

BUKU AJAR

TEKNIK-TEKNIK DASAR BIOTEKNOLOGI

Tim Penyusun:

Ir. Suprayogi, M.Sc., Ph.D.

Dr. Ir. Noor Farid, M.Si.

Prita Sari Dewi, S.P., M.Sc., Ph.D.

Sapto Nugroho, S.Si., M.Biotech.

Dyah Susanti, S.P., M.P.



Penerbit

Universitas Jenderal Soedirman

2021

BUKU AJAR

TEKNIK-TEKNIK DASAR BIOTEKNOLOGI

© 2021 Universitas Jenderal Soedirman

Cetakan Kesatu, November 2021

Hak Cipta dilindungi Undang-undang
All Right Reserved

Penulis:

Ir. Suprayogi, M.Sc., Ph.D.
Dr. Ir. Noor Farid, M.Si.
Prita Sari Dewi, S.P., M.Sc., Ph.D.
Sapto Nugroho, S.Si., M.Biotech.
Dyah Susanti, S.P., M.P.

Editor Isi:

Ir. Budi Prakoso, M.Sc. D.Tech.Sc

Editor Bahasa:

Kristianto Setiawan, SS., M.A

Diterbitkan oleh:

UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Gd. BPU Percetakan dan Penerbitan (UNSOED Press)
Telp. (0281) 626070
Email: unsoedpresspwt@gmail.com



Anggota

Afiliasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia

Nomor : 003.027.1.03.2018

viii + 111 hal., 15 x 23 cm

ISBN: 978-623-6783-75-7

Dilarang mengutip dan memperbanyak tanpa izin tertulis dari penerbit, sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apapun, baik cetak, photoprint, microfilm dan sebagainya.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah robbil'alamin, atas ridlo Allah SWT dan atas dukungan banyak pihak Buku Ajar "Teknik-teknik Dasar Bioteknologi" ini dapat diselesaikan. Penulisan buku ajar ini disusun sebagai materi kuliah pada Mata Kuliah Rekayasa Genetika Tanaman atau mata kuliah Bioteknologi Pertanian. Penulisan buku ini juga didasari oleh pemikiran bahwa pada era millennium ini Bioteknologi mempunyai peran yang sangat penting sebagai salah satu *leading and frontier technology*. Bioteknologi tidak hanya penting untuk mereka yang bekerja di bidang ilmu biologi, pertanian, kehutanan, peternakan, perikanan, lingkungan dan kedokteran, tetapi juga untuk mereka yang bekerja di bidang lain, seperti ilmu bioteknologi forensik. Mendasarkan pada hal tersebut dan mempertimbangkan sumberdaya yang ada di Laboratorium Pemuliaan Tanaman dan Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Unsoed, maka kami tergerak untuk menulis buku yang dapat dijadikan sebagai buku ajar dan panduan teknis laboratorium untuk mengenalkan teknik-teknik dasar yang harus dikuasai oleh mereka yang bekerja dalam bidang Bioteknologi Pertanian.

Atas tersusun dan terbitnya buku ini kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Kristianto Setiawan, S.S, M.A. yang telah membantu penyuntingan Bahasa, Budi Prakoso, Dr.Tech.Sc. yang telah melakukan penyuntingan isi dan Eka Oktaviani, S.Si., M.Biotech. yang telah membantu membuat glossary. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Rektor Unsoed yang telah memberikan dana hibah penulisan buku ajar, dan Ketua Lembaga Pengembangan Pembelajaran dan Penjaminan Mutu (LP3M) Unsoed yang telah membantu penerbitan buku ajar ini.

Purwokerto, Oktober 2021

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
I. PENDAHULUAN	1
II. ISOLASI DNA	9
III. METODE PENGUKURAN KUANTITAS DAN KUALITAS DNA	15
IV. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	23
V. PEMOTONGAN DNA DENGAN ENZIM RESTRIKSI ENDONUKLEASE DAN ISOLASI PLASMID	33
VI. DESAIN PRIMER	49
VII. MARKA MOLEKULER DAN SELEKSI BERBASIS MARKA	63
VIII. ANALISIS FILOGENETIK	73
KISI-KISI JAWABAN SOAL LATIHAN	78
GLOSARIUM	85
INDEKS	109

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Penghitungan penambahan ammonium asetat dan isopropanol berdasarkan volume DNA yang diambil pada <i>aqueous phase</i>	13
3.1. Tabel pembacaan hasil spektrofotometri	15
4.1. Sifat beberapa enzim DNA polimerase <i>thermostable</i>	25
5.1. Enzim restriksi dan daerah pemotongannya (Nicholl, 2008)	36
5.2. Contoh plasmid dan karakteristik yang dimiliki	42
5.3. Beberapa contoh plasmid yang digunakan dalam teknik biologi molekuler	44
6.1. <i>Melting temperature</i> yang dihitung dengan Rumus Wallace untuk panjang primer yang berbeda, dengan asumsi 50% GC	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1.1. Struktur sel hewan dan tumbuhan tingkat tinggi (sel eukariot)	2
1.2. Struktur sel bakteri (sel prokariot)	3
1.3. Struktur DNA untai ganda dan komponen penyusunnya	5
2.1. Hasil ekstraksi fenol berupa tiga lapisan dari atas ke bawah yaitu lapisan DNA, lapisan protein dan lapisan fenol (Dale dan Schantz, 2003)	10
2.2. Presipitasi DNA dengan isopropanol atau ethanol (Dale dan Schantz, 2003)	10
2.3. Tahap-tahap isolasi DNA dengan metode konvensional (Sumber: Rajendrakumar <i>et al.</i> (2006)	11
2.4. Tahap-tahap isolasi DNA dengan menggunakan <i>kit</i> isolasi DNA (Bioneer, 2013)	11
3.1. Hasil elektroforesis pada gel (Reece, 2004)	16
3.2. Penempelan EtBr pada DNA (Reece, 2004)	17
3.3. Cara menentukan konsentrasi DNA genomik dengan melihat ketebalan pita DNA dibandingkan dengan DNA ladder yang sudah diketahui konsentrasinya (Sumber: Genomic DNA QC Using Standard Gel Electrophoresis. De Join Genome Institute, USA)	19
3.4. DNA genomik yang terkontaminasi oleh RNA dan yang telah terdegradasi (Sumber: Genomic DNA QC Using Standard Gel Electrophoresis. De Join Genome Institute, USA)	20
3.5. DNA genomik yang tidak murni (impurities) (Sumber: Genomic DNA QC Using Standard Gel Electrophoresis. De Join Genome Institute, USA)	20
4.1. Ilustrasi penempelan primer oligonukleotida (P) pada DNA cetakan	26
4.2. Struktur <i>deoxy ribose triphosphates (dNTPs)</i> . Kandungan basa nitrogennya dapat A (dATP), T (dTTP), G (dGTP) atau C (dCTP)	26
4.3. Tahap dalam setiap siklus PCR	28
4.4. Peningkatan eksponensial jumlah kopi DNA selama berlangsungnya PCR	29

5.1.	Daerah pengenalan <i>EcoRI</i> pada DNA utas ganda. (a) DNA sebelum dipotong, (b) DNA setelah dipotong dengan enzim restriksi <i>EcoRI</i>	35
5.2.	Bentuk-bentuk ujung DNA hasil pemotongan enzim restriksi endonuklease (Nicholl, 2008)	37
5.3.	Peta plasmid pUC19 dengan daerah pengenalan enzim restriksi yang terkandung	38
5.4.	Komposisi pemotongan plasmid pGEM [®] -T dengan <i>BamHI</i> dan <i>EcoRI</i> (Hadi, 2004)	39
5.5.	Komposisi pemotongan plasmid pCR [®] 2.1-TOPO [®] dengan <i>NcoI</i> dan <i>XhoRI</i> (Hadi, 2011)	40
5.6.	Komposisi pemotongan plasmid pUC19 dengan <i>EcoRI</i>	40
5.7.	Sel bakteri dengan DNA kromosom (1) dan plasmid (2) (http://en.wikipedia.org/wiki/Plasmid)	41
5.8.	Peta plasmid pBR322 yang menunjukkan adanya gen resisten terhadap antibiotika ampisilin (Ap ^r) dan tetrasiklin (Tet ^r), titik ori, dan beberapa daerah pengenalan enzim restriksi. b) Peta plasmid pUC18 yang mengandung gen resisten ampisilin (Ap ^r), gen <i>lacZ</i> , dan sepuluh daerah restriksi (<i>EcoRI</i> , <i>SstI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>XbaI</i> , <i>SolI</i> , <i>PstI</i> , <i>SphI</i> , <i>HindIII</i>) (Lodge, 2007)	42
6.1.	Kesesuaian Primer dan DNA template memungkinkan terjadinya annealing	49
6.2.	Kedua primer oligonukleotida yang saling menempel	53
6.3.	Kesesuaian (<i>complementarity</i>) basa N pada primer yang dapat menyebabkan terbentuknya hairpin dan self-dimer	54
6.4.	Contoh-contoh menempelnya primer pada DNA cetakan	55
7.1.	Penggunaan RFLP untuk membedakan DNA sekuen antara tanaman tahan (tidak mengalami mutasi gen) dan peka (mengalami mutasi gen, kehilangan salah satu <i>restriction site</i>)	65
7.2.	Pola pita DNA marka RAPD. P1 = tetua 1, P2 = tetua 2, F1 = Hybrid, F7 = generasi ke 7. (Perhatikan pola dominan dan resesif pada pita DNA)	66
7.3.	Pola pita DNA marka mikrosatelit (<i>Simple Sequence Repeat</i>). (Perhatikan pola dominan dan resesifnya pada pita DNA)	67
7.4.	Pola pita DNA AFLP. (Perhatikan pola dominan dan resesifnya pada pita DNA)	68

V. PEMOTONGAN DNA DENGAN ENZIM RESTRIKSI ENDONUKLEASE DAN ISOLASI PLASMID

(Sapto Nugroho Hadi, S.Si., M. Biotech.)

Capaian Pembelajaran:

Setelah menyelesaikan bab ini, mahasiswa mampu menjelaskan mengenai enzim restriksi endonuclease dan gunanya dalam teknik genetika molekuler, serta mampu menjelaskan mengenai cara-cara isolasi plasmid.

Kompetensi Khusus:

Pada akhir kuliah mahasiswa dapat:

1. menjelaskan mengenai enzim restriksi dan spesifikasi posisi pemotongan.
 2. menjelaskan mengenai berbagai plasmid dan karakteristiknya serta teknik isolasi plasmid
 3. melakukan pemotongan DNA dan isolasi plasmid.
-

A. Pengantar

Dalam teknik molekuler (bioteknologi), salah satu *tool* yang sangat penting adalah enzim restriksi endonuklease. Enzim restriksi memiliki peran mengkatalisis reaksi pemotongan DNA. Seperti kita hendak memotong tali menggunakan gunting, enzim restriksi dapat dianalogikan layaknya sebuah gunting namun dalam skala molekuler.

Enzim restriksi endonuklease mampu memotong DNA secara tepat dan memiliki keberulangan tinggi, tanpa merusak struktur DNA secara keseluruhan. Kemampuan enzim restriksi memotong DNA secara tepat dikarenakan kemampuannya mengenali daerah spesifik pada DNA yang sesuai dengan daerah pengenalan enzim. Daerah ini dikenal dengan daerah restriksi (*restriction site*).

B. Sejarah Penemuan Enzim

Enzim restriksi endonuklease secara alami diproduksi di dalam sel bakteri. Enzim ini pertama kali ditemukan secara tidak sengaja oleh para peneliti yang sedang bekerja dengan *bacteriophage* (virus yang menginfeksi bakteri). Sejak era 1950-an telah diketahui bahwa bakteri lebih rentan terhadap infeksi *bacteriophage* yang sebelumnya telah ditumbuhkan pada galur lain. Fenomena ini kemudian dikenal dengan istilah *host-controlled restriction*. Fenomena ini lebih lanjut diketahui karena adanya produksi enzim pada bakteri inang yang akan mendegradasi DNA *phage* (virus) yang menginfeksi bakteri tersebut. Enzim ini mengenali sekuen DNA spesifik dan memotong DNA pada sekuen yang dikenalnya. DNA bakteri sendiri terlindung dari usaha pemotongan enzim restriksi dikarenakan situs restriksinya mengandung gugus metil (-CH₃). Adanya gugus metil pada situs restriksi DNA bakteri menyebabkan enzim restriksi tidak mampu menempel dan melakukan pemotongan. Penemu enzim restriksi, yaitu Werner Arber, Hamilton Smith, dan Daniel Nathans mendapat hadiah nobel bidang fisiologi atau kedokteran pada 1978.

C. Tipe Enzim Restriksi

Terdapat tiga tipe enzim restriksi, yaitu tipe I, II, dan III. Enzim restriksi tipe I mengenali sekuen DNA pada daerah tertentu, namun baru akan memotongnya setelah enzim ini terlebih dahulu “berjalan” dan melacak sekuen DNA sepanjang 1000-5000 basa dari daerah pengenalan enzim. Enzim ini juga melepaskan sejumlah nukleotida (~75) di tempat pemotongan dihasilkan. Untuk memotong sekuen DNA utas ganda diperlukan dua molekul enzim restriksi tipe I karena masing-masing enzim hanya mampu memutus satu utas DNA saja. Dalam bekerja memotong DNA, enzim restriksi endonuklease tipe I membutuhkan molekul kofaktor seperti Mg²⁺, ATP, dan S-adenosyl methionine (SAM). Contoh enzim restriksi tipe I adalah *EcoK*.

Enzim restriksi endonuklease tipe II mengenali sekuen target spesifik pada DNA dan mampu memutus DNA utas ganda dalam waktu bersamaan (jadi hanya diperlukan satu molekul enzim saja). Situs pengenalan enzim tipe ini pun hanya beberapa basa saja dan tidak melakukan aktivitas pelacakan sejauh 1000-5000 basa seperti pada tipe I. Untuk aktivitas pekerjaannya, enzim restriksi tipe II membutuhkan kofaktor Mg²⁺. Contoh enzim restriksi tipe II adalah *EcoRI*.

Enzim restriksi nuclease tipe III merupakan enzim pertengahan antara tipe I dan II. Enzim restriksi tipe III ini mampu memotong kedua utas DNA secara bersamaan, namun baru memotongnya setelah “berjalan” dengan jarak tertentu dari daerah pengenalan enzim. Untuk

aktivitas kerjanya, enzim membutuhkan Mg^{2+} dan ATP. Contoh enzim restriksi tipe III adalah *HgaI*.

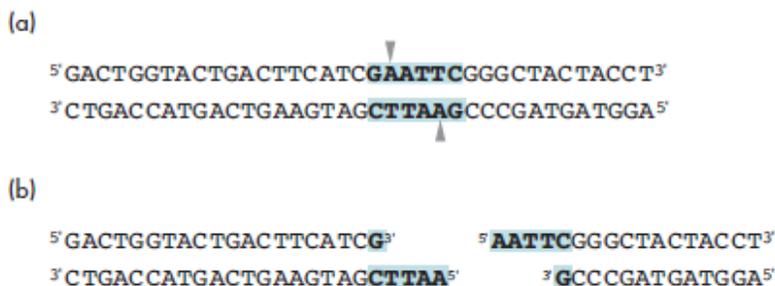
Dari ketiga tipe enzim restriksi di atas, enzim yang umum digunakan adalah enzim restriksi endonuklease tipe II karena sistem kerjanya yang lebih efektif dan efisien.

D. Penamaan Enzim Restriksi Endonuklease Tipe II

Penamaan enzim restriksi didasarkan kepada mikroba tempat enzim pertama kali diisolasi. Misalnya enzim restriksi yang berasal dari *Escherichia coli* akan diberi nama depan *Eco* (tiga huruf miring), sementara yang berasal dari *Bacillus amyloliquefaciens* akan diberi nama depan *Bam*, dan seterusnya. Untuk enzim yang diisolasi dari bakteri yang sama namun dari galur (*strain*) berbeda, maka di belakang tiga huruf miring akan ditambahkan inisial nama galur bakteri tersebut. Inisial galur ditulis dengan huruf tegak, tidak miring, contohnya *EcoRI* dan *BamHI* (Nicholl, 2008).

E. Kespesifikan Kerja Enzim Restriksi

Enzim restriksi endonuklease (tipe II) mengenali dan memotong sekuen DNA yang memiliki urutan basa dan panjang tertentu (sangat spesifik). Setiap enzim restriksi berbeda dari enzim restriksi lainnya dalam hal situs pengenalannya. Misalnya enzim restriksi *EcoRI* yang akan mengenali dan memotong urutan basa GAATTC, berbeda dengan *BamHI* yang mengenali dan memotong urutan basa GGATCC, meskipun keduanya sama mengenali sekuen DNA dengan panjang 6 bp (pasang basa). Situs pengenal dan pemotongan *EcoRI* disajikan pada Gambar 5.1, sementara situs pengenal enzim lain disajikan pada Tabel 5.1.



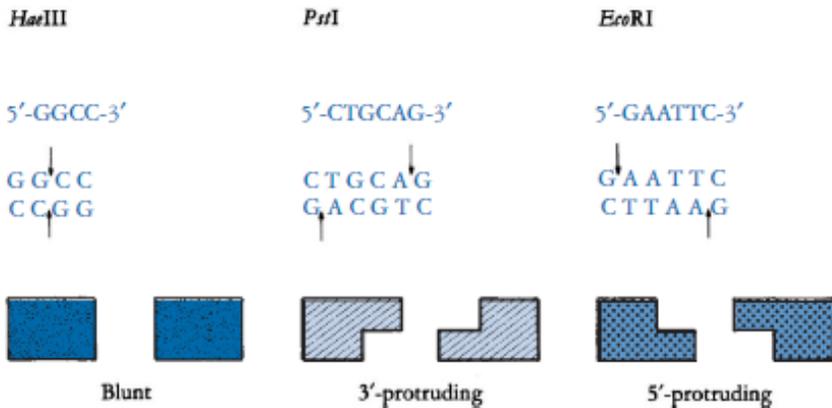
Gambar 5.1. Daerah pengenalan *EcoRI* pada DNA utas ganda. (a) DNA sebelum dipotong, (b) DNA setelah dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI*

EcoRI akan memotong ikatan fosfodiester antara basa G-A (ditunjukkan dengan anak panah), b). DNA utas ganda setelah mengalami pemotongan dengan *EcoRI*, menghasilkan ujung *sticky* (lengket).

Tabel 5.1. Enzim restriksi dan daerah pemotongannya (Nicholl, 2008)

Enzyme	Recognition sequence	Cutting sites	Ends
<i>Bam</i> HI	5'-GGATCC-3'	G [↓] GATCC CCTAG [↓] G	5'
<i>Eco</i> RI	5'-GAATTC-3'	G [↓] AATTC CTTAA [↓] G	5'
<i>Hae</i> III	5'-GGCC-3'	GG [↓] CC CC [↓] GG	Blunt
<i>Hpa</i> I	5'-GTTAAC-3'	GT [↓] TAA [↓] C CAAT [↓] TTG	Blunt
<i>Pst</i> I	5'-CTGCAG-3'	CTGCA [↓] G G [↓] ACGTC	3'
<i>Sau</i> 3A	5'-GATC-3'	[↓] GATC CTAG [↓]	5'
<i>Sma</i> I	5'-CCCGGG-3'	CCC [↓] GGG GGG [↓] CCC	Blunt
<i>Sst</i> I	5'-GAGCTC-3'	GAGCT [↓] C CTCGAG	3'
<i>Xma</i> I	5'-CCCGGG-3'	[↓] CCCGGG GGGCC [↓]	5'

Tabel 5.1 menyajikan bentuk ujung DNA sebagai hasil pemotongan beberapa enzim restriksi endonuklease. Misalnya *HaeIII* yang mengenali daerah restriksi 5'-GGCC-3' akan memotong ikatan fosfodiester antara G dan C menghasilkan DNA ujung tumpul (*blunt*). Enzim yang lain, misal *EcoRI* mengenali daerah restriksi 5'-GAATTC-3' akan memotong ikatan G dan A menghasilkan ujung lengket (*sticky*). Pemotongan enzim restriksi menghasilkan DNA dengan ujung lengket dibagi menjadi dua jenis, yaitu *protruding* 3' (yang bagian panjang menggantung terletak pada posisi 3') dan *protruding* 5' (bagian menggantung pada posisi 5') (Gambar 5.2.). Untuk teknik kloning gen, enzim restriksi yang menghasilkan DNA dengan ujung *sticky*, baik *protruding* 3' maupun 5' lebih umum digunakan karena kemudahan dalam hal penyambungan kembali DNA yang terpotong tersebut pada tahap selanjutnya.

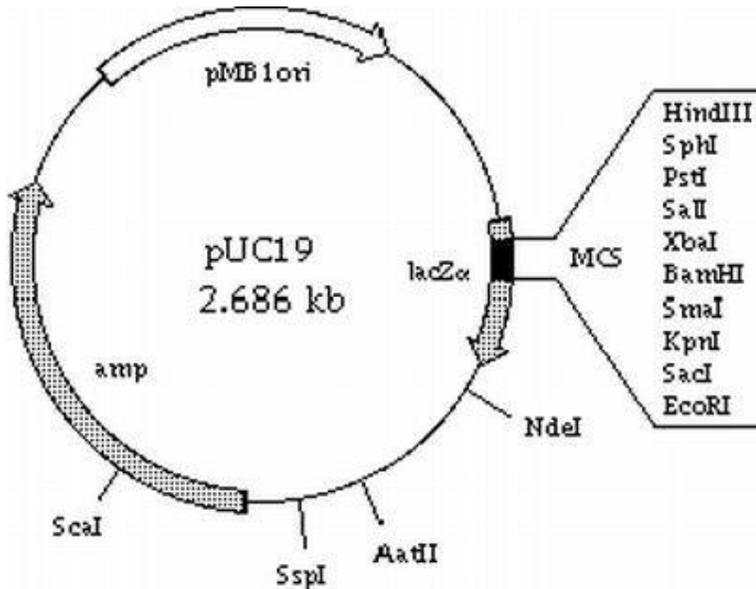


Gambar 5.2. Bentuk-bentuk ujung DNA hasil pemotongan enzim restriksi endonuklease (Nicholl, 2008)

F. Prosedur Pemotongan DNA dengan Enzim Restriksi

Secara teoritis teknik pemotongan DNA dengan enzim restriksi endonuklease tipe II mudah dilakukan. Namun pada praktiknya, serangkaian proses optimasi harus dijalankan sebelum mendapatkan metode yang tepat. Ini disebabkan oleh cukup banyaknya faktor yang ikut berperan, misalnya, konsentrasi enzim restriksi, volume buffer, waktu pemotongan, konsentrasi dan kemurnian DNA yang akan dipotong, dan sebagainya.

Sebelum melakukan pemotongan DNA plasmid atau DNA kromosom dengan enzim restriksi, harus dipastikan terlebih dahulu bahwa di dalam DNA terdapat daerah restriksi yang dapat dikenali enzim restriksi endonuklease. Misalnya plasmid pUC 18/19 pada Gambar 5.3. akan dipotong dengan enzim restriksi. Maka kita dapat memilih salah satu (atau dua) dari beragam enzim yang daerah restriksinya terdapat pada plasmid pUC19 seperti *HindIII*, *SphI*, *PstI*, *SalI*, *XbaI*, *BamHI*, *SmaI*, *KpnI*, *SacI*, *EcoRI* (umumnya yang terdapat pada daerah MCS (*multi cloning site*- dari plasmid).



Gambar 5.3. Peta plasmid pUC19 dengan daerah pengenalan enzim restriksi yang terkandung

Setelah kita menentukan enzim restriksi yang akan digunakan, hal lain yang perlu diperhatikan adalah kesesuaian bufer jika kita memotong DNA menggunakan dua enzim restriksi yang berlainan. Bufer yang digunakan harus dapat mendukung kerja dari kedua enzim, tidak hanya salah satunya sehingga optimalisasi kerja kedua enzim dalam melakukan pemotongan dapat tercapai. Pengecekan kesesuaian enzim dapat dilakukan kepada penyedia enzim masing-masing.

Kemurnian DNA yang akan dipotong juga merupakan faktor yang cukup penting dalam teknik pemotongan DNA dengan enzim restriksi. Semakin murni DNA plasmid yang digunakan akan semakin baik. Karena kerja enzim tidak akan terganggu oleh pengotor yang mungkin masih ada pada DNA yang hendak dipotong. Minimalisasi keberadaan pengotor dengan melakukan teknik isolasi DNA secara baik dan sesuai prosedur.

Lama waktu pemotongan (inkubasi) juga berpengaruh terhadap hasil pemotongan DNA dengan enzim restriksi. Semakin lama waktu pemotongan belum tentu semakin baik karena bisa jadi enzim akan memotong daerah yang bukan situs pengenalannya. Sementara waktu yang singkat juga belum tentu optimum karena memungkinkan DNA target belum terpotong sempurna oleh enzim restriksi. Oleh karena itu perlu dilakukan optimasi waktu inkubasi. Waktu terpendek inkubasi adalah 20 menit sementara waktu terlama sekitar semalam (*overnight*).

Pemotongan DNA Dengan Enzim Restriksi Endonuklease dan Isolasi Plasmid

Untuk memotong DNA target (misalnya DNA plasmid), ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml steril dimasukkan sejumlah volume ddH₂O, buffer enzim, dan enzim restriksi. Setelah dihomogenkan dengan sentuhan ujung jari, ke dalam campuran tersebut ditambahkan DNA plasmid. Campuran selanjutnya diinkubasi pada 37°C (suhu optimum enzim restriksi) selama waktu tertentu. Pada Gambar 4 dan 5 disajikan teknik pemotongan plasmid DNA menggunakan dua enzim restriksi, sementara pemotongan plasmid dengan satu enzim restriksi disajikan pada Gambar 5.6.

METODE PEMOTONGAN PLASMID DENGAN ENZIM RESTRIKSI

*Bam*HI dan *Eco*RI

Tabel 1. Komposisi reaksi pemotongan plasmid dengan enzim

Material	Volume untuk pemotongan (µL)
Plasmid	6,00
<i>Bam</i> HI Buffer 10X	1,00
Enzim <i>Bam</i> HI 20 u/µl	0,25
Enzim <i>Eco</i> RI 20 u/µl	0,25
ddH ₂ O bebas nuklease	2,50
VOLUME TOTAL	10,00

Pemotongan dilakukan pada suhu 37°C selama semalam. Hasil pemotongan enzim dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

Urutan penambahannya:

1. ddH₂O bebas nuklease
2. *Bam*HI Buffer 10X
3. Enzim *Bam*HI 20 u/µl
4. Enzim *Eco*RI 20 u/µl
5. Plasmid

(hadi, sn., 2004)

Gambar 5.4. Komposisi pemotongan plasmid pGEM[®]-T dengan *Bam*HI dan *Eco*RI (Hadi, 2004)

Material	Volume untuk pemotongan (µl)	Volume untuk pemotongan (µl)
Plasmid pCR [®] 2.1-TOPO [®]	27,8	5,1
NEBuffer 4 (NEB)	5,0	5,0
100x BSA	0,5	0,5
Enzim <i>Nco</i> I 10 u/µl	1,0	1,0
Enzim <i>Xho</i> I 10 u/µl	0,5	0,5
H ₂ O bebas nuklease	15,2	37,9
VOLUME TOTAL	50,0	50,0

Pemotongan dilakukan pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya enzim yang digunakan dinaktivasi dengan penginkubasian campuran reaksi pada suhu 65°C selama 20 menit. Hasil pemotongan enzim dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa 1%. (hadi, sn., 2011)

Gambar 5.5. Komposisi pemotongan plasmid pCR[®]2.1-TOPO[®] dengan *Nco*I dan *Xho*RI (Hadi, 2011)

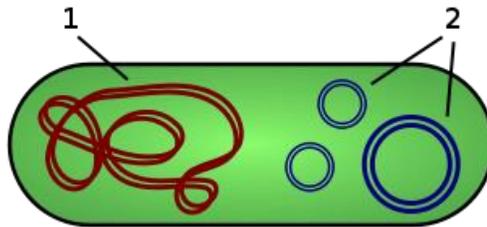
Material	Volume untuk pemotongan (µL)
Plasmid pUC 19	6,0
Buffer <i>Eco</i> RI 10 X	2,0
Enzim <i>Eco</i> RI	5,0
ddH ₂ O	7,0
VOLUME TOTAL	20,0

Pemotongan dilakukan pada suhu 37°C semalam (*overnight*)

Gambar 5.6. Komposisi pemotongan plasmid pUC19 dengan *Eco*RI

G. Plasmid

Plasmid merupakan suatu molekul yang dapat bereplikasi sendiri secara independen (*self-replicating*), terdiri atas utas ganda DNA dan berbentuk DNA sirkular yang dipelihara di dalam bakteri sebagai entitas ekstrakromosomal (Glick & Jack, 1994). Ukuran plasmid sangat bervariasi dari mulai 1 kb sampai lebih dari 200 kb (Sambrook & Russel, 2001). Plasmid berukuran kecil banyak ditemukan pada beragam tipe bakteri. Namun, tidak semua sel bakteri mengandung plasmid karena plasmid bukan merupakan komponen esensial sel yang mempengaruhi hidup matinya sel, melainkan hanya merupakan komponen tambahan. Tanpa plasmid sekalipun, sel bakteri tetap dapat hidup dan tumbuh asalkan pada kondisi yang sesuai.



Gambar 5.7. Sel bakteri dengan DNA kromosom (1) dan plasmid (2)
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Plasmid>)

Plasmid memiliki kemampuan bereplikasi karena adanya titik awal replikasi (*origin of replication*). Adanya titik ori membuat replikasi plasmid tidak bergantung pada kromosom inang. Meskipun demikian, replikasi plasmid tetap membutuhkan beberapa protein yang dikode oleh kromosom sel inang bakteri, disamping protein yang diekspresikan oleh gen yang terdapat pada plasmidnya sendiri; gen-gen ini biasanya terletak dekat dengan titik ori plasmid atau yang dikenal dengan daerah ori (Lodge, 2007). Daerah ori ini juga mengontrol jumlah kopi plasmid dalam setiap kopi kromosom inang.

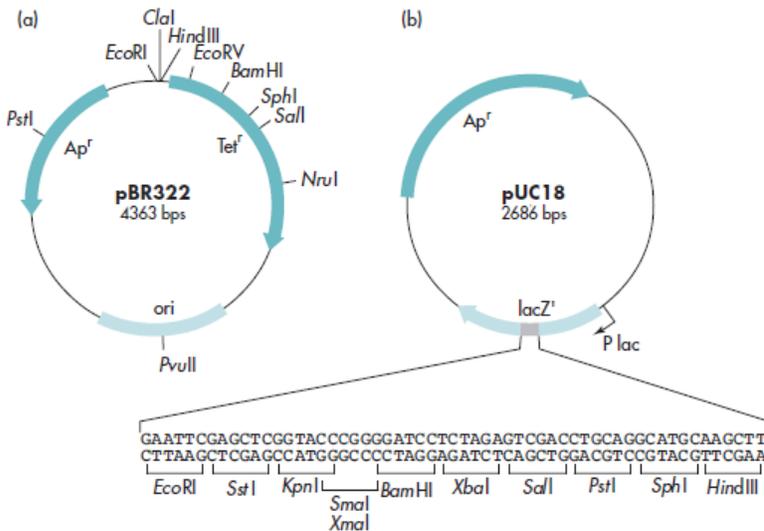
Tabel 5.2. Contoh plasmid dan karakteristik yang dimiliki

Plasmid	Size (kb)	Conjugative?	Copy number	Selectable markers
ColE1	7.0	No	10–15	EI ^{imm}
RSF1030	9.3	No	20–40	Ap ^r
CloDF13	10.0	No	10	DFI ₃ ^{imm}
pSC101	9.7	No	1–2	Tc ^r
RK6	42	Yes	10–40	Ap ^r , Sm ^r
F	103	Yes	1–2	–
R1	108	Yes	1–2	Ap ^r , Cm ^r , Sm ^r , Sn ^r , Km ^r
RK2	56.4	Yes	3–5	Ap ^r , Km ^r , Tc ^r

Keterangan:

Ap, ampisilin; Cm, kloramfenikol; Km, kanamisin; Sm, streptomisin; Sn, sulfonamid; Tc, tetrasiklin; EI^{imm} dan DFI₃^{imm}, kekebalan terhadap kolisin homologus tetapi tidak kolisin heterologus (Nicholl, 2008).

Sifat fenotipa bakteri yang berhubungan erat dengan peran plasmid seperti resistensi bakteri terhadap antibiotika tertentu, kemampuan bakteri memproduksi antibiotika dan memfermentasi gula, peran bakteri dalam menginduksi terbentuknya tumor pada tanaman, produksi enterotoksin dan lain sebagainya.



Gambar 5.8. Peta plasmid pBR322 yang menunjukkan adanya gen resisten terhadap antibiotika ampisilin (Ap^r) dan tetrasiklin (Tet^r), titik ori, dan beberapa daerah pengenalan enzim restriksi. b) Peta plasmid pUC18 yang mengandung gen resisten ampisilin (Ap^r), gen *lacZ*, dan sepuluh daerah restriksi (*EcoRI*, *SstI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SalI*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*) (Lodge, 2007).

H. Sejarah Plasmid

Penamaan plasmid pertama kali dicetuskan oleh Joshua Lederberg, seorang ahli biologi molekuler dan genetika berkebangsaan Amerika. Istilah “plasmid” pertama kali muncul dalam sebuah tulisan ilmiah berjudul *in Physiological Reviews* karya Lederberg untuk mewakili istilah “elemen yang dapat diwariskan selain kromosom”.

Di penghujung 1960, pemahaman genetik dan sifat fisik plasmid dan pewarisan sitoplasmik berkembang pesat hingga memungkinkan eksploitasi massif plasmid sebagai alat untuk mempelajari proses seluler seperti replikasi DNA.

I. Klasifikasi Plasmid

Plasmid dapat diklasifikasikan ke dalam dua kelompok, yaitu plasmid konjugatif dan non-konjugatif. Plasmid konjugatif dapat memediasi pentransferan dirinya sendiri di antara sel bakteri melalui proses yang dikenal dengan konjugasi. Proses konjugasi membutuhkan fungsi dari daerah spesifik *tra* (transfer) dan *mob* (*mobilising*) yang terdapat pada plasmid. Sementara plasmid non-konjugatif tidak memiliki kemampuan mentransfer dirinya sendiri tetapi memungkinkan dimobilisasi oleh plasmid yang memiliki kemampuan konjugasi jika mereka memiliki daerah *mob* yang fungsional (Nicholl, 2008).

Plasmid juga dapat diklasifikasikan berdasarkan jumlah kopi plasmid yang ditemukan di dalam sel inangnya, suatu sifat yang dikenal dengan sebutan *copy number*. Plasmid *low-copy-number* cenderung menunjukkan kontrol ketat replikasi DNA, dengan replikasi DNA plasmid terkait erat dengan replikasi DNA kromosom inangnya. Sementara replikasi plasmid *high-copy-number* tidak bergantung pada replikasi DNA kromosom inangnya (Nicholl, 2008).

Secara umum plasmid yang dikelompokkan pada plasmid konjugatif berukuran besar menunjukkan kontrol ketat replikasi DNA (dikelompokkan sebagai plasmid *low-copy-number*), sedangkan plasmid non-konjugatif berukuran kecil menunjukkan replikasi DNA yang tidak bergantung replikasi DNA kromosom inang (dikelompokkan sebagai plasmid *high-copy-number*).

J. Plasmid dalam Teknik Biologi Molekuler

Plasmid biasa digunakan dalam teknik kloning molekuler. Plasmid ini umumnya dikonstruksi melalui teknik rekayasa genetika sehingga bereplikasi di bawah kontrol, membawa gen yang secara spesifik resisten terhadap satu atau lebih antibiotika, dan mengandung sejumlah situs restriksi endonuklease yang merupakan tempat penyisipan DNA target yang diinginkan (namun hanya terbatas sampai berukuran ~10 kb).

Dalam teknik biologi molekuler, plasmid dijadikan wahana (vektor) untuk mentransfer sekuen DNA target pada inang sel bakteri, tempat DNA target nantinya diperbanyak. Plasmid termasuk vektor yang paling umum digunakan dibandingkan dengan vektor lainnya seperti cosmids, fosmids, phage, yeast artificial chromosomes (YACs), transposon, bacterial artificial chromosomes (BACs), dan virus.

Tabel 5.3. Beberapa contoh plasmid yang digunakan dalam teknik biologi molekuler

Vektor	Kandungan	Aplikasi	Supplier
pBR322	Ap ^r , Tc ^r , Daerah kloning tunggal	Kloning dan subkloning pada <i>Escherichia coli</i>	Banyak supplier
pATI53	Ap ^r , Tc ^r , Daerah kloning tunggal	Kloning dan subkloning pada <i>Escherichia coli</i>	Banyak supplier
pGEM [®] -3Z	Ap ^r , <i>multicloning site</i> (MCS), promoter SP6/T7, <i>lacZ α</i>	Kloning dan transkripsi <i>in vitro</i> pada E.coli dan produksi DNA utas tunggal	Promega
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Kan ^r , Ap ^r , MCS, Promoter T7, <i>LacZ</i> □□□ daerah primer M13 <i>forward</i> dan <i>reverse</i>	Kloning produk PCR	Invitrogen
pCI [®]	Ap ^r , MCS, promoter T7, <i>CMV enhancer/promoter</i>	Ekspresi gen pada sel mamalia	Promega
pET-3	Ap ^r , MCS, promoter T7	Ekspresi gen pada sel bakteri	Stratagene
pCMV-Script [®]	Neo ^r , MCS yang besar, <i>human cytomegalovirus</i> (CMV) <i>enhancer/promoter</i>	Ekspresi gen tingkat tinggi pada sel mamalia dan kloning produk PCR	Stratagene
pYES2/CT, pYES3/CT	Ap ^r , Marker <i>URA3/TRP1</i> , MCS dengan 8/9 daerah unik, epitop V5 dan polyhistidine (6xHis) <i>tag</i> , promoter <i>GAL1</i> khamir	Ekspresi gen pada sel khamir <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invitrogen

K. Teknik Isolasi Plasmid dari Sel Bakteri

Teknik isolasi plasmid merupakan prosedur yang umum dilakukan dalam teknik kloning gen. Daerah DNA target yang ingin diperbanyak disisipkan dalam daerah MCS plasmid kemudian ditransformasikan ke dalam sel inang bakteri untuk selanjutnya secara otomatis ikut digandakan ketika sel bakteri membelah selama tahap perbanyakan sel. Setelah proses perbanyakan dalam sel bakteri mencukupi, plasmid dengan DNA target yang disisipkan ke dalamnya umumnya akan diisolasi (diambil) dari sel inangnya melalui serangkaian teknik isolasi.

Prinsip dalam teknik isolasi plasmid dari sel bakteri adalah mengambil plasmid dengan membuat membran sel bakteri terbuka pada kondisi basa yang memungkinkan plasmid keluar dari sel. Kondisi basa dimaksudkan agar DNA berbentuk sirkular larut sementara DNA kromosom yang berbentuk linier akan mengendap bersama organel lain sel sehingga mudah dipisahkan dengan teknik sentrifugasi.

L. Prosedur Lisis Sel Bakteri dengan Alkali untuk Isolasi Plasmid

Tahap pertama adalah menginokulasi koloni tunggal bakteri yang diambil dari cawan petri yang mengandung medium LB agar dan antibiotik tertentu ke dalam tabung uji yang mengandung 3-5 ml medium LB dengan antibiotik tertentu. Kultur bakteri ditumbuhkan semalam dengan penggoyangan 200 rpm pada 37°C.

Sebanyak 1,5 ml kultur bakteri dipindahkan ke dalam tabung sentrifus mikro 1,5 ml. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Pelet yang didapatkan ditambahkan 200 µL *Lysing solution I* dingin. Suspensi dihomogenkan dengan divorteks atau melalui pemipetan naik-turun. Pastikan semua pelet sel bakteri bercampur baik dengan *Lysing solution I*. Suspensi lalu diinkubasi di dalam es selama 5 menit. Ke dalam suspensi bakteri ditambahkan 300 µL *Lysing solution II* (larutan selalu dibuat baru). Suspensi dicampurkan dengan dibolak-balik secara cepat sebanyak lima kali tanpa divorteks. Suspensi bakteri lalu diinkubasi di dalam es selama 5 menit.

Ke dalam suspensi ditambahkan 200 µL *Lysing solution III* dingin. Suspensi dicampur dengan dibolak-balik beberapa kali untuk selanjutnya diinkubasi selama 5 menit di dalam es. Suspensi ini kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Supernatannya dipindahkan ke tabung yang baru. Selanjutnya, supernatan ditambahkan 400 µL CIAA (*Chloroform Isoamyl Alcohol*) dengan perbandingan 1:1. Untuk menghomogenkannya, suspensi divorteks. Suspensi selanjutnya disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Cairan lapisan atas dipindahkan ke tabung sentrifus mikro

baru dan ditambahkan etanol absolut (100%) sebanyak 2 x volume pada suhu ruang. Setelah diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang, larutan disentrifugasi 5 menit pada 13.000 rpm. Supernatan yang didapat dibuang dan peletnya dicuci dengan 1 ml etanol 70%. Larutan lalu disentrifugasi selama 5 menit pada 13.000 rpm. Setelah supernatan dibuang, pelet dikeringkan selama 7-10 menit pada suhu ruang. Pelet yang diperoleh disuspensikan dengan penambahan 50 μ L TE buffer atau ddH₂O yang mengandung enzim RNase 20 μ g/ml. Suspensi dihomogenkan dengan divorteks, kemudian disimpan dalam pendingin -20°C.

Keterangan

Lysing solution I : 2,5 ml glukosa 2 M, 2 ml EDTA 0,5 M, 2,5 ml Tris 1 M, dan 3 ml ddH₂O

Lysing solution II : 200mM NaOH, 1% SDS

Cara membuatnya (untuk 1 Liter) :

Larutkan 8,0 gram NaOH ke dalam 950 ml ddH₂O. Tambahkan 50 ml larutan SDS 20%. Homogenkan larutan.

Lysing solution III: 60 ml kalium asetat 5 M (pH 4,8), 11,5 ml asam asetat, dan ddH₂O sampai volume total 100 ml.

Buffer TE : Tris pH 8.0 with HCl, 1mM EDTA

Cara membuatnya (untuk 1 Liter):

Larutkan 1,21 gram Tris base dan 0,37 gram EDTA.2H₂O ke dalam 800 ml ddH₂O. Atur pH sampai 8,0 dengan penambahan HCl. Tambahkan ddH₂O sampai volumenya 1 liter. Homogenkan larutan.

M. Soal Latihan

1. Apa yang dimaksud dengan enzim restriksi? Apa bedanya dengan enzim-emzim pada umumnya?
2. Apa yang dimaksud dengan *restriction site*?
3. Jelaskan perbedaan enzim restriksi type I, II dan III.
4. Jelaskan secara sederhana tahapan pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi.
5. Jelaskan apa yang dimaksud dengan plasmid. Mengapa plasmid penting dalam teknologi DNA rekombinan?
6. Jelaskan beda antara plasmid konjugatif dan plasmid non-konjugatif.
7. Jelaskan apa yang dimaksud dengan plasmid sebagai vektor utk *cloning*.
8. Jelaskan secara sederhana tahapan isolasi plasmid.

DAFTAR PUSTAKA

Buku dan Jurnal

- Hadi, S.N. 2004. *Kloning dan Ekspresi Daerah Determinan "a" Gen S Virus Hepatitis V pada Saccharomyces cerevisiae YRD15*. Skripsi.
- Hadi, S.N. 2011. *Kloning dan Ekspresi Daerah DBL3x dan DBL5ε Gen var2csa P. falciparum pada Escherichia coli BL21 (DE3)*. Tesis.
- Lodge, J., I. Pete dan M. Steve. 2007. *Gene Cloning*. Taylor and Francis Group, Birmingham.
- Nicholl, D.S. 2008. *An Introduction to Genetic Engineering*. Cambridge University Press.
- Sambrook, J. dan D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual. Ed ke-3*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Website

- (<http://en.wikipedia.org/wiki/Plasmid>). 2013. Plasmid.

