



[www.esaunggul.ac.id](http://www.esaunggul.ac.id)

# REKAYASA GENETIKA

## IBD 131

*By Seprianto S.Pi, M.Si*

Pertemuan 6

# BAKTERI REPLIKASI



# Sasaran Perkuliahan

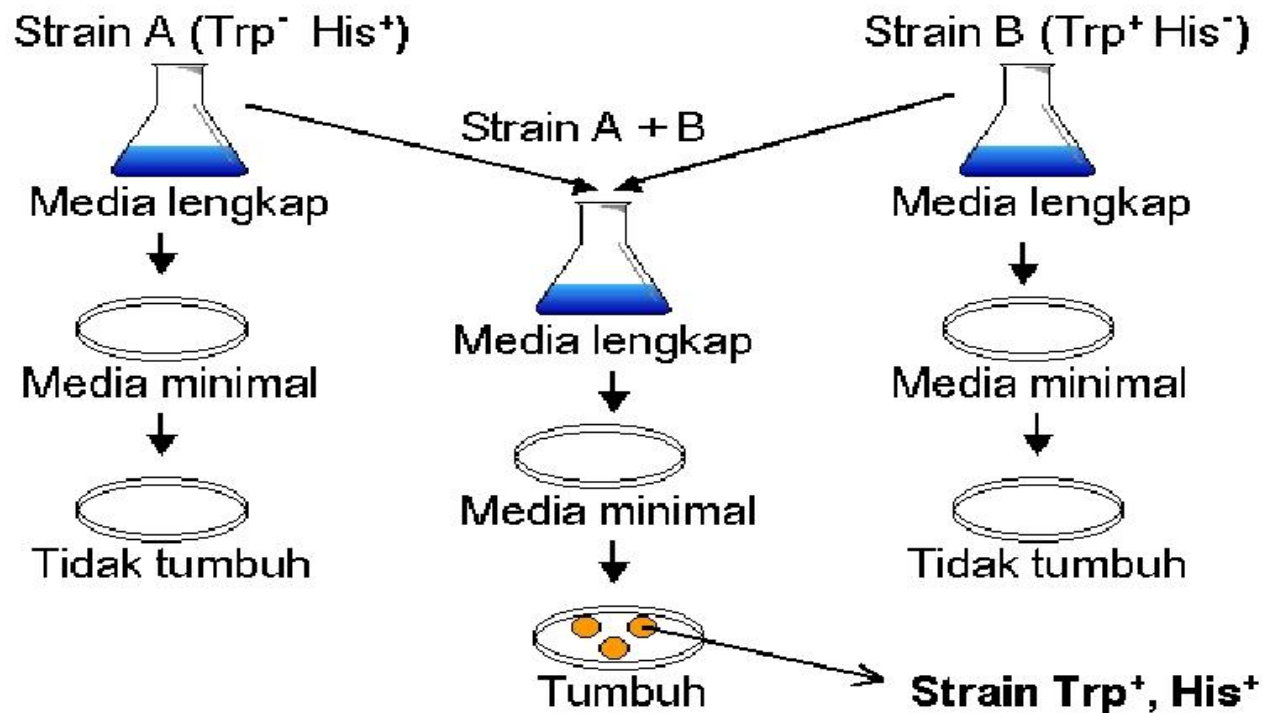
- Mahasiswa dapat Memahami dan menjelaskan tentang proses Replikasi terhadap bakteri yang digunakan agen dalam rekayasa genetika
- Mahasiswa memahami tentang teknik perpindahan genetik dalam bakteri
- Memahami dan mampu menjelaskan Respon bakteri terhadap kerusakan DNA dan teknik memperbaikinya

# Lederberg dan Tatum (1946)

- Percobaan Lederberg dan Tatum (1946) menunjukkan bakteri mempunyai mekanisme seksual.
- Menyebabkan terbentuknya kombinasi gen-gen yang berasal dari dua sel yang berbeda.
- Merupakan pertukaran DNA atau gen dari satu sel ke sel lainnya. Mekanisme seksual pada bakteri ini tidak bersifat reproduktif (tidak menghasilkan anak).

# Teknologi DNA Rekombinan berdasarkan mekanisme yang ada pada bakteri

## Prinsip Percobaan Lederberg dan Tatum



# Replication origins of different bacteria

*Escherichia coli*: 260 bp, 5 DnaA boxes



*Bacillus subtilis*: 560 + 200 bp, 15 DnaA boxes



*Thermus thermophilus*: 300 bp, 13 DnaA boxes



*Streptomyces lividans*: 600 bp, 19 DnaA boxes



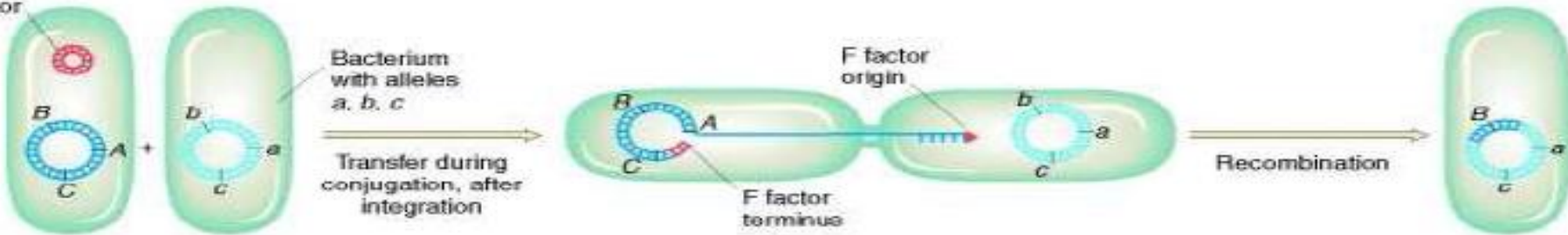
DnaA boxes are shown as red arrows  
AT-rich regions are shown in yellow

# Mekanisme pertukaran gen dan rekombinasi

- Rekombinasi genetik mengarah pada pertukaran gen antara dua molekul DNA untuk membentuk kombinasi gen baru dalam kromosom.
- Transfer genetik → transfer gen secara vertikal dan horizontal.
  - a. Vertikal : gen diturunkan dari satu induk kepada keturunannya.
  - b. Horizontal : transfer gen antara bakteri satu dengan bakteri lain melalui beberapa cara, yaitu transformasi, konjugasi, dan transduksi.

# Transfer Materi Genetik

(a) Conjugation  
F factor



(b) Transformation



(c) Transduction





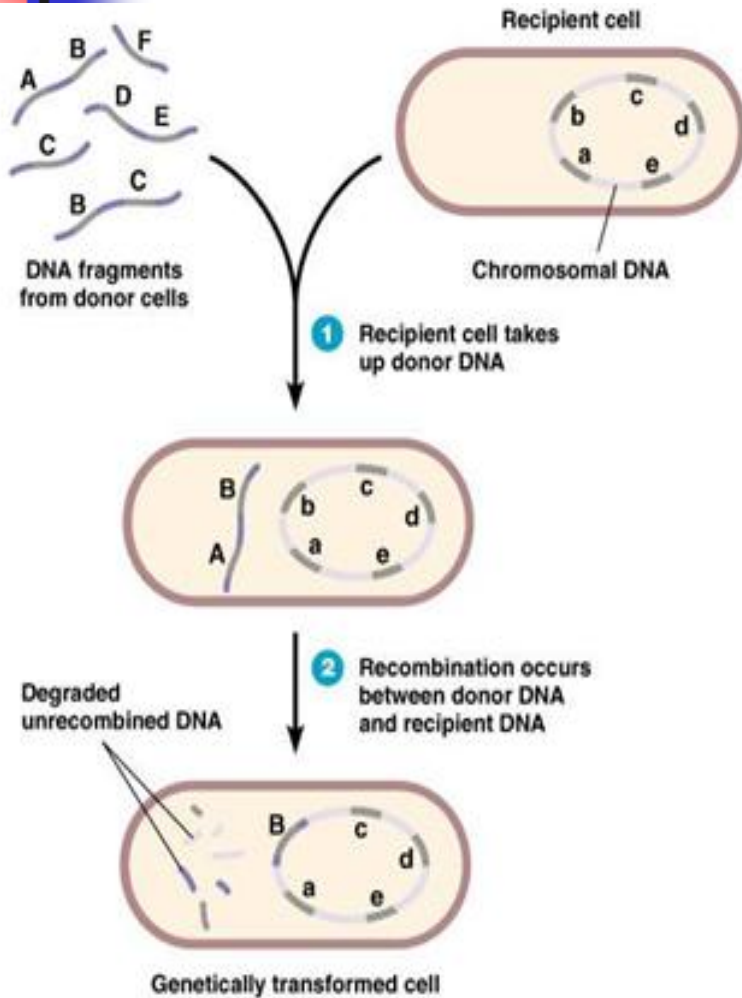
# 1. Transformasi

- Pada proses ini, gen ditransfer dari satu bakteri ke bakteri lain sebagai DNA telanjang dalam larutan.
- Proses transformasi dapat berlangsung dengan baik bila sel donor & sel resipien memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat.
- Saat transformasi berlangsung, sel resipien harus dalam keadaan **kompeten** (suatu kondisi fisiologis dimana terjadi perubahan struktur pada dinding sel & membran sel) → Sel bakteri resipien menjadi permeabel untuk menerima molekul DNA.

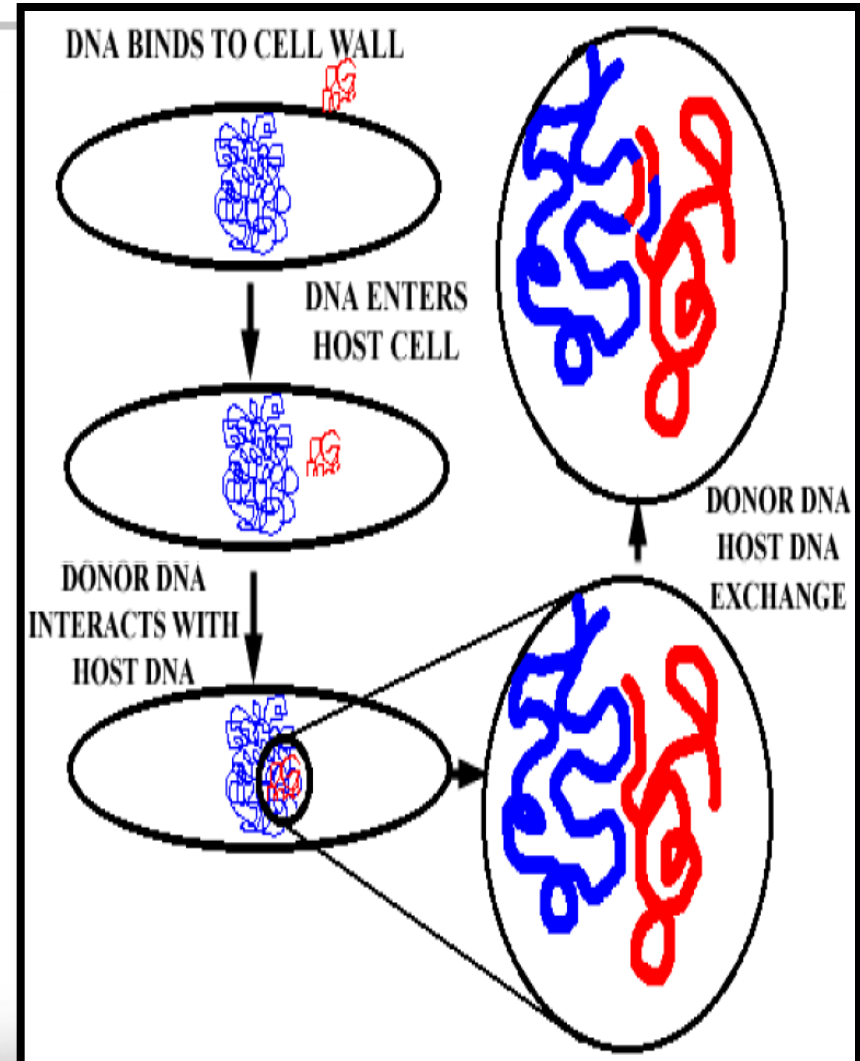


## Transformasi Alami

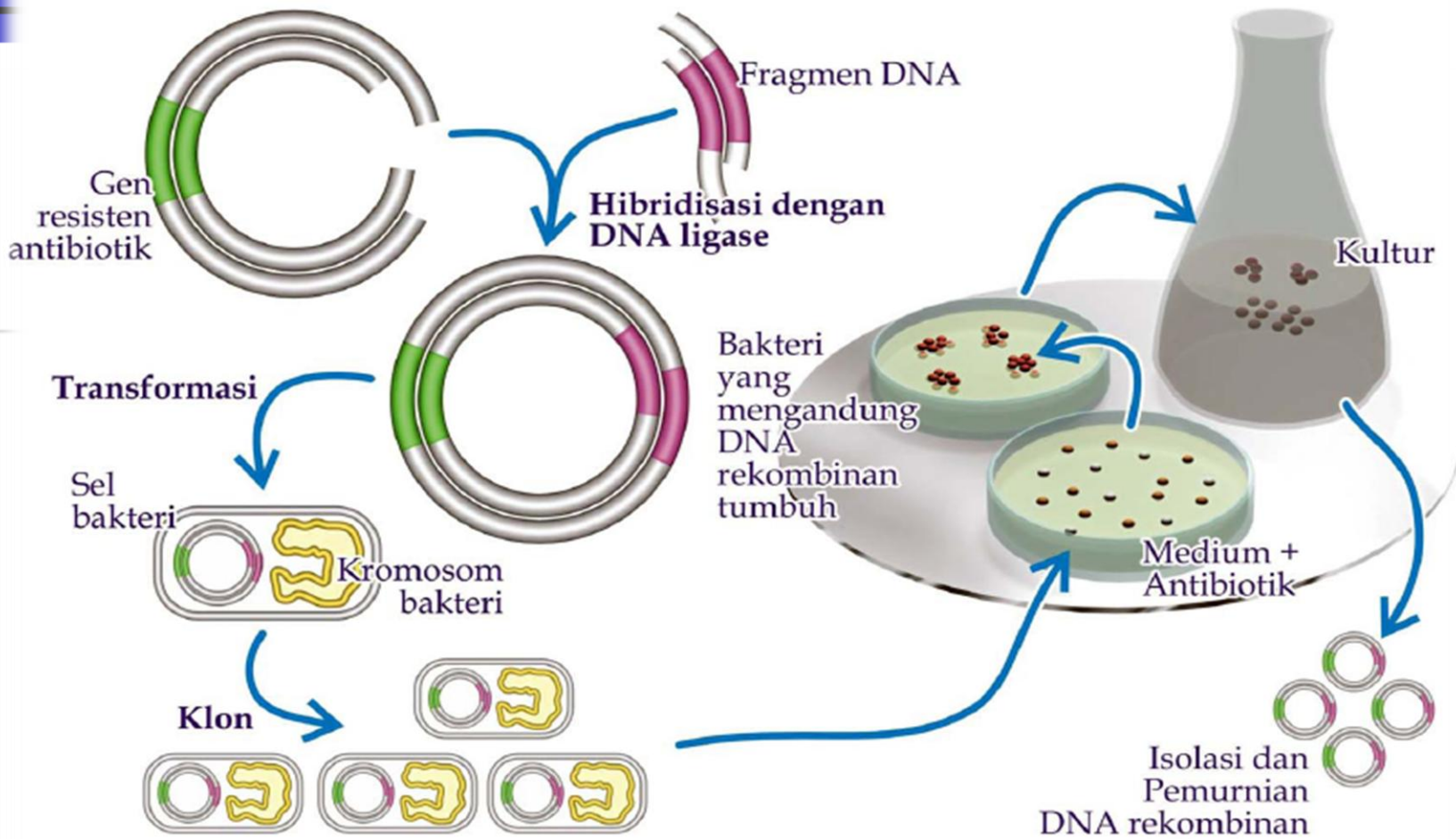
- Yang secara alami dapat melakukan transformasi yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif, seperti genus *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, dan *Acinetobacter*.



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.




# Ligasi dan Transformasi



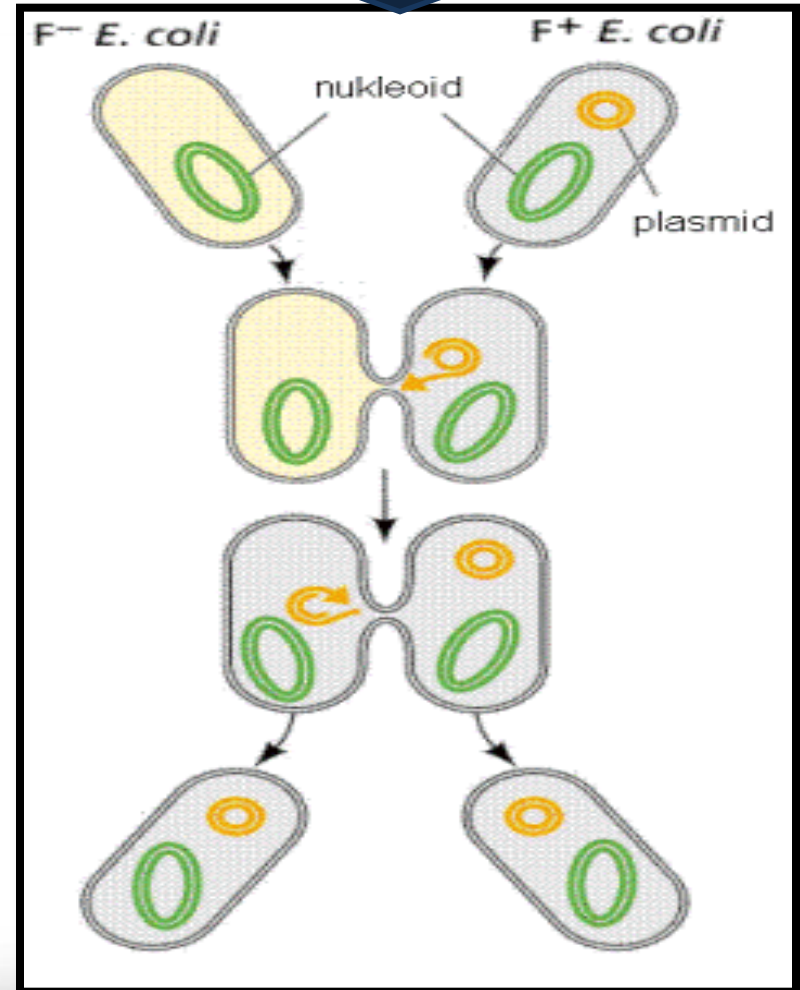
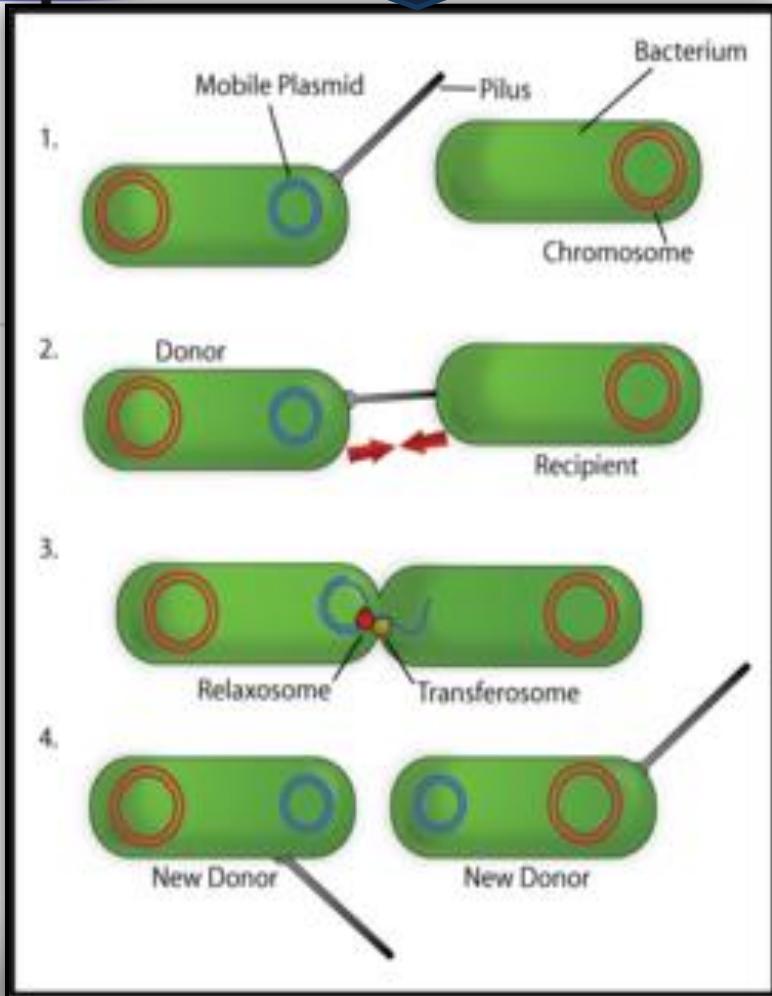
## 2. Konjugasi

- Merupakan proses transfer bahan genetik dari sel satu ke sel yang lain melalui kontak langsung.
- Konjugasi diperantarai oleh plasmid, yaitu molekul DNA sirkular yang terdapat bebas dalam sel bakteri dan bereplikasi secara independen (tidak tergantung kromosom bakteri).
- Proses konjugasi pada bakteri gram positif & negatif?

- 
- Pada bakteri gram negatif, proses konjugasi melibatkan pili seks yang merupakan perpanjangan dari permukaan sel donor yang akan melekat pada permukaan sel resipien → memperantarai kontak langsung antara sel donor dan sel resipien.
  - Pada bakteri gram positif, proses konjugasi umumnya dalam bentuk kontak langsung antara dinding sel donor dengan dinding sel resipien.

- Bakteri gram negatif

- Bakteri gram positif



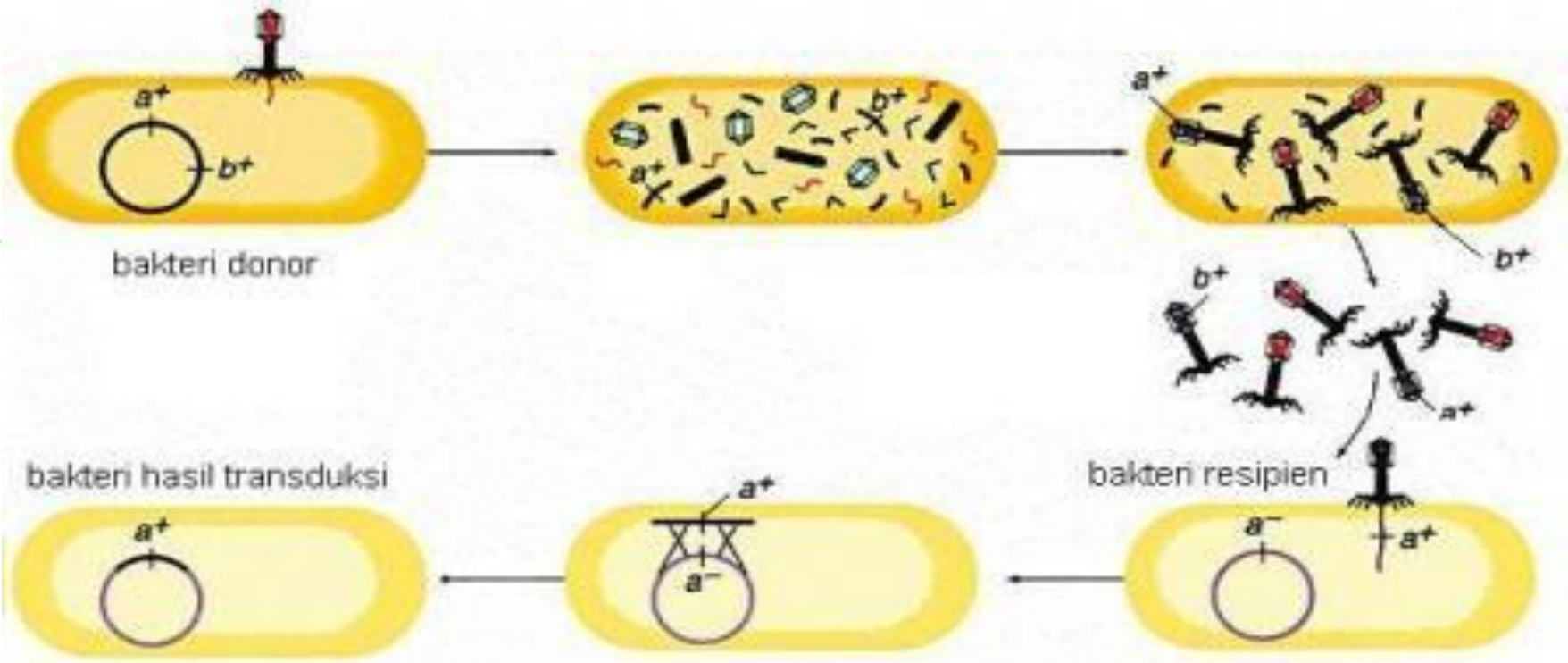
Proses konjugasi

### 3. Transduksi

- Merupakan proses transfer DNA dari sel donor ke sel resipien melalui bakteriofaga (faga).
- Proses transduksi dibedakan menjadi 2, yaitu :
  - a. Transduksi non-spesifik (umum) → dapat mentransfer bagian manapun dari DNA donor.
  - b. Transduksi spesifik (*specialized transduction*) → hanya mentransfer segmen DNA tertentu → diperantarai oleh faga lisogenik.



# Proses Transduksi

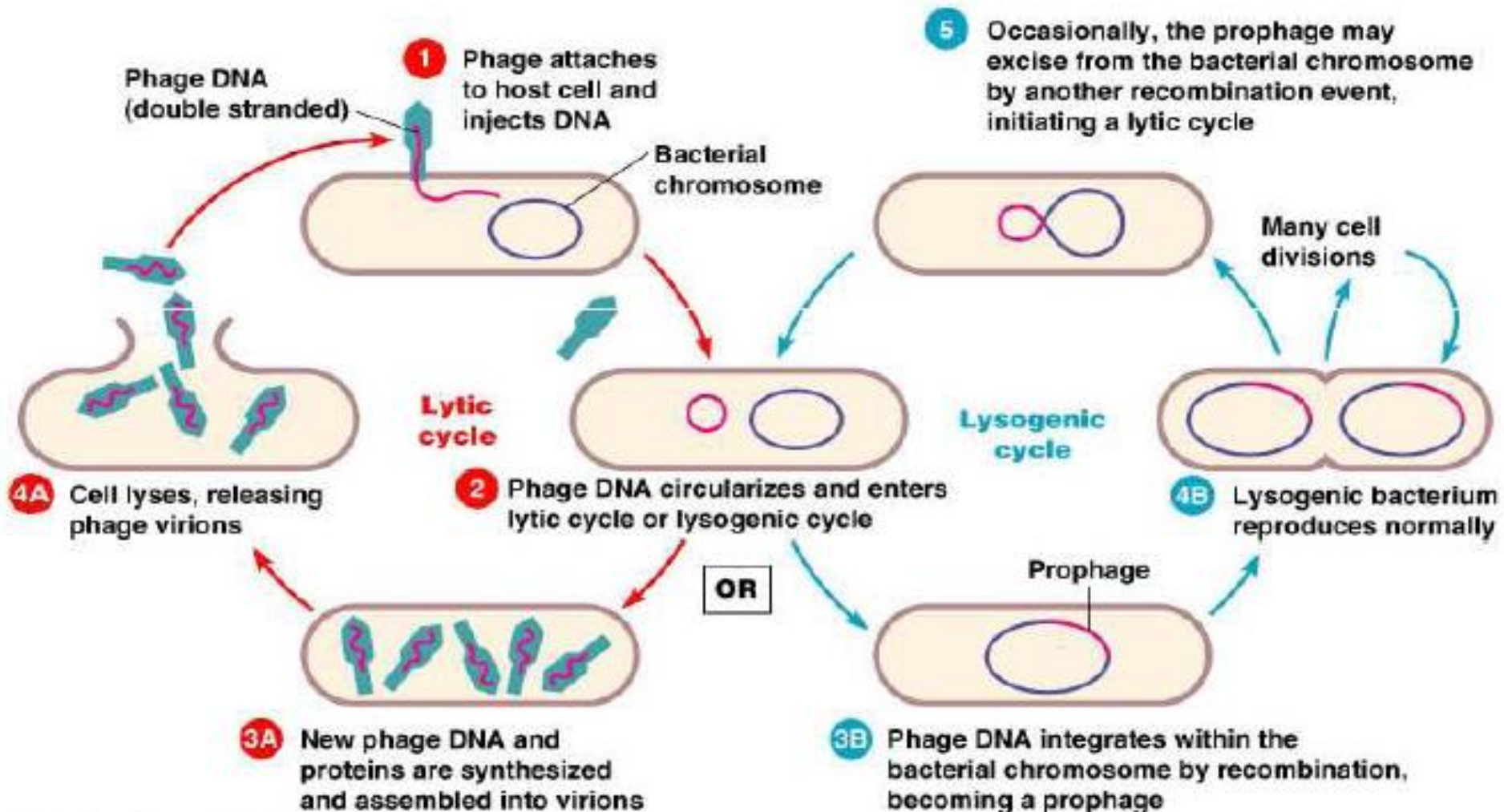




# Proses transduksi

1. Faga melekat pada sel bakteri & menyuntikkan DNA-nya.
2. Enzim faga mendegradasi DNA bakteri.
3. Sel menyintesis faga baru yg membawa DNA faga & DNA bakteri.
4. Sel lisis, faga lepas dari bakteri yg diinfeksi & menginfeksi sel bakteri baru.
5. Faga transduksi menyuntikkan DNA donor (gen bakteri donor).
6. DNA donor disisipkan ke kromosom bakteri resipien yg baru.

# SIKLUS HIDUP BAKTERIOFAGA



# TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN

- Kumpulan teknik atau metode yang digunakan untuk mengkombinasikan gen-gen secara buatan.
- (Proses: rekombinasi; Hasil: rekombinan)
- Teknologi DNA rekombinan meliputi :
  - a. Teknik untuk mengisolasi DNA.
  - b. Teknik untuk memotong DNA.
  - c. Teknik untuk menggabung atau menyambung DNA.
  - d. Teknik untuk memasukkan DNA ke dalam sel hidup sehingga DNA rekombinan dapat bereplikasi dan dapat diekspresikan.

# Manfaat Teknologi DNA Rekombinan

Teknologi DNA rekombinan telah memberikan manfaat di bidang Teknologi DNA rekombinan telah memberikan manfaat di bidang kesehatan.

- a. **Insulin manusia** telah diproduksi secara massal menggunakan bakteri *E.coli* dan telah diperdagangkan untuk mengobati penyakit diabetes. Contoh: Humulin R™
- b. **Vaksin hepatitis B** digunakan untuk mencegah infeksi virus hepatitis, telah diproduksi secara komersial menggunakan *S.cerevisiae* dalam skala industri

Contoh: HBV



# Manfaat Teknologi DNA Rekombinan

- c. **Hormon tumbuh manusia (Growth Hormon)** diproduksi menggunakan *E.coli* dan digunakan untuk mengobati kelainan pertumbuhan (misal: cebol). Contoh: Omnitrope





# Contoh Produk Rekombinan

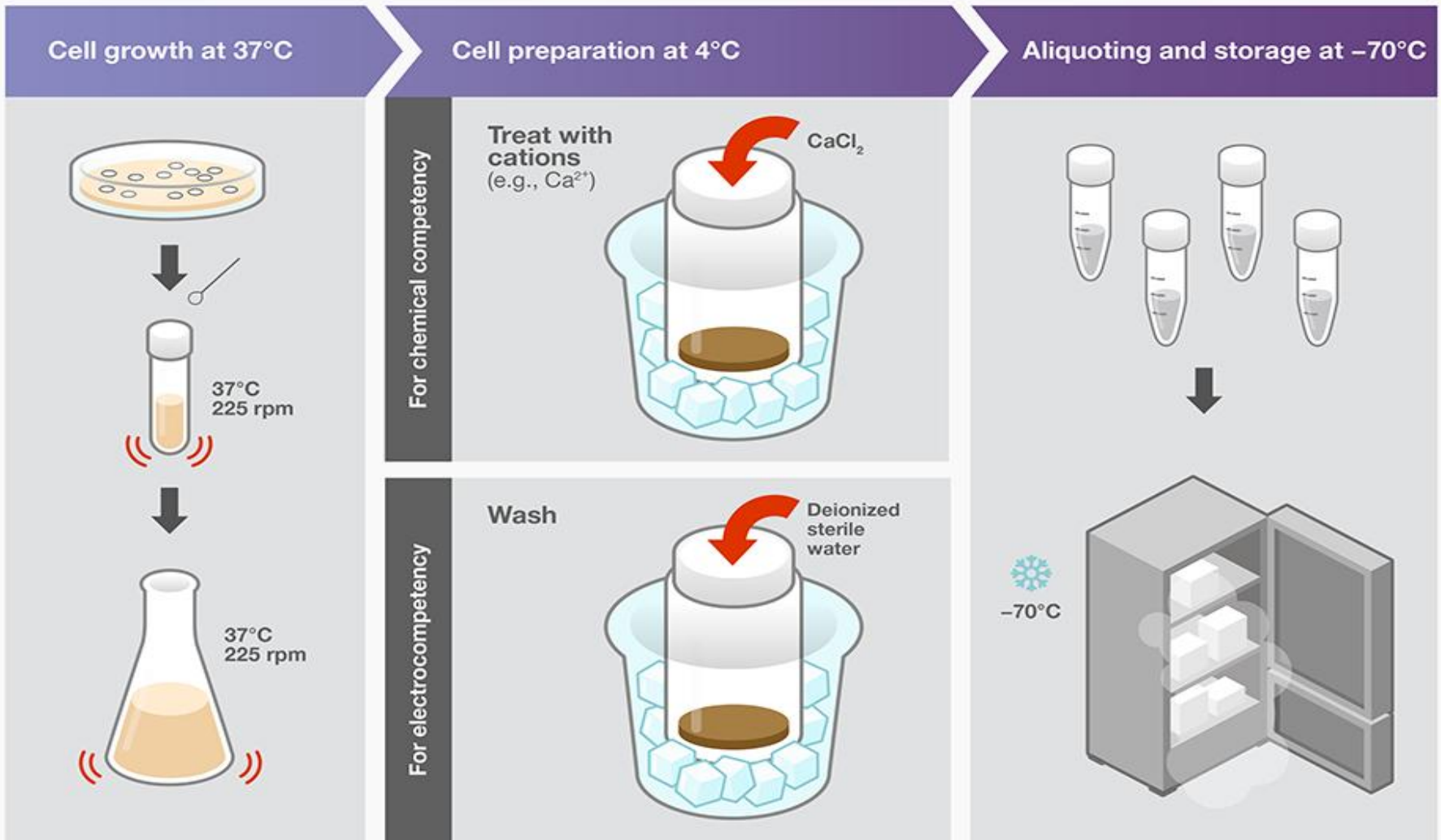
- Antibodi rekombinan
- Protein terapeutik : insulin, interferon, albumin serum manusia, *growth hormone*, antithrombin, faktor pembekuan darah, gonadotropin manusia.
- Vaksin : hepatitis B, herpes, influenza, malaria
- Vaksin DNA
- Terapi gen
- Produk pertanian : tanaman tahan penyakit, resistensi pestisida, bioinsektisida, fiksasi nitrogen
- Produk bioremediasi : pengurai lemak/minyak, penghilangan herbisida, pendegradasi pestisida.

# Kompetensi Sel dan Mekanisme Transformasi DNA Pada Bakteri

- sel kompeten adalah sel bakteri yang memiliki kemampuan untuk mengambil DNA eksogenous dan mengintegrasikan DNA eksogenous tersebut dalam genomnya
- Kompetensi sel ini dapat diperoleh secara alami dan buatan,
- Bakteri yang digunakan dalam mereplikat DNA asing
  1. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$
  2. E . Coli TOP 10
  3. *Escherichia coli* K12
  4. *Escherichia coli* BL21 ( ekspresi gen)



# Proses pembuatan Kompeten sel






# Respon Bakteri Terhadap Kerusakan DNA

- **Missense mutation**, adalah mutasi yang menyebabkan perubahan kodon spesifik suatu asam amino ke asam amino yang lain.
- **Nonsense mutation**, adalah mutasi yang menyebabkan perubahan kodon spesifik suatu asam amino ke kodon terminasi.
- **Insertion**, mengakibatkan suatu perubahan jumlah basa DNA pada gen dengan menambahkan sebagian dari DNA (pada nukleotidanya). Hasilnya, protein yang dibuat oleh gen tersebut tidak dapat berfungsi semestinya.




# Respon Bakteri Terhadap Kerusakan DNA

- **Deletion**, mengakibatkan perubahan jumlah basa DNA pada gen dengan menghilangkan sebagian dari DNA. DNA yang hilang akan mengubah fungsi dari protein tersebut.
- **Duplication**, terdiri atas sebagian DNA yang terkopi satu atau lebih dari satu kali. DNA yang terkopi akan mengubah fungsi dari protein tersebut.
- **Frameshift mutation**, menggeser pengelompokan dari basa dan mengubah pengkodean untuk asam amino. Protein yang dihasilkan biasanya tidak berfungsi.
- **Repeat expansion**, mutasi yang meningkatkan banyaknya rantai pendek DNA berkali-kali, mengakibatkan protein yang dihasilkan tidak dapat berfungsi dengan benar.



Menurut Garret & Klenk (2007), kerusakan DNA akibat bahan kimia, fisik, dan lingkungan diklasifikasikan menjadi empat tipe

1. Perubahan satu basa
  - a. Depurinasi
  - b. Deaminasi sitosin menjadi urasil
  - c. Deaminasi adenin menjadi hipoxantin
  - d. Alkilasi basa
  - e. Inseri atau delesi nukleotida
  - f. Penyertaan analog basa



Menurut Garret & Klenk (2007), kerusakan DNA akibat bahan kimia, fisik, dan lingkungan diklasifikasikan menjadi empat tipe

## 2. Perubahan dua basa

- a. Dimmer antartimin (pirimidin) yang diinduksi oleh sinar UV
- b. Ikatan silang agen pengalkil bifungsional

## 3. Pemutusan rantai

- Radiasi pengionan
- Disintegrasi elemen rangka (tulang punggung) oleh radioaktivitas
- Pembentukan radikal bebas oksidatif

## 4. Ikatan silang

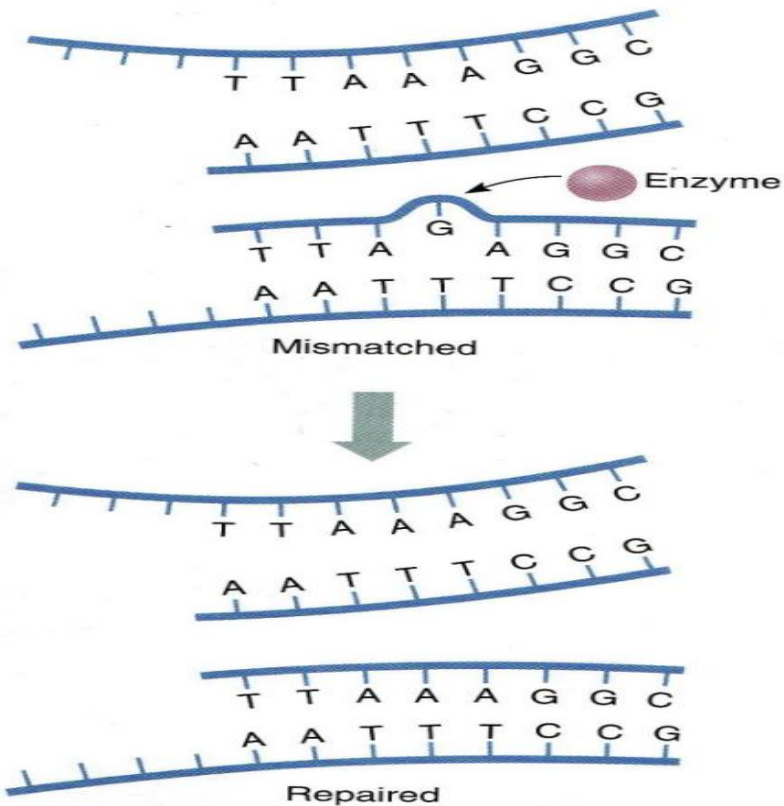
- a. Antara basa di untai yang sama atau berlawanan
- b. Antara DNA dan molekul protein (misalnya Histon)

# Mekanisme Perbaikan DNA

<b>Mekanisme</b>	<b>Masalah</b>	<b>Solusi</b>
<i>Mismatch repair</i>	Kesalahan penyalinan	Pemotongan untai yang diarahkan oleh metal, pencernaan oleh eksonuklease, dan penggantian
<i>Base excision repair</i>	Kerusakan satu basa yang timbul spontan akibat bahan kimia atau radiasi	Pengeluaran basa oleh N-glikosilase, pengeluaran gula tanpa basa, penggantian
<i>Nucleotide excision repair</i>	Kerusakan suatu segmen DNA secara spontan akibat bahan kimia atau radiasi	Pengeluaran oligomer sekitar 30 nukleotida dan penggantian
<i>Double strand break repair</i>	Radiasi pengionan, kemoterapi, radikal bebas oksidatif	Sinapsis, penguraian, penyusunan, dan ligasi.

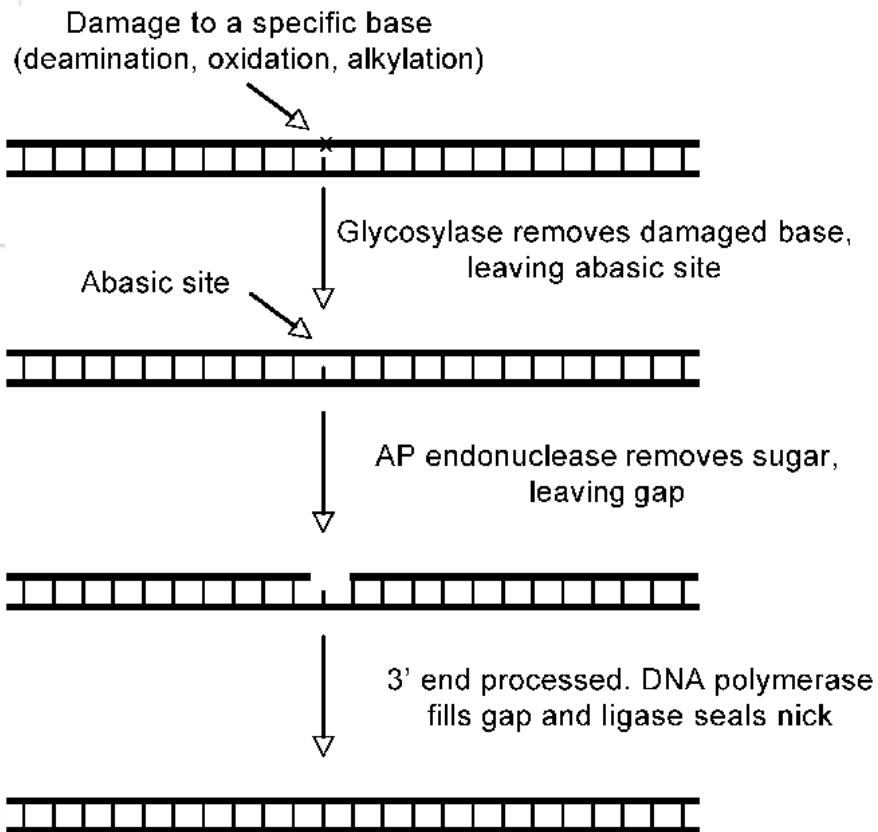
# Mekanisme Perbaikan DNA

## *Mismatch repair* (Perbaikan ketidakcocokan)



*Mismatch repair* memperbaiki kesalahan yang dibuat ketika DNA disalin. Protein spesifik memindai DNA yang baru dibentuk menggunakan metilasi adenin di dalam sekuens GATC sebagai titik referensi. Jika ditemukan ketidakcocokan atau lengkung kecil, suatu GATC endonuklease memotong untai yang mengandung mutasi di tempat yang berkorespondensi dengan GATC. Suatu eksonuklease kemudian mencerna untai ini dari GATC sehingga DNA yang cacat tersebut dapat dibuang.

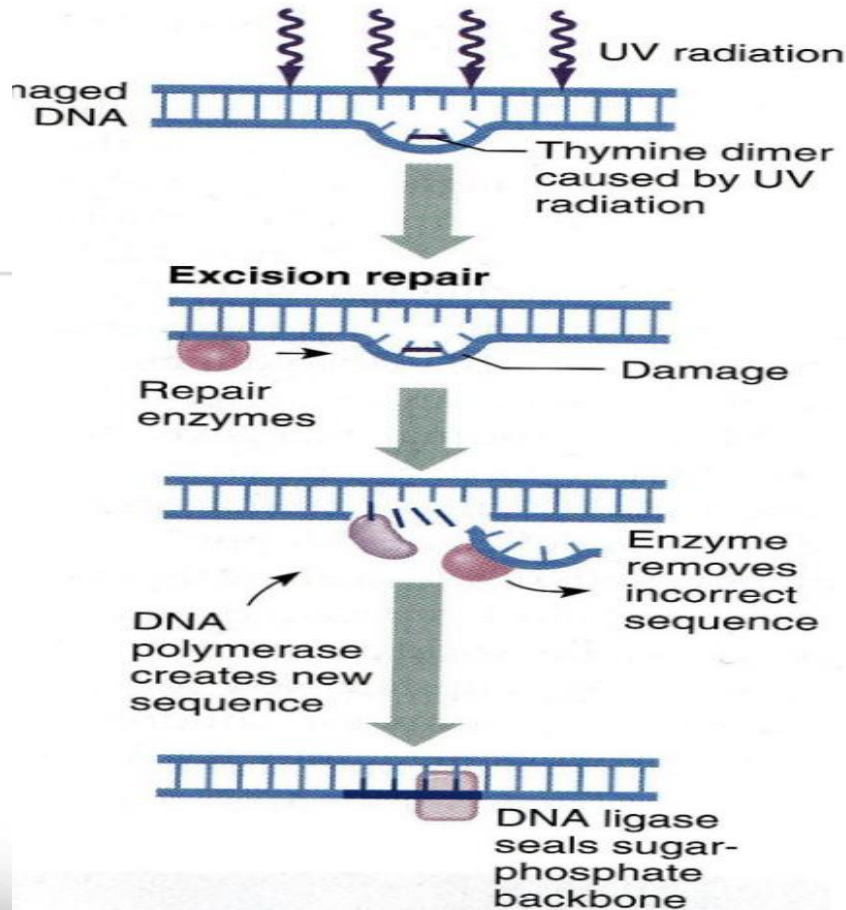
# Base excision repair (Perbaikan dengan memotong Basa)



Kerusakan dikenali oleh glikosilase, yang kemudian menghilangkan basa yang salah, kemudian membentuk abasic site. Kemudian AP endonuklease menghilangkan gula pentosanya kemudian DNA polimerase merepair rantai rusak tersebut.



## *Nucleotide excision repair* (perbaikan dengan memotong nukleotida)



Setelah kelainan dideteksi suatu nuclease eksisi (eksinuklease) memotong DNA dari bagian yang cacat. Celah ini kemudian diisi oleh polymerase dan disambung kembali.



## Bakteri dengan Mekanisme Perbaikan DNA yang Sangat Baik

- *Deinococcus radiodurans* merupakan bakteri yang mempunyai kemampuan untuk bertahan hidup terhadap radiasi yang sangat tinggi
- Bakteri ini mempunyai kemampuan untuk dapat bertahan hidup terhadap radiasi yang sangat tinggi karena bakteri ini mempunyai mekanisme perbaikan DNA yang cepat dan mempunyai banyak copy dari genomnya sendiri

THANK  
YOU



607132.wordpress.com

Noviani's Blog

