



PRINSIP DASAR BIOTEKNOLOGI MOLEKULER

DRH. RATNA ERMAWATI, M.SC.

Definisi Bioteknologi



- Bidang penerapan biosains dan teknologi yang menyangkut penerapan praktis organisme hidup atau komponen subselulernya pada industri jasa dan manufaktur serta pengelolaan lingkungan.
- Teknologi yang menggunakan sistem hayati (proses-proses biologi) untuk mendapatkan barang dan jasa yang berguna bagi kesejahteraan manusia

- 
- Bioteknologi memanfaatkan: bakteri, ragi, kapang, alga, sel tumbuhan atau sel hewan yang dibiakkan sbg konstituen berbagai proses industri.



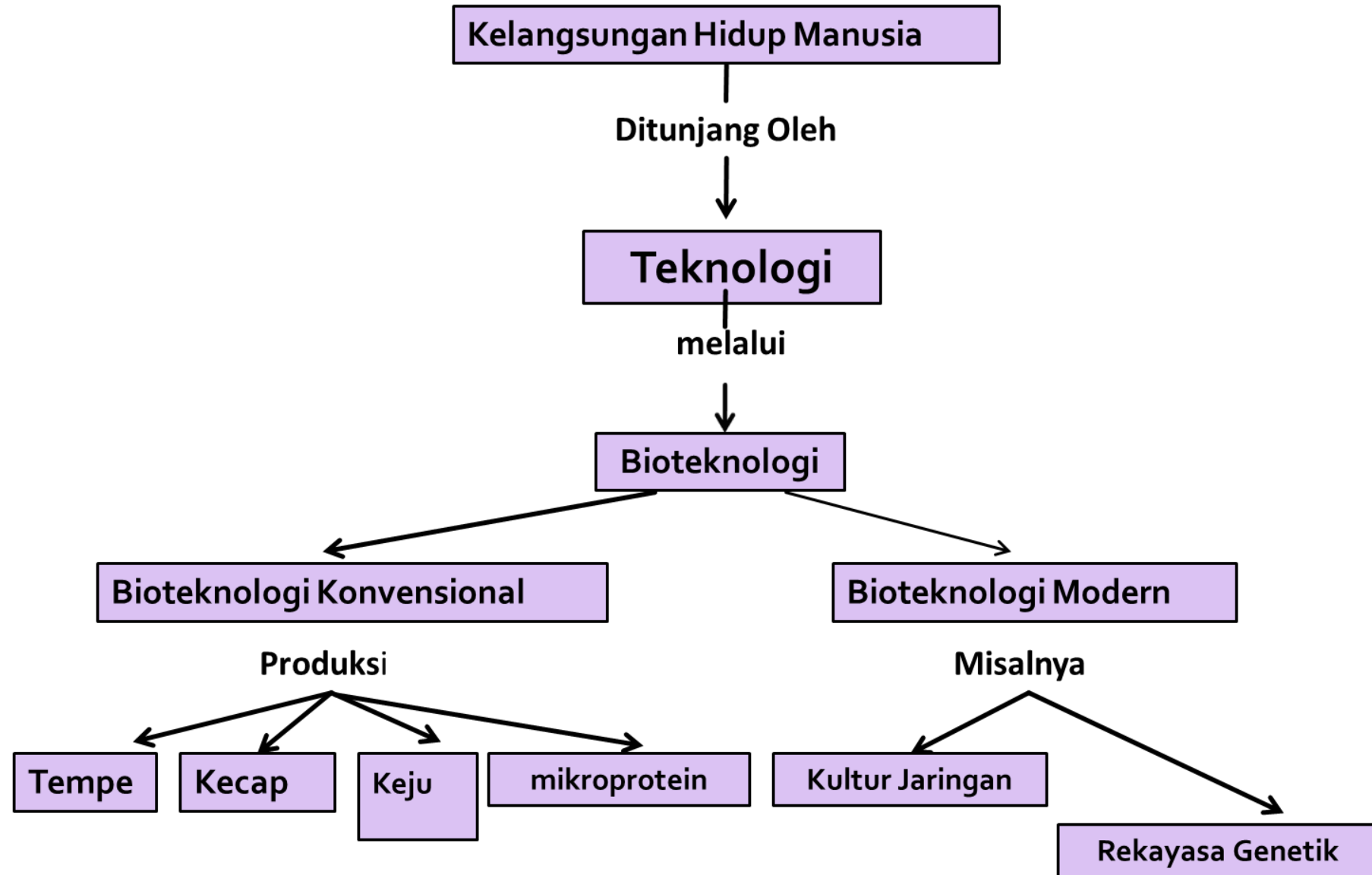
Sejarah Evolusi Bioteknologi

- produksi bioteknologi makanan dan minuman (sejak sebelum 4000sm) → nenek moyang kita telah memanfaatkan mikroba untuk membuat produk-produk berguna seperti tempe, oncom, tape, arak, terasi, kecap, yogurt, dan nata de coco .

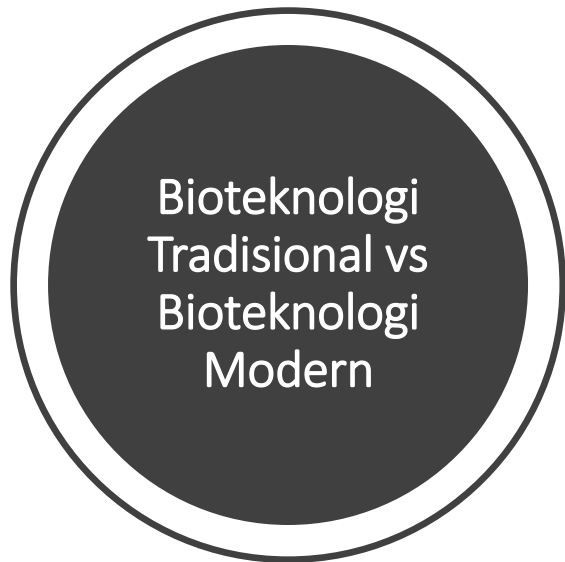


15 Contoh Penerapan Bioteknologi Pangan





- Hampir semua **antibiotik** berasal dari mikroba, demikian pula **enzim**-enzim yang dipakai untuk membuat sirup fruktosa hingga pencuci pakaian.
- Dalam bidang pertanian, mikroba penambat nitrogen telah dimanfaatkan sejak abad ke 19.
- Mikroba juga telah dimanfaatkan secara intensif untuk membersihkan dan mendekomposisi **limbah** dan **kotoran** selama berpuluh-puluh tahun.
- Dalam bidang medis, **vaksin**-vaksin tertentu dibuat dari virus atau bakteri yang telah dilemahkan.
- Bioteknologi memiliki gradien perkembangan teknologi, yang dimulai dari penerapan bioteknologi tradisional yang telah lama dan secara luas dimanfaatkan, hingga teknik-teknik bioteknologi baru dan secara terus menerus berevolusi



A. Tradisional

1. Memakai makhluk hidup scr langsung
2. Tanpa didasari prinsip ilmiah
3. Berdasarkan keteram-pilan yg diwariskan turun temurun
4. Tidak diproduksi scr masal

B. Modern

1. Memakai makhluk hi-dup dan komponen-nya scr langsung
2. Menggunakan prinsip-prinsip ilmiah
3. Hasil pengkajian berbagi disiplin ilmu yg mendalam
4. Diproduksi secara masal

Peningkatan Biaya



Bioteknologi Modern

Genomik

Rekayasa Genetika Hewan

Rekayasa Genetika Tanaman

Rekayasa Genetika Mikroba

DNA Rekombinan

Produksi Antibodi Monoklonal

Tranfer Embrio pada Binatang

Kultur Jaringan

Biologi Kontrol

Biofertilizer

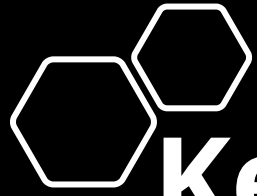
Biodekomposer

Fermentasi Mikroba

Bioteknologi Tradisional

Peningkatan Efisiensi



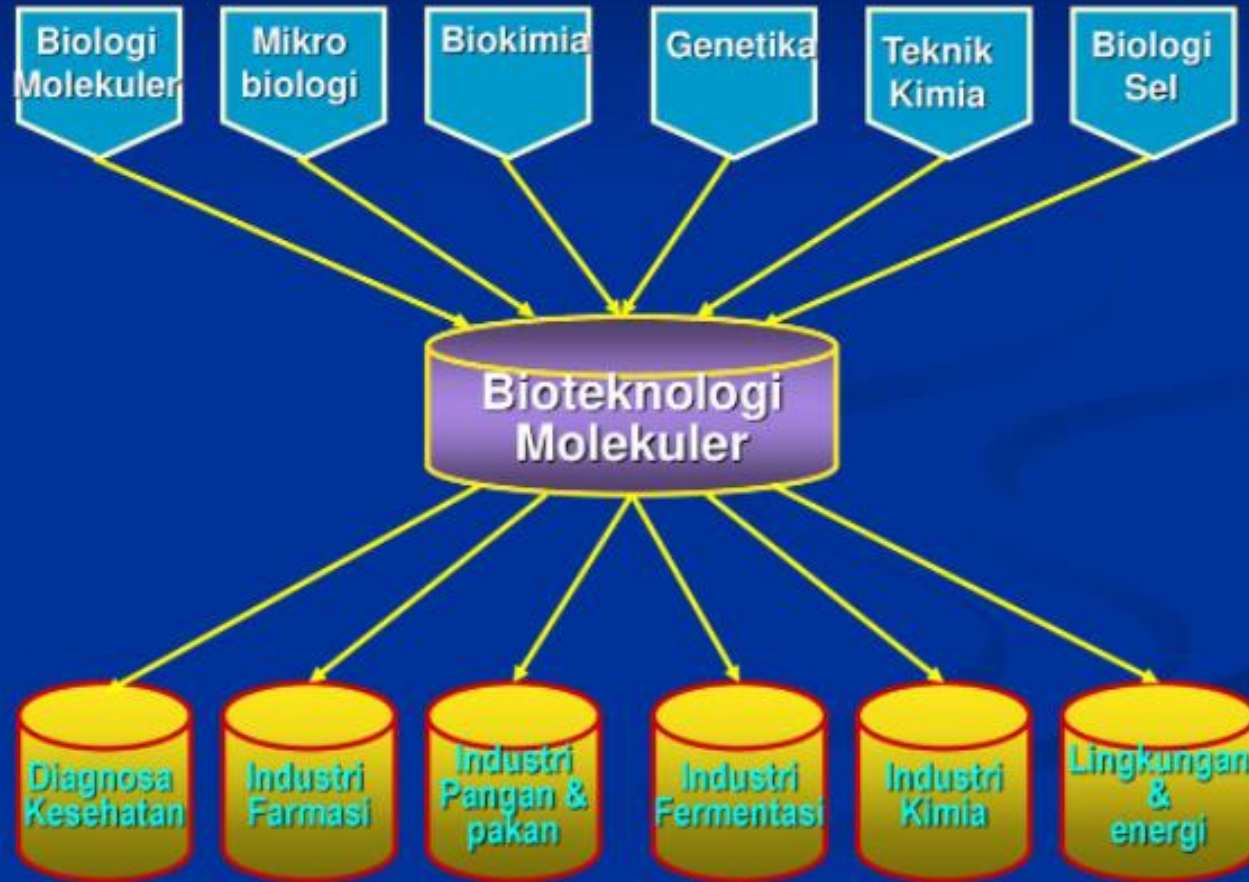


Keberhasilan Bioteknologi

- **tergantung pengintegrasian berbagai disiplin ilmu pengetahuan alam dan teknologi**
- Mikrobiologi
- Biokimia
- Genetika
- Bio molekuler
- Kimia
- Rekayasa proses
- Teknik kimia



Keberhasilan bioteknologi tergantung pada
pengintegrasian berbagai disiplin ilmu:



Reaksi pada Proses Bioteknologi

- ❖ katabolik : senyawa kompleks diuraikan menjadi senyawa sederhana
- ❖ anabolik : molekul sederhana dibangun menjadi senyawa lebih kompleks.

- Bioteknologi mencakup proses fermentasi, pengelolaan air dan sampah, teknologi pangan, obat-obatan dll
- Teknik yg diterapkan dlm bioteknologi → lebih ekonomis, lebih sedikit dlm penggunaan energi dan lebih aman dibandingkan dengan proses tradisional.
- Harapan masa depan dlm pemecahan masalah-masalah dunia khususnya: obat-obatan, produksi pangan, pengendalian polusi dan pengembangan sumber energi baru.

Perkembangan Rekayasa Genetika sebagai Bagian dari Perkembangan Bioteknologi

- Perkembangan semua bidang kehidupan tidak bisa terlepas dari perkembangan dunia teknologi → tolak ukur kemajuan suatu negara banyak ditentukan dari teknologi yang dimilikinya
- Bioteknologi modern saat ini menggunakan organisme hasil rekayasa genetik melalui perlakuan yang mengubah landasan penentu kemampuan hidup, yaitu mengubah tatanan gen yang menentukan sifat spesifik suatu organisme, sehingga proses pengubahan dapat berlangsung secara lebih efisien dan efektif, serta hasil yang lebih komersial.
- Pada awal perkembangannya metode perpindahan gen hanya dapat dilakukan antara satu jenis makhluk hidup, akan tetapi dikemudian hari gen dapat dipindahkan dari satu jenis ke jenis lainnya.

Rekayasa Genetika

- Diawali rasa ingin tahu manusia dan keinginan untuk selalu mendapatkan yang terbaik dalam memecahkan semua masalah kehidupan → berfantasi dan mengembangkan imajinasinya → berandai-andai adanya suatu makhluk hidup yang merupakan perpaduan dari sifat-sifat positif makhluk hidup yang sudah ada → menemukan teknik “rekayasa genetika” untuk menghasilkan makhluk hidup seperti apa yang mereka inginkan.

Definisi Rekayasa Genetik

Teknik untuk menghasilkan molekul DNA yang berisi gen baru yang diinginkan atau kombinasi gen-gen baru atau dapat dikatakan sebagai manipulasi organisme

Bioteknologi merupakan penerapan prinsip ilmiah dan rekayasa pengolahan bahan oleh agen biologi untuk menyediakan barang dan jasa

Proses Rekayasa Genetika

1. Setiap makhluk hidup terdiri atas jutaan sel individu yang masing-masing sel tersebut mengandung satu set gen yang identik.
2. Gen-gen tersebut berfungsi memberikan perintah-perintah biologi yang hanya mengeluarkan satu dari ribuan perintah yang diperlukan untuk membangun dan menjaga kelangsungan suatu makhluk hidup serta menentukan penampakan yang dimunculkan dalam bentuk fisik suatu makhluk hidup.
3. Gen-gen tersebut tersusun atas deoxyribonucleic acid (DNA) yg merupakan molekul yang mengkode perintah-perintah biologi di dalam struktur kimianya.
4. Struktur kimia DNA seperti sebuah rangkaian surat-surat yang berisi pesan-pesan genetika. Surat-surat itu hanya memiliki empat huruf menurut abjad genetik (Adenin/A, Guanin/G, Timin/T, dan Cytosin/C), yang disebut basa .

Lanjutan...

5. Setiap gen mengandung ribuan rantai basa yang tersusun menjadi sebuah rangkaian dimana gen tersebut berada dalam kromosom sebuah sel. DNA mudah diekstraksi dari sel-sel, dan kemajuan biologi molekuler sekarang memungkinkan ilmuwan untuk mengambil DNA suatu spesies dan kemudian menyusun konstruksi molekuler yang dapat disimpan di dalam laboratorium. DNA yang telah mengalami penyusunan molekuler tersebut disebut **DNA rekombinan** sedangkan gen yang diisolasi dengan metode tersebut dinamakan **gen yang diklon**

6. **DNA rekombinan** ini dapat dipindahkan ke makhluk hidup lain bahkan yang berbeda jenisnya. Hasil dari perpaduan tersebut menghasilkan makhluk hidup rekombinan yang memiliki kemampuan baru dalam melangsungkan proses hidup dan bersaing dengan makhluk hidup lainnya. Dengan kata lain makhluk hidup rekombinan memiliki sifat unggul bila dibandingkan dengan makhluk hidup asalnya.

Perkembangan Bioteknologi

- Rekayasa genetika : Manipulasi genom thd organisme penting di bidang industri melalui teknik rekombinasi dan atau mutasi mrpk inovasi baru para ahli genetika industri.
- Teknik rekombinasi DNA melibatkan:
 - pemecahan sel
 - ekstraksi DNA
 - pemurnian dan fragmentasi selektif DNA dg enzim
 - pemisahan
 - analisis
 - pemilihan dan pemurnian suatu fragmen yg mengandung gen yg diinginkan
 - pemasukan hibrid DNA ke dalam sel terpilih utk reproduksi dan sintesis selluler.
- Teknologi enzim : Isolat enzim banyak digunakan dlm banyak proses bioteknologi.

ISOLASI DNA

DNA

- DNA kita sepakati sebagai senyawa penting yang hanya ada di makhluk hidup. Di makhluk hidup senyawa ini sebagai master kehidupan untuk penentuan karakter dan karakter itu bisa diwariskan keketurunan

LETAK DNA

- Sebagian besar terdapat dalam makhluk hidup baik makhluk hidup tingkat tinggi maupun rendah

FUNGSI DNA

- penentu karakter makhluk hidup dan karakter itu bisa diwariskan
- perancang / arsitek sintesis protein

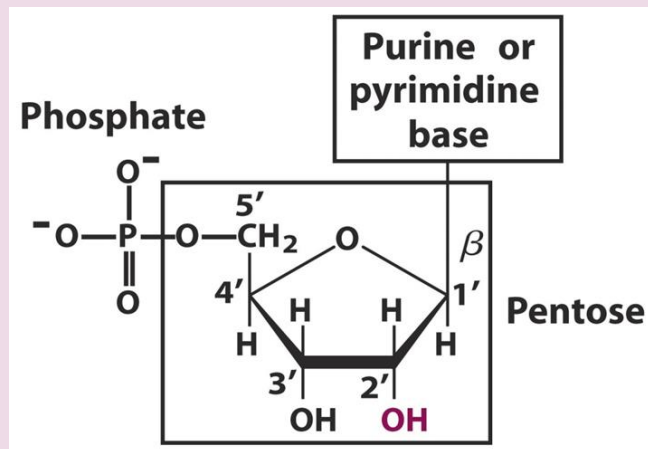
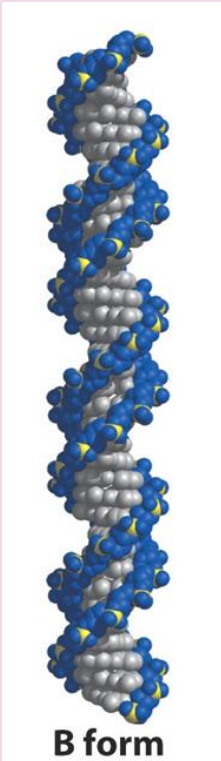
BENTUK DNA

- Pita ganda berpilin (double heliks) dan panjang membentuk untaian seperti tangga berpilin

STRUKTUR DNA

- tersusun atas rangkaian nukleotida (polinukleotida). Yang setiap nukleotida disusun oleh senyawa : Gula, pospat dan basa nitrogen , yang susunanya selalu GULA diapit oleh senyawa Phospat (PO_4) dan Basa Nitrogen

DNA



- DNA (Deoxyribonucleic acid) : polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan merupakan pembawa informasi genetik yang diturunkan kepada jasad keturunannya.



DNA vs. RNA



DEOXYRIBONUCLEIC ACID

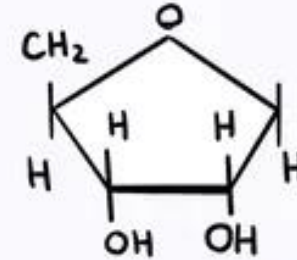
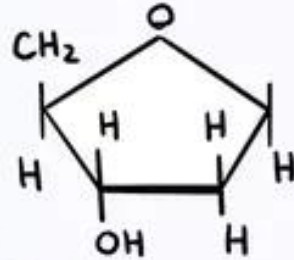
RIBONUCLEIC ACID

DOUBLE-STRANDED
SUGAR*PHOSPHATE

USUALLY SINGLE-STRANDED
SUGAR*PHOSPHATE

* DEOXYRIBOSE

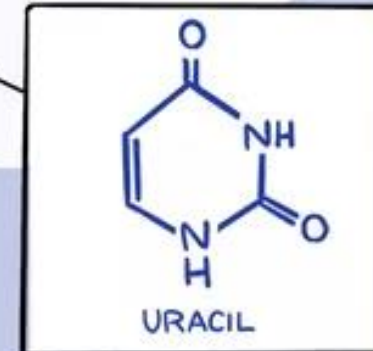
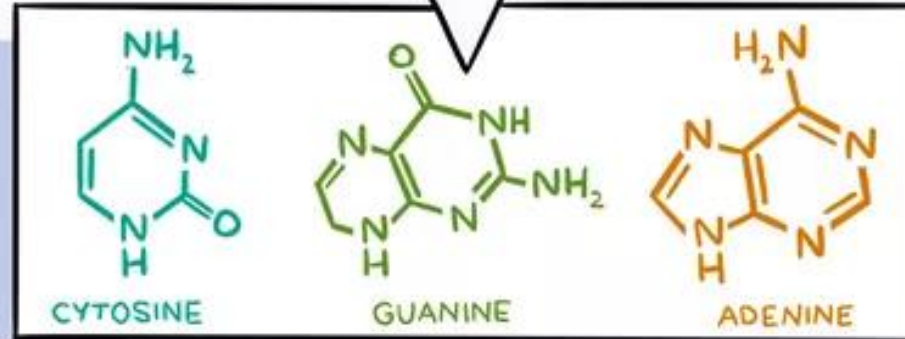
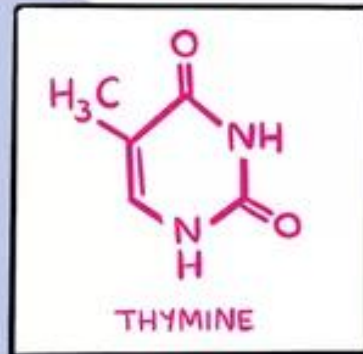
★ RIBOSE

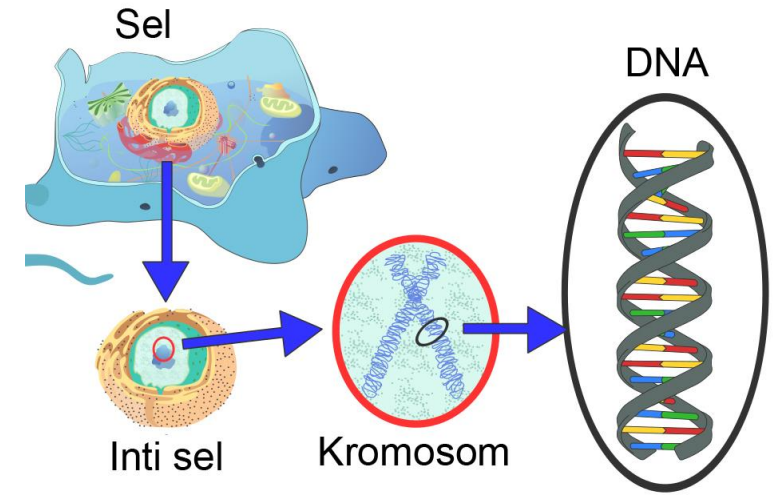
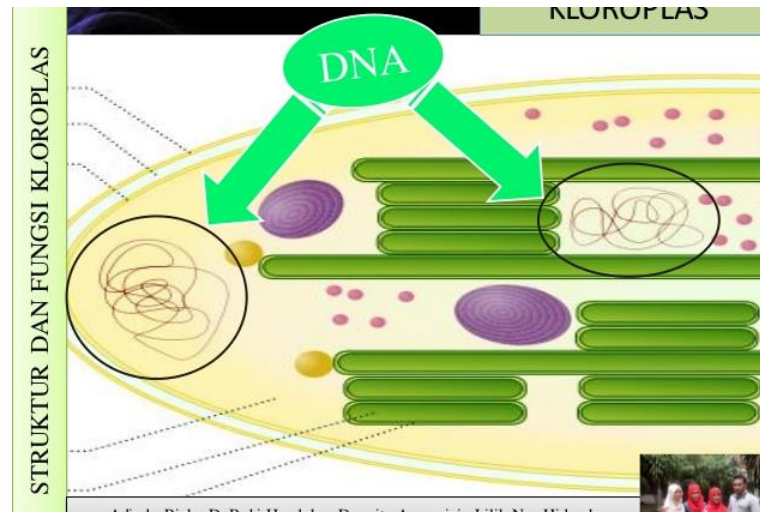
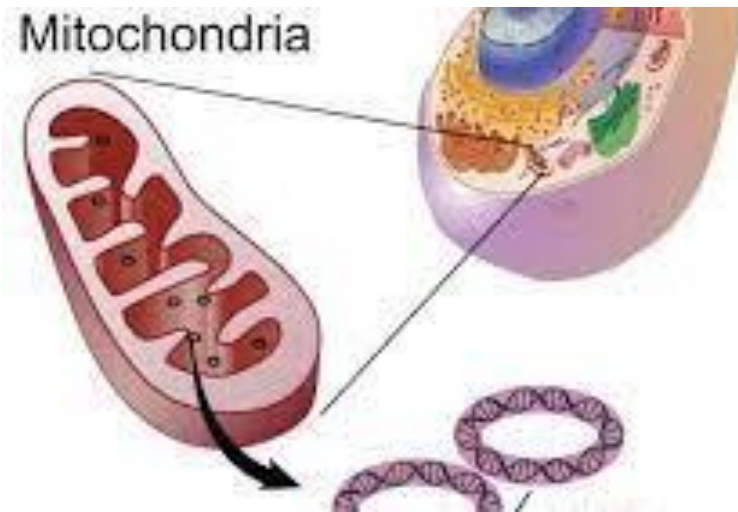


BASE PAIR

SINGLE
NUCLEOBASE

NUCLEOBASES





Letak DNA

- DNA pada organisme eukariotik seperti hewan dan tumbuhan terdapat di dalam **inti sel**, dan beberapa organ lain di dalam sel seperti **mitokondria** dan **kloroplast** (Hanya pada tumbuhan). Sedangkan DNA pada organisme prokariotik terdapat pada nukleoid yang tidak diselubungi oleh membran inti.

Faktor-faktor Penyebab DNA Rusak

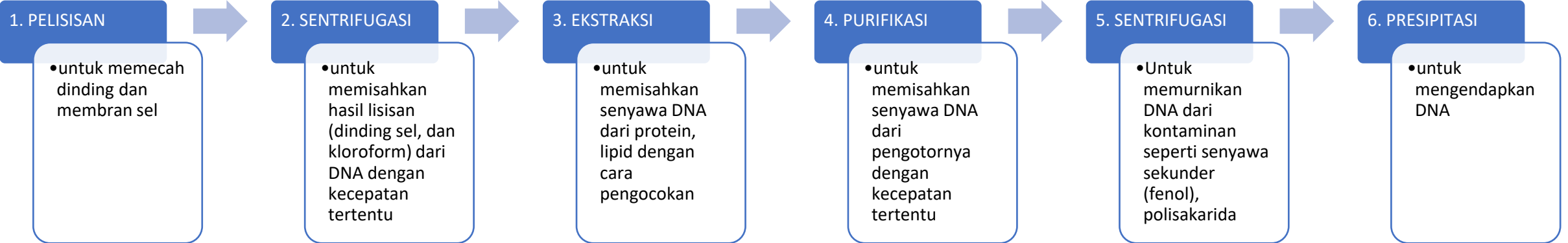
- **Tekanan** : jika tekanan yang diberikan sampai menembus ke sel DNA melalui membran sel. Tekanan itu antara lain tumbukkan menggunakan mortal dan pestel.
- **pH Tinggi** : peningkatan pH → perubahan struktur Guanin dari bentuk keto menjadi bentuk enolat karena molekul tersebut kehilangan sebuah proton → perubahan ini akan menyebabkan terputusnya sejumlah ikatan hidrogen → rantai ganda DNA mengalami denaturasi. Derajat keasaman (pH) yang ekstrim ($\text{pH} < 3$ atau $\text{pH} > 10$) → DNA akan mengalami denaturasi DNA.
- **Suhu (Panas)** : panas yang ekstrim → molekul rantai ganda (pada dsDNA) akan berubah menjadi molekul rantai tunggal. Suhu yang dapat merusak DNA berkisar dari 80-100°C untuk molekul-molekul DNA yang panjang.
- **Radiasi** : Radiasi yang bersifat mutagenik antara lain berasal dari sinar kosmis, sinar ultraviolet, sinar gamma, sinar X, partikel beta, pancaran neutron ion-ion berat, dan sinar lain yang mempunyai daya ionisasi. Radiasi dapat memicu kerusakan DNA. Radiasi pengionan seperti sinar kosmik dapat menyebabkan break dalam DNA strands. Kerusakan yang terjadi akibat radiasi pengionan dapat berupa: DNA sama sekali putus (Double Strand Break), satu back bone DNA putus (Single Strand Break), kerusakan base (Base Damage), dan kerusakan gula ribosa pada backbone DNA.
- **Tidak tersedianya senyawa kromatin kompleks** : dapat berperan sebagai pelindung dari serangan senyawa O_2 reaktif, aktivitas DNA repair berubah dan terdapat kerusakan pada rantai transforelektron → merangsang pembentukan senyawa O_2 reaktif sekunder.
- **Konsentrasi iso elektrolit** : seperti Na^+ dan K^+ serta ratio kandungan antara basa nukleotida GC terhadap AT, misal tingginya kandungan GC akan memperlambat proses denaturasi molekul DNA.

Isolasi DNA

- Isolasi DNA : metode untuk mendapatkan asam deoksiribonukleat dari suatu makhluk hidup.
- Isolasi DNA pertama kali dilakukan oleh ilmuwan asal Swiss bernama Friedrich Miescher pada tahun 1869. Ia menemukan senyawa asam yang mengandung nitrogen dan fosfat pada inti sel dari sel darah putih. Senyawa ini diberi nama **nuklein**, namun pada tahun 1889 muridnya yaitu Richard Altmann menamainya **asam nukleat** . Metode yang digunakan oleh Miescher adalah alkalyne lysis untuk memecahkan sel dan mengisolasi DNA.
- **Menurut Wilson, Keith and John, (2010)** Isolasi DNA merupakan kegunaan DNA untuk dianalisa atau dimanipulasi yang harus diisolasi terlebih dahulu dan murni kandungannya

Prinsip isolasi DNA

- Prinsip dasar DNA/RNA dari jaringan → memecah dan mengekstraksi jaringan tersebut sehingga terbentuk ekstrak sel yang terdiri dari DNA, RNA, dan substansi dasar lainnya



1. Tahap Pelisisan

a. Cara Mekanis

- Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel
- Tahap penghancuran sel atau jaringan secara fisik → menggerus sampel menggunakan mortar dan pestle dalam nitrogen cair atau dengan metode freezing-thawing, iradiasi, sonikasi, pemberian tekanan tinggi,

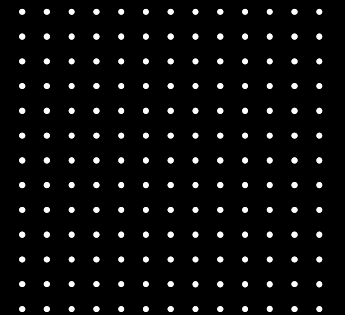
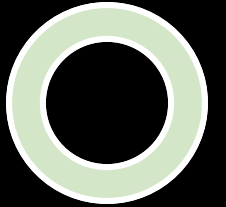
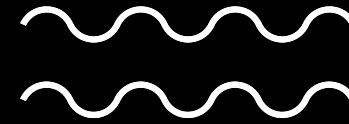
b. Cara Kimiawi dan Enzimatis

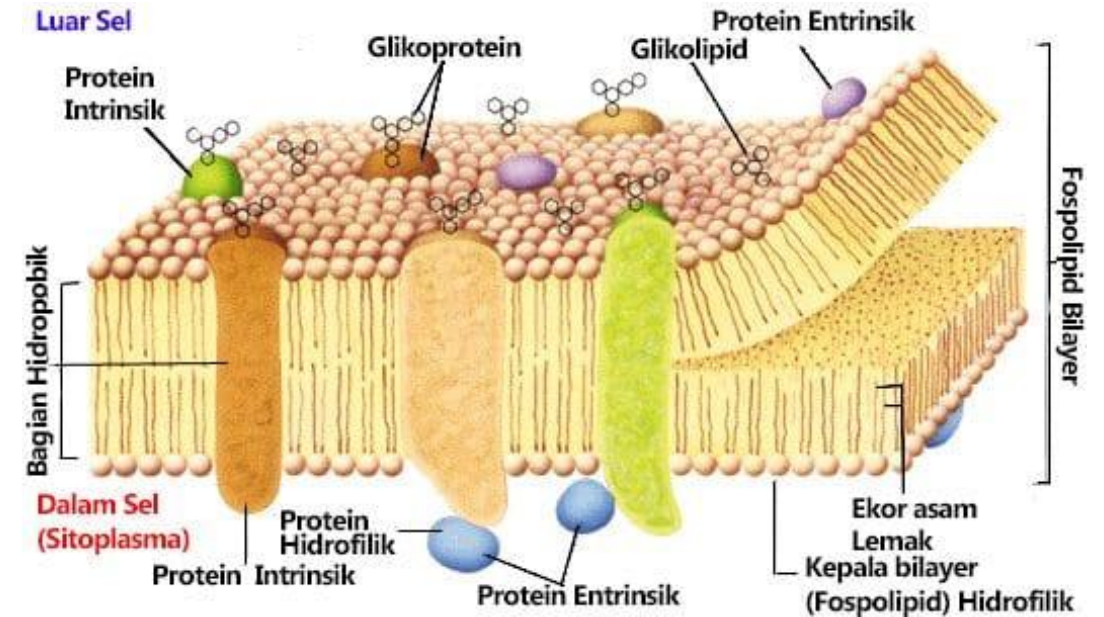
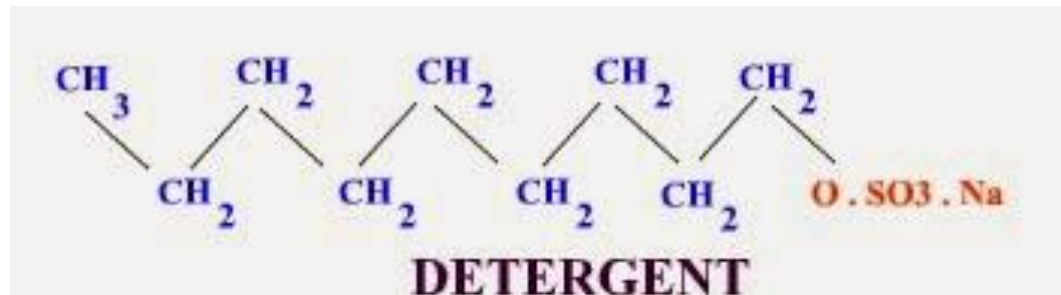
- Cara kimiawi → penggunaan detergen yang dapat melarutkan lipid pada membran sel sehingga terjadi destabilisasi membran sel.
- Cara enzimatis → menggunakan proteinase K seperti untuk melisiskan membran pada sel darah serta mendegradasi protein globular maupun rantai polipeptida dalam komponen sel

1. Tahap Pelisisan

- Bahan yang digunakan:

1. Deterjen → melisiskan membran sel, mengurangi aktivitas enzim nuklease (enzim pendegradasi DNA)
2. Sodium dodecyl sulphate (SDS) → melisiskan membran sel
3. Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) → melisiskan membran sel pada isolasi DNA tumbuhan karena efektivitasnya dalam menghilangkan polisakarida





Penambahan deterjen dalam isolasi DNA dapat dilakukan karena deterjen dapat menyebabkan rusaknya membran sel, melalui ikatan yang dibentuk melalui sisi hidrofobik deterjen dengan protein dan lemak pada membran membentuk senyawa "lipid protein-deterjen kompleks". Senyawa tersebut dapat terbentuk karena protein dan lipid memiliki ujung hidrofilik dan hidrofobik, demikian juga dengan deterjen, sehingga dapat membentuk suatu ikatan kimia

+

•

○

2. Tahap sentrifugasi

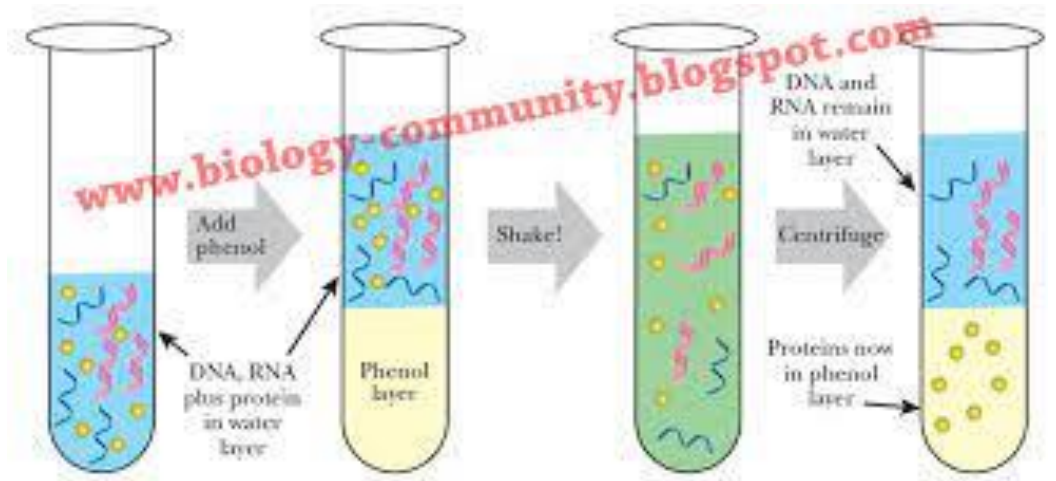
- CIAA (Kloroform, isoamil alkohol) → untuk mengendapkan protein, komponen fenolik, dan polisakarida → dapat dipisahkan dengan larutan DNA menggunakan proses sentrifugasi
- tube dicentrifuge selama 15 menit pada 12.000 rpm → untuk mengendapkan molekul kasar yang bercampur dengan DNA (dinding sel, protein, karbohidrat) serta kloroform.
- setelah 15 menit, tube dikeluarkan dari centrifuge → akan terlihat 3 lapisan dari hasil centrifuge.
 - karena DNA bersifat ringan, maka **DNA** berada di lapisan **paling atas** (supernatant).
 - **lapisan kedua** berbentuk padatan, berisi material padat hasil lisis sel (**debris**). Misalnya serpihan dinding sel yang rusak.
 - **lapisan paling bawah** adalah **klorofil** yang larut dengan kloroform (warnanya hijau).

3. Tahap Ekstraksi

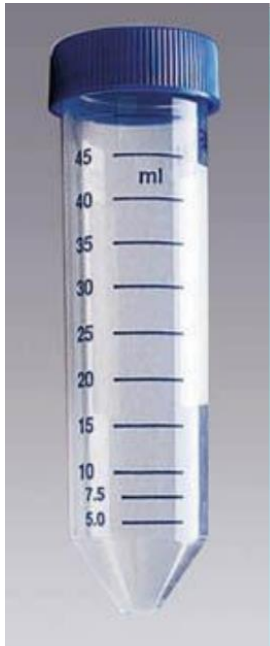
- Pada tahapan ekstraksi DNA, seringkali digunakan chelating agent seperti ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) yang berperan menginaktivasi enzim DNase yang dapat mendenaturasi DNA yang diisolasi, EDTA menginaktivasi enzim nuklease dengan cara mengikat ion magnesium dan kalsium yang dibutuhkan sebagai kofaktor enzim DNase (Corkill dan Rapley, 2008) dengan cara dikocok berulang kali.

4. Tahap Purifikasi

- Pemurnian DNA dari kontaminan protein digunakan enzim Protease yaitu Pronase atau Proteinase-k, dan kontaminan RNA dengan menggunakan RNase.
- Bahan yang digunakan :
 - Penambahan RNase → untuk menyingkirkan kontaminasi RNA, diinkubasi selama 10 menit pada suhu 65°C → tujuan: mengoptimalkan kerja enzim yang sangat dipengaruhi oleh temperatur
 - Pemurnian (purifikasi) DNA → untuk menghilangkan beberapa kontaminan seperti senyawa sekunder (fenol), polisakarida, RNA dan juga protein. Pemurnian dari kontaminan protein dan RNA dilakukan menggunakan senyawa kloroform isoamilalkohol, asam asetat, dan enzim RNase. Senyawa kloroform isoamilalkohol dan asam asetat → berfungsi mendenaturasi protein sedangkan enzim RNase → berfungsi melisis RNA dari ekstrak DNA tersebut.

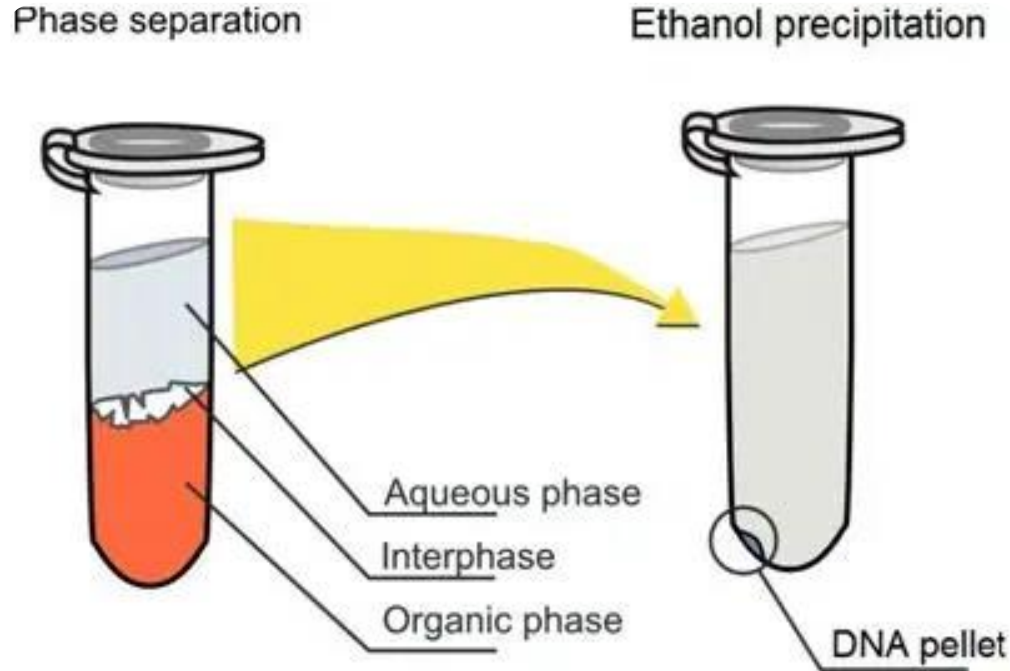


5. Tahap sentrifugasi



- Tabung di sentrifugasi kembali pada kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit.
- Hasil yang didapat : berupa supernatan yang bening dan pelet (endapan DNA murni) yang berwarna putih terdapat pada dasar tabung dan penambahan senyawa etanol. Etanol memiliki sifat hidrofilik.
- Supernatan tersebut dibuang karena DNA berada pada bagian natan. DNA murni yang dihasilkan adalah DNA yang terbebas dari campuran material dan komponen intraseluler yang mengandung larutan kompleks berupa RNA, protein, lemak dan karbohidrat.

6. Tahap Prepitasi



- Presipitasi (pemekatan) DNA menggunakan isopropanol dingin → agar DNA tersebut mengendap/mengumpul sekaligus memisahkannya dari garam-garam mineral sisa CTAB.
- Pelet hasil presipitasi oleh isopropanol dibersihkan menggunakan alkohol 70%.
- Pemurnian ini merupakan tahapan **paling penting** dalam Isolasi DNA → karena bila ada kontaminan selain DNA maka hasil isolasi DNA yang dilakukan dianggap gagal. Kontaminasi dapat menurunkan kualitas DNA hasil isolasi dan mengakibatkan data yang didapat tidak valid.

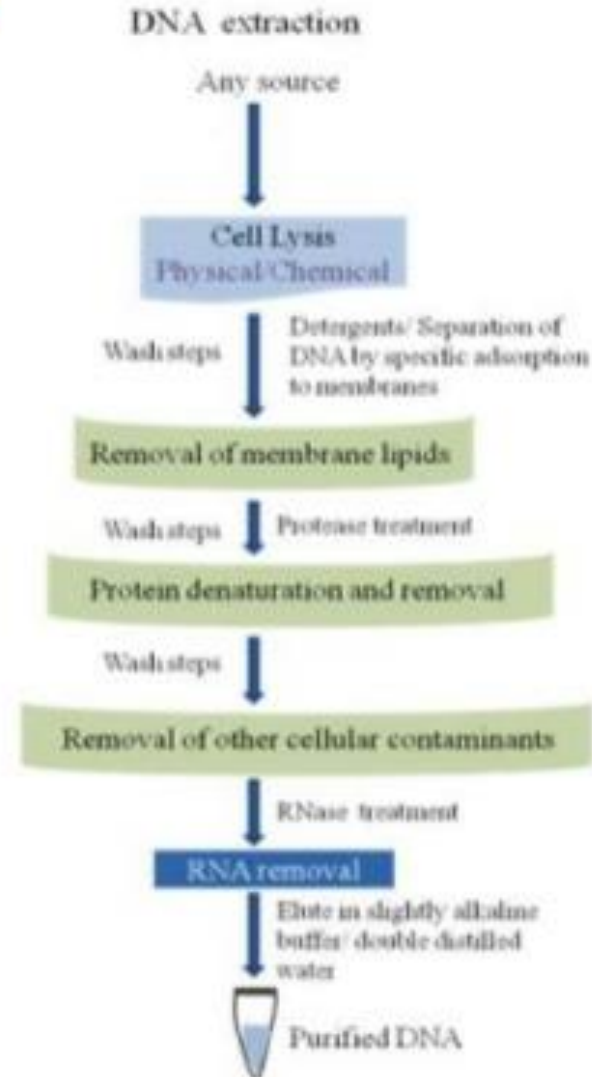


DNA Isolation

PRINCIPLE

- Removal and separation of DNA.

1. Cell Lysis
2. Precipitation
3. Wash
4. Resuspension



TERIMA KASIH

