadi adalah perubahan atau penataan kembali urutan linear gen. Ada dua macam inversi yaitu perisentrik dan parasentrik.



Gambar 6.21 Inversi parasentrik (a), dan inversi perisentrik (b) (Sumber: Klug et al., 2010)

Segmen yang mengalami inversi mungkin pendek atau panjang; bahkan dapat juga mencapai sentromer. Dalam hubungan ini jika inversi tersebut mencapai sentromer, maka itu adalah inversi perisentrik dan sebaliknya tidak mencakup sentromer maka itu adalah inversi parasentrik. Inversi parasentrik tidak mengakibatkan perubahan suatu lengan kromosom; sedangkan inversi perisentrik dapat menimbulkan perubahan panjang lengan kromosom. Dinyatakan lebih lanjut bahwa inversi dapat menghasilkan gamet-gamet yang menyimpang, dan sebagaimana yang telah dikemukakan inversi terbukti mempunyai peranan besar pada proses evolusi.

d. Translokasi

Pada translokasi terjadi perubahan posisi segmen kromosom maupun urutan gen yang terkandung pada kromosom itu. Translokasi dibedakan menjadi yang intrakromosom dan interkromosom. Pada translokasi intrakromosom, perubahan posisi segmen kromosom itu berlangsung di dalam satu kromosom, terbatas pada suatu lengan kromosom atau antar lengan kromosom. Translokasi interkromosom dibedakan menjadi yang nonresiprok dan resiprok. Pada translokasi interkromosom yang nonresiprok, terjadi perpindahan segmen kromosom dari sesuatu kromosom ke suatu kromosom lain yang nonhomolog. Pada translokasi interkromosomal yang resiprok terjadi perpindahan segmen kromosom timbal balik antara dua kromosom yang nonhomolog.

Pada individu-individu pengidap translokasi homozigot, dampak genetika dari translokasi adalah berupa perubahan pautan gen. Fenomena semacam itu terjadi pada translokasi intrakromosom maupun yang interkromosom (yang nonresiprok maupun resiprok). Dampak translokasi terhadap hasil meiosis berlangsung pada tipe translokasi yang diidap. Pada beberapa kasus, beberapa gamet yang dihasilkan juga mengalami duplikasi atau delesi, oleh karena itu seringkali tidak hidup, salaah satu perkecualian adalah sindrom Down familial yang terjadi akibat duplikasi yang disebabkan oleh translokasi. Dalam hal ini dikatakan bahwa sindrom Down familial ini disebabkan oleh translokasi Robertson. Pada translokasi Robertson yang memunculkan sindrom Down familial, lengan panjang kromosom 21 bergabung dengan lengan panjang kromosom 14 atau 15.

2. Perubahan jumlah

a. Fusi sentrik dan fisi sentrik

Fusi kromosom terjadi bila dua kromosom homolog bergabung membentuk satu kromosom, telah diketahui terjadi pada tiap kelompok tumbuhan maupun hewan yang besar sedangkan fisi kromosom terjadi bila satu kromosom terpisah menjadi dua. Fusi kromosom diperkirakan lebih sering terjadi dibanding fisi kromosom dan keduanya merupakan fenomena umum ditinjau dari sudut pandang evolusi.

Robertsonian changes disebut sebagai Robertsonian translocation karena juga akan sebagai peristiwa translokasi yaitu merupakan suatu tipe translokasi nonresiprok yang berakibat bergabungnya lengan-lengan panjang dari dua kromosom akrosentrik penggabungan tersebut hanya satu sentromer yang disertakan). Satu contoh Robertsonian translocation itu adalah yang menimbulkan terjadinya Familial Down Syndrome. Pada translokasi nonresiprok itu lengan panjang kromosom 21 bergabung dengan lengan panjang kromosom 14. Perkembangan selanjutnya fenotip normal akan berperan sebagai carrier akan memunculkan familial Down Syndrome disaat kawin dengan pasangan yang normal.

Familial Down Syndrome ini tidak sama dengan kelainan Down Syndrome yang dikenal dengan Downisme yang terjadi akibat trisomi 21 yang terkait dengan gagal berpisah kromosom 21 pada saat meiosis sebelumnya; sedangkan Familial Down Syndrome terjadi karena trisomi kromosom 21 khususnya lengan panjang (memang ada 3 buah lengan panjang kromososm 21) dan kejadiannya terkait dengan peristiwa gagal berpisah.

b. Aneuploidi

Aneuploidi adalah kondisi abnormal yang disebabkan oleh hilangnya satu kromosom atau lebih pada sesuatu pasang

kromosom, atau disebabkan oleh bertambahnya jumlah kromosom pada sesuatu pasang kromosom dari jumlah yang seharusnya. aneuploidi adalah yang pasangan kromosomnya Individu tertentu kehilangan satu atau lebih sari satu kromosom, atau juga bertambahnya satu atau lebih dari satu kromosom dari jumlah yang seharusnya pada pasangan itu. Aneuploidi terjadi pada pasangan kromosom yang tergolong autosom maupun gonosom.

Aneuploidi dibedakan menjadi nullisomi, trisomi, tetrasomi, pentasomi, dan sebagainya. Nullisomi terjadi kedua kromosom dari satu pasangan kromosom hilang, jumlah keseluruhan kromosomnya dinyatakan sebagai 2n-2. Monosomi terjadi hanya satu kromosom dari suatu pasangan kromosom hilang, dan jumlah keseluruhan kromosomnya dinyatakan sebagai 2n-1. Trisomi terjadi jika jumlah kromosom suatu pasangan kromosom bertambah satu, jumlah keseluruhan kromosomnya dinyatakan sebagai 2n+1. Tetrasomi terjadi jika jumlah kromosom suatu pasangan kromosom bertambah dua, jumlah keseluruhan kromosomnya dinyatakan sebagai 2n+2. Pentasomi terjadi jika jumlah kromosom suatu pasangan kromosom bertambah tiga, jumlah keseluruhan kromosomnya dinyatakan sebagai 2n+3. Trisomi, tetrasomi, dan seterusnya disebut dengan polisomi.

Aneuploidi dapat terjadi dari segregasi yang abnormal (ada peristiwa gagal berpisah) pada saat meiosis. Aneuploidi pertama kali dilaporkan oleh Bridges pada tahun 1916, di saat beliau menemukan fenomena gagal berpisah pada D. Malanogaster. Pada saat irtu ditemukan ada individu betina yang memiliki dua kromosom X dan satu kromosom Y.

Trisomi banyak ditemukan pada banyak tumbuhan termasuk tanaman budidaya pangan seperti padi, jagung, dan gandum. Pada tumbuhan, individu yang mengalami trisomi kadangkadang memperlihatkan tampilan yang berbeda dari individu normal. Contohnya pada tumbuhan Datura stramonium yang telah diketahui mempunyai 12 pasang kromosom. Tumbuhan Datura stramonium memperlihatkan tampilan yang berbeda-beda untuk ke dua belas alternatif trisomi yang mungkin terjadi

Seringkali trisomi menimbulkan dampak parah bahkan dapat bersifat letal terutama pada hewan, pada manusia trisomi pada kromosom no 13, 18, dan 21 serta kromosom X. Trisomi pada kromosom-kromosom tersebut menimbulkan dampak yang parah.

c. Poliploidi

Poliploidi merupakan penggandaan perangkat kromosom secara keseluruhan. Fenomena poliploidi sering terjadi pada tumbuhan dibandingkan spesies hewan. Pada spesies hewan poliploidi dapat dijumpai pada kelompok kadal, amfibi, ikan, hewan-hewan hermaphrodit seperti cacing tanah dan planaria, serta hewan-hewan partenogenetik seperti kumbang, udang, kupu malam dan salamander. Pada spesies tumbuhan, poliploidi terjadi hampir 47% pada tumbuhan angiospermae.

Beberapa alasan kenapa poliploidi jarang terjadi pada spesies hewan yaitu poliploidi mengganggu keseimbangan antara autosom dan kromosom kelamin yang bermanfaat untuk determinasi kelamin, kebanyakan hewan melakukan fertilisasi silang; dalam hal ini satu individu poliploid yang baru terbentuk tidak dapat bereproduksi sendiri, hewan memiliki perkembangan yang lebih kompleks yang dapat dipengaruhi oleh perubahan yang disebabkan oleh poliploidi misalnya dalam kaitan dengan ukuran sel yang akhirnya mengubah ukuran organ, jika di kalangan tumbuhan, individu-individu poliploid sering timbul duplikasi pada hibrid, tetapi di kalangan hewan hibrid-hibrid biasanya inviabel atau steril

Jumlah perangkat kromosom yang ganjil biasanya steril. Sedangkan perangkat kromosom yang genap berpeluang fertil karena masih adanya peluang kromosom-kromosom berpasangan selama meiosis. Poliploidi dapat terjadi karena penyimpangan meiosis dan mitosis. Poliploidi dapat terjadi karena penyimpangan selama meiosis yang menghasilkan gamet-gamet yang tidak mengalami reduksi, jika suatu gamet yang tidak mengalami reduksi itu bergabung dengan suatu gamet normal (haploid) maka zigot yang terbentuk tergolong triploid dan sebagainya. Berkenaan dengan kejadian poliploid selama mitosis, poliploid dapat juga terjadi akibat penggandaan jumlah perangkat kromosom di dalam sel-sel somatik secara spontan. Dalam hal ini replikasi kromosom berlangsung tanpa diikuti oleh pembelahan sel. Pada kondisi ini, individu diploid dapat berakibat terbentuknya kelompok sel (jaringan) tetraploid dan sebagainya.

Poliploidi dibedakan menjadi autopoliploidi dan allopoliploidi. Autotetraploidi dapat terjadi akibat pembuahan suatu gamet diploid oleh satu gamet haploid, gamet diploid terjadi akibat kegagalan pemisahan kromosom selama meiosis. perangkat kromosom pada peristiwa autopoliploidi ini berasal dari spesies yang sama dan tidak melibatkan spesies yang lain.

Pada autopoliploidi seperti autotriploidi dapat dibentuk melalui perlakuan. Perlakuan yang dapat diberikan adalah perlakuan dengan tekananan hidrostatik, kejutan panas dan dingin. Pada umumnya ukuran individu autopoliploid lebih besar daripada ukuran pada kondisi diploid, seperti misalnya bunga atau buah tanaman bertambah besar, hal ini disebabkan karena makin besarnya ukuran sel dan bukan peningkatan jumlah sel.

Allopoliploidi merupakan poliploidi yang melibatkan spesies lain, yang biasanya perangkat kromosom lain berasal dari spesies yang berkerabat dekat. Contohnya, misal terjadi hibridisasi antar spesies A (yang berkromosom a₁, a₂, a₃, ..., a_n) dan spesies B (yang berkromosom b₁, b₂, b₃, ..., b_n) menghasilkan hibrid AB. Hibrid itu

mungkin steril karena ketidakmampuan menghasilkan gamet yang viabel, sebagai akibat kromosom-kromosom dari kedua spesies itu tidak dapat melakukan sinapsis selama meiosis yang menimbulkan kondisi genetik yang tidak seimbang. Tetapi jika hibrid tersebut penggandaan kromosom mengalami secara terbentuk tetrapioid AABB. Pada gambar dibawah menghasilkan allotetraploid. Jika suatu individu hibrid menganding dua genom diploid yang lengkap, maka disebut juga amphidiploid.

RANGKUMAN

- 1. Mutasi adalah perubahan materi genetik yang dapat diwariskan dan tiba-tiba yang terjadi pada gen atau kromosom. Mutasi prupakan peristiwa yang lumrah terjadi.
- Mutasi spontan adalah perubahan materi genetik yang terjadi tanpa sebab-sebab yang jelas, sedangkan mutasi terinduksi ialah terjadi karena pemaparan makhluk hidup yang disebabkan oleh radiasi pengion, radiasi ultraviolet, dan berbagai senyawa kimia.
- Mutasi gen antara lain mutasi pergantian basa, mutasi misens, mutasi nonsense, mutasi netral, mutasi diam, dan mutasi frameshift
- 4. Mutasi kromosom terdiri dari 2 yaitu perubahan struktur (delesi, duplikasi, inversi, dan translokasi) dan mutasi perubahan jumlah (fusi sentrik, fisi sentrik, aneuploidi, poliploidi, dan monoploidi).

EVALUASI

 Mutasi dapat disebabkan oleh faktor internal dan faktor lingkungan. Sebut dan jelaskan penyebab mutasi oleh faktor lingkungan!

- Macam mutasi gen antara lain mutasi misens, nonsense, netral, diam, dan perubahan rangka. Jelaskan maksud mutasi-mutasi tersebut dan berilah contoh mutasinya!
- Jelaskan maksud aneuploidi dan poliploidi dan berilah contohnya!
- 4. Salah satu jenis mutasi kromosom adalah delesi. Jelaskan kelainan-kelainan yang disebabkan adanya delesi tersebut pada kromosom!

REFLEKSI BELAJAR

Setelah mempelajari materi ini,

- 1. Tuliskan hal baru apa saja yang Saudara peroleh!
- 2. Bagian mana dari materi ini yang sulit Saudara pahami?
- 3. Apa saja upaya belajar Saudara pada materi ini?
- 4. Apa saja manfaat/ dampak yang Saudara peroleh setelah mempelajari materi ini?

DAFTAR RUJUKAN

- Corebirg, A. D. 2000. *Genetika Mutasi dan Rekombinasi*. Malang: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang.
- Gardner, E.J., dkk. 1991. *Principle of Genetic 8th Edition*. New York: Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: John Wiley and Sons Inc.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., Suzuki, D.T., & Miller, J.H. 2007. *An Introduction to Genetic* 9th Edition. W. H. Freeman and Company.

Irawan, B. 2008. *Genetika Molekuler*. Surabaya: Airlangga University Press.

- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A. 2010. Essentials of Genetics 7th Edition. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L., Darnell, J. 2003. Molecular Cell Biology 5th Edition. New York: Freeman, W. H. & Company
- Tamarin, R.H. 2001. Principles of Genetics 7th Edition. The McGraw-Hill Companies

14) GENETIKA PRINSIP DASAR BERBASIS PENELITIAN DI PERGURUAN TINGGI

BAGIAN VII VARIASI GEN *TI* PADA *J. CURCAS*

Indikator Capaian Pembelajaran

- Mahasiswa dapat menjelaskan tahapan isolasi DNA genom pada J. curcas
- Mahasiswa dapat menjelaskan deteksi hasil isolasi DNA genom pada J. curcas
- Mahasiswa dapat menjelaskan proses amplifikasi gen TI pada J. curcas.
- Mahasiswa dapat mengolah data hasil sekuensing
- Mahasiswa dapat membaca dan menyimpulkan hasil olahan data

A. Pendahuluan

Penelitian yang mengungkapkan gen spesifik yang bertanggung jawab terhadap cekaman biotik sekaligus abiotik pada *J. curcas* masih terbatas. Salah satu jenis gen yang penting untuk dikaji lebih lanjut adalah gen *TI (Trypsin Inhibitor)*. Gen *TI* mampu meregulagi ketahanan tanaman dari faktor biotik dan abiotik (Sanchez et al., 2004; Srinivasan et al., 2009). *Trypsin inhibitor* terdeteksi pada tanaman yang kekurangan garam (Shan et al., 2008; Srinivasan et al., 2009; Kidric et al, 2014), cekaman kekeringan (Kidric et al, 2014), tolerangin barena serangan serangga (Lawrence & Koundal, 2002; Fan & Wu, 2005; Srinivasan et al., 2009; Anandhan et al, 2010; Mendoza-Blanda & Casaretto, 2012), dan aplikasi ABA dan jasmonate (Sanchez et al., 2004; Srinivasan et al., 2009). Primandiri dkk (2012) melaporkan terdeteksinya gen *TI* dengan ukuran pita 415 bp pada *J. curcas*. Tetapi, hasil yang didapatkan memerlukan

verifikasi sekuen sebagai upaya awal mengetahui potensi gen TI untuk upaya pemuliaan jarak pagar untuk ketahanan terhadap biotik dan abiotik.

Untuk mendeteksi gen harus melalui tahapan isolasi DNA, amplifikasi gen target, dan membaca hasil sekuen gen target tersebut. Tahapan-tahapan tersebut akan dijelaskan lebih lanjut pada bagian VI ini.

B. Data Molekuler

1. Isolasi DNA Genom J. curcas

Adanya polisakarida dalam tanaman ditandai kekentalan pada hasil isolasi DNA, menyebabkan penghambatan aktivitas Tag polymerase dalam reaksi PCR. Oleh karena itu, diperlukan suatu teknik isolasi DNA genom tanaman yang tepat sehingga diperoleh kualitas DNA yang baik bagi proses amplifikasi PCR. Pada isolasi DNA genom J. curcas, bahan kimia yang dibutuhkan dijelaskan pada Tabel 7.1.

Tabel 7.1 Bahan Kimia dan Fungsinya yang Digunakan dalam Isolasi DNA Genom J. curcas

No.	Nama Bahan	Fungsi	Keterangan
1.	Nitrogen cair	Untuk membekukan daun sehingga mempermudah proses penggerusan dan menjaga agar DNA tidak mengalami kerusakan	Larutan ini berwarna bening, sangat dingin, berasap, dan bersifat cepat menguap.
2.	Aquadest	Sebagai pelarut	Digunakan aquadest steril
3.	EDTA (Etylen Diamine Tetra Acetic acid)	 Melindungi DNA dari aktivitas endogeneus nuclease Stabilitator DNA dan pembentu 145 kompleks (chelat) Mengikat lipid pada membran sel sehingga membran sel akan hancur dan menjadi lisis 	 Merupakan pengkelat ion yang dibutuhkan sebagai kofaktor sebagian besar nuklease Konsentrasi EDTA yang digunakan adalah 0,5 M

4.	Tris HCI	Buffer untuk menjaga pH larutan. pH larutan adalah 8	Konsentrasi Tris-HCl yang digunakan adalah 2 M
5.	Glukosa	Meningkatkan tekanan osmosis di luar sel yang mampu membantu proses pelisisan	Konsentrasi yang digunakan adalah 1 M
6.	PVP (polyvinyl pyrrolidone)	Mengurangi <i>broning</i> akibat kandungan fenol	
7.	CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromida)	Melarutkan membran plasma sel dan akan membentuk kompleks dengan protein dan polisakarida, tetapi tidak mengendapkan asam nukleat	 Merupakan detergen Konsentrasi yang digunakan adalah 5%
8.	NaCl	 Menjaga struktur doubel helix DNA Memisahkan molekul DNA dari komponen lainnya dengan cara membentuk ikatan ionik dengan asam nukleat (kondisi ionik yang lebih stabil) 	Konsentrasi yang digunakan adalah 5 M
9.	Na-bisulfit	Menyelubungi ion negatif pada ujung struktur DNA sehingga dapat meningkatkan daya presipitasi DNA terhadap alkohol dingin	Ditambahkan saat akan melakukan isolasi
10.	NaOAc	Untuk membuang garam dan mengendapkan protein	Konsentrasi yang digunakan adalah 3 M
11.	Chloroform	Untuk menghilangkan protein Untuk menstabilkan ikatan tidak stabil antara lapisan organik dan aquaeus	 Bahaya jika tertelan Bisa iritasi ke kulit Menghirup chloroform dalam jangka panjang akan berbahaya bagi kesehatan
12.	Isoamilalkohol	 Untuk menghilangkan protein Sebagai larutan penstabil dan mencegah adanya busa 	
13.	Etanol absolut	Untuk presipitasi	 Sangat mudah terbakar Mudah menguap sehingga tutup harus bener-benar rapat

14.	Etanol 70%	Untuk mencuci DNA dari etanol absolut	
		 Untuk membuang kontaminan yang masih tersisa 	
		 Meningkatkan konsentrasi DNA genom yang terbentuk 	

(dirangkum dari berbagai sumber)

Isolasi DNA genom J. curcas dapat dilakukan berdasarkan metode dari Doyle & Doyle yang dimodifikasi oleh Maftuchah & Zainudin (2007). Buffer ekstraksi dan buffer lisis yang digunakan dalam isolasi DNA dijelaskan pada Tabel 7.2.

Tabel 7.2 Larutan, Konsentrasi, dan Volume yang Digunakan dalam Isolasi DNA Genom J. curcas

No.	Nama larutan	Bahan	Konsentrasi	Volum	Keterangan
1.	Buffer	Glukosa	1 M	60 ml	Na-bisulfit
	ekstraksi	PVP	¥	2 g	dicampur pada
		Tris-HCI (pH 8)	2 M	5 ml	saat akan isolasi dan volumenya
		EDTA (pH 8)	0,5 M	1 ml	tergantung
		Aquadest	¥*		banyaknya sampel (1
		Na-bisulfit		0,02 g	sampel = 0,0017 g).
2.	Buffer lisis	CTAB	5%	40 ml	 Semua bahan
	(pH 8)	163	7	2 g	dilarutkan dengan
	2741 - 82	Tris-HCI (pH	2 M	5 ml	aquadest sampai
		8)			100 ml.
		EDTA (pH 8)	0,5 M	1 ml	
		NaCl	5 M	28 ml	
		Aquadest			

3.	CI (Chloro- form- Isoamil- alkohol) (24:1)	Chloroform Isoamilalkoho	ol	24 ml 1 ml	 Disimpan dalam botol yang dibungkus dengan aluminium foil Berfungsi untuk memisahkan DNA dari membran sel yang memiliki berat molekul lebih besar
4.	Buffer TE	Tris-HCI EDTA Aquadest	1 M 0,5 M	2 ml 0,4 ml	Sebagai pelarut DNA Ditambah aquadest sampai volume 100 ml

Proses isolasi DNA genom *J. curcas* adalah sebagai berikut.

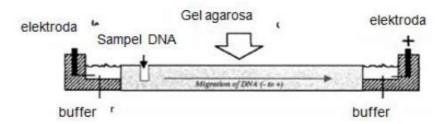
- a. Menimbang Na-bisulfit sebanyak 0,02 gram untuk 12 sampel.
- b. Menggerus daun dengan nitrogen cair hingga homogen lalu menambahkan 800 µl buffer ekstraksi yang sudah dicampur dengan Na-bisulfit.
- c. Menginkubasi sampel ke dalam freezer selama 5 menit. Kemudian sentrifus 12000 rpm/4ºC selama 8 menit.
- d. Membuang supernatan dan menambah endapan dengan 500 ul buffer lisis.
- e. Memvorteks sampel dan menginkubasi dengan suhu 65°C selama 30 menit dan membolak-balik sampel setiap 10 menit.
- f. Menambahkan larutan Chloroform-Isoamil (24:1) sebanyak 500 μl. Kemudian sentrifuge 12000 ppp/4°C selama 12 menit.
- g. Mengambil supernatan untuk dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml baru dengan menggunakan mikropipet.
- h. Untuk mendapatkan hasil yang bagus, langkah g dapat diulang dua kali.
- i. Menambahkan *ethanol absolut* 800 µl dan NaOAc 3 M 80 µl dan membolak-balik hingga homogen. Kemudian sentrifuge 12000 rpm/4ºC selama 8 menit.

- j. Membuang supernatan dan endapan dicuci dengan ethanol 70% 800 μl. Men-sentrifuge 12000 rpm/4°C selama 8 menit.
- k. Supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringanginkan semalam.
- Menambahkan TE 25 μl pada pelet kering DNA. Penambahan senyawa TE dilakukan untuk menghindari kerusakan DNA genom hasil isolasi dari endonuklease selama proses penyimpanan. Senyawa Tris berfungsi untuk mempertahankan pH, sedangkan senyawa EDTA yang terkandung untuk menghambat aktivitas DNAse.

Deteksi hasil isolasi

Ukuran molekul DNA teramat kecil sehingga tidak dapat dilihat secara kasat mata. Elektroforesis DNA merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan antara lain agarosa. Elektroforesis gel agarosa dapat dilakukan untuk memisahkan sampel DNA dengan ukuran dari beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa (bp).

Elektroforesis merupakan metode standar yang digunakan untuk memisahkan berbagai molekul organik seperti DNA dengan medan listrik sebingga berat molekul fragmen dapat diidentifikasi (Ausubel, 1998). Molekul DNA bermuatan negatif (anjon) sehingga jika dimasukkan ke dalam sumur gel dan diberi medan listrik, maka DNA akan bermigrasi melalui gel dari kutub negatif (anoda) ke kutub positif (katoda) (Clark, 2005).



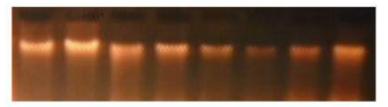
Gambar 7.1 Perangkat elektroforesis dan gel agarosa untuk migrasi DNA (Sumber: Walker & Rapley, 2002)

Elektroforesis menunjukkan hasil yang positif jika menghasilkan pola pita-pita (bands) yang jelas dan tidak smearing (berbayang) (Klug & Cumming, 1994). Beberapa faktor yang mempengaruhi laju migrasi DNA pada gel agarosa antara lain ukuran fragmen DNA, konformasi DNA, besarnya arus listrik, konsentrasi, dan jenis gel, lamanya waktu elektroforesis, serta komposisi buffer yang digunakan. Molekul DNA penanda atau marka digunakan untuk mengetahui ukuran molekul-molekul DNA hasil isolasi, restriksi, maupun purifikasi.

Tahapan proses elektroforesis adalah sebagai berikut.

- a. Menutup bagian samping tray dengan menggunakan karet penutup.
- b. Memanaskan gel agarose 0,8% dengan menggunakan *microwave* sampai mencair sempurna.
- Menunggu sampai larutan agarose agak dingin.
- d. Menuang larutan agarose ke dalam tray, menghindari gelembung udara.
- e. Memasukkan comb ke dalam larutan agarose sebelum membeku.
- f. Setelah agarose menjadi gel dengan sempurna (paling cepat 15 menit) karet dan comb dilepas dengan hati-hati agar gel tidak patah dan gel agarose siap untuk digunakan untuk melakukan elektroforesis.

- g. Memasukkan gel agarose yang telah beku ke dalam electrophoresis apparatus.
- h. Memasukkan buffer elektroforesis (TBE 1X) ke dalam electrophoresis apparatus hingga gel terendam sempurna.
- Mencampur sejumlah sample DNA dengan 0,2 volume buffer loading. Menyalakan power supply. Proses elektroforesis berlangsung selama ± 45 menit.
- Setelah proses elektroforesis selesai, gel diangkat dari apparatus.
- k. Merendam gel agarose dalam larutan *ethidium bromide* (*EtBr*) pada box plastik khusus. Secara alami DNA tidak memiliki warna sehingga gel dapat diwarnai dengan *ethidium bromide* (*EtBr*) yang berikatan dengan kuat dan spesifik pada DNA.
- Meletakkan box pada shaker, didiamkan selama 20 menit. Setelah selesai, gel dikeluarkan dari box.
- m. Gel dicuci dengan air selama 15 menit untuk menghilangkan kelebihan *ethidium bromide* pada gel.
- n. Gel agarose dipotret dengan menggunakan alat pemotret gel (*Geldock*). Hasilnya digambarkan pada Gambar 7.2.

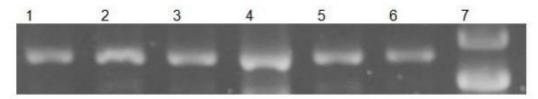


Gambar 7.2 Pita DNA Hasil Isolasi Genom J. curcas (Sumber: Primandiri, 2012)

C. Amplifikasi Hasil Isolasi

Pada 142 ksi PCR, DNA jarak pagar hasil isolasi digunakan sebagai cetakan. Primer yang digunakan dalam reaksi PCR ini adalah sepasang primer gen *CpTI* dengan urutan basa *CpTI*-F (5'-ATG AAG AGC ACC ATC TTC TTT GCT C-3') dan *CpTI*-R (5'-CTT ACT CAT CAT CTT CAT CCC

TGG-3') (Zhang et al, 2004). Volume total reaksi PCR yang dipergunakan adalah sebanyak 25 µl, terdiri dari campuran larutan yang terdiri dari DNA tag polimerase dan 10X buffer Tag Polimerase (100 mM Tris-Cl, pH 8.3; 500 mM KCI; 15 mM MgCI, 0.01% gelatin); dNTP'S mix (dGTP, dATP, dTTP dan dCTP) (Recho); dH,0 dan DNA cetakan. Kondisi untuk reaksi PCR dirancang dengan suhu pradenaturasi 94°C (5 menit), denaturasi 94°C (1 menit), penempelan primer 40°C (1 menit), perpanjangan 72°C (2 menit) dan pasca PCR 4°C (2 menit). Untuk perbanyakan, siklus reaksi PCR diulang sebanyak 35 kali. Hasil amplifikasi PCR kemudian dirunning dalam proses elektroforesis pada 2% gel agarose dengan voltase 25 Volt selama 5 jam dan selanjutnya dilakukan pemotretan gel. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 7.3.

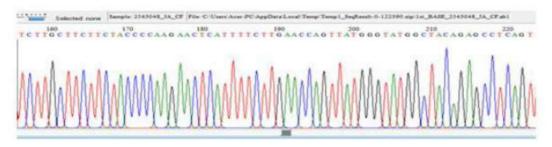


Gambar 7.3 Pola Pita DNA J. curcas Hasil PCR Menggunakan Primer Gen TI aksesi IP3A (lajur 1), IP3P (lajur 2), nomor 5 (lajur 3), nomor 6 (lajur 4), nomor 7 (lajur 5), nomor 18 (lajur 6), marker 1000 bp (lajur 7) (Sumber: Dokumen Pribadi)

Gen TI dari tanaman sampel diamplifikasi dengan panjang berkisar 400-500 bp setelah divisualisasikan pada gel agarosa 2% (Gambar 6.3). Pada semua sampel J. curcas terdapat pita DNA dengan ukuran pita sejumlah 450 bp (base pair). Menurut Zhang et al. (2004) ukuran gen TI adalah 450 bp, sehingga produk hasil PCR tersebut sesuai dengan ukuran gen TI. Secara visual, pita yang nampak memiliki ketebalan pita yang berbeda, namun memiliki ukuran yang relatif sama yaitu 450 bp.

D. Mengolah Data Hasil Sekuensing

amplifikasi selanjutnya disekuensing. Data hasil sekuensing berupa urutan nukleotida fragmen gen TI kemudian disejajarkan dengan aksesi pembanding yaitu IP3A dan IP3P dengan menggunakan program BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5, MEGA 7.0, Clustal X. Program-program ini dikembangkan untuk mempermudah peneliti mempelajari materi genetik berbasis sekuensing. Data hasil sekuensing dilihat menggunakan program (Gambar 7.4).



Gambar 7.4 Kromatogram gen TI J. curcas sampel aksesi IP3A hasil sekuensing (Sumber: Dokumen pribadi)

Pensejajaran sekuen untuk membandingkan sekuen-sekuen yang homolog dengan mengidentifikasi insersi, delesi, maupun substitusi (Graur & Li, 2000). Berdasarkan hasil pensejajaran ini, dapat didentifikasi mutasi yang terjadi. Hasil pensejajaran menggunakan program *BioEdit* ditunjukkan pada Gambar 7.5.

1	DII	∑ 8 co + E	銀羅紅手		EATEN !!!	₩м.	I	Scroll speed slow • 4 fas	
	+	180	190	200	210	220	230	240	
0000	Jc-IP3A Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 ig-0	CTTCCCTCTTC CTTCCCTCTTC CTTCCCTCTTC	CATCTCTCTTT CATCTCTCTTT CATCTCTCTTT CATCTCTCTTT CATCTCTCTTT	CTTGCTTCTT CTTGCTTCTT CTTGCTTCTT CTTGCTTCTT	CTACCCCAAG CTACCCCAAG CTACCCCAAG CTACCCCAAG CTACCCCAAG	AACTCATTTT AACTCATTTT AACTCATTTT AACTCATTTT AACTCATTTT	CTTGAAC CTTGAAC CTTGAAC CTTGAAC	CAGTTATGGTAT CAGTTATGGGTAT CAGTTATGGGTAT CAGTTATGGGTAT CAGTTATGGGTAT CAGTTATGGGTAT	GGC GGC GGC GGC

Gambar 7.5 Penjajaran sekuen gen TI Jatropha curcas (aksesi IP3A, IP3P, nomor persilangan 18, 7, 6, dan 5) dengan program BioEdit (Sumber: Dokumen pribadi)

A. Membaca dan Menyimpulkan Hasil

Hasil sekuensing gen TI yang diperoleh dari enam sampel yaitu sepanjang 59% 04, disejajarkan menggunakan program BioEdit dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 7.6.

Jc-IP3A	1 7	TGAA	GAGCA	CC	ATCTTCTT	TG	CTCGTTGT	CTA	TT-C	AA-ATATC	GT 4	6
JC-IP3P	1 .			12/02							A 4	6
Jc-18	32		2222					11 35				
Jc-5	-								c	.TC		10.00
Jc-7	1 .											7
JC-6	7					-					7.7	
00-0				*		+.+			. Ch. 1.		10.7	0
JC-IP3A	47	CCTA	GAAGA	T C	CGGGAGAT	T C	TGAATGAA	A TCT	G CAGGA	TCTTCCT	TTC	95
Jc-IP3P	47											95
Jc-18	47					T						95
Jc-5	49											97
Jc-7	48		T				C					96
Jc-6	49	C					C	T	.T			98
Jc-IP3A	96	CAAA	CTGTC	C -	AGATTTCC	T A	CAGGATTT	C TAT	CTGTATG	GCTCTCC	ATT	144
Jc-IP3P	96											144
Jc-18	96											144
Jc-5	98											
Jc-7	97			7		4 050						
Jc-6	99	THE RESERVE		170		17 (20)						
Jc-IP3A	145	TAA	AACTT	TC	CTACCTTC	cc i	PCTTCCCT	CT TO	ATCTCTC	T TTCTTG	CTTC	194
JC-IP3P	145											194
Jc-18	145											194
Jc-5	147											196
JC-7	146											L
Jc-6	149		1000000	200								
	110				******	15.17						1.70
Jc-IP3A												
	195	TTC	TACCO	CA	AGAACTCA	TT :	PTCTTGAA	CC AC	TTATGGG	T ATGGCT	ACAG	
Jc-IP3P		-	TACCO	-	AGAACTCA		PTCTTGAA	-				
Jc-IP3P Jc-18				-								244
	195											244
Jc-18	195			• •		••						244 244 246
Jc-18 Jc-5	195 195 197		 	• •								244 244 246 245
Jc-18 Jc-5 Jc-7	195 195 197 196 199	•••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		**	· , • , • , • , • , • , • , • , • , • ,					244 246 246 248
Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6	195 195 197 196 199	AGC		 		CT !		AT G		a TCGATA	GAAA	244 244 246 245 246
Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A	195 195 197 196 199	AGC	CTCAG	- T	TCCATGTT	CT!	rgctgttg	AT G	TAGCCTO	A TCGATA	GAAA	244 244 245 245 248 293 293
Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P	195 195 197 196 199 245 245	AGC	CTCAG	- T	TCCATGTT	CT !	rgctgttg	AT GA	TAGCCTC	A TCGATA	GAAA	244 246 246 248 248 293 293 293
Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P Jc-18 Jc-5	195 197 196 199 245 245 245 247	AGC	CTCAG	- T	TCCATGTT	CT!	rgctgttg	AT G	TAGCCTC	A TCGATA	GAAA	244 246 246 245 248 293 293 293
Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P Jc-18	195 195 197 196 199 245 245 245	AGC	CTCAG		TCCATGTT	CT!	rgctgttg	AT G	TAGCCTC	A TCGATA	GAAA	244 244 246 245 248 293 293 293 293

JC-IP3A		the second section is not a second section.					
	294	ATTGATTGAA	AGGCTTCTTA	AAACATCTTC	TTATCATGGT	AGGTTTACTT	343
JC-IP3P	294						343
JC-18	294				100000000000000000000000000000000000000		343
JC-5	296						345
(T-1) T	-				Major Carlo Tolk		1000
Jc-7	295						344
JC-6	299			T			348
JC-IP3A	344	TTCTTTATT	AATCTGGTTT	CTTAAAATTC	TTGTGATCTT	TGAAATTGGT	393
JC-IP3P	344						393
Jc-18	344						393
Jc-5	346					* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	395
Jc-7	345						394
JC-6	349						398
JC-IP3A	394	TATTGATTGT	TATTCTTCTT	TTGTTTGTGT	AGTTACTGCA	GTTGATTCAG	443
JC-IP3P							443
JC-18	394						443
(B) (C)							
JC-5	396				THE RESIDENCE OF THE PARTY.	The second secon	445
JC-7	395						444
JC-6	399			********			448
JC-IP3A	444	GARGTARAGE	THTTCC3 CTTC	TTGGGTTTAA	ATGRAGRAGA	ACAGATAGAT	493
JC-IP3P	The second second	-			The state of the s	THE	493
			202000000000000000000000000000000000000			A CONTRACTOR OF THE PARTY OF TH	493
Jc-18	444						
Jc-5	446		THE RESERVE OF THE PARTY OF THE PARTY.				495
JC-7	445						494
JC-6	449						498
TC-TP35	494	TCASACCTTA	CCTCTCTTTC	CCCTCCACCT	CATCATCATC	BACATOTTCA	543
Jc-IP3A	- 12-12-12-12-12-12-12-12-12-12-12-12-12-1		THE RESERVE OF THE PARTY OF THE PARTY.	CCCTCCAGGT			543
JC-IP3P	494	TCAAACCTTA	******	********		*******	543
Jc-IP3P Jc-18	494 494		******				543 543
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5	494			********			543 543 545
Jc-IP3P Jc-18	494 494						543 543
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5	494 494 496						543 543 545
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7	494 494 496 495						543 543 545 544
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6	494 494 496 495 499						543 543 545 544 548
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6	494 494 496 495 499	AGTAAATTTG	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P	494 494 496 495 499 544 544	AGTAAATTTG	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P Jc-18	494 494 496 495 499 544 544	AGTAAATTTG	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P	494 494 496 495 499 544 544	AGTAAATTTG	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P Jc-18	494 494 496 495 499 544 544	AGTAAATTTG	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7	494 494 496 495 499 544 544 546 545	AGTAAATTTG	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592 594 592
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P Jc-18 Jc-5	494 494 496 495 499 544 544 544 546	AGTAAATTTG	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592 594
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7	494 494 496 495 499 544 544 546 545	AGTAAATTTG	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592 594 592
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6	494 494 496 495 499 544 544 546 545 549	AGTAAATTTG	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592 594 592
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-1P3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6	494 496 495 499 544 544 546 545 549	AGTAAATTTG	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592 594 592
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-1P3P Jc-5 Jc-7 Jc-6	494 496 495 499 544 544 546 545 549 592 592	AGTAAATTTG GAGTAAG 598598	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592 594 592
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6	494 494 496 495 544 544 546 545 549 592 592 593	GAGTAAG 598	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592 594 592
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-1P3P Jc-5 Jc-7 Jc-6	494 496 495 499 544 544 546 545 549 592 592	GAGTAAG 598	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592 594 592
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6	494 494 496 495 544 544 546 545 549 592 592 593 595	GAGTAAG 598	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592 594 592
Jc-IP3P Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6 Jc-IP3A Jc-18 Jc-5 Jc-7 Jc-6	494 494 496 495 544 544 546 545 549 592 592 593 595	GAGTAAG 598598598601	ATCATTACAG	ATTA-CT-GT	ATGCCAGGGA	TGAAGATGAT	543 543 545 544 548 591 591 592 594 592

Gambar 7.6 Penjajaran Sekuen Gen Trypsin Inhibitor pada J. curcas

Berdasarkan Gambar 7.6, panjang sekuen gen yang berhasil diamplifikasi cukup bervariasi. Panjang sekuens gen TI pada sampel Jc-IP3A dan Jc-IP3B mencapai 598 bp. Adapun panjang sekuen gen TI pada sampel Jc-18 dan Jc-7 juga sama yaitu 599 bp. Sedangkan pada sampel Jc-6 dan Jc-5 masing – masing sejumlah 604 dan 601 bp.

Selain panjang sekuen gen TI yang berbeda pada beberapa sampel, juga ditemukan perbedaan basa nukelotida. Berdasarkan penjajaran sekuen pada Gambar 7.6, ditemukan perbedaan pada beberapa tapak. Perbedaan basa nukleotida tersebut dikelompokkan menjadi dua yaitu insersi dan subtitusi. Jumlah tapak yang mengalami insersi sejumah 9 tapak, sedangkan yang mengalami subtitusi sejumlah 15 tapak.

Insersi terjadi pada sampel nomor persilangan 18 (Jc-18), 5 (Jc-5), 7 (Jc-7), dan 6 (Jc-6) jika dibandingkan dengan dua sampel lainnya sebagai pembanding yaitu IPA3A (Jc-IP3A) dan IP3P (Jc-IP3P). Kesembilan tapak yang mengalami insersi antara lain tapak nomor 35, 37, 39, 43, 85, 111, 259, 575, dan 578.

Pada tapak 35, sampel yang mengalami insersi adalah nomor persilangan Jc-5. Pada tapak 37, ada dua sampel yang mengalami perubahan dengan pola insersi yaitu sampel Jc-7 dan Jc-6. Adapun pada tapak 39 dan 43, masing - masing hanya ada satu sampel yang mengalami insersi pada gen TI-nya yaitu secara berurutan nomor persilangan Jc-6 dan Jc-5. Berikutnya tapak 85, 111, dan 259 juga ditemukan insersi dan terjadi hanya pada satu sampel yaitu Jc-6. Pada tapak 575, insersi hanya ditemukan pada sampel Jc-18, sedangkan pada tapak 578 pada sampel Jc-5 dan Jc-6. Pola insersi juga dapat dibaca secara paralel sebagai berikut. Insersi yang terjadi pada sampel Jc-5 dapat ditemukan pada pada tapak 35, 43, dan 578, pada sampel Jc-18 tapak 575, pada sampel Jc-7 tapak 37, dan sampel Jc-6 tapak 37, 39, 85, 111, 259, 578.

Perbedaan basa nukleotida yang ditemukan dari hasil analisis penjajaran sekuen gen TI sampel pada penelitian ini adalah subtitusi. Subtitusi pergantian basa oleh basa yang lain, menyebabkan perubahan pada tapak tersebut. Ada 15-tapak yang mengalami subtitusi. Substitusi basa terdiri dari transisi dan transversi. Substitusi transisi adalah perubahan basa purin oleh basa purin lainnya ($T \leftrightarrow C$) atau basa pirimidin oleh basa pirimidin reng lain (A ↔ G). Pada subtitusi transversi terjadi perubahan basa purin oleh basa pirimidin atau sebaliknya. Pergantian basa yang jarang terjadi adalah transisi yaitu 5 tapak, yaitu tapak ke-36 mengalami pergantian basa $T \leftrightarrow C$, pada tapak ke-31, 71, dan 292 mengalami pergantian basa C↔T,dan pada tapak ke-138 mengalami pergantian basa A ↔ G. Transversi terjadi pada tapak ke-34, 42, 57, 80, 132, dan 323 yaitu perubahan A \leftrightarrow T, pada tapak ke-49 yaitu perubahan G↔T, pada tapak ke-54 dan 75 yaitu perubahan $A \leftrightarrow C$.

Variasi tapak yang mengalami perubahan subtitusi juga dapat dibaca secara paralel pada setiap sampelnya. Jika dibandingkan dengan aksesi Jc-IP3A dan Jc-IP3P sebagai aksesi acuan, sampel nomor persilangan Jc-18 mengalami dua kali subtitusi transisi yaitu pada tapak 31 dan 71 serta satu subtitusi transversi pada tapak 50. Pola perubahan basa nukelotida berupa subtitusi transisi dan transversi juga ditemukan pada sampel dengan nomor persilangan Jc-6. Pada sampel tersebut, ada tiga tapak yang mengalami subtitusi transisi yaitu tapak 36 138, dan 292. Sedangkan subtitusi transversi terjadi pada delapan tapak, antara lain 34, 49, 50, 54, 75, 80, 132, dan 323.

Sampel dengan nomor persilangan lainnya memiliki jumlah tapak tersubtitusi yang lebih rendah. Nomor persilangan Jc-5 hanya mengalami subtitusi transversi saja sejumlah dua yang dapat ditemukan pada tapak 42 dan 50. Kasus pada sampel nomor persilangan Jc-7 juga mengalami hal yang sama. Jenis subtitusi yang ditemukan hanya berjenis subtitusi transversi. Ada empat tapak yang mengalami subtitusi transversi yaitu tapak 34, 50, 57, dan 75.

RANGKUMAN

- 1. Isolasi DNA adalah pemisahan molekul DNA dari molekul lain seperti dinding sel, membran sel, dan membran inti sehingga ukturnya dapat dilihat dengan jelas.
- 2. Elektroforesis adalah suatu teknik yang mengukur laju perpindahan atau pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), dalam hal tersebut DNA, yang bergerak menuju kutub positif (anode), sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (anode).
- 3. Komponen PCR adalah DNA hasil isolasi, primer gen TI, DNA taq polimerase, buffer Taq Polimerase, dNTP'S mix dan dH₂0. Volume total reaksi PCR yang dipergunakan adalah sebanyak 25 μl. Kondisi untuk reaksi PGA dirancang dengan suhu pradenaturasi 94°C (5 menit), denaturasi 94°C (1 menit), penempelan primer 40°C (1 menit), perpanjangan 72°C (2 menit) dan pasca PCR 4°C (2 menit). Untuk perbanyakan, siklus reaksi PCR diulang sebanyak 35 kali.
- 4. Data hasil sekuensing berupa urutan nukleotida disejajarkan menggunakan program BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5, MEGA 7.0, Clustal X. Program-program ini dikembangkan untuk mempermudah peneliti mempelajari materi genetik berbasis sekuensing.

EVALUASI

- Jelaskan fungsi bahan kimia untuk proses isolasi DNA genom tanaman!
- Bagaimanakah cara isolasi DNA genom tanaman menggunakan buffer CTAB?
- 3. Jelaskan prinsip kerja alat elektroforesis!
- Jelaskan proses PCR menggunakan primer gen TI!
- Sekuen berbagai macam gen dari berbagai macam organisme dapat diunduh dari genebank. Unduhlah gen dari berbagai macam organisme dan analisislah potensi mutasi yang terjadi.

REFLEKSI BELAJAR

Setelah mempelajari materi ini,

- 1. Tuliskan hal baru apa saja yang Saudara peroleh!
- 2. Bagian mana dari materi ini yang sulit Saudara pahami?
- 3. Apa saja upaya belajar Saudara pada materi ini?
- 4. Apa saja manfaat/ dampak yang Saudara peroleh setelah mempelajari materi ini?

DAFTAR RUJUKAN

Anandhan, S., Insaf A. Qureshi and K.R. Koundal. 2010. The Cowpea Trypsin Inhibitor Promoter Drives Expression in Response to Cellular Maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 16 (1): 31-37.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Stuhl, K. 1994. Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Clark, D. 2005. Molecular Biology. Illinois: Elsevier Academic Press.

- Fan, S. G., Wu, G. J. 2005. Characteristics of Plant Proteinase Inhibitors Their Applications in and Combating Phytophagus Insects. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 46: 273-292.
- Graur, D., Wen-Hsiung, L. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution 2nd Edition. Sunderland: Sinauer Associates Inc.
- Kidric, M., Kos, J., Sabotic, J. 2014. Proteases and Their Endogenous Inhibitors in The Plant Response to Abiotic Stress. Botanica Serbica, 38 (1): 139-158.
- Klug, W. S. & M. R. Cummings. 1994. Concepts of Genetics 4th ed. Prentice Hall, Englewood.
- Lawrence, P.K. and Koundal, K.R. 2002. Plant Protease Inhibitors in Control of Phytophagous Insects. EJB Electronic Journal of Biotechnology, 5 (1): 93-109.
- Maftuchah & Zainudin, A. 2007. Studi Pendahuluan Variasi Genetik Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) Lokal Berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA. Lokakarya Nasional III Inovasi Teknologi Jarak Pagar untuk Mendukung Program Desa Mandiri Energi, Malang, 5 November.
- Maftuchah. 2009. Petunjuk Praktikum Dasar-dasar Bioteknologi Tanaman. Malang: Pusat Pengembangan Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang.
- Mendoza-Blanco, W. and Casaretto, J.A. 2012. The Serine Protease Inhibitors and Plant-Insect Interaction. IDESIA (Chile), 30: 121-126.
- Primandiri, P.R., Amin, M., Maftuchah. 2012. Analisis Molekuler Gen CpTI (Cowpea Trypsin Inhibitor) Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) Toleran Cekaman Kekeringan. Prosiding Seminar Nasional MIPA dan Pembelajaran, Malang, 13 Oktober.

- Sanchez-H. C., Martinez-G. N., Guerrero-R. A., Valdes-R. S., Delano-F. J. 2004. Trypsin and Alpha-Amylase Inhibitors are Differentially Induced in Lleaves of Amaranth (Amaranthus hypochondriacus) in Response to Biotic and Abiotic Stress. Physiol Plantarum, 122: 254-264.
- Shan, L., Li, C., Chen, F., Zhao, S., Xia, G. 2008. A Bowman-Birk Type Protease Inhibitor is Involved in the Tolerance to Salt Stress in Wheat. Plant, Cell and Environment, 31: 1128–1137.
- Srinivasan, T., Kumar, K. R. R., Kirti, P. B. 2009. Constitutive Expression of a Trypsin Protease Inhibitor Confers Multiple Stress Tolerance in Transgenic Tobacco. Plant Cell Physiol, 50 (3): 541-553.
- Walker, J.M. & Rapley, R. 2002. Molecular Biology and Biotechnology 4th Edition. Royal Society of Chemistry.

GLOSARIUM

Adenin (A) Basa purin yang berpasangan dengan timin, ditemukan dalam DNA atau RNA

Aneuploidi Memiliki jumlah kromosom berbeda yang tidak beraturan

Antikodon Kelompok tiga basis komplementer pada tRNA yang mengenali dan mengikat kodon pada mRNA

Antiparalel Paralel, tapi berjalan dalam arah yang berlawanan

Asam amino Monomer dari mana rantai protein polipeptida dibuat

Asam Nukleat Kelas molekul polimer yang terdiri dari nukleotida yang membawa informasi genetik

Autosom Kromosom yang terpaut sifat

Bakteriofag Virus yang menginfeksi bakteri

Basa zat kimia alkali, dalam biologi molekular terutama mengacu pada senyawa nitrogen siklik yang ditemukan dalam DNA dan RNA

deoxyribonucleic acid (DNA)

Deoxyribose: Gula dengan lima atom karbon yang ditemukan dalam DNA DNA Asam deoksiribonukleat, polimer asam nukleat dimana gen dibuat.

Difraksi

Diploid

DNA polimerase Enzim yang berfungsi mengkatalisis pemanjangan DNA dengan cara menambahkan nukleotida pada rantai DNA

Dogma sentral Rencana dasar aliran informasi genetik pada sel hidup yang menghubungkan gen (DNA), pesan (RNA) dan protein

- Elektroforesis Teknik pemisahan biomolekul DNA atau protein dengan menggunakan matriks agarose melalui perbedaan muatan sehingga memisahkan DNA berdasarkan berat molekul
- Eukromatin Kromatin normal, berlawanan dengan heterochromatin
- Fosfodiester Keterkaitan antara nukleotida dalam asam nukleat yang terdiri dari gugus fosfat sentral yang dipercayakan pada gugus hidroksil gula di kedua sisi
- Gen Penentu suatu sifat pada organisme yang terdiri dari molekulmolekul DNA yang teratur secara linier yang dapat diturunkan pada generasi berikutnya
- Genom Semua informasi genetik suatu organisme termasuk semua DNA yang membentuk gen
- Gonosom Kromosom terlibat dalam menentukan jenis kelamin individu
- Guanin (G) Bina purin ditemukan dalam DNA atau RNA yang berpasangan dengan sitosin

Haploid

- Heliks ganda dibentuk dengan memutar dua helai DNA secara spiral satu sama lain
- Heterochromatin Bentuk kromatin yang sangat kental yang tidak dapat ditranskripsi karena tidak dapat diakses oleh RNA polymerase
- Histon Protein dengan berat molekul kecil, bermuatan positif, yang mampu berikatan dengan untai DNA yang bermuatan negatif sehingga berperan dalam struktur kromatin

Interfase

Ikatan hidrogen Ikatan yang dihasilkan dari daya tarik atom hidrogen positif ke dua atom lain dengan muatan negatif

- **Ikatan peptida** Jenis ikatan kimia yang menahan asam amino bersama-sama dalam molekul protein
- Kariotipe Kumpulan kromosom lengkap yang ditemukan di sel individu tertentu
- **Kinetokor** Struktur protein yang menempel pada DNA sentromer selama pembelahan sel dan juga mengikat mikrotubulus
- Kromatin Kompleks DNA plus protein yang merupakan kromosom eukariotik
- Kode triplet Kumpulan huruf-huruf yang menentukan asam amino pada ranpai polipeptida
- Kodon Suatu urutan DNA atau mRNA yang terdiri atas 3 nukleotida yang menspesifikasi asam amino fungsional; unit dasar kode genetik
- Kromosom bentuk packaging DNA yang terlihat pada fase metafase
- Ligase Enzim yang berfungsi menyatukan 2 fragmen DNA pada fragmen Okazaki

Nukleosom

Nukleolus

Nukleotida: Monomer atau subunit asam nukleat, terdiri dari gula pentosa ditambah basa ditambah kelompok fosfat.

- mRNA Molekul yang membawa informasi genetik dari gen ke sel lainnya
- Mutasi perubahan pada DNA atau kromosom yang terjadi secara acak dan tiba-tiba
- Pasangan basa Dua basa yang disatukan oleh ikatan hidrogen
- PCR teknologi molekuler yang bertujuan untuk mengamplifikasi sekuen DNA secara enzimatis melalui pengaturan suhu
- Pentosa: Lima gula karbon, seperti gugus fosfat ribosa atau deoksiribasa Kelompok empat atom oksigen di sekitar

atom fosfor sentral yang ditemukan di tulang punggung DNA dan RNA.

Pirimidin Jenis basa nitrogen dengan cincin tunggal ditemukan pada DNA dan RNA

Ploidi Jumlah set kromosom yang dimiliki oleh suatu organisme Polisakarida

Primer Untai asam nukleat pendek yang berfungsi sebagai titik awal inisiasi sintesis DNA

Promoter Urutan DNA di depan gen, digunakan untuk regulasi dan bukan untuk mengkodekan protein

Purin Jenis basa nitrogen dengan cincin ganda ditemukan pada DNA dan RNA

Replikasi Duplikasi DNA sebelum pembelahan sel

ribonucleic acid (RNA) Asam nukleat yang berbeda dari DNA dalam memiliki ribose menggantikan deoxyribose

Ribosa Gula 5-karbon ditemukan di RNA

rRNA Kelas molekul RNA yang merupakan bagian dari struktur ribosom

Satelit

Sentromer Daerah kromosom eukariotik, biasanya lebih atau kurang sentral, dimana mikrotubulus menempel selama mitosis dan meiosis.

Sitosin (C) Salah satu pirimidin yang ditemukan dalam DNA atau RNA dan pasangan dengan guanin

Solenoid

Telomer Urutan khusus DNA ditemukan pada akhir kromosom eukariotik linier

Tetraploid Memiliki empat salinan dari setiap gen

Triploid Memiliki tiga salinan dari setiap gen

Trisomi Memiliki tiga salinan kromosom tertentu

Timin (T) Basa pirimidin ditemukan pada DNA yang berpasangan dengan adenin

Transformasi

Transkripsi Sintesis RNA berdasarkan satu untai DNA sebagai cetakan

Translasi Sintesis polipeptida berdasarkan urutan rantai mRNA tRNA molekul RNA yang membawa asam amino ke ribosom Urasil (U) Basa pirimidin ditemukan di RNA yang bisa dipasangkan dengan adenin

Virus Parasit subselluler dengan materi genetik DNA atau RNA yang bereplikasi di dalam sel inang untuk sintesis energi dan protein. Selain itu, ia memiliki bentuk ekstraselular, di mana gen virus terkandung di dalam lapisan pelindung



GENETIKA Prinsip Dasar Berbasis Penelitian di Perguruan Tinggi

Ting	gi			
ORIGINAL	LITY REPORT			
	6% 16% INTERNET SOURCES	4% PUBLICATIONS	5% STUDENT	PAPERS
PRIMARY	SOURCES			
1	simki.unpkediri.ac.id Internet Source			<1%
2	Yaser Rahimi, Rassoul A Ghaderi. "Design of a N Classifier for Separation Chromosome from Ima Chromosomes", 2008 Conference on Broadb Information Technolog Applications, 2008	Neural Networn of Images was with Sevential International Commun	rk vith One eral ional ications,	<1%
3	148.216.10.83 Internet Source			<1%
4	faternaunram2012.blog	gspot.com		<1%
5	Submitted to University Student Paper	y of Sheffield		<1%
6	eprints.unsri.ac.id Internet Source			<1%
7	yanuaritablog.wordpre	ess.com		<1%

Internet Source

8	andre4088.blogspot.com Internet Source	<1%
9	he-wroteyou.com Internet Source	<1 %
10	mydokterhewan.blogspot.com Internet Source	<1%
11	we-didview.com Internet Source	<1%
12	sidoarjo88.blogspot.com Internet Source	<1%
13	repository.unimus.ac.id Internet Source	<1%
14	richihanun.blogspot.com Internet Source	<1 %
15	croisant.wordpress.com Internet Source	<1%
16	Submitted to University of Amsterdam Student Paper	<1%
17	ayosinau.com Internet Source	<1%
18	repository.unair.ac.id Internet Source	<1%
19	repository.unpkediri.ac.id Internet Source	<1%
20	yusrintosepu.wixsite.com Internet Source	<1%

21	Submitted to Konsorsium Turnitin Relawan Jurnal Indonesia Student Paper	<1%
22	giyan77.files.wordpress.com Internet Source	<1%
23	hes-gotappointment-newspaper.icu Internet Source	<1%
24	repository.uinmataram.ac.id Internet Source	<1 %
25	repository.uts.ac.id Internet Source	<1%
26	akseptor.blogspot.com Internet Source	<1%
27	mulok.library.um.ac.id Internet Source	<1%
28	silo.pub Internet Source	<1%
29	Submitted to Auckland University of Technology Student Paper	<1%
30	as-wait.icu Internet Source	<1%
31	etheses.uin-malang.ac.id Internet Source	<1%
32	vdokumen.com Internet Source	<1%

33	hastutiwibowo.wordpress.com Internet Source	<1%
34	nununghaerani.blogspot.com Internet Source	<1%
35	Submitted to Universiti Malaysia Sarawak Student Paper	<1%
36	anitabintiakhamad.blogspot.com Internet Source	<1%
37	babay2712.blogspot.com Internet Source	<1%
38	lib.ui.ac.id Internet Source	<1%
39	nanikimia.wordpress.com Internet Source	<1%
40	www.unri.ac.id Internet Source	<1%
41	Kunert, K. J., S. G. van Wyk, C. A. Cullis, B. J. Vorster, and C. H. Foyer. "Potential use of phytocystatins in crop improvement, with a particular focus on legumes", Journal of Experimental Botany, 2015. Publication	<1%
42	belajar.ditpsmk.net Internet Source	<1%
43	liyanaputriafifah.blogspot.com Internet Source	<1%
		_

	44	istiqomahsragen.wordpress.com Internet Source	<1%
	45	mumtayatussaadah.wordpress.com Internet Source	<1%
_	46	vibdoc.com Internet Source	<1%
	47	www.edubio.info Internet Source	<1%
	48	Submitted to Universitas Pendidikan Indonesia Student Paper	<1%
	49	Submitted to University of Maryland, University College Student Paper	<1%
	50	slideplayer.info Internet Source	<1%
	51	botanicaserbica.bio.bg.ac.rs Internet Source	<1%
	52	journal2.unusa.ac.id Internet Source	<1%
	53	artikelbermanfaat100.blogspot.com Internet Source	<1%
	54	Hendra-Wibawa I P.A., Kurniawan A., Adjie B "VARIASI KANDUNGAN GIZI DIOSCOREA HISPIDA YANG BERASAL DARI BALI DAN LOMBOK SERTA KERAGAMAN GENETIKNYA	<1%

BERDASARKAN PCR SSCP", JURNAL WIDYA BIOLOGI, 2020

Publication

55	enina.wordpress.com Internet Source	<1%
56	shellynurdaniyanti.blogspot.com Internet Source	<1%
57	Wania N. Wagner. "Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type 1 from type 4 by the polymerase chain reaction", Canadian Journal of Microbiology, 11/1992	<1%
58	poltekkesbanten.ac.id Internet Source	<1 %
59	repository.usd.ac.id Internet Source	<1%
60	117sitrabio.blogspot.com Internet Source	<1%
61	ditjenbun.deptan.go.id Internet Source	<1%
62	eprints.umm.ac.id Internet Source	<1%
63	tulisanterkini.com Internet Source	<1 %
64	Submitted to Georgia Virtual School Student Paper	<1%

65	Submitted to Kalamazoo Area Mathematics and Science Center Student Paper	<1%
66	Yun-Yan Fei, Javaid Akhter Bhat, Jun-Yi Gai, Tuan-Jie Zhao. "Global Transcriptome Profiling of Enterobacter Strain NRS-1 in Response to Hydrogen Peroxide Stress Treatment", Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020 Publication	<1%
67	alhabshy92.wordpress.com Internet Source	<1%
68	apps.dtic.mil Internet Source	<1%
69	afz-andikazaki.blogspot.com Internet Source	<1%
70	repository.iik-strada.ac.id Internet Source	<1%
71	son-show.xyz Internet Source	<1%
72	www.springerprofessional.de Internet Source	<1%
73	P R Primandiri, M Amin, S Zubaidah, Maftuchah, A M Santoso. "Sequences of Trypsin Inhibitor Gene on Jatropha curcas L", IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021	<1%

74	Submitted to Universitas Jember Student Paper	<1%
75	open.metu.edu.tr Internet Source	<1%
76	"Scientists in Government: Growing Concern Over Conflicts of Interest", Science, 1960 Publication	<1%
77	Submitted to UIN Walisongo Student Paper	<1%
78	anieez87.blogspot.com Internet Source	<1%
79	biologyjimmi.blogspot.com Internet Source	<1%
80	dogr.res.in Internet Source	<1%
81	bhimashraf.blogspot.com Internet Source	<1%
82	biosainsku.blogspot.com Internet Source	<1%
83	eprints.nottingham.ac.uk Internet Source	<1%
84	See-edge.xyz Internet Source	<1%
85	tinangkung.blogspot.com Internet Source	<1%

86	Internet Source	<1%
87	repo.upertis.ac.id Internet Source	<1%
88	yadizhe.wordpress.com Internet Source	<1%
89	contohsuratcontoh.blogspot.com Internet Source	<1%
90	digilib.uinsgd.ac.id Internet Source	<1%
91	noviegakpunyapapa.blogspot.com Internet Source	<1 %
92	repository.isi-ska.ac.id Internet Source	<1%
93	agro.icm.edu.pl Internet Source	<1 %
94	repository.ipb.ac.id Internet Source	<1%
95	ahyanfahrimuhammadblog.wordpress.com Internet Source	<1%
96	perbedaan.budisma.net Internet Source	<1 %
97	repository.unand.ac.id Internet Source	<1%
98	www.docstoc.com Internet Source	<1%

99	caiherang.com Internet Source	<1%
100	med.unhas.ac.id Internet Source	<1%
101	ejournal.undip.ac.id Internet Source	<1%
102	hardianimalscience.wordpress.com Internet Source	<1%
103	ufind.name Internet Source	<1%
104	Dian Devita Yohanie, Samijo Samijo. "Pengembangan modul berdasarkan pemecahan masalah polya pada mata kuliah analisis vektor", Jurnal Math Educator Nusantara: Wahana Publikasi Karya Tulis Ilmiah di Bidang Pendidikan Matematika, 2019 Publication	<1%
105	aryaagh.wordpress.com Internet Source	<1%
106	jurnal.ugm.ac.id Internet Source	<1%
107	unsyiahpress.id Internet Source	<1%
108	Submitted to Monash University Student Paper	<1%

109	Internet Source	<1 %
110	pendidikan176.blogspot.com Internet Source	<1%
111	ptrynarn.blogspot.com Internet Source	<1%
112	www.dosenpendidikan.co.id Internet Source	<1%
113	Shazia Rehman, Ejaz Aziz, Wasim Akhtar, Muhammad Ilyas, Tariq Mahmood. "Structural and functional characteristics of plant proteinase inhibitor-II (PI-II) family", Biotechnology Letters, 2017	<1%
114	brother-quiet.xyz Internet Source	<1%
115	devianaeka.blogspot.com Internet Source	<1%
116	priyantoamak.blogspot.com Internet Source	<1%
117	sdnegeri01cipari.blogspot.com	<1%
	Internet Source	70
118	sk.sagepub.com Internet Source	<1 %

Limit Water Stress Responses in White Clover (Trifolium repens L.) Plants", Frontiers in Plant Science, 2017

Publication

120	alqueena.blogspot.com Internet Source	<1%
121	biologi.uin-malang.ac.id Internet Source	<1%
122	biologicallytested.wordpress.com Internet Source	<1%
123	sandiapriadi.blogspot.com Internet Source	<1%
124	sinta.unud.ac.id Internet Source	<1%
125	Craig, Nancy. "Molecular Biology- Principles of Genome Function", Oxford University Press, 2020 Publication	<1%
126	id.ovalengineering.com Internet Source	<1%
127	repositori.usu.ac.id Internet Source	<1%
128	repository.unika.ac.id Internet Source	<1%
129	rikacherend28.blogspot.com Internet Source	<1%

130	Internet Source	<1%
131	05nabil.blogspot.com Internet Source	<1%
132	angga-dkpsumsel.blogspot.com Internet Source	<1%
133	assyarip.files.wordpress.com Internet Source	<1%
134	bionce-bioscience.blogspot.com Internet Source	<1%
135	drutama.wordpress.com Internet Source	<1%
136	emsalfiancee.wordpress.com Internet Source	<1%
137	laporanakhirpraktikum.blogspot.com Internet Source	<1%
138	repositori.kemdikbud.go.id Internet Source	<1%
139	repository.unipa.ac.id:8080 Internet Source	<1%
140	setditjen.dikdasmen.kemdikbud.go.id	<1%
141	www.kafekepo.com Internet Source	<1%
142	Tetty CHAIDAMSARI, Rita HAYATI, Auzar SYARIEF, Aswaldi ANWAR, Djoko SANTOSO.	<1%

"Kloning gen LEAFY kakao dari jaringan bantalan bunga aktif Cloning of cacao LEAFY gene from the active flower cushions", E-Journal Menara Perkebunan, 2016

Publication

143	akdevi.wordpress.com Internet Source	<1%
144	allphenome.wordpress.com Internet Source	<1%
145	ejournal.unesa.ac.id Internet Source	<1%
146	eprints.undip.ac.id Internet Source	<1%
147	eprints.uny.ac.id Internet Source	<1%
148	f3dream.blogspot.com Internet Source	<1%
149	frisztado.wordpress.com Internet Source	<1%
150	hasni-blog.blogspot.com Internet Source	<1%
151	hendyz.blogspot.com Internet Source	<1%
152	issuu.com Internet Source	<1%
153	jmm.unram.ac.id Internet Source	<1%

154	jurnal.unej.ac.id Internet Source	<1%
155	libre-vdaka.info Internet Source	<1%
156	njannatin.blogspot.com Internet Source	<1%
157	pbxpo.com Internet Source	<1%
158	rizkafajriah.blogspot.com Internet Source	<1%
159	suka-suka.web.id Internet Source	<1%
160	tel.archives-ouvertes.fr Internet Source	<1%
161	ummi.ac.id Internet Source	<1%
162	www.jakbelajar.com Internet Source	<1%
163	www.jurnal.unsyiah.ac.id Internet Source	<1%
164	www.zenius.net Internet Source	<1%
165	zh.scribd.com Internet Source	<1%

166	S. Anandhan, Insaf A. Qureshi, K. R. Koundal. "The cowpea trypsin inhibitor promoter drives expression in response to cellular maturation in Arabidopsis thaliana", Physiology and Molecular Biology of Plants, 2010 Publication	<1%
167	aaxsadzim.blogspot.com Internet Source	<1%
168	buku-on-line.com Internet Source	<1%
169	silfiadahnia.blogspot.com Internet Source	<1%
170	sopiismailtahera1.blogspot.com Internet Source	<1%
171	yanuarsulistiono.blogspot.com Internet Source	<1%
172	Tabira, T "Neurotrophic effect of hematopoietic cytokines on cholinergic and other neurons in vitro", International Journal of Developmental Neuroscience, 199506/07 Publication	<1%
173	grisellarambitan.wordpress.com Internet Source	<1%
174	www.powershow.com Internet Source	<1%

Exclude quotes Off Exclude matches Off

Exclude bibliography Off