

TEKNIK BIOLOGI MOLEKULER

Prof. Dr. Yuni Ahda, M.Si
Dr. Dwi Hilda Putri, M.Biomed
Afifatul Achyar, M.Si | Risa Ukhti Muslima, M.Si

Buku ini merupakan panduan yang dirancang untuk memberikan pemahaman menyeluruh tentang berbagai teknik dasar dalam biologi molekuler. Di dalamnya dibahas metode-metode penting seperti isolasi DNA, RNA, dan protein, polymerase chain reaction (PCR), sekuensing, elektroforesis, kloning molekuler, serta teknik lainnya yang menjadi fondasi utama dalam studi di bidang ini. Selain itu, konsep analisis ekspresi gen, genotyping, dan analisis protein juga diuraikan guna memperkaya pemahaman pembaca terhadap metode-metode yang banyak digunakan dalam riset biologi molekuler modern.

Dengan pendekatan yang menekankan pada pemahaman konsep dasar dan aplikasinya, buku ini diharapkan dapat menjadi referensi yang bermanfaat tidak hanya bagi mahasiswa, tetapi juga bagi peneliti pemula, tenaga laboratorium, dan siapa saja yang tertarik untuk mendalami dunia biologi molekuler secara lebih luas dan praktis.



PENERBITAN & PERCETAKAN UNP PRESS
Jln. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Padang
Sumatera Barat



UNP PRESS

TEKNIK BIOLOGI
MOLEKULER

Prof. Dr. Yuni Ahda, M.Si
Dr. Dwi Hilda Putri, M.Biomed
Afifatul Achyar, M.Si | Risa Ukhti Muslima, M.Si

TEKNIK BIOLOGI MOLEKULER

Penerbitan & Percetakan
UNP PRESS

Prof. Dr. Yuni Ahda, M.Si
Dr. Dwi Hilda Putri, M.Biomed
Afifatul Achyar, M.Si | Risa Ukhti Muslima, M.Si

DUMMY

Penerbitan & Percetakan

UNP PRESS

TEKNIK BIOLOGI MOLEKULER

Prof. Dr. Yuni Ahda, M.Si.

Dr. Dwi Hilda Putri, M.Biomed.

Afifatul Achyar, M.Si.

Risa Ukhti Muslima, M.Si.

DUMMY

Penerbitan & Percetakan

UNP PRESS

DUMMY

UNDANG-UNDANG REPUBLIK INDONESIA
NO 19 TAHUN 2002
TENTANG HAK CIPTA
PASAL 72
KETENTUAN PIDANA SANKSI PELANGGARAN

1. Barang siapa dengan sengaja dan tanpa hak mengumumkan atau memperbanyak suatu Ciptaan atau memberi izin untuk itu, dipidana dengan pidana penjara paling singkat 1 (satu) bulan dan denda paling sedikit Rp 1.000.000, 00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan denda paling banyak Rp 5.000.000.000, 00 (lima milyar rupiah)
2. Barang siapa dengan sengaja menyerahkan, menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu Ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud dalam ayat (1), dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan denda paling banyak Rp 500.000.000, 00 (lima ratus juta rupiah).

Penerbitan & Percetakan

UNP PRESS

TEKNIK BIOLOGI MOLEKULER

DUMMY

Penerbitan & Percetakan

UNP PRESS

Prof. Dr. Yuni Ahda, M.Si.

Dr. Dwi Hilda Putri, M.Biomed.

Afifatul Achyar, M.Si.

Risa Ukhti Muslima, M.Si.

DUMMY

Penerbitan & Percetakan

UNP PRESS



2025

TEKNIK BIOLOGI MOLEKULER

editor, Tim editor UNP Press

Penerbit UNP Press, Padang, 2025

1 (satu) jilid; 17.6 x 25 cm (B5)

Jumlah Halaman xv + Halaman 176



Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang pada penulis
Hak penerbitan pada UNP Press

Penyusun: Prof.Dr. Yuni Ahda,M.Si., Dr Dwi Hilda Putri., M.Biomed.,
Afifatul Achyar, M.Si., Risa Ukhti Muslima, M.Si.

Editor Substansi: TIM UNP Press

Editor Bahasa: Prof. Dr. Harris Effendi Thahar, M.Pd.

Desain Sampul & Layout: Melinda Febrianti, S.IP. & Ghaisan Ghauts.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga buku Teknik Biologi Molekuler ini dapat terselesaikan dengan baik. Buku ini hadir sebagai referensi umum bagi siapa saja yang ingin memahami prinsip-prinsip dasar dari berbagai teknik yang digunakan dalam bidang biologi molekuler.

Melalui buku ini, pembaca diharapkan dapat memperoleh pemahaman yang lebih jelas mengenai teknik-teknik dasar seperti isolasi asam nukleat dan protein, polymerase chain reaction (PCR), elektroforesis, sekuensing, teknik DNA rekombinan, genotyping, serta analisis ekspresi gen dan protein. Teknik-teknik tersebut merupakan metode penting dan banyak digunakan dalam kegiatan penelitian di berbagai bidang ilmu hayati dan bioteknologi.

Penyusunan buku ini dilakukan secara sistematis, dimulai dari pemaparan landasan teori, gambaran metodologi, hingga pembahasan mengenai kendala umum (troubleshooting) yang kerap ditemui dalam praktik. Dengan pendekatan ini, buku ini diharapkan dapat memberikan gambaran menyeluruh baik bagi mahasiswa, peneliti pemula, maupun pembaca umum yang tertarik untuk mendalami biologi molekuler.

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan, baik secara langsung maupun tidak langsung, sehingga buku ini dapat diselesaikan dan diterbitkan.

Kami menyadari bahwa buku ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kami sangat menghargai segala bentuk kritik dan saran yang membangun sebagai bahan perbaikan di masa yang akan datang. Semoga buku ini dapat memberikan manfaat yang luas dan turut berkontribusi dalam pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang biologi molekuler.

Padang, Mei 2025

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	V
DAFTAR ISI	VI
DAFTAR GAMBAR	IX
DAFTAR TABEL	XIV
BAB 1 PENGANTAR TEKNIK BIOLOGI MOLEKULER ..	1
BAB 2. STRUKTUR ASAM NUKLEAT DAN KONSEP DOGMA SENTRAL BIOLOGI	8
A. STRUKTUR ASAM NUKLEAT	8
B. KONSEP DOGMA SENTRAL BIOLOGI MOLEKULER.....	13
C. MEKANISME REPLIKASI DNA	14
D. MEKANISME TRANSKRIPSI DAN TRANSLASI	20
BAB 3. TEKNIK ISOLASI DNA.....	34
A. PERBEDAAN STRUKTUR SEL.....	34
B. PRINSIP DASAR DAN METODE ISOLASI DNA.....	35
C. ISOLASI DNA PADA BERBAGAI JENIS SEL	39
D. ISOLASI DNA EKSTRAKROMOSOMAL.....	41
E. TROUBLESHOOTING ISOLASI DNA	43
BAB 4. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	45
A. PENGANTAR DAN PRINSIP DASAR PCR	45
B. PERBANDINGAN PCR DAN REPLIKASI DNA.....	47
C. TROUBLESHOOTING PCR	48
D. JENIS-JENIS PCR	51
BAB 5. ELEKTROFORESIS.....	59
A. PRINSIP DASAR ELEKTROFORESIS	59

B. JENIS-JENIS ELEKTROFORESIS	61
C. TROUBLESHOOTING ELEKTROFORESIS	68
BAB 6. REAL-TIME PCR	71
A. PRINSIP DASAR REAL-TIME PCR.....	71
B. JENIS PEWARNA FLUORESEN DAN METODE DETEKSI DALAM QPCR.....	71
C. KURVA AMPLIFIKASI DAN ANALISIS DATA QPCR	76
D. TROUBLESHOOTING QPCR.....	79
BAB 7. SEKUENSING	81
A. PENGANTAR SEKUENSING	81
B. SEKUENSING METODE SANGER.....	82
C. ANALISIS DATA SEKUENSING.....	84
D. APLIKASI SEKUENSING.....	86
BAB 8. PEMOTONGAN DNA DENGAN ENZIM RESTRIKSI ENDONUKLEASE	88
A. PRINSIP DASAR RESTRIKSI DNA.....	88
B. NOMENKLATUR ENZIM RESTRIKSI	90
C. TIPE-TIPE ENZIM RESTRIKSI.....	91
D. KOMPONEN REAKSI RESTRIKSI DNA.....	93
E. TROUBLESHOOTING RESTRIKSI DNA.....	95
BAB 9. KLONING MOLEKULER (TEKNIK DNA REKOMBINAN).....	98
A. PENGERTIAN KLONING MOLEKULER.....	98
B. KOMPONEN KLONING MOLEKULER.....	98
C. TAHAPAN KLONING MOLEKULER	100
D. APLIKASI KLONING MOLEKULER.....	105
BAB 10. ISOLASI RNA.....	107

A. JENIS-JENIS RNA	107
B. PRINSIP DASAR ISOLASI RNA	109
C. ANALISIS KUANTITAS DAN KUALITAS RNA	111
D. TROUBLESHOOTING ISOLASI RNA	113
BAB 11. ANALISIS EKSPRESI GEN	115
A. PRINSIP DASAR EKSPRESI GEN	115
B. METODE ANALISIS EKSPRESI GEN	115
C. PERBANDINGAN METODE PADA ANALISIS EKSPRESI GEN	123
BAB 12. GENOTYPING	125
A. PRINSIP DASAR GENOTYPING	125
B. METODE GENOTYPING	128
BAB 13. TEKNIK ISOLASI PROTEIN	130
A. STRUKTUR PROTEIN	130
B. PRINSIP DASAR ISOLASI PROTEIN	134
C. METODE ISOLASI PROTEIN	134
BAB 14. ANALISIS PROTEIN	141
A. METODE ANALISIS PROTEIN	141
B. PERBANDINGAN METODE ANALISIS PROTEIN	154
DAFTAR PUSTAKA	156
GLOSARIUM	161
INDEKS	172
TENTANG PENULIS	174

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Adenosin Trifosfat (ATP), Salah Satu Bentuk Nukleotida.....	8
Gambar 2.2. Struktur Kimia Basa Nitrogen Dalam Asam Nukleat.....	9
Gambar 2.3. Struktur Umum Nukleotida, A) Contoh Nukleotida, B) Perbedaan Gula Pentosa dalam Nukleotida.....	10
Gambar 2.4. Skema Reaksi Dehidrasi Dalam Sintesis Polimer .	11
Gambar 2.5. Struktur Helix Ganda DNA	12
Gambar 2.6. Struktur Trna Dalam Representasi Dua dan Tiga Dimensi	13
Gambar 2.7. Skema Aliran Informasi Genetik Dari DNA Ke Protein.....	14
Gambar 2.8. Tiga Hipotesis Untuk Replikasi DNA	15
Gambar 2.9. Dua Garpu Replikasi Bergerak Ke Arah Berlawanan Pada Kromosom <i>E. Coli</i>	16
Gambar 2.10. Beberapa Protein Yang Berperan Dalam Inisiasi Replikasi DNA.....	17
Gambar 2.11. Sintesis Untai Leading (Leading Strand) pada Replikasi DNA.....	19
Gambar 2.12. Sintesis Untai Lagging (<i>Lagging Strand</i>) pada Replikasi DNA.....	20
Gambar 2.13. Ilustrasi Inisiasi Transkripsi.....	22
Gambar 2.14. Modifikasi Pre-Mrna Dengan Penambahan 5' Cap Dan Poly-A Tail.....	24

Gambar 2.15. Perbandingan Struktur Molekul Mrna Bakteri Dan Eukariotik	25
Gambar 2.16. Skema Spliceosom Menyambung Pre-Mrna	26
Gambar 2.17. Reaksi Penyambungan (<i>Splicing</i>) Pra-Mrna	27
Gambar 2.18. Tabel Kodon Mrna	28
Gambar 2.19. Ilustrasi Tahap Inisiasi Translasi	31
Gambar 3.1. Perbedaan Struktur Sel Bakteri, Hewan, dan Tumbuhan	35
Gambar 3.2. Skema Metode Sentrifugasi	37
Gambar 3.3. Perbedaan Kecepatan pada Sentrifugasi Menghasilkan Komponen Endapan (Pelet) yang Berbeda	42
Gambar 4.1. Skema Amplifikasi DNA Dengan Metode PCR....	47
Gambar 4.2. Skema Prinsip Dasar Metode Multiplex-PCR	52
Gambar 4.3. Skema Prinsip Dasar Dari Metode ARMS-PCR....	53
Gambar 4.4. Contoh Hasil RAPD-PCR	54
Gambar 4.5. Skema Prinsip Dasar Metode <i>Nested</i> -PCR	55
Gambar 4.6. Skema Prinsip Dasar Metode RFLP-PCR	56
Gambar 4.7. Skema Prosedur AFLP-PCR	57
Gambar 5.1. Skema Elektroforesis Gel Agarosa (Horizontal) ...	62
Gambar 5.2. Skema Elektroforesis Gel Poliakrilamida (Vertikal)	63
Gambar 5.3. Skema Susunan Dua Bagian Gel Poliakrilamida: <i>Stacking Gel</i> Dan <i>Resolving Gel</i>	64
Gambar 5.4. Perbandingan PFGE Dengan Elektroforesis Konvensional, Beserta Contoh Hasil PFGE (Kanan)	65

Gambar 5.5. Skema elektroforesis kapiler	68
Gambar 6.1. Diagram Jablonski, Yang Merepresentasikan Tahap Eksitasi Dan Emisi Pada Fenomena Fluoresensi	72
Gambar 6.2. Skema Kinerja DNA <i>Binding Dyes</i> SYBR® Green Pada DNA Untai Ganda	73
Gambar 6.3. Skema Kerja Probe Molecular Beacon	74
Gambar 6.4. Skema Mekanisme Kerja Probe Taqman™ Double-Dye	76
Gambar 6.5. Skema Kurva Amplifikasi Qpcr	77
Gambar 7.1. Perbandingan Struktur Dntp Dan Ddntp	82
Gambar 7.2. Skema Kerja Metode Sekuensing Otomatis	83
Gambar 7.3. Contoh Kromatogram Hasil Sekuensing DNA	84
Gambar 7.4. Kromatogram Hasil Sekuensing DNA dari Tiga Sampel Produk PCR dalam Deteksi Polimorfisme Rs895819. (A) Heterozigot TC; (B) Homozigot TT; (C) Homozigot CC	85
Gambar 7.5. Contoh Hasil Sekuensing Pada Gen <i>Rearranged During Transfection</i> (RET) Wilayah Ekson 6 Pada Pasien Hirschsprung. Nukleotida Ke 36.874 Pada Individu 1 Menunjukkan Mutasi A→T	86
Gambar 8.1. Contoh Situs Pemotongan Enzim Restriksi Endonuklease	88
Gambar 8.2. Visualisasi Hasil Elektroforesis DNA	90
Gambar 9.1. Vektor Puc18, Plasmid Rekombinan yang Berasal dari <i>Escherichia Coli</i> Sebagai Vektor Untuk Kloning Molekuler	99

Gambar 9.2. Inseri Fragmen DNA ke Plasmid Bakteri yang Melibatkan Tahapan Restriksi dan Ligasi pada DNA Rekombinan	102
Gambar 9.3. Skema Proses Transformasi dan Fenotip Koloni yang Dihasilkan	104
Gambar 10.1. Skema rRNA yang Merupakan Komponen Utama Ribosom	108
Gambar 10.2. Perbandingan Berbagai Jenis RNA.....	109
Gambar 10.3. Ilustrasi Hasil Elektroforesis Gel pada Sampel Hasil Isolasi RNA yang Berbeda.....	113
Gambar 11.1. Sintesis DNA Komplementer (Cdna) dari Gen Eukariotik Menggunakan Metode Reverse Transcription-PCR.	117
Gambar 11.2. Skema Tahapan Umum <i>Reverse Transcription-PCR</i> (RT-PCR)	117
Gambar 11.3. Skema Tahapan Umum dari Metode Northern Blotting	118
Gambar 11.4. Hasil Northern Blotting pada Mrna Sitoplasma yang Diisolasi dari Jaringan Tikus.....	119
Gambar 11.5. DNA Mikroarray dalam Analisis Ekspresi Gen	120
Gambar 11.6. Skema Metode <i>RNA-Sequencing</i> Dalam Analisis Ekspresi Gen	122
Gambar 12.1. Jenis Variasi Genetik	125
Gambar 13.1. Skema Struktur Protein (Rantai Polipeptida).....	131
Gambar 13.2. Skema Konformasi Rangka Polipeptida Dalam Bentuk A-Helix (A,B) Dan B-Pleated Sheet (C,D)	132
Gambar 13.3. Skema Pembentukan Ikatan Disulfida (Jembatan Disulfida) Dalam Protein	133

Gambar 13.4. Empat Tingkatan Struktur Protein	133
Gambar 13.5. Berbagai Metode yang Digunakan dalam Pelisisan Sel: 1) Sonikasi, 2) Lisis Sel Berbasis Larutan, 3) Metode <i>French Press</i> , 4) Metode <i>Potter-Elvehjem Homogenizer</i>	136
Gambar 14.1. Skema Cara Kerja SDS-PAGE	144
Gambar 14.2. Contoh Hasil Elektroforesis Gel Poliakrilamida 1 Dimensi (1D-PAGE).....	146
Gambar 14.3. Skema Pemisahan Protein Dengan Metode Pemfokusan Isoelektrik.....	147
Gambar 14.4. Skema Pemisahan Elektroforesis Gel Poliakrilamida 2 Dimensi (2D-PAGE)	147
Gambar 14.5. Contoh Hasil Elektroforesis Gel Poliakrilamida 2 Dimensi (2D-PAGE).....	148
Gambar 14.6. Skema Aparatus Elektroblothing Basah Untuk Transfer Protein pada Western Blotting.....	149
Gambar 14.7. Perbandingan Metode Deteksi Langsung dan Tidak Langsung Pada Western Blotting	151
Gambar 14.8. Skema Perbandingan Berbagai Metode ELISA.....	154

Penerbitan & Percetakan



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Sejarah dan Perkembangan Teknik Biologi Molekuler.....	4
Tabel 2.1. Jenis Enzim DNA Polimerase dan Fungsinya dalam Replikasi DNA pada Prokariota dan Eukariota.	17
Tabel 3.1. Reagen yang digunakan dalam proses isolasi DNA beserta fungsinya	37
Tabel 3.2. Jenis dan Prinsip Dasar Berbagai Metode Isolasi DNA.....	38
Tabel 3.3. Perbedaan Isolasi DNA Pada Sel Bakteri, Hewan dan Tumbuhan	40
Tabel 3.4. Troubleshooting Isolasi DNA.....	43
Tabel 4.1. Komponen PCR Dan Deskripsi Beserta Fungsinya. ..	46
Tabel 4.2. Perbandingan Metode PCR Dan Replikasi DNA Dalam Sel.....	48
Tabel 4.3. Troubleshooting PCR.	49
Tabel 5.1. Komponen Elektroforesis Dan Fungsinya.....	60
Tabel 5.2. Troubleshooting Metode Elektroforesis.....	68
Tabel 6.1. Fluorofor yang umum digunakan untuk pelabelan asam nukleat	72
Tabel 6.2. Troubleshooting metode qPCR.....	79
Tabel 8.1. Situs Pengenalan (<i>Recognition Site</i>) dan Situs Pemotongan (<i>Restriction Site</i>) dari Beberapa Enzim Restriksi Endonuklease yang Sering Digunakan.	92
Tabel 8.2. Komponen Umum Reaksi Enzim Restriksi Beserta Fungsinya.....	93
Tabel 8.3. Troubleshooting Dalam Aplikasi Enzim Restriksi	95

Tabel 9.1. Perbandingan vektor yang umum digunakan untuk kloning fragmen DNA	99
Tabel 10.1. Perbedaan prinsip dalam isolasi RNA dan DNA.....	110
Tabel 10.2. Troubleshooting isolasi RNA	113
Tabel 11.1. Perbandingan Antar Metode Analisis Ekspresi Gen ..	123
Tabel 12.1. Sejumlah Istilah Terkait Genotyping.....	127
Tabel 14.1. Metode spektrofotometri yang umum digunakan dalam analisis protein	142
Tabel 14.2. Perbandingan Prinsip Dasar, Keunggulan dan Kelemahan Sejumlah Metode Analisis Protein.	154



BAB 1

PENGANTAR TEKNIK BIOLOGI MOLEKULER

Teknik biologi molekuler merupakan sekumpulan metode dan prosedur untuk mengkaji, memodifikasi, serta menganalisis materi genetik dan protein, baik dalam sel hidup (*in vivo*), sistem aseluler (*in vitro*), maupun melalui analisis berbasis komputer (*in silico*). Teknik ini berakar dari biologi molekuler, cabang ilmu biologi yang mempelajari komposisi, struktur, mekanisme kerja, interaksi, dan regulasi molekul dalam fungsi sel. Sejumlah metode umum, seperti *polymerase chain reaction* (PCR), sekuensing, kloning molekuler, dan blotting, hanyalah beberapa contoh teknik biologi molekuler yang telah menjadi metode standar dalam berbagai disiplin ilmu.

Perkembangan teknik biologi molekuler tentu tidak lepas dari perkembangan biologi molekuler, yang berakar kuat dari genetika dan biokimia. Adapun fondasi awal genetika klasik dapat ditelusuri dari eksperimen Gregor Mendel mengenai pewarisan sifat. Pada tahun 1865, Mendel menerbitkan hasil penelitiannya tentang pewarisan tujuh karakteristik berbeda pada kacang polong (*Pisum sativum*). Sebelum temuan ini, pewarisan sifat dianggap terjadi melalui pencampuran karakteristik kedua orang tua—konsep yang dikenal sebagai *blending inheritance*. Sebagai contoh, keturunan dari orang tua yang tinggi dan pendek diasumsikan memiliki tinggi menengah. Namun, Mendel menyimpulkan bahwa pewarisan bersifat partikulat, di mana sifat-sifat diwariskan melalui unit pewarisan terpisah (yang kini dikenal sebagai *gen*) yang tetap utuh dari satu generasi ke generasi berikutnya.

Meskipun temuan Mendel tidak langsung mendapat perhatian luas, pada tahun 1900, tiga ahli botani—Hugo de Vries, Carl Correns, dan Erich von Tschermak—menemukan kembali prinsip pewarisannya secara independen. Sejak saat itu, penelitian genetika berkembang pesat, mencakup eksplorasi sifat gen, mekanisme pewarisan melalui perilaku kromosom dalam mitosis dan meiosis, serta analisis komposisi kimia DNA. Rangkaian penemuan ini menjadi dasar lahirnya biologi

molekuler modern, yang kemudian memicu pengembangan berbagai teknik analisis dan manipulasi material genetik.

Investigasi fundamental lainnya adalah penyelidikan mengenai mekanisme kerja gen dimulai dengan pengamatan Archibald Garrod terhadap penyakit alkaptonuria pada manusia pada tahun 1902. Pada masa itu, ahli biokimia telah mengidentifikasi bahwa makhluk hidup melakukan berbagai reaksi kimia yang sangat kompleks, yang dikatalisis oleh protein yang dikenal sebagai enzim. Reaksi-reaksi ini sering kali berlangsung secara berurutan, di mana produk dari satu reaksi menjadi substrat untuk reaksi berikutnya. Produk atau substrat di sepanjang jalur ini disebut sebagai “senyawa intermediet.” Garrod menduga bahwa akumulasi senyawa intermediet tertentu pada tingkat yang tinggi dalam kasus alkaptonuria terjadi karena kerusakan enzim yang seharusnya mengubah senyawa tersebut menjadi senyawa berikutnya dalam jalur metabolisme. Dengan mengaitkan temuannya ini dengan fakta bahwa alkaptonuria merupakan penyakit resesif berdasarkan hukum pewarisan Mendel, Garrod menyimpulkan bahwa gen yang mengalami kerusakan menghasilkan enzim yang juga rusak. Dengan kata lain, gen memiliki peran langsung dalam produksi enzim. Temuan Garrod ini yang kemudian menjadi dasar bagi penelitian lebih lanjut oleh George Beadle dan E. L. Tatum pada tahun 1941 yang membuktikan bahwa setiap gen bertanggung jawab untuk memproduksi satu enzim tertentu melalui eksperimen mereka menggunakan jamur *Neurospora crassa*. Inilah yang akhirnya dikenal sebagai *one gene-one enzyme hypothesis* (hipotesis satu gen-satu enzim).

Penelitian mengenai materi genetik mengalami kemajuan signifikan pada tahun 1953 ketika James Watson dan Francis Crick mengusulkan model struktur DNA berbentuk heliks ganda. Model ini dikembangkan berdasarkan data kimia dan fisika, terutama hasil difraksi sinar-X yang diperoleh Rosalind Franklin dan Maurice Wilkins. Penemuan ini menjadi landasan bagi pemahaman mekanisme replikasi dan ekspresi gen. Seterusnya, Marshall Nirenberg dan Gobind Khorana secara independen berhasil menguraikan kode genetik yang terdiri dari 64 kodon melalui pendekatan berbeda pada awal 1960-an. Temuan ini menjelaskan proses penerjemahan RNA menjadi urutan asam amino, yang menjadi dasar sintesis protein dalam sel.

Perkembangan teknik biologi molekuler semakin berkembang pesat dengan ditemukannya berbagai enzim krusial yang mendasari kemajuan teknologi di bidang ini. Salah satu penemuan penting adalah DNA polimerase, yang ditemukan oleh Arthur Kornberg dan rekannya pada tahun 1955. Selain itu, enzim ligase, yang digunakan untuk menggabungkan fragmen DNA, ditemukan secara independen oleh sejumlah peneliti pada tahun 1967. Penemuan lainnya adalah enzim restriksi endonuklease HindII dari bakteri *Haemophilus influenzae*, yang berfungsi sebagai "gunting molekuler" untuk memotong untai DNA pada urutan tertentu, yang ditemukan oleh Hamilton Smith pada tahun 1970. Penemuan ini telah menyokong teknik dalam manipulasi DNA dan teknologi DNA rekombinan.

Rangkaian penemuan inilah yang terus mendorong perkembangan berbagai teknik baru dalam biologi molekuler. Pada awal 1970-an, teknik isolasi gen, transfer gen ke organisme lain, serta kloning gen mulai berkembang pesat. Pada tahun 1972, Paul Berg berhasil merekayasa DNA rekombinan pertama secara *in vitro*, yang menjadi tonggak utama dalam bioteknologi modern. Selanjutnya, pada tahun 1975, Edwin Southern mengembangkan metode Southern blotting, sebuah teknik hibridisasi transfer gel untuk mendeteksi urutan DNA spesifik. Kemajuan signifikan lainnya terjadi pada tahun 1985, ketika Kary Mullis dan timnya mengembangkan metode PCR, yang merevolusi amplifikasi DNA. Sementara itu, metode sekuensing DNA dikembangkan secara independen oleh Frederick Sanger serta Alan Maxam dan Walter Gilbert antara tahun 1975 hingga 1977. Hingga kini, teknik biologi molekuler terus berkembang melalui inovasi, menghasilkan metode yang lebih canggih dan presisi, serta meningkatkan efisiensi dalam berbagai aplikasi.

Teknik biologi molekuler telah diterapkan secara luas di berbagai bidang. Dalam bidang kesehatan, teknik ini digunakan untuk mendiagnosis penyakit genetik dan infeksius, mendeteksi mutasi onkogenik, serta mengembangkan terapi gen guna memahami dan mengintervensi proses fisiologis seluler. Penerapan ini juga mendukung pengembangan obat yang lebih efisien melalui pendekatan berbasis

regulasi molekuler. Di bidang forensik, biologi molekuler berperan dalam identifikasi individu melalui analisis profil DNA. Sementara itu, dalam bidang pertanian, teknik ini diterapkan untuk mendeteksi patogen pada tanaman dan produk pangan, menguji karakter genetik tanaman, serta menganalisis organisme hasil rekayasa genetika (GMO).

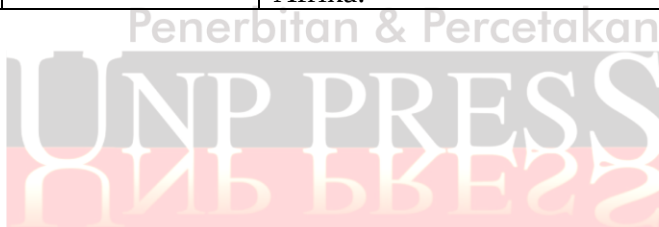
Tabel 1.1. Sejarah dan Perkembangan Teknik Biologi Molekuler

Tahun	Ilmuwan	Penemuan/pengembangan
1865	Gregor Mendel	Memperkenalkan konsep dasar genetika, yaitu: prinsip pemisahan (<i>segregation</i>) dan prinsip berpasangan secara bebas (<i>independent assortment</i>).
1869	Friedrich Miescher	Pertama kali mengisolasi DNA yang disebutnya “nuklein”.
1900	Hugo de Vries, Carl Correns, Erich von Tschermak	Menemukan kembali prinsip-prinsip Mendel.
1902	Archibald Garrod	Pertama kali mengemukakan penyebab genetik untuk penyakit manusia.
1902	Walter Sutton, Theodor Boveri	Mengusulkan teori kromosom.
1910, 1916	Thomas Hunt Morgan, Calvin Bridges	Menunjukkan bahwa gen berada pada kromosom.
1913	A.H. Sturtevant	Membangun peta genetik pertama.
1927	H.J. Muller	Menemukan bahwa sinar X dapat menginduksi mutasi gen.
1931	Harriet Creighton, Barbara McClintock	Memperoleh bukti adanya rekombinasi genetik.
1941	George Beadle, E.L. Tatum	Mengusulkan hipotesis satu gen-satu enzim (<i>one gene-one enzyme hypothesis</i>).
1944	Oswald Avery, Colin McLeod, Maclyn McCarty	Mengidentifikasi DNA sebagai materi pembentuk gen.
1953	James Watson,	Mengungkap struktur DNA

Tahun	Ilmuwan	Penemuan/pengembangan
	Francis Crick, Rosalind Franklin, Maurice Wilkins	
1955	Arthur Kornberg dan kolega	Menemukan enzim DNA polimerase
1958	Matthew Meselson, Franklin Stahl	Membuktikan replikasi DNA bersifat semikonservatif
1961	Sydney Brenner, François Jacob, Matthew Meselson	Menemukan RNA mesenjer (<i>messenger</i> RNA)
1961	Julius Marmur, Paul Doty	Menemukan renaturasi DNA, yang terkait dengan reaksi hibridisasi asam nukleat
1966	Marshall Nirenberg, Gobind Khorana	Menyelesaikan penguraian kode genetik
1967	Martin Gellert, Charles Richardson, Lehman, Hurwitz	Menemukan enzim ligase
1970	Hamilton Smith	Menemukan enzim restriksi DNA.
1972	Paul Berg	Membuat DNA rekombinan pertama secara in vitro.
1973	Herb Boyer, Stanley Cohen	Pertama kali menggunakan plasmid untuk mengkloning DNA.
1975	Edwin Southern	Mengembangkan hibridisasi transfer gel (Southern blotting) untuk mendeteksi urutan DNA spesifik.
1975- 1977	Frederick Sanger dan tim, Alan Maxam dan Walter Gilbert	Mengembangkan metode sekuensing DNA (metode Sanger dan metode Maxam-Gilbert).
1977	Phillip Sharp, Richard Roberts	Menemukan intron pada gen dan lainnya.
1982	<i>National</i>	Mendirikan GenBank yang menjadi

Tahun	Ilmuwan	Penemuan/pengembangan
	<i>Institutes of Health</i> (NIH)	basis data sekuens genetik publik yang berpusat awal di Laboratorium Nasional Los Alamos.
1985	Kary Mullis dan tim	Menemukan metode <i>polymerase chain reaction</i> (PCR)
1987	Mario Capecchi dan Oliver Smithies	Mengembangkan metode untuk penggantian gen yang ditargetkan (<i>targeted gene replacement</i>) pada sel induk embrionik tikus
1989	Stanley Fields dan Ok-Kyu Song	Mengembangkan sistem <i>yeast two-hybrid</i> untuk mengidentifikasi dan mempelajari interaksi protein
1990	David Lipman dan kolega	Merilis BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>), sebuah algoritma yang digunakan untuk mencari homologi antara urutan DNA dan protein.
1990	Melvin I. Simon dan kolega	Mempelajari cara efisien menggunakan <i>bacterial artificial chromosome</i> (BAC) dalam rangka menyisipkan fragmen DNA berukuran besar untuk sekuensing.
1990	Leroy Hood dan Michael Hunkapiller	Memperkenalkan teknologi sekuens DNA otomatis (<i>automated DNA sequence</i>).
1993	Victor Ambros dan kolega	Menemukan bahwa mikroRNA seluler dapat menurunkan ekspresi gen dengan memasang basa (<i>base-pairing</i>) ke RNA mesenjer (mRNA).
1996-1997	Patrick Brown, Joseph DeRisi, David Botstein dan kolega	Mengembangkan DNA mikroarray yang memungkinkan pemantauan ribuan gen secara simultan.
1997	Ian Wilmut dan kolega	Mengkloning domba (Dolly) dari sel ambing domba dewasa.
2003	Konsorsium peneliti internasional	Menyelesaikan <i>Human Genom Project</i> yang merupakan sekuensing dari genom manusia.
2007	Craig Venter dan	Menggunakan metode <i>shotgun</i>

Tahun	Ilmuwan	Penemuan/pengembangan
	kolega	<i>sequencing</i> untuk memperoleh sekuensing lengkap pertama dari genom individu manusia.
2008	Jian Wang dan kolega	Menggunakan <i>Next-Generation Sequencing</i> (NGS) untuk memperoleh sekuensing genom pertama dari individu Asia.
2008	David Bentley dan kolega	Menggunakan <i>single-molecule sequencing</i> untuk memperoleh sekuensing genom pertama dari individu Afrika.

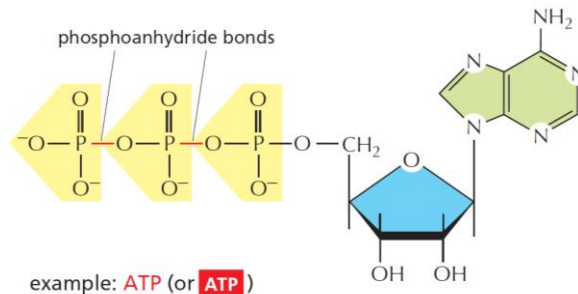


BAB 2

STRUKTUR ASAM NUKLEAT DAN KONSEP DOGMA SENTRAL BIOLOGI

A. Struktur Asam Nukleat

Asam nukleat merupakan makromolekul yang tersusun dari rantai panjang polinukleotida. Setiap nukleotida, yang merupakan unit dasar polinukleotida, terdiri atas tiga komponen utama: gula berkarbon lima (pentosa), basa nitrogen, dan gugus fosfat (**Gambar 2.1**). Nukleotida awal yang membentuk polinukleotida memiliki tiga gugus fosfat, namun selama proses polimerisasi, dua gugus fosfat dilepaskan. Adapun nukleotida yang tidak memiliki gugus fosfat disebut nukleosida. Terdapat dua jenis utama asam nukleat: deoxyribonucleic acid (DNA) dan ribonucleic acid (RNA) yang berbeda baik dari struktur maupun fungsinya.

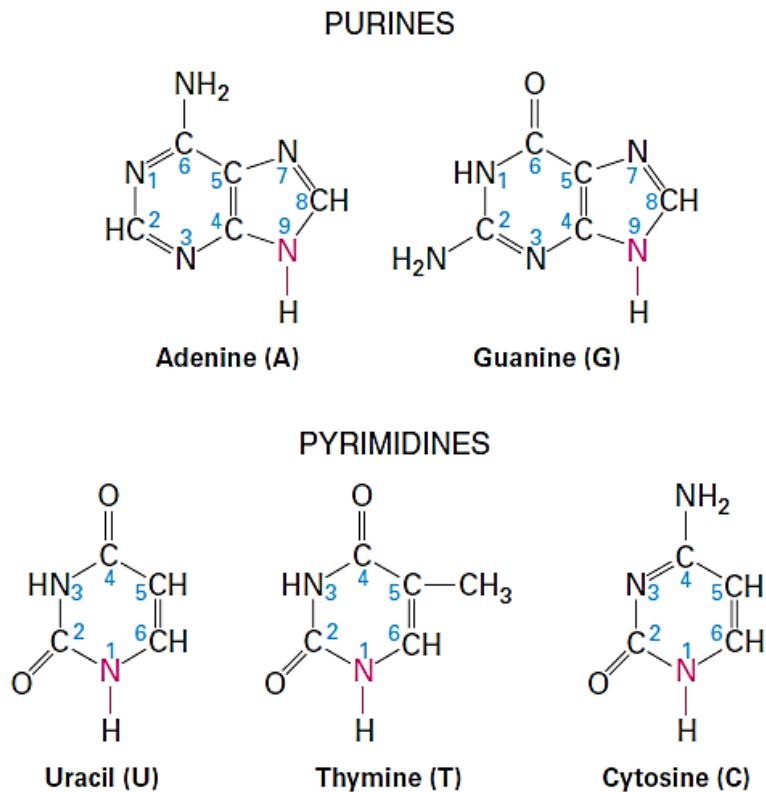


Gambar 2.1. Adenosin Trifosfat (ATP), Salah Satu Bentuk Nukleotida

Sumber: (Alberts *Et Al.*, 2022)

Basa nitrogen dalam nukleotida memiliki struktur cincin yang mengandung atom nitrogen dan berdasarkan strukturnya diklasifikasikan menjadi dua kelompok utama: pirimidin dan purin. Pirimidin memiliki struktur cincin tunggal dengan enam atom yang terdiri dari atom karbon dan nitrogen, dengan anggotanya meliputi sitosin (C), timin (T), dan urasil (U). Sebaliknya, purin memiliki struktur yang lebih besar, terdiri dari cincin enam atom yang menyatu dengan cincin lima atom, dengan anggotanya meliputi

adenin (A) dan guanin (G). Adenin, guanin, dan sitosin terdapat pada DNA dan RNA; sementara timin hanya ada pada DNA, dan urasil hanya ditemukan pada RNA (**Gambar 2.2**). Dalam bentuk nukleosidanya, adenin disebut adenosin, guanin disebut guanosin, sitosin disebut sitidin, urasil disebut uridin, dan timin disebut timidin.

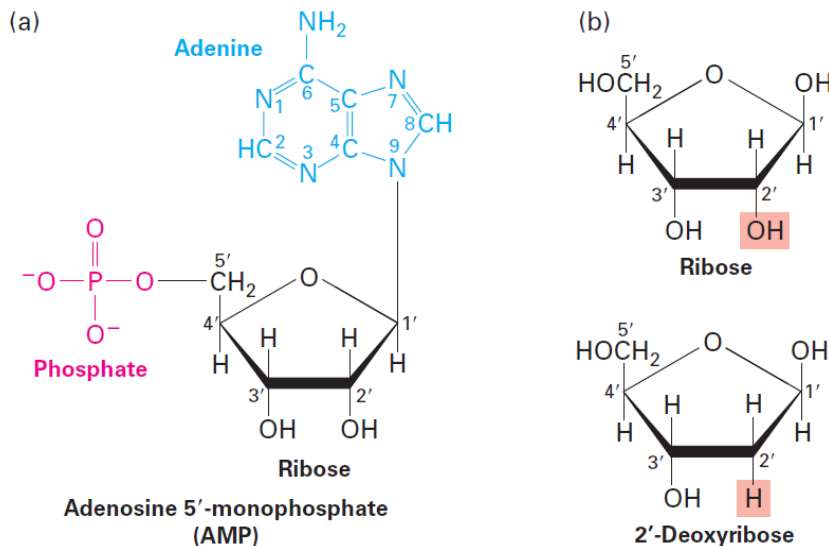


Gambar 2.2. Struktur Kimia Basa Nitrogen Dalam Asam Nukleat

Sumber: (Lodish Et Al., 2021)

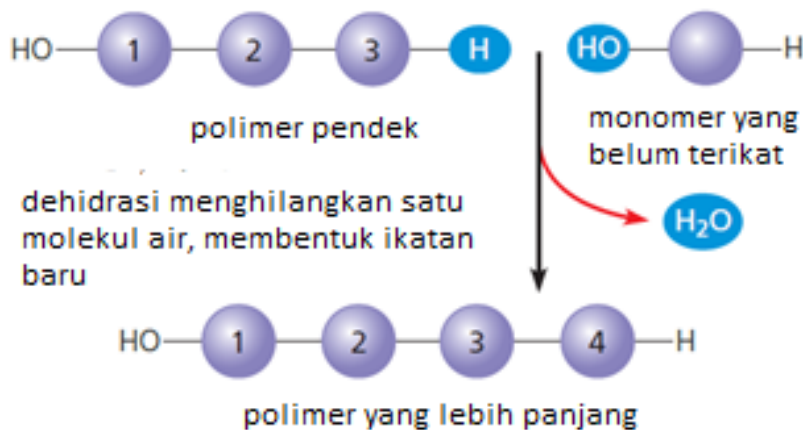
Berdasarkan jenis gula pentosa, DNA mengandung gula deoksiribosa, sedangkan RNA mengandung gula ribosa. Perbedaan utama antara keduanya terletak pada atom oksigen pada karbon kedua cincin, dimana deoksiribosa tidak memiliki atom oksigen pada posisi ini, sehingga disebut "deoksi" (tanpa oksigen). Untuk membentuk nukleotida, nukleosida harus berikatan dengan satu

hingga tiga gugus fosfat pada karbon 5' dari gula pentosa, di mana posisi karbon dalam gula diberi simbol prima (') (**Gambar 2.3**).



Gambar 2.3. Struktur Umum Nukleotida, A) Contoh Nukleotida, B) Perbedaan Gula Pentosa dalam Nukleotida
Sumber: (Lodish *Et Al.*, 2021)

Penggabungan nukleotida menjadi polinukleotida terjadi melalui reaksi dehidrasi yang melepaskan air (**Gambar 2.4**). Dalam polinukleotida, antar nukleotida dihubungkan oleh ikatan fosfodiester, yaitu ikatan kovalen antara gugus fosfat pada karbon 5' dari satu nukleotida dan gugus hidroksil ($-\text{OH}$) pada karbon 3' dari nukleotida sebelumnya. Ikatan ini membentuk struktur berulang yang dikenal sebagai rangka gula-fosfat (*sugar-phosphate backbone*), dengan dua ujung bebas yang berbeda. Ujung satunya memiliki gugus fosfat yang terikat pada atom karbon 5', sementara ujung lainnya memiliki gugus hidroksil pada atom karbon 3'. Oleh karena itu, kedua ujung ini disebut dengan ujung 5' dan ujung 3'.

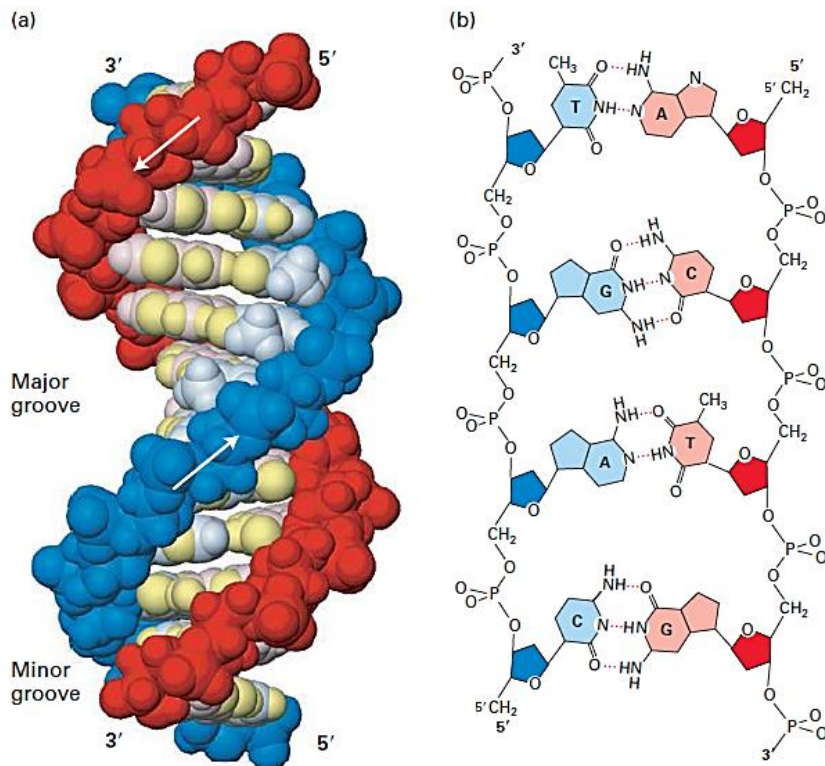


Gambar 2.4. Skema Reaksi Dehidrasi Dalam Sintesis Polimer

Sumber: (Urry *Et Al.*, 2021)

Struktur DNA terdiri dari dua untai polinukleotida yang melilit membentuk heliks ganda. Dua rangka gula-fosfat pada heliks ini bergerak dalam arah yang berlawanan (antiparalel), dengan orientasi 5' ke 3' pada satu untai dan 3' ke 5' pada untai lainnya. Terdapat dua jenis celah atau alur pada lilitan DNA, yang disebut alur mayor dan alur minor. Alur ini terbentuk karena cara untai DNA melilit, dan menjadi bagian penting karena memungkinkan protein tertentu mengenali dan berinteraksi dengan DNA.

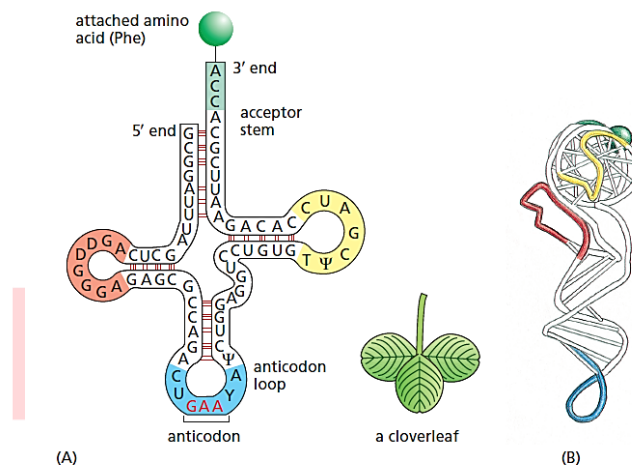
Rangka gula-fosfat terletak di bagian luar heliks (ditunjukkan oleh warna merah dan biru), sementara basa nitrogen tersusun di bagian dalamnya (**Gambar 2.5**). Kedua untai dihubungkan oleh ikatan hidrogen antara pasangan basa komplementernya, dimana adenin (A) selalu berpasangan dengan timin (T) melalui 2 ikatan hidrogen, dan guanin (G) selalu berpasangan dengan sitosin (C) melalui 3 ikatan hidrogen. Kedua untai DNA bersifat komplementer, sehingga setiap untai dapat diprediksi berdasarkan pasangan dari untai lainnya.



Gambar 2.5. Struktur Helix Ganda DNA

Sumber: (Lodish *Et Al.*, 2021)

Berbeda dengan DNA, molekul RNA biasanya berbentuk untai tunggal. Namun, pasangan basa komplementer tetap dapat terbentuk, baik antara dua molekul RNA maupun di antara segmen nukleotida dalam molekul RNA yang sama. Pasangan basa ini memungkinkan RNA memiliki struktur tiga dimensi yang esensial untuk menjalankan fungsinya. Sebagai contoh, RNA *transfer* (tRNA), yang berperan membawa asam amino ke ribosom selama proses sintesis protein. Molekul tRNA memiliki panjang sekitar 80 nukleotida, dan bentuk fungsionalnya yang seperti daun semanggi terbentuk melalui pasangan basa antara segmen nukleotida komplementer yang tersusun antiparalel satu sama lain (**Gambar 2.6**). Pada RNA, adenin (A) berpasangan dengan urasil (U), menggantikan timin (T) yang tidak ada pada RNA.



Gambar 2.6. Struktur Trna Dalam Representasi Dua dan Tiga Dimensi

Sumber: (Alberts Et Al., 2022)

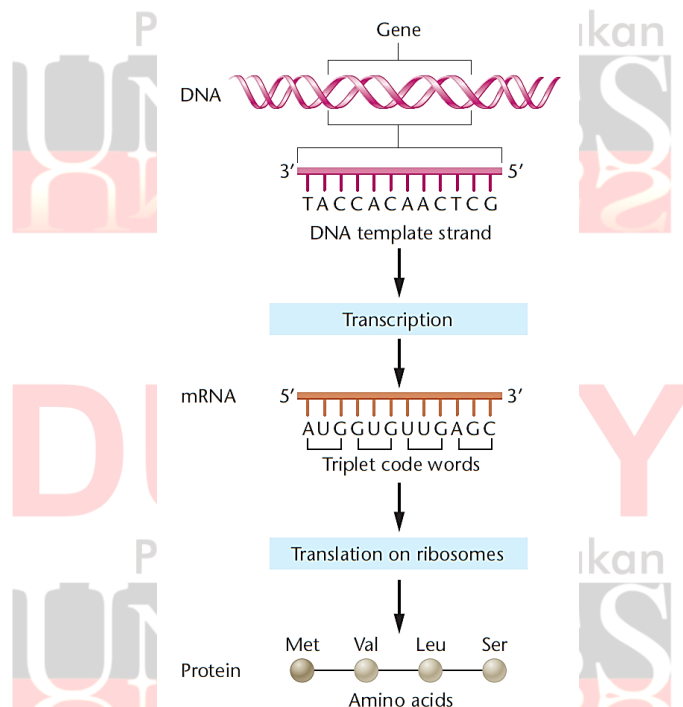
Gambar 2.6 memperlihatkan struktur transfer RNA (tRNA) dalam dua representasi yang berbeda: (A) struktur sekunder dan (B) struktur tiga dimensi. Pada bagian (A), struktur sekunder tRNA digambarkan menyerupai bentuk daun semanggi, yang mencerminkan organisasi khas dari molekul ini. Garis merah menunjukkan pasangan basa komplementer yang membentuk heliks ganda pada beberapa daerah, seperti lengan akseptor, lengan D, lengan antikodon, dan lengan TΨC. Interaksi basa-basa ini berperan penting dalam mempertahankan stabilitas struktur serta konfigurasi khas tRNA. Sementara itu, bagian (B) menampilkan salah satu representasi struktur tiga dimensi tRNA, yang menunjukkan bagaimana molekul ini melipat secara spasial untuk membentuk konfigurasi fungsional. Dalam bentuk tiga dimensi ini, tRNA membentuk struktur berbentuk L yang memungkinkan pengikatan yang tepat dengan ribosom dan asam amino selama proses translasi. Perbandingan kedua representasi ini menekankan pentingnya hubungan antara struktur dan fungsi tRNA dalam sintesis protein.

B. Konsep Dogma Sentral Biologi Molekuler

Konsep dogma sentral biologi molekuler pertama kali diperkenalkan oleh Francis Crick pada tahun 1958. Dogma ini

menjelaskan bahwa aliran informasi genetik terjadi dari DNA ke RNA, kemudian diteruskan ke protein. Konsep ini dikenal secara luas sebagai prinsip dasar dalam biologi molekuler dan berlaku pada berbagai organisme, mulai dari bakteri hingga manusia.

Gambar 2.7 merupakan skema dari dogma sentral biologi molekuler, yang menjelaskan aliran informasi genetik dalam secara umum. Transkripsi merupakan proses penyalinan DNA menjadi RNA, sementara translasi merupakan penerjemahan urutan nukleotida pada RNA menjadi urutan asam amino untuk membentuk protein.



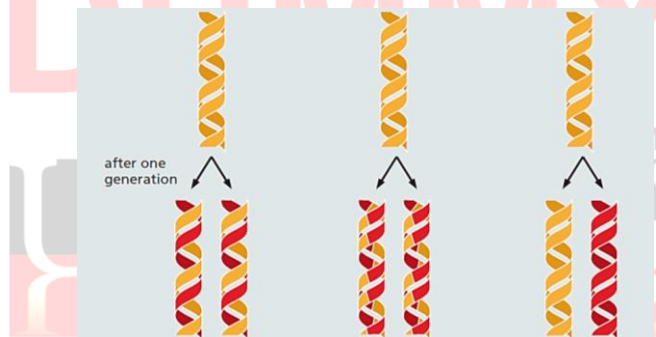
Gambar 2.7. Skema Aliran Informasi Genetik Dari DNA Ke Protein

Sumber: (Klug *et al.*, 2021)

C. Mekanisme Replikasi DNA

Dari beberapa penelitian, ahli dapat membuktikan bahwa replikasi DNA mengikuti model semikonservatif, di mana setiap molekul DNA yang baru terbentuk terdiri dari satu untai lama dari

molekul induk dan satu untai baru yang disintesis. Dalam model ini, setiap untai DNA dapat berfungsi sebagai cetakan untuk mensintesis untai komplementer yang baru. Hal ini berbeda dengan hipotesis model konservatif, di mana kedua untai induk tetap bersatu, serta hipotesis model dispersif, di mana setiap untai mengandung campuran DNA lama dan baru (**Gambar 2.8**). Hipotesis untuk model replikasi konservatif dan model dispersif tidak dapat dibuktikan kebenarannya.



Gambar 2.8. Tiga Hipotesis Untuk Replikasi DNA

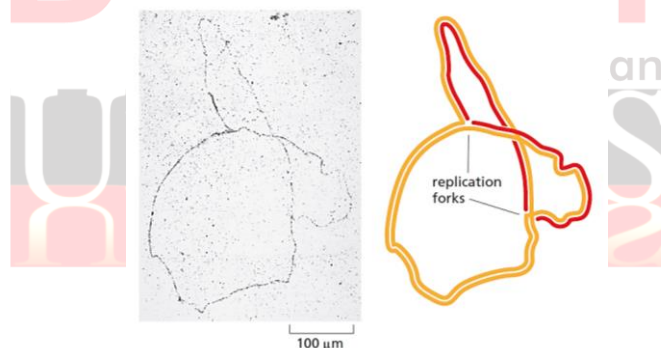
Sumber: (Alberts *et al.*, 2014)

Agar DNA dapat berfungsi sebagai cetakan, heliks ganda harus dibuka terlebih dahulu agar kedua untai terpisah dan basa-basa yang berpasangan menjadi terekspos. Secara *in vitro*, pemisahan ini memerlukan suhu tinggi mendekati titik didih air karena stabilnya struktur heliks ganda DNA. Namun, secara *in vivo*, proses ini dapat berlangsung pada suhu fisiologis dengan bantuan enzim DNA polimerase dan DNA helikase yang membantu mekanisme pembukaan heliks ganda DNA tanpa memerlukan suhu tinggi.

Replikasi DNA dimulai ketika “protein inisiasi” mengikat urutan DNA tertentu yang disebut asal replikasi (*origin of replication*, ORI). Di titik ini, protein inisiator memisahkan kedua untai DNA dengan memutus ikatan hidrogen antar basa. Oleh karena pasangan basa A-T memiliki lebih sedikit ikatan hidrogen dibandingkan G-C, DNA yang kaya A-T lebih mudah dipisahkan dan sering menjadi lokasi ORI. Pada genom bakteri, yang berupa DNA sirkular, hanya terdapat satu ORI, sedangkan genom manusia memiliki sekitar 10.000 ORI. Setelah heliks ganda terbuka, protein inisiasi

mengkoordinasi berbagai faktor replikasi untuk membentuk kompleks replikasi yang berperan dalam proses replikasi DNA.

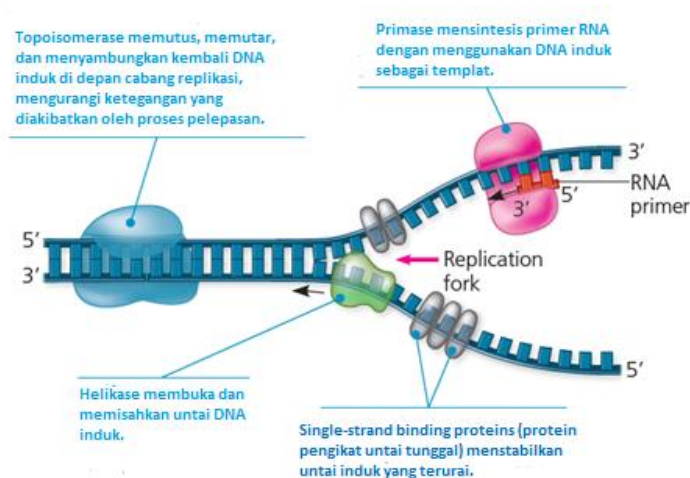
Bagian DNA yang terbuka membentuk gelembung replikasi (*replication bubble*), dimana pada setiap ujung gelembung replikasi terdapat garpu replikasi (*replication fork*), yang merupakan area berbentuk Y di mana untai DNA induk terbuka (**Gambar 2.9**). Dalam proses ini, beberapa jenis protein terlibat, diantaranya: helikase, topoisomerase, *single-strand binding proteins*, dan primase.



Gambar 2.9. Dua Garpu Replikasi Bergerak Ke Arah Berlawanan Pada Kromosom *E. Coli*

Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)

Helikase adalah enzim yang bertugas melepaskan lilitan heliks ganda pada garpu replikasi, sehingga kedua untai induk terpisah dan dapat berfungsi sebagai cetakan (**Gambar 2.10**). Setelah untai induk terpisah, protein pengikat untai tunggal (*single-strand binding proteins*) akan mengikat untai DNA yang tidak berpasangan, sehingga mencegahnya untuk kembali berpasangan. Proses pelepasan lilitan heliks ganda ini menyebabkan peningkatan lilitan dan ketegangan di depan garpu replikasi. Topoisomerase adalah enzim yang berperan dalam mengurangi ketegangan ini dengan cara memutus, memutar, dan menyambungkan kembali untai DNA.



Gambar 2.10. Beberapa Protein Yang Berperan Dalam Inisiasi Replikasi DNA

Sumber: (Urry et al., 2021)

Setelah untai DNA terbuka, rantai awal yang terbentuk pada sintesis DNA adalah untai RNA pendek yang disebut primer yang dibuat oleh enzim primase (**Gambar 2.10**). Primase memulai primer dengan menambahkan satu per satu nukleotida RNA, menggunakan untai DNA induk sebagai cetakan. Primer yang terbentuk biasanya terdiri dari 5 hingga 10 nukleotida. Setelah primer terbentuk, sintesis DNA baru dimulai pada ujung 3' primer RNA, dan enzim DNA polimerase menambahkan nukleotida DNA ke ujung 3' rantai yang sudah ada.

Pada *E. coli*, terdapat beberapa jenis DNA polimerase, di mana DNA polimerase III dan DNA polimerase I merupakan enzim utama dalam replikasi DNA. Sementara itu, pada eukariota, proses replikasi DNA lebih kompleks, dengan setidaknya 15 jenis DNA polimerase yang telah diidentifikasi. Di antara enzim-enzim tersebut, DNA polimerase δ , ϵ , dan α berperan sebagai enzim utama (**Tabel 2.1**).

Tabel 2.1. Jenis Enzim DNA Polimerase dan Fungsinya dalam Replikasi DNA pada Prokariota dan Eukariota.

Organisme	Nama Enzim	Fungsi
Prokariota	DNA polimerase I	Menghapus primer RNA pada untai

Organisme	Nama Enzim	Fungsi
		<i>lagging</i> menggunakan aktivitas eksonuklease 5' → 3' dan mengisi celah tersebut dengan nukleotida DNA. Juga berperan dalam perbaikan DNA.
	DNA polimerase III	Berperan dalam sintesis untai DNA baru pada untai <i>leading</i> dan <i>lagging</i> . Memiliki aktivitas eksonuklease <i>proofreading</i> 3' → 5' untuk memastikan akurasi replikasi.
Eukariota	DNA polimerase δ	Memperpanjang fragmen Okazaki pada untai <i>lagging</i> , dengan aktivitas eksonuklease <i>proofreading</i> 3' → 5'.
	DNA polimerase ϵ	Memperpanjang untai <i>leading</i> selama proses replikasi, dengan aktivitas eksonuklease <i>proofreading</i> 3' → 5'.
	DNA polimerase α	Memulai sintesis DNA dengan membentuk primer RNA-DNA, di mana subunit primase mensintesis RNA pendek, sedangkan subunit polimerase memperpanjangnya dengan beberapa nukleotida DNA. Primer ini kemudian diperpanjang oleh DNA polimerase δ atau ϵ .

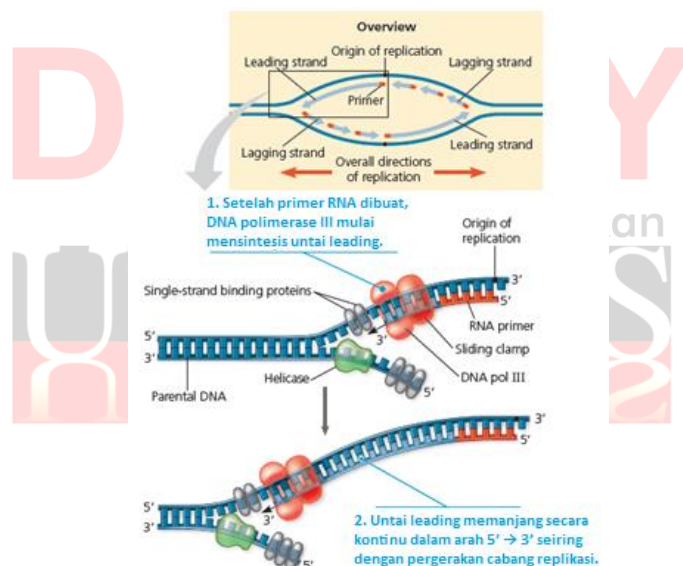
DNA polimerase mengkatalisis penambahan nukleotida melalui reaksi dehidrasi (**Gambar 2.4**). Saat nukleotida bergabung dengan ujung untaian DNA yang sedang tumbuh, dua gugus fosfat dilepaskan sebagai molekul pirofosfat (P—Pi). Hidrolisis pirofosfat menjadi dua molekul fosfat anorganik (Pi) merupakan reaksi eksergonik yang menyediakan energi untuk mendorong reaksi polimerisasi.

Dalam sintesis DNA, DNA polimerase hanya dapat menambahkan nukleotida ke ujung 3' bebas dari primer atau untai DNA yang sedang tumbuh, sehingga sintesis untai DNA baru hanya dapat berlangsung dalam arah 5' ke 3' (**Gambar 2.11**). Selama proses ini, DNA polimerase tetap berada di cabang replikasi pada untai cetakan dan terus menambahkan nukleotida ke untai komplementer yang sedang disintesis. Untai DNA yang terbentuk dengan mekanisme ini disebut untai *leading* (*leading stand*), di

mana hanya satu primer yang dibutuhkan agar DNA polimerase dapat mensintesis keseluruhan untai.

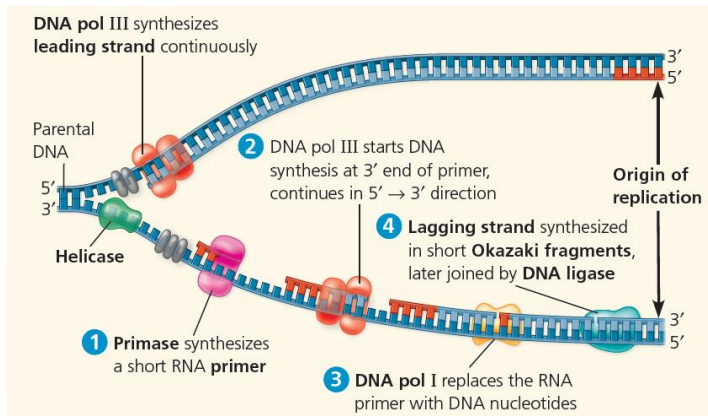
Sementara, untuk sintesis untai DNA baru pada untai cetakan lainnya dalam arah 5' ke 3', DNA polimerase harus bergerak sepanjang untai cetakan dalam arah yang menjauhi dari cabang replikasi. Untai DNA yang memanjang dalam arah ini disebut untai *lagging* (*lagging strand*) (**Gambar 2.12**). Berbeda dengan untai *leading* yang disintesis secara terus-menerus, untai *lagging* disintesis secara terputus-putus, membentuk serangkaian segmen yang dikenal sebagai fragmen Okazaki, yang dinamakan sesuai dengan penemunya, Reiji Okazaki.

Setelah fragmen Okazaki terbentuk, DNA polimerase lainnya menggantikan nukleotida RNA dari primer dengan nukleotida DNA, satu per satu. Penyambungan ikatan nukleotida terakhir dari segmen pengganti dengan nukleotida pertama dari fragmen Okazaki yang berdekatan dilakukan oleh enzim DNA ligase, yang menggabungkan rangka gula-fosfat dari semua fragmen Okazaki, sehingga membentuk satu untai DNA yang berkesinambungan.



Gambar 2.11. Sintesis Untai Leading (Leading Strand) pada Replikasi DNA

Sumber: (Urry et al., 2021)



Gambar 2.12. Sintesis Untai Lagging (*Lagging Strand*) pada Replikasi DNA

Sumber: (Urry *et al.*, 2021)

D. Mekanisme Transkripsi dan Translasi

DNA merupakan sumber informasi genetik yang berperan dalam mengarahkan sintesis molekul di dalam sel. Proses ini melibatkan dua tahap utama, yaitu transkripsi dan translasi, sebagaimana disampaikan pada subbab dogma sentral biologi molekuler.

Produk DNA dapat berupa protein atau non-protein, seperti RNA. Meski sebagian besar RNA ini berfungsi sebagai perantara transfer informasi genetik, khususnya RNA mesenjer (mRNA), yang mengarahkan sintesis protein berdasarkan instruksi genetik yang terdapat dalam DNA, beberapa jenis RNA, yang juga merupakan produk DNA, seperti RNA transfer (tRNA) dan RNA ribosom (rRNA), berperan langsung dalam proses translasi setelah ditranskripsi.

Semua organisme memiliki mekanisme transkripsi dan translasi, namun terdapat perbedaan mendasar antara proses ini pada prokariota dan eukariota. Pada prokariota, yang tidak memiliki membran inti, translasi mRNA dapat dimulai segera setelah transkripsi selesai, karena kedua proses tersebut terjadi di sitoplasma. Sebaliknya, pada sel eukariotik, transkripsi berlangsung di dalam nukleus, sedangkan translasi terjadi di sitoplasma. Selain

itu, transkrip RNA pada eukariota mengalami modifikasi pasca-transkripsi, sebelum meninggalkan nukleus dan menjadi mRNA yang siap digunakan dalam translasi.

1. Transkripsi

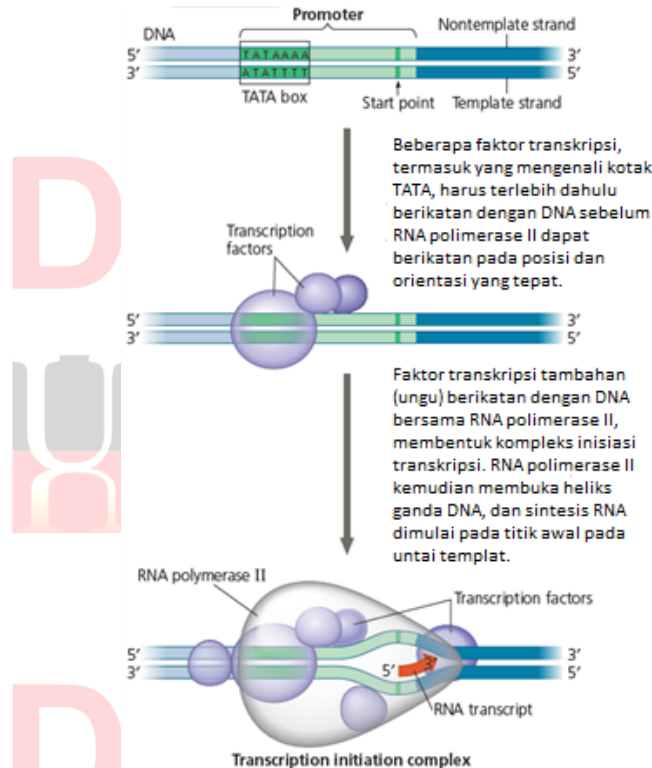
Transkripsi memiliki tiga tahap: inisiasi, elongasi, dan terminasi, dengan enzim utama yang berperan adalah RNA polimerase, yang memisahkan dua untai DNA dan menyusun nukleotida RNA komplementer dengan arah 5' ke 3'. Berbeda dengan DNA polimerase, RNA polimerase tidak memerlukan primer untuk memulai sintesis. Transkripsi dimulai pada urutan nukleotida tertentu di DNA yang disebut promotor. Untuk menunjukkan posisi relatif urutan nukleotida dalam DNA atau RNA terhadap arah transkripsi, digunakan istilah *downstream* (arah hilir, menuju ujung 3') dan *upstream* (arah hulu, menuju ujung 5').

Pada prokariota, hanya terdapat satu jenis RNA polimerase yang mensintesis mRNA serta jenis RNA lainnya yang berfungsi dalam sintesis protein, seperti RNA ribosom. Sebaliknya, pada eukariota, terdapat setidaknya tiga jenis RNA polimerase di dalam nukleus, di mana RNA polimerase II digunakan untuk sintesis pre-mRNA, sementara RNA polimerase lainnya mentranskripsi molekul RNA yang tidak diterjemahkan menjadi protein, diantaranya RNA polimerase I yang mensintesis rRNA, dan RNA polimerase III yang mensintesis tRNA, dan sejumlah snRNA (*small nuclear RNA*) dan snoRNA (*small nucleolar RNA*). Berikut adalah tiga tahapan transkripsi secara umum:

a. Inisiasi

Tahapan ini dimulai saat RNA polimerase mengikat pada lokasi dan orientasi yang tepat pada promotor, yang menentukan titik mulai transkripsi dan untai DNA mana yang digunakan sebagai cetakan. Pada eukariota, kumpulan protein yang disebut faktor transkripsi memediasi pengikatan RNA polimerase dan inisiasi transkripsi. Setelah faktor transkripsi melekat pada promotor, RNA polimerase II mengikatnya.

Kompleks faktor transkripsi dan RNA polimerase II yang terikat pada promotor ini disebut kompleks inisiasi transkripsi (**Gambar 2.13**).



Gambar 2.13. Ilustrasi Inisiasi Transkripsi

Sumber: (Urry Et Al., 2021)

Pada promotor eukariotik, terdapat urutan DNA penting yang disebut kotak TATA (*TATA box*), yang berperan dalam pembentukan kompleks inisiasi. Setelah faktor transkripsi yang sesuai melekat pada DNA promotor dan RNA polimerase terikat padanya dalam orientasi yang benar, enzim tersebut melepaskan dua untai DNA dan mulai mentranskripsi untai cetakan pada titik awal.

b. Elongasi

Pada tahap elongasi, RNA polimerase bergerak sepanjang DNA, membuka lilitan heliks ganda dan mengekspos sekitar

10-20 nukleotida untuk dipasangkan dengan nukleotida RNA. Enzim ini menambahkan nukleotida RNA ke ujung 3' RNA yang sedang tumbuh, sambil terus bergerak di sepanjang DNA. Setelah segmen RNA baru terbentuk, molekul RNA tersebut terlepas dari cetakan DNA-nya, dan heliks ganda DNA kembali terbentuk.

c. Terminasi

Mekanisme penghentian transkripsi berbeda antara prokariota dan eukariota. Pada prokariota, transkripsi berakhir ketika RNA polimerase mencapai urutan terminator pada DNA, yang juga ditranskripsi sebagai sinyal untuk menghentikan proses. Setelah itu, RNA polimerase terlepas, dan transkrip RNA langsung siap untuk translasi tanpa memerlukan modifikasi lebih lanjut. Sebaliknya, pada eukariota, RNA polimerase II menyalin urutan sinyal poliadenilasi pada DNA, menghasilkan urutan AAUAAA pada pre-mRNA (**Gambar 2.14**). Sinyal ini kemudian dikenali oleh protein di dalam nukleus, yang memotong transkrip RNA sekitar 10-35 nukleotida setelah sinyal tersebut, sehingga melepaskan pre-mRNA untuk pemrosesan lebih lanjut.

2. Modifikasi RNA pada eukariota

Terdapat dua jenis modifikasi RNA pada eukariota: modifikasi ujung RNA dan penyambungan RNA (splicing). Semua modifikasi RNA terjadi setelah transkripsi berakhir, kecuali modifikasi pada ujung 5' RNA, yang terjadi segera setelah transkripsi dimulai.

a. Modifikasi ujung mRNA

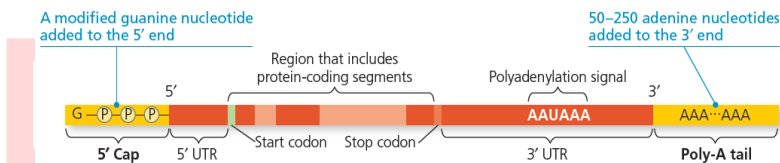
1) Modifikasi ujung 5' (5' *cap*)

Proses ini terjadi segera setelah RNA polimerase mulai mentranskripsi DNA, dan sekitar 20–40 nukleotida pertama telah disintesis, 5' cap ditambahkan pada ujung 5' mRNA yang sedang mengalami elongasi. Modifikasi ini berupa molekul 7-metilguanosin (m7G) yang terikat melalui ikatan

5'-5' trifosfat. 5' cap berfungsi untuk melindungi mRNA dari degradasi oleh enzim hidrolitik, memfasilitasi ekspor mRNA dari nukleus ke sitoplasma, serta membantu inisiasi translasi dengan memfasilitasi pengikatan ribosom pada mRNA.

2) Modifikasi ujung 3' (*poly-A tail*)

Tahapan ini terjadi setelah transkripsi selesai, di mana pre-mRNA mengalami poliadenilasi, yaitu penambahan ekor poli-A oleh enzim poly(A) polymerase (PAP). Proses ini dimulai setelah RNA polimerase II melewati sinyal poliadenilasi (AAUAAA), yang menandai lokasi pemotongan pre-mRNA. Kemudian, PAP menambahkan sekitar 80-250 nukleotida adenin (A) pada ujung 3' (**Gambar 2.14**). Modifikasi ini berfungsi dalam menjaga stabilitas mRNA, melindunginya dari degradasi, mempermudah transportasi mRNA ke sitoplasma, dan berperan dalam pengikatan faktor yang diperlukan untuk tahapan translasi.

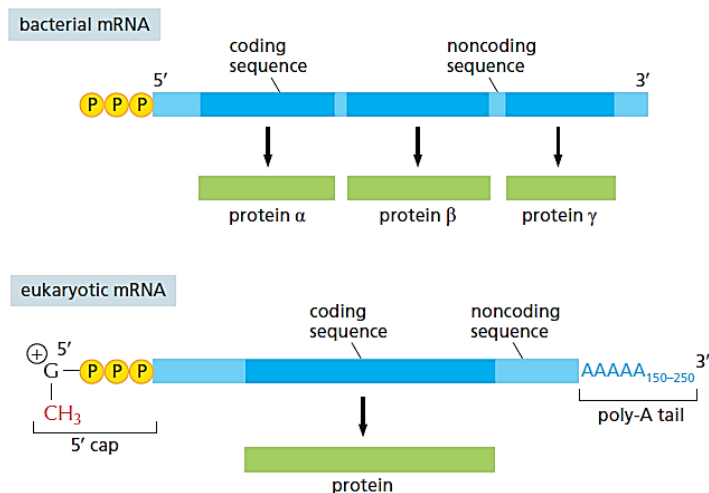


Gambar 2.14. Modifikasi Pre-Mrna Dengan Penambahan 5' Cap Dan Poly-A Tail

Sumber: (Urry *et al.*, 2017)

Modifikasi 5' *cap* dan *poly-A tail* tidak diterjemahkan menjadi protein. Selain itu, terdapat wilayah yang disebut *untranslated region* (UTR) pada ujung 5' dan 3' mRNA, yang juga tidak diterjemahkan menjadi protein, namun memiliki peran vital dalam regulasi ekspresi gen. Wilayah 5' UTR, yang terletak sebelum start kodon (AUG), berperan penting dalam pengaturan inisiasi translasi, khususnya dalam pengikatan ribosom dan faktor inisiasi translasi. Adapun 3' UTR, yang terletak setelah stop kodon, berfungsi

dalam pengaturan stabilitas mRNA dan kontrol terhadap jumlah mRNA yang diterjemahkan.



Gambar 2.15. Perbandingan Struktur Molekul Mrna Bakteri Dan Eukariotik

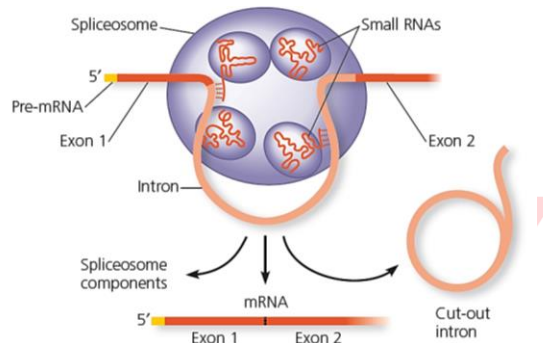
Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)

b. Penyambungan RNA (*splicing*)

Pada tahap ini, bagian-bagian tertentu dari molekul RNA dihilangkan, dan bagian yang tersisa disambungkan kembali. Bagian yang dihilangkan merupakan nukleotida non-pengkode yang disebut “intron”, sementara urutan pengkode, yang disebut “ekson” disatukan untuk membentuk urutan mRNA yang berkesinambungan.

Splicing terjadi setelah transkripsi selesai dan pra-mRNA terbentuk. *Splicing* pra-mRNA melibatkan kompleks *spliceosome*, yang terdiri dari lima molekul RNA kecil, yaitu U1, U2, U4, U5, dan U6, yang dikenal sebagai *small nuclear RNA* (*snRNA*) (**Gambar 2.16**). Masing-masing *snRNA* ini berikatan dengan sedikitnya tujuh subunit protein, membentuk kompleks ribonukleoprotein kecil (*small nuclear ribonucleoproteins*, *snRNPs*), yang menjadi inti dari *spliceosome*. Kompleks ini mengenali sekuens spesifik pada intron, lalu memotongnya dan menyambungkan kembali

bagian mRNA yang diperlukan, sehingga menghasilkan mRNA matang yang siap diterjemahkan.

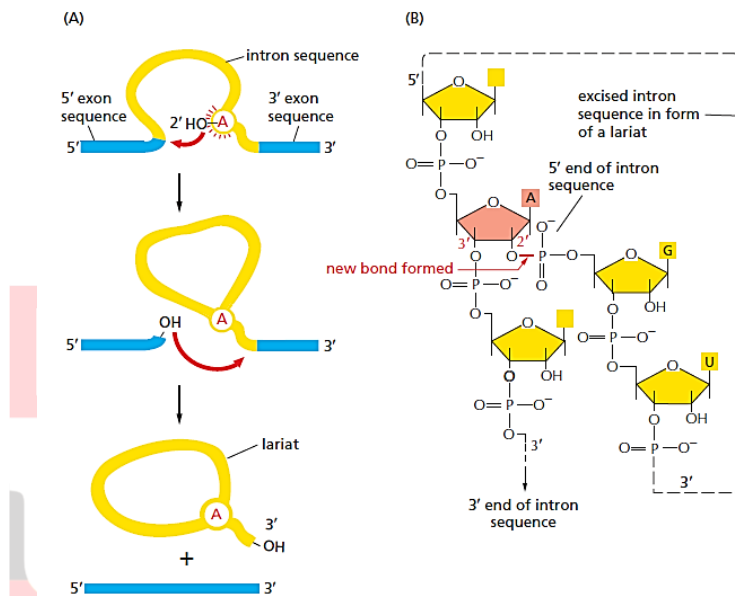


Gambar 2.16. Skema Spliceosom Menyambung Pre-Mrna

Sumber: (Urry *et al.*, 2021)

Splicing dimulai saat spliceosome mengenali dan mengikat sekuens spesifik pada intron, dengan bantuan kompleks snRNPs (U1, U2, U4, U5, dan U6). U1 snRNP mengikat situs penyambungan 5', sementara U2 snRNP menempel pada nukleotida adenina spesifik dalam intron, yang akan berperan dalam pembentukan struktur lariat. Setelah kompleks spliceosome aktif terbentuk dengan perekrutan U4, U5, dan U6, reaksi splicing dikatalisis secara bertahap.

Pada tahap pertama, nukleotida adenina dalam intron memicu situs penyambungan 5', menyebabkan pemutusan rantai gula-fosfat RNA dan pembentukan struktur lariat melalui ikatan kovalen antara ujung 5' intron dan nukleotida adenina. Spliceosome kemudian menstabilkan konformasi ekson yang akan disambungkan dan memfasilitasi langkah kedua, yaitu reaksi antara ujung 3'-OH ekson pertama dengan ekson kedua. Akibatnya, kedua ekson bergabung membentuk urutan pengodean yang berkelanjutan, sementara intron dilepaskan dalam bentuk lariat dan selanjutnya mengalami degradasi menjadi nukleotida tunggal yang dapat didaur ulang untuk sintesis RNA baru (**Gambar 2.17**).



Gambar 2.17. Reaksi Penyambungan (*Splicing*) Pra-Mrna
 Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)

RNA kecil dalam spliceosom tidak hanya membantu pengenalan lokasi splicing, tetapi juga mengkatalisis reaksi splicing itu sendiri. Proses splicing ini juga dapat menghasilkan *alternative splicing*, yang memungkinkan satu gen untuk menghasilkan berbagai varian protein berdasarkan pengaturan yang berbeda dari ekson-ekson yang disambungkan.

3. Translasi

Tahap ini merupakan proses penerjemahan informasi genetik yang terdapat dalam mRNA menjadi urutan asam amino untuk membentuk protein. Penerjemahan dilakukan dengan 'membaca' kodon, yaitu triplet nukleotida dalam urutan mRNA, yang ditulis dalam arah 5' ke 3' (**Gambar 2.18**). Translasi melibatkan dua komponen utama, yaitu tRNA dan ribosom.

		Second mRNA base				
		U	C	A	G	
First mRNA base (5' end of codon)	U	UUU } Phe UUC } (F) UUA } Leu UUG } (L)	UCU } UCC } Ser (S) UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } (Y) UAA } Stop UAG } Stop	UGU } Cys UGC } (C) UGA } Stop UGG } Trp (W)	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu (L) CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro (P) CCA } CCG }	CAU } His CAC } (H) CAA } Gln CAG } (Q)	CGU } CGC } Arg (R) CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile (I) AUA } AUG } Met (M) or start	ACU } ACC } Thr (T) ACA } ACG }	AAU } Asn (N) AAC } AAA } Lys (K) AAG }	AGU } Ser (S) AGC } AGA } Arg (R) AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val (V) GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala (A) GCA } GCG }	GAU } Asp (D) GAC } GAA } Glu (E) GAG }	GGU } GGC } Gly (G) GGA } GGG }	U C A G
		Third mRNA base (3' end of codon)				

Gambar 2.18. Tabel Kodon Mrna

Sumber: (Urry *et al.*, 2021)

a. RNA transfer (RNA)

RNA merupakan komponen translasi yang berperan sebagai "penerjemah" yang membawa asam amino dari sitoplasma ke ribosom, tempat asam amino tersebut dirangkai menjadi rantai polipeptida. Seperti halnya mRNA dan jenis RNA seluler lainnya, molekul tRNA ditranskripsi dari cetakan DNA. Pada sel eukariotik, setelah tRNA diproduksi di dalam nukleus, komponen ini kemudian ditranspor ke sitoplasma, tempat translasi berlangsung. Baik pada prokariota maupun eukariota, setiap molekul tRNA berfungsi secara berulang selama proses translasi. tRNA mengambil asam amino spesifik dari sitosol, mengantarkannya ke rantai polipeptida yang sedang disintesis di ribosom, lalu meninggalkan ribosom untuk kembali mengambil asam amino yang sama pada siklus penerjemahan berikutnya.

Dalam prosesnya, terdapat dua pengenalan molekuler utama untuk penerjemahan yang akurat. Pertama, tRNA harus membawa asam amino yang sesuai dengan kodon mRNA ke ribosom. Proses pencocokan antara tRNA dan asam amino ini dimediasi oleh enzim yang disebut aminoasil-tRNA sintetase (*aminoacyl-tRNA synthetases*). Setiap jenis enzim ini memiliki situs aktif yang hanya cocok dengan kombinasi spesifik antara asam amino dan tRNA. Terdapat 20 jenis aminoasil-tRNA sintetase, masing-masing untuk satu jenis asam amino. Enzim ini menghubungkan asam amino dengan tRNA yang sesuai, mengenali semua tRNA yang membawa asam amino tersebut, dan mengkatalisis pembentukan ikatan kovalen antara asam amino dan tRNA. Proses ini memerlukan energi dari hidrolisis adenosin trifosfat (ATP). Setelah tRNA bermuatan asam amino, ia dilepaskan dari enzim dan siap mengantarkan asam amino tersebut ke rantai polipeptida yang sedang terbentuk di ribosom. Kedua, antikodon tRNA harus berpasangan dengan kodon mRNA yang sesuai. Hal ini karena beberapa tRNA dapat mengenali lebih dari satu kodon, yang disebabkan oleh fleksibilitas pemasangan basa pada posisi ketiga kodon. Fenomena ini disebut *wobble*, yang menjelaskan mengapa sejumlah kodon berbeda yang mengkodekan asam amino yang sama sering kali hanya memiliki perbedaan pada basa ketiga.

b. Ribosom

Ribosom adalah komponen kunci lainnya dalam proses translasi. Organel ini terdiri dari dua subunit, yaitu subunit besar dan kecil, yang terdiri dari protein dan rRNA (**Gambar 2.19**). Pada eukariota, subunit ribosom diproduksi di nukleolus dan diekspor ke sitoplasma. Subunit kecil ribosom (40S) dan subunit besar ribosom (60S) akan bergabung di sekitar molekul mRNA saat translasi dimulai. Terdapat tiga situs pengikatan tRNA pada ribosom: situs P (peptidyl tRNA *binding site*), yang menahan tRNA yang membawa rantai polipeptida yang sedang tumbuh; situs A (aminoacyl-tRNA *binding site*), yang menahan tRNA yang membawa asam

amino berikutnya; dan situs E (*exit site*), tempat keluarnya tRNA setelah melepaskan asam amino.

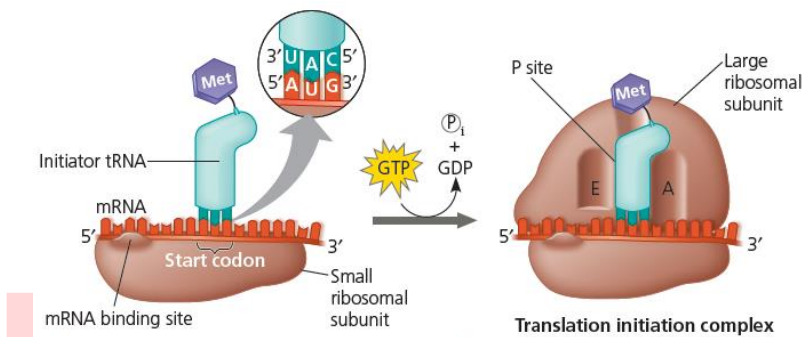
Struktur ribosom memungkinkan interaksi yang efisien antara tRNA dan mRNA, serta penempatan asam amino untuk ditambahkan ke ujung polipeptida yang sedang tumbuh. Bagian rRNA dalam subunit besar juga bertindak sebagai ribozim yang mengkatalisis pembentukan ikatan peptida antara asam amino, memungkinkan elongasi rantai polipeptida yang sedang disintesis.

Translasi berlangsung dalam tiga tahapan utama, yaitu: inisiasi, elongasi dan terminasi.

1) Inisiasi

Proses ini dimulai saat subunit kecil ribosom berinteraksi dengan mRNA dan tRNA inisiator. Pada prokariota, tRNA inisiator disebut fMet-tRNA_i, karena membawa N-formilmethionin, sementara pada eukariota, tRNA inisiator disebut Met-tRNA_i, karena membawa asam amino metionin tanpa modifikasi.

Pada prokariota, subunit kecil ribosom (30S) mengenali dan berikatan dengan urutan Shine-Dalgarno, urutan konservatif pada mRNA prokariota yang berfungsi sebagai situs pengikatan ribosom, yang terletak di hulu kodon start (AUG). Interaksi ini memungkinkan kodon start diposisikan dengan tepat di dalam ribosom untuk berpasangan dengan tRNA inisiator. Adapun pada eukariota, subunit kecil ribosom (40S) yang telah terikat dengan tRNA inisiator terlebih dahulu mengenali 5' cap pada mRNA. Selanjutnya, ribosom bergerak secara progresif ke arah hilir mRNA hingga menemukan kodon start (AUG).



Gambar 2.19. Ilustrasi Tahap Inisiasi Translasi

Sumber: (Urry *et al.*, 2021)

Tahap inisiasi translasi dimulai dengan asosiasi mRNA, tRNA inisiator, dan subunit ribosom kecil, yang membentuk komponen awal dari proses ini. Setelahnya, subunit ribosom besar bergabung untuk membentuk kompleks inisiasi translasi yang lengkap. Proses ini dimediasi oleh faktor inisiasi dan memerlukan energi yang dihasilkan dari hidrolisis guanosin trifosfat (GTP), yang mendukung pembentukan kompleks ini (**Gambar 2.19**). Setelah inisiasi selesai, tRNA inisiator berada di situs P ribosom, sementara situs A kosong dan siap menerima tRNA aminoasil lainnya. Proses sintesis rantai polipeptida berlangsung secara searah, dimulai dengan metionin pada ujung yang mengandung gugus amino, atau yang disebut ujung amino (*N-terminus*), ke ujung yang mengandung gugus karboksil, atau yang disebut ujung karboksil (*C-terminus*).

2) Elongasi

Pada tahap ini, asam amino ditambahkan satu per satu ke rantai polipeptida yang sedang tumbuh di ujung karboksil melalui siklus tiga langkah yang terkoordinasi yang melibatkan berbagai faktor elongasi yang bekerja sama. Tahapan tersebut adalah sebagai berikut:

- a) Pengenalan kodon: tRNA aminoasil berpasangan dengan kodon mRNA yang sesuai di situs A ribosom.

- b) Pembentukan ikatan peptida: rRNA pada subunit besar ribosom berperan dalam katalisis pembentukan ikatan peptida antara gugus amino dari asam amino yang baru masuk di situs A dan ujung karboksil dari polipeptida yang sedang tumbuh di situs P. Proses ini menyatukan asam amino baru dengan polipeptida yang telah ada.
- c) Translokasi: ribosom bergerak sepanjang mRNA ke arah 3', menyebabkan tRNA **yang** sebelumnya berada di situs A berpindah ke situs P, sementara tRNA kosong di situs P berpindah ke situs E sebelum dilepaskan. Pergerakan ini membawa kodon berikutnya ke situs A, sehingga siklus elongasi dapat berlanjut.

Selama elongasi, dua molekul GTP digunakan dalam setiap siklus translasi. Molekul GTP pertama diperlukan untuk memastikan akurasi dalam pengikatan tRNA aminoasil pada tahap pengenalan kodon di situs A ribosom, dengan bantuan faktor elongasi. Molekul GTP kedua digunakan dalam proses translokasi, di mana ribosom bergerak sepanjang mRNA ke arah 3', satu kodon dalam satu waktu.

Pada akhir setiap siklus, tRNA yang telah melepaskan asam aminonya berpindah ke situs E sebelum akhirnya dilepaskan ke sitoplasma. Di sitoplasma, tRNA tersebut dapat diisi ulang dengan asam amino spesifik oleh enzim aminoasil-tRNA sintetase, memastikan kelangsungan proses translasi.

3) Terminasi

Elongasi berakhir ketika kodon stop pada mRNA mencapai situs A ribosom. Tiga kodon stop, yaitu UAG, UAA, dan UGA (ditulis dalam arah 5' ke 3'), tidak mengkode asam amino tetapi berfungsi sebagai sinyal penghentian translasi. Tidak seperti kodon lainnya, kodon stop tidak dikenali oleh tRNA aminoasil, melainkan oleh

faktor pelepas, yaitu protein yang menyerupai struktur tRNA.

Ketika faktor pelepas mengikat kodon stop di situs A, ia memicu reaksi hidrolisis yang menyebabkan penambahan molekul air, bukan asam amino, ke ujung rantai polipeptida yang sedang disintesis. Molekul air ini, yang berasal dari sitosol, memutus ikatan antara polipeptida yang telah selesai dengan tRNA yang berada di situs P ribosom. Akibatnya, polipeptida dilepaskan dari ribosom. Setelah pelepasan ini, kompleks translasi dibongkar secara sistematis dengan bantuan faktor-faktor protein tertentu. Pembongkaran ini memerlukan energi tambahan yang diperoleh melalui hidrolisis dua molekul GTP.

BAB 3

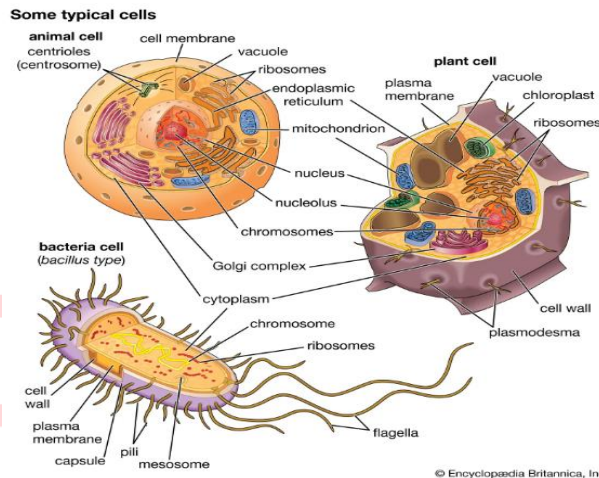
TEKNIK ISOLASI DNA

A. Perbedaan Struktur Sel

Sel makhluk hidup diklasifikasikan menjadi dua kelompok utama, yaitu sel prokariotik dan sel eukariotik, yang dibedakan berdasarkan struktur internal dan organisasi genetiknya. Pada sel prokariotik, seperti bakteri dan arkea, materi genetik berupa DNA tersusun dalam bentuk sirkular dan terletak di dalam nukleoid, yaitu area dalam sitoplasma yang tidak dikelilingi oleh membran inti. Sel prokariotik tidak memiliki organel bermembran dan umumnya memiliki dinding sel yang tersusun dari peptidoglikan (pada bakteri) atau komponen lain seperti pseudopeptidoglikan (pada arkea).

Sebaliknya, sel eukariotik, seperti yang terdapat pada hewan, tumbuhan, fungi, dan protista, memiliki DNA yang tersimpan dalam nukleus, yaitu organel yang dibatasi oleh membran inti ganda. Selain nukleus, sel eukariotik juga memiliki organel bermembran lainnya, seperti mitokondria dan kloroplas (pada sel tumbuhan dan alga), yang juga mengandung DNA sirkular tersendiri. Struktur luar sel eukariotik bervariasi, seperti sel tumbuhan memiliki dinding sel yang tersusun dari selulosa, sel hewan hanya memiliki membran plasma tanpa dinding sel, sementara sel fungi memiliki dinding sel yang mengandung kitin.

Pemahaman mengenai perbedaan struktural antara sel prokariotik dan eukariotik sangat penting dalam teknik isolasi DNA. Perbedaan ini menentukan metode lisis sel yang digunakan.



Gambar 3.1. Perbedaan Struktur Sel Bakteri, Hewan, dan Tumbuhan

B. Prinsip Dasar dan Metode Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan proses pemisahan DNA dari komponen seluler lainnya untuk memperoleh DNA murni yang dapat digunakan dalam berbagai aplikasi molekuler. Teknik isolasi DNA dapat diterapkan pada berbagai jenis sel, baik dari organisme prokariotik seperti bakteri maupun eukariotik seperti tumbuhan, hewan, dan fungi. Namun, perbedaan struktur sel mengharuskan adanya modifikasi dalam prosedur tertentu, seperti metode lisis yang digunakan.

Proses ini melibatkan penghancuran dinding sel atau membran sel dan selubung inti melalui metode fisik, kimia, enzimatis atau kombinasi dari ketiganya. Proses ini juga memanfaatkan reagen tertentu untuk mendegradasi komponen seluler lain, sambil tetap menjaga integritas DNA. Setelah dinding sel dan komponen internalnya dihancurkan, molekul DNA untai ganda dilepaskan ke dalam buffer ekstraksi. Pada tahap ini, DNA masih bercampur dengan protein dan komponen seluler lainnya. Supernatan yang mengandung DNA dan metabolit kecil lainnya kemudian dicampur dengan etanol atau isopropanol. Alkohol ini menyebabkan DNA, yang bersifat tidak larut dalam alkohol, mengendap, sementara metabolit kecil tetap larut. DNA yang mengendap membentuk pelet

kecil yang dikumpulkan melalui proses sentrifugasi. Setelah etanol dihilangkan, pelet DNA dilarutkan dalam air atau larutan buffer. Buffer ini biasanya mengandung Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA), yang menghambat aktivitas nuklease dengan mengikat ion logam seperti Mg^{2+} , serta memiliki pH netral hingga sedikit basa untuk menjaga stabilitas DNA. DNA yang dilarutkan siap untuk digunakan dalam analisis lebih lanjut.

Secara umum, isolasi DNA terdiri dari 4 tahapan utama, diantaranya:

1. Lisis sel

Tahap ini bertujuan untuk menghancurkan membran sel dan nukleus guna melepaskan DNA. Proses ini dapat dilakukan melalui metode fisik (misalnya sonikasi atau penggilingan), kimia (menggunakan deterjen seperti SDS), atau enzimatik (menggunakan lisozim atau proteinase K). Selain itu, reagen spesifik digunakan untuk mendegradasi komponen seluler lainnya, sambil menjaga integritas DNA. Setelah lisis, DNA dilepaskan ke dalam buffer ekstraksi dan masih bercampur dengan protein serta komponen lain.

2. Pemurnian DNA

Pada tahap ini, protein dan kontaminan lainnya dihilangkan menggunakan metode ekstraksi fenol-kloroform atau perlakuan enzimatik. Enzim seperti RNase dapat digunakan untuk menghilangkan RNA.

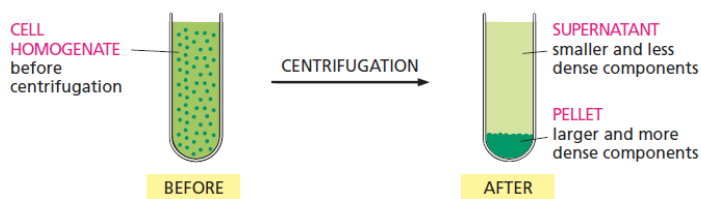
3. Presipitasi DNA

Tahap ini dilakukan dengan menambahkan etanol atau isopropanol. Alkohol ini menyebabkan DNA, yang tidak larut dalam alkohol, mengendap, sementara metabolit kecil tetap berada dalam larutan. DNA yang mengendap dikumpulkan melalui sentrifugasi, dicuci untuk menghilangkan residu alkohol, lalu dilarutkan dalam buffer yang sesuai. Umumnya, buffer yang digunakan mengandung ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) untuk menghambat aktivitas nuklease dan memiliki pH

yang menjaga stabilitas DNA. DNA yang telah mengendap dapat dikumpulkan dengan sentrifugasi.

4. Pelarutan DNA

Sentrifugasi merupakan salah satu teknik utama yang digunakan dalam isolasi DNA. Sentrifugasi memanfaatkan gaya sentrifugal untuk mengendapkan komponen campuran dalam sentrifus. Homogenat ditempatkan dalam tabung reaksi dan diputar dengan kecepatan tinggi, baik menggunakan sentrifus atau ultrasentrifus. Komponen yang lebih padat akan bermigrasi menjauh dari sumbu sentrifus, sedangkan komponen yang kurang padat akan bergerak menuju sumbu. Proses ini menggantikan gaya gravitasi, mempercepat pemisahan, dan menyebabkan endapan (pelet) terkumpul di dasar tabung. Larutan yang tersisa disebut supernatan.



Gambar 3.2. Skema Metode Sentrifugasi

Sumber: (Albert *et al.*, 2014)

DNA yang telah diisolasi dilarutkan dalam buffer TE (Tris-EDTA) (**Tabel 3.1**).

Tabel 3.1. Reagen yang digunakan dalam proses isolasi DNA beserta fungsinya

Reagen	Fungsi
Deterjen, seperti sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X-100, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	Menghancurkan membran sel (melisis sel) dan melepaskan komponen-komponen seluler, termasuk DNA. CTAB secara khusus berfungsi untuk mendegradasi dinding sel pada sel tumbuhan.
Enzim lisozim	Enzim hidrolitik yang dapat memecah ikatan β -(1,4)-glikosidik dalam peptidoglikan, komponen struktural utama dinding sel bakteri.
Agen khelasi, seperti	Menghambat enzim yang aktivitasnya tergantung

Reagen	Fungsi
EDTA, natrium sitrat	pada logam, seperti DNase, dengan cara mengikat ion logam divalen, seperti magnesium dan kalsium, sehingga mencegah degradasi DNA dan RNA.
Agen proteinase, seperti proteinase K	Menghancurkan protein, termasuk protein yang terikat pada DNA atau protein penghalang lainnya.
Alkohol, seperti ethanol, isopropanol	Mengendapkan DNA dari larutan dan menghilangkan kontaminan yang larut dalam air.
Fenol-kloroform	Memurnikan asam nukleat dari protein terkait dan kontaminan lainnya, serta membantu memisahkan fase organik dan akuosus.
Polivinilpirolidon (PVP)	Mencegah kontaminasi DNA oleh senyawa fenolik, yang dapat menghambat proses isolasi DNA, dengan membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa fenolik selama sentrifugasi.
Tris-EDTA atau buffer TE	Buffer yang digunakan untuk menyimpan DNA, dengan fungsi menstabilkan pH dan melindungi DNA dari degradasi dengan kandungan EDTA.

Beberapa metode isolasi DNA yang umum digunakan meliputi metode fenol-kloroform, lisis alkali, *salting-out* (penggunaan garam), penggunaan CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide), kolom silika (*spin column*), partikel magnetik (*magnetic beads*), Chelex, dan metode enzimatik (seperti proteinase K atau RNase). Setiap metode memiliki keunggulan dan keterbatasan, yang biasanya disesuaikan dengan jenis sel yang menjadi target isolasi (Tabel 3.2). Selain metode konvensional, saat ini tersedia berbagai kit isolasi DNA komersial yang dirancang untuk menyederhanakan proses ekstraksi.

Tabel 3.2. Jenis dan Prinsip Dasar Berbagai Metode Isolasi DNA

Metode	Prinsip Dasar
Fenol-kloroform	Menggunakan fenol dan kloroform untuk memisahkan DNA dari protein dan komponen lain dalam sampel. Fenol memecah protein, sementara kloroform memisahkan fase organik (mengandung protein) dari fase akuosus (mengandung DNA).
Penggunaan CTAB (<i>Cetyltrimethylammonium Bromide</i>)	Menggunakan CTAB untuk memisahkan DNA dari kontaminan seperti polisakarida dan polifenol. CTAB mengendapkan polisakarida,

Metode	Prinsip Dasar
	sementara DNA tetap larut dalam larutan. CTAB juga membantu mengurangi interferensi polifenol yang dapat mengganggu kualitas DNA.
Lisis Alkali	Metode ini melibatkan larutan alkali kuat (seperti NaOH) dan detergen (seperti SDS) untuk merusak membran sel dan dinding sel. DNA lalu dipisahkan dari komponen seluler lainnya melalui presipitasi atau metode pemisahan lainnya.
Kolom Silika (<i>Spin Column</i>)	DNA diikat ke membran silika di dalam kolom di bawah kondisi tertentu, biasanya dengan adanya garam chaotropic. DNA yang terikat kemudian dicuci untuk menghilangkan kontaminan, lalu dielusi.
Garam (<i>Salting-Out</i>)	Menggunakan konsentrasi garam tinggi untuk mengendapkan protein dan komponen seluler lainnya, sementara DNA tetap larut dalam larutan. DNA kemudian diendapkan menggunakan alkohol.
Partikel Magnetik (<i>Magnetic Beads</i>)	Menggunakan partikel magnetik yang dilapisi dengan bahan yang memiliki afinitas terhadap DNA. Di bawah kondisi tertentu, DNA akan diikat oleh partikel ini. Setelah pengikatan, medan magnet digunakan untuk memisahkan partikel magnetik (dan DNA yang terikat) dari larutan. DNA kemudian dielusi.
Chelex	Melibatkan lisis sel pada suhu tinggi dan pengikatan ion logam dengan Chelex. Chelex merupakan media pengikat ion logam yang digunakan untuk menghilangkan ion logam divalen, seperti Mg^{2+} , yang diperlukan untuk aktivitas DNase.
Enzimatis (Proteinase K atau RNase)	Proteinase K digunakan untuk mendegradasi protein, termasuk protein yang terikat pada DNA. RNase ditambahkan untuk memecah RNA, sehingga sampel hanya mengandung DNA.

C. Isolasi DNA pada Berbagai Jenis Sel

Tumbuhan dan bakteri memiliki dinding sel yang lebih kuat dibandingkan dengan sel hewan, sehingga diperlukan metode tambahan seperti penghancuran mekanik dan enzimatis (untuk tumbuhan), atau penghancuran enzimatis (untuk bakteri). Adapun pelisisan sel hewan dapat dilakukan lebih mudah hanya dengan menggunakan detergen. Pada isolasi DNA dari sel tumbuhan, langkah tambahan sering diperlukan untuk mengatasi kontaminan

seperti polifenol, yang dapat berikatan dengan DNA melalui interaksi hidrofobik sehingga mengganggu reaksi *downstream* seperti PCR, serta polisakarida, yang meningkatkan viskositas larutan, menghambat presipitasi DNA, dan menurunkan efisiensi enzim dalam analisis lanjutan, dimana kendala ini tidak terdapat pada isolasi DNA dari sel bakteri atau hewan (**Tabel 3.3**). Meskipun prinsip dasar isolasi DNA tetap sama—yaitu lisis sel, pemisahan, presipitasi, dan pemurnian—metode yang digunakan harus disesuaikan dengan karakteristik masing-masing jenis sel.

Tabel 3.3. Perbedaan Isolasi DNA Pada Sel Bakteri, Hewan dan Tumbuhan

Aspek Pembeda	Sel Bakteri	Sel Hewan	Sel Tumbuhan
Dinding Sel	Gram-positif memiliki peptidoglikan tebal, sementara Gram-negatif memiliki lapisan lipopolisakarida (LPS). Membutuhkan lisozim (Gram-positif) atau EDTA + detergen (Gram-negatif) untuk lisis.	Tidak memiliki dinding sel, sehingga lebih mudah dilisis dengan detergen.	Memiliki dinding sel keras (selulosa dan lignin) yang memerlukan penghancuran mekanis.
Metode Lisis	DNA genomik: Fenol-kloroform atau CTAB. DNA plasmid: Lisis alkali (NaOH + SDS).	Penggunaan detergen (SDS atau Triton X-100) dan enzim protease untuk memecah protein.	Memerlukan penghancuran mekanis (lumpang dan alu dengan nitrogen cair) serta reagen CTAB untuk mengikat pengotor.
Penambahan Enzim	Lisozim (Gram-positif), RNase untuk menghilangkan RNA, Protease (opsional) untuk mendegradasi protein.	Proteinase K untuk mendegradasi protein, RNase untuk menghilangkan RNA.	Pektinase dan selulase untuk mendegradasi dinding sel dan membantu melepaskan DNA.

Aspek Pemanding	Sel Bakteri	Sel Hewan	Sel Tumbuhan
Penghilangan Kontaminan	Fenol-kloroform atau kit kolom silika untuk menghilangkan protein. RNase untuk menghilangkan RNA.	Kit kolom silika atau ekstraksi fenol-kloroform untuk meningkatkan kemurnian DNA.	CTAB untuk mengikat polisakarida dan polifenol, fenol-kloroform untuk meningkatkan kemurnian DNA.

D. Isolasi DNA Ekstrakromosomal

DNA ekstrakromosomal (ecDNA) adalah DNA sirkular yang terpisah dari kromosom utama, seperti plasmid bakteri, DNA mitokondria (mtDNA), dan DNA kloroplas (cpDNA). Isolasi ecDNA memiliki prinsip dasar yang mirip dengan isolasi DNA genomik, tetapi melibatkan beberapa langkah tambahan. Berikut sejumlah langkah kerja dasar dengan sejumlah perbedaan antara isolasi DNA genomik dan isolasi ecDNA:

1. Lisis

a. Lisis untuk isolasi plasmid bakteri

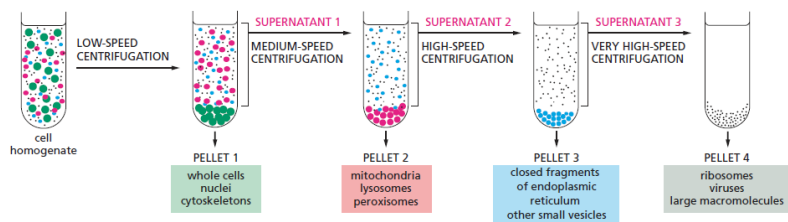
Pada isolasi plasmid bakteri, lisis alkali adalah metode yang umum digunakan (**Tabel 3.2**). Dalam metode ini, larutan alkali (NaOH) dan deterjen (SDS) digunakan untuk merusak membran sel dan mendenaturasi DNA genomik. Setelah proses netralisasi dengan larutan asam (biasanya kalium asetat), DNA genomik akan mengendap, sedangkan plasmid tetap larut dalam supernatan.

b. Lisis untuk isolasi mtDNA dan cpDNA

Isolasi mtDNA dan cpDNA diawali dengan pemisahan organel dari sel eukariotik melalui sentrifugasi diferensial. Teknik ini memungkinkan pemisahan mitokondria atau kloroplas dari komponen seluler lainnya. Sentrifugasi diferensial dilakukan dengan kecepatan berjenjang yang semakin tinggi sehingga memisahkan homogenat sel menjadi komponen-komponen subseluler berdasarkan ukuran dan

kepadatan. Komponen yang lebih besar dan padat akan mengalami gaya sentrifugal terbesar dan bergerak paling cepat, mengendap membentuk pelet di dasar tabung. Sebaliknya, komponen yang lebih kecil dan kurang padat tetap tersuspensi di atasnya sebagai supernatan.

Gambar 3.3 menampilkan perbedaan hasil fraksinasi (pemisahan) sel pada berbagai kecepatan sentrifugasi. Secara umum, semakin kecil ukuran komponen subseluler, semakin besar gaya sentrifugal yang diperlukan untuk mengendapkannya. Kecepatan sentrifugasi yang umum digunakan dalam berbagai langkah fraksinasi adalah: kecepatan rendah ($1000 \times g$ selama 10 menit), kecepatan sedang ($20.000 \times g$ selama 20 menit), kecepatan tinggi ($80.000 \times g$ selama 1 jam), dan kecepatan sangat tinggi ($150.000 \times g$ selama 3 jam), di mana "g" mewakili percepatan gravitasi ($9,8 \text{ m/s}^2$).



Gambar 3.3 Perbedaan Kecepatan pada Sentrifugasi Menghasilkan Komponen Endapan (Pelet) yang Berbeda
Sumber: (Albert *et al.*, 2014)

Setelah organel terisolasi, lisis dilakukan menggunakan buffer lisis yang mengandung deterjen untuk merusak membran organel dan melepaskan ecDNA ke dalam larutan.

2. Pemisahan

Tahap pemisahan ini bertujuan untuk memisahkan ecDNA dari komponen sel lainnya (seperti protein dan RNA) yang terlarut dalam larutan. Proses ini dapat dilakukan dengan menambahkan larutan netralisasi atau garam, seperti kalium asetat, yang menyebabkan protein, RNA, dan debris sel

terpresipitasi, sementara ecDNA tetap terlarut dalam supernatan. Dalam isolasi mtDNA dan cpDNA, enzim seperti DNase dapat digunakan untuk menghilangkan kontaminasi DNA genomik sebelum pemurnian lebih lanjut.

3. Presipitasi

Tahap presipitasi ecDNA menggunakan langkah yang sama dengan tahapan pada isolasi DNA genomik dengan penambahan alkohol (etanol atau isopropanol) untuk mengendapkan ecDNA yang dibantu teknik sentrifugasi. Hal ini menyebabkan ecDNA mengendap, sementara komponen lainnya tetap berada dalam supernatan.

4. Pemurnian

Pemurnian ecDNA dapat dilakukan menggunakan metode kolom silika atau ekstraksi fenol-kloroform. Pada metode kolom silika, ecDNA akan berikatan dengan membran silika di bawah kondisi tinggi garam chaotropic. Setelah proses pencucian untuk menghilangkan kontaminan, DNA dielusi dalam buffer atau air bebas nuklease. Sementara itu, metode fenol-kloroform digunakan untuk menghilangkan protein dan senyawa pengotor lainnya. Setelah pencampuran dengan fenol-kloroform dan sentrifugasi, DNA akan tetap berada dalam fase akuosus, yang kemudian dapat dipisahkan dan diproses lebih lanjut.

E. Troubleshooting Isolasi DNA

Meskipun prosedur isolasi DNA telah distandardisasi, berbagai kendala atau kesalahan masih dapat terjadi dan memengaruhi kualitas serta kuantitas DNA yang diperoleh. Tabel 3.4 merangkum sejumlah permasalahan yang umum terjadi selama isolasi DNA, kemungkinan penyebabnya, serta langkah-langkah yang dapat diterapkan untuk mengatasinya.

Tabel 3.4. Troubleshooting Isolasi DNA.

Masalah	Penyebab	Solusi
Kualitas DNA rendah	DNA terdegradasi atau tidak murni.	Pastikan peralatan dan bahan kimia bebas kontaminasi.

Masalah	Penyebab	Solusi
		Gunakan bahan kimia segar dan simpan sesuai kondisi optimal.
		Hindari pengerjaan terlalu lama di suhu ruang, terutama setelah ekstraksi DNA.
Isolasi DNA tidak berhasil	Tidak ada DNA yang terisolasi atau dalam konsentrasi yang sangat rendah.	Tinjau kembali langkah-langkah sesuai protokol kerja.
		Gunakan jumlah sampel yang cukup dan pertimbangkan metode ekstraksi alternatif.
		Untuk sel tumbuhan, gunakan bahan seperti CTAB, dan PVP untuk optimasi lisis.
		Pastikan penghancuran jaringan dilakukan secara optimal.
Terdapat pengotor DNA	DNA terkontaminasi protein atau senyawa lain.	Lakukan pencucian tambahan setelah tahap lisis sel.
		Gunakan enzim protease untuk menghilangkan protein yang menempel pada DNA.
		Pertimbangkan metode pemurnian tambahan, seperti kolom spin atau teknik lainnya.
Kelarutan DNA rendah	DNA tidak larut dengan baik atau hasilnya tidak dapat digunakan.	Larutkan DNA dalam buffer TE atau air bebas nuklease.
		Simpan DNA di suhu rendah (biasanya -20°C atau -80°C) untuk menghindari degradasi.
Kuantitas DNA rendah	Jumlah DNA yang terisolasi sedikit	Gunakan spektrofotometer untuk mengevaluasi kemurnian (rasio 260/280 nm).
		Pastikan proses ekstraksi dilakukan dengan efisien dan gunakan metode tambahan untuk meningkatkan hasil DNA.

BAB 4

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

A. Pengantar dan Prinsip Dasar PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah salah satu metode revolusioner dalam biologi molekuler yang dikembangkan oleh Kary Mullis dan tim pada 1980-an. Metode ini memanfaatkan enzim DNA polimerase untuk mereplikasi wilayah DNA tertentu secara spesifik. Pada awalnya, enzim DNA polimerase harus ditambahkan pada setiap siklus amplifikasi karena enzim yang digunakan tidak tahan terhadap suhu tinggi (di atas 90°C) yang diperlukan untuk memisahkan untai ganda DNA (denaturasi). Namun, penemuan polimerase termostabil, seperti Taq polimerase, yang berasal dari bakteri *Thermus aquaticus* yang hidup di lingkungan sumber air panas, memungkinkan proses amplifikasi menjadi lebih efisien. Enzim ini tahan terhadap suhu tinggi, sehingga dapat bertahan sepanjang proses amplifikasi.

PCR merupakan siklus amplifikasi berulang dengan tiga tahapan utama pada setiap siklusnya, yaitu:

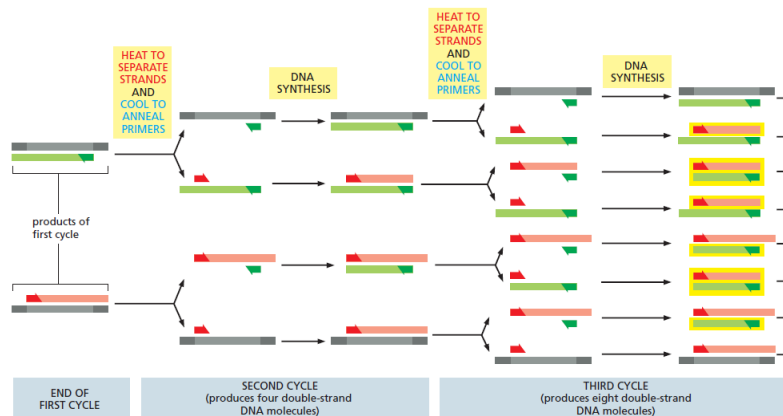
1. Denaturasi: pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal, pada suhu sekitar 94–98°C, tergantung pada komposisi GC DNA target.
2. Annealing: penempelan primer pada urutan target DNA terjadi pada suhu 50–65°C, bergantung pada suhu leleh (T_m) primer yang digunakan.
3. Ekstensi: DNA polimerase menambahkan nukleotida ke ujung 3' dari setiap primer, pada suhu optimal 72°C (untuk enzim Taq polimerase).

Komponen utama PCR meliputi: DNA untai ganda yang mengandung urutan target, DNA polimerase termostabil, deoksinukleotida trifosfat (dNTP), dua primer DNA tunggal (15–20 nukleotida) yang bersifat komplementer dengan ujung-ujung sekuen

target DNA, buffer reaksi serta reagen lainnya (**Tabel 4.1**). Seluruh campuran ditempatkan dalam thermal cycler, sebuah alat yang secara otomatis mengatur perubahan suhu sesuai dengan tahapan PCR. Setelah 20–30 siklus amplifikasi, miliaran salinan dari urutan DNA target dapat diperoleh. DNA baru yang terbentuk pada setiap siklus juga berfungsi sebagai templat untuk siklus berikutnya, menghasilkan amplifikasi eksponensial. Metode ini telah menjadi teknik utama untuk mengkloning fragmen DNA pendek (umumnya <10 kilobasa) karena efisiensinya yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan metode kloning konvensional menggunakan bakteri.

Tabel 4.1. Komponen PCR Dan Deskripsi Beserta Fungsinya.

Komponen PCR	Deskripsi
Templat DNA	Untai DNA cetakan yang mengandung urutan target untuk amplifikasi.
Polimerase termostabil	Enzim tahan panas, seperti Taq polymerase, yang bertanggung jawab dalam pemanjangan DNA.
Primer oligonukleotida (forward dan reverse)	Fragmen pendek DNA untai tunggal (15–30 basa) yang berikatan dengan ujung 3' dari untai komplementer DNA target, menentukan spesifisitas amplifikasi.
Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP)	Nukleotida penyusun DNA baru, terdiri dari dATP, dTTP, dCTP, dGTP.
Kofaktor enzim	Biasanya ion magnesium (Mg^{2+}), yang diperlukan untuk aktivitas optimal DNA polimerase dan efisiensi reaksi PCR.
Penstabil (stabilizer)	Buffer yang menjaga pH optimal, menyediakan lingkungan yang stabil bagi enzim, dan mendukung efisiensi reaksi PCR.



Gambar 4.1. Skema Amplifikasi DNA Dengan Metode PCR

Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)

PCR memiliki aplikasi luas dalam berbagai bidang, terutama dalam deteksi mikroorganisme pada tahap awal infeksi.. Hal ini dapat dicapai dengan menyesuaikan primer yang digunakan untuk mengamplifikasi segmen genom spesifik patogen tersebut. Selain itu, PCR juga berperan dalam diagnostik medis, seperti deteksi mutasi genetik pada penyakit bawaan dan kanker.

Dalam bidang bioteknologi, PCR memungkinkan kloning gen dan analisis ekspresi gen, sementara dalam ekologi, teknik ini digunakan untuk mendeteksi spesies langka melalui environmental DNA (eDNA). Aplikasi forensik PCR meliputi identifikasi individu dari jejak DNA yang sangat kecil atau terdegradasi. Di bidang pertanian dan keamanan pangan, PCR digunakan untuk mendeteksi organisme hasil rekayasa genetika (GMO) serta mengidentifikasi patogen yang menginfeksi tanaman dan hewan ternak. Dengan kemampuannya yang tinggi dalam mendeteksi dan mengamplifikasi DNA secara spesifik, PCR terus menjadi teknologi kunci di berbagai disiplin ilmu.

B. Perbandingan PCR dan Replikasi DNA

PCR merupakan metode laboratorium yang diadaptasi dari proses replikasi DNA alami dalam sel. Meskipun keduanya memiliki prinsip dasar yang serupa, terdapat perbedaan mendasar antara keduanya. Replikasi DNA adalah proses biologis yang terjadi dalam

sel hidup untuk menggandakan keseluruhan genom secara alami. Sebaliknya, PCR merupakan teknik yang dirancang untuk memperbanyak fragmen DNA tertentu dengan cepat dan spesifik di laboratorium. Perbedaan mendasar antara PCR dan replikasi DNA dirangkum pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4.2. Perbandingan Metode PCR Dan Replikasi DNA Dalam Sel.

Parameter	PCR	Replikasi DNA
Definisi	Proses laboratorium yang mensintesis banyak salinan DNA pada wilayah target spesifik.	Proses biologis yang menggandakan seluruh genom sel secara in vivo sebelum pembelahan sel.
Tempat terjadi	In vitro (di luar sel, dalam tabung reaksi menggunakan mesin thermal cycler).	In vivo (dalam sel, di nukleus eukariota atau sitoplasma prokariota).
Suhu	Menggunakan tiga suhu berbeda dalam siklus PCR (~95°C, ~50–65°C, ~72°C).	Berlangsung pada suhu tubuh (~37°C pada manusia).
Enzim Polimerase	Menggunakan DNA polimerase termostabil (seperti Taq polymerase), yang umumnya tidak memiliki aktivitas proofreading.	Menggunakan DNA polimerase III pada prokariota dan DNA polimerase α , δ , atau ϵ pada eukariota, yang memiliki aktivitas proofreading (3'→5' eksoribonuklease).
Primer	Menggunakan primer DNA sintetis (forward dan reverse) untuk menginisiasi sintesis DNA.	Menggunakan primer RNA yang disintesis oleh enzim RNA primase untuk memulai sintesis DNA.
Denaturasi	Menggunakan suhu tinggi (~95°C) untuk memisahkan untai ganda DNA dengan memutus ikatan hidrogen.	Menggunakan enzim DNA helikase yang memisahkan untai ganda DNA secara enzimatik.
Faktor Pendukung	Memerlukan buffer reaksi, ion Mg^{2+} , primer DNA, dan dNTP.	Membutuhkan banyak protein pendukung seperti helikase, SSB (single-strand binding protein), DNA ligase, sliding clamp, dan topoisomerase.

C. Troubleshooting PCR

Faktor-faktor yang berkontribusi terhadap permasalahan dalam PCR dapat disebabkan karena kualitas templat DNA, konsentrasi primer, suhu siklus termal, jumlah siklus amplifikasi dan lainnya. Keberhasilan PCR, terutama untuk metode konvensional, dievaluasi melalui elektroforesis gel (yang akan dibahas lebih rinci pada Bab 5). Karena itu indikasi masalah dalam PCR dapat dikenali dari hasil visualisasi pada gel, seperti misal: tidak terbentuknya pita pada gel, munculnya pita nonspesifik, smearing berlebihan, atau pembentukan dimer primer. Tabel 4.3 merangkum indikasi permasalahan dalam PCR, faktor penyebabnya, serta langkah-langkah penanganan yang dapat diterapkan.

Tabel 4.3. Troubleshooting PCR.

Masalah	Kemungkinan Penyebab	Solusi
Tidak ada pita pada gel	Reagen tidak berfungsi dengan baik	Pastikan reagen disimpan dan digunakan sesuai petunjuk. Uji reagen pada reaksi kontrol dengan templat dan primer yang terbukti berfungsi untuk memastikan kualitas.
	Templat yang digunakan terlalu sedikit atau terlalu banyak	Sesuaikan jumlah templat sesuai kebutuhan. Templat yang terlalu sedikit menyebabkan amplifikasi tidak memadai, sedangkan terlalu banyak menghasilkan hasil yang tidak spesifik.
	Kualitas templat DNA buruk atau mengandung inhibitor	Gunakan DNA yang baru disiapkan dan bebas dari inhibitor seperti fenol atau protein. Jika perlu, isolasi templat dengan metode yang lebih efektif.
	Konsentrasi primer terlalu rendah atau tidak seimbang	Gunakan konsentrasi primer dalam rentang 0,1–1 μ M. Pastikan kedua primer memiliki konsentrasi yang sama untuk amplifikasi optimal.
	Kontaminasi nuklease	Siapkan templat baru dengan memastikan seluruh peralatan bebas nuklease. Gunakan bahan plastik dan reagen bebas nuklease serta simpan templat pada kondisi sesuai.
	Suhu annealing primer terlalu tinggi	Turunkan suhu annealing secara bertahap (misalnya 2°C per percobaan) untuk meningkatkan spesifisitas pengikatan

Masalah	Kemungkinan Penyebab	Solusi
		primer.
	Suhu denaturasi tidak optimal	Tingkatkan suhu atau durasi denaturasi awal, terutama untuk templat dengan kandungan GC tinggi yang memerlukan suhu lebih tinggi.
	Mesin thermal cycler tidak berada pada suhu yang tepat	Kalibrasi mesin thermal cycler secara berkala atau perbaiki jika diperlukan untuk memastikan suhu sesuai protokol.
Terdapat pita ekstra atau non-spesifik pada gel	Primer berikatan dengan “situs sekunder”.	Situs sekunder adalah lokasi pada templat DNA di luar target utama yang memiliki kesamaan parsial dengan urutan primer, sehingga memungkinkan pengikatan yang tidak diinginkan. Rancang primer baru dengan menghindari situs pengikatan sekunder dan tingkatkan suhu annealing untuk spesifisitas lebih baik.
	Kontaminasi DNA pada primer atau buffer	Jalankan reaksi kontrol negatif tanpa templat untuk mendeteksi kontaminasi. Jika terdeteksi, gunakan bahan baru untuk menghindari kontaminasi silang.
	Terlalu banyak templat yang ditambahkan	Kurangi jumlah templat dalam reaksi PCR. Templat berlebih dapat menyebabkan amplifikasi tidak spesifik.
	Konsentrasi primer terlalu tinggi	Sesuaikan konsentrasi primer untuk mencegah pengikatan pada situs yang tidak diinginkan.
	Mesin thermal cycler tidak berada pada suhu yang tepat	Pastikan mesin dikalibrasi dengan baik atau gunakan perangkat lain jika diperlukan.
Smearing berlebihan pada gel	Terlalu banyak templat yang ditambahkan	Gunakan jumlah templat yang sesuai agar amplifikasi lebih terkontrol.
	Siklus terlalu banyak	Batasi jumlah siklus menjadi kurang dari 35 untuk mencegah amplifikasi berlebihan dan produk sampingan.
	Suhu annealing terlalu rendah	Naikkan suhu annealing primer sebanyak 2°C hingga 5°C untuk meningkatkan selektivitas pengikatan.
	Konsentrasi primer	Kurangi konsentrasi primer untuk

Masalah	Kemungkinan Penyebab	Solusi
	terlalu tinggi	menghindari amplifikasi tidak spesifik.
	Waktu ekstensi terlalu lama	Gunakan DNA berkualitas tinggi yang baru disiapkan untuk hasil yang lebih baik.
	Kualitas templat rendah	Kurangi jumlah sampel yang dimuat pada gel untuk mencegah smearing.
	Terlalu banyak DNA yang dimuat pada gel	Kurangi konsentrasi primer agar pembentukan dimer primer dapat diminimalkan.
Terdapat dimer primer	Konsentrasi primer terlalu tinggi	Rancang ulang primer untuk menghindari urutan yang saling komplementer dan tingkatkan suhu annealing untuk mengurangi pembentukan dimer.
	Primer memiliki urutan yang saling tumpang tindih secara komplementer	Pastikan reagen disimpan dan digunakan sesuai petunjuk. Uji reagen pada reaksi kontrol dengan templat dan primer yang terbukti berfungsi untuk memastikan kualitas.

D. Jenis-Jenis PCR

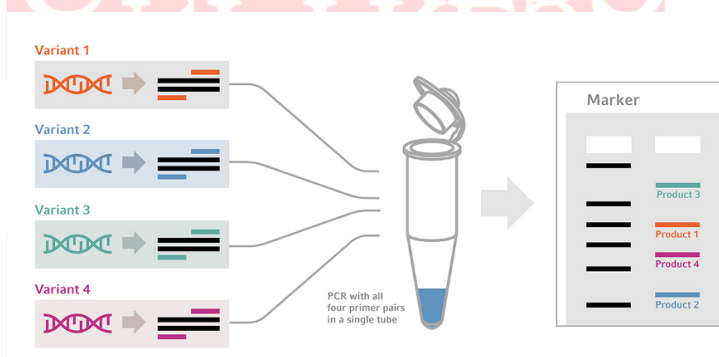
PCR dapat dilakukan dengan berbagai metode yang disesuaikan dengan kebutuhan amplifikasi DNA yang diinginkan. Setiap metode memiliki keunggulan dan aplikasi tertentu, yang membuatnya relevan untuk berbagai tujuan penelitian. Berikut adalah jenis-jenis metode PCR yang umum digunakan:

1. Multiplex-PCR

Multiplex-PCR adalah teknik yang memungkinkan penggunaan beberapa pasang primer dalam satu reaksi PCR untuk mendeteksi berbagai organisme atau sekuens DNA secara bersamaan (**Gambar 4.2**). Suhu *annealing* untuk masing-masing primer harus dioptimalkan agar dapat bekerja dalam satu reaksi. Oleh karena itu, desain set primer yang spesifik sangat penting untuk keberhasilan reaksi multiplex ini. Primer yang digunakan biasanya memiliki panjang sekitar 18-22 pasang basa dan memiliki suhu *annealing* 55-60°C, kecuali untuk sekuens yang

memiliki kandungan GC yang tinggi, sehingga memerlukan suhu *annealing* yang lebih tinggi.

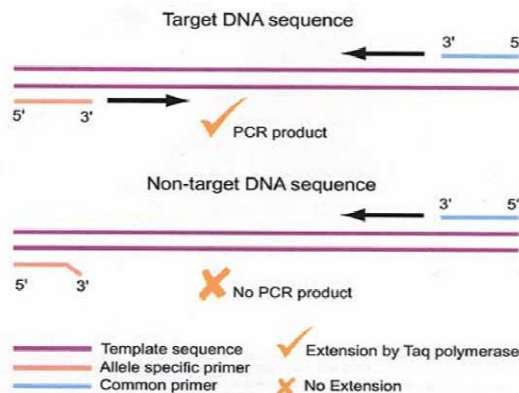
Desain primer yang tepat sangat penting untuk keberhasilan reaksi multiplex. Primer harus memiliki spesifisitas tinggi untuk target DNA dan meminimalkan pembentukan dimer primer atau produk nonspesifik. Selain itu, perbedaan panjang produk PCR juga harus cukup signifikan (biasanya dalam rentang puluhan hingga ratusan pasangan basa) untuk memastikan pita-pita DNA dapat terpisah dengan jelas selama elektroforesis gel. Multiplex-PCR memiliki aplikasi luas, termasuk deteksi patogen, misalnya dalam diagnostik infeksi bakteri atau virus; identifikasi forensik, seperti analisis DNA untuk kasus kriminal, analisis mutasi, genotyping SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), dan studi ekspresi gen.



Gambar 4.2. Skema Prinsip Dasar Metode Multiplex-PCR

2. Amplification refractory mutation system-PCR (ARMS-PCR)

ARMS-PCR atau PCR spesifik alel, adalah metode PCR untuk mendeteksi mutasi yang diketahui, baik berupa SNP, maupun delesi kecil (small deletion). Teknik ini didasarkan pada penggunaan primer PCR yang spesifik terhadap sekuens, sehingga memungkinkan amplifikasi DNA uji hanya jika alel target terdapat dalam sampel (**Gambar 4.3**).



Gambar 4.3. Skema Prinsip Dasar Dari Metode ARMS-PCR

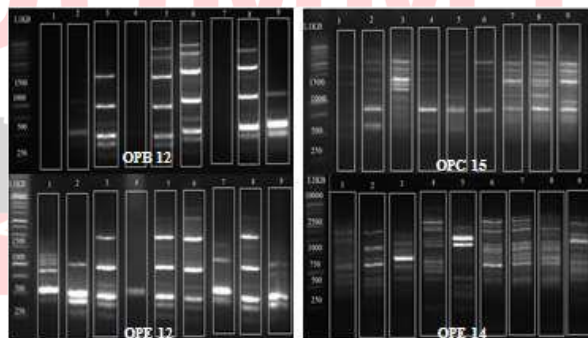
ARMS-PCR melibatkan dua reaksi PCR terpisah. Reaksi PCR pertama dilakukan untuk mendeteksi alel mutan, yang menggunakan primer spesifik untuk alel mutan di ujung 5' dan primer umum (tidak spesifik untuk alel tertentu) di ujung 3'. Jika amplifikasi terjadi, ini menunjukkan bahwa urutan DNA yang diuji mengandung alel mutan. Sebaliknya, jika tidak ada amplifikasi, berarti DNA tersebut tidak mengandung alel mutan pada posisi tersebut. Reaksi PCR kedua dilakukan untuk mendeteksi alel normal, yang menggunakan primer spesifik untuk alel normal di ujung 5' dan primer umum di ujung 3'. Jika amplifikasi terjadi, ini menunjukkan bahwa urutan DNA mengandung alel normal. Jika tidak ada amplifikasi, ini mengindikasikan adanya mutasi pada titik tersebut.

Jika kedua jenis amplifikasi, normal dan mutan, terdeteksi, hal ini mengindikasikan individu tersebut heterozigot, dengan kedua alel (normal dan mutan) hadir dalam genom. Untuk memastikan validitas hasil, setiap reaksi PCR perlu dilengkapi dengan kontrol positif (yang dipastikan menunjukkan amplifikasi) dan kontrol negatif (tanpa amplifikasi, berfungsi sebagai pembanding).

3. *Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)*

RAPD-PCR merupakan salah satu teknik mendeteksi variasi genetik dalam DNA. Pada metode ini, fragmen genom yang diamplifikasi bersifat acak dengan menggunakan satu atau lebih

primer pada sekuens tidak tentu (*arbitrary sequence*). Primer yang digunakan umumnya berukuran pendek (10–12 pasang basa) dan secara acak mengikat urutan DNA target berdasarkan kesesuaian antara urutan primer dan templat DNA. Jika terjadi mutasi pada urutan DNA yang sebelumnya komplementer dengan primer, amplifikasi fragmen DNA tersebut tidak akan terjadi. Akibatnya, pola produk PCR yang divisualisasikan melalui elektroforesis gel akan berbeda, mencerminkan variasi genetik antar individu atau spesies (**Gambar 4.4**).



Gambar 4.4. Contoh Hasil RAPD-PCR

Sumber: (Sari *et al.*, 2022).

Gambar 4.4 menampilkan Contoh Hasil RAPD-PCR Pada Berbagai Jeruk Varietas Lokal Sumatera Dan Jeruk Impor Dengan 4 Primer Berbeda (OPB 12, OPC 15, OPE 12, OPE 14). L1KB = DNA Ladder, 1 = Jeruk Clemengold, 2 = Jeruk Murcott, 3 = Jeruk Wokam, 4 = Jeruk Sunkist, 5 = Jeruk Keprok Maga, 6 = Jeruk Keprok Brastepu, 7 = Jeruk Madu, 8 = Jeruk Pasaman Dan 9 = Jeruk Siam Gunung Omeh

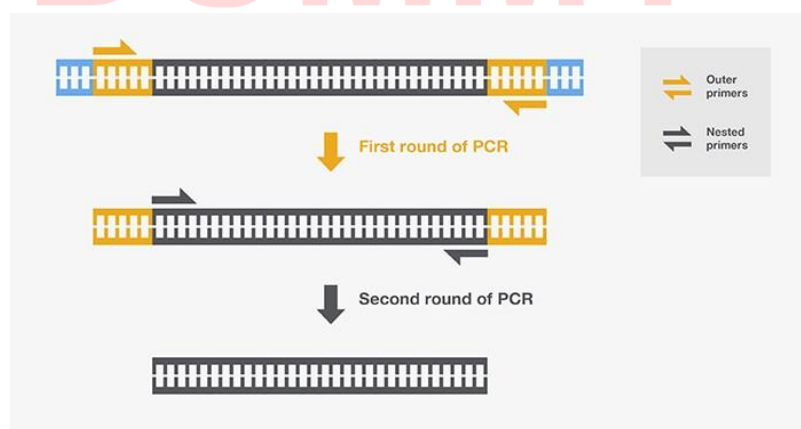
Metode ini dapat dilakukan dengan tanpa memerlukan pengetahuan spesifik tentang urutan DNA dari organisme target. Penerapan RAPD-PCR meliputi penelitian keanekaragaman genetik dalam populasi atau spesies, penentuan taksonomi dan sistematika untuk mengidentifikasi spesies yang sulit dibedakan secara morfologis, mendeteksi variasi genetik pada patogen, serta studi penyakit genetik.

4. *Nested-PCR*

Nested-PCR adalah modifikasi dari *PCR* standar yang dirancang untuk meningkatkan spesifisitas dan keberhasilan amplifikasi target DNA yang diinginkan. Teknik ini memanfaatkan dua set primer yang dirancang khusus: primer luar (outer primers) yang mengapit daerah DNA yang mengandung target, dan primer bersarang (nested primers) yang lebih spesifik pada daerah DNA yang akan diamplifikasi.

Pada *PCR* putaran pertama, primer luar digunakan untuk mengamplifikasi target dengan cakupan daerah yang lebih luas. Produk *PCR* dari putaran pertama ini kemudian digunakan sebagai templat pada putaran kedua, di mana primer bersarang mengamplifikasi daerah target yang lebih spesifik (Gambar 4.5).

Apabila produk nonspesifik dihasilkan pada putaran pertama, misalnya akibat pengikatan primer (priming) yang tidak akurat oleh primer luar, kemungkinan besar produk nonspesifik tersebut tidak akan dikenali atau diamplifikasi oleh primer bersarang pada putaran kedua. Hal ini memastikan peningkatan spesifisitas amplifikasi pada tahap selanjutnya. Keunggulan lain dari metode dua putaran ini adalah kemampuannya untuk menghasilkan amplifikasi yang cukup dari target yang diinginkan, bahkan ketika sampel DNA tersedia dalam jumlah yang sangat kecil.

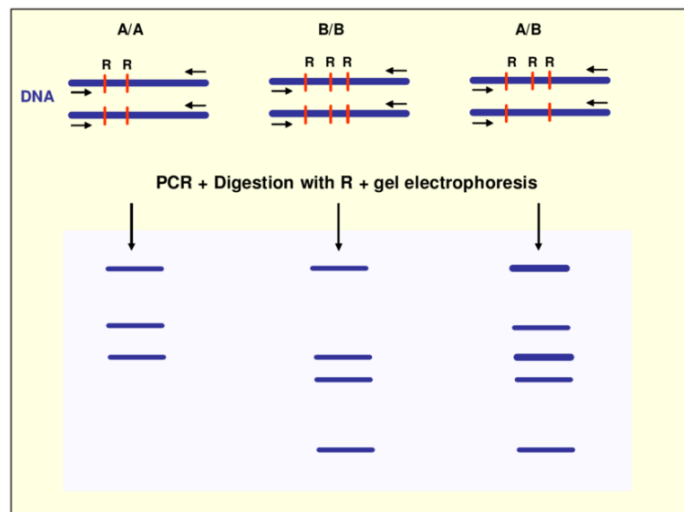


Gambar 4.5. Skema Prinsip Dasar Metode *Nested-PCR*.

5. Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR (RFLP-PCR)

RFLP-PCR merupakan teknik yang menggabungkan PCR dengan analisis polimorfisme panjang fragmen restriksi. Metode ini digunakan untuk mendeteksi variasi genetik berdasarkan pola pemotongan DNA oleh enzim restriksi, yaitu enzim yang secara spesifik memutus ikatan fosfodiester pada DNA di situs pengenalan tertentu (enzim ini akan dibahas lebih lanjut pada Bab 8).

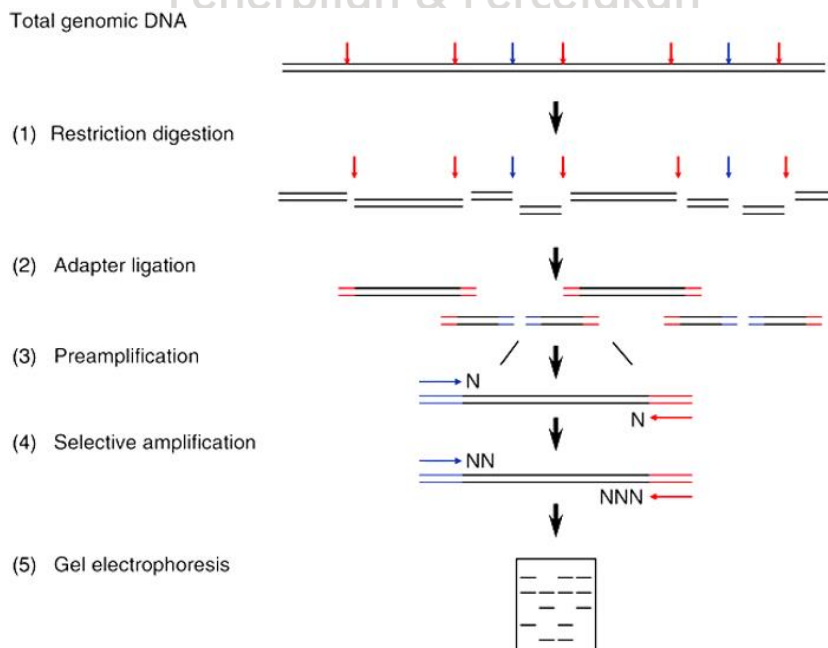
Langkah pertama dalam RFLP-PCR adalah amplifikasi fragmen DNA target menggunakan PCR. Setelah amplifikasi, produk PCR ini dipotong dengan enzim restriksi yang mengenali urutan DNA spesifik. Variasi genetik, seperti mutasi atau polimorfisme, dapat mengubah situs pengenalan enzim restriksi, sehingga dapat menghasilkan potongan fragmen DNA dengan panjang yang berbeda. Setelah tahap pemotongan, fragmen-fragmen DNA yang dihasilkan divisualisasi melalui elektroforesis gel (**Gambar 4.6**). Pola fragmen yang terbentuk ini memungkinkan identifikasi variasi genetik, sehingga RFLP-PCR sering digunakan dalam analisis genotip, pemetaan gen, studi hubungan kekerabatan, dan identifikasi mutasi yang terkait dengan penyakit.



Gambar 4.6. Skema Prinsip Dasar Metode RFLP-PCR

6. *Amplified Fragment Length Polymorphism-PCR (AFLP-PCR)*

AFLP-PCR merupakan teknik PCR yang digunakan untuk menganalisis variasi genetik dalam DNA melalui amplifikasi fragmen DNA yang telah dipotong oleh enzim restriksi. Metode ini sangat berguna untuk memetakan polimorfisme DNA di seluruh genom, tanpa memerlukan informasi genetik sebelumnya. AFLP-PCR memiliki sensitivitas tinggi dan mampu mendeteksi sejumlah besar polimorfisme secara acak di seluruh genom. Metode ini berguna dalam studi keanekaragaman genetik, pemetaan gen, identifikasi spesies, serta analisis hubungan kekerabatan antar individu atau populasi.



Gambar 4.7 Skema Prosedur AFLP-PCR

Berikut adalah gambaran umum tahapan metode AFLP-PCR yang mengacu pada Gambar 4.7:

- Digesti DNA genomik: DNA genomik dipotong menggunakan dua enzim restriksi, dimana dalam contoh ini adalah EcoRI dan MseI. Situs pemotongan untuk enzim EcoRI ditandai

dengan panah biru, sementara untuk enzim MseI ditandai dengan panah merah.

- b. Ligasi adaptor: setelah pemotongan (digesti), adaptor spesifik beruntai ganda diligasikan ke ujung fragmen DNA yang telah dipotong. Adaptor ini tidak mengandung situs pengenalan untuk enzim restriksi yang digunakan, tetapi dirancang agar sesuai dengan ujung kohesif fragmen untuk menyediakan situs perlekatan bagi primer yang digunakan dalam tahap amplifikasi selanjutnya.
- c. Pre-amplifikasi: pada tahap ini, amplifikasi awal dilakukan menggunakan primer yang komplementer terhadap urutan adaptor. Primer ini mengandung satu nukleotida selektif di ujung 3' (ditunjukkan dengan simbol "N"), yang berfungsi untuk mengurangi kompleksitas fragmen yang akan diamplifikasi pada tahap berikutnya. Amplifikasi ini menghasilkan subset fragmen DNA yang berasal dari kombinasi pemotongan EcoRI/MseI.
- d. Amplifikasi selektif: pada tahap ini, amplifikasi dilakukan dengan primer yang memiliki tambahan dua atau tiga nukleotida selektif di ujung 3', yang semakin mempersempit jumlah fragmen yang teramplifikasi. Hanya fragmen dengan urutan spesifik yang cocok dengan nukleotida selektif pada primer yang akan diamplifikasi, menghasilkan pola pita yang lebih spesifik dan terkontrol.
- e. Fraksinasi dan visualisasi: fragmen hasil amplifikasi kemudian dipisahkan berdasarkan ukuran melalui elektroforesis gel. Pola fragmen yang dihasilkan dari kombinasi pemotongan EcoRI/MseI akan tervisualisasi pada gel untuk dianalisis lebih lanjut.

BAB 5

ELEKTROFORESIS

A. Prinsip Dasar Elektroforesis

Elektroforesis merupakan teknik analisis molekuler yang memanfaatkan medan listrik untuk memisahkan molekul berdasarkan ukuran dan muatan listriknya. Pemisahan berdasarkan ukuran terjadi karena molekul yang lebih besar mengalami hambatan lebih besar saat bermigrasi melalui matriks gel elektroforesis dibandingkan dengan molekul yang lebih kecil. Sementara itu, pemisahan berdasarkan muatan listrik bergantung pada sifat ionisasi gugus fungsional dalam molekul biologis tertentu. Pada pH tertentu, molekul ini dapat bermuatan positif (kation), negatif (anion), atau tetap netral. Saat medan listrik diterapkan, molekul bermuatan negatif akan bergerak menuju anoda (elektroda positif), sedangkan molekul bermuatan positif akan bermigrasi ke katoda (elektroda negatif), sesuai dengan arah medan listrik yang diterapkan.

Protein dan asam nukleat memiliki sifat ionisasi yang bergantung pada pH lingkungan, sehingga muatan bersihnya dapat berubah sesuai kondisi tersebut. Karakteristik ini dimanfaatkan dalam elektroforesis untuk menentukan arah migrasi molekul di bawah pengaruh medan listrik. Protein mengandung gugus fungsional seperti karboksil ($-\text{COOH}$) dan amina ($-\text{NH}_2$), yang mengalami ionisasi bergantung pada pH larutan. Pada pH rendah, gugus karboksil cenderung berada dalam bentuk protonasi ($-\text{COOH}$), sedangkan pada pH tinggi akan terdeprotonasi menjadi ($-\text{COO}^-$). Sebaliknya, gugus amina akan berada dalam bentuk terprotonasi ($-\text{NH}_3^+$) pada pH rendah dan terdeprotonasi menjadi ($-\text{NH}_2$) pada pH tinggi. Di sisi lain, asam nukleat seperti DNA dan RNA memiliki gugus fosfat yang terionisasi penuh pada pH fisiologis (pH 7–8), menghasilkan muatan negatif secara keseluruhan. Akibatnya, dalam elektroforesis, asam nukleat secara konsisten bermigrasi menuju anoda (elektroda bermuatan positif).

Setelah elektroforesis selesai, molekul yang telah dipisahkan dapat divisualisasikan menggunakan pewarna fluoresen, seperti ethidium bromida (EtBr), yang berinterkalasi dengan DNA dan memancarkan fluoresensi oranye-merah di bawah sinar ultraviolet (UV). Pewarnaan dapat dilakukan dengan dua metode: merendam gel dalam larutan pewarna setelah elektroforesis (*post-staining*) atau mencampurkan pewarna langsung ke dalam gel sebelum elektroforesis (*pre-staining*). Tabel 5.1 merangkum alat dan bahan yang digunakan untuk metode elektroforesis.

Tabel 5.1. Komponen Elektroforesis Dan Fungsinya.

Komponen	Fungsi
Gel (agarosa atau poliakrilamida)	Medium pemisahan dengan pori-pori yang memungkinkan pergerakan molekul. Agarosa digunakan untuk elektroforesis DNA/RNA, sedangkan poliakrilamida digunakan untuk protein atau asam nukleat berukuran kecil (<100 bp).
Buffer (misal: TAE, TBE)	Mengatur pH dan konduktivitas medium. TAE (Tris-Acetate-EDTA) lebih sering digunakan untuk fragmen DNA besar, sedangkan TBE (Tris-Borate-EDTA) lebih cocok untuk fragmen kecil.
Elektroda (katoda dan anoda)	Menghasilkan medan listrik untuk mendorong pergerakan molekul menuju elektroda bermuatan berlawanan.
Sumber listrik	Menghasilkan arus listrik untuk menciptakan medan listrik.
Pewarna	Mewarnai molekul agar dapat divisualisasikan, misal: EtBr, SYBR Green, GelRed untuk asam nukleat dan Coomassie Brilliant Blue untuk protein.
Loading dye	Meningkatkan densitas agar sampel tenggelam dalam sumur gel dan memberikan pewarna indikator (misalnya bromophenol blue, xylene cyanol) untuk memantau migrasi molekul.
Detektor (misal: UV transilluminator)	Memvisualisasikan sinyal pewarna fluoresen dari molekul yang terpisah dalam gel.
Cetakan gel (<i>gel casting tray</i>)	Alat untuk membentuk gel sesuai ukuran yang diperlukan, dilengkapi dengan sisir (<i>comb</i>) untuk membentuk sumur tempat sampel dimuat.

Elektroforesis digunakan dalam berbagai aplikasi biologi molekuler, baik dalam analisis protein maupun DNA atau RNA.

Metode ini merupakan teknik yang umum digunakan dalam memverifikasi keberhasilan amplifikasi DNA dalam reaksi PCR.

Elektroforesis juga memiliki berbagai aplikasi di bidang terapan, seperti dalam diagnostik klinis, forensik, dan bioteknologi. Dalam diagnostik medis, teknik ini digunakan untuk mendeteksi kelainan genetik melalui analisis DNA, seperti dalam skrining penyakit hereditas. Di bidang forensik, elektroforesis berperan dalam identifikasi individu melalui analisis DNA. Sementara itu, dalam bioteknologi dan industri farmasi, teknik ini digunakan untuk kontrol kualitas protein terapeutik, seperti antibodi monoklonal dan enzim rekombinan, serta untuk pengujian kemurnian vaksin.

B. Jenis-Jenis Elektroforesis

1. Elektroforesis gel agarosa (horizontal)

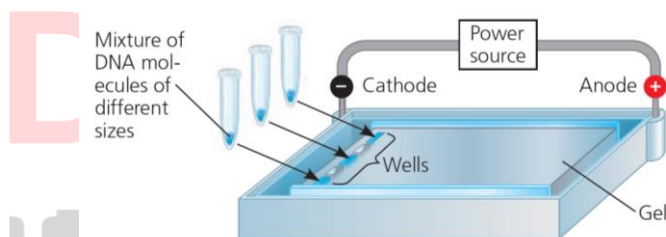
Elektroforesis gel agarosa merupakan metode elektroforesis yang digunakan untuk memisahkan asam nukleat (DNA dan RNA) berdasarkan ukurannya menggunakan medium gel agarosa. Gel agarosa adalah biopolimer alami yang diekstraksi dari rumput laut dan membentuk matriks berpori setelah mengeras. Konsentrasi agarosa yang digunakan biasanya berkisar antara 0,5-2%, tergantung pada ukuran molekul target. Konsentrasi agarosa yang lebih rendah, seperti 0,5% hingga 1%, digunakan untuk pemisahan molekul yang lebih besar ($>10\text{kb}$), karena pori-pori gel yang lebih besar memungkinkan pergerakan molekul-molekul besar dengan lebih lancar. Sebaliknya, konsentrasi agarosa yang lebih tinggi hingga $\geq 2\%$, digunakan untuk pemisahan molekul kecil ($<500\text{ bp}$), karena pori-pori gel yang lebih kecil memperlambat pergerakan molekul kecil, sehingga memisahkannya dengan lebih baik.

Gel agarosa disiapkan dengan mensuspensikan agarosa kering dalam buffer yang sesuai, seperti TAE, kemudian dipanaskan hingga larut sepenuhnya. Jika menggunakan metode *pre-staining*, pewarna ditambahkan ke dalam larutan dan diaduk hingga merata sebelum dituangkan ke dalam cetakan gel. Setelah larutan

dituangkan, sisir dipasang untuk membentuk sumur dan gel dibiarkan mengeras pada suhu ruang.

Gel kemudian ditempatkan di dalam chamber perangkat elektroforesis yang telah diisi dengan buffer elektroforesis, yang berfungsi menjaga kestabilan pH dan konduktivitas selama elektroforesis berlangsung (**Gambar 5.1**). Perlu diperhatikan bahwa buffer elektroforesis yang digunakan harus sama dengan buffer yang digunakan pada pembuatan gel untuk menjaga konsistensi lingkungan elektrolit.

Setelah dicampur dengan *loading dye*, sampel DNA atau RNA kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel menggunakan mikropipet. Sebagai pembanding ukuran molekul, DNA atau RNA ladder ditambahkan ke salah satu sumur sesuai dengan jenis molekul yang sedang dianalisis. Ladder berisi fragmen DNA atau RNA dengan ukuran yang sudah diketahui, sehingga berfungsi sebagai marker untuk menentukan ukuran fragmen dalam sampel. Baru kemudian medan listrik diterapkan dengan voltase yang disesuaikan. Hasil pemisahan divisualisasikan menggunakan detektor seperti UV transluminator.



Gambar 5.1 Skema Elektroforesis Gel Agarosa (Horizontal)

Sumber: (Urry *et al.*, 2021).

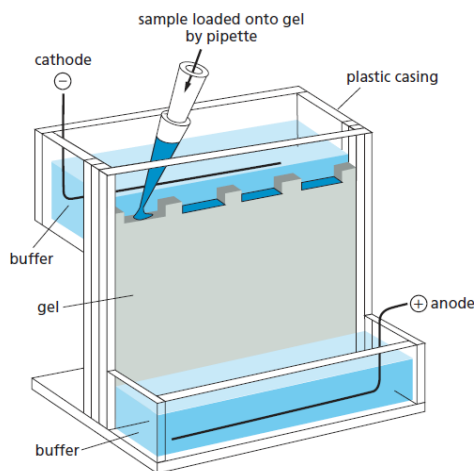
2. Elektroforesis gel poliakrilamida (vertikal)

Elektroforesis gel poliakrilamida, atau *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE), merupakan metode elektroforesis yang menggunakan gel poliakrilamida sebagai medium pemisah. Metode ini umumnya digunakan untuk memisahkan molekul berdasarkan berat molekul, tetapi variasi teknik dalam metode ini

juga memungkinkan pemisahan berdasarkan muatan dan struktur molekul.

Gel poliakrilamida memiliki jaringan matriks yang terbentuk oleh ikatan silang antara monomer akrilamida dan bis-akrilamida, yang menghasilkan pori-pori yang lebih kecil dan teratur jika dibandingkan dengan gel agarosa. Hal ini menjadikan metode ini cocok untuk pemisahan molekul yang lebih kecil, seperti protein atau fragmen DNA pendek. Ukuran pori gel dapat disesuaikan dengan mengubah konsentrasi akrilamida, yang memungkinkan pemisahan molekul secara lebih terkendali.

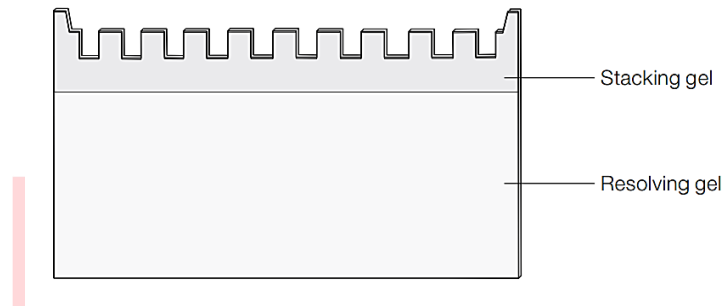
Pada teknik ini, gel ditempatkan di antara dua pelat kaca dalam sistem elektroforesis yang disusun secara vertikal. Sampel yang akan dianalisis dimasukkan ke dalam sumur-sumur kecil yang terbentuk di bagian atas gel (**Gambar 5.2**).



Gambar 5.2 Skema Elektroforesis Gel Poliakrilamida (Vertikal) Sumber: (Alberts *et al.*, 2022).

Gel poliakrilamida terdiri dari dua bagian utama: gel penumpuk (*stacking gel*) dan gel pemisah (*resolving gel*), yang masing-masing memiliki fungsi spesifik. *Stacking gel* memiliki konsentrasi akrilamida lebih rendah (4-5%) dan menggunakan buffer Tris-HCl dengan pH sekitar 6,8. Lapisan ini berfungsi untuk memusatkan protein, sehingga migrasi molekul menuju *resolving gel* lebih seragam. *Resolving gel*, dengan konsentrasi

akrilamida lebih tinggi (10-15%) dan pH lebih tinggi (~8,8), berfungsi untuk memisahkan molekul berdasarkan ukurannya.



Gambar 5.3 Skema Susunan Dua Bagian Gel Poliakrilamida: *Stacking Gel* Dan *Resolving Gel*.

Berbeda dengan gel agarosa yang memerlukan pemanasan untuk pembentukannya, gel poliakrilamida terbentuk melalui reaksi polimerisasi. Proses ini dimulai dengan pencampuran akrilamida, bis-akrilamida, buffer Tris-HCl, dan air bebas ion. Untuk memicu polimerisasi, ammonium persulfate (APS) ditambahkan sebagai sumber radikal bebas, sedangkan tetramethylethylenediamine (TEMED) digunakan untuk mempercepat proses tersebut. Polimerisasi berlangsung pada suhu ruang dalam waktu sekitar 30-60 menit.

Dalam urutannya, larutan *resolving gel* dituangkan terlebih dahulu dan dibiarkan mengeras, baru kemudian *stacking gel* dituangkan di atasnya. Sebelum menuangkan *stacking gel*, sisir dipasang untuk membentuk sumur tempat sampel akan dimasukkan.

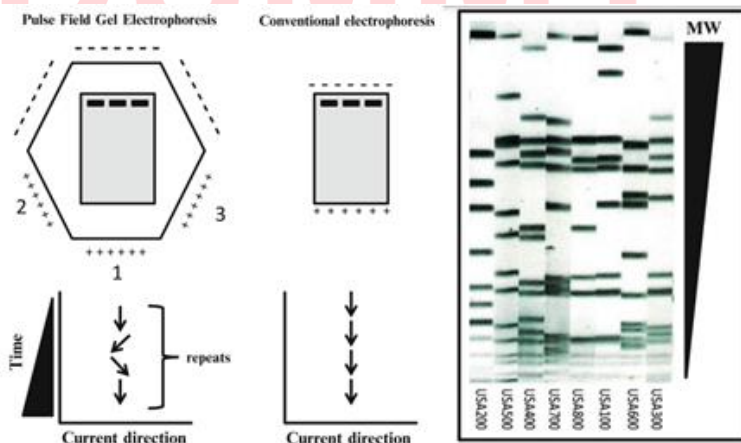
Setelah elektroforesis selesai, gel biasanya diwarnai menggunakan Coomassie Brilliant Blue, pewarna yang berikatan dengan protein dan menghasilkan pita berwarna biru pada posisi protein dalam gel. Proses pewarnaan melibatkan perendaman gel dalam larutan pewarna selama 30-60 menit, diikuti dengan pencucian menggunakan metanol atau asam asetat untuk menghilangkan pewarna yang tidak terikat pada protein. Setelah itu, gel dapat divisualisasikan di bawah cahaya tampak atau sinar

UV untuk mengidentifikasi lokasi dan kuantitas relatif protein dalam sampel.

Dua variasi utama PAGE adalah Native PAGE dan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Native PAGE memisahkan molekul berdasarkan berat molekul serta konformasi atau struktur tiga dimensinya, sehingga mempertahankan aktivitas biologis protein. Sebaliknya, SDS-PAGE menggunakan deterjen SDS untuk mendisosiasi struktur protein dan memberikan muatan negatif seragam, sehingga pemisahan hanya bergantung pada berat molekul. Teknik SDS-PAGE dibahas lebih lanjut pada Bab 14.

3. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Metode PFGE merupakan teknik elektroforesis khusus yang digunakan untuk memisahkan fragmen DNA berukuran besar—biasanya dalam rentang 30 kb hingga 10 mb. Metode ini mengatasi keterbatasan elektroforesis gel agarosa, yang tidak mampu memisahkan fragmen DNA yang lebih besar dari 50 kb secara efisien. Teknik ini menerapkan medan listrik yang berubah variabel (*pulsed field*) pada interval yang teratur, yang memungkinkan fragmen DNA besar untuk kembali terorientasi dan bermigrasi secara berbeda di sepanjang gel.



Gambar 5.4 Perbandingan PFGE Dengan Elektroforesis Konvensional, Beserta Contoh Hasil PFGE (Kanan)

Sumber: (Sharma *et al.*, 2016).

Pada PFGE, DNA ditempatkan dalam gel agarosa dan diberi paparan medan listrik dengan pengubahan arah secara berkala (**Gambar 5.4**). Perubahan arah medan listrik ini menyebabkan DNA yang berukuran lebih besar berorientasi ulang dalam gel sebelum kembali bermigrasi. Fragmen yang lebih kecil bergerak lebih cepat karena lebih mudah beradaptasi dengan perubahan arah medan, sementara fragmen yang lebih besar membutuhkan waktu lebih lama untuk kembali terorientasi, sehingga menghasilkan pemisahan yang lebih baik. Teknik ini sering diterapkan dalam analisis genomik, termasuk pemetaan kromosom, penelusuran epidemiologi mikroorganisme patogen, dan analisis DNA dari organisme kompleks.

4. Elektroforesis kapiler

Elektroforesis kapiler atau *capillary electrophoresis* (CE) merupakan teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan muatan, ukuran, dan massa molekul dalam medan listrik yang diterapkan pada larutan dalam kapiler berdiameter kecil. Prinsip dasar dari CE melibatkan pergerakan ionik molekul-molekul bermuatan melalui larutan penyangga di dalam kapiler silika ketika medan listrik diterapkan. Molekul-molekul yang bermuatan akan berpindah dengan kecepatan yang berbeda tergantung pada rasio muatan terhadap ukuran.

Keunggulan utama dari elektroforesis kapiler adalah resolusinya yang tinggi, penggunaan volume sampel yang sangat kecil, dan kecepatan analisis yang cepat. Kapiler yang sempit (berdiameter 25–100 μm) memungkinkan pengembangan gradien medan listrik yang sangat kuat (hingga 30 kV), sehingga mempercepat proses pemisahan.

Elektroforesis kapiler dapat diterapkan dalam berbagai bentuk tergantung pada jenis analit yang dianalisis. Beberapa aplikasi utama metode ini diantaranya:

- a. *Capillary Zone Electrophoresis* (CZE): memisahkan analit berdasarkan mobilitas elektroforetiknya dalam larutan

penyangga homogen tanpa adanya gradien pH atau konduktivitas.

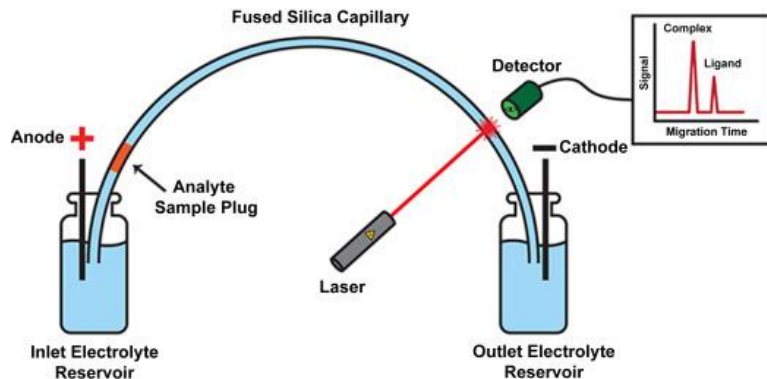
- b. *Capillary Gel Electrophoresis* (CGE): menggunakan matriks gel dalam kapiler untuk mengontrol ukuran pori, memungkinkan pemisahan molekul besar seperti protein dan DNA berdasarkan ukuran dan muatan, dengan kelebihan analisis yang lebih cepat dan resolusi yang lebih tinggi.
- c. *Capillary isotachopheresis* (CITP): memisahkan ion berdasarkan mobilitas elektroforetiknya dalam sistem kontinu, di mana ion-ion tersusun dalam urutan tertentu tanpa membentuk zona diskret yang jelas. Proses ini memungkinkan pemisahan yang lebih presisi dengan mempertahankan gradien kontinu sepanjang medium pemisah.

Dalam teknik elektroforesis zona kapiler (CZE)—yang merupakan metode elektroforesis kapiler paling umum—kapiler diisi dengan larutan elektrolit, dan medan listrik diterapkan. Kapiler ini memiliki tiga area utama: area injeksi, zona migrasi, dan zona deteksi (**Gambar 5.5**). Pada area injeksi, sejumlah kecil sampel dimasukkan ke dalam kapiler. Dalam zona migrasi, analit bergerak melalui kapiler berdasarkan perbedaan mobilitas elektroforetiknya. Kapiler dapat dilapisi dengan polimer atau bahan lain untuk mencegah interaksi elektrostatik antara analit dan dinding kapiler, tergantung pada kebutuhan analisis.

Saat medan listrik diterapkan, ion bermuatan positif bergerak menuju katoda, sementara ion bermuatan negatif bergerak ke anoda. Kecepatan migrasi analit bergantung pada rasio muatan terhadap ukurannya (*charge-to-size ratio*), di mana molekul yang lebih kecil dan lebih bermuatan cenderung bermigrasi lebih cepat. Namun, gaya gesek dalam medium juga berpengaruh terhadap laju migrasi. Molekul netral tidak mengalami pemisahan berdasarkan muatan, tetapi tetap dapat terbawa dalam arah aliran elektroosmotik (EOF), yaitu aliran larutan akibat muatan negatif pada dinding kapiler.

Ketika analit mencapai titik deteksi, detektor—seperti UV-visibel, fluoresens, atau spektrometri massa—merekam

sinyalnya. Pemilihan detektor bergantung pada sifat analit. Data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk elektroferogram, yang menunjukkan waktu migrasi dan intensitas sinyal yang berhubungan dengan konsentrasi analit dalam sampel.



Gambar 5.5 Skema elektroforesis kapiler

Sumber: (Sawant *et al.*, 2023).

C. Troubleshooting Elektroforesis

Terdapat berbagai faktor yang dapat menjadi kendala atau masalah dalam penerapan metode elektroforesis, seperti persiapan sampel, pengkondisian gel, atau pengaturan alat yang digunakan. **Tabel 5.2** merangkum sejumlah masalah umum yang sering dihadapi dalam elektroforesis, serta solusi yang dapat dilakukan untuk mengatasinya.

Tabel 5.2. Troubleshooting Metode Elektroforesis.

Masalah	Penyebab	Solusi
Pita tidak muncul sama sekali	Gel belum dipersiapkan dengan benar.	Pastikan buffer elektroforesis telah diencerkan dengan benar untuk hasil optimal.
	Gel tidak diwarnai dengan baik.	Ulangi pewarnaan (<i>post-staining</i>).
	Unit elektroforesis mengalami kerusakan.	Lakukan perbaikan atau penggantian unit elektroforesis atau sumber daya.
Pita muncul pada <i>ladder</i> tapi tidak muncul pada produk PCR	Proses amplifikasi PCR tidak berhasil.	Ulangi PCR menggunakan reagen baru dan primer baru.
Pita muncul	Volume DNA dan	Tingkatkan keterampilan

Masalah	Penyebab	Solusi
pada <i>ladder</i> , namun tidak muncul pada beberapa produk PCR	primer yang digunakan dalam reaksi PCR tidak sesuai.	penggunaan pipet (<i>pipetting</i>) untuk menghindari kesalahan volume.
Pita DNA tidak terpisah dengan baik	Durasi migrasi elektroforesis terlalu singkat.	Perpanjang waktu elektroforesis agar pemisahan optimal.
	Konsentrasi gel tidak tepat.	Sesuaikan konsentrasi gel. Gunakan konsentrasi lebih rendah untuk fragmen yang lebih besar, dan sebaliknya.
	Tegangan listrik terlalu rendah.	Pastikan tegangan listrik yang digunakan sesuai dengan ukuran gel.
	Buffer tidak segar atau tidak cocok dengan gel.	Pastikan buffer yang digunakan baru dan sesuai dengan buffer pada gel yang digunakan.
Pita samar (<i>faint band</i>)	Konsentrasi sampel rendah.	Pastikan jumlah sampel yang dimasukkan ke sumur gel berada dalam rentang 1-100 ng untuk hasil visualisasi yang lebih baik.
	Pewarnaan tidak memadai.	Gunakan pewarna DNA atau RNA dalam konsentrasi yang tepat. Jika pita masih samar, lakukan pewarnaan ulang (<i>post-staining</i>) pada gel.
	Sumber cahaya UV lemah.	Pertimbangkan untuk mengganti lampu atau menggunakan <i>transilluminator</i> yang lebih kuat.
	Kehilangan sampel saat pengisian sumur.	Pastikan proses pengisian sumur dilakukan dengan hati-hati dan hindari gelembung atau tumpahan yang bisa mengurangi jumlah sampel yang masuk ke dalam sumur gel.
<i>Smearing band</i> (pita memanjang atau tersebar)	Terlalu banyak sampel PCR yang dimasukkan ke dalam sumur gel.	Pastikan konsentrasi sampel yang ditambahkan ke gel berada dalam rentang yang tepat (biasanya 1-100 ng)
	Kondisi gel tidak tepat.	Sesuaikan konsentrasi agarosa berdasarkan ukuran sampel. Pastikan juga gel tidak terlalu tebal (disarankan <5 mm) untuk menghindari <i>overheating</i> .
	Perbedaan buffer pada gel dan <i>running</i>	Pastikan buffer yang digunakan untuk membuat gel sama dengan

Masalah	Penyebab	Solusi
	buffer.	<i>running</i> buffer untuk menghindari masalah migrasi yang tidak merata.
	Degradasi sampel, karena kontaminasi nuklease.	Gunakan peralatan steril dan reagen bebas nuklease untuk mencegah degradasi sampel, simpan sampel dalam kondisi yang sesuai untuk mencegah degradasi DNA atau RNA.



BAB 6

REAL-TIME PCR

A. Prinsip Dasar Real-Time PCR

Real-time PCR (RT-PCR), atau disebut juga quantitative PCR (qPCR), merupakan teknik biologi molekuler yang memungkinkan pemantauan amplifikasi DNA dilakukan saat proses PCR berlangsung atau secara “real-time”. Teknik ini berbeda dengan PCR konvensional, dimana evaluasi hasil amplifikasi dilakukan setelah proses PCR selesai.

Komponen dasar dalam qPCR serupa dengan yang digunakan dalam PCR konvensional, meliputi DNA templat, DNA polimerase termostabil, primer, dNTPs, dan buffer reaksi. Namun, metode ini juga melibatkan pewarna fluoresen atau probe spesifik untuk mendeteksi amplifikasi DNA secara langsung selama reaksi berlangsung. Selain itu, qPCR juga menggunakan thermal cycler yang dilengkapi dengan sistem deteksi fluoresensi, berbeda dari PCR konvensional yang hanya memerlukan thermal cycler standar.

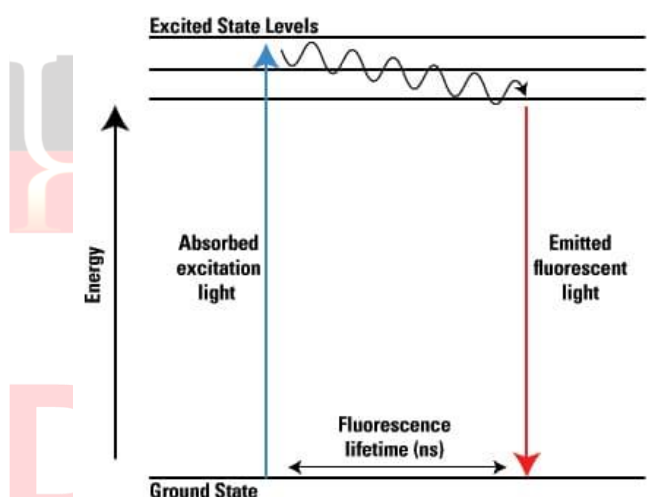
Perlu dicatat bahwa singkatan "RT-PCR" dapat merujuk pada "real-time PCR" dan "reverse transcriptase PCR," yang merupakan dua metode PCR berbeda. Oleh karena itu, interpretasi 'RT-PCR' harus disesuaikan dengan konteks penggunaannya. Metode real-time PCR dapat digabungkan dengan reverse transcriptase PCR, menghasilkan teknik yang dikenal sebagai 'Real-Time RT-PCR' atau 'RT-qPCR', yang memungkinkan pengambilan data kuantitatif ekspresi gen melalui penggunaan enzim reverse transcriptase, serta pemantauan hasil PCR secara real-time.

B. Jenis Pewarna Fluoresen dan Metode Deteksi dalam qPCR

Deteksi amplifikasi pada qPCR memanfaatkan molekul fluoresen atau fluorofor, yang mampu menyerap energi cahaya (foton) dan memancarkannya kembali (**Tabel 6.1**). Ketika fluorofor menyerap energi, elektronnya berpindah ke tingkat energi lebih tinggi, yang dikenal sebagai keadaan tereksitasi. Namun, keadaan ini tidak

bertahan lama, dimana sebagian energi yang diserap akan hilang melalui interaksi dengan molekul di sekitarnya, sementara sisanya dilepaskan kembali dalam bentuk cahaya (foton) saat elektron kembali ke keadaan dasar (*ground state*).

Cahaya yang dipancarkan memiliki energi lebih rendah dan panjang gelombang lebih panjang dibandingkan dengan cahaya yang diserap, sehingga mudah dibedakan. Proses ini berlangsung berulang kali hingga fluorofoor mengalami kerusakan permanen (*photobleaching*). Hal ini memungkinkan pemantauan amplifikasi DNA dapat dilakukan secara real-time (**Gambar 6.1**).



Gambar 6.1. Diagram Jablonski, Yang Merepresentasikan Tahap Eksitasi Dan Emisi Pada Fenomena Fluoresensi

Tabel 6.1. Fluorofoor yang umum digunakan untuk pelabelan asam nukleat

Fluorofoor	Panjang gelombang eksitasi maksimum (nm)	Panjang gelombang emisi maksimum (nm)	Warna emisi
AMCA	350	450	Biru
DAPI	358	461	Biru
FITC	492	520	Hijau
Fluorescein	494	523	Hijau
CY3	550	570	Merah
TRITC	554	575	Merah
Rhodamin	570	590	Merah
Texas Red	596	620	Merah

Fluorofor	Panjang gelombang eksitasi maksimum (nm)	Panjang gelombang emisi maksimum (nm)	Warna emisi
CY5	650	670	Merah

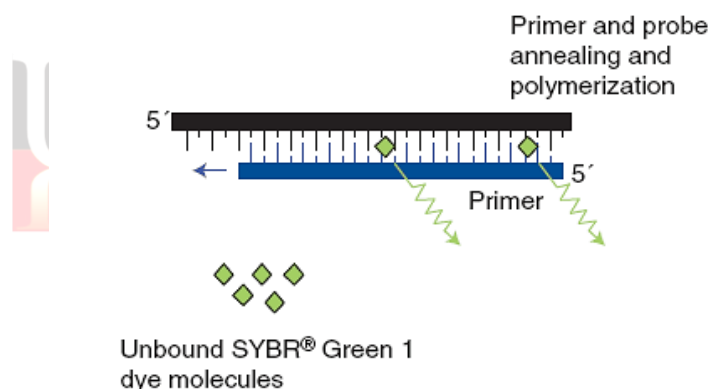
Keterangan: AMCA, aminometilkumarin; DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol; FITC, fluorescein isothiocyanate; CY3, indokarbosianin; TRITC, tetrametilrodamin; isothiocyanate; CY5, indodikarbosianin.

(Sumber: Strachan dan Read, 2018).

Kuantifikasi dalam qPCR bergantung pada pendeteksian sinyal fluoresensi yang didasarkan pada dua metode utama, yaitu:

1. Berbasis pewarna DNA *binding dyes*

Pada metode ini, fluorofor yang digunakan bekerja dengan cara berinteraksi dengan DNA untai ganda dan mengalami peningkatan fluoresensi setelah berikatan. Salah satu contohnya adalah SYBR Green, yang berikatan pada alur minor (*minor groove*) DNA. Ketika pewarna ini terikat pada DNA dan tereksitasi oleh cahaya dengan panjang gelombang tertentu, ia akan memancarkan fluoresensi, yang kemudian diukur untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi DNA dalam qPCR. Namun, pewarna ini tidak memiliki spesifisitas dalam pengikatan, sehingga juga dapat berinteraksi dengan dimer primer atau produk amplifikasi nonspesifik. Untuk mengatasi hal ini, diperlukan analisis tambahan, seperti kurva peleburan (*melting curve analysis*), untuk memastikan spesifisitas amplifikasi.



Gambar 6.2. Skema Kinerja DNA *Binding Dyes* SYBR® Green Pada DNA Untai Ganda

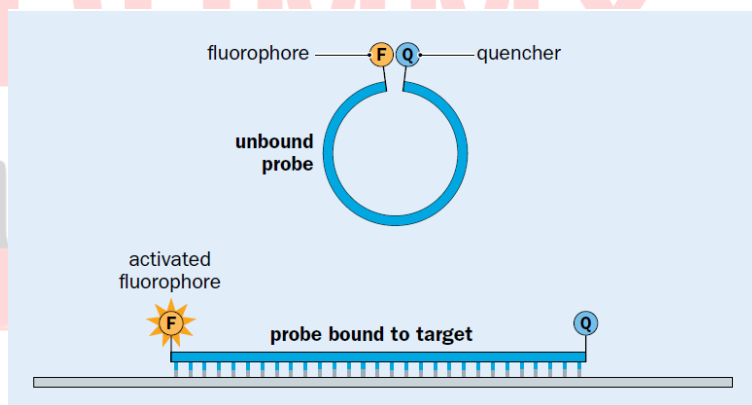
Sumber: (Weaver, 2012).

2. Berbasis probe (*fluorescent probes*)

Pendekatan ini menggunakan probe berupa oligonukleotida pendek yang diberi label fluoresen (*fluorophore-labeled oligonucleotides*) untuk mendeteksi DNA target secara spesifik. Probe ini dirancang untuk berikatan secara komplementer dengan urutan target DNA selama proses amplifikasi. Terdapat 2 metode yang umum digunakan untuk metode deteksi qPCR berbasis probe, yaitu:

a. Probe Molecular Beacon

Probe Molecular Beacon dirancang dengan struktur *stem-loop*, di mana fluorofor (F) berada di ujung 5' dan quencher (Q) di ujung 3'. Dalam keadaan tidak terikat, struktur ini menjaga fluorofor dan quencher dalam jarak dekat, sehingga fluoresensi teredam. Namun, ketika probe mengenali dan berikatan dengan urutan target yang komplementer, struktur *stem-loop* terbuka. Hal ini menyebabkan fluorofor menjauh dari quencher, sehingga tidak lagi menyerap energi cahaya yang dipancarkan. Akibatnya, fluoresensi terdeteksi, menandakan keberadaan target DNA atau RNA (**Gambar 6.3**).



Gambar 6.3. Skema Kerja Probe Molecular Beacon

Sumber: (Strachan dan Read, 2018).

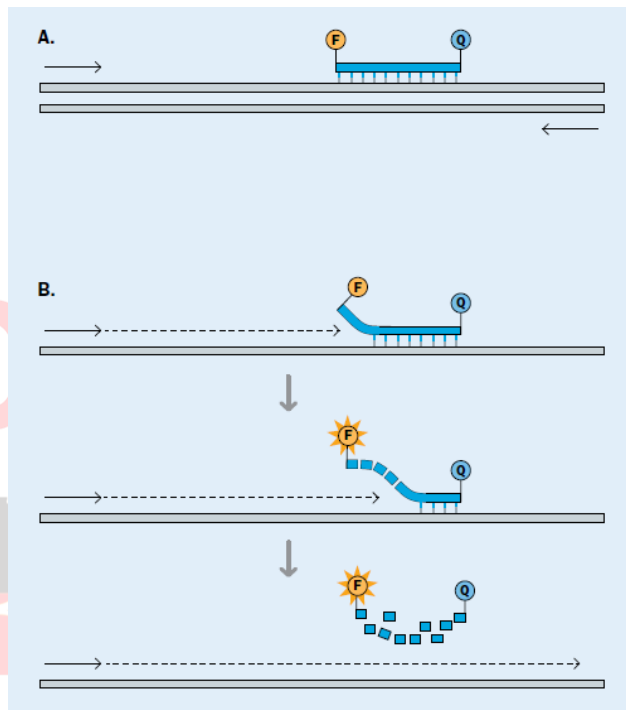
b. Probe TaqMan™ double-dye probes

Probe dalam metode ini adalah oligonukleotida pendek yang memiliki fluorofofor (F) di ujung 5' dan quencher (Q) di ujung 3'. Dalam kondisi normal, fluorofofor tidak memancarkan cahaya karena energinya langsung ditransfer ke quencher melalui mekanisme *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET), yang bergantung pada jarak antara donor dan akseptor, dengan efisiensi maksimum dalam rentang <10 nm.

Selama tahap annealing dalam siklus PCR, probe mengenali dan berikatan dengan urutan target dalam ampikon, tetapi fluorofofor tetap dalam keadaan teredam oleh quencher. Saat DNA polimerase memperpanjang untai DNA, aktivitas eksonuklease 5' → 3'-nya mendegradasi probe yang menempel, melepaskan fluorofofor dari quencher sehingga sinyal fluoresensi dapat terdeteksi (**Gambar 6.4**). Semakin banyak DNA target yang diperbanyak, semakin kuat sinyal fluoresensi yang dihasilkan, memungkinkan kuantifikasi DNA dalam sampel.

Fluoresensi yang dipancarkan oleh fluorofofor kemudian diukur menggunakan alat deteksi, seperti fluorometer. Peningkatan fluoresensi ini berbanding lurus dengan jumlah produk PCR yang dihasilkan, sehingga memungkinkan kuantifikasi produk amplifikasi.





Gambar 6.4. Skema Mekanisme Kerja Probe Taqman™ Double-Dye

Sumber: (Strachan dan Read, 2018)

C. Kurva Amplifikasi dan Analisis Data qPCR

Setiap siklus qPCR menghasilkan kurva amplifikasi yang menggambarkan perubahan fluoresensi seiring dengan pertumbuhan jumlah produk amplifikasi. Kurva amplifikasi terbagi dari tiga fase, yaitu:

1. Fase inisiasi (*baseline*)

Pada fase ini, fluoresensi yang terdeteksi masih berada di bawah ambang batas deteksi. Produk amplifikasi sangat sedikit, sehingga sinyal fluoresensi yang terdeteksi hampir tidak ada bedanya dengan sinyal latar belakang. Fase ini menentukan nilai *baseline*, yang merujuk pada nilai rata-rata sinyal fluoresensi latar belakang selama siklus awal PCR (biasanya 3-15 siklus pertama), sebelum amplifikasi target DNA menjadi terdeteksi secara signifikan. Nilai *baseline* ini digunakan sebagai titik referensi

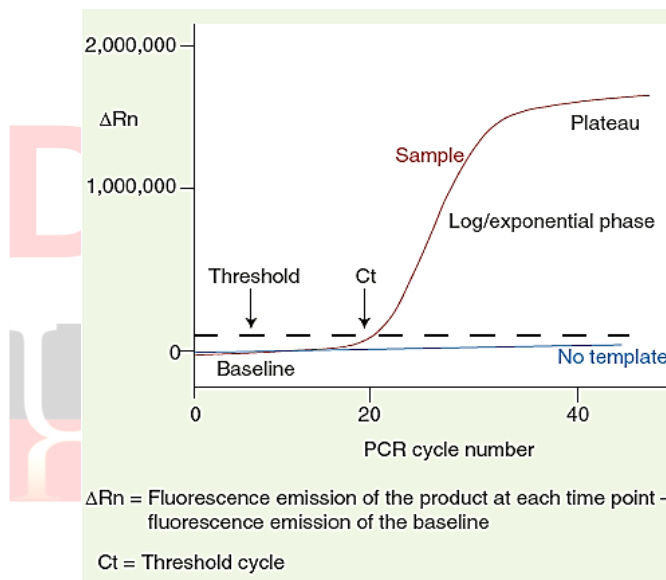
untuk menentukan kapan fluoresensi mulai meningkat secara eksponensial pada fase logaritmik.

2. Fase eksponensial (logaritmik)

Pada fase ini, amplifikasi DNA terjadi secara eksponensial, dengan efisiensi reaksi yang tinggi. Pada fase ini, peningkatan fluoresensi sebanding dengan jumlah produk amplifikasi, sehingga fase ini menjadi dasar untuk kuantifikasi.

3. Fase plateau

Pada fase plateau, laju amplifikasi menurun secara signifikan dan akhirnya mencapai titik jenuh akibat keterbatasan reagen, seperti dNTP dan primer, yang semakin menipis. Meskipun reaksi amplifikasi masih berlangsung dalam jumlah yang sangat kecil, laju pembentukan produk amplifikasi menjadi sangat lambat dan tidak menunjukkan peningkatan yang berarti dalam sinyal fluoresensi.



Gambar 6.5. Skema Kurva Amplifikasi Qpcr.

Berikut beberapa istilah yang terkait dengan analisis kurva amplifikasi qPCR, diantaranya adalah:

- a. *Baseline*: nilai rata-rata sinyal fluoresensi yang diukur selama siklus awal PCR, ketika amplifikasi target DNA belum menghasilkan peningkatan fluoresensi yang signifikan.
- b. ΔR_n adalah perubahan sinyal fluoresen yang dihitung berdasarkan selisih antara nilai fluoresensi total pada siklus tertentu (R_n) dan nilai baseline fluoresensi (R_b). Nilai ini digunakan untuk mengukur perubahan sinyal fluoresen yang dihasilkan oleh produk amplifikasi DNA dari satu siklus ke siklus berikutnya.
- c. *Threshold*: nilai batas yang ditentukan untuk membedakan sinyal fluoresen yang valid dari *noise*. Sinyal fluoresen yang melebihi nilai *threshold* dianggap cukup signifikan untuk digunakan dalam analisis kuantitatif amplifikasi DNA.
- d. *Ct (Threshold Cycle)* atau *Cq (Quantification Cycle)*: Ini adalah jumlah siklus PCR yang diperlukan untuk mencapai level fluoresensi yang terdeteksi di atas *threshold*. Nilai *Ct* digunakan untuk menentukan jumlah relatif atau absolut dari produk amplifikasi DNA.

Terdapat dua metode utama untuk analisis kuantifikasi real time PCR, yaitu:

1. Kuantifikasi relatif

Kuantifikasi ini membandingkan ekspresi gen target dengan gen *housekeeping*, gen yang digunakan sebagai kontrol untuk normalisasi data ekspresi gen target. Gen *housekeeping* harus diekspresikan secara konsisten dan stabil dalam semua sampel untuk memastikan hasil yang valid dan dapat dibandingkan, seperti β -actin dan GAPDH. Perubahan ekspresi dihitung dengan ΔC_t dalam satu sampel:

$$\Delta C_t = C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{housekeeping}}}$$

Untuk membandingkan ekspresi gen antar kondisi berbeda, digunakan $\Delta\Delta C_t$:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{sampel}}} - \Delta C_{t_{\text{kontrol}}}$$

Nilai ini kemudian dikonversi menjadi fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Metode ini lebih sederhana dan tidak memerlukan kurva standar, sehingga sering digunakan untuk studi ekspresi gen relatif antar kondisi biologis.

2. Kuantifikasi absolut

Kuantifikasi ini mengukur jumlah salinan target DNA dalam sampel dengan membandingkan data PCR terhadap kurva standar. Kurva standar dibuat menggunakan sampel dengan jumlah salinan yang diketahui dan diukur pada berbagai titik siklus PCR. Dengan membandingkan C_t sampel dengan kurva standar, jumlah salinan target DNA dapat dihitung secara langsung. Metode ini digunakan untuk pengukuran yang akurat dan kuantitatif dari konsentrasi gen target.

D. Troubleshooting qPCR

Keberhasilan metode qPCR ini sangat bergantung pada optimalisasi setiap tahapan, mulai dari desain primer hingga pengaturan parameter reaksi. Setiap tahapan yang tidak dioptimalkan dengan baik dapat memengaruhi hasil akhir. Tabel 6.2 menyajikan beberapa masalah umum yang dapat terjadi dalam penerapan qPCR, beserta kemungkinan penyebab dan solusi yang dapat diterapkan untuk mengatasinya.

Tabel 6.2. Troubleshooting metode qPCR

Masalah	Kemungkinan Penyebab	Solusi
Tidak ada sinyal amplifikasi	Reagen bermasalah	Periksa tanggal kedaluwarsa reagen, gunakan reagen baru.
	Konsentrasi DNA templat terlalu rendah	Tingkatkan konsentrasi templat DNA.
	Primer atau probe tidak sesuai/spesifik	Optimalkan desain primer/probe, periksa kesesuaian dengan urutan target.
	Kondisi termal tidak optimal	Uji siklus PCR yang berbeda atau optimalkan suhu annealing.
	Kontaminasi inhibitor dalam sampel	Lakukan pemurnian DNA, pastikan tidak ada bahan

Masalah	Kemungkinan Penyebab	Solusi
		penghambat dalam ekstraksi.
Kurva amplifikasi tidak normal	Dimer primer atau amplifikasi nonspesifik	Optimalkan desain primer atau suhu annealing, tambahkan kontrol nontemplat untuk verifikasi spesifisitas.
	Konsentrasi templat terlalu tinggi	Kurangi jumlah DNA templat dalam reaksi.
	Masalah dalam <i>pipetting</i> atau dalam pengaturan reaksi	Pastikan semua reagen ditambahkan dengan benar, kalibrasi alat pipet secara rutin.
Sinyal latar tinggi	Kebocoran sinyal fluoresen atau probe yang tidak stabil	Gunakan probe atau pewarna yang stabil, dan pastikan kuvet atau tabung bebas dari kontaminasi fluoresen.
Amplifikasi yang lambat atau Ct tinggi	Konsentrasi DNA templat terlalu rendah	Tingkatkan jumlah DNA templat.
	Kualitas DNA atau reagen buruk	Gunakan DNA berkualitas baik, ganti reagen jika perlu.
	Desain primer atau probe tidak optimal	Desain ulang primer/probe agar lebih efisien dan spesifik.
Sinyal berkurang	Degradasi probe atau pewarna selama proses PCR	Simpan probe dan pewarna pada suhu rendah, sesuai anjuran produsen.

BAB 7

SEKUENSING

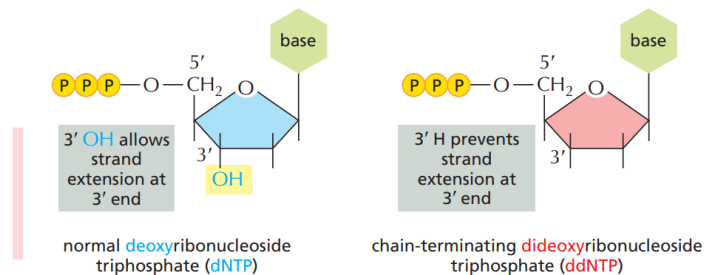
A. Pengantar Sekuensing

Sekuensing merupakan proses penentuan urutan unit penyusun biopolimer linier, seperti nukleotida pada asam nukleat (DNA atau RNA). Metode sekuensing pertama kali dikembangkan pada tahun 1977 oleh dua tim ilmuwan, Allan Maxam dan Walter Gilbert, serta Frederick Sanger dan tim. Maxam dan Gilbert menghasilkan metode sekuensing yang disebut metode Maxam-Gilbert, yang menggunakan reaksi kimia untuk memecah DNA pada basa tertentu. Fragmen DNA yang dihasilkan kemudian dipisahkan melalui gel elektroforesis. Namun saat ini metode ini jarang digunakan karena prosedurnya yang melibatkan bahan kimia berbahaya dan proses yang rumit. Sementara itu, metode yang dikembangkan oleh Frederick Sanger dan tim dikenal sebagai metode Sanger atau *chain-termination sequencing*. Teknik ini memanfaatkan ddNTP (dideoksinukleotida trifosfat) untuk menghentikan sintesis DNA pada posisi tertentu, memungkinkan penentuan urutan basa secara efisien.

Teknologi sekuensing kemudian berkembang ke generasi kedua, yang dikenal sebagai *Next-Generation Sequencing* (NGS). Teknologi ini memungkinkan sekuensing skala besar secara paralel, dengan efisiensi waktu yang lebih baik dibandingkan metode sebelumnya. Contoh platform NGS meliputi Illumina, Roche 454, dan SOLiD. Pada tahun 2010, sekuensing generasi ketiga diperkenalkan, dimana metode ini mengandalkan pendekatan *Single-Molecule Sequencing* yang mengidentifikasi urutan molekul DNA atau RNA secara langsung tanpa amplifikasi. Generasi ini memungkinkan pembacaan fragmen DNA yang lebih panjang dengan cepat dan akurat, sehingga menjadi alat penting dalam studi genom kompleks. Contoh teknologi generasi ketiga adalah Pacific Biosciences (PacBio) dan Oxford Nanopore Technologies.

B. Sekuensing Metode Sanger

Metode sekuensing Sanger telah lama menjadi referensi utama dalam penentuan urutan DNA karena keakuratannya dalam membaca urutan nukleotida. Metode ini didasarkan pada prinsip terminasi rantai (*chain termination*), yang melibatkan komponen-komponen reaksi yang mirip dengan PCR, seperti templat DNA, primer, dNTP, DNA polimerase, dan buffer, namun dengan penambahan dideksinukleotida trifosfat (ddNTP). ddNTP merupakan analog dari dNTP, namun berbeda karena tidak memiliki gugus hidroksil (-OH) pada posisi karbon 3' dari molekul gula pentosa, yang menghalangi pemanjangan rantai DNA karena tidak terbentuknya ikatan fosfodiester antara ddNTP dan nukleotida berikutnya (**Gambar 7.1**). Seperti dNTP, ddNTP tersedia dalam empat analog yang mewakili masing-masing basa nukleotida, yaitu ddATP (adenin), ddTTP (timin), ddGTP (guanin), dan ddCTP (sitosin).



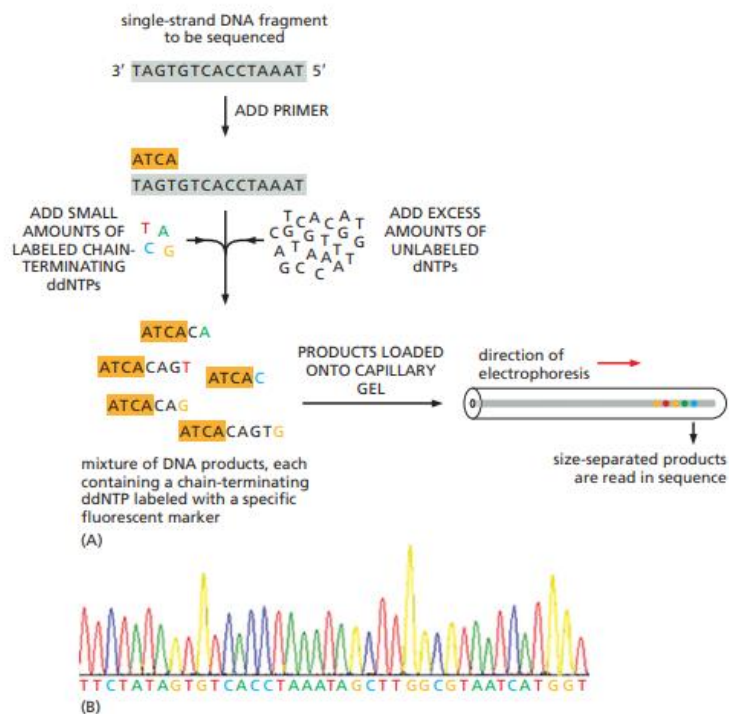
Gambar 7.1. Perbandingan Struktur Dntp Dan Ddntp

Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)

Pada awal perkembangannya, metode Sanger menggunakan ddNTP yang dilabeli isotop radioaktif seperti ^{32}P , ^{33}P , atau ^{35}S , dan fragmen DNA dipisahkan menggunakan gel poliakrilamida yang kemudian dianalisis melalui autoradiografi secara manual. Seiring dengan kemajuan teknologi, metode Sanger telah berkembang menjadi sistem otomatis (*automated Sanger method*) yang memungkinkan pembacaan data melalui komputer. Dalam sekuensing Sanger otomatis, ddNTP dilabeli dengan pewarna fluoresen, yang memungkinkan deteksi otomatis menggunakan sumber cahaya laser dan elektroforesis kapiler. Data yang diperoleh

kemudian dibaca oleh komputer, menggantikan penggunaan gel poliakrilamida dan visualisasi manual, menjadikannya lebih cepat, lebih akurat, dan lebih efisien.

Gambar 7.2 merepresentasikan tahapan sekuensing Sanger otomatis. Langkah pertama proses ini adalah hibridisasi DNA untai tunggal (highlight abu-abu) dengan primer pendek (highlight oranye). Setelah itu, fragmen DNA ditambahkan dengan DNA polimerase, dNTP, serta campuran ddNTP yang telah diberi label fluoresen dalam empat warna berbeda untuk mengakhiri rantai. Oleh karena ddNTP dimasukkan secara acak, reaksi ini menghasilkan salinan DNA dengan panjang yang bervariasi, di mana setiap fragmen berakhir pada titik yang berbeda dalam urutan DNA.



Gambar 7.2. Skema Kerja Metode Sekuensing Otomatis

Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)

Produk reaksi kemudian dimuat ke dalam gel kapiler untuk dipisahkan melalui elektroforesis kapiler. Fluoresensi yang dihasilkan oleh label fluoresen pada setiap fragmen DNA akan

dideteksi oleh kamera khusus, seperti kamera CCD (*Charge-Coupled Device*). Sinyal yang diperoleh dari deteksi ini kemudian diproses oleh komputer dan dirangkai menjadi urutan DNA. Hasil analisis ini menghasilkan urutan pelengkap dari molekul DNA templat. Visualisasi dari hasil sekuensing otomatis ditampilkan dalam bentuk kromatogram, yaitu puncak-puncak berwarna yang masing-masing mewakili nukleotida dalam urutan DNA yang dianalisis.

C. Analisis Data Sekuensing

Kromatogram merupakan representasi visual dari urutan DNA dari sampel yang digunakan untuk analisis data lanjutan. Dalam kromatogram, setiap warna mewakili nukleotida tertentu, seperti adenin (hijau), sitosin (merah), guanin (biru), dan timin (kuning), pada sebagian besar sistem sekuensing. Adapun beberapa sistem sekuensing atau perangkat lunak menggunakan kombinasi warna alternatif seperti adenin (hijau), sitosin (biru), guanin (hitam), dan timin (merah) (**Gambar 7.3**).

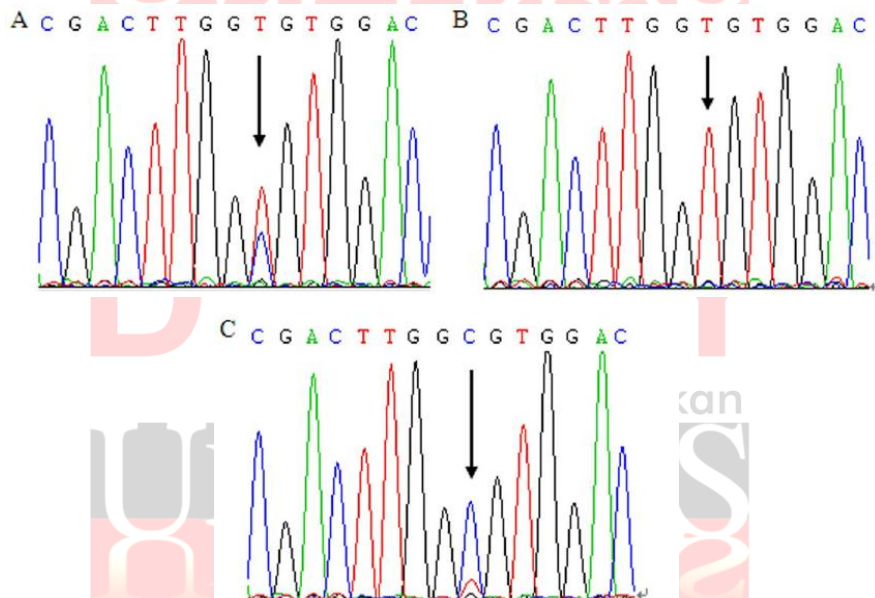
Pembacaan urutan DNA dilakukan secara berurutan dari kiri ke kanan. Jika kromatogram terdiri atas beberapa baris, pembacaan dilanjutkan ke baris berikutnya. Urutan basa yang ditampilkan mencerminkan arah 5' ke 3' dari urutan pelengkap (komplementer) DNA yang dianalisis.



Gambar 7.3. Contoh Kromatogram Hasil Sekuensing DNA.

Kualitas kromatogram dinilai berdasarkan visualisasi puncak warna dan tingkat noise. Puncak warna yang tajam dan terdefinisi dengan baik menunjukkan nukleotida yang dapat diidentifikasi secara akurat. Variasi tinggi puncak merupakan fenomena normal dan tidak selalu mengindikasikan masalah. Sebaliknya, puncak yang tumpang tindih atau tidak teratur sering kali menandakan gangguan, yang dapat disebabkan oleh kualitas DNA yang rendah atau kendala teknis dalam reaksi sekuensing.

Jika perangkat lunak sekuensing gagal mengidentifikasi suatu basa nukleotida, simbol "N" (nukleotida tidak diketahui) akan digunakan sebagai pengganti. Bagian awal urutan, khususnya 20 hingga 40 pasangan basa pertama, cenderung memiliki kualitas rendah, yang ditandai dengan tingginya jumlah placeholder "N" (Gambar 7.3).

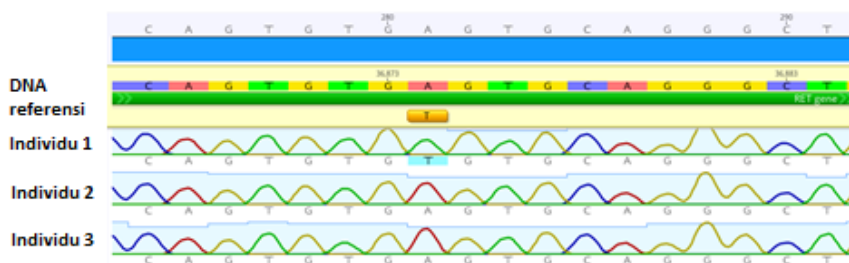


Gambar 7.4. Kromatogram Hasil Sekuensing DNA Dari Tiga Sampel Produk PCR dalam Deteksi Polimorfisme Rs895819. (A) Heterozigot TC; (B) Homozigot TT; (C) Homozigot CC
Sumber: (Shi *et al.*, 2012).

Apabila suatu individu memiliki genotipe heterozigot pada suatu posisi pasangan basa, kromatogram akan menunjukkan dua puncak

pada lokasi tersebut, masing-masing mewakili basa yang berbeda. Hal ini menandakan bahwa individu tersebut mewarisi dua alel berbeda pada posisi ini, sehingga urutan DNA di lokasi tersebut bervariasi. Sebaliknya, jika individu memiliki genotipe homozigot, kromatogram akan menunjukkan satu puncak tunggal, yang menunjukkan bahwa individu tersebut mewarisi dua alel identik pada posisi tersebut (**Gambar 7.4**).

Mesin sekuensing otomatis modern mampu menghasilkan kromatogram yang mencakup hingga 1000–1500 basa dalam satu kali pembacaan, tergantung pada platform yang digunakan. Untuk analisis kromatogram DNA, tersedia berbagai perangkat lunak seperti Chromas, FinchTV, dan SnapGene Viewer, yang dipilih berdasarkan kebutuhan analisis atau preferensi laboratorium.



Gambar 7.5. Contoh Hasil Sekuensing Pada Gen *Rearranged During Transfection* (RET) Wilayah Ekson 6 Pada Pasien Hirschsprung. Nukleotida Ke 36.874 Pada Individu 1 Menunjukkan Mutasi A→T

D. Aplikasi Sekuensing

Metode sekuensing DNA telah dimanfaatkan dan berkontribusi pada berbagai bidang penelitian dan aplikasi praktis, seperti:

1. Proteomik: membantu memprediksi daerah pengkode protein, yang mendukung studi mendalam tentang struktur dan fungsi dari suatu protein.
2. Aplikasi medis: digunakan dalam diagnosis penyakit, pengembangan pengobatan, studi epidemiologi, serta identifikasi dan karakterisasi patogen seperti virus, bakteri, dan mikroorganisme lainnya.

3. Pemantauan wabah: digunakan dalam pelacakan sumber infeksi dalam situasi wabah, dan mendukung pengendalian penyakit secara efektif.
4. Pemuliaan tanaman dan hewan: mengidentifikasi gen yang mengontrol sifat-sifat penting seperti ketahanan terhadap penyakit atau produktivitas, sehingga meningkatkan hasil dan kualitas tanaman serta hewan ternak.
5. Ekologi: mengidentifikasi spesies dari sampel lingkungan seperti tanah atau air, yang mendukung pemantauan keanekaragaman hayati, konservasi spesies langka, dan studi ekosistem.
6. Forensik: membantu identifikasi individu, analisis sampel biologis, dan identifikasi korban dalam investigasi kriminal.



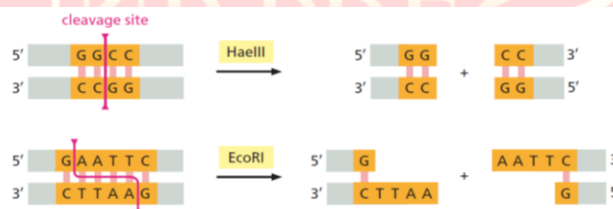
BAB 8

PEMOTONGAN DNA DENGAN ENZIM RESTRIKSI ENDONUKLEASE

A. Prinsip Dasar Restriksi DNA

Restriksi DNA merupakan teknik pemotongan molekul DNA pada urutan nukleotida spesifik oleh enzim endonuklease restriksi. Enzim ini mengenali dan memotong DNA pada urutan spesifik yang disebut situs pengenalan (*recognition site*). Secara alami, enzim restriksi ditemukan pada bakteri sebagai bagian dari sistem pertahanannya terhadap infeksi virus. Disebut endonuklease (dari bahasa Yunani, *endo*, yang berarti 'di dalam') karena memotong DNA pada lokasi tertentu di dalam untai, bukan di ujungnya. Sementara itu, DNA bakteri sendiri terlindungi dari degradasi oleh enzim ini melalui mekanisme metilasi, yaitu penambahan gugus metil ($-\text{CH}_3$) pada basa nitrogen tertentu—umumnya adenin atau sitosin—dalam situs pengenalan, sehingga mencegah pemotongan oleh enzim restriksi.

Enzim restriksi yang umum digunakan biasanya mengenali urutan DNA dengan panjang empat hingga delapan pasangan basa. Urutan pengenalannya sering kali bersifat palindromik, yakni urutan basa yang sama ketika dibaca dari arah 5' ke 3' pada satu untai dan dari 3' ke 5' pada untai pelengkapannya. Enzim restriksi memotong ikatan gula-fosfat dalam kedua untai DNA secara bertahap, menghasilkan fragmen DNA dengan ujung yang dapat berupa *blunt ends* (ujung rata) atau *sticky ends* (ujung kohesif) (**Gambar 8.1**).

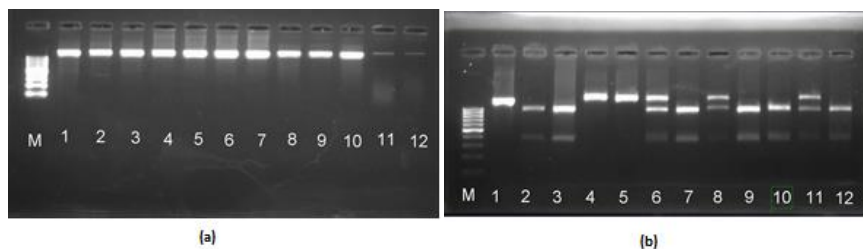


**Gambar 8.1. Contoh Situs Pemotongan Enzim Restriksi
Endonuklease**

Perbedaan dalam selektivitas urutan memungkinkan enzim restriksi untuk memotong molekul DNA yang panjang menjadi fragmen-fragmen yang lebih pendek untuk aplikasi tertentu. Enzim restriksi direaksikan dengan DNA target dalam kondisi optimal yang mencakup penggunaan buffer spesifik, suhu inkubasi yang sesuai, serta waktu reaksi yang cukup untuk memastikan pemotongan efisien. Proses ini umumnya melibatkan pencampuran DNA, enzim, dan buffer dalam urutan tertentu, diikuti dengan inkubasi pada suhu optimal—biasanya 37°C—selama periode yang bervariasi tergantung pada jenis enzim. Setelah reaksi selesai, enzim dapat dinaktivasi jika diperlukan, dan hasil pemotongan dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa untuk memastikan keberhasilan reaksi.

Enzim restriksi memiliki berbagai aplikasi luas, termasuk dalam kloning gen, analisis DNA forensik, serta teknik seperti *Restriction Fragment Length Polymorphism*-PCR (RFLP-PCR) untuk mendeteksi variasi genetik. **Gambar 8.2** menunjukkan salah satu penerapan enzim restriksi dalam metode RFLP-PCR untuk mendeteksi mutasi pada gen *Estrogen Receptor* (ER) pada pasien diabetes mellitus tipe 2 (DM Tipe 2). Gen ER berperan dalam regulasi hormon dan metabolisme serta berkontribusi terhadap kerentanan terhadap DM Tipe 2.

Pada analisis ini, DNA pasien dipotong menggunakan enzim restriksi PvuII, yang memiliki situs pengenalan 5' C A G ↓ C T G 3'. Substitusi basa T menjadi C pada situs restriksi PvuII menyebabkan hilangnya lokasi pemotongan oleh enzim. Akibatnya, DNA yang mengalami mutasi pada kedua untai menghasilkan satu pita berukuran 1.373 bp. Sebaliknya, DNA tanpa mutasi akan terpotong menjadi dua fragmen berukuran 980 bp dan 373 bp. Sementara itu, individu heterozigot yang membawa satu alel mutan dan satu alel normal akan menunjukkan tiga pita dengan ukuran 1.373 bp, 980 bp, dan 373 bp pada hasil elektroforesis.



Gambar 8.2. Visualisasi Hasil Elektroforesis DNA

Gambar 8.2 menunjukkan hasil elektroforesis gel agarosa dari analisis gen estrogen receptor (ER) pada sampel pasien dengan Diabetes Mellitus Tipe 2. Panel (A) memperlihatkan produk amplifikasi PCR gen ER dari 12 sampel pasien (lajur 1–12), yang menunjukkan pita DNA dengan ukuran sesuai target amplifikasi, menandakan bahwa proses PCR berhasil dilakukan. Panel (B) menampilkan hasil pemotongan gen ER menggunakan enzim restriksi PvuII pada sampel yang sama. Pola pita hasil pemotongan menunjukkan adanya variasi fragmen DNA, yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan polimorfisme atau variasi genetik pada gen ER di antara sampel pasien. Visualisasi ini memberikan gambaran penting mengenai keberhasilan amplifikasi dan efektivitas pemotongan DNA dalam analisis molekuler.

B. Nomenklatur Enzim Restriksi

Hingga saat ini, sekitar 4.000 enzim restriksi telah dikarakterisasi dari berbagai mikroorganisme, masing-masing dengan spesifisitas unik terhadap urutan DNA targetnya. Untuk memastikan konsistensi dalam penamaan dan identifikasi, sistem nomenklatur standar telah ditetapkan. Konvensi penamaan enzim restriksi didasarkan pada asal organisme penghasilnya—genus, spesies, dan strain atau serotipe—dengan format nama singkat diikuti angka Romawi untuk membedakan variasi enzim dari strain yang sama. Nama enzim restriksi terdiri dari tiga huruf pertama yang diambil dari nama Latin mikroorganisme: huruf pertama mewakili genus, dua huruf berikutnya mewakili spesies, dan dapat diikuti oleh huruf tambahan yang menunjukkan strain. Jika mikroorganisme hanya menghasilkan satu enzim restriksi, namanya diakhiri dengan angka Romawi I. Namun, jika lebih dari satu enzim dihasilkan, enzim berikutnya

diberi nomor II, III, dan seterusnya. Sebagai contoh, enzim HindIII memiliki arti sebagai berikut:

1. H: *Haemophilus*
2. in: *influenzae*
3. d: menunjukkan serotipe d
4. III membedakan enzim ini dari enzim restriksi lain dari *Haemophilus influenzae* serotipe d (misalnya, HindII vs HindIII).

C. Tipe-Tipe Enzim Restriksi

Berdasarkan kompleksitas struktural, urutan pengenalan, posisi situs pemotongan (*recognition site*), dan kebutuhan kofaktor, enzim restriksi dikategorikan menjadi empat kelas utama, yaitu:

1. Tipe I: Merupakan enzim multi-subunit yang memiliki aktivitas restriksi sekaligus metilasi. Enzim ini membutuhkan ATP untuk aktivasi dan memotong DNA pada lokasi yang bervariasi dari situs pengenalan. Enzim tipe ini bekerja dengan mekanisme yang lebih kompleks dan biasanya menghasilkan potongan yang tidak spesifik.
2. Tipe II: Enzim ini memiliki situs pengenalan yang bersifat palindromik dan umumnya memotong DNA langsung pada situs pengenalan. Beberapa enzim tipe II juga dapat memotong sedikit lebih jauh dari situs pengenalan, tetapi tetap dalam jarak yang relatif dekat. Enzim ini tidak memerlukan ATP untuk pemotongan. Oleh karena spesifitasnya yang tinggi, enzim tipe ini adalah yang paling banyak dipelajari dan digunakan dalam berbagai aplikasi penelitian.
3. Tipe III: Mirip dengan tipe II, enzim ini juga memiliki urutan pengenalan palindromik, namun memotong DNA pada jarak tertentu dari situs pengenalan. Tipe III memerlukan ATP untuk aktivasi. Meskipun serupa dengan tipe II, tipe III memiliki perbedaan dalam mekanisme pemotongan dan lebih sensitif terhadap kondisi reaksi, seperti konsentrasi kofaktor dan pH.
4. Tipe IV: Enzim ini hanya memotong DNA yang telah termetilasi, dengan pemotongan yang terjadi sekitar 30 pasangan basa dari situs pengenalan. Enzim tipe IV berperan penting dalam pengenalan dan pemotongan DNA yang telah mengalami modifikasi metilasi, seperti metilasi pada basa adenin atau sitosin.

Tabel 8.1. Situs Pengenalan (*Recognition Site*) Dan Situs Pemotongan (*Restriction Site*) Dari Beberapa Enzim Restriksi Endonuklease Yang Sering Digunakan.

Enzim	Situs Pengenalan
AluI	A G ↓ C T
BamHI	G ↓ G A T C C
BglII	A ↓ G A T C T
ClaI	A T ↓ C G A T
EcoRI	G ↓ A A T T C
HaeIII	G G ↓ C C
HindII	G T Py ↓ Pu A C
HindIII	A ↓ A G C T T
HpaII	C ↓ C G G
KpnI	G G T A C ↓ C
MboI	↓ G A T C
PstI	C T G C A ↓ G
PvuI	C G A T ↓ C G
Sall	G ↓ T C G A C
SmaI	C C C ↓ G G G
XmaI	C ↓ C C G G G
NotI	G C ↓ G G C C G C

Keterangan: ↓ = situs pemotongan enzim; Py = basa pirimidin (C, T); Pu = basa purin (A, G).

Berdasarkan situs pengenalan dan spesifisitas pemotongannya, enzim restriksi dikelompokkan menjadi 2, yaitu:

1. Isoskizomer (*iso*: sama, *schizo*: terbelah): enzim restriksi yang mengenali dan memotong urutan DNA pada situs yang sama, menghasilkan pola pemotongan identik. Sebagai contoh, AgeI dan BshT1 keduanya mengenali dan memotong urutan 5'-A↓CCGGT-3' secara identik. Meskipun isoskizomer memiliki kesamaan dalam pola pengenalan dan pemotongan, mereka dapat berbeda dalam preferensi lokasi pemotongan, kondisi reaksi, sensitivitas terhadap metilasi, serta potensi aktivitas bintang (*star activity*)—yakni kecenderungan enzim untuk memotong situs non-spesifik di luar urutan pengenalan ketika kondisi reaksi tidak optimal.
2. Neoskizomer (*neo*: baru, *schizo*: terbelah), atau yang juga dikenal sebagai heteroskizomer: enzim restriksi yang mengenali urutan

nukleotida yang sama, namun memotong DNA pada lokasi yang berbeda. Sebagai contoh, SmaI (5'-CCC↓GGG-3') dan XmaI (5'-C↓CCGGG-3') keduanya mengenali urutan 5'-CCCGGG-3', tetapi menghasilkan potongan yang berbeda. SmaI menghasilkan ujung tumpul, sedangkan XmaI menghasilkan ujung kohesif, memberikan variasi dalam jenis ujung yang dihasilkan dari pemotongan.

D. Komponen Reaksi Restriksi DNA

Reaksi enzim restriksi memerlukan beberapa komponen reaksi dan kondisi lingkungan yang harus diperhatikan untuk memastikan pemotongan DNA berlangsung optimal. Tabel 8.2 merangkum berbagai reagen yang digunakan dalam reaksi enzim restriksi beserta fungsinya masing-masing.

Tabel 8.2. Komponen Umum Reaksi Enzim Restriksi Beserta Fungsinya.

Komponen Reaksi	Fungsi
Air steril bebas nuklease	Sebagai pelarut, penentu konsentrasi, dan mencegah degradasi DNA dengan menghindari kontaminasi nuklease.
Buffer enzim restriksi	Mengandung Tris-HCl sebagai penyangga pH, MgCl ₂ sebagai kofaktor enzim, NaCl untuk stabilitas ionik.
Bovine Serum Albumin (BSA), diasetilasi	Menstabilkan enzim restriksi dengan mencegah pengendapan enzim, serta asetilasi BSA untuk mencegah aktivitas degradasi non-spesifik yang dapat memengaruhi hasil reaksi.
DNA target	Berupa DNA plasmid (sirkular), DNA genom, produk PCR, atau oligonukleotida untai ganda.
Enzim restriksi	Memotong DNA berdasarkan pengenalan situs spesifik pada urutan target.

Adapun kondisi yang perlu diperhatikan dalam reaksi enzim restriksi, diantaranya:

1. pH

Sebagian besar enzim restriksi berfungsi optimal pada pH antara 7,2 dan 8,5, yang diukur pada suhu inkubasi. Nilai pH di luar kisaran optimal dapat menyebabkan aktivitas bintang. Dalam

hal ini, enzim restriksi dapat memotong urutan yang mirip, tetapi tidak identik, dengan situs pengenalan asli. Sebagai contoh, enzim restriksi EcoRI, yang biasanya mengenali situs 5' G ↓ A A T T C 3', dapat memotong pada urutan yang mirip, seperti 5' A ↓ A T T C 3' atau 5' G ↓ A A T G 3', akibat aktivitas bintang.

2. Konsentrasi garam

Enzim restriksi menunjukkan respons yang beragam terhadap kekuatan ionik, dimana sebagian besar enzim restriksi diaktifkan oleh konsentrasi **NaCl** atau KCl dalam kisaran 50-150 mM, sementara beberapa enzim tidak dapat bekerja pada konsentrasi garam melebihi 20 mM.

3. Penggunaan Bovine Serum Albumin (BSA)

BSA digunakan dalam buffer penyimpanan enzim restriksi untuk melindungi enzim dari protease dan faktor lingkungan yang dapat merusak aktivitasnya, seperti panas, tegangan permukaan, dan zat pengganggu lainnya. Selain itu, BSA juga membantu menjaga stabilitas enzim selama penyimpanan.

4. Gliserol

Gliserol ditambahkan pada buffer penyimpanan enzim restriksi untuk mencegah pembekuan enzim pada suhu -20°C. Siklus pembekuan-pencairan berulang dapat mengurangi aktivitas enzim. Beberapa enzim restriksi menunjukkan penurunan spesifisitas atau peningkatan aktivitas bintang jika konsentrasi gliserol dalam reaksi melebihi 5%.

5. Suhu inkubasi

Sebagian besar enzim restriksi menunjukkan aktivitas maksimum pada suhu 37°C. Namun, beberapa enzim restriksi memerlukan suhu inkubasi **yang** lebih tinggi atau lebih rendah untuk mencapai aktivitas optimal. Oleh karena itu, suhu inkubasi harus disesuaikan dengan spesifikasi enzim yang digunakan.

6. Volume reaksi

Konsentrasi DNA dalam reaksi enzim restriksi harus diatur dengan tepat, karena konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menghambat difusi enzim dan menurunkan efisiensi pemotongan, sedangkan konsentrasi yang terlalu rendah dapat mengurangi efektivitas enzim. Perhitungan volume reaksi harus mempertimbangkan kekuatan ionik akhir serta memastikan bahwa konsentrasi gliserol tidak melebihi 5%, guna mencegah terjadinya aktivitas bintang.

E. Troubleshooting Restriksi DNA

Sejumlah kendala mungkin dihadapi dalam penggunaan enzim restriksi. **Tabel 8.3** menyajikan troubleshooting dalam aplikasi enzim restriksi.

Tabel 8.3. Troubleshooting Dalam Aplikasi Enzim Restriksi

Masalah	Kemungkinan Penyebab	Rekomendasi
Digesti tidak lengkap atau tidak ada	Enzim tidak aktif	- Periksa tanggal kedaluwarsa enzim. Pastikan enzim disimpan pada suhu -20°C. - Hindari siklus pembekuan-pencairan terlalu sering. - Gunakan pendingin meja, seperti <i>cold block</i>, untuk meletakkan atau mengangkut enzim.
	Protokol digesti yang diterapkan belum optimal	Ikuti protokol yang direkomendasikan produsen enzim restriksi dan jenis DNA target. Pastikan semua aditif atau kofaktor (misalnya, DTT (dithiothreitol), Mg^{2+}, ATP) ada dalam reaksi, untuk enzim restriksi yang memerlukan hal tersebut.
	Kesalahan dalam penanganan atau penambahan enzim	- Hindari penggunaan volume kecil ($<0,5 \mu\text{L}$). Buat stok kerja yang lebih besar untuk memastikan keakuratan jumlah enzim yang ditambahkan ke setiap reaksi. - Gunakan buffer pengencer yang direkomendasikan oleh produsen enzim.
	Prosedur	Tambahkan enzim restriksi pada akhir

Masalah	Kemungkinan Penyebab	Rekomendasi
	penyusunan reaksi yang tidak sesuai	proses reaksi. ○ Goyangkan atau campur tabung reaksi setelah menambahkan enzim untuk memastikan enzim tidak mengendap di bagian bawah akibat kepadatan gliserol.
	Konsentrasi gliserol berlebih dalam campuran reaksi	○ Pertahankan konsentrasi gliserol dalam campuran reaksi di bawah 5%. Hindari penguapan yang mengurangi volume reaksi dan menyebabkan peningkatan konsentrasi gliserol.
	Konsentrasi DNA belum optimal	○ Pertahankan konsentrasi DNA dalam campuran digesti pada rentang optimal 20–100 ng/μL.
	Kontaminan dalam larutan DNA	○ Lakukan pemurnian kolom spin-silika, atau ekstraksi fenol dan presipitasi etanol untuk menghilangkan kontaminan.
	Efek metilasi	○ Periksa sensitivitas enzim restriksi terhadap metilasi. Jika enzim terhambat oleh metilasi pada situs pengenalannya, cari neoschizomer atau isoschizomer yang tidak terpengaruh oleh metilasi.
Pola pemotongan (<i>cleavage pattern</i>) tidak sesuai prediksi	Aktivitas bintang (<i>star activity</i>) dari enzim restriksi	○ Gunakan jumlah enzim yang direkomendasikan ○ Hindari inkubasi reaksi digesti yang terlalu lama. ○ Gunakan buffer reaksi yang direkomendasikan. ○ Pastikan konsentrasi gliserol dalam reaksi tidak melebihi 5%.
	Kontaminasi dengan enzim lain	○ Gunakan tabung baru untuk enzim dan/atau buffer.
	Kontaminasi dengan DNA substrat lain	○ Siapkan sampel DNA baru.
	Terdapat situs pengenalan yang tidak terduga pada DNA substrat	○ Konfirmasi integritas urutan DNA dengan sekuensing Sanger. ○ Mutasi mungkin telah mengubah situs restriksi pada templat.
Pita DNA membur (diffuse bands)	Kualitas DNA rendah	○ Periksa DNA yang belum didigesti dengan elektroforesis. ○ Lakukan pemurnian ulang pada DNA jika terlihat <i>smear</i> (degradasi) pada gel.
	Reagen terkontaminasi	○ Siapkan reagen baru, gunakan enzim baru

Masalah	Kemungkinan Penyebab	Rekomendasi
		o Komponen reaksi mungkin terkontaminasi nuklease akibat penanganan yang tidak tepat.



BAB 9

KLONING MOLEKULER (TEKNIK DNA REKOMBINAN)

A. Pengertian Kloning Molekuler

Kloning molekuler merupakan bagian dari teknik rekayasa DNA yang digunakan untuk menghasilkan salinan identik dari segmen DNA tertentu melalui mekanisme biologis di dalam sel inang. Proses ini melibatkan penyisipan segmen DNA yang diinginkan ke dalam vektor, seperti plasmid, yang kemudian dimasukkan ke dalam sel inang. Sel inang kemudian mereplikasi DNA rekombinan ini sebagai bagian dari proses pembelahannya, menghasilkan populasi sel yang mengandung salinan DNA tersebut. Berbeda dengan PCR, yang memperbanyak DNA secara cepat dan langsung di luar sel (*in vitro*), kloning molekuler memungkinkan amplifikasi DNA secara biologis (*in vivo*) sekaligus mempertahankan kemampuan segmen DNA untuk diekspresikan atau dimodifikasi lebih lanjut dalam sistem seluler.

B. Komponen Kloning Molekuler

Kloning molekuler melibatkan sejumlah komponen penting yang mendukung proses pemotongan, penggabungan, dan replikasi DNA target. Komponen-komponen tersebut antara lain:

1. Sisipan (*Insert*)

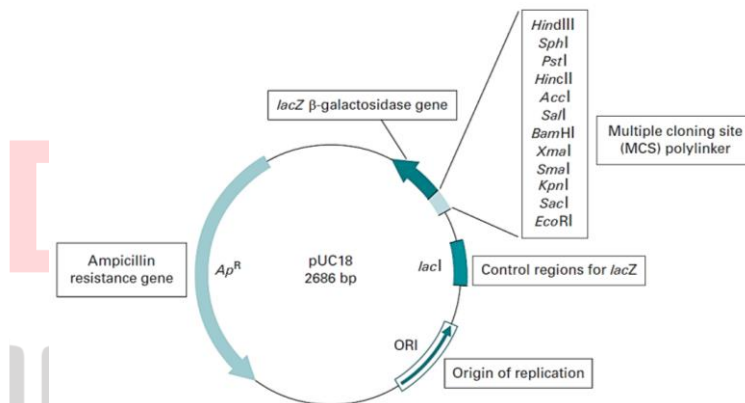
Sisipan merupakan fragmen DNA yang akan dikloning. Fragmen ini dapat berasal dari berbagai sumber, seperti DNA genomik, DNA komplementer (cDNA), DNA plasmid, produk PCR, atau DNA sintesis.

2. Vektor

Vektor adalah molekul DNA yang berfungsi sebagai pembawa dan memungkinkan replikasi sisipan DNA dalam sel inang. Vektor yang paling sering digunakan dalam kloning molekuler adalah plasmid, yakni DNA sirkular untai ganda yang ditemukan secara alami pada bakteri. Plasmid yang digunakan telah

dimodifikasi untuk meningkatkan efisiensi kloning, dengan beberapa elemen penting, diantaranya:

- Origin of Replication (ORI):** memungkinkan plasmid tersebut bereplikasi dalam sel bakteri secara independen dari kromosom bakteri sehingga proses perbanyakan dalam sel inang menjadi efisien.
- Multiple Cloning Site (MCS):** sekumpulan situs restriksi yang memudahkan penyisipan DNA target menggunakan enzim restriksi.
- Penanda Seleksi:** gen yang memberikan keuntungan selektif, seperti resistensi antibiotik, yang mempermudah pemilihan sel inang yang berhasil mentransformasi plasmid. Sebagai contoh, plasmid pUC18 mengandung gen *lacZα*, yang memungkinkan seleksi koloni berdasarkan warna menggunakan substrat X-gal.



Gambar 9.1. Vektor Puc18, Plasmid Rekombinan yang Berasal dari *Escherichia Coli* Sebagai Vektor Untuk Kloning Molekuler

Tabel 9.1. Perbandingan vektor yang umum digunakan untuk kloning fragmen DNA

Vektor	Sel Inang (<i>host</i>)	Struktur Vektor	Rentang Sisipan (kb)
M13	<i>E. coli</i>	Virus sirkular	1–4
Plasmid	<i>E. coli</i>	Plasmid sirkular	1–5

Vektor	Sel Inang (<i>host</i>)	Struktur Vektor	Rentang Sisipan (kb)
Phage λ	<i>E. coli</i>	Virus linier	2–25
Cosmids	<i>E. coli</i>	Plasmid sirkular	35–45
BACs*	<i>E. coli</i>	Plasmid sirkular	50–300
YACs**	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kromosom linier	100–2000

* Bacterial artificial chromosome

**Yeast artificial chromosome

3. Sel Inang (*Host*):

Sel inang adalah organisme yang digunakan untuk memperbanyak dan mengekspresikan DNA rekombinan. Sel inang harus memenuhi beberapa kriteria, antara lain kemampuan untuk menerima DNA rekombinan tanpa mengenalinya sebagai bahan asing, serta dapat menyediakan enzim dan protein yang diperlukan untuk replikasi plasmid dan ekspresi sisipan.

Inang dapat berasal dari prokariotik atau eukariotik tergantung kebutuhan. *E. coli* adalah inang prokariotik yang paling sering digunakan dalam kloning molekuler karena pertumbuhannya yang cepat, kemudahan manipulasi genetik, dan statusnya yang tidak patogen. Alternatif seperti *Bacillus subtilis* digunakan untuk tujuan tertentu, misalnya untuk mensekresikan protein yang dikode oleh gen hasil kloning. Adapun *Saccharomyces cerevisiae* adalah inang eukariotik yang umum digunakan karena kemampuannya mengekspresikan protein secara efisien, termasuk protein yang memerlukan modifikasi pasca-translasi, yang tidak dapat dilakukan oleh inang prokariotik.

C. Tahapan Kloning Molekuler

Kloning molekuler secara garis besar memiliki 4 tahap utama, yaitu restriksi, ligasi, transformasi dan seleksi plasmid rekombinan.

1. Restriksi

Langkah awal dalam kloning molekuler adalah pemotongan DNA target menjadi potongan-potongan yang lebih kecil untuk memungkinkan rekombinasi dan amplifikasi. Tahap ini

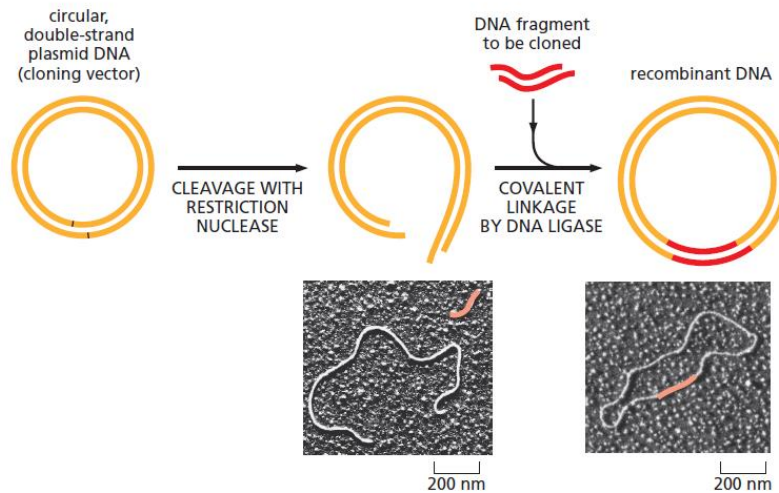
memanfaatkan enzim restriksi endonuklease tertentu untuk memotong molekul DNA pada situs pengenalan spesifik sesuai dengan urutan basa yang dikenali oleh enzim tersebut. Setelah fragmen DNA target dihasilkan, situs penyisipan pada vektor dipotong menggunakan enzim restriksi yang sesuai. Pemilihan enzim restriksi didasarkan pada lokasi urutan pengenalan pada vektor dan sisipan, serta kompatibilitas enzim dalam proses ligasi. Dalam kloning molekuler, enzim restriksi yang menghasilkan ujung kohesif lebih sering dipilih karena beberapa keuntungan praktis, seperti meningkatkan efisiensi ligasi.

Setelah proses restriksi, dilakukan defosforilasi vektor untuk mencegah ligasi diri (*self-ligation*). Proses ini menggunakan enzim alkali fosfatase yang menghilangkan gugus fosfat dari ujung 5' DNA vektor. Tanpa gugus fosfat pada ujung 5', enzim DNA ligase tidak dapat menggabungkan kedua ujung DNA vektor yang telah dipotong, sehingga memastikan penyisipan fragmen DNA target ke dalam vektor selama proses ligasi.

2. Ligasi

Apabila potongan fragmen vektor dan sisipan menghasilkan *sticky ends*, kedua fragmen tersebut dapat bergabung melalui ikatan hidrogen antara basa-basa komplementernya. Namun, asosiasi ini bersifat sementara, sehingga diperlukan enzim DNA ligase untuk mengkatalisis pembentukan ikatan kovalen antara gugus fosfat pada ujung 5' dan gugus hidroksil pada ujung 3' dari DNA.

Beberapa jenis DNA ligase, seperti DNA ligase T4, DNA ligase *E. coli*, dan DNA ligase termotabil, dapat digunakan dalam proses ligasi. Di antara enzim-enzim tersebut, DNA ligase T4 yang diperoleh dari bakteriofag T4 adalah yang paling sering digunakan karena kemampuannya untuk meligasi baik *sticky ends* maupun *blunt ends*. Proses ligasi dengan DNA ligase T4 memerlukan beberapa kofaktor, seperti ATP, DTT, dan Mg^{2+} , yang berperan dalam meningkatkan aktivitas enzim.



Gambar 9.2. Inseri Fragmen DNA ke Plasmid Bakteri yang Melibatkan Tahapan Restriksi dan Ligasi pada DNA Rekombinan

Sumber: (Alberts *et al.*, 2022).

3. Transformasi

Tahap transformasi bertujuan untuk memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel bakteri, memungkinkan bakteri membawa dan memperbanyak plasmid yang mengandung gen target. Secara alami, beberapa bakteri memiliki kemampuan untuk menyerap DNA dari lingkungan, seperti DNA yang dilepaskan oleh bakteri mati. Namun, dalam aplikasi laboratorium, bakteri umumnya tidak memiliki kompetensi alami ini, sehingga perlu dirangsang menggunakan metode tertentu.

Dua teknik utama yang digunakan adalah perlakuan kimiawi dengan kalsium klorida (CaCl_2 *heat shock method*) dan elektroporasi (kejutan listrik). Kedua metode ini meningkatkan permeabilitas membran sel, memungkinkan plasmid rekombinan masuk ke dalam bakteri. Setelah transformasi, bakteri dikultur dalam medium kaya nutrisi untuk mendukung pertumbuhan dan replikasi plasmid. Jika plasmid mengandung gen seleksi (misalnya gen resistensi antibiotik), hanya bakteri yang berhasil

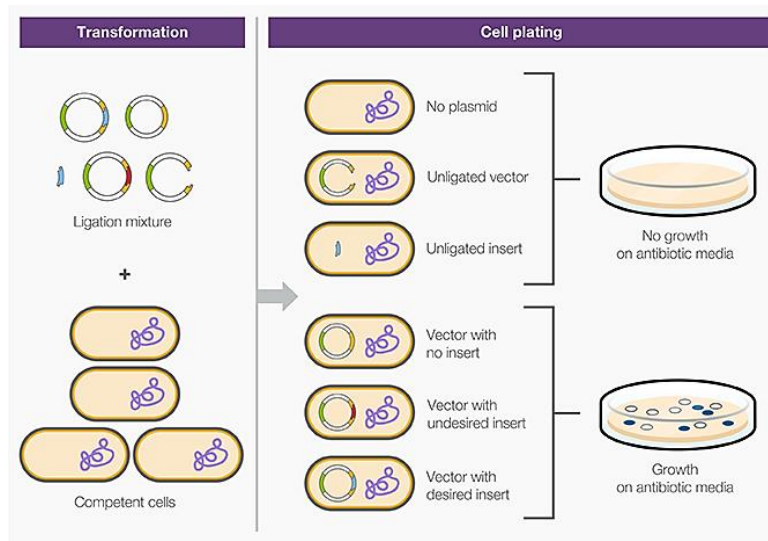
mentransformasikan plasmid yang akan bertahan dalam medium selektif.

Plasmid yang telah masuk ke dalam bakteri dapat diperbanyak bersamaan dengan pembelahan sel bakteri, menghasilkan banyak salinan DNA rekombinan. Plasmid dapat diekstraksi dan dimurnikan menggunakan metode seperti lisis alkali.

4. Seleksi plasmid rekombinan

Transformasi menghasilkan campuran koloni bakteri yang terdiri dari sel tanpa vektor, sel dengan vektor tanpa sisipan, sel dengan sisipan saja, serta sel dengan vektor yang berhasil mengandung sisipan. Sel yang tidak menerima vektor tidak memiliki gen resistensi antibiotik, sehingga tidak dapat tumbuh pada media seleksi. Sebaliknya, bakteri yang ditransformasi dengan vektor (baik yang mengandung sisipan maupun tidak) dapat bertahan hidup karena ekspresi gen resistensi antibiotik. Dengan demikian, seleksi berbasis antibiotik memastikan bahwa hanya bakteri yang berhasil menerima plasmid yang dapat berkembang.

Untuk mengidentifikasi apakah koloni yang ditransformasi mengandung sisipan, beberapa metode dapat digunakan, termasuk penyaringan biru/putih dan seleksi positif. Dalam metode penyaringan biru/putih, bakteri ditumbuhkan pada media selektif yang mengandung IPTG (induser transkripsi) dan X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolyl- β -D-galaktopiranosida), yang merupakan substrat kromogenik untuk enzim β -galaktosidase. Jika vektor tidak mengandung sisipan, gen lacZ α akan tetap aktif, menghasilkan enzim β -galaktosidase yang menghidrolisis X-gal sehingga koloni berwarna biru. Sebaliknya, jika sisipan DNA berhasil masuk ke dalam vektor dan mengganggu gen lacZ α , enzim β -galaktosidase tidak terbentuk, sehingga koloni berwarna putih.



Gambar 9.3. Skema Proses Transformasi dan Fenotip Koloni yang Dihasilkan

Selain penyaringan biru/putih, metode seleksi positif juga dapat digunakan. Dalam metode ini, gen yang bersifat mematikan bagi inang bakteri ditempatkan di dalam situs kloning ganda (multiple cloning site, MCS) vektor. Jika sisipan berhasil terligasi ke dalam gen tersebut, ekspresinya akan terhambat, memungkinkan hanya sel yang mengandung vektor dengan sisipan yang dapat bertahan hidup.

Untuk mengonfirmasi keberadaan dan karakteristik sisipan secara lebih spesifik, diperlukan analisis lanjutan. Salah satu metode yang umum digunakan adalah digesti restriksi terhadap plasmid yang diekstraksi dari koloni positif atau putih, kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis gel untuk menentukan ukuran dan orientasi sisipan. Pemilihan enzim restriksi yang tepat sangat penting dalam memastikan keberhasilan proses ini.

Selain digesti restriksi, metode PCR koloni dapat digunakan untuk mendeteksi sisipan. Teknik ini menggunakan primer spesifik yang menargetkan sisipan, sekuens vektor yang mengapit sisipan, atau kombinasi keduanya untuk memastikan integrasi sisipan dalam plasmid. Metode paling akurat untuk mengidentifikasi sisipan adalah sekuensing DNA, yang

memungkinkan analisis langsung terhadap urutan nukleotida sisipan dalam vektor.

D. Aplikasi Kloning Molekuler

Kloning molekuler memiliki berbagai aplikasi luas dalam penelitian dasar dan terapan. Berikut adalah beberapa contoh utama penerapannya:

1. Studi Fungsi Gen

Kloning molekuler memungkinkan analisis mendalam terhadap fungsi gen dan perannya dalam proses biologis, perkembangan, patogenesis penyakit, serta karakteristik organisme. Aplikasi utama meliputi:

- a. Knockout dan knockdown ekspresi gen: Menggunakan teknik seperti CRISPR-Cas9 atau RNA interferensi (RNAi) untuk menginaktivasi atau mengurangi ekspresi gen target guna mengevaluasi perannya dalam metabolisme, proliferasi sel, atau mekanisme patogenik.
- b. Ekspresi berlebih (overexpression): Menyisipkan gen ke dalam vektor ekspresi yang dikendalikan oleh promotor konstitutif guna meningkatkan produksi protein tertentu, seperti dalam studi onkogen pada kanker.
- c. Uji gen reporter: Menggabungkan promotor gen dengan gen reporter (misalnya luciferase atau GFP) untuk memantau ekspresi gen dalam kondisi fisiologis dan patologis.
- d. Studi biologi perkembangan: Mengkloning gen perkembangan ke dalam embrio model untuk mengevaluasi dampaknya terhadap organogenesis, seperti pembentukan sistem saraf atau kardiovaskular.
- e. Analisis jalur metabolisme: Mengekspresikan enzim dari jalur metabolisme tertentu guna mengevaluasi efek mutasi terhadap aktivitas enzimatik atau produk metabolit.

2. Studi Daerah Pengatur Genomik

Kloning molekuler juga digunakan untuk memahami fungsi elemen non-coding yang berperan dalam regulasi ekspresi gen, seperti promotor, enhancer, dan silencer. Penerapannya meliputi:

- a. Analisis promotor: Mengkloning dan mengkarakterisasi promotor untuk meneliti regulasi ekspresi gen dalam kondisi spesifik, termasuk dalam patogenesis kanker atau respons terhadap stres lingkungan.
- b. Studi enhancer dan silencer: Mengevaluasi pengaruh elemen regulasi ini terhadap ekspresi gen dalam pola spesifik jaringan.
- c. Interaksi faktor transkripsi: Mengidentifikasi dan menganalisis situs pengikatan faktor transkripsi guna memahami regulasi ekspresi gen, seperti peran p53 dalam kanker.
- d. Studi epigenetik: Mengeksplorasi pengaruh modifikasi epigenetik, seperti metilasi DNA atau modifikasi histon, terhadap ekspresi gen dan perkembangan penyakit.
- e. Respons terhadap sinyal eksternal: Mengkloning elemen regulator yang merespons sinyal seperti hormon atau stres lingkungan untuk memahami mekanisme aktivasi gen dalam berbagai kondisi biologis.

3. Aplikasi Translasional

Kloning molekuler juga memiliki berbagai aplikasi dalam bidang medis dan bioteknologi. Contoh aplikasinya meliputi:

- a. Produksi protein rekombinan: Menghasilkan protein terapeutik seperti insulin untuk diabetes, faktor pembekuan untuk hemofilia, dan enzim terapi lainnya.
- b. Terapi gen: Mengembangkan strategi pengobatan berbasis transfer gen untuk penyakit genetik seperti fibrosis kistik, distrofi otot, dan gangguan retina bawaan.
- c. Pengembangan vaksin rekombinan: Termasuk produksi vaksin hepatitis B dan vaksin mRNA untuk COVID-19.
- d. Produksi antibodi monoklonal: Menghasilkan antibodi spesifik untuk diagnostik dan terapi berbagai penyakit, termasuk kanker dan gangguan autoimun.
- e. Organisme hasil rekayasa genetika (GMO): Meningkatkan sifat agronomis tanaman atau hewan, seperti ketahanan terhadap hama atau peningkatan kandungan nutrisi.
- f. Produksi biofarmasi: Menggunakan sel bakteri, ragi, atau mamalia sebagai pabrik produksi protein terapeutik, enzim industri, dan vaksin.

BAB 10

ISOLASI RNA

A. Jenis-Jenis RNA

RNA (asam ribonukleat) adalah molekul asam nukleat yang berperan penting dalam berbagai proses biologis, terutama dalam ekspresi gen dan sintesis protein. Berbeda dengan DNA yang umumnya beruntai ganda, RNA sebagian besar berbentuk untai tunggal, meskipun dapat membentuk struktur sekunder, seperti *hairpin loops*, melalui interaksi basa komplementer intramolekuler. Panjang RNA sangat bervariasi, mulai dari sekitar 20 nukleotida pada mikroRNA hingga lebih dari 8 kilobasa (kb) pada RNA untai panjang seperti mRNA dan rRNA.

Terdapat beberapa jenis RNA yang memiliki peran spesifik yang sangat penting dalam berbagai proses biologisnya, diantaranya:

1. RNA mesenjer (mRNA)

mRNA adalah RNA yang mengandung informasi genetik untuk sintesis protein. Molekul ini merupakan hasil transkripsi DNA dan membawa informasi dalam bentuk kodon, yaitu triplet nukleotida spesifik, yang kemudian diterjemahkan menjadi urutan asam amino dalam proses sintesis protein.

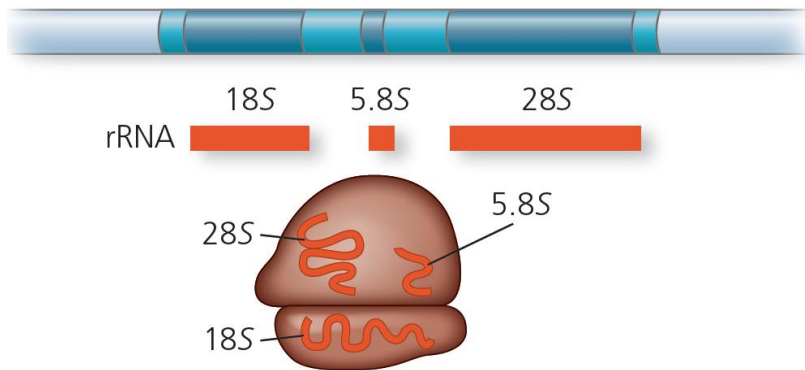
2. Transfer RNA (tRNA)

tRNA berfungsi membawa asam amino ke ribosom selama proses translasi. Molekul ini memiliki triplet antikodon yang spesifik untuk kodon tertentu pada mRNA serta situs pengikatan asam amino di ujung 3'. Fungsi ini difasilitasi oleh enzim aminoasil-tRNA sintetase.

3. Ribosomal RNA (rRNA)

rRNA, seperti 5S, 18S, dan 28S pada ribosom eukariotik, merupakan komponen utama ribosom yang berperan dalam sintesis protein. Ribosom terdiri atas dua subunit, yaitu subunit besar dan subunit kecil, yang bekerja sama selama translasi.

Selain sebagai komponen struktural, rRNA juga memiliki aktivitas katalitik (ribozim) yang esensial untuk pembentukan ikatan peptida.



Gambar 10.1 Skema rRNA yang Merupakan Komponen Utama Ribosom

Sumber: (Urry *Et Al.*, 2021)

4. *Small nuclear RNA (snRNA)*

snRNA adalah RNA kecil yang berperan dalam berbagai proses, termasuk *splicing* intron dari pre-mRNA menjadi mRNA matang, regulasi transkripsi, dan pemeliharaan telomer. snRNA bergabung dengan protein untuk membentuk ribonukleoprotein nuklir kecil (snRNP), yang menjadi bagian inti dari spliceosom. Molekul snRNA yang paling umum adalah U1, U2, U4, U5, dan U6.

5. *Small nucleolar RNA (snoRNA)*

snoRNA berperan dalam pemrosesan dan modifikasi rRNA, termasuk modifikasi seperti metilasi dan pseudouridilasi.

6. *Small interfering RNA (siRNA)*

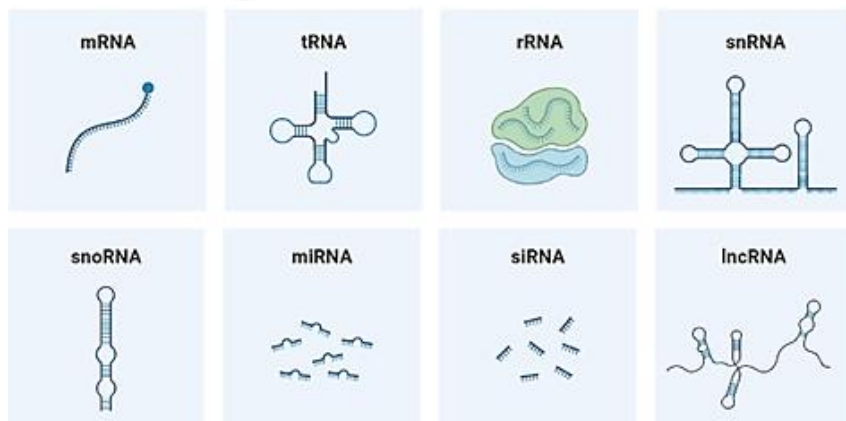
siRNA adalah RNA pendek (sekitar 20–25 nukleotida) yang menghambat ekspresi gen melalui mekanisme interferensi RNA (RNA interference). siRNA bekerja dengan mengenali mRNA target secara spesifik dan memfasilitasi degradasinya. Proses ini mencegah translasi mRNA menjadi protein, sehingga berperan penting dalam regulasi genetik dan pertahanan terhadap virus.

7. MikroRNA (miRNA)

miRNA adalah RNA kecil (sekitar 22 nukleotida) yang mengatur ekspresi gen dengan menghambat translasi atau menyebabkan degradasi mRNA target.

8. Long non-coding RNA (lncRNA)

lncRNA adalah RNA non-pengkode panjang (lebih dari 200 nukleotida) yang berperan dalam berbagai fungsi regulasi genetik, termasuk epigenetik, transkripsi, stabilitas mRNA, dan pengaturan interaksi kromatin.



Gambar 10.2. Perbandingan Berbagai Jenis RNA

B. Prinsip Dasar Isolasi RNA

Isolasi RNA bertujuan untuk memisahkan RNA dari komponen lain dalam sel, seperti protein, lipid, dan karbohidrat, dan DNA, melalui ekstraksi dan pemurnian, dengan 4 tahapan umum, diantaranya:

1. Lisis sel

Membran sel dipecah untuk melepaskan RNA menggunakan buffer lisis, yang biasanya mengandung deterjen (misalnya SDS) dan agen denaturasi (seperti guanidin isothiocyanate). Agen-agen ini membantu mendenaturasi protein dan menghambat aktivitas RNase. Salah satu reagen yang umum digunakan adalah TRIzol, suatu larutan fenol-kloroform yang juga mengandung guanidin

isothiocyanate untuk meningkatkan stabilitas RNA selama ekstraksi.

2. Pemisahan

RNA dipisahkan dari DNA, protein, dan komponen lainnya menggunakan metode seperti fenol-kloroform. RNA tetap berada di fase air karena sifat hidrofiliknya, sementara komponen lain berada di fase organik atau pada antarmuka kedua fase tersebut (*interphase*).

3. Presipitasi RNA

RNA dalam larutan dipresipitasi menggunakan alkohol (etanol atau isopropanol) dalam kondisi garam tinggi (misalnya sodium acetate), yang menetralkan muatan RNA dan memfasilitasi presipitasi. Sampel kemudian disentrifugasi untuk memisahkan RNA yang mengendap di bagian bawah tabung sentrifuge, membentuk pelet RNA.

4. Pencucian dan pelarutan RNA

Pelet RNA dicuci dengan etanol 70% untuk menghilangkan sisa garam dan kontaminan lainnya, kemudian dilarutkan dalam air bebas RNase atau buffer seperti TE.

RNA lebih mudah terdegradasi dibandingkan DNA karena adanya gugus hidroksil (-OH) pada karbon 2' ribosa serta keberadaan enzim RNase yang tersebar di lingkungan. Oleh sebab itu, proses isolasi RNA memerlukan kehati-hatian lebih untuk mencegah kontaminasi dan degradasi RNA.

Meskipun prinsip isolasi RNA serupa dengan isolasi DNA, beberapa tahapan memerlukan reagen tambahan untuk menghambat aktivitas RNase. Perbedaan utama antara isolasi RNA dan DNA dirangkum dalam **Tabel 10.1**.

Tabel 10.1. Perbedaan prinsip dalam isolasi RNA dan DNA

Aspek Pembeding	DNA	RNA
Sifat molekul	DNA lebih stabil terhadap kerusakan karena struktur	RNA lebih rentan terhadap kerusakan, terutama karena

Aspek Pembeding	DNA	RNA
	kimianya lebih tahan terhadap hidrolisis dan degradasi.	adanya ribonuklease (RNase), serta struktur kimianya yang lebih mudah terhidrolisis.
pH buffer lisis	Menggunakan buffer dengan pH netral hingga sedikit basa (pH 7,5–8,0)	Menggunakan buffer dengan pH asam hingga sedikit netral (pH 4,5–6,0)
Reagen denaturasi	Tidak memerlukan reagen denaturasi kuat	Memerlukan agen denaturasi kuat seperti guanidin isothiocyanate yang tidak hanya membantu dalam lisis sel, tetapi juga menonaktifkan RNase
Penyimpanan	Stabil pada 4°C (jangka pendek), -20°C hingga -80°C (jangka panjang).	Perlu disimpan dalam air DEPC- <i>treated</i> atau buffer bebas RNase di -80°C untuk stabilitas jangka panjang dan mencegah degradasi.

C. Analisis Kuantitas dan Kualitas RNA

Analisis kuantitas dan kualitas RNA dilakukan untuk memastikan bahwa hasil isolasi memenuhi standar kemurnian dan integritas yang diperlukan dalam aplikasi molekuler lanjutan. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa RNA yang digunakan dalam eksperimen memiliki konsentrasi yang memadai serta bebas dari kontaminasi dan degradasi.

1. Analisis kuantitas

Kuantitas RNA ditentukan dengan mengukur konsentrasi RNA dalam larutan hasil isolasi. Pengukuran biasanya dilakukan menggunakan spektrofotometer atau Nanodrop, yang mengukur absorbansi pada panjang gelombang 260 nm (A260), yang spesifik untuk asam nukleat. Konsentrasi RNA dihitung berdasarkan nilai A260, dengan asumsi bahwa 1 unit absorbansi pada 260 nm setara dengan 40 µg/mL RNA murni. Tingkat kemurnian RNA dapat ditentukan dengan menghitung rasio A260/A280, yang diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{rasio A260/A280} = \frac{\text{Absorbansi pada 260 nm}}{\text{Absorbansi pada 280 nm}}$$

2. Analisis Kualitas RNA

Analisis kualitas RNA dilakukan untuk memastikan RNA yang diisolasi bebas dari kontaminasi dan degradasi. Ada dua parameter utama yang diukur dalam analisis kualitas RNA:

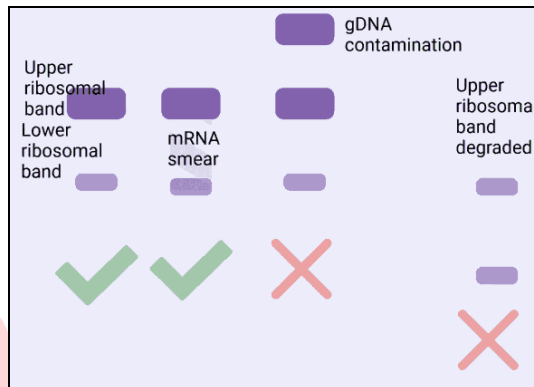
a. Kemurnian RNA

Kemurnian RNA dapat dinilai berdasarkan rasio absorbansi A_{260}/A_{280} , dengan nilai ideal untuk RNA murni berkisar antara 2.0 – 2.2. Rasio yang lebih rendah (<2.0) menunjukkan kemungkinan kontaminasi protein atau fenol, sedangkan nilai yang lebih tinggi dapat mengindikasikan kontaminasi dengan DNA.

b. Integritas RNA

Integritas RNA dapat dievaluasi menggunakan gel elektroforesis atau alat seperti Bioanalyzer, atau dengan menghitung RNA Integrity Number (RIN). RNA yang utuh akan menunjukkan dua pita utama yang jelas, yaitu 16S dan 23S rRNA untuk prokariotik atau 18S dan 28S rRNA untuk eukariotik. Degradasi RNA ditandai dengan pita yang kabur atau hilangnya pita utama, yang mengindikasikan fragmentasi molekul RNA.

Kualitas hasil isolasi RNA dapat dilihat dari hasil elektroforesis, seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 10.3**. Isolasi RNA dikatakan berhasil apabila terdapat dua pita ribosom yang jelas, di mana pita bagian atas (28S untuk sel eukariotik atau 23S untuk sel bakteri) harus memiliki intensitas sekitar dua kali lipat dibandingkan pita ribosom bagian bawah (18S untuk sel eukariotik atau 16S untuk sel bakteri). Semua pita harus tampak tajam dan padat, seperti yang ditunjukkan pada jalur 1.



Gambar 10.3. Ilustrasi Hasil Elektroforesis Gel pada Sampel Hasil Isolasi RNA yang Berbeda

Jika intensitas kedua pita rRNA tersebut sama, ini menunjukkan RNA telah mengalami degradasi. Pita mRNA biasanya muncul di antara dua pita ribosom sebagai smear (jalur 2). Jika terdapat pita besar yang signifikan yang berada jauh lebih tinggi pada gel, ini menunjukkan adanya kontaminasi DNA dalam RNA (jalur 3). Sementara itu, smearing di bawah pita rRNA menunjukkan RNA dengan kualitas rendah (jalur 4).

D. Troubleshooting Isolasi RNA

Keberhasilan proses isolasi RNA sangat memengaruhi hasil langkah-langkah uji lanjut, sehingga perlu memahami potensi masalah yang dapat muncul. **Tabel 10.2** menyajikan panduan troubleshooting untuk mengatasi berbagai masalah yang mungkin terjadi selama isolasi RNA.

Tabel 10.2. Troubleshooting isolasi RNA

Masalah	Kemungkinan Penyebab	Solusi
RNA terdegradasi atau berkualitas rendah, misal: smear pada gel	Sampel awal tidak disimpan/ditangani dengan baik.	- Ikuti pedoman penyimpanan/penanganan yang benar. - Segera tambahkan agen denaturasi untuk menonaktifkan RNase.
	RNase endogen merusak RNA.	Gunakan sarung tangan dan ganti secara berkala untuk menghindari kontaminasi RNase.

Masalah	Kemungkinan Penyebab	Solusi
		Gunakan peralatan yang telah dibersihkan untuk memastikan bebas dari RNase.
	Penyimpanan RNA yang tidak tepat	Simpan RNA di -80°C untuk periode waktu yang panjang guna mengurangi degradasi.
RNA total mengandung DNA genomik	Perlakuan DNase tidak memadai/tidak digunakan.	- Lakukan perlakuan DNase dan pastikan DNase sepenuhnya dihilangkan setelah perlakuan. - Gunakan DNase pada kolom atau ekstraksi fenol-kloroform, diikuti presipitasi RNA.
Hasil RNA total rendah	Kandungan RNA rendah dalam sampel awal atau sampel awal salah	- Gunakan sampel awal yang tepat atau tingkatan jumlah sampel. - Hindari melebihi kapasitas sistem pemurnian.
	Sampel tidak disimpan/ditangani dengan baik.	Ikuti pedoman penyimpanan dan penanganan yang benar.
	Terdapat RNase selama/setelah pemrosesan sampel.	- Gunakan sarung tangan dan ganti berkala. - Bersihkan peralatan yang digunakan agar bebas kontaminasi RNase.
	Sampel tidak dihancurkan/dihomogenisasi dengan baik.	Ikuti rekomendasi penghancuran/homogenisasi untuk jenis sampel tersebut.

BAB 11

ANALISIS EKSPRESI GEN

A. Prinsip Dasar Ekspresi Gen

Ekspresi gen merupakan proses di mana informasi yang terkandung dalam gen digunakan untuk menghasilkan produk fungsional yang dapat berupa protein (seperti enzim atau protein struktural) atau produk non-protein, seperti RNA. Proses ini mengatur waktu, lokasi, dan tingkat sintesis molekul RNA dan protein, yang esensial untuk memastikan fungsi yang sesuai dalam konteks spesifik sel dan organisme.

B. Metode Analisis Ekspresi Gen

Evaluasi tingkat ekspresi gen dapat dilakukan melalui berbagai pendekatan, termasuk pengukuran aktivitas fungsional produk gen, analisis langsung molekul RNA atau protein, serta pengamatan fenotipe yang dipengaruhi oleh ekspresi gen tersebut. Analisis ekspresi gen mencakup berbagai tingkat regulasi, seperti regulasi transkripsi oleh faktor transkripsi, modifikasi pasca-transkripsi, translasi, dan modifikasi pasca-translasi. Secara umum, studi ini dapat dibagi menjadi empat area utama: analisis ekspresi RNA, studi regulasi promotor, analisis ekspresi protein, dan investigasi modifikasi pasca-translasi. Keempat aspek ini saling melengkapi untuk memahami dinamika ekspresi gen secara menyeluruh.

Untuk memahami dinamika ekspresi gen, diperlukan teknik-teknik analisis yang dapat mendeteksi dan mengukur tingkat RNA yang dihasilkan oleh gen-gen tertentu dalam berbagai kondisi biologis. Seiring perkembangan teknologi, berbagai metode analisis ekspresi gen telah dikembangkan, masing-masing dengan keunggulan dan keterbatasannya. Dalam bab ini, akan dibahas empat metode yang sering digunakan dalam analisis ekspresi gen, yaitu Reverse Transcription-PCR (RT-PCR), Northern blotting, DNA Microarray, dan RNA-Seq.

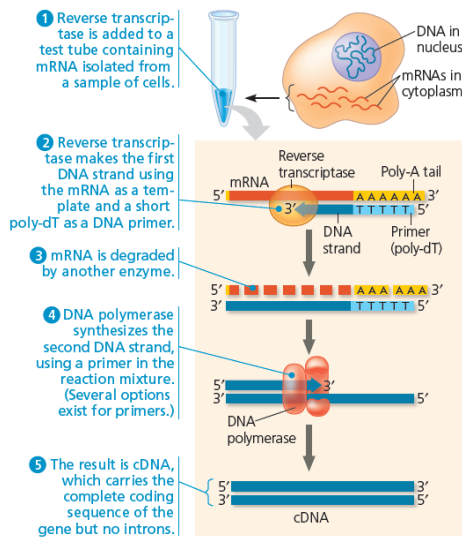
1. Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

RT-PCR adalah teknik yang menggabungkan enzim reverse transcriptase untuk mensintesis DNA komplementer (cDNA) dari untai mRNA, diikuti oleh amplifikasi cDNA menggunakan PCR. Proses ini memungkinkan analisis ekspresi gen, seperti membandingkan tingkat ekspresi gen antar sampel—misalnya, pada berbagai tahap perkembangan embrionik, berbagai jaringan, atau dalam jenis sel yang sama pada kondisi yang berbeda.

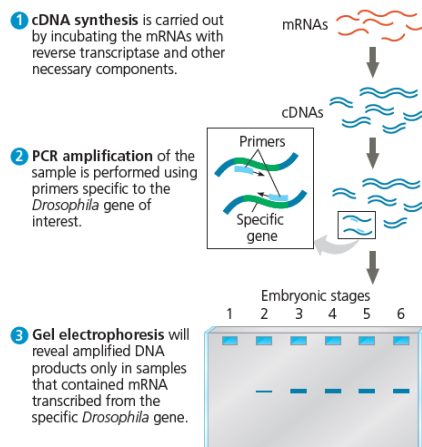
Ujung 3' mRNA memiliki ekor poli-A, yaitu urutan nukleotida adenin (A) yang memungkinkan penggunaan primer poli-dT untuk sintesis cDNA. Selain itu, primer acak atau primer spesifik gen juga dapat digunakan sesuai kebutuhan eksperimen. Setelah sintesis cDNA untai pertama, DNA untai kedua yang komplementer dapat disintesis menggunakan DNA polimerase, menghasilkan DNA untai ganda (double-stranded cDNA) (**Gambar 11.1**).

cDNA yang dihasilkan tidak mengandung intron karena disalin dari mRNA matang yang telah melalui proses *splicing*, sehingga merepresentasikan gen yang sedang diekspresikan pada saat mRNA diisolasi. Ketika produk dianalisis menggunakan elektroforesis gel, pita amplifikasi akan terlihat hanya pada sampel yang mengandung mRNA dari gen target, menunjukkan bahwa gen tersebut diekspresikan (**Gambar 11.2**).

RT-PCR dapat digabungkan dengan metode qPCR berbasis fluoresensi untuk kuantifikasi produk secara langsung, yang dikenal sebagai RT-qPCR. Teknik ini tidak memerlukan elektroforesis dan memberikan data kuantitatif ekspresi gen. RT-PCR atau RT-qPCR juga memungkinkan analisis ekspresi gen pada berbagai jaringan secara simultan, sehingga memfasilitasi identifikasi jaringan spesifik yang menghasilkan mRNA tertentu.



Gambar 11.1. Sintesis DNA Komplementer (Cdna) dari Gen Eukariotik Menggunakan Metode Reverse Transcription-PCR Sumber: (Urry *Et Al.*, 2021).



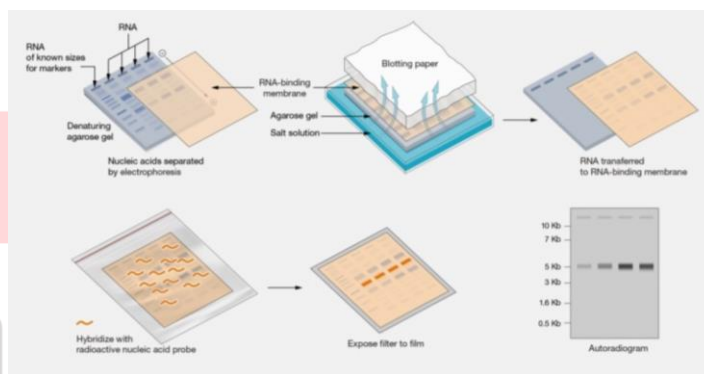
Gambar 11.2. Skema Tahapan Umum Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)
Sumber: (Urry *Et Al.*, 2021)

2. Northern blotting

Northern blotting merupakan teknik blotting yang digunakan untuk analisis molekul RNA spesifik. Istilah 'blotting' mengacu

pada pemindahan sampel biologis dari gel ke membran, diikuti oleh pendeteksian pada permukaan membran. Teknik ini memanfaatkan prinsip dasar interaksi spesifik antara molekul target dan probe yang komplementer, sehingga menghasilkan sinyal yang dapat divisualisasikan.

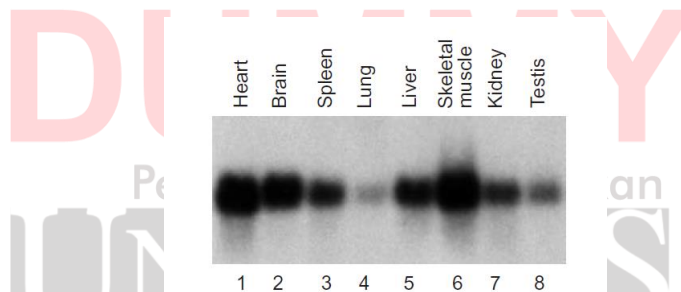
Setelah RNA dimurnikan, molekul-molekul RNA dipisahkan berdasarkan ukuran menggunakan elektroforesis gel. Setelah pemisahan, RNA dipindahkan dari gel ke membran padat, seperti membran nilon atau nitroselulosa, menggunakan metode kapiler, vakum, atau elektro-transfer. Membran ini kemudian diinkubasi dengan probe berlabel, yang biasanya berupa DNA atau RNA yang komplementer terhadap urutan target RNA. Probe biasanya dilabeli dengan isotop radioaktif, fluoresen, atau senyawa kimia. Proses hibridisasi ini memungkinkan deteksi molekul RNA dengan urutan komplementer terhadap probe, sehingga memberikan informasi tentang keberadaan dan ukuran molekul RNA target (**Gambar 11.3**).



Gambar 11.3. Skema Tahapan Umum dari Metode Northern Blotting

Blot atau bercak yang dihasilkan dalam metode Northern blotting mencerminkan tingkat ekspresi gen melalui jumlah transkrip RNA yang terdeteksi. Intensitas gelap pita pada film meningkat seiring dengan konsentrasi RNA yang lebih tinggi, karena lebih banyak probe yang terikat pada transkrip RNA target.

Gambar 11.4 merupakan contoh hasil Northern blotting RNA dari delapan jenis jaringan tikus menggunakan probe spesifik untuk gen G3PDH, yang mengkode enzim metabolisme gula *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Hasil visualisasi tersebut menunjukkan bahwa tingkat ekspresi gen G3PDH tertinggi ditemukan pada jaringan jantung dan otot rangka, sementara ekspresi terendah terdeteksi pada jaringan paru-paru.



Gambar 11.4 Hasil Northern Blotting pada Mrna Sitoplasma yang Diisolasi dari Jaringan Tikus

Sumber: (Weaver, 2012)

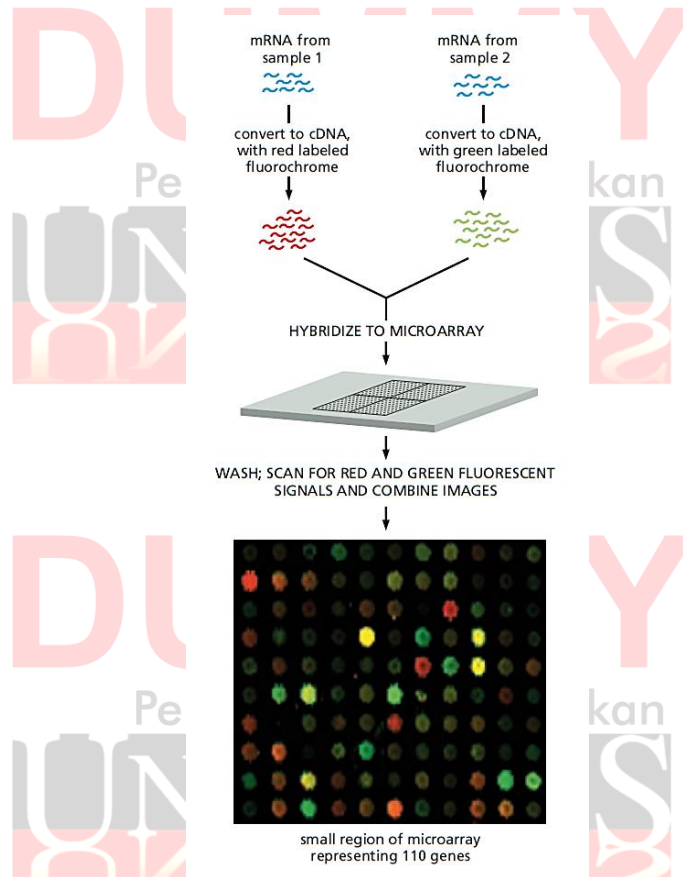
3. DNA Microarray

DNA Microarray merupakan teknik analisis genom yang memungkinkan penelitian ekspresi ribuan gen secara bersamaan dalam satu percobaan. Teknik ini menggunakan mikroarray (chip DNA) yang terdiri dari ribuan fragmen DNA untai tunggal, yang mewakili gen-gen tertentu, yang tersusun dalam pola kisi rapat pada permukaan kaca atau substrat lainnya.

Proses analisis dimulai dengan mengekstraksi mRNA dari sampel sel atau jaringan yang ingin dianalisis. mRNA kemudian ditranskripsi balik menjadi cDNA, yang berfungsi sebagai salinan dari ekspresi gen. cDNA ini diberi label dengan pewarna fluoresen yang berbeda untuk membedakan sampel yang berbeda dalam percobaan yang sama. Setelah label fluoresen ditambahkan, cDNA berlabel ini digunakan sebagai probe yang akan berikatan dengan fragmen DNA pada chip.

Ketika cDNA berlabel tersebut berikatan dengan DNA target di mikroarray, pola ikatan ini dapat dideteksi menggunakan

teknik pengukuran fluoresensi. Setiap titik pada mikroarray mewakili ekspresi dari gen tertentu, dan intensitas fluoresensi yang terdeteksi menunjukkan tingkat ekspresi gen tersebut dalam sampel. Pola titik yang dihasilkan memberikan informasi tentang lokasi gen-gen yang diekspresikan dalam sampel yang diuji, sehingga dapat membandingkan ekspresi gen antar sampel atau kondisi yang berbeda.



Gambar 11.5. DNA Mikroarray dalam Analisis Ekspresi Gen
 Sumber: (Alberts *et al.*, 2014)

Gambar 11.5 menyajikan skema prosedur kerja DNA mikroarray untuk menganalisis perbedaan ekspresi gen antara dua sampel sel yang berbeda—dalam hal ini, sel yang telah diobati dengan hormon dan sel yang tidak menerima perlakuan yang sama. Pada tahap awal, mRNA diekstraksi dari kedua sampel,

kemudian ditranskripsi balik menjadi cDNA yang diberi label dengan pewarna fluoresensi merah untuk satu sampel dan hijau untuk sampel lainnya. Selanjutnya, campuran cDNA berlabel diinkubasi dengan mikroarray, memungkinkan hibridisasi dengan fragmen DNA spesifik yang terikat pada array. Setelah tahap inkubasi, array dicuci dan dianalisis menggunakan pemindai fluoresensi.

Hasil fluoresensi memberikan gambaran ekspresi gen spesifik dalam kedua kondisi. Bintik merah menunjukkan bahwa gen pada sampel 1 diekspresikan lebih tinggi dibandingkan sampel 2, sedangkan bintik hijau menunjukkan ekspresi yang lebih tinggi pada sampel 2 dibandingkan sampel 1. Bintik kuning menandakan ekspresi gen yang relatif setara di kedua sampel, sementara bintik gelap mengindikasikan ekspresi yang sangat rendah atau tidak terdeteksi. Intensitas fluoresensi yang dihasilkan merefleksikan jumlah relatif RNA yang diekspresikan dari setiap gen dalam array. Dalam ilustrasi ini, hanya sebagian kecil mikroarray yang ditampilkan, mewakili 110 gen.

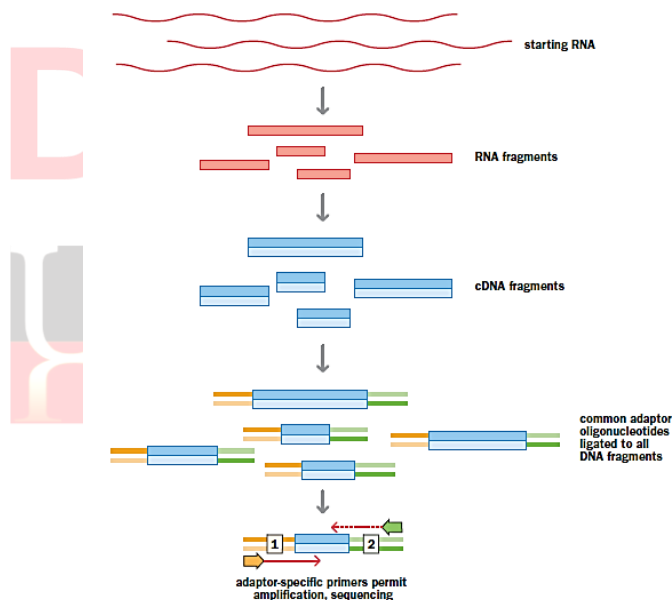
4. RNA-sequencing (RNA-seq)

Dalam RNA sequencing, sampel cDNA disekuensing untuk mengidentifikasi gen-gen yang diekspresikan. Meskipun disebut RNA sequencing, yang diurutkan sebenarnya adalah cDNA, bukan RNA langsung.

Metode RNA-Seq dimulai dengan mengonversi RNA input menjadi fragmen cDNA menggunakan beberapa pendekatan. Salah satu metode yang umum digunakan adalah sintesis cDNA melalui enzim *reverse transcriptase*, yang memanfaatkan primer oligo(dT) untuk menargetkan mRNA yang memiliki ekor poli-A, atau primer *random hexamer* untuk menghasilkan cDNA dari berbagai jenis RNA. Setelah sintesis untai pertama cDNA, untai RNA dalam hibrida RNA-DNA didegradasi oleh RNase H, sehingga hanya tersisa untai DNA tunggal. Selanjutnya, DNA polimerase (misalnya DNA polymerase I atau Klenow fragment) digunakan untuk menyintesis untai DNA kedua, menghasilkan DNA untai ganda yang kemudian difragmentasi.

Sebagai alternatif, RNA dapat difragmentasi terlebih dahulu sebelum dikonversi menjadi cDNA. Metode fragmentasi RNA yang umum digunakan mencakup hidrolisis kimiawi dan nebulisasi mekanik. Fragmen RNA yang dihasilkan kemudian dikonversi menjadi DNA untai tunggal oleh *reverse transcriptase* dan selanjutnya disintesis menjadi cDNA untai ganda.

Setelah sintesis cDNA, oligonukleotida adaptor dilekatkan pada ujung fragmen untuk memfasilitasi amplifikasi dan sekuensing. Amplifikasi dilakukan menggunakan primer yang spesifik terhadap adaptor, memungkinkan analisis lebih lanjut dengan metode sekuensing throughput tinggi berbasis *adaptor-ligation* PCR. Untuk mempertahankan informasi terkait "strandedness" RNA (kemampuan membedakan transkrip sense dan antisense), adaptor oligonukleotida yang berbeda dapat dipasang pada kedua ujung fragmen cDNA. Salah satu pendekatan umum adalah penggunaan adaptor berbentuk cabang (*Y-shaped adaptors*), yang memungkinkan identifikasi orientasi transkrip dengan lebih akurat (**Gambar 11.6**).



Gambar 11.6 Skema Metode RNA-Sequencing Dalam Analisis Ekspresi Gen

Hasil sekuensing kemudian dianalisis untuk menyusun urutan cDNA yang lengkap. Dua pendekatan utama dapat digunakan, yaitu dengan memetakan fragmen ke genom referensi spesies yang sesuai atau menggunakan metode *de novo* assembly untuk menggabungkan fragmen-fragmen yang memiliki sekuens tumpang tindih. Pendekatan *de novo* assembly sangat berguna ketika genom referensi tidak tersedia, memungkinkan identifikasi transkriptom yang lebih luas serta penemuan transkrip baru yang belum terdokumentasi.

C. Perbandingan Metode pada Analisis Ekspresi Gen

Masing-masing metode analisis ekspresi gen memiliki keunggulan dan keterbatasannya masing-masing. **Tabel 11.1** merangkum perbandingan antar metode yang telah dibahas sebelumnya berdasarkan keunggulan dan kelemahannya.

Tabel 11.1. Perbandingan Antar Metode Analisis Ekspresi Gen

Metode	Keunggulan	Kelemahan
RT-PCR	○ Sensitivitas tinggi, cepat, dan spesifik dalam mendeteksi mRNA dengan primer spesifik.	○ Kuantifikasi terbatas, biasanya menghasilkan data kualitatif. Namun, jika menggunakan RT-qPCR, data kuantitatif dapat diperoleh. ○ Bergantung pada desain primer yang tepat.
Northern blotting	○ Memberikan informasi ukuran transkrip mRNA dan tingkat ekspresi gen.	○ Proses rumit, memakan waktu, dan kurang sensitif dibandingkan RT-PCR.
DNA mikroarray	○ Memungkinkan analisis multiplex dan <i>high-throughput</i> ○ Memberikan gambaran komprehensif mengenai ekspresi gen.	○ Sensitivitas terbatas, biaya tinggi, dan potensi kesalahan interpretasi data (misalnya, hasil sinyal yang tumpang tindih).

Metode	Keunggulan	Kelemahan
RNA-sequencing	- o Resolusi tinggi, informasi lengkap tentang transkrip, varian, dan level ekspresi. - o Kuantifikasi ekspresi gen yang akurat, dengan kemampuan untuk mendeteksi varian dan isoform gen.	- o Biaya yang tinggi, analisis data rumit, dan waktu persiapan lama. - o Membutuhkan kapasitas komputasi yang tinggi untuk menganalisis data besar, serta keterampilan bioinformatika.



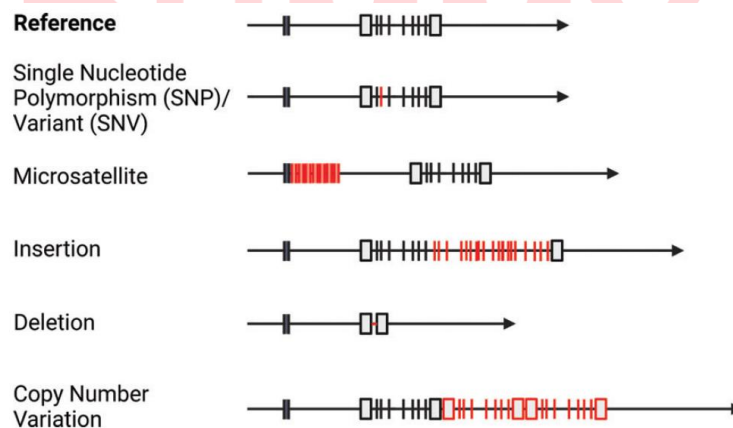
BAB 12

GENOTYPING

A. Prinsip Dasar Genotyping

Genotyping merupakan teknik molekuler yang digunakan untuk mendeteksi dan menganalisis variasi genetik dalam DNA individu. Teknik ini bertujuan mengidentifikasi perbedaan kecil dalam urutan genetik, yang dapat memberikan informasi penting mengenai fenotipe, termasuk karakteristik unik individu dan kecenderungan genetik terhadap penyakit tertentu. Melalui genotyping, perbedaan komposisi genetik ditentukan dengan membandingkan urutan DNA individu dengan urutan dari sampel lain atau referensi standar.

Polimorfisme genetik, terutama *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), merupakan salah satu variasi genetik yang paling banyak dipelajari dalam genotyping. Polimorfisme ini merujuk pada variasi urutan DNA yang ada pada lebih dari 1% populasi dan berperan penting dalam analisis hubungan antara gen dan fenotipe, termasuk kecenderungan terhadap penyakit.



Gambar 12.1 Jenis Variasi Genetik

Sumber: (Kockum, 2023)

Gambar 12.1 mengilustrasikan berbagai jenis variasi genetik. Setiap anak panah mewakili bentangan DNA atau kromosom,

dengan varian genetik digambarkan sebagai garis vertikal dan daerah pengapit diwakili oleh kotak. Alel referensi, yang berfungsi sebagai standar, biasanya diperoleh dari basis data ilmiah seperti NCBI atau Ensembl, yang dibandingkan dengan alel varian. Nukleotida alternatif atau yang telah mengalami perubahan ditandai dengan garis merah. Berbagai jenis variasi genetik yang ditampilkan diantaranya adalah:

1. SNP: merupakan variasi genetik di mana satu nukleotida, seperti adenin (A), menggantikan nukleotida lain, misalnya sitosin (C).
2. Mikrosatelit: menunjukkan urutan berulang yang terdiri dari beberapa nukleotida, seperti urutan tiga nukleotida yang berulang beberapa kali dan sering digunakan dalam analisis identifikasi individu.
3. Penyisipan: menggambarkan segmen DNA kecil yang dimasukkan ke lokasi baru, sedangkan hilangnya segmen DNA di lokasi asal disebut sebagai penghapusan.
4. Variasi jumlah salinan (*Copy Number Variation*, CNV): menunjukkan segmen DNA yang lebih besar, terkadang gen utuh, yang telah disalin beberapa kali dan disisipkan di samping lokasi aslinya, sehingga muncul dalam bentuk duplikat, triplikat, atau lebih banyak lagi salinan.

Dampak variasi genetik bergantung pada lokasi variasi tersebut, yang umumnya dibagi menjadi varian pengkode dan non-pengkode. Varian pengkode terletak di ekson dan dapat mengubah urutan asam amino, yang berpotensi memengaruhi struktur dan fungsi protein. Sebaliknya, varian non-pengkode mencakup berbagai jenis variasi. Misalnya, variasi pada intron dapat memengaruhi proses *splicing* dan menentukan ekson mana yang akan diterjemahkan, sehingga menghasilkan protein dengan karakteristik yang berbeda. Selain itu, variasi pada daerah promotor atau enhancer dapat mengubah tingkat ekspresi gen tertentu, memengaruhi jumlah protein yang dihasilkan. Sementara itu, variasi pada RNA kecil non-pengkode (seperti miRNA atau siRNA) dapat memengaruhi regulasi translasi protein.

Tabel 12.1. Sejumlah Istilah Terkait Genotyping

Istilah	Definisi
Allel	Varian dalam urutan gen. Allel dapat dikategorikan berdasarkan frekuensinya (allel minor/utama) atau kecocokannya dengan genom referensi (allel referensi/alternatif).
Autosom	Kromosom non-seksual yang terdapat pada organisme, yang tidak terkait dengan penentuan jenis kelamin.
Genotipe	Kombinasi alel pada individu untuk varian DNA tertentu, dimana satu alel diwarisi dari setiap orang tua.
Varian DNA	Salah satu dari beberapa versi dari urutan DNA tertentu.
Drift genetik	Mekanisme evolusi berupa fluktuasi acak dalam frekuensi alel tertentu dalam populasi, yang terutama berdampak pada populasi kecil yang terisolasi dan dapat mengurangi keragaman genetik dalam populasi tersebut.
<i>Genome-wide association study (GWAS)</i>	Studi yang menyelidiki asosiasi genetik antara polimorfisme di seluruh genom dengan suatu sifat tertentu.
Haplotipe	Kombinasi varian alel yang cenderung diwariskan bersama.
Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)	HWE menyatakan bahwa variasi genetik dalam populasi akan tetap konstan antar generasi jika perkawinan acak terjadi dalam populasi besar yang tidak terganggu.
<i>Single-nucleotide polymorphisms (SNPs)</i>	Perubahan pasangan basa tunggal dalam DNA yang terjadi di tempat tertentu dalam genom.
Sex-linked	Suatu sifat dikendalikan oleh gen atau polimorfisme pada salah satu kromosom seks.
Heterozigot	Ketika seorang individu membawa dua alel berbeda pada posisi tertentu dalam genom.
Homozigot	Ketika seorang individu membawa dua alel identik pada posisi tertentu dalam genom.
Hibridisasi	Proses dua molekul DNA beruntai tunggal komplementer bergabung melalui ikatan hidrogen.
<i>Whole exome sequencing (WES)</i>	Teknik pengurutan genetik yang fokus pada sekuensing seluruh ekson dalam genom.
<i>Whole genome sequencing (WGS)</i>	Teknik pengurutan genetik yang mencakup seluruh genom organisme, termasuk semua bagian DNA, baik yang mengkode (ekson) maupun yang tidak mengkode (introns, wilayah pengatur, dan bagian lainnya).

Istilah	Definisi
<i>Linkage disequilibrium</i> (LD)	Asosiasi non-acak antara alel pada dua atau lebih lokus genetik yang terletak berdekatan di dalam suatu genom.
Lokus	Lokasi fisik atau tempat dari gen tertentu pada kromosom.
Mikrosatelit	Sekumpulan urutan DNA pendek yang diulang secara berurutan pada lokus tertentu di kromosom, disebut juga <i>Short Tandem Repeat</i> (STR).
Oligonukleotida	Urutan DNA atau RNA pendek, biasanya kurang dari 20 pasang basa (bp).

B. Metode Genotyping

1. DNA restriction-based genotyping

Salah satu metode genotyping berbasis enzim restriksi adalah *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Metode ini telah digunakan untuk genotyping sejak tahun 1970-an hingga 1980-an. Prinsip RFLP ini mirip dengan RFLP-PCR yang telah dijelaskan sebelumnya pada Bab 4, namun pada RFLP tidak ada tahapan PCR setelah pemotongan DNA dengan enzim restriksi. Tahapan dalam RFLP hanya mencakup isolasi DNA, pemotongan dengan enzim restriksi, dan elektroforesis gel.

2. PCR-based genotyping

Metode PCR-based genotyping melibatkan penggunaan primer khusus yang dirancang untuk mengenali dan memperbanyak urutan DNA yang mengandung variasi genetik, seperti polimorfisme nukleotida tunggal (SNP), pengulangan tandem pendek (STR), atau delesi/insersi (indel). Setelah amplifikasi, produk PCR dapat dianalisis untuk mengidentifikasi jenis alel yang ada, memungkinkan untuk menentukan genotipe individu pada lokus tertentu.

TaqMan-PCR merupakan salah satu contoh metode genotyping yang banyak digunakan untuk menentukan genotipe kandidat SNP. Dalam metode ini, daerah sepanjang 100-150 bp di sekitar SNP yang diinginkan diamplifikasi dengan PCR menggunakan dua probe spesifik alel yang berlabel fluoresensi

berbeda. Ketika DNA polimerase melepaskan DNA selama ekstensi, label fluoresensi dilepaskan, menghasilkan sinyal fluoresensi yang dapat dideteksi. Dengan cara ini, dua alel alternatif dapat dideteksi secara bersamaan. TaqMan-PCR merupakan metode kuantitatif yang dapat digunakan untuk mengukur variasi jumlah salinan dengan membandingkan jumlah salinan target dengan referensi yang diketahui. Contoh lain dari PCR-based genotyping adalah metode qPCR dan RFLP-PCR, yang sudah dibahas pada Bab sebelumnya.

3. Hybridization-based genotyping

Dalam konteks genotyping, hibridisasi merujuk pada proses di mana urutan DNA spesifik berpasangan dengan urutan komplementer untuk mendeteksi dan menganalisis variasi genetik pada individu. Teknik ini memanfaatkan prinsip pasangan basa komplementer, di mana adenin (A) berpasangan dengan timin (T), dan sitosin (C) berpasangan dengan guanin (G).

Teknik ini mengidentifikasi urutan DNA tertentu yang berpasangan dengan probe yang telah dilabeli, memungkinkan deteksi varian genetik dengan sensitivitas tinggi. Salah satu teknik hibridisasi yang paling umum dalam genotyping adalah DNA mikroarray, yang memungkinkan analisis multiplex dengan mendeteksi ribuan varian genetik secara simultan.

Penerbitan & Percetakan

UNP PRESS

BAB 13

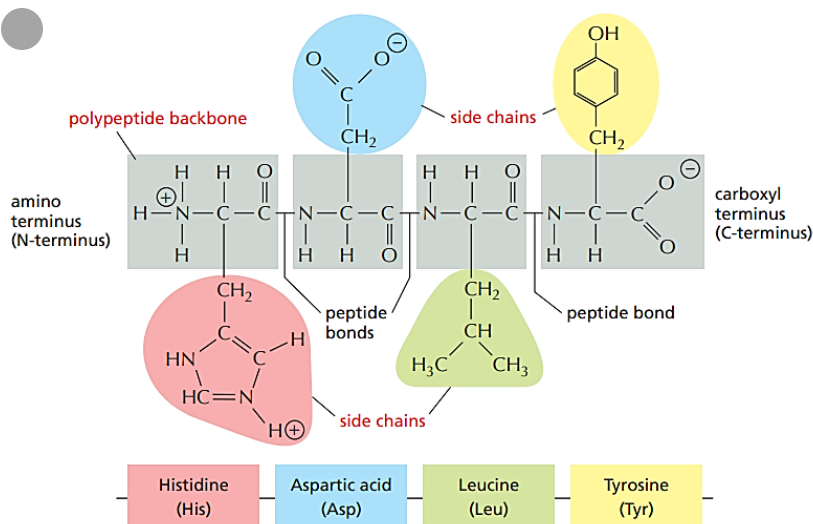
TEKNIK ISOLASI PROTEIN

A. Struktur Protein

Protein adalah makromolekul yang terdiri dari monomer berupa 20 jenis asam amino berbeda. Setiap jenis asam amino ini memiliki sifat kimia yang unik, yang menentukan struktur dan fungsi protein secara keseluruhan. Antar asam amino dihubungkan oleh ikatan peptida kovalen, sehingga protein disebut juga sebagai polipeptida, dan rantai asam aminonya disebut rantai polipeptida. Setiap rantai polipeptida terdiri dari rangka (*backbone*) yang terbentuk dari urutan berulang atom inti ($-N-C-C-$) yang ditemukan pada setiap asam amino. Kedua ujung setiap asam amino berbeda secara kimia, satu ujung memiliki gugus amino ($-NH_2$ pada pH netral, atau $-NH_3^+$ pada pH rendah), dan ujung lainnya memiliki gugus karboksil ($-COOH$ pada pH netral, atau $-COO^-$ pada pH tinggi). Setiap rantai polipeptida memiliki arah, di mana ujung yang membawa gugus amino disebut ujung amino (N-terminus), dan ujung yang membawa gugus karboksil disebut ujung karboksil (C-terminus).

Protein biasanya terdiri dari beberapa ratus asam amino, dimana urutannya dibaca dari N-terminus ke C-terminus. Selain itu, terdapat rantai samping asam amino yang merupakan bagian dari asam amino yang tidak terlibat dalam pembentukan ikatan peptida, namun memberi sifat khas pada setiap asam amino. Beberapa rantai samping bersifat nonpolar dan hidrofobik, beberapa bermuatan negatif atau positif, beberapa dapat reaktif secara kimia, dan lainnya.

Gambar 13.1 merepresentasikan sebuah polipeptida pendek yang terdiri dari empat residu asam amino. Kerangka utama polipeptida disimbolkan dengan kotak abu-abu, sementara rantai sampingnya digambarkan sesuai dengan sifat kimianya: nonpolar (hijau), polar tak bermuatan (kuning), dan bermuatan negatif (biru). Variasi sifat kimiawi rantai samping ini menentukan interaksi intra- dan intermolekuler dalam protein, yang pada akhirnya memengaruhi struktur dan fungsinya.



Gambar 13.1. Skema Struktur Protein (Rantai Polipeptida)

Sumber: (Alberts *Et Al.*, 2022)

Berdasarkan strukturnya, protein dapat dibedakan dalam empat tingkatan diantaranya:

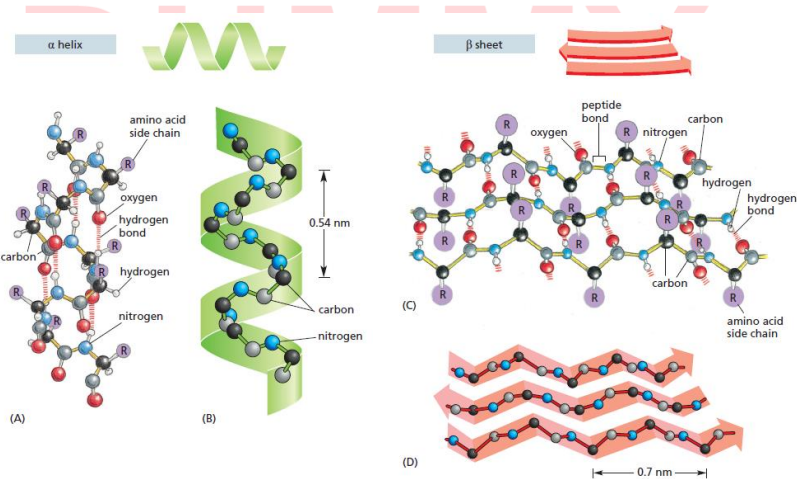
1. Struktur Primer

Struktur primer protein merujuk pada urutan residu asam amino yang menyusun rantai polipeptida, yang ditentukan oleh urutan kodon dalam mRNA selama proses translasi. Urutan ini menentukan komposisi serta proporsi asam amino dalam protein. Residu asam amino dalam struktur primer dihubungkan oleh ikatan peptida, yang bersifat kaku dan planar akibat adanya resonansi antara ikatan karbonil ($-C=O$) dan gugus amina ($-NH$). Resonansi ini menghasilkan karakter ikatan rangkap parsial pada ikatan peptida, sehingga membatasi rotasi di sekitar ikatan karbon-nitrogen dan memengaruhi struktur protein pada tingkat yang lebih tinggi.

2. Struktur Sekunder

Struktur sekunder protein terbentuk oleh ikatan hidrogen dalam rantai polipeptida yang menyebabkan rantai terlipat dan melingkar dalam dua konformasi berbeda yang dikenal sebagai heliks- α (α -helix) atau lembaran berlipit- β (β -pleated sheet).

(**Gambar 13.2**). Heliks- α berbentuk spiral tunggal dan dibentuk oleh ikatan hidrogen antara setiap asam amino keempat. Sementara lembaran berlipit- β terbentuk melalui ikatan hidrogen antara dua atau lebih rantai polipeptida yang berdekatan. Proporsi struktur sekunder dalam protein bervariasi, dengan beberapa protein memiliki hingga 70% struktur sekunder yang teratur, sementara yang lain memiliki sedikit atau tidak ada.

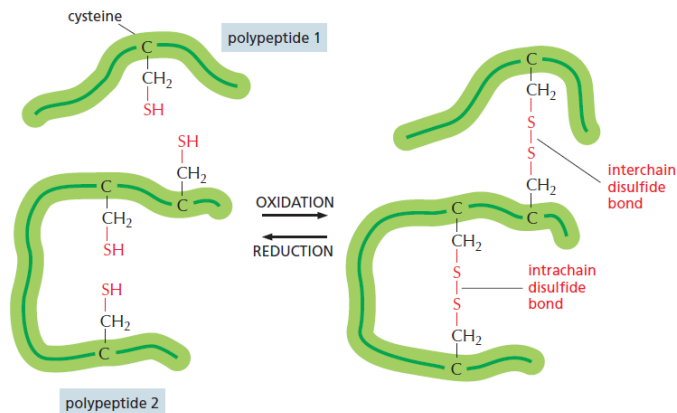


Gambar 13.2. Skema Konformasi Rangka Polipeptida Dalam Bentuk A-Helix (A,B) Dan B-Pleated Sheet (C,D)

Sumber: (Alberts *Et Al.*, 2022)

3. Struktur Tersier

Struktur tersier merujuk pada lipatan keseluruhan rantai polipeptida menjadi bentuk tiga dimensi. Struktur ini distabilkan oleh interaksi seperti gaya tarik elektrostatis antara gugus ionik bermuatan berlawanan (gugus amino dan gugus karboksil), gaya van der Waals yang lemah, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan, dalam beberapa protein, jembatan disulfida ($-S-S-$) yang terbentuk melalui oksidasi gugus sulfidril ($-SH$) pada residu sistein yang berdekatan secara spasial (**Gambar 13.3**). Lipatan tiga dimensi ini menyebabkan bagian dalam protein sebagian besar terdiri dari residu asam amino hidrofobik non-polar, sementara residu hidrofilik yang terionisasi dan polar ditemukan di bagian luar molekul. Struktur tersier sangat penting untuk fungsi protein.

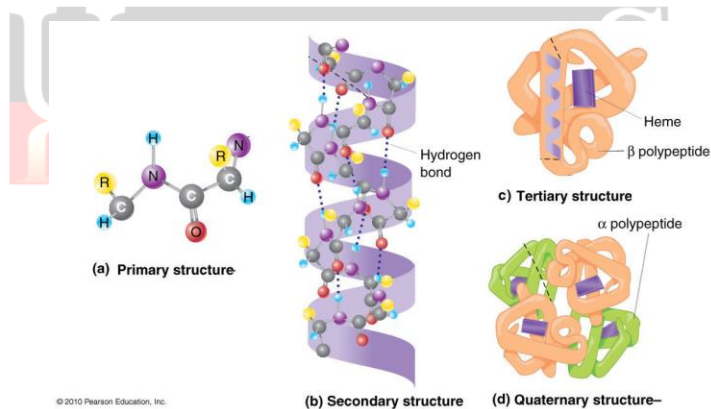


Gambar 13.3. Skema Pembentukan Ikatan Disulfida (Jembatan Disulfida) Dalam Protein

Sumber: (Alberts *Et Al.*, 2022)

4. Struktur Kuarterner

Struktur kuartener ditemukan pada protein oligomerik, yaitu protein yang terdiri dari dua atau lebih rantai polipeptida (subunit) yang berinteraksi untuk membentuk kompleks fungsional. Interaksi antar-subunit distabilkan oleh berbagai gaya non-kovalen, termasuk gaya elektrostatik, ikatan hidrogen, gaya van der Waals, serta interaksi hidrofobik. Pada beberapa protein, jembatan disulfida juga dapat berperan dalam memperkuat struktur kuartener, baik dengan menghubungkan residu dalam satu subunit (intra-rantai) maupun antar-subunit (antar-rantai).



Gambar 13.4. Empat Tingkatan Struktur Protein

B. Prinsip Dasar Isolasi Protein

Isolasi protein merupakan tahap krusial dalam studi identifikasi, fungsi, struktur, dan interaksi protein. Proses ini bertujuan untuk memperoleh protein dengan kemurnian tinggi melalui beberapa tahapan yang terstruktur. Isolasi dimulai dengan ekstraksi protein dari sel menggunakan teknik lisis, homogenisasi, dan sentrifugasi, diikuti dengan tahap pemurnian dan analisis. Selama proses ini, perlu diperhatikan kondisi lingkungan agar integritas dan aktivitas biologis protein tetap terjaga, dengan menghindari paparan asam, alkali, suhu tinggi, serta gangguan mekanis yang berlebihan.

Sumber protein yang digunakan beragam, termasuk mikroorganisme, tumbuhan, dan hewan. Dalam studi modifikasi pasca-translasi dan ekspresi protein, sering digunakan sel mamalia yang dikultur, jaringan mamalia, atau sel primer. Ekstraksi protein dari jaringan mamalia memerlukan metode penghancuran enzimatik dan/atau mekanis yang lembut untuk memisahkan sel dari matriks jaringan, sementara sel mamalia yang dikultur cukup dilisis menggunakan reagen berbasis deterjen. Sebaliknya, mikroorganisme seperti bakteri dan ragi memiliki dinding sel yang lebih kuat sehingga memerlukan perlakuan enzimatik atau mekanis tambahan untuk memungkinkan ekstraksi protein yang efektif.

C. Metode Isolasi Protein

Isolasi protein dapat dibagi menjadi 3 bagian utama, yaitu:

1. Lisis dan ekstraksi

Tahap awal isolasi protein melibatkan penghancuran membran sel untuk melepaskan isi sel secara terkendali, menghasilkan homogenat atau ekstrak seluler yang mengandung berbagai biomolekul, termasuk protein, enzim, dan organel bermembran (**Gambar 13.5**). Diantara metode umum yang digunakan dalam tahap ini meliputi:

- a. Sonikasi (*Sonication*): menggunakan gelombang ultrasonik untuk memecah suspensi sel, menciptakan getaran yang merusak membran sel. Metode ini efektif untuk

mikroorganisme tetapi menghasilkan panas yang signifikan, sehingga diperlukan pendinginan untuk mencegah denaturasi protein.

- b. Lisis sel berbasis deterjen (*Detergent-based lysis*): menggunakan deterjen seperti Triton X-100, NP-40, atau sodium deoxycholate untuk melisiskan membran sel dengan cara melarutkan lipid bilayer. Untuk dinding sel bakteri yang lebih tebal, dapat ditambahkan lisozim untuk meningkatkan efisiensi lisis.
- c. Homogenisasi cair (*Liquid homogenization*): sering digunakan untuk sampel volume kecil atau sel yang dikultur. Pada metode ini, suspensi sel atau jaringan dipaksa melewati ruang sempit, yang menggeser dan merusak membran sel. Beberapa jenis metode homogenisasi cair antara lain:
 - 1) *Potter-Elvehjem homogenizer*: menggunakan pestle PTFE (polytetrafluoroethylene) yang berputar di dalam tabung kaca tebal untuk menghancurkan sel secara mekanis.
 - 2) *French press*: menggunakan piston untuk memberikan tekanan tinggi pada sampel yang mendorong sampel melalui lubang kecil di dalam alat untuk menghasilkan homogenat.

2. Pemisahan

Setelah lisis, ekstrak sel mengandung campuran protein, asam nukleat, lipid, dan komponen lain. Untuk memisahkan protein dari material lain, digunakan teknik seperti:

- a. Sentrifugasi diferensial: memisahkan fraksi berdasarkan perbedaan densitas dan ukuran.
- b. Filtrasi membran: menggunakan pori-pori selektif untuk memisahkan protein dari partikel besar lainnya.



Gambar 13.5. Berbagai Metode yang Digunakan dalam Pelisisan Sel: 1) Sonikasi, 2) Lisis Sel Berbasis Larutan, 3) Metode French Press, 4) Metode Potter-Elvehjem Homogenizer

Sumber: (Alberts *et al.*, 2014)

3. Pemurnian protein

Homogenat yang diperoleh masih mengandung berbagai kontaminan. Oleh karena itu, tahap pemurnian diperlukan untuk memperoleh protein dengan kemurnian tinggi berdasarkan sifat fisikokimia seperti kelarutan, muatan, ukuran, dan afinitas.

4. Pengendapan protein

a. Penggaraman (*salting-out*)

Penggaraman adalah metode pemisahan protein berdasarkan perbedaan kelarutan dalam larutan garam. Pada konsentrasi garam rendah, kelarutan protein meningkat (*salting-in*), tetapi pada konsentrasi tinggi, kelarutan menurun sehingga protein mengendap (*salting-out*). Proses ini terjadi karena ion-ion garam, seperti SO_4^{2-} dan NH_4^+ dari amonium sulfat, menarik molekul air yang sebelumnya menghidrasi protein, menyebabkan agregasi dan presipitasi. Efektivitas penggaraman bergantung pada pH larutan, dengan hasil optimal dicapai saat pH berada di sekitar titik isoelektrik

protein. Karena setiap protein memiliki hidrofilitas dan ukuran molekul yang berbeda, pengendapan dapat dilakukan secara bertahap dengan mengatur konsentrasi garam secara selektif.

b. Pengendapan titik isoelektrik

Pengendapan protein pada titik isoelektrik terjadi ketika pH larutan disesuaikan hingga mencapai titik isoelektrik protein, di mana muatan totalnya menjadi netral. Pada kondisi ini, gaya tolak-menolak antar molekul protein berkurang secara signifikan, sehingga kelarutannya menurun dan protein mengendap. Metode ini sering dikombinasikan dengan penggaraman untuk meningkatkan efisiensi pemisahan protein dengan kemurnian lebih tinggi.

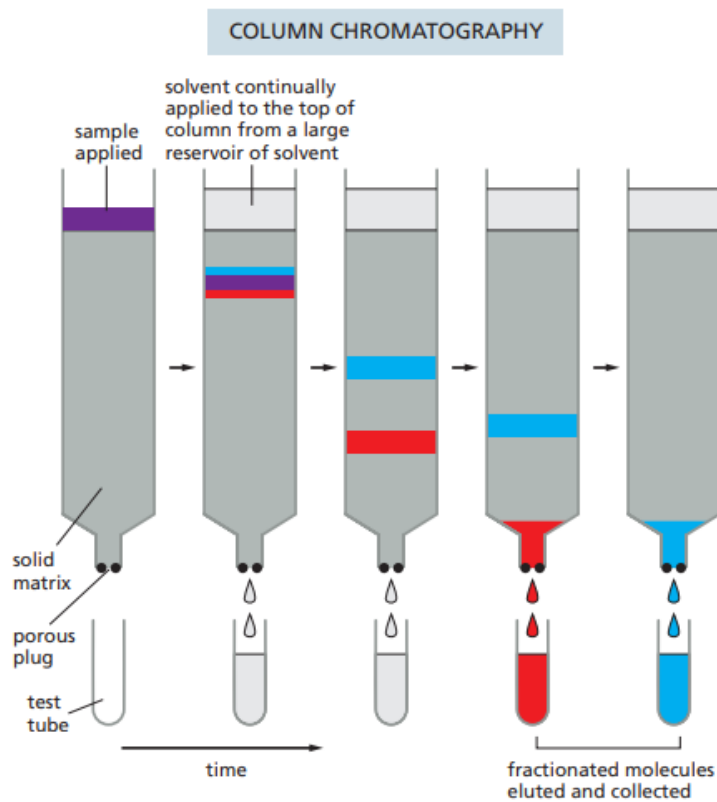
c. Pengendapan dengan Pelarut Organik

Penggunaan pelarut organik seperti metanol, etanol, atau aseton dapat menurunkan kelarutan protein dalam larutan berair, sehingga mendorong terjadinya pengendapan. Metode ini lebih selektif dibandingkan penggaraman karena memanfaatkan perbedaan kelarutan protein dalam berbagai pelarut. Namun, proses ini harus dilakukan pada suhu rendah untuk mencegah denaturasi protein yang dapat mengurangi aktivitas biologisnya.

5. Kromatografi

Kromatografi kolom merupakan metode utama dalam pemurnian protein. Teknik ini melibatkan pemisahan campuran protein berdasarkan interaksinya dengan matriks padat yang dimuat dalam kolom silinder. Larutan yang mengandung campuran protein dimasukkan ke bagian atas kolom, kemudian dialirkan bersama pelarut dalam jumlah besar. Setiap protein akan berinteraksi secara berbeda dengan matriks, menyebabkan variasi dalam kecepatan pergerakannya di sepanjang kolom, sehingga memungkinkan pemisahan berdasarkan sifat spesifiknya (**Gambar 13.6**).

Efektivitas kromatografi kolom sangat bergantung pada jenis matriks yang digunakan, yang dapat memisahkan protein berdasarkan muatan listrik, hidrofobisitas, ukuran molekul, atau afinitas terhadap gugus kimia tertentu. Meskipun komposisi matriks bervariasi, umumnya digunakan manik-manik mikroskopis (bead) berukuran 10–100 μm , yang terbuat dari bahan seperti silika, agarosa, atau polistiren. Manik-manik ini memberikan luas permukaan yang besar untuk interaksi protein-matriks, meningkatkan efisiensi pemisahan, dan memungkinkan tingkat pemurnian protein hingga 10.000 kali lipat.



Gambar 13.6. Skema Kromatografi Kolom

Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)

Berdasarkan jenis matriks yang digunakan, kromatografi kolom untuk pemurnian protein dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori utama:

a. *Ion-Exchange Chromatography* (pemisahan berdasarkan muatan)

Metode ini memanfaatkan matriks bermuatan positif (*anion-exchange*) atau negatif (*cation-exchange*) untuk memisahkan protein berdasarkan muatannya. Protein dengan muatan berlawanan akan berinteraksi dengan matriks, sementara protein dengan muatan serupa akan keluar lebih cepat dari kolom. Pemisahan dapat dikendalikan dengan menyesuaikan pH atau kekuatan ionik larutan eluen, yang memengaruhi stabilitas interaksi protein-matriks dan memungkinkan pelepasan protein secara bertahap.

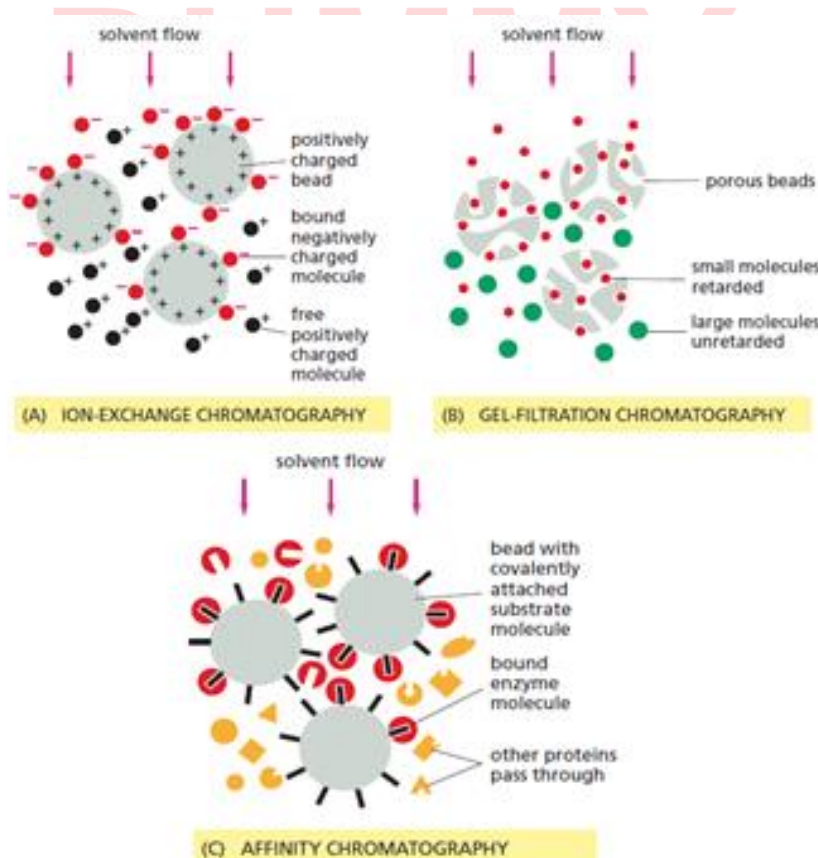
b. *Gel-Filtration Chromatography* (pemisahan berdasarkan ukuran)

Metode ini menggunakan matriks berpori untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran molekulnya. Protein berukuran kecil memasuki pori-pori matriks dan mengalami perlambatan migrasi (*retardasi*), sementara protein yang lebih besar tidak dapat memasuki pori-pori sehingga bergerak lebih cepat melalui kolom. Selain berfungsi sebagai teknik pemurnian, metode ini juga dapat digunakan untuk memperkirakan berat molekul protein dengan membandingkan waktu elusi terhadap standar protein dengan ukuran yang diketahui.

c. *Affinity Chromatography* (pemisahan berdasarkan afinitas)

Teknik ini memanfaatkan interaksi spesifik antara protein target dan ligan yang terikat secara kovalen pada matriks. Ligan dapat berupa antibodi, substrat enzim, atau molekul lain yang memiliki afinitas tinggi terhadap protein tertentu. Protein yang berikatan dengan matriks akan tertahan di dalam kolom, sementara protein lain akan dielusi lebih awal. Pelepasan protein target dapat dilakukan dengan mengubah kondisi lingkungan, seperti pH, atau dengan menambahkan larutan kompetitor seperti garam berkonsentrasi tinggi.

Meskipun prinsip pemisahannya berbeda, ketiga metode kromatografi ini memiliki kesamaan utama, yaitu penggunaan fase padat (matriks) dalam kolom kaca dan fase bergerak berupa larutan penyangga, seperti Phosphate Buffered Saline (PBS) atau Tris-Hydrochloride (Tris-HCl), yang membawa campuran protein melalui kolom. Fraksi protein yang terpisah kemudian dikumpulkan untuk analisis lebih lanjut.



Gambar 13.7. Tiga Jenis Kromatografi Kolom yang Memisahkan Antar Protein Melalui Perbedaan Sifatnya

Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)

BAB 14

ANALISIS PROTEIN

A. Metode Analisis Protein

Analisis protein berperan penting dalam memahami fungsi biologis, identifikasi penyakit, serta pengembangan terapi dan teknologi berbasis protein. Bab ini akan membahas empat metode analisis protein yang paling umum, diantaranya: spektrofotometri, *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), Western Blotting, dan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

1. Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah metode kuantitatif yang digunakan untuk mengukur konsentrasi protein dalam larutan berdasarkan penyerapan cahaya pada panjang gelombang tertentu. Prinsip ini mengikuti Hukum Lambert-Beer, yang menyatakan bahwa absorbansi cahaya berbanding lurus dengan konsentrasi zat penyerap dan panjang lintasan cahaya.

Protein umumnya menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm karena keberadaan asam amino aromatik seperti tirosin dan triptofan. Variasi kandungan kedua asam amino ini menyebabkan perbedaan nilai absorbansi antarprotein meskipun berat molekulnya sama. Selain itu, struktur tiga dimensi protein dan faktor lingkungan, seperti pH, suhu, dan kekuatan ionik, turut memengaruhi absorbansi. Misalnya, perubahan pH dapat menyebabkan protonasi atau deprotonasi residu tertentu, yang berdampak pada struktur dan interaksi antar-rantai samping, sehingga mengubah pola penyerapan cahaya UV.

Konsentrasi protein dalam larutan dapat dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Konsentrasi } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{A_{280}}{(\epsilon_{280} \times L)}$$

di mana:

- A₂₈₀ : absorbansi pada 280 nm.
 ϵ_{280} : koefisien absorbansi molar protein pada 280 nm ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$).
 L : panjang lintasan cahaya dalam spektrofotometer (cm)

Berbagai metode spektrofotometri telah dikembangkan untuk mengukur konsentrasi protein berdasarkan karakteristik penyerapan cahaya oleh asam amino tertentu. Setiap metode memiliki sensitivitas dan rentang konsentrasi yang berbeda, bergantung pada jenis protein dan kebutuhan analisis. Tabel 14.1 menyajikan perbandingan metode spektrofotometri yang umum digunakan dalam analisis protein. Pada tabel tersebut, semua metode menggunakan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai standar referensi dalam penentuan rentang konsentrasi. BSA dipilih karena sifatnya yang stabil dan kemampuannya menghasilkan data yang konsisten dalam pengukuran kuantitatif protein.

Tabel 14.1. Metode spektrofotometri yang umum digunakan dalam analisis protein

Type	Prinsip Dasar	Rentang Konsentrasi
UV Absorbance	Absorbansi maksimum pada 280 nm mencerminkan kontribusi tirosin, triptofan, dan sebagian sistein (melalui ikatan disulfida). Metode ini digunakan untuk analisis protein total.	50 – 2000 $\mu g/mL$ (BSA)
Biuret	Ion tembaga dalam reagen Biuret berikatan dengan rantai polipeptida dalam kondisi alkali, menghasilkan kompleks berwarna ungu dengan absorbansi pada 540 nm.	150 – 9000 $\mu g/mL$ (BSA)
Lowry	Tirosin, triptofan, dan sistein dalam protein mereduksi kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat dalam reagen Folin-Ciocalteu, menghasilkan warna biru. Absorbansi diukur pada 750 nm.	5 – 200 $\mu g/mL$ (BSA)
BCA (Bicinchoninic Acid)	Protein mereduksi ion Cu^{2+} dalam larutan alkali menjadi Cu^+ , yang kemudian bereaksi dengan BCA, menghasilkan kompleks berwarna ungu. Absorbansi diukur pada 560 nm.	20 – 2000 $\mu g/mL$ (BSA)
Bradford	Pewarna Coomassie Brilliant Blue G-250	10 – 2000

Tipe	Prinsip Dasar	Rentang Konsentrasi
	berikatan dengan residu basa dan aromatik pada protein, menyebabkan pergeseran absorbansi dari 465 nm menjadi 595 nm. Absorbansi pada 595 nm digunakan untuk kuantifikasi.	$\mu\text{g/mL}$ (BSA)

Berikut adalah contoh langkah-langkah dalam analisis protein menggunakan metode Bradford:

a. Persiapan reagen Bradford

Reagen Bradford mengandung pewarna Coomassie Brilliant Blue G-250, yang berikatan dengan protein melalui interaksi elektrostatis dan hidrofobik. Ikatan ini menyebabkan perubahan warna larutan dari coklat kemerahan menjadi biru, dengan intensitas yang bergantung pada jumlah protein dalam sampel.

b. Persiapan sampel dan standar protein

Seri larutan standar protein, seperti BSA, disiapkan dalam berbagai konsentrasi (misalnya, 0, 10, 20, 40, 80, dan 100 $\mu\text{g/mL}$) untuk membuat kurva standar. Sampel protein yang akan dianalisis juga disiapkan dengan pengenceran yang sesuai, memastikan bahwa konsentrasi berada dalam rentang yang dapat terukur oleh spektrofotometer.

c. Pencampuran sampel dengan reagen

Sejumlah reagen Bradford ditambahkan ke masing-masing tabung yang berisi larutan standar dan sampel protein. Setelah pencampuran yang homogen, larutan diinkubasi selama 5–10 menit untuk memastikan pewarna berikatan dengan protein dalam sampel secara efektif.

d. Pengukuran absorbansi

Absorbansi setiap larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer. Pewarna yang berikatan dengan protein menghasilkan warna biru dengan

intensitas yang berbanding lurus dengan jumlah protein dalam sampel.

e. Pembuatan kurva standar

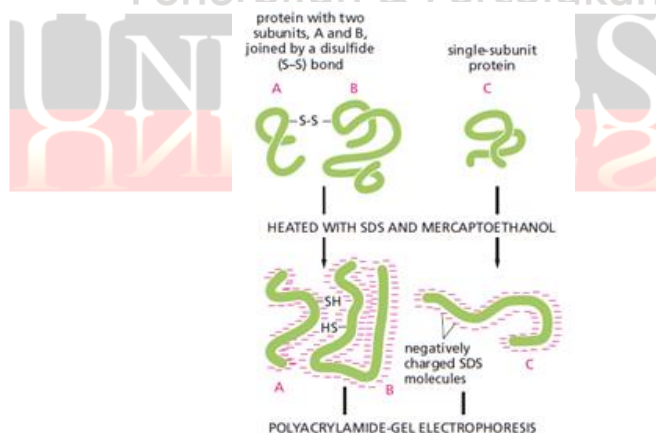
Grafik absorbansi terhadap konsentrasi larutan standar diplot untuk membentuk kurva standar. Persamaan garis dari kurva ini digunakan sebagai dasar perhitungan konsentrasi protein dalam sampel.

f. Perhitungan konsentrasi protein dalam sampel

Konsentrasi protein dalam sampel dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva standar. Hasil ini memberikan estimasi kuantitatif protein berdasarkan perbandingan dengan standar yang telah dibuat.

2. SDS *polyacrylamide-gel electrophoresis* (SDS-PAGE)

SDS-PAGE adalah teknik analisis protein yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Teknik ini memanfaatkan deterjen ionik SDS, yang mengganggu interaksi molekul hidrofobik dalam protein dan memberikan muatan negatif secara seragam pada struktur protein (**Gambar 14.1**). Proses ini memungkinkan protein dipisahkan bukan berdasarkan muatan atau pelipatan strukturalnya, melainkan berdasarkan ukuran molekulnya.



Gambar 14.1. Skema Cara Kerja SDS-PAGE

Protein memiliki struktur kompleks dengan muatan yang bervariasi, yang dapat memengaruhi pola migrasinya dalam gel. Untuk memastikan pemisahan hanya bergantung pada berat molekul, SDS digunakan bersama dengan agen pereduksi seperti dithiothreitol (DTT) atau β -merkaptotanol. Agen pereduksi ini berfungsi memutus ikatan disulfida (-S-S-) yang menghubungkan rantai polipeptida, sehingga protein terdenaturasi sepenuhnya menjadi rantai linier.

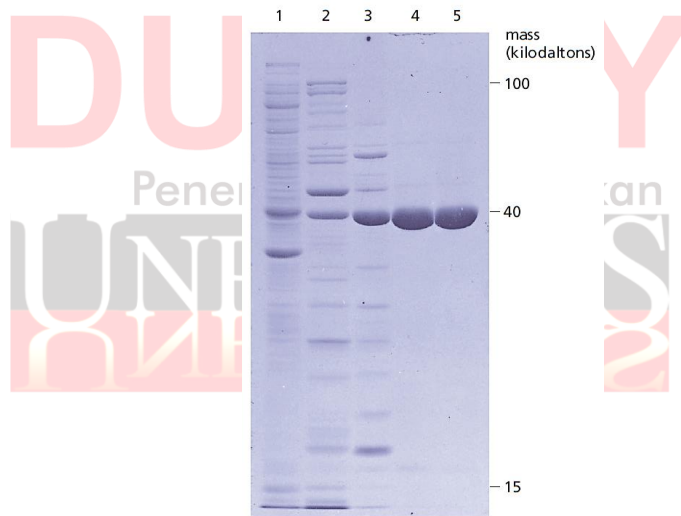
Protein selanjutnya dimuat ke dalam sumur pada gel poliakrilamida. Ketika arus listrik diterapkan, kompleks SDS-protein yang bermuatan negatif akan bergerak menuju elektrode positif. Molekul protein dengan ukuran yang berbeda akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda, sehingga mobilitas protein berbanding terbalik dengan ukuran molekulnya. Proses ini menghasilkan pemisahan protein dalam gel, yang kemudian terlihat sebagai pita-pita setelah dilakukan pewarnaan dengan larutan pewarna seperti Coomassie Brilliant Blue. Terdapat dua jenis SDS-PAGE, yaitu:

a. Elektroforesis gel poliakrilamida 1 dimensi (1D-PAGE)

Pada metode ini, sampel protein dipisahkan berdasarkan berat molekulnya. Setelah dimuat ke dalam sumur gel poliakrilamida, arus listrik diterapkan, menyebabkan protein bermigrasi melalui gel. Kecepatan migrasi bergantung pada kekuatan arus, durasi elektroforesis, dan konsentrasi gel, dengan protein berukuran lebih kecil bergerak lebih cepat dibandingkan yang lebih besar. Proses ini menghasilkan pita-pita pada gel, di mana posisi pita menunjukkan ukuran relatif protein, sementara intensitas dan ketebalannya mencerminkan kelimpahan protein dalam sampel. Berat molekul protein yang terpisah dapat ditentukan dengan membandingkan posisi pita dengan protein marker.

Gambar 14.2 menunjukkan hasil elektroforesis 1D-PAGE. Jalur 1 berisi campuran protein dari ekstrak sel awal, sementara jalur-jalur berikutnya menunjukkan protein

yang diperoleh setelah fraksinasi kromatografi dari sampel yang dianalisis pada jalur sebelumnya. Setiap jalur memuat jumlah total protein yang sama, yaitu 10 µg. Protein individual muncul sebagai pita-pita yang tajam dan berwarna, tetapi pita tersebut dapat melebar jika mengandung jumlah protein yang lebih banyak.



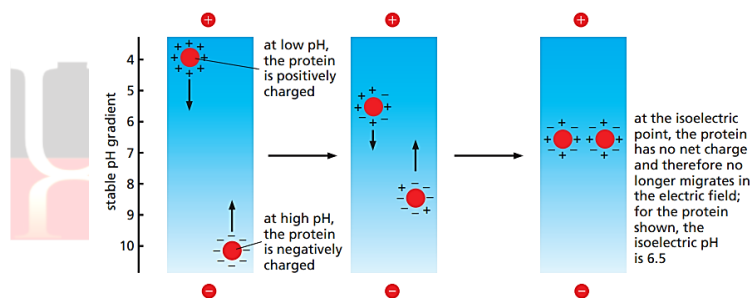
Gambar 14.2 Contoh Hasil Elektroforesis Gel Poliakrilamida 1 Dimensi (1D-PAGE)

Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)

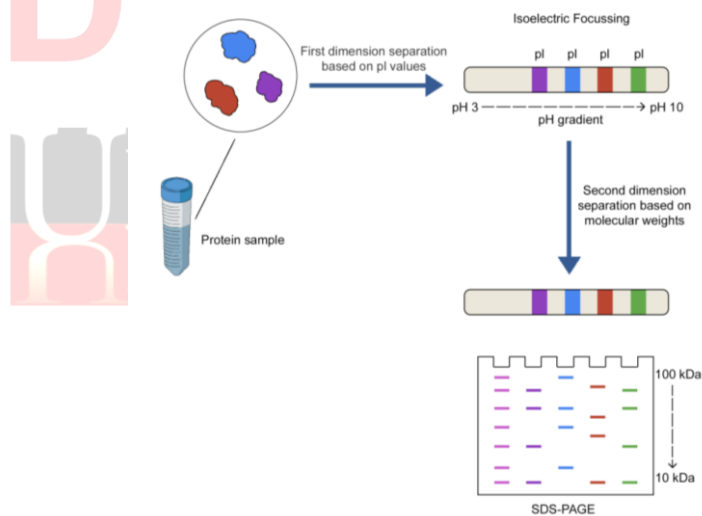
b. Elektroforesis gel poliakrilamida 2 dimensi (2D-PAGE)

Metode ini menggabungkan dua tahap pemisahan protein. Pada dimensi pertama, protein dipisahkan berdasarkan titik isoelektriknya (pI) menggunakan teknik pemfokusan isoelektrik (*isoelectric focusing*, IEF) (**Gambar 14.3**). Dalam tahap ini, protein bermigrasi sepanjang strip gel poliakrilamida dengan gradien pH tetap (biasanya menggunakan strip gradien pH terimobilisasi atau IPG strips). Selama IEF, protein akan bermigrasi hingga mencapai pH yang sesuai dengan titik isoelektriknya, di mana muatan bersih (*net charge*) protein menjadi nol dan migrasinya berhenti.

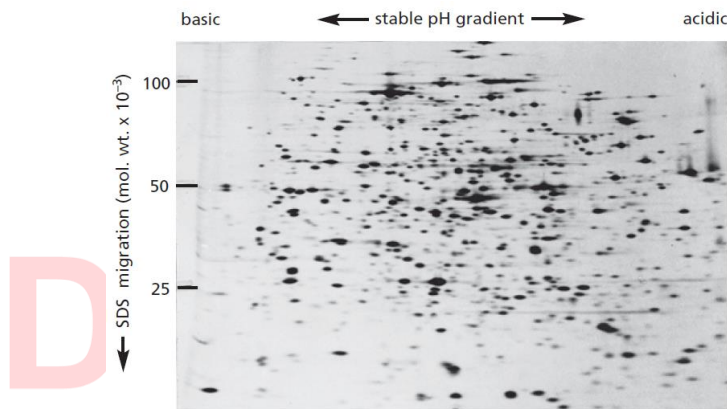
Dimensi kedua memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Setelah tahap IEF selesai, strip gel dari tahap pertama diletakkan secara horizontal di atas gel poliakrilamida untuk menjalankan pemisahan tahap kedua (**Gambar 14.4**). Hasil dari 2D-PAGE menghasilkan pola titik protein pada gel, yang masing-masing mewakili protein individu berdasarkan titik isoelektrik dan berat molekulnya. Metode ini sangat efektif untuk analisis protein kompleks karena memberikan resolusi pemisahan yang tinggi.



Gambar 14.3. Skema Pemisahan Protein Dengan Metode Pemfokusan Isoelektrik
Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)



Gambar 14.4. Skema Pemisahan Elektroforesis Gel Poliakrilamida 2 Dimensi (2D-PAGE)



Gambar 14.5. Contoh Hasil Elektroforesis Gel Poliakrilamida 2 Dimensi (2D-PAGE)

Sumber: (Alberts *et al.*, 2022)

3. Western Blotting

Western blotting adalah teknik berbasis antibodi yang digunakan untuk mendeteksi protein spesifik setelah pemisahan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida. Proses ini melibatkan transfer protein ke membran dan deteksi menggunakan antibodi spesifik yang dikonjugasikan dengan enzim atau fluorofor. Western blotting disebut juga immunoblotting karena memanfaatkan antibodi untuk mendeteksi antigen secara spesifik. Spesifisitas interaksi antibodi-antigen ini memungkinkan identifikasi protein target di tengah campuran protein yang kompleks.

Berikut adalah langkah umum metode Western blotting:

a. Pemisahan protein (gel Western blot)

Langkah pertama dalam prosedur Western blotting adalah memisahkan protein dalam sampel menggunakan elektroforesis gel SDS-PAGE.

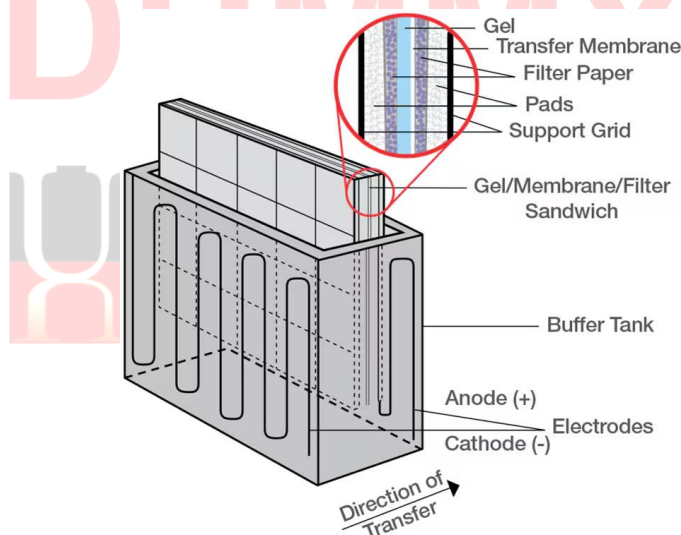
b. Pemindahan protein (blotting)

Protein yang telah dipisahkan kemudian dipindahkan (atau "diblotting") ke membran transfer, yang biasanya terbuat dari

nitroselulosa atau polivinilidena difluorida (PVDF). Beberapa teknik pemindahan dapat digunakan, termasuk pemindahan dengan difusi, blotting vakum, dan elektroblotting, di mana elektroblotting adalah metode yang paling umum digunakan karena efisiensinya dan kecepatannya.

Dalam elektroblotting, protein dipindahkan dengan menerapkan arus listrik pada sistem yang mengapit gel dengan membran transfer. Terdapat tiga metode elektroblotting yang umum digunakan:

- 1) Transfer basah (*wet transfer*): menggunakan volume buffer yang besar, memungkinkan efisiensi pemindahan tinggi, terutama untuk protein berukuran besar.
- 2) Transfer semi-kering (*semi-dry transfer*): memanfaatkan jumlah buffer yang lebih sedikit dan memiliki waktu pemindahan lebih singkat, tetapi kurang optimal untuk protein berukuran besar.
- 3) Transfer kering (*dry transfer*): tidak memerlukan buffer cair, sehingga lebih praktis, namun memiliki keterbatasan dalam fleksibilitas pemindahan protein.



Gambar 14.6. Skema Aparatus Elektroblotting Basah Untuk Transfer Protein pada Western Blotting

c. Pemblokiran membran

Oleh karena membran transfer memiliki afinitas tinggi terhadap protein, langkah pemblokiran penting untuk mencegah pengikatan non-spesifik dari protein yang tidak diinginkan. Pemblokiran dilakukan dengan merendam membran dalam larutan blok seperti bovine serum albumine (BSA) atau susu skim non-lemak, yang mengisi semua tempat pengikatan yang belum digunakan pada membran.

d. Pencucian membran

Setelah pemblokiran, membran dicuci untuk menghilangkan sisa reagen yang tidak terikat. Langkah pencucian yang tidak optimal dapat menyebabkan gangguan berupa sinyal latar belakang (sinyal non-spesifik), sementara pencucian berlebihan dapat mengurangi intensitas sinyal target. Oleh karena itu, durasi dan jumlah pencucian perlu dioptimalkan. Penyangga pencucian yang umum digunakan meliputi Tris-buffered Saline (TBS) dan Phosphate-buffered Saline (PBS), yang sering ditambahkan dengan Tween 20 untuk mengurangi ikatan non-spesifik, menghasilkan TBST (Tris-Buffered Saline with Tween) dan PBST (Phosphate-Buffered Saline with Tween).

e. Deteksi protein menggunakan antibodi

Western blotting menggunakan antibodi spesifik untuk mendeteksi protein target dengan dua pendekatan utama:

- 1) Deteksi langsung: antibodi primer dikonjugasikan langsung dengan enzim atau fluorofor untuk mendeteksi antigen.
- 2) Deteksi tidak langsung: antibodi primer mengenali antigen dan dideteksi oleh antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim atau fluorofor. Metode ini lebih sensitif karena memungkinkan amplifikasi sinyal.



Gambar 14.7. Perbandingan Metode Deteksi Langsung dan Tidak Langsung Pada Western Blotting

4. Analisis Western blotting

Beberapa metode digunakan untuk mendeteksi protein pada membran, di antaranya:

- Kolorimetri: enzim seperti horseradish peroxidase (HRP) atau alkaline phosphatase (AP) mengkatalisis reaksi yang menghasilkan perubahan warna, yang dapat diamati secara visual.
- Kemiluminesensi: enzim menghasilkan cahaya setelah bereaksi dengan substrat tertentu, memungkinkan deteksi dengan kamera CCD atau film X-ray.
- Fluoresensi: menggunakan antibodi berlabel fluorofor yang memancarkan cahaya saat terkena eksitasi cahaya dengan panjang gelombang tertentu, memungkinkan deteksi simultan beberapa protein dalam satu membran.
- Radioaktif: menggunakan antibodi berlabel isotop radioaktif yang dideteksi melalui film sinar-X. Metode ini kini jarang digunakan karena keterbatasan keamanan dan biaya.

Dalam aplikasinya, metode Western blotting digunakan untuk mempelajari berbagai aspek protein, seperti interaksi protein-DNA dalam regulasi transkripsi, interaksi protein-protein untuk memahami fungsi seluler, serta modifikasi pasca-translasi yang memengaruhi pelipatan protein dan terkait dengan penyakit. Selain itu, teknik ini juga digunakan untuk mendeteksi isoform protein yang diekspresikan dalam kondisi seluler yang berbeda, karakterisasi antibodi untuk memastikan kinerja dan keamanan,

serta pemetaan epitop untuk memahami interaksi antibodi dengan protein target dalam penelitian, diagnostik, dan terapi berbasis protein.

5. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

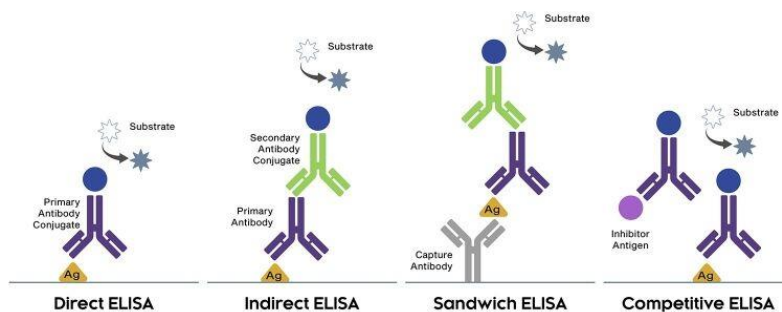
ELISA adalah teknik pengujian yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur zat terlarut seperti peptida, protein, antibodi dan hormon. Teknik ini juga dikenal dengan nama *Enzyme Immunoassay* (EIA), yang merujuk pada metode yang sama. Dalam ELISA, antigen (zat target) ditempelkan pada permukaan mikrotiter plate (mikroplat), kemudian dikombinasikan dengan antibodi yang sudah terikat pada enzim. Proses deteksi dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim setelah ditambahkan substrat, yang menghasilkan produk yang bisa diukur. Elemen kunci dari ELISA adalah interaksi antibodi-antigen yang sangat spesifik.

ELISA biasanya dilakukan dalam pelat polistirena dengan 96 sumur atau 384 sumur, yang secara pasif mengikat antibodi dan protein. Dengan reaktan ELISA yang diimobilisasi pada permukaan mikroplat, bahan yang terikat pada pelat dapat dengan mudah dipisahkan dari bahan yang tidak terikat selama pengujian. Meskipun terdapat berbagai metode ELISA, prinsip dasar yang digunakan tetap sama, yaitu:

- a. Pelapisan/penangkapan: Antigen diikatkan pada permukaan sumur mikroplat polistirena, baik secara langsung maupun tidak langsung.
- b. Pemblokiran pelat: Protein atau molekul lain ditambahkan untuk menutupi tempat pengikatan yang tidak terisi pada permukaan sumur mikroplat.
- c. Pemeriksaan/deteksi: Inkubasi dilakukan dengan antibodi yang spesifik dan memiliki afinitas tinggi terhadap antigen yang ingin dideteksi.
- d. Pengukuran sinyal: Sinyal yang dihasilkan dari label pada antibodi dideteksi untuk mengukur hasilnya.

Mirip dengan Western blotting, enzim yang paling umum digunakan dalam ELISA adalah horseradish peroxidase (HRP) dan alkaline phosphatase (AP). Enzim lain yang juga digunakan termasuk β -galaktosidase, asetilkolinesterase, dan katalase. Pemilihan substrat tergantung pada sensitivitas pengujian yang diperlukan dan jenis instrumen yang digunakan untuk deteksi sinyal, seperti spektrofotometer, fluorometer, atau luminometer. Berikut adalah beberapa jenis metode ELISA:

- a. ELISA langsung: menggunakan antibodi primer yang dilabeli enzim reporter, seperti HRP atau AP, yang bereaksi langsung dengan antigen. Deteksi dilakukan dengan antigen yang diimobilisasi langsung pada pelat uji atau menggunakan format uji penangkapan.
- b. ELISA tidak langsung: Pada metode ini, antibodi primer yang tidak berlabel mengikat antigen yang diimobilisasi pada pelat. Kemudian, antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim ditambahkan untuk mengenali antibodi primer. Antibodi sekunder ini memiliki spesifisitas terhadap antibodi primer.
- c. ELISA sandwich: Pelat ELISA dilapisi dengan antibodi penangkap yang mengikat protein target. Setelah sampel dimasukkan, antibodi ini menangkap protein target. Antibodi deteksi, yang terkonjugasi dengan enzim atau label, kemudian ditambahkan. Substrat ditambahkan untuk menghasilkan sinyal yang dapat diukur, berdasarkan interaksi dengan antibodi yang terikat enzim.
- d. ELISA kompetitif: Pada metode ini, sampel dan antigen kontrol bersaing untuk mengikat antibodi penangkap yang dilapisi pada pelat. Semakin banyak protein target yang ada dalam sampel, semakin sedikit situs yang tersedia untuk antigen berlabel, sehingga menghasilkan sinyal yang lebih lemah. Sinyal yang lebih lemah menunjukkan konsentrasi target yang lebih tinggi.



Gambar 14.8. Skema Perbandingan Berbagai Metode ELISA

B. Perbandingan Metode Analisis Protein

Metode analisis protein, seperti spektrofotometri, SDS-PAGE, Western blotting, dan ELISA, digunakan untuk tujuan yang berbeda, mulai dari pemisahan protein, kuantifikasi, hingga deteksi spesifik protein tertentu. Setiap metode memiliki prinsip dasar yang berbeda, serta kelebihan dan kelemahan masing-masing. Tabel 14.2 menyajikan perbandingan antar metode berdasarkan prinsip dasar, keunggulan, dan kelemahannya.

Tabel 14.2. Perbandingan Prinsip Dasar, Keunggulan dan Kelemahan Sejumlah Metode Analisis Protein.

Metode	Prinsip Dasar	Keunggulan	Kelemahan
SDS-PAGE	Menggunakan elektroforesis gel untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran molekul. Protein didenaturasi dengan SDS untuk memastikan muatan negatif secara seragam, memungkinkan pemisahan berdasarkan ukuran.	- Memungkinkan pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul. - Dapat memeriksa keberadaan atau kemurnian protein dalam sampel kompleks. - Bisa digunakan untuk menganalisis profil protein.	- Tidak memberikan informasi kuantitatif secara langsung. - Memerlukan teknik lanjutan seperti Western blotting untuk identifikasi protein spesifik.
Spektrofotometri	Mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu untuk mendeteksi	Cepat dan sederhana untuk analisis kuantitatif protein total.	Kurang spesifik karena hanya mendeteksi total protein.

Metode	Prinsip Dasar	Keunggulan	Kelemahan
	protein atau senyawa tertentu yang bereaksi dengan protein, menggunakan prinsip Beer-Lambert.	○ Tidak memerlukan banyak tahapan persiapan sampel. ○ Dapat dilakukan dalam volume kecil.	○ Hasil dapat dipengaruhi oleh interferensi, seperti keberadaan asam nukleat atau senyawa lain yang menyerap pada panjang gelombang yang sama.
Western blotting	Merupakan kombinasi SDS-PAGE dan imunodeteksi dengan antibodi untuk mengidentifikasi protein tertentu berdasarkan ukuran dan spesifisitasnya di dalam sampel.	○ Sangat spesifik untuk mendeteksi protein target berdasarkan ukuran dan ekspresi. ○ Memberikan informasi tentang ukuran molekul protein. ○ Memungkinkan analisis ekspresi protein dan modifikasi pasca-translasi.	○ Prosesnya cukup panjang dan rumit. ○ Memerlukan antibodi spesifik yang berkualitas dan teruji. ○ Waktu dan biaya yang tinggi.
ELISA	Menggunakan antibodi spesifik untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi protein target dalam sampel. Antigen diikat oleh antibodi yang terkonjugasi dengan enzim pelapor.	○ Sangat spesifik dan sensitif untuk mendeteksi protein tertentu. ○ Dapat memberikan hasil kuantitatif yang presisi. ○ Memungkinkan analisis banyak sampel sekaligus (<i>high throughput</i>).	○ Memerlukan antibodi spesifik yang berkualitas tinggi. ○ Prosesnya lebih kompleks dan membutuhkan waktu lebih lama. ○ Rentan terhadap interferensi dari komponen lain dalam sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., Rebecca, H., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Lewis, J., Wilson, J., & Hunt, T. (2022). *Molecular biology of the cell* (7th ed.). W. W. Norton & Company.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Essential cell biology* (7th ed.). Garland Science.
- Bertero, A., Brown, S., & Vallier, L. (2017). Methods of cloning. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 19–39). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803077-6.00002-3>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2022). The genetic information (I). In *Medical biochemistry* (2nd ed.). Academic Press.
- Boodhun, N. (2018). Protein analysis: Key to the future. *BioTechniques*, 64(5), 197–201. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0055>.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A., & Killian, D. J. (2021). *Concepts of genetics* (12th ed.). Pearson Education.
- Kockum, I., Huang, J., & Stridh, P. (2023). Overview of genotyping technologies and methods. *Current Protocols*, 3(4), e727. <https://doi.org/10.1002/cpz1.727>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Martin, K. C. (2021). *Molecular cell biology* (9th ed.). W. H. Freeman.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. J. C. C. A. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231–250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.11.001>
- Sari, R. M., Achyar, A. A., Ahda, Y., & Putri, D. H. (2022). Genotyping of Sumatera local variety of citrus using random amplified polymorphism DNA (RAPD) technique. *Tropical Genetics*, 2(2), 56–65. <https://doi.org/10.46742/tg.2022.v02i02.56>
- Sawant, R. C., Somkuwar, S. R., Luo, S. Y., Kamble, R. B., Panhekar, D. Y., Bhorge, Y. R., ... & Kader, S. A. (2023). Novel extraction

- and characterization methods for phytochemicals. In *Recent frontiers of phytochemicals* (pp. 63–84). Elsevier.
- Sharma-Kuinkel, B. K., Rude, T. H., & Fowler, V. G. (2016). Pulse field gel electrophoresis. In *The genetic manipulation of staphylococci: Methods and protocols* (pp. 117–130). Humana Press.
- Shi, D., Li, P., Ma, L., Zhong, D., Chu, H., Yan, F., ... & Yin, C. (2012). A genetic variant in pre-miR-27a is associated with a reduced renal cell cancer risk in a Chinese population. *PloS One*, 7(10), e46566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046566>
- Strachan, T., & Read, A. (2018). *Human molecular genetics* (5th ed.). Garland Science.
- Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Orr, R. B., & Campbell, N. A. (2021). *Campbell biology* (12th ed.). Pearson Higher Education.
- Weaver, R. (2012). *Molecular biology* (5th ed.). McGraw Hill.
- [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Genetics/Online_Open_Genetics_\(Nickle_and_Barrette-Ng\)/08%3A_Techniques_of_Molecular_Genetics/8.02%3A_Isolating_Genomic_DNA](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Genetics/Online_Open_Genetics_(Nickle_and_Barrette-Ng)/08%3A_Techniques_of_Molecular_Genetics/8.02%3A_Isolating_Genomic_DNA)
- <https://bitesizebio.com/13527/how-to-quality-control-check-your-rna-samples/>
- <https://byjus.com/neet/dna-polymerases/>
- <https://clinicalsci.info/real-time-pcr/>
- <https://gatescientific.com/technique-geeks-blog/f/agarose-gel-electrophoresis-troubleshooting-guide>
- <https://info.gbiosciences.com/blog/bid/201326/spectrophotometry-and-its-application-in-protein-estimation>
- <https://jascoinc.com/applications/protein-quantitation-spectrophotometer/>
- <https://seqwell.com/sanger-method-the-mp3-player-of-sequencing/>
- <https://www.aatbio.com/catalog/rna-purification-analysis>

<https://www.bio-rad.com/en-id/applications-technologies/sds-page-analysis>
<https://www.bio-rad.com/en-id/applications-technologies/what-gene-expression-analysis?ID=LUSNINKSY>
https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6201.pdf
<https://www.britannica.com/science/bacteria#/media/1/48203/102103>
<https://www.creativebiomart.net/resource/principle-protocol-real-time-quantitative-pcr-367.htm>
<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Gene-Expression>
<https://www.iitg.ac.in/cseweb/vlab/Bioscience/exp/2D%20gel%20electrophoresis%20of%20the%20egg%20proteins/index.html>
<https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:22c08d85:html:1>
<https://www.medicilon.com/press-events/protein-extraction-and-purification-techniques/>
<https://www.nature.com/scitable/content/outline-of-the-aflp-procedure-41047/>
https://www.researchgate.net/figure/General-schema-of-the-PCR-RFLP-markers-CAPS_fig21_238771667
https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/troubleshooting-pcr-and-rt-pcr-amplification?srsltid=AfmBOOpUNQjzyQH_TyWO1-e-5EtZ3bq03rGAF-jy9b9vCFOjQWgdlTIM
<https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/technical-documents/technical-article/genomics/dna-and-rna-purification/troubleshooting-rna-preparation?srsltid=AfmBOoo3w5Psr9VXRpj8U3NpJQf56-A0517hpK6W7B1elJxtpggV7vwi>
<https://www.southernbiotech.com/introduction-to-elisa/>
<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/western-blot-procedures-analysis-and-purpose-353918>
<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of->

molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-methods.html

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/na-electrophoresis-education/na-electrophoresis-troubleshooting.html>

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/restriction-enzymes/restriction-enzyme-troubleshooting-guide.html>

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/restriction-enzymes/restriction-enzyme-basics.html#ref>

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/cloning/traditional-cloning-basics.html>

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information.html>

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/genotyping-analysis-real-time-pcr-information/what-is-genotyping.html>

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html>

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/traditional-methods-cell-lysis.html>

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-western-blotting.html>

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>

<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/sequencing-basics/dna-sequencing-information.html>



GLOSARIUM

Istilah	Makna
Agen khelasi	Molekul yang dapat mengikat ion logam secara kuat, sering digunakan untuk menghilangkan logam berat atau dalam aplikasi biokimia.
Air DEPC-treated	Air yang telah diolah dengan dietilpirokarbonat (DEPC) untuk menonaktifkan enzim RNase, digunakan untuk eksperimen RNA.
Aliran elektroosmotik (EOF)	Aliran cairan melalui medium berpori akibat medan listrik.
Aminoasil-tRNA sintetase	Enzim yang mengkatalisis pengikatan asam amino ke tRNA spesifik, membentuk aminoasil-tRNA yang digunakan dalam translasi protein.
Analit	Komponen spesifik dalam sampel yang diukur atau dianalisis.
Anion	Ion bermuatan negatif yang dihasilkan dari penerimaan elektron.
Anoda	Elektrode positif tempat terjadi oksidasi dalam proses elektrokimia.
Antiparalel	Orientasi dua untaian DNA atau RNA yang berjalan dalam arah berlawanan (5' ke 3' pada satu untaian dan 3' ke 5' pada untaian lainnya).
Archaea	Mikroorganisme prokariotik unik yang memiliki karakteristik berbeda dari bakteri, sering ditemukan di lingkungan ekstrem.
CRISPR-Cas9	Sistem biologi molekuler yang berasal dari mekanisme pertahanan bakteri terhadap virus, digunakan sebagai alat untuk mengedit DNA secara spesifik.
Debris	Sisa atau partikel kecil dari bahan biologis atau lainnya yang tidak diinginkan dalam sampel.
Diasetilasi	Proses penambahan gugus asetil (-COCH ₃) ke suatu molekul, seperti protein, enzim, atau senyawa lainnya.

Istilah	Makna
Dimer primer	Struktur sekunder yang terbentuk ketika dua molekul primer (baik forward maupun reverse primer) saling berpasangan secara tidak spesifik melalui ikatan basa-basa nukleotida yang komplementer.
DNA genomik	DNA yang berasal dari seluruh genom organisme, termasuk ekson, intron, dan elemen regulator.
Dipol	Sistem yang terdiri dari dua muatan listrik berlawanan (positif dan negatif) yang terpisah oleh jarak tertentu.
Eksitasi	Proses di mana molekul menyerap energi dari foton, menyebabkan elektron berpindah ke keadaan energi yang lebih tinggi.
Elektroferogram	Grafik hasil analisis elektroforesis kapiler, yang menunjukkan pergerakan molekul (seperti DNA atau protein) berdasarkan waktu atau jarak sebagai fungsi dari medan listrik.
Elektroosmotik (EOF)	Fenomena aliran cairan yang diinduksi oleh medan listrik melalui saluran sempit atau pori dalam bahan bermuatan. Biasanya diamati dalam teknik seperti elektroforesis kapiler.
Elusi	Proses pelepasan molekul target dari medium pemisahan, seperti kolom kromatografi.
Emisi	Pelepasan energi oleh molekul yang tereksitasi, biasanya dalam bentuk foton, ketika molekul kembali ke keadaan energi dasar atau lebih rendah.
Enhancer	Elemen regulasi DNA yang meningkatkan tingkat transkripsi gen yang berjarak jauh dari lokasi pengikatan RNA polimerase.
Enzim cellulase	Enzim yang memecah selulosa menjadi glukosa atau oligosakarida.
Enzim lisozim	Enzim yang memecah peptidoglikan dalam dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan

Istilah	Makna
	lisis sel.
Enzim nuklease	Enzim yang memecah asam nukleat (DNA atau RNA) dengan memotong ikatan fosfodiester.
Enzim pektinase	Enzim yang mengkatalisis pemecahan pektin, komponen utama dinding sel tanaman.
Fase air	Lapisan cair yang terdiri dari air atau larutan berbasis air yang terpisah selama proses ekstraksi.
Fase eksponensial	Tahap awal dalam reaksi rantai polimerase (PCR) ketika amplifikasi DNA berlangsung secara logaritmik.
Fase organik	Fase yang mengandung pelarut organik, biasanya cairan yang tidak larut dalam air (seperti kloroform, eter, atau fenol).
Fase plateau	Tahap akhir dalam reaksi berantai polimerase (PCR) atau proses eksponensial lainnya, di mana tingkat amplifikasi produk target tidak lagi meningkat secara signifikan meskipun siklus PCR dilanjutkan.
Fenol	Senyawa kimia organik yang digunakan dalam ekstraksi asam nukleat untuk memisahkan protein dari DNA atau RNA.
Fenomena wobble	Fenomena pada pasangan basa kodon-antikodon di mana nukleotida ketiga kodon dapat berpasangan tidak secara ketat, memungkinkan fleksibilitas dalam pengikatan tRNA.
Förster resonance energy transfer (FRET)	Proses transfer energi antara dua fluorofor, di mana energi eksitasi dari molekul donor ditransfer ke molekul akseptor (quencher) jika keduanya berada pada jarak yang sangat dekat, digunakan untuk studi interaksi molekuler.
Fluoresen	Sifat suatu zat untuk menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu dan memancarkan cahaya pada panjang

Istilah	Makna
	gelombang lain.
Fluorometer	Alat yang digunakan untuk mengukur fluoresensi suatu sampel, biasanya untuk menentukan konsentrasi molekul fluoresen atau mempelajari sifat optiknya.
Fosfat anorganik	Molekul fosfat yang tidak terikat dengan karbon organik, biasanya dilepaskan dalam reaksi biokimia.
Foton	Partikel dasar cahaya atau radiasi elektromagnetik, yang membawa energi tetapi tidak memiliki massa atau muatan.
Fraksinasi	Proses pemisahan komponen campuran (misalnya, molekul atau sel) berdasarkan ukuran, berat molekul, atau sifat lainnya.
Gaya sentrifugal	Gaya yang timbul akibat rotasi, mendorong benda menjauh dari pusat rotasi, digunakan dalam sentrifugasi untuk memisahkan komponen campuran.
Gaya van der Waals	Jenis gaya antarmolekul yang bersifat lemah dan terjadi akibat interaksi listrik antara molekul atau atom, termasuk molekul netral.
Gel strip	Pita tipis berbentuk lembaran yang mengandung gel polimer, biasanya berbasis poliakrilamida, yang digunakan dalam teknik isoelectric focusing (IEF) untuk memisahkan protein berdasarkan titik isoelektriknya (pI).
Gen housekeeping	Gen yang diekspresikan secara konstitutif di hampir semua jenis sel dalam organisme, terlepas dari kondisi lingkungan atau status perkembangan.
Gugus amida	Gugus fungsi yang mengandung ikatan karbonil ($C=O$) yang terhubung langsung dengan nitrogen. Rumus umumnya adalah $R-CO-NH_2$ (atau variasi dengan substituen).
Gugus amina	Gugus fungsi yang terdiri dari atom nitrogen yang terikat pada satu atau lebih

Istilah	Makna
	atom karbon melalui ikatan tunggal. Amina dapat berupa primer ($R-NH_2$), sekunder (R_2-NH), atau tersier (R_3-N).
Gugus imina	Gugus fungsi yang mengandung ikatan rangkap antara atom karbon dan nitrogen ($C=NH$), biasanya terbentuk sebagai hasil reaksi antara aldehyd atau keton dengan amonia atau amina primer.
Hibridisasi	Proses pengikatan spesifik antara untai DNA atau RNA komplementer, sering digunakan untuk mendeteksi sekuens target.
Hidrolisis	Reaksi kimia yang melibatkan pemecahan ikatan dalam molekul dengan menambahkan molekul air.
Homogenat	Suspensi yang dihasilkan dari penghancuran jaringan atau sel untuk memperoleh komponen seluler dalam bentuk homogen.
Homogenisasi	Proses menghancurkan jaringan atau sel untuk mendapatkan suspensi homogen dari komponen sel.
Ikatan nonkovalen	Interaksi kimia lemah yang tidak melibatkan pembagian elektron.
Imputasi genetik	Proses statistik yang digunakan untuk memperkirakan urutan genetik yang hilang atau tidak terdeteksi dalam data genetik seseorang berdasarkan informasi dari individu lain dengan data yang lebih lengkap atau referensi yang lebih besar, seperti basis data genom populasi.
In vitro	Eksperimen atau proses yang dilakukan di luar organisme hidup, biasanya dalam kondisi terkontrol seperti di laboratorium, menggunakan tabung reaksi, cawan petri, atau alat lainnya.
In vivo	Proses atau eksperimen yang dilakukan di dalam organisme hidup, seperti hewan atau manusia, untuk mempelajari efek biologis dalam kondisi alami.

Istilah	Makna
Interferensi RNA (RNAi)	Mekanisme biologis untuk menghambat ekspresi gen tertentu dengan menggunakan RNA kecil, seperti siRNA atau miRNA, untuk mendegradasi atau mencegah translasi mRNA target.
Intervening (intron)	Segmen DNA atau RNA yang tidak mengkode protein dan dipotong selama proses splicing pada pembentukan mRNA.
Ion logam divalen	Ion logam dengan muatan +2, seperti Ca^{2+} atau Mg^{2+} , yang penting dalam reaksi biokimia.
Isoelectric focusing (IEF)	Teknik elektroforesis yang memisahkan protein berdasarkan titik isoelektriknya dalam gradien pH.
Isopropanol	Alkohol yang sering digunakan dalam presipitasi asam nukleat karena kemampuannya mengendapkan DNA/RNA.
Isotop radioaktif	Bentuk elemen kimia yang tidak stabil, yang memancarkan radiasi saat meluruh untuk mencapai keadaan yang lebih stabil.
Jembatan disulfida	Ikatan kovalen yang terbentuk antara dua gugus tiol pada residu sistein dalam protein, yang membantu menjaga struktur protein.
Kation	Ion bermuatan positif yang terbentuk ketika atom atau molekul kehilangan satu atau lebih elektron.
Katoda	Elektrode negatif tempat terjadi reduksi dalam proses elektrokimia.
Keadaan dasar (ground state)	Kondisi energi terendah yang dimiliki oleh sebuah molekul atau atom sebelum menerima energi dari sumber eksternal.
Knockdown gen	Penurunan ekspresi gen secara sementara, biasanya menggunakan teknik RNA interference (RNAi).
Knockout gen	Penghapusan total atau inaktivasi permanen suatu gen untuk mempelajari fungsi biologisnya.
Kodon	Sekuens tiga nukleotida pada mRNA yang

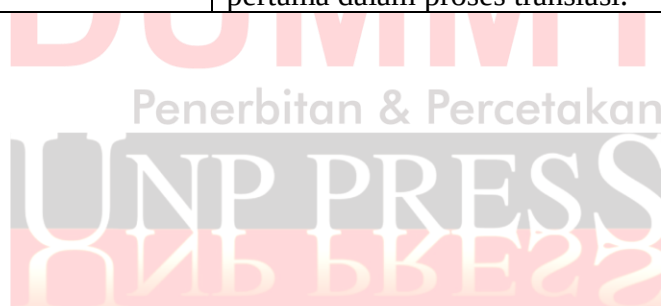
Istilah	Makna
	menentukan asam amino tertentu atau sinyal stop dalam translasi.
Kofaktor	Molekul non-protein yang diperlukan untuk aktivitas optimal suatu enzim.
Kolorimetri	Metode analisis untuk mengukur konsentrasi zat berdasarkan intensitas warna yang dihasilkan oleh reaksi kimia.
Konduktivitas	Kemampuan suatu larutan untuk menghantarkan listrik.
Kurva peleburan (melting curve)	Teknik yang digunakan dalam qPCR untuk mengevaluasi spesifisitas produk amplifikasi DNA dengan cara memanaskan produk amplifikasi secara bertahap sambil memantau perubahan fluoresensi.
Kuvet	Wadah kecil yang biasanya terbuat dari kaca atau plastik transparan yang digunakan dalam eksperimen laboratorium untuk menampung sampel cairan yang akan dianalisis.
Luminometer	Alat yang digunakan untuk mengukur cahaya (luminesen) yang dihasilkan dalam suatu reaksi kimia atau biokimia, biasanya sebagai hasil dari proses bioluminescence atau chemiluminescence.
Matriks	Medium tempat molekul terlarut atau komponen biologis ditempatkan untuk analisis.
Metilasi	Proses penambahan gugus metil pada molekul DNA, RNA, atau protein, yang dapat memengaruhi ekspresi gen atau fungsi biologis lainnya.
Metode dialisis	Teknik pemisahan molekul berdasarkan ukuran menggunakan membran semipermeabel untuk menghilangkan molekul kecil dari larutan.
Mikrosatelit	Segmen DNA pendek yang terdiri dari pengulangan tandem nukleotida, biasanya 2-6 pasangan basa, digunakan dalam analisis

Istilah	Makna
	genetik dan penanda molekuler.
Pelet	Material padat yang terkumpul di dasar tabung setelah sentrifugasi.
Peptidoglikan	Komponen utama dinding sel bakteri, terdiri dari polimer gula dan asam amino, memberikan kekuatan struktural.
Plasmid	Molekul DNA kecil berbentuk sirkular yang ditemukan di bakteri dan beberapa sel eukariotik, sering digunakan dalam rekayasa genetika.
Polimorfisme	Keberadaan dua atau lebih alel pada satu lokus genetik dalam suatu populasi dengan frekuensi yang signifikan, mencerminkan variasi genetik.
Post-staining	Teknik pewarnaan sampel setelah elektroforesis untuk memvisualisasikan molekul, seperti DNA.
Pseudouridilasi	Modifikasi pasca-transkripsi pada molekul RNA yang mengubah basa urasil (U) menjadi pseudourasil (Ψ) melalui proses enzimatik.
Primer	Fragmen pendek DNA atau RNA yang berfungsi sebagai titik awal untuk sintesis DNA.
Primer hexamer	Oligonukleotida pendek yang terdiri dari enam nukleotida dengan urutan acak, yang digunakan dalam sintesis cDNA untuk menginisiasi penyalinan RNA secara acak oleh reverse transcriptase.
Primer oligo(dT)	Sekuens pendek oligonukleotida yang terdiri dari rantai residu deoksitimidin (dT) yang berulang.
Priming	Proses persiapan untuk replikasi DNA dengan melekatkan primer pada templat DNA, memberikan titik awal bagi enzim seperti DNA polimerase.
Probe reporter	Molekul probe yang dilengkapi dengan label fluoresen yang memancarkan sinyal

Istilah	Makna
	cahaya saat bereaksi dengan target, digunakan untuk mendeteksi keberadaan atau jumlah target dalam reaksi.
Probe	Molekul pendek, biasanya DNA, RNA, atau oligonukleotida, yang dirancang untuk mengenali dan berikatan dengan urutan target spesifik melalui hibridisasi.
Promotor	Sekuens DNA yang berfungsi sebagai situs pengikatan untuk RNA polimerase dan faktor transkripsi untuk memulai transkripsi gen.
Proteom	Keseluruhan kumpulan protein yang diekspresikan oleh genom suatu organisme, sel, atau jaringan pada kondisi tertentu. Studi tentang proteom dikenal sebagai proteomik.
Proteomik	Studi tentang seluruh kumpulan protein yang diekspresikan oleh organisme, jaringan, atau sel pada kondisi tertentu.
Reaksi eksergonik	Reaksi kimia yang menghasilkan energi bebas, biasanya dalam bentuk panas, sehingga terjadi secara spontan.
Renaturasi	Proses pengembalian struktur heliks ganda DNA yang sebelumnya terdenaturasi.
Resuspensi	Proses melarutkan kembali pelet yang telah diendapkan ke dalam larutan.
Ribonuklease (RNase)	Enzim yang berfungsi mengkatalisis degradasi RNA dengan memutus ikatan fosfodiester di antara nukleotida.
Ribosom	Kompleks molekuler yang menjadi tempat sintesis protein dengan membaca urutan kodon pada mRNA.
Running buffer	Larutan yang digunakan dalam elektroforesis untuk menjaga pH dan konduktivitas yang stabil.
Sel primer	Sel yang langsung diambil dari organisme hidup dan belum melalui proses kultur atau manipulasi laboratorium yang ekstensif.

Istilah	Makna
Sentrifugasi	Proses pemisahan komponen campuran berdasarkan massa jenis dengan menggunakan gaya sentrifugal.
Sentrifugasi diferensial	Teknik pemisahan komponen-komponen dalam sampel biologis, seperti sel atau jaringan, berdasarkan perbedaan ukuran, bentuk, dan kepadatan dengan menggunakan sentrifugasi pada beberapa tahap kecepatan yang berbeda.
Serotipe	Klasifikasi organisme berdasarkan pola antigenik spesifik pada permukaannya.
Silencer	Elemen DNA yang menurunkan atau menghambat ekspresi gen dengan menghambat transkripsi.
Sintetase	Enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan molekul baru dengan energi dari ATP atau GTP.
Spektrofotometer	Alat yang digunakan untuk mengukur intensitas cahaya yang diserap oleh suatu sampel pada panjang gelombang tertentu.
Spektrometri massa	Teknik analisis yang mengukur massa molekul untuk mengidentifikasi dan mengkuantifikasi senyawa.
Splicesom	Kompleks molekuler dalam inti sel eukariotik yang bertanggung jawab untuk memotong intron dari pre-mRNA dan menyambung ekson, menghasilkan mRNA matang.
Splicing	Proses penghapusan intron (segmen non-coding) dari transkrip RNA primer, menyisakan ekson yang dirangkai bersama untuk membentuk RNA matang.
Studi epigenetik	Kajian tentang perubahan ekspresi gen yang diwariskan tanpa perubahan urutan DNA, seperti metilasi DNA atau modifikasi histon.
Substrat kromogenik	Molekul yang menghasilkan warna setelah bereaksi dengan enzim tertentu, digunakan

Istilah	Makna
	untuk mendeteksi aktivitas enzim secara visual.
TATA box	Sekuens DNA kaya timin dan adenin di promotor gen eukariotik yang menjadi titik pengenalan RNA polimerase dan faktor transkripsi.
Telomer	Struktur yang terletak di ujung kromosom eukariotik yang terdiri dari urutan DNA berulang, yang melindungi kromosom dari kerusakan atau penyusutan yang dapat terjadi selama pembelahan sel.
Thermal cycler	Alat yang digunakan untuk mengontrol siklus suhu dalam reaksi PCR.
Titik isoelektrik	pH di mana molekul, seperti protein, memiliki muatan total nol, sehingga tidak bergerak dalam medan listrik.
Transilluminator	Alat yang menghasilkan cahaya, biasanya ultraviolet, untuk visualisasi molekul fluoresen pada gel.
tRNA aminoasil	Molekul tRNA yang telah terikat dengan asam amino tertentu.
tRNA inisiator	Molekul tRNA yang membawa asam amino pertama dalam proses translasi.



INDEKS

1	gelembung replikasi · 30 Genotyping · 141
1D-PAGE · 161	
2	H Helikase · 30 Hybridization-based genotyping · 145
2D-PAGE · 163	
A	I <i>intervening</i> (intron) · 40
Agen khelasi · 53 Amplification refractory mutation system-PCR · 68 <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> -PCR · 73	K Kuantifikasi absolut · 95 Kuantifikasi relatif · 94
D	L <i>lagging strand</i> · 33 <i>leading stand</i> · 33 Ligasi · 116
deoksinukleotida trifosfat (dNTP) · 61 DNA <i>binding dyes</i> · 89 DNA restriction-based genotyping · 144 dogma sentral molekuler · 27	
E	M metode Sanger · 98 Mikrosatelit · 144 <i>Multiple Cloning Site</i> (MCS) · 114 Multiplex-PCR · 67
F	
fenol-kloroform · 130 Fraksinasi · 74	N <i>Nested</i> -PCR · 71 Northern Blotting · 133, 140
G	
garpu replikasi · 30 gel agarosa · 81, 82	

O

origin of replication · 29

P

PCR-based genotyping · 144
Penyambungan RNA (*splicing*) · 40
poly-A tail · 39
Pulsed-Field Gel Electrophoresis
(PFGE) · 81

Q

quantitative PCR · 87

R

Random Amplified Polymorphic DNA-
PCR · 69
Restriction Fragment Length
Polymorphism-PCR (RFLP-PCR) · 72
Reverse transcription PCR · 132
RT-qPCR · 140

S

salting-out · 152
SDS polyacrylamide-gel electrophoresis
(SDS-PAGE) · 160
SDS-PAGE · 160, 170, 171
Sel inang (host) · 115
semikonservatif · 28
single-strand binding proteins · 30
spektrofotometer · 60, 159, 169
Spektrofotometri · 157, 171

T

TaqMan-PCR · 144
Threshold Cycle · 94
Topoisomerase · 30
Transformasi · 118

U

untranslated region (UTR) · 39

TENTANG PENULIS



Prof. Dr. Yuni Ahda, M.Si. adalah dosen tetap pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Padang (UNP). Ia memperoleh gelar sarjana Biologi dari Universitas Andalas (UNAND) (1998), serta gelar magister dan doktor di bidang Biomedik dari Universitas Indonesia (1999 dan 2004). Beliau mengajar berbagai mata kuliah, seperti Genetika, Genetika Sel, Biologi Sel dan Molekuler, Teknik Biologi Molekuler, Bioteknologi, dan Filsafat Ilmu, dengan fokus penelitian pada bidang biomedis, biologi molekuler dan bioteknologi. Beliau pernah menjabat sebagai Ketua Program Studi S2 Pendidikan Biologi UNP (2011–2020) dan Wakil Dekan II FMIPA UNP (2019–2023). Saat ini, beliau menjabat sebagai Wakil Dekan I FMIPA UNP untuk periode 2023–2028. Beliau juga merupakan penulis buku *Bioremediasi: Kajian dari Aspek Lingkungan sampai Genetik* (Sukabina Press), serta kontributor dalam buku *Biokimia, Biologi Molekuler dan Aplikasinya dalam Bidang Kesehatan* (Mafy Media Literasi Indonesia). Email: ahdayuni@fmipa.unp.ac.id



Dr. Dwi Hilda Putri, M.Biomed. adalah dosen tetap pada Program Studi Biologi FMIPA UNP. Ia memperoleh gelar sarjana Biologi dari UNAND, serta gelar magister dan doktor di bidang Biomedik dari Universitas Indonesia. Fokus penelitiannya mencakup bidang biomedis, biologi molekuler dan bioteknologi. Beliau juga telah menulis beberapa buku, di antaranya *Panduan Pemeriksaan Laboratorium Mikrobiologi Infeksi Dengue* (Badan Penerbit FK-UI) dan *Evolusi Bermuatan ESQ dan Case Method* (Deepublish). Saat ini, beliau menjabat sebagai Ketua Departemen Biologi FMIPA UNP. Email: dwi_hildaputri@fmipa.unp.ac.id



Afifatul Achyar, M.Si. adalah dosen tetap pada program Studi Biologi FMIPA UNP. Ia memperoleh gelar sarjana Biologi dari Insititut Teknologi Bandung (2006), dan gelar magister bidang Bioteknologi dari institusi yang sama (2011). Beliau mengajar berbagai mata kuliah, seperti Teknik Biologi Molekuler, Biologi Sel, Genetika, Genetika Populasi, Genetika Manusia, Bioinformatika, Fisiologi Hewan, dan Kapita Selekta Biologi, dengan fokus penelitian pada bidang bioteknologi dan biologi molekuler. Beliau juga menjadi salah satu kontributor dalam buku *Biokimia, Biologi Molekuler dan Aplikasinya dalam Bidang Kesehatan*, yang diterbitkan oleh Mafy Media Literasi Indonesia. Email: afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id



Risa Ukhti Muslima, M.Si. mendapat gelar sarjana Biologi dari UNP (2016), dan gelar magister pada program studi yang sama dari UNAND (2020). Saat ini, ia berperan sebagai asisten riset di lingkungan UNP. Email: risaukhti99@gmail.com

Penerbitan & Percetakan
UNP PRESS

RINGKASAN ISI BUKU

Buku ini merupakan panduan yang dirancang untuk memberikan pemahaman menyeluruh tentang berbagai teknik dasar dalam biologi molekuler. Di dalamnya dibahas metode-metode penting seperti isolasi DNA, RNA, dan protein, polymerase chain reaction (PCR), sekuensing, elektroforesis, kloning molekuler, serta teknik lainnya yang menjadi fondasi utama dalam studi di bidang ini. Selain itu, konsep analisis ekspresi gen, genotyping, dan analisis protein juga diuraikan guna memperkaya pemahaman pembaca terhadap metode-metode yang banyak digunakan dalam riset biologi molekuler modern.

Dengan pendekatan yang menekankan pada pemahaman konsep dasar dan aplikasinya, buku ini diharapkan dapat menjadi referensi yang bermanfaat tidak hanya bagi mahasiswa, tetapi juga bagi peneliti pemula, tenaga laboratorium, dan siapa saja yang tertarik untuk mendalami dunia biologi molekuler secara lebih luas dan praktis.

