



BIOTEKNOLOGI PETERNAKAN

prinsip dan teknik dasar rekayasa genetika

SUHARDI, S.PT., MP., PH.D

Prinsip Dasar

01

Memanipulasi atau melakukan perubahan susunan asam nukleat dari DNA (gen) atau menyelipkan gen baru ke dalam struktur DNA organisme penerima.

DNA baru dapat dimasukkan secara acak atau ditargetkan ke bagian tertentu dari genom.

Selain memasukkan gen, proses ini dapat digunakan untuk menghapus gen.

02

Pro dan Kontra

Munculnya tanaman rekayasa genetika yang dikomersilkan telah memberikan manfaat ekonomi kepada para petani di berbagai negara, tetapi juga menjadi sumber kontroversi. Meskipun ada konsensus ilmiah yang menyatakan bahwa makanan yang berasal dari tanaman transgenic tidak menimbulkan risiko yang lebih besar untuk kesehatan manusia daripada makanan konvensional, keamanan pangan transgenic tetap menjadi pusat kritikan.

Adanya masalah ini mengakibatkan munculnya pengembangan kerangka peraturan yang dimulai pada tahun 1975.

Perjanjian internasionalnya juga telah disepakati pada tahun 2000 yaitu Protokol Cartagena tentang keamanan hayati. Masing-masing negara telah mengembangkan sendiri sistem regulasi mengenai transgenik.

Rekayasa genetik memegang peranan penting dalam merubah susunan genetika makhluk hidup sesuai dengan keperluan manusia di masa kini.

- **Pemahaman mendasar mengenai prinsip yang ada pada teknik-teknik rekayasa genetik penting untuk dimiliki oleh mereka yang terkait dalam bidang tersebut.**
- **Prinsip dasar teknik-teknik tersebut meliputi prinsip yang berhubungan dengan ekspresi gen, mulai dari transkripsi dari DNA sampai dengan modifikasi protein.**
- **Selain itu, DNA rekombinan juga merupakan hal penting yang perlu dipahami karena terkait dengan perpindahan materi genetik dan teknik kloning.**
- **Untuk menganalisa DNA, seseorang perlu memahami ciri-ciri DNA seperti untai ganda, bermuatan negatif karena gugus fosfat, sensitif terhadap perubahan pH dan banyak memiliki domain untuk ikatan dengan molekul lain (DNA, RNA atau protein).**



METODE

Rekayasa Genetika

Beberapa metode yang sering digunakan dalam teknik rekayasa genetika meliputi:

- ❖ penggunaan vektor,
- ❖ kloning,
- ❖ PCR (Polymerase Chain Reaction),
- ❖ dan seleksi,
- ❖ screening, serta
- ❖ analisis rekombinan

Rekombinasi Genetik

Langkah-langkahnya



Teknik pelestarian dengan rekayasa genetik ini sangat bermanfaat, dengan alasan:

1. Induk dari spesies biasa dapat melahirkan anak dari spesies langka;
2. Telur hewan langka yang sudah dibuahi dapat dibekukan, lalu disimpan bertahun-tahun meskipun induknya sudah mati. Telur yang sudah disimpan beku ini kemudian dapat ditransplantasi.

Memodifikasi materi genetik hewan telah banyak dilakukan dengan tujuan memiliki berbagai macam manfaat yang bisa diambil, antara lain

1

Bidang Sains dan Kedokteran Hewan yang secara genetika sudah dimodifikasi atau dikenal dengan istilah Genetically Modified Animal (GMA) seperti pada hewan uji yakni mencit dapat digunakan untuk penelitian bagaimana fungsi yang ada pada hewan. Disamping itu juga digunakan untuk memahami dan mengembangkan perlakuan pada penyakit baik pada manusia maupun hewan.

2

Pengobatan Penyakit. Beberapa penelitian telah menggunakan protein pada manusia untuk mengobati penyakit tertentu dengan cara mentransfer gen manusia ke dalam gen hewan, misalnya domba atau sapi. Selanjutnya hewan tersebut akan menghasilkan susu yang memiliki protein dari gen manusia yang akan digunakan untuk penyembuhan pada manusia.

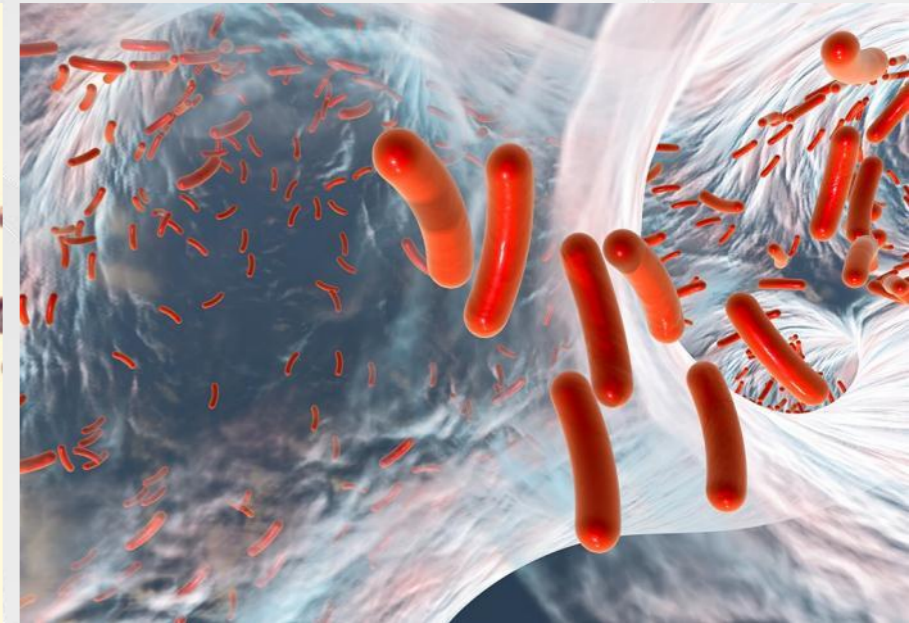
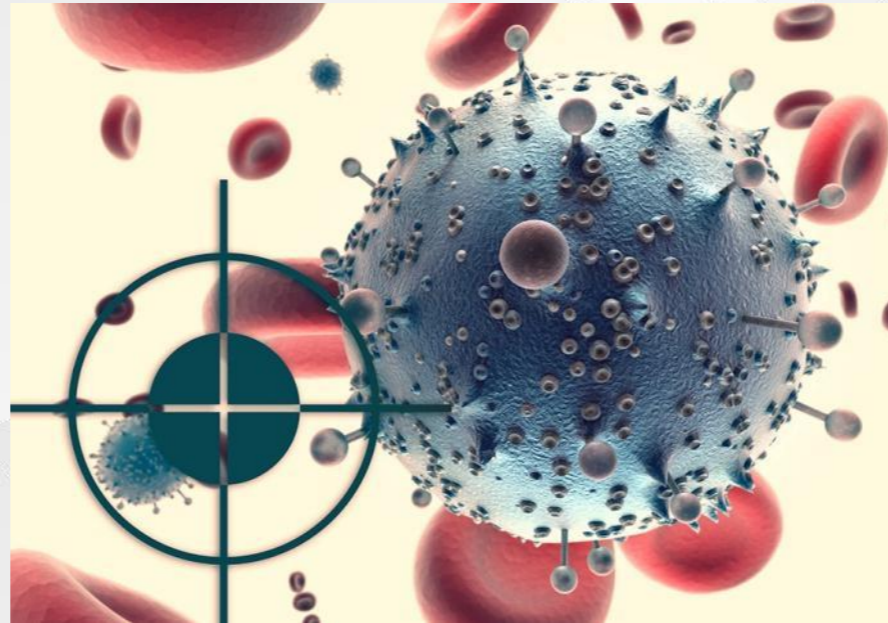
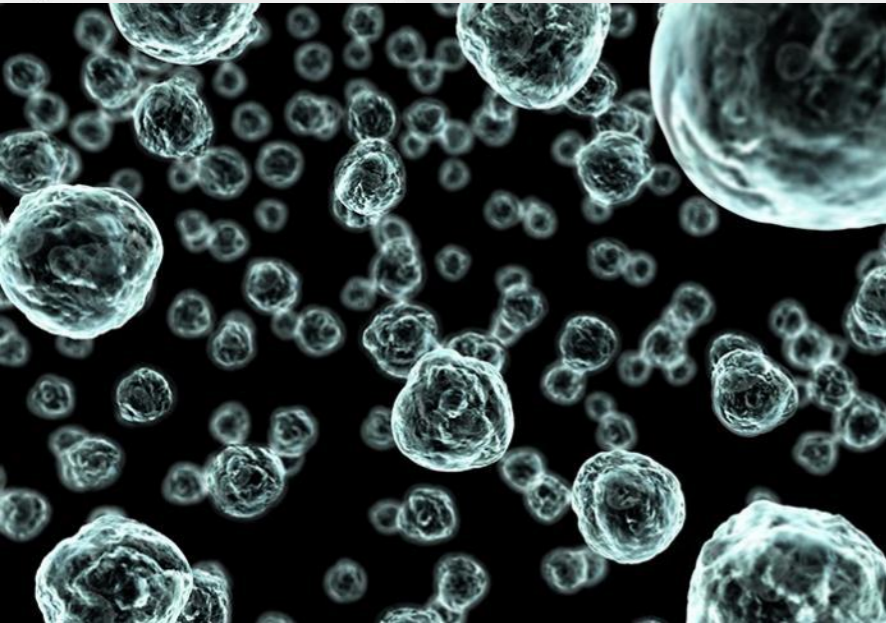
Modifikasi Hasil Produksi Hewan. Beberapa negara melakukan rekayasa genetik pada hewan ternak yang diharapkan akan menghasilkan hewan ternak yang cepat pertumbuhannya, tahan terhadap penyakit, bahkan menghasilkan protein atau susu yang sangat bermanfaat bagi manusia. Berikut ini ada beberapa penerapan Rekayasa Genetika pada beberapa jenis hewan. Unsur-

3

unsur yang esensial diperlukan dalam kloning DNA adalah:

1. Enzim retraksi (enzim pemotong DNA)
2. Kloning vektor (pembawa)
3. Enzim ligase yang berfungsi menyambung rantai DNA Adapun proses-proses dasar dalam kloning DNA meliputi :
 1. Pemotongan DNA (DNA organisme yang diteliti dan DNA vektor)
 2. Penyambungan potongan-potongan (fragmen) DNA organisme dengan DNA vektor menggunakan enzim ligase
 3. Transformasi rekombinan DNA (vektor + DNA sisipan) ke dalam sel bakteri *Escherichia coli*.
 4. Seleksi (screening) untuk mendapatkan klon DNA yang diinginkan.

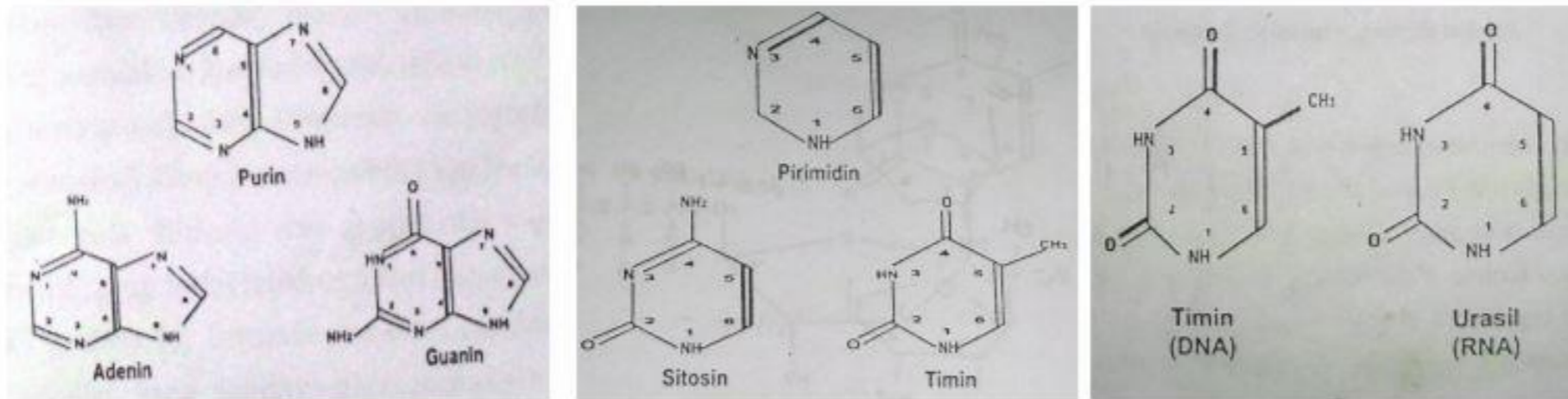
ISOLASI DNA



Prinsipnya adalah memisahkan DNA kromosom atau DNA genom dari komponen-komponen sel lain. Sumber DNA bisa dari tanaman, kultur mikroorganise, atau sel manusia. Membran sel dilisis dengan menambahkan detergen untuk membebaskan isinya, kemudian pada ekstrak sel tersebut ditambahkan protease (yang berfungsi mendegradasi protein) dan RNase (yang berfungsi untuk mendegradasi RNA), sehingga yang tinggal adalah DNA. Selanjutnya ekstrak tersebut dipanaskan sampai suhu 90 oC untuk menginaktifasi enzim yang mendegradasi DNA (DNase). Larutan DNA kemudian di presipitasi dengan etanol dan bisa dilarutkan lagi dengan air.

Ekstraksi Asam Nukleat

- **Asam Nukleat** >> Molekul makro yang tersusun dari rantai nukleotida monomerik:
 - DNA (*deoxyribonucleic acid*)
 - RNA (*ribonucleic acid*)



- **Tujuan Ekstraksi:**
 - Memisahkan asam nukleat dari komponen sel lainnya sehingga cukup murni untuk dianalisis dan atau dimodifikasi lebih lanjut.

1. Homogenisasi Sel



Organ dan jaringan



Peralatan steril → Menghilangkan aktivitas DNase



Suhu 4°C → Menghindari digesti asam nukleat oleh enzim nuklease

2 Pelisisian Sel

- Melisisikan sel tetapi mencegah fragmentasi DNA
- Bahan yang dapat digunakan:
 - EDTA ➔ mengikat ion magnesium (kofaktor yang dibutuhkan oleh enzim DNase).
 - Detergen ➔ lisis dinding bakteri. Contoh: Tween, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), Nbnidet, Laureth dan Triton. Untuk dinding lebih tebal dapat digunakan enzim lisosim

3. Pemisahan DNA dari komponen lain

- Fenol (pelarut organik) ➔ protein larut dalam pelarut organik sedangkan DNA tidak

- Proteinase ➔ mendigesti protein.

- Garam kationik



Setelah itu, asam nukleat dipresipitasi. Dapat digunakan: etanol 100%, isopropanol, PEG (polyethylene glycol).
Dapat pula digunakan NaCl, sodium asetat, dan amonium asetat.



Presipitasi etanol dan pencucian pelet dengan etanol 70% dapat dengan efektif menghilangkan garam dari DNA

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

- Teknik amplifikasi DNA selektif in Vitro yang meniru fenomena replikasi DNA in Vivo

KOMPONEN

• **Template.** Bila cetakan awal adalah RNA, maka diperlukan RT-PCR untuk mengubahnya menjadi cDNA.

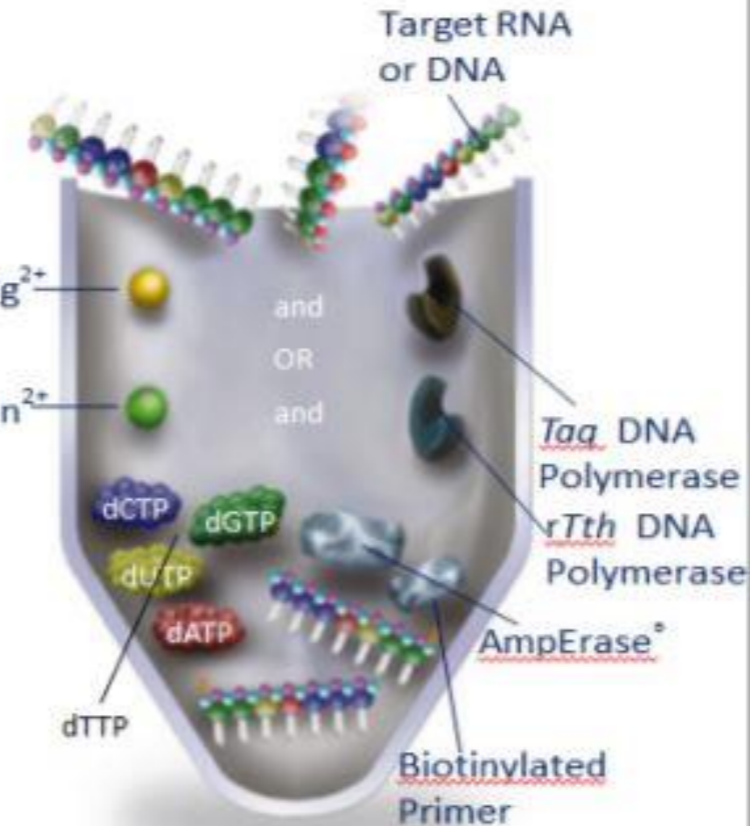
• **Primer (forward & backward).** Berfungsi mengawali reaksi replikasi.

• **dNTPs :** dATP, dTTP, dCTP, dGTP

• **Enzim polimerase DNA,** beberapa memiliki aktivitas *proofreading*.

• **Buffer reaksi,** jangan TE. Bisa ddw atau Tris.

Mg^{2+} mempengaruhi aktivitas enzim, meningkatkan T_m ds DNA, membentuk kompleks yang solubel dengan dNTP. Namun beberapa DNA polimerase lebih membutuhkan Mn^{2+} .

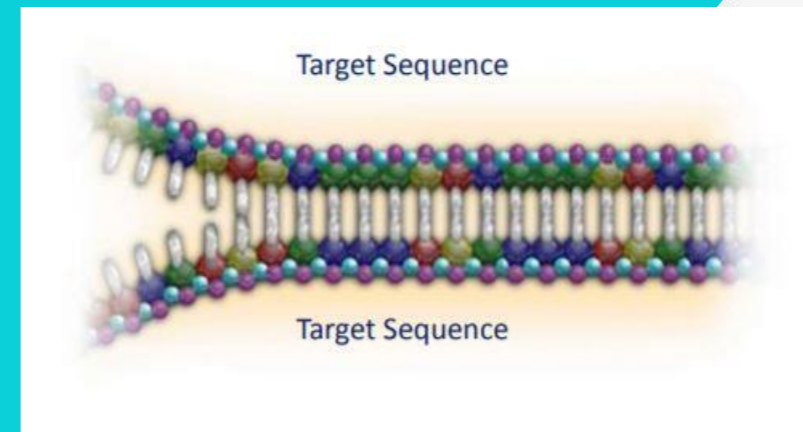
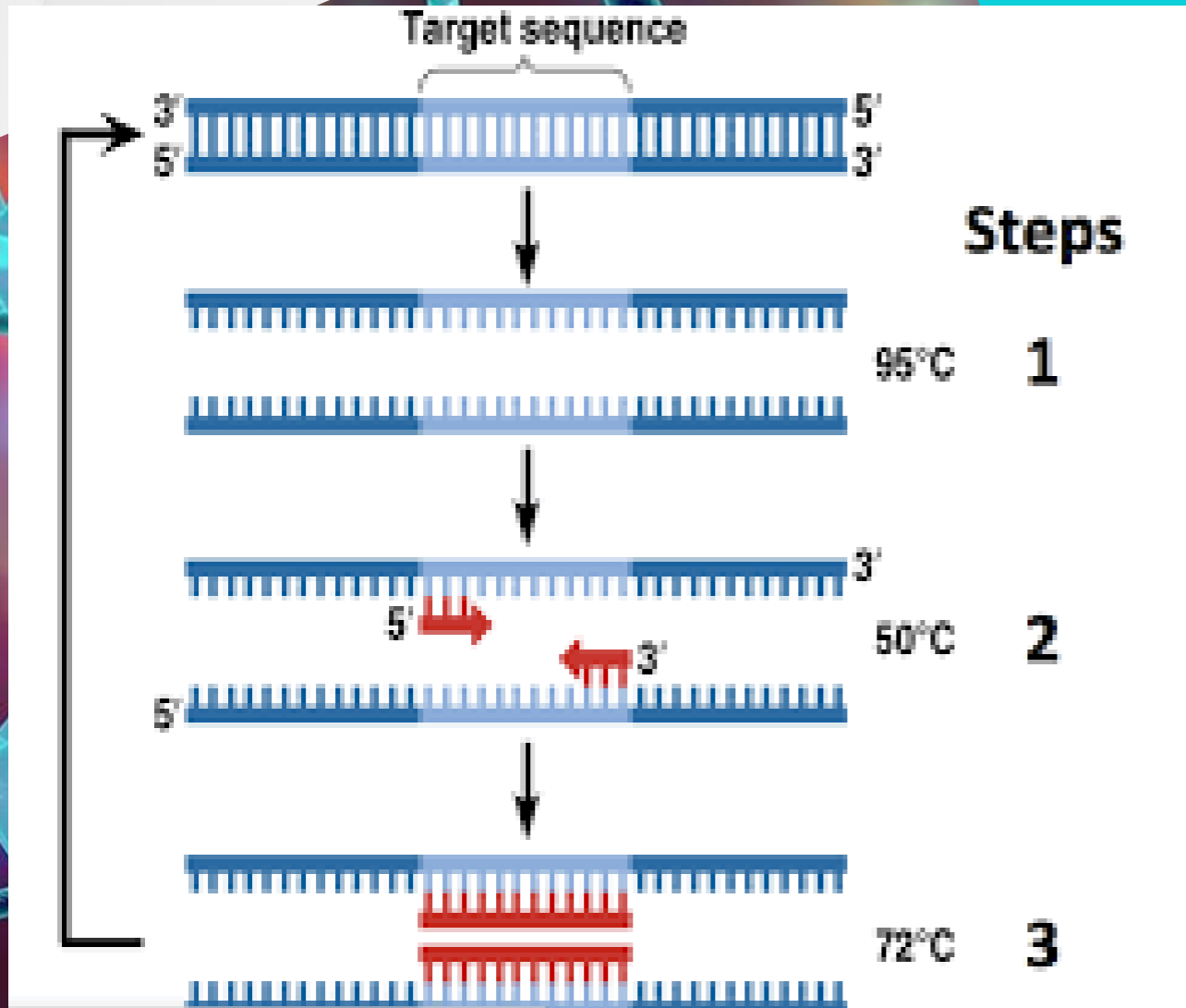


Prasetyo, A.A. 2011. *Teknik Biologi Molekular Dasar*. Surakarta: LPP UNS dan UNS Press.
Roche Diagnostics. 2006. *PCR Application Manual*. 3rd edition. Available at www.roche-applied-science.com. Accessed 25 July 2012.

- Denaturasi (Melting)

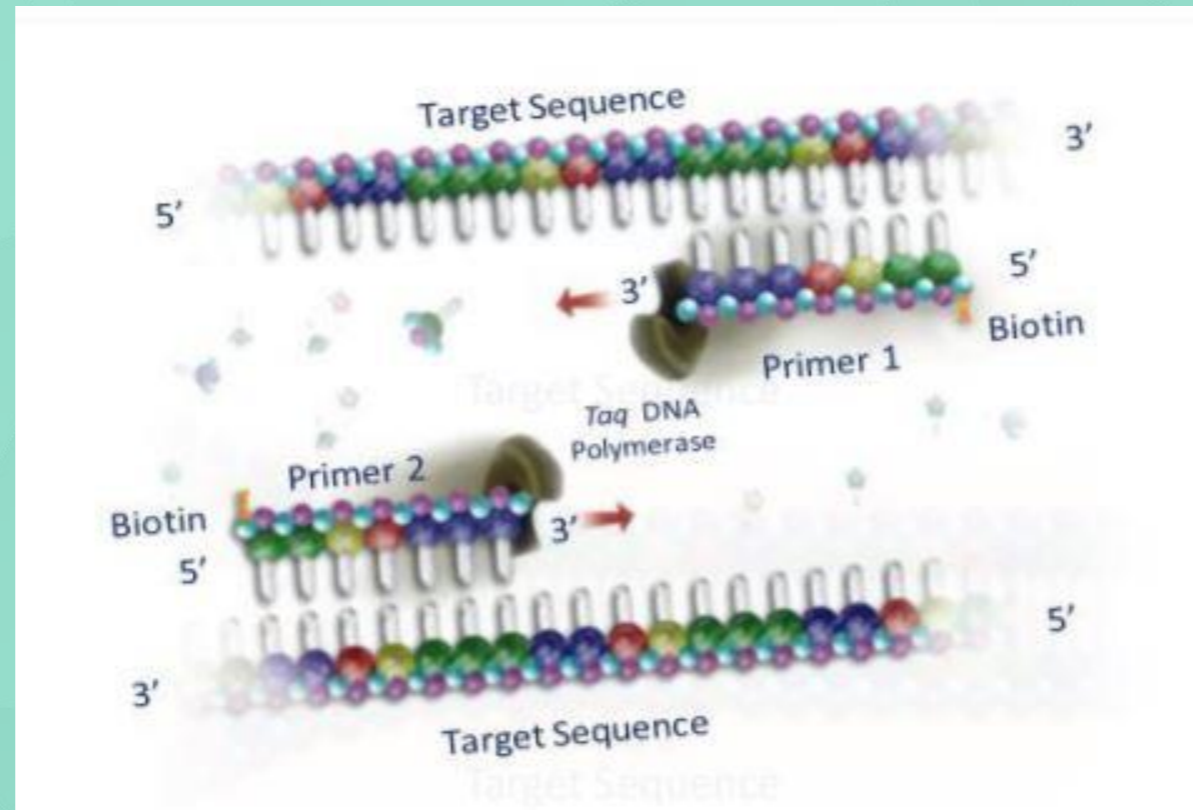
Memisahkan DNA untai ganda menjadi komponen untai tunggal

➔ Memungkinkan Hbridisasi primer untai ganda pada sekuen targetnya



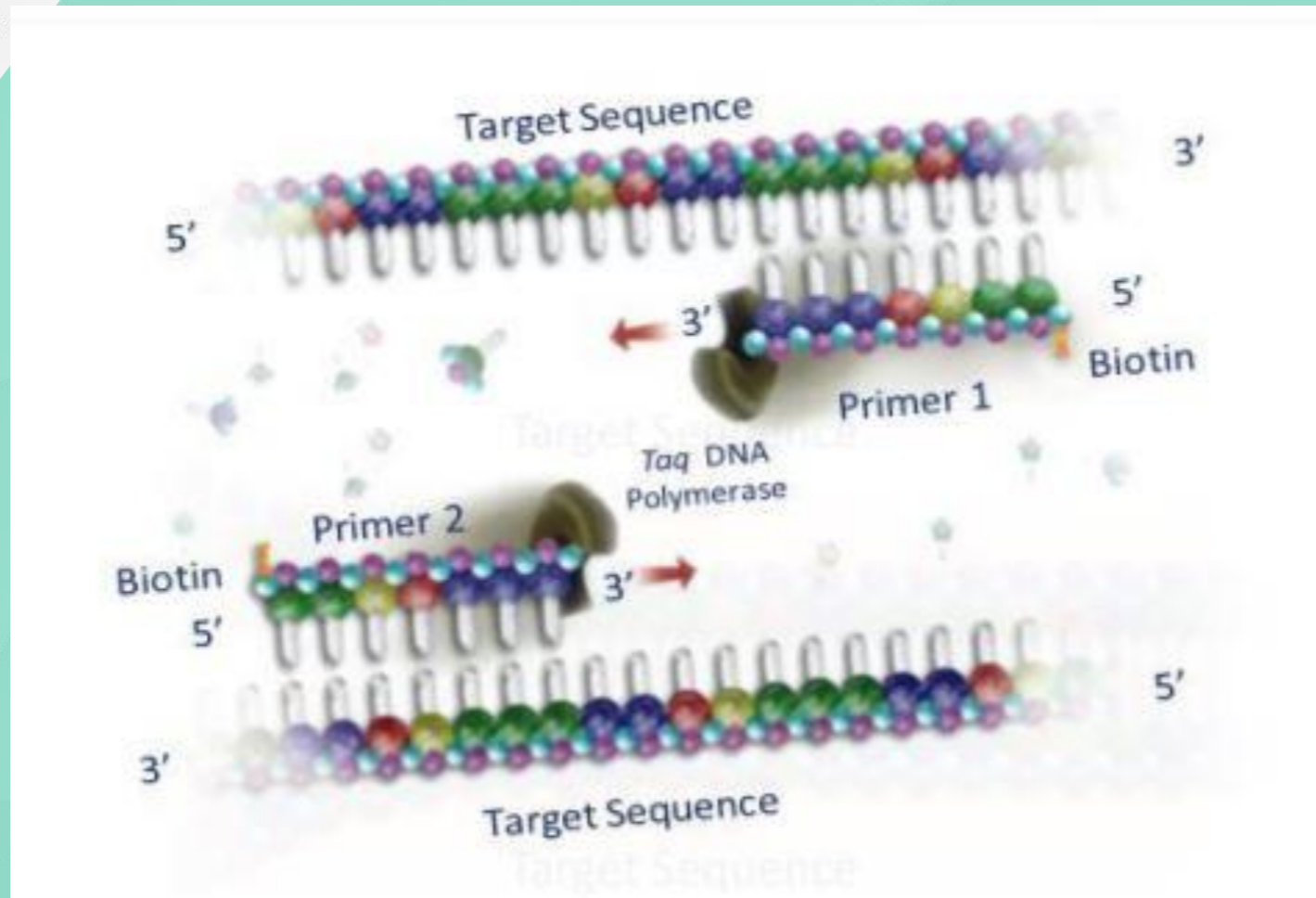
– Annealing

Hbridisasi primer PCR pada sekuen target → suhu annealing berasal dari suhu annealing primer hasil kalkulasi matematis



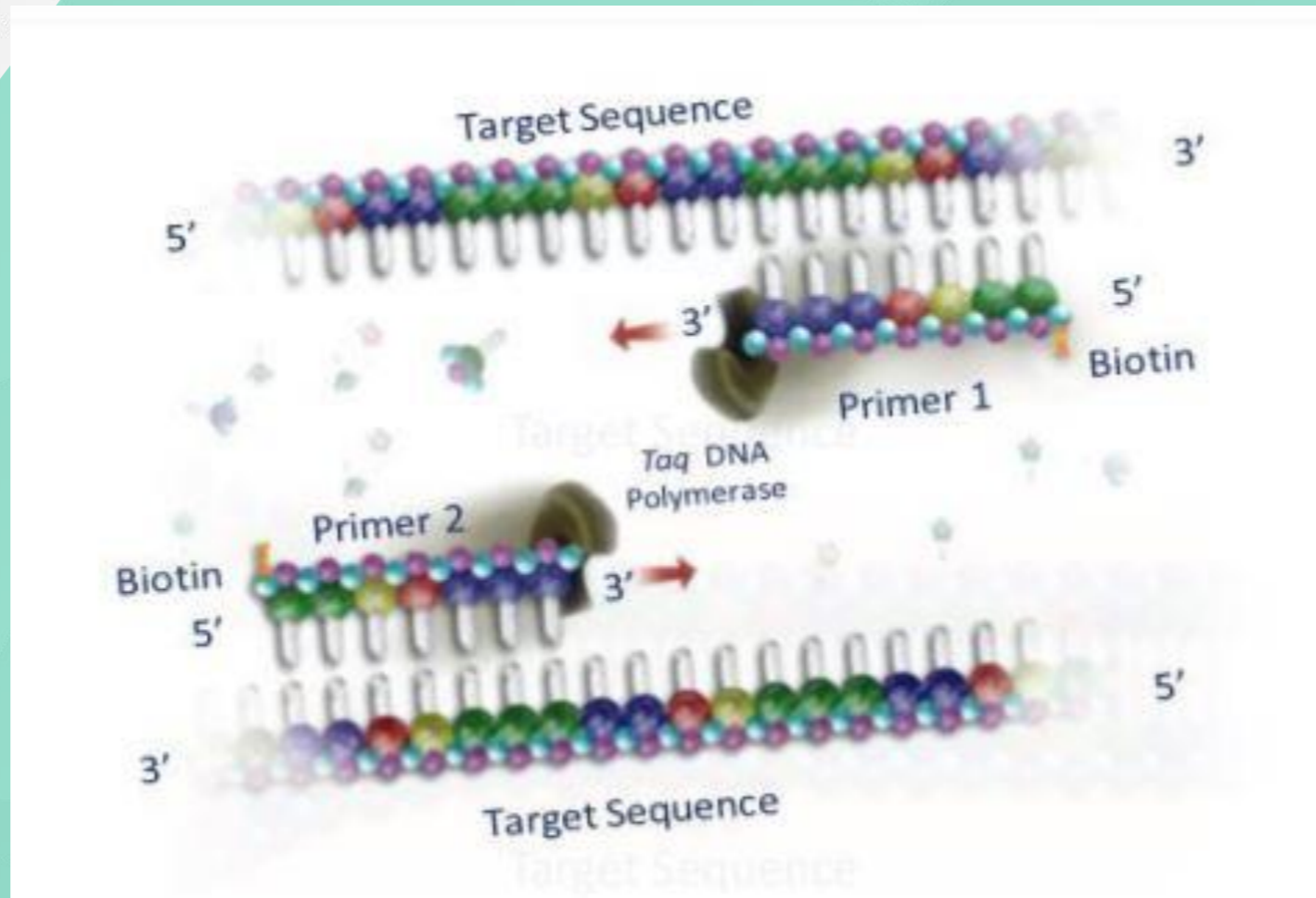
– Elongasi

Mengamplifikasi daerah yang sudah dihibridisasi oleh primer

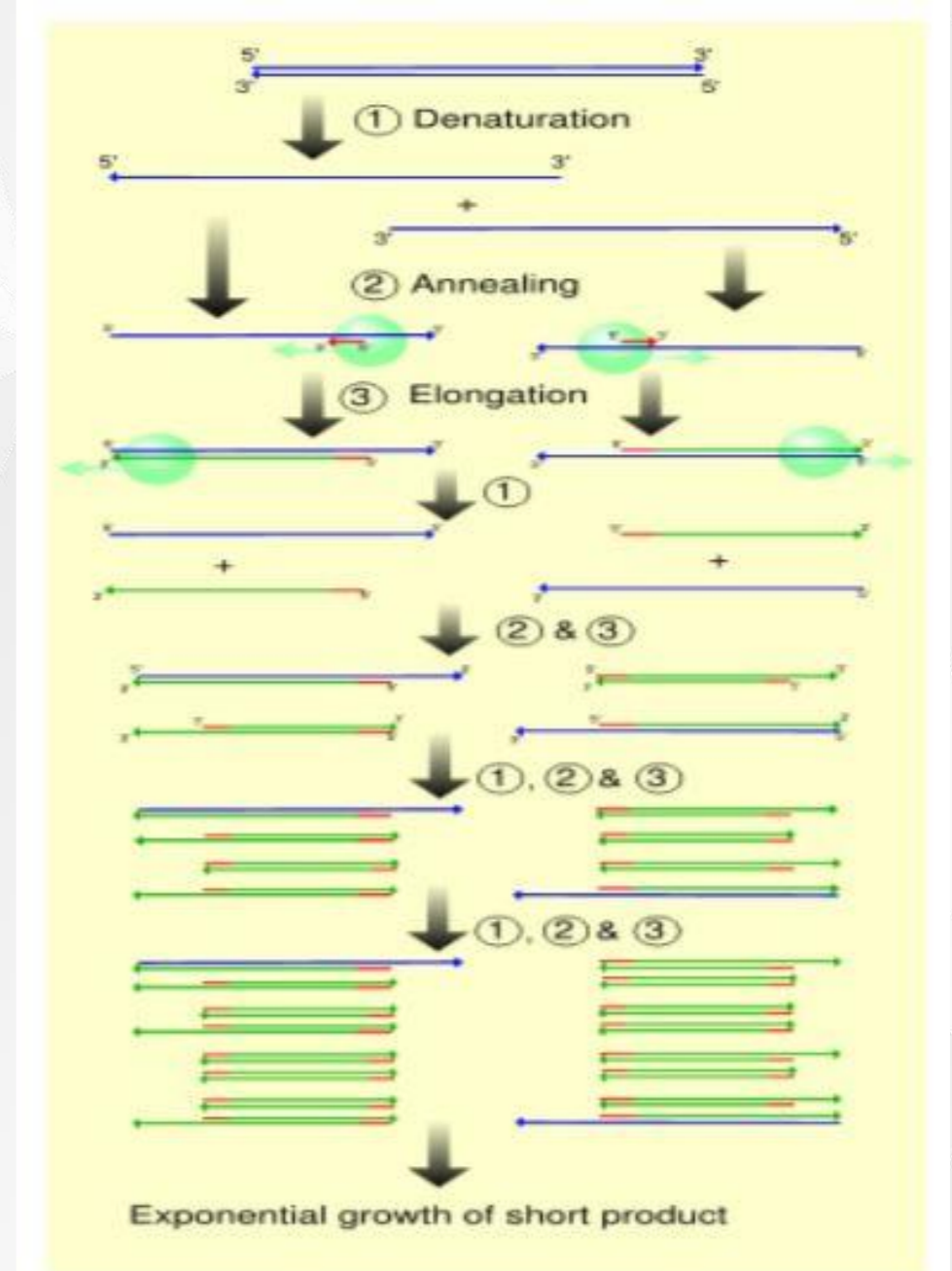


– Elongasi

Mengamplifikasi daerah yang sudah dihibridisasi oleh primer

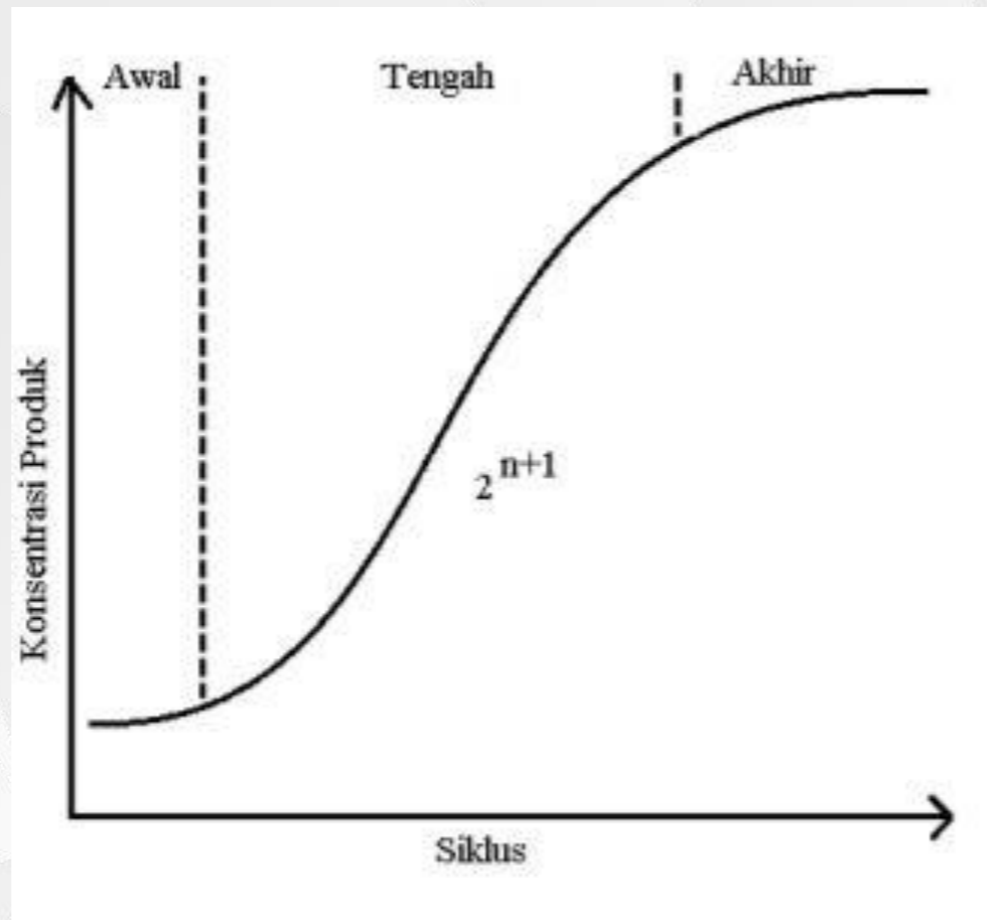


PCR Equipment





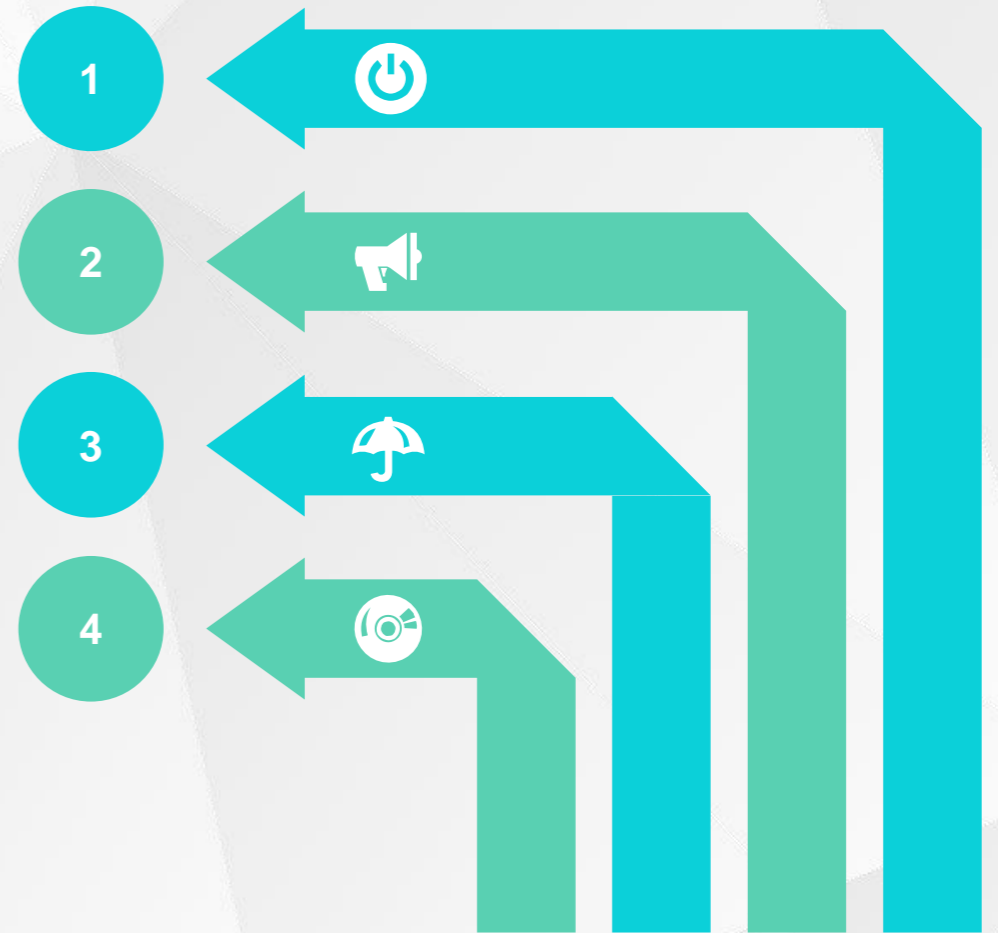
Pada fase eksponensial (tengah) penambahan produk PCR sebesar 2^{n+1} , maka dengan mengetahui penambahan produk ini dapat dihitung konsentrasi awal DNA target dalam sampel.



Setelah siklus ke-30-an biasanya mulai memasuki fase plateau (bahan habis, hasil sudah banyak).

Elektroforesis

- Analisis asam nukleat dan mendeteksi keberadaan produk PCR
- Perpindahan molekul yang bermuatan sebagai respon terhadap medan elektrik
- DNA bergerak dari kutub negatif (katoda) ke kutub positif (anoda).
- Kecepatan perpindahan dipengaruhi oleh:
 - Ukuran dan bentuk molekul, makin berat makin lambat.
 - Konsentrasi agarose
 - Tegangan listrik
 - Kekuatan buffer



3. Marker



Dibuat dengan memotong-motong plasmid yang telah diketahui ukuran dan urutan sekuensnya.



diketahui ukuran dan urutan sekuensnya. • atau dengan mencampur fragmen DNA yang telah diketahui panjangnya

Komponen Elektrolisis

1. Medium

- Agarosa
 - Paling mudah dengan gel agarosa horizontal.
 - Digunakan untuk molekul $>100\text{bp}$.
 - Konsentrasi rendah digunakan untuk molekul DNA besar, begitu sebaliknya.
- Poliakrilamid
 - Biasanya untuk molekul $<100\text{bp}$.
 - Disarankan menggunakan poliakrilamid dari pada menggunakan 3% agarosa



Buffer



- Buffer TBE (Tris-Base-EDTA) untuk fragmen asam nukleat berukuran 0,1–3 kb.
- Kapasitas buffering lebih besar, namun dihindari pada purifikasi asam nukleat dari gel

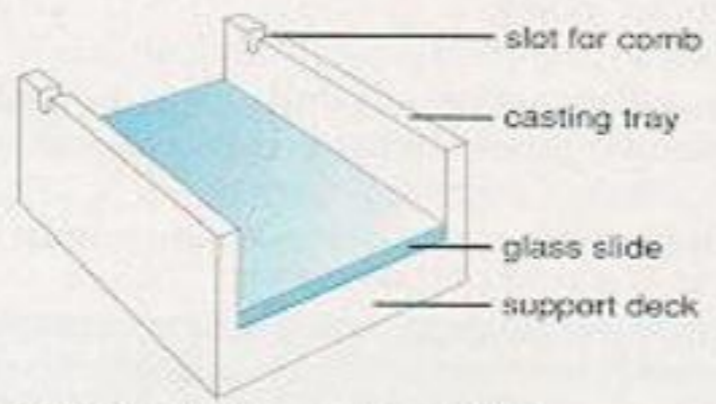


Buffer TAE (Tris-Asetat-EDTA) untuk fragmen asam nukleat berukuran > 4kb.

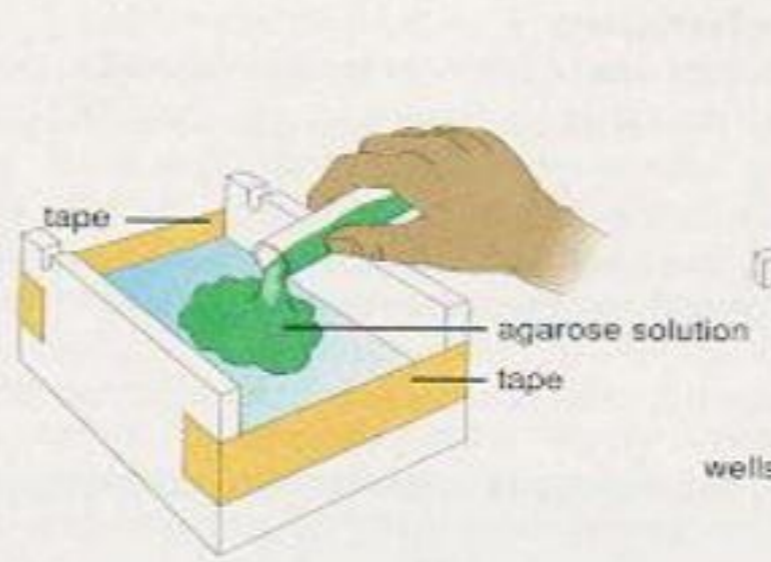
Paling sering dipakai namun lebih mudah kehilangan fungsinya

pada elektroforesis tegangan tinggi atau pada proses yang berlangsung

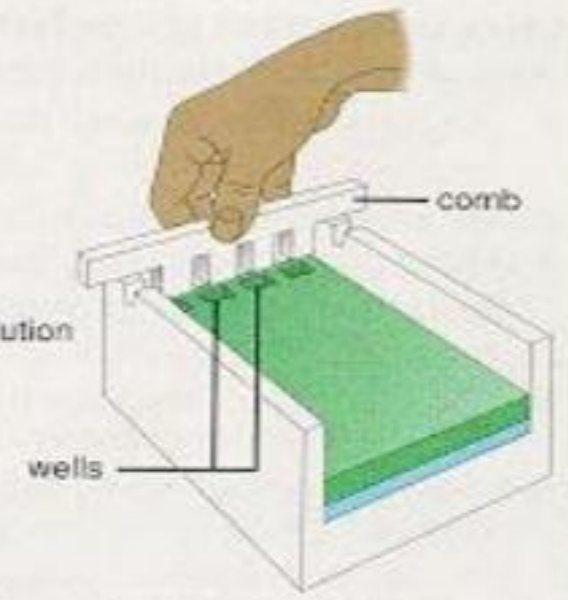
lama/berulang.



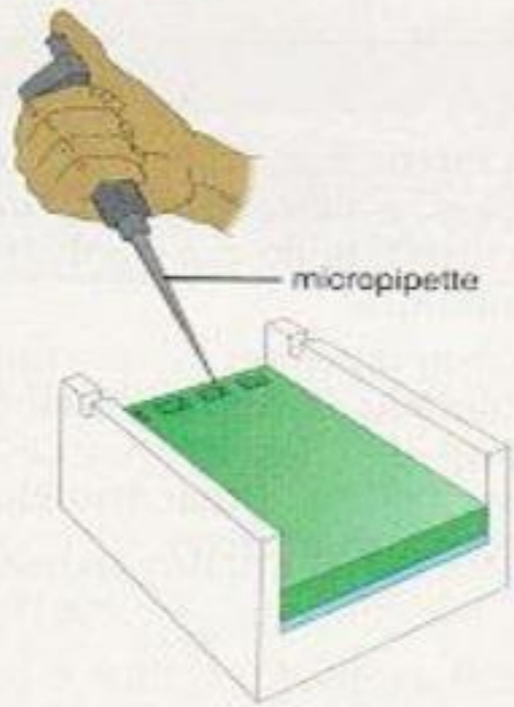
a. Casting tray for making gel slab



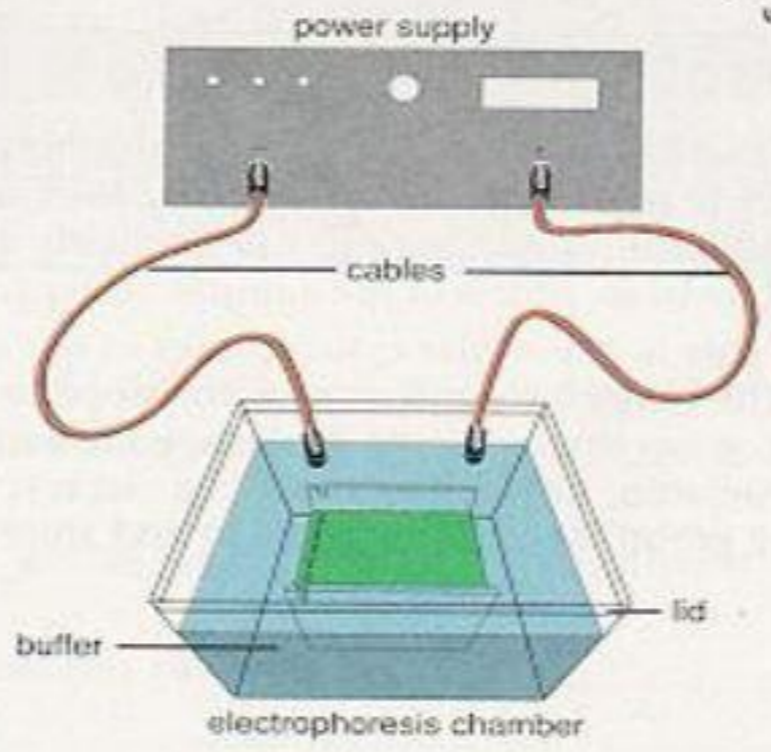
b. Agarose solution poured into casting tray



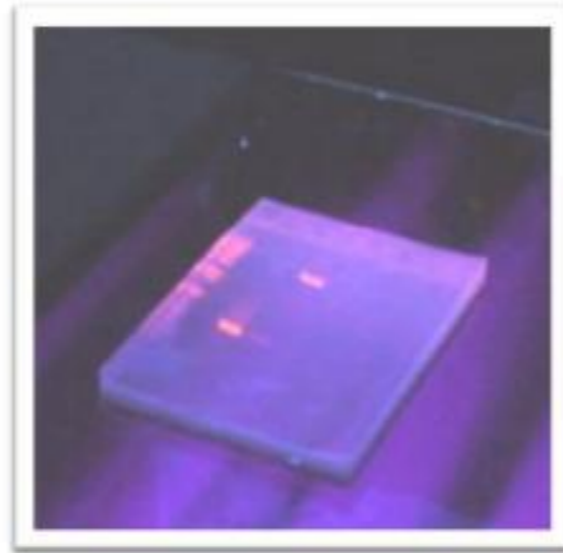
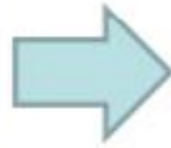
c. Comb that forms wells for samples



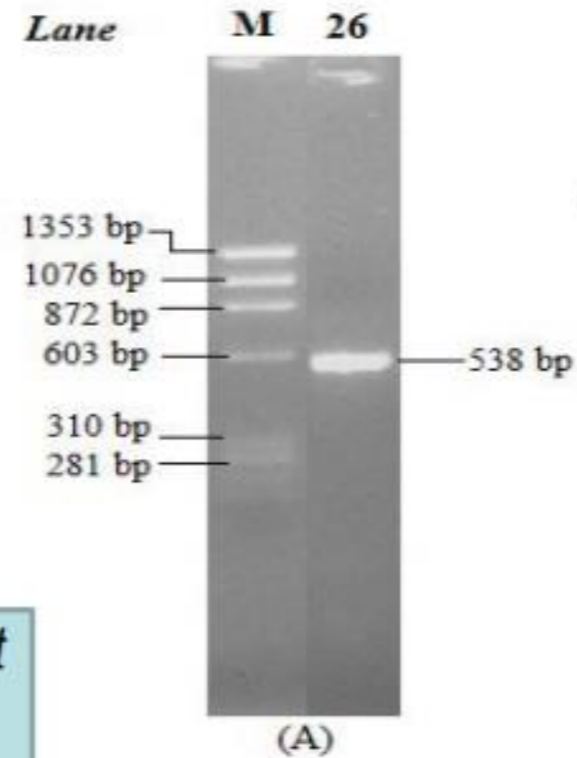
d. Wells that can be loaded with samples



e. Electrophoresis chamber and power supply



Sekuensing



Agarose 2%, Marker ϕ X174/HaeIII digest
(Toyobo), voltase 100 volt, 400 A, 30
menit



TERIMAKASIH

Suhardi, S.Pt. MP.,Ph.D