

TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN DAN APLIKASINYA DALAM EKSPLORASI MIKROBA LAUT

Dedi Noviendri^{*)}

ABSTRAK

Teknologi DNA rekombinan merupakan teknik penggabungan DNA dari spesies yang berbeda sehingga akan diperoleh organisme baru dengan sifat-sifat yang diinginkan. Pada pengembangan bioteknologi kelautan dan perikanan, teknik DNA rekombinan ini dapat digunakan antara lain untuk melakukan eksplorasi potensi dan biodiversitas organisme laut, seperti mikroba laut. Mikroba laut yang sebelumnya hanya merupakan kekayaan alam laut yang potensial dan belum memberikan nilai tambah, maka dengan teknologi DNA rekombinan dapat ditingkatkan nilai tambahnya untuk menghasilkan produk yang sangat prospektif. Secara garis besar, teknologi DNA rekombinan (rekayasa genetika) melibatkan penyisipan informasi genetik baru ke dalam organisme, biasanya bakteri, untuk memberikan kemampuan baru. Metode ini tidak mengikuti rangkaian prosedur yang pasti. Pemilihan metode bergantung kepada gen mana yang akan dipindahkan dan jenis organisme mana yang akan menerima informasi genetik baru. Pilihan tersebut bergantung pada sampai sejauh mana keterlibatan pilihan pribadi ilmuwan yang bersangkutan.

KATA KUNCI: teknologi DNA rekombinan, transformasi, kloning DNA

PENDAHULUAN

Tingginya biodiversitas dan kelimpahan mikroba laut menunjukkan potensinya sebagai sumber yang paling menjanjikan dan memberikan peluang besar kepada ahli-ahli bioteknologi kelautan untuk menemukan produk alami yang bernilai ekonomi. Menurut Dahuri (2003), khusus tentang biodiversitas laut, terdapat tidak kurang dari 782 spesies alga, 12 spesies lamun, 38 spesies *mangrove*, 850 spesies spons, 210 spesies karang lunak, serta ratusan ribu spesies berbagai biota lainnya, baik makro maupun mikro yang merupakan kekayaan alam lautan Indonesia. Selain spesies-spesies tersebut, kelompok organisme yang masih sedikit dieksplorasi dan didayagunakan adalah berbagai jenis mikroba laut. Semua itu merupakan potensi luar biasa sebagai sumber pangan, obat-obatan, bahan diagnostika, maupun aneka produk industri bernilai ekonomi tinggi.

Sejak ditemukannya enzim endonuklease restriksi yang dapat mengkatalisis pemotongan molekul DNA pada bagian atau tempat spesifik pada tahun 1971, maka lahirlah teknologi baru dalam bidang biologi molekuler yang disebut teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetika (Murdiyatmo, 1992). Teknologi DNA rekombinan merupakan teknik penggabungan DNA dari spesies yang berbeda sehingga akan diperoleh organisme baru dengan sifat-sifat yang diinginkan (Hala, 1999). Pada pengembangan bioteknologi kelautan dan perikanan, teknik DNA rekombinan ini dapat digunakan antara lain untuk eksplorasi potensi dan biodiversitas organisme laut.

Organisme laut (dalam hal ini mikroba laut) yang sebelumnya hanya merupakan kekayaan alam laut yang potensial dan belum memberikan nilai tambah, maka dengan teknologi DNA rekombinan dapat ditingkatkan nilai tambahnya menjadi produk yang sangat prospektif. Salah satu contohnya adalah dari suatu mikroorganisme (mikroba laut), dapat diisolasi gen-gen fungsionalnya yang menyandikan satu atau lebih enzim-enzim yang potensial yang dapat digunakan di dalam dunia medis. Adapun enzim-enzim yang dipandang penting di dalam dunia medis di antaranya adalah protease, lisozim, lipase, invertase, hemiselulase, kolagenase, glukosaminase, dekskanase dan katalase (Suhartono, 1989).

Dengan kemajuan teknologi molekuler ini, perpindahan gen dapat terjadi antar organisme yang sama sekali tidak berkerabat dekat, misalnya gen manusia dipindahkan ke bakteri atau gen manusia dipindahkan ke ternak babi dan lain sebagainya (Muladno, 2002). Kemungkinan memindahkan gen dari satu organisme ke organisme lain merupakan prospek yang sangat memikat, karena rekayasa genetika dapat mengurangi biaya dan meningkatkan penyediaan sejumlah besar bahan yang sekarang dipergunakan di dalam kedokteran, farmasi (Murdiyatmo, 1992), pertanian, dan industri (Prentis, 1990), maupun bidang kelautan.

TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN

Berhasilnya suatu teknik DNA rekombinan sangat didukung oleh cara-cara bagaimana kita menanganinya,

^{*)} Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan

mengembangkan mikroorganisme atau fage dari seleksi/kloning dari beberapa strain bakteri yang digunakan dalam sistem ini (Artama, 1991). Menurut Brown (1991), bahwa molekul DNA plasmid dan fage mempunyai sifat-sifat dasar yang dibutuhkan sebagai vektor kloning. Namun sifat-sifat ini tidak berguna tanpa adanya teknik-teknik eksperimen untuk manipulasi molekul DNA di dalam laboratorium. Langkah-langkah dasar dalam kloning gen/DNA membutuhkan beberapa keterampilan manipulasi. Beberapa keterampilan dasar yang diperlukan untuk melakukan kloning gen/DNA secara sederhana adalah: preparasi sampel DNA murni, pemotongan molekul DNA dengan enzim restriksi, analisis ukuran fragmen DNA, penggabungan molekul DNA dengan enzim ligase, memasukkan molekul DNA rekombinan ke dalam sel inang (cara yang paling umum adalah dengan cara transformasi), dan identifikasi sel yang mengandung molekul DNA rekombinan hasil kloning.

Komponen Eksperimen Kloning

Bila melakukan suatu eksperimen kloning, maka ada lima komponen utama yang harus dipenuhi agar suatu eksperimen dapat berjalan dengan baik. Komponen-komponen yang harus dipenuhi tersebut adalah DNA donor (*insert*), endonuklease restriksi, vektor, DNA ligase, dan sel inang (*host cell*). Fungsi dari masing-masing komponen tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari kelima komponen eksperimen kloning yang disebutkan pada Tabel 1, hanya dua topik yang akan dijelaskan pada tulisan ini mengingat urgensinya

kepentingannya. Dua komponen eksperimen kloning tersebut adalah endonuklease restriksi dan vektor.

Endonuklease restriksi

Endonuklease restriksi adalah enzim bakteri yang mengenal sekuen nukleotida spesifik dalam suatu molekul DNA *double-stranded*, dan memisahkan DNA pada lokasi tersebut. Enzim-enzim ini memotong DNA ke dalam fragmen-fragmen dari berbagai ukuran, tergantung dari jumlah waktu situs pengenalan enzim yang berulang dalam molekul. Endonuklease restriksi merupakan enzim yang umumnya diisolasi dari mikroorganisme prokariotik (Artama, 1991).

Menurut Brown (1991), bahwa ada tiga jenis endonuklease restriksi yang telah dikenal. Ketiga enzim tersebut masing-masing dibedakan oleh cara kerjanya yang agak berbeda satu sama lain. Endonuklease tipe I dan III agak kompleks dan hanya mempunyai peran yang sangat terbatas dalam rekayasa genetika. Di lain pihak, endonuklease restriksi tipe II adalah enzim pemotong yang begitu penting dalam rekayasa genetika (kegiatan kloning gen). Endonuklease tipe II yang digunakan dalam eksperimen kloning memiliki panjang sekuen pasangan basa pengenalan dari 4 sampai 8 nukleotida. Enzim ini dinamai berdasarkan sumber spesies bakteri asal isolasinya. Sebagai contoh, endonuklease restriksi *EcoRI* artinya adalah enzim restriksi pertama yang diisolasi dari bakteri *Escherichia coli* strain R, dan enzim *HindIII* artinya, enzim restriksi ketiga yang diisolasi dari bakteri *Haemophilus influenzae strain D* (Stanfield *et al.*, 1997) (Tabel 2).

Tabel 1. Komponen-komponen dari suatu eksperimen kloning

Komponen kloning	Fungsi
DNA donor (<i>insert</i>)	Sumber dari DNA atau gen yang diklon, salah satunya berasal dari mikroba laut
Endonuklease restriksi	Enzim digunakan untuk memotong DNA donor dan vektor pada lokasi spesifik, sehingga DNA donor dapat disambungkan ke dalam vektor
Vektor	Plasmid atau bakteriofage yang digunakan untuk mengintroduksi gen untuk diklonkan ke dalam suatu sel inang yang cocok
DNA ligase	Enzim yang digunakan untuk menggabungkan ujung sambungan (<i>splice</i>) dari vektor dan DNA donor, dan kemudian membentuk suatu vektor rekombinan
Sel inang (<i>host cell</i>)	Biasanya suatu bakteri atau <i>yeast</i> . Tempat diintroduksi vektor rekombinan ke dalam sel inang.

Sumber : Stanfield *et al.* (1997)

Sejak awal tahun 1970an, kira-kira sudah 300 jenis enzim restriksi telah ditemukan (Prentis, 1990). Enzim restriksi ini memiliki dua sifat yang membuatnya sangat bermanfaat. Sifat pertama adalah kekhususannya. Dalam hal ini tiap enzim mengenal dan memotong hanya urutan nukleotida tertentu pada DNA. Sifat kedua adalah kemampuan sebagian mereka untuk menghasilkan potongan runcing atau dikenal dengan ujung bangku/ujung lengket (*sticky ends*) ketika mereka memotong DNA yang beruntai ganda (Marx, 1991).

Kebanyakan endonuklease restriksi akan berfungsi secara memadai pada pH 7,4 dan dalam kekuatan ionik, biasanya NaCl serta semua endonuklease restriksi tipe II membutuhkan Mg^{2+} untuk berfungsi (Brown, 1991; Artama, 1991). Selain itu aktivitas endonuklease tipe II ini seringkali dipacu pula oleh senyawa pereduksi seperti 2-merkaptotanol atau ditiotretiol (Suhartono, 1989). Membuat kondisi yang tepat untuk aktivitas enzim adalah penting misalnya konsentrasi NaCl atau Mg^{2+} , apabila tidak tepat maka kondisi tersebut dapat menyebabkan tidak saja penurunan aktivitas, tetapi dapat juga mengubah spesifisitas enzim, sehingga pemotongan DNA terjadi pada urutan pengenalan tambahan yang tidak baku.

Vektor

Sejumlah vektor dari prokariotik, eukariotik dan vektor sintesis telah banyak digunakan dalam sistem kloning DNA. Secara garis besar ada 4 vektor yang sering digunakan dalam proses pengklonan gen (sebagai vektor kloning), yaitu plasmid, fage, kromosom buatan dari khamir (YAC=*yeast artificial chromosome*) (Suharsono, 2000) dan kosmid (Artama, 1991). Menurut Suharsono (2000), penggunaan jenis

vektor tergantung dari tujuan pengklonan. Pembuatan pustaka cDNA biasanya menggunakan plasmid sebagai vektornya, sedangkan pembuatan pustaka genom yang mengandung fragmen DNA besar biasanya menggunakan fage, kosmid atau YAC.

Vektor kloning harus memiliki situs pengenalan endonuklease restriksi, dimana informasi genetik dapat disisipkan. Beberapa vektor kloning telah direkayasa untuk mengandung suatu situs kloning ganda atau dikenal *multiple cloning site* (MCS), yang masing-masing mengandung beberapa situs restriksi yang berbeda. Karakteristik penting yang harus dimiliki oleh suatu vektor kloning adalah: (1) stabil dalam sel inang, (2) mengandung gen resistensi antibiotik tertentu, sehingga memudahkan seleksi dari gen rekombinan (Artama, 1991), (3) memiliki titik *ori* (sebagai titik awal replikasi), sehingga bisa bereplikasi atau multiplikasi sendiri. Dengan kata lain, plasmid tersebut dapat berbiak autonom (Marx, 1991) serta dapat mengontrol replikasinya sendiri, (4) memiliki daerah restriksi atau MCS, yang dapat dipotong dengan enzim restriksi endonuklease tertentu (Artama, 1991), (5) berukuran kecil, (6) dipotong pada situs tunggal oleh endonuklease restriksi, (7) tidak ditransfer dengan konjugasi, (8) cirinya dengan mudah dideteksi, dan (9) dengan mudah diisolasi dari sel (Stanfield *et al.*, 1997).

Kemudian berdasarkan kemampuan memperbanyak diri secara alami maka plasmid dapat dibagi dua, yaitu: (1) plasmid *stringent*, yaitu plasmid dengan kontrol replikasi ketat, dimana hanya terdapat 1 kopi plasmid tiap genom bakteri, (2) plasmid *relaxed*, yaitu plasmid dengan kontrol replikasi yang tidak begitu ketat, sehingga dalam satu sel dapat dijumpai 1-20 kopi plasmid (Artama, 1991). Jumlah

Tabel 2. Beberapa enzim restriksi dan situs pengenalnya

Nama enzim	Sumber bakteri	Situs pengenalnya
<i>Alu I</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AG*CT
<i>Bam HI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G*GATCC
<i>Cla I</i>	<i>Caryphanon latum</i>	AT*CGAT
<i>Eco RI</i>	<i>Escherichia coli</i>	G*AATTC
<i>Hae III</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG*CC
<i>Hind III</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	A*AGCT
<i>Kpn I</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GGTAC*C
<i>Not I</i>	<i>Nocardia otidis-caviarum</i>	GC*GGCCGC
<i>Pst I</i>	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCA*G

Sumber : Stanfield *et al.* (1997)

kopi suatu plasmid dapat merupakan *relaxed-control* (pengendalian yang lemah), yaitu dapat bereplikasi antara 10-200 kopi setiap sel. Tipe plasmid ini berguna untuk penelitian DNA rekombinan karena memiliki jumlah kopi yang banyak (*high copy number*). Plasmid ini bereplikasi tidak tergantung pada replikasi DNA kromosom sel inang (Nicholl, 1994). Sedangkan *stringent control* (pengendalian yang kuat) memperbanyak diri dengan kecepatan yang hampir sama dengan kromosom selnya, dan terdapat hanya dalam satu atau beberapa kopi plasmid per sel. Jumlah kopi ini menunjukkan jumlah molekul plasmid masing-masing ditemukan dalam satu sel bakteri (Brown, 1991).

Penanda Resistensi Antibiotik

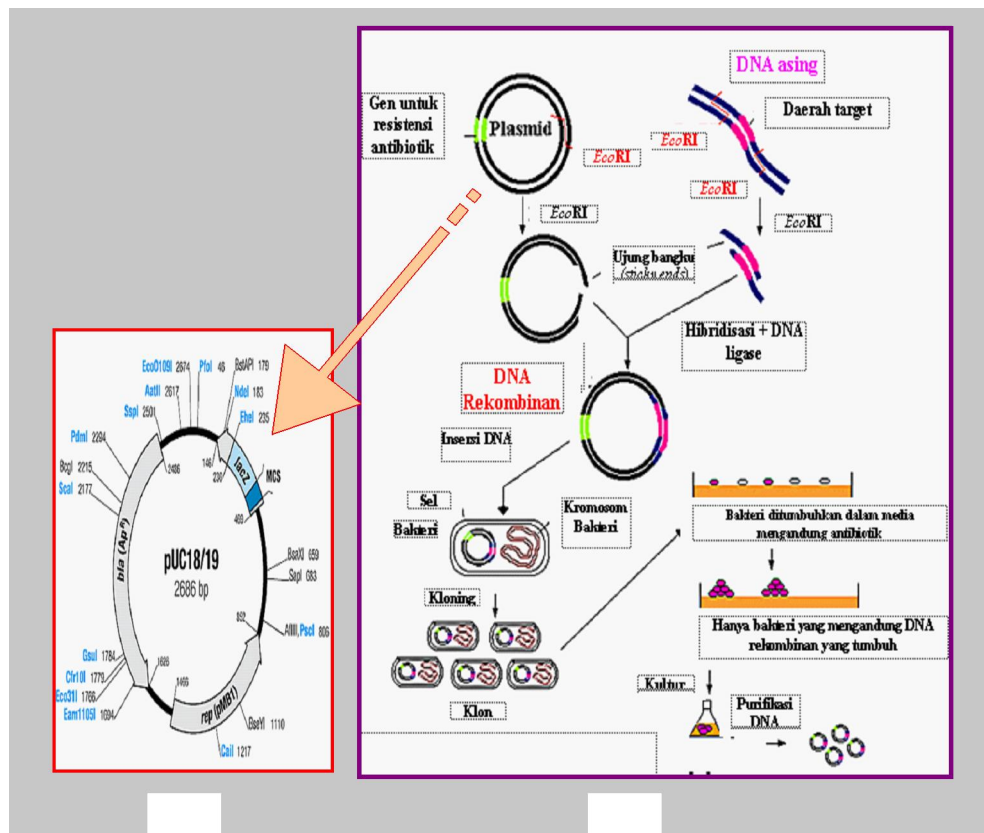
Untuk mengetahui berbagai aktivitas bakteri di habitat (lingkungannya), baik itu bakteri hasil rekayasa genetika maupun bukan hasil rekayasa genetika, perlu adanya penanda molekuler dengan menggunakan gen yang mudah diassai penampilan dan ekspresinya. Gen merupakan suatu segmen DNA yang mampu menyandikan protein (enzim). Banyak penanda molekuler yang dapat digunakan untuk menandai bakteri. Gen penanda (*marker gene*) tersebut nantinya dapat juga berperan sebagai gen pelapor (*reporter*

gene) yang akan menunjukkan aktivitas bakteri tersebut di habitatnya. Dengan demikian, aktivitas bakteri tersebut di lingkungan dapat dipantau sehingga langkah-langkah apa yang akan diambil untuk kegiatan selanjutnya dapat ditentukan (Wahyudi, 1997).

Di dalam laboratorium, penanda resistensi antibiotik sering digunakan sebagai suatu *selectable marker* untuk memastikan bahwa suatu bakteri dalam kultur mengandung gen penyandi antibiotik tertentu (Brown, 1991). Penanda resistensi antibiotik adalah penanda yang paling sering digunakan dan telah banyak dibuat sebagai dasar untuk pengembangan teknik penanda yang lainnya. Keuntungan dari teknik ini adalah dimungkinkan untuk menyeleksi populasi bakteri yang hidup dari bakteri yang ditandai, dan teknik ini dapat dilakukan hanya dengan teknik pencawanan dengan menggunakan menggunakan antibiotik yang sesuai.

Transformasi

Secara alami plasmid dapat dipindahkan ke sel inang baru melalui proses konjugasi atau dengan cara lain, tetapi di dalam laboratorium dapat dipindahkan secara artifisial, dengan proses yang disebut transformasi, yaitu plasmid dimasukkan ke dalam



Gambar 1. Peta vektor plasmid pUC18/19 (A), dan tahap-tahap kloning DNA (B) (<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/plasmid.html>).

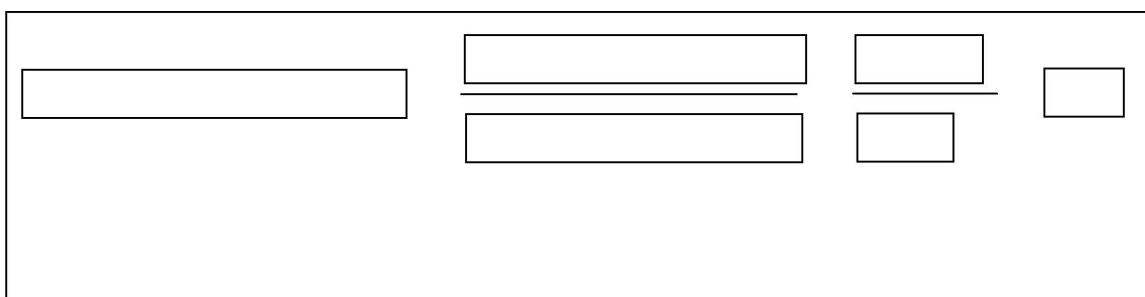
bakteri yang dibuat kompeten, sehingga untuk sementara dinding sel bersifat permeabel dan dapat dilewati molekul DNA kecil (Artama, 1991). Untuk memudahkan plasmid masuk ke dalam sel inang, maka sel inang harus dibuat kompeten terlebih dahulu. Dengan kata lain, sel yang digunakan dalam proses transformasi ini biasanya disebut dengan sel kompeten (Muladno, 2002). Dalam proses transformasi, sel kompeten yang dicampur dengan molekul DNA hasil penggabungan akan mengalami tiga kemungkinan, yaitu: (1) sel kompeten tidak kemasukan molekul DNA apapun, (2) sel kompeten kemasukan DNA vektor yang membawa gen target, dan (3) sel kompeten kemasukan DNA vektor yang membawa gen target (yaitu DNA rekombinan) (Muladno, 2002) (Gambar 1B).

Menurut Seno & Wirahadikusumah (1992), bahwa sel inang dapat dibuat kompeten dengan cara menginokulasi 30 mL media Luria Bertani (LB) dengan 1% biakan *E. Coli* yang berumur semalam, kemudian dikocok pada suhu 30°C sampai pertumbuhan disekitar fase log (\pm 3 jam). Pasta sel dipisahkan dengan sentrifugasi dingin selama 10 menit pada 8000 rpm, lalu dicuci 2 kali dengan volume yang sama CaCl_2 0,1 mM, serta sentrifugasi lagi dalam kondisi yang sama dan endapan sel dilarutkan dengan $\frac{1}{2}$ volume larutan 30% sukrosa dalam CaCl_2 0,1 mM.

Untuk mendeteksi tingkat keberhasilan terjadinya transformasi, maka perlu dihitung efisiensi transformasi yang terjadi. Efisiensi transformasi dihitung berdasarkan rumus berikut (Anwar, 1999) :

Jika segmen dari DNA donor disisipkan pada situs kloning ganda (MCS), dalam hal ini pada posisi gen *lacZ*, maka tidak akan dihasilkan suatu enzim fungsional yaitu enzim β -galaktosidase. Fenomena ini dikenal dengan dengan *insertional inactivation*. Hal ini sering digunakan untuk mendeteksi rekombinan-rekombinan dengan metode skrining yang dikenal sebagai skrining koloni biru putih (*blue-white colony screening*).

Kemudian plasmid yang dipakai sebagai vektor untuk kloning semula berasal dari plasmid *relaxed* yang telah dimodifikasi menjadi berbagai jenis plasmid yang terdapat bebas di pasaran seperti pBR322, pUC19 dan derivat-derivatnya. Contoh plasmid yang telah lama digunakan sebagai vektor untuk mengklonkan gen adalah plasmid pUC18/19 (Gambar 1A). Plasmid ini merupakan pengembangan dari pBR322. Plasmid pUC18/19 mengandung gen *lacZ* yang dapat menyandikan enzim β -galaktosidase. Bila menggunakan plasmid pUC18/19 sebagai vektor, maka koloni yang membawa plasmid rekombinan dapat dideteksi dengan menggunakan media tumbuh yang mengandung X-gal. Koloni bakteri yang mengandung plasmid pUC18/19 akan berwarna biru karena plasmid pUC18/19 mengandung gen *lacZ* yang dapat menghasilkan β -galaktosidase. Oleh karena itu koloni bakteri yang mengandung plasmid pUC18/19 akan berwarna biru bila ditumbuhkan pada media pertumbuhan yang mengandung X-gal. Hasil pengamatan koloni pada media tersebut memperlihatkan adanya koloni berwarna biru



Seleksi Biru Putih

Kebanyakan vektor kloning modern, memiliki suatu MCS dalam gen *lacZ*. Gen ini dalam keberadaan suatu induser seperti IPTG (isopropil- β -D-tiogalaktosida) akan menghasilkan enzim β -galaktosidase, yang akan mengkonversi laktosa menjadi galaktosa dan glukosa. Enzim ini dalam kondisi normal akan disintesis oleh *E.coli* jika ada laktosa, dan merubah laktosa menjadi galaktosa dan glukosa (Stryer, 2000). Bagaimanapun, induksi dapat terjadi jika suatu senyawa analog laktosa seperti IPTG digunakan (Nicholl, 1994).

menunjukkan terekspresikan gen *lacZ* tersebut (Wahyudi, 1997). Warna biru ini disebabkan karena enzim β -galaktosidase yang disandikan oleh gen *lacZ* yang dikandung pUC18/19 mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis X-gal (5-kloro-4-bromo-3-indolil- β -D-galaktopiranosida) suatu substrat kromogenik *inert* yang tidak berwarna menjadi derivat indigo yang berwarna biru (Artama, 1991). Enzim ini memecah X-gal menjadi galaktosa dan indoksil derivatif. Senyawa indoksil derivatif ini akan teroksidasi dengan adanya udara membentuk senyawa indigo yang berwarna biru. Reaksi hidrolisis senyawa X-gal yang tidak berwarna menjadi suatu senyawa yang

berwarna biru dengan adanya enzim β -galaktosidase dapat dilihat pada Gambar 2B.

Koloni bakteri akan berwarna putih bila pUC18/19 telah disisipi oleh DNA asing pada bagian *gen lacZ*. Dalam hal ini *gen lacZ* menjadi tidak berfungsi (tidak akan menghasilkan β -galaktosidase) karena telah disisipi DNA asing. Warna putih pada koloni diakibatkan adanya kerusakan pada *gen lacZ* yang disisipi gen target. Terbentuknya koloni berwarna putih berarti sel kompeten membawa DNA rekombinan (DNA plasmid dan gen target). Adapun koloni berwarna biru berarti sel kompeten yang tumbuh membawa DNA plasmid saja (tidak disisipi gen target) (Muladno, 2002) (Gambar 2A).

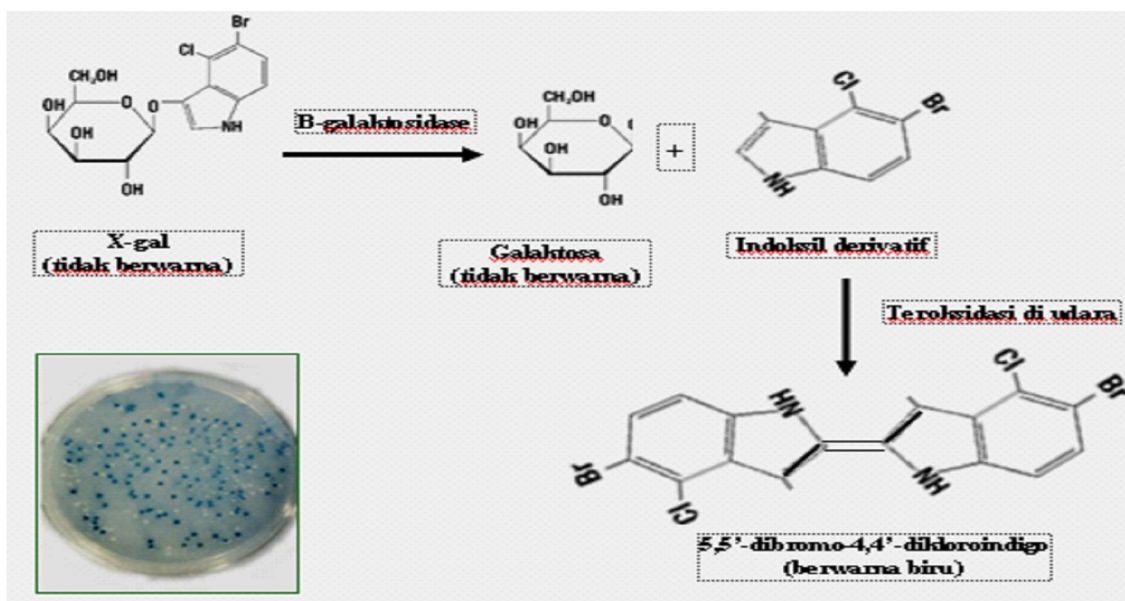
Dengan kata lain, bila *gen lacZ*-nya rusak atau dirusak maka sel akan membentuk koloni yang berwarna putih. Jadi, dengan mata telanjang bisa disimpulkan bahwa apabila sel bakteri membentuk koloni berwarna biru berarti *gen lacZ*-nya masih berfungsi, sedangkan apabila koloninya berwarna putih *gen lacZ*-nya sudah rusak dan tidak berfungsi (Muladno, 2002). Bentuk ini menurut Nicholl (1994) adalah dasar untuk metode skrining rekombinan secara langsung menggunakan X-gal substrat kromogenik.

APLIKASI TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN

Penggunaan teknologi DNA rekombinan untuk eksplorasi mikroba, terutama mikroba laut telah banyak dilakukan. Tujuan dari penggunaan teknologi

ini terhadap mikroba laut bermacam-macam. Seiring dengan penggunaan metode ini dengan tujuan yang bermacam-macam, maka secara tidak langsung ada modifikasi-modifikasi metode yang dilakukan. Metode ini tidak mengikuti rangkaian prosedur yang pasti. Pemilihan metode bergantung kepada gen mana yang akan dipindahkan dan jenis organisme mana yang akan menerima informasi genetik baru. Pilihan tersebut akan bergantung pada sampai sejauh mana keterlibatan pilihan pribadi ilmuwan yang bersangkutan (Prentis, 1990). Namun pada prinsipnya, teknologi DNA rekombinan yang dilakukan adalah sama.

Dalam prakteknya, penggunaan teknologi ini pada mikroba laut telah banyak dilakukan orang, diantaranya untuk konstruksi pustaka gen (Liebl, 2006), konstruksi gen klaster yang menyandikan enzim poliketida sintase I (PKS-I) (Grozdanov *et al.*, 2006), untuk menemukan senyawa metabolit anti-tumor (Calle, 2006), senyawa sitotoksik, (Webb *et al.*, 2006), inhibitor likopen β -siklase (suatu senyawa antioksidan) (Tofighi *et al.*, 2006), enzim baru yang memiliki aktivitas antimikrobal (Eck *et al.*, 2006), senyawa eksopolisakarida (EPS) baru (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006), untuk perbandingan keragaman genetik (biodiversitas) (Suwanto, 2004), untuk keperluan bioremediasi, dalam hal ini menemukan dan menghasilkan mikroba yang dapat mendegradasi tumpahan minyak di laut, selain itu untuk menemukan mikroba penghasil bahan baku plastik biodegradable, contohnya poli- β -hidroksialkanoat (PHA) (Noviendri, 2004). Jadi dengan demikian, mikroba laut yang



Gambar 2. Contoh seleksi koloni bakteri rekombinan dengan menggunakan X-gal (dikenal dengan seleksi biru putih)(A), Reaksi hidrolisis X-gal oleh enzim β -galaktosidase (B).

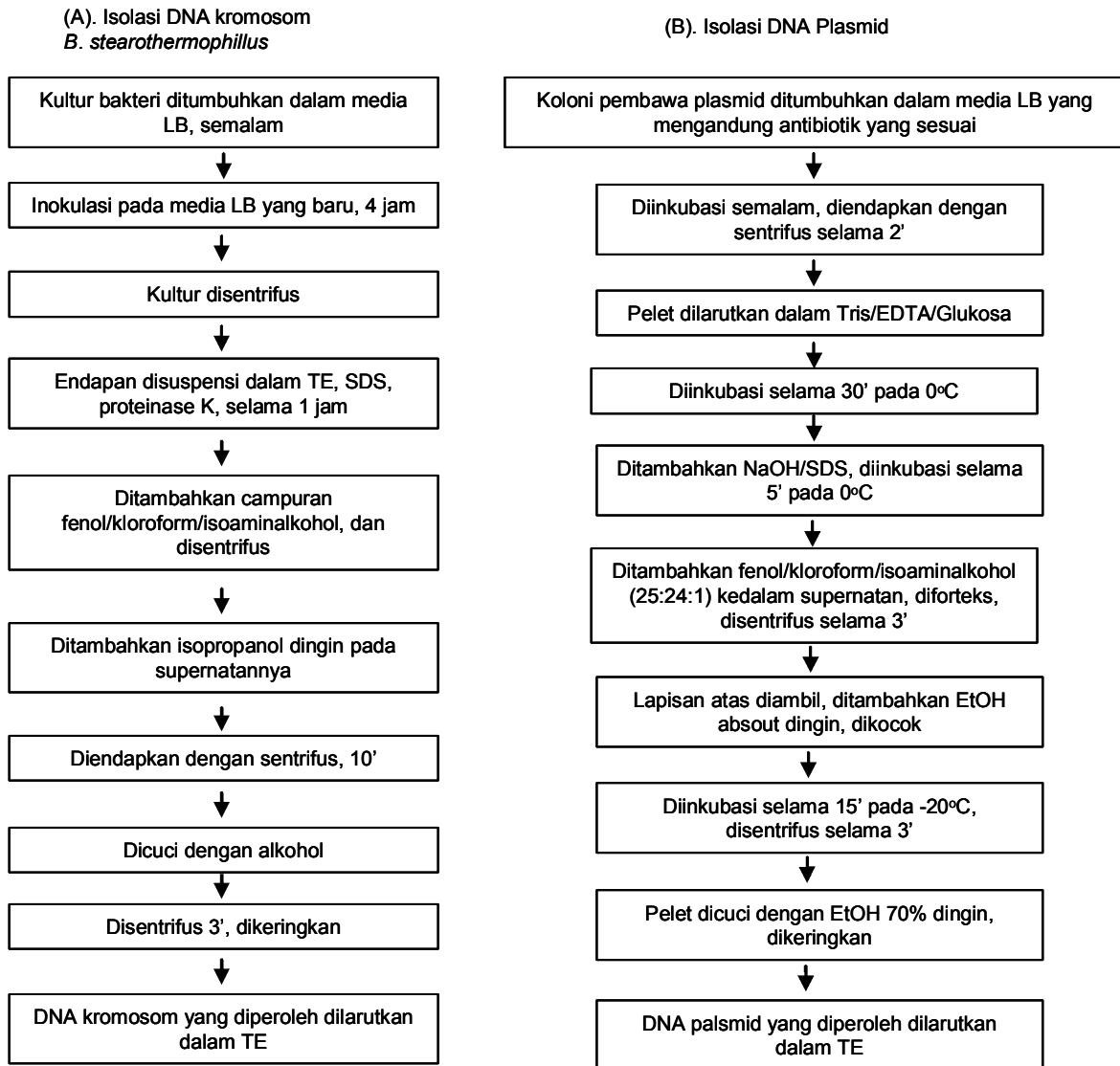
semula hanya sebagai penghuni laut yang merupakan kekayaan alam laut potensial, maka dengan adanya teknologi DNA rekombinan dapat ditingkatkan nilai tambahnya untuk menghasilkan suatu produk yang sangat prospektif.

Contoh penggunaan teknologi DNA rekombinan yang telah berhasil dilakukan adalah kloning gen protease *Bacillus stearothermophilus* DSM297 ke dalam *Escherichia coli* DH5 alfa (Suhartono *et al.*, 1995). Adapun tahap-tahap kloning gen yang telah

dilakukannya tersebut dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.

PENUTUP

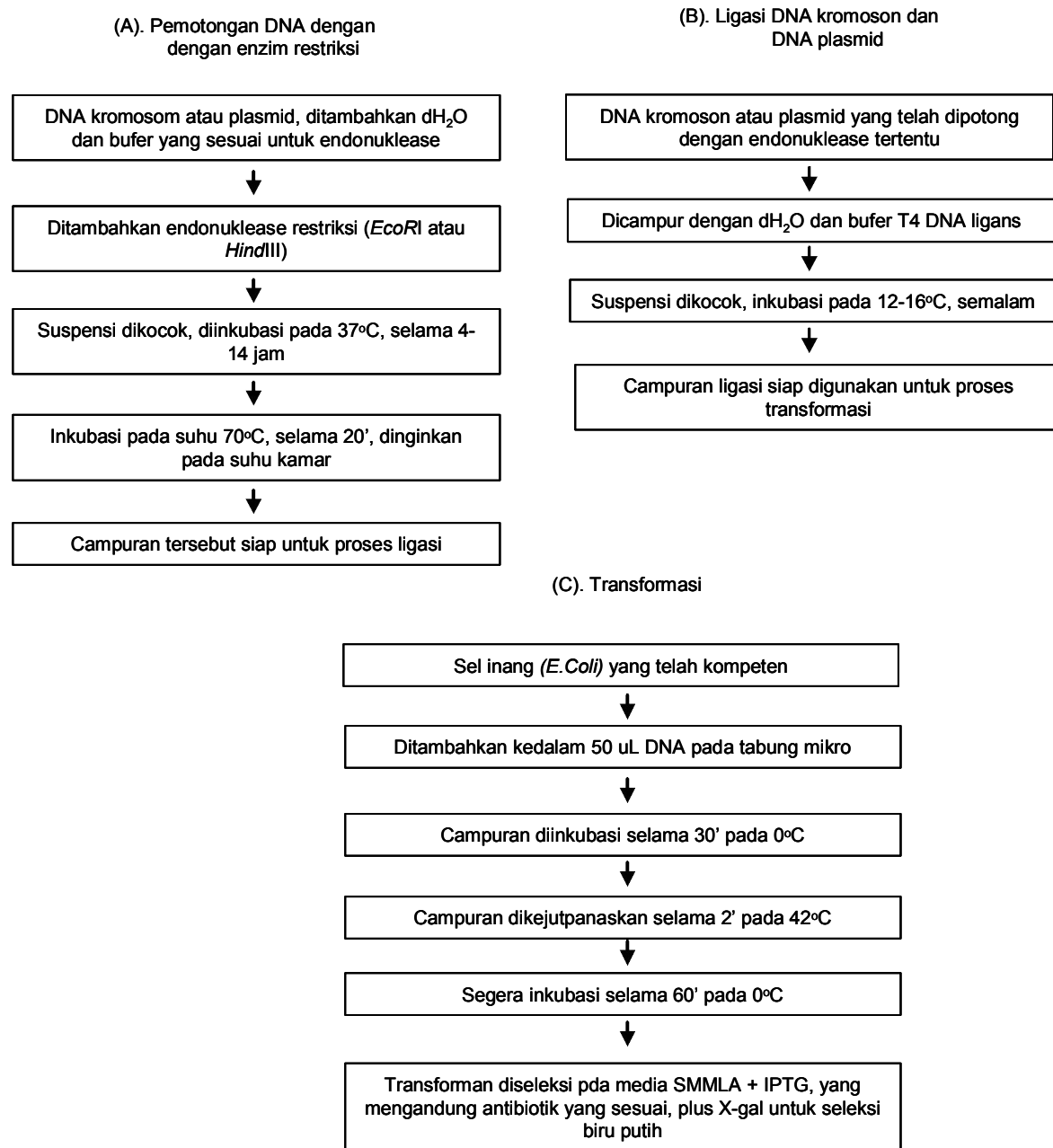
Pada pengembangan bioteknologi kelautan dan perikanan, teknologi DNA rekombinan ini dapat digunakan untuk eksplorasi potensi dan biodiversitas organisme laut. Organisme laut (dalam hal ini mikroba laut) yang sebelumnya hanya merupakan kekayaan



Gambar 3. Diagram alir tahap isolasi DNA kromosom (A), dan isolasi DNA plasmid (B), (Suhartono *et al.*, 1995).

Keterangan:

- LB : Luria bertani
- TE : Bufer Tris EDTA
- SDS : Sodium dodesil sulfat
- EtOH : Etanol



Gambar 4. Diagram alir tahap pemotongan DNA dengan enzim restriksi (A), ligasi DNA kromosom dan plasmid (B), dan transformasi (C) (Suhartono *et al.*, 1995).

Keterangan:

SMMLA : *Skim Milk Modified Luria Agar*

IPTG : Isopropil- β -D-tiogalaktosida

alam laut yang potensial dan belum memberikan nilai tambah, maka dengan teknologi DNA rekombinan dapat ditingkatkan nilai tambahnya untuk menghasilkan suatu produk yang sangat prospektif.

DAFTAR PUSTAKA

Anwar, S. 1999. *Pengklonan Gen-Gen yang Diinduksi oleh Aluminium pada Kedelai (Glycine max (L)*

Merryl). Disertasi Program Pascasarjana. IPB. Bogor. 28 pp.

Artama, W. T. 1991. *Rekayasa Genetika*. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi. UGM, Jogjakarta. 148 pp.

Brown, T. 1991. *Pengantar Kloning Gen*. Yayasan Essentia Medica, Yogyakarta. 274 pp.

Calle, F. D. L. 2006. Drug discovery of marine microorganisms as source of new antitumor compounds at pharmaMar. *Conference: From*

- Functional Genomics to Natural Products of Marine Microorganism*. June 21-24, 2006. Greifswald, Germany.
- Dahuri, R. 2003. *Keanekaragaman Hayati Laut*. PT Gramedia Pustaka Utama. 412 pp.
- Delbarre-Ladrat, C., Noel, J., Ratiskol, J., Siquin, C., Dion, M. and Jouault, S. C. 2006. Enzyme for The Engineering of marine bacterial exopolysaccharides. *Conference: From Functional Genomics to Natural Products of Marine Microorganism*. June 21-24, 2006. Greifswald, Germany.
- Eck, J., Meurer, G., Schulze, R., and Lorenz, P. 2006. Accessing metagenomes for industrial applications. *Conference: From Functional Genomics to Natural Products of Marine Microorganism*. June 21-24, 2006. Greifswald, Germany.
- Grozdanov, L., Fieseler, L., Piel, J. and Hentschel, U. 2006. Metagenomic analysis of secondary metabolic gene clusters from marine sponge associated microbial consortia. *Conference: From Functional Genomics to Natural Products of Marine Microorganism*. June 21-24, 2006. Greifswald, Germany.
- Hala, Y. 1999. *Penggunaan Gen Penanda Molekular untuk Deteksi Pelekatan dan Kolonisasi Vibrio harveyi pada Larva Udang Windu (Penaeus monodon)*. Tesis Program Pascasarjana IPB, Bogor. 16 pp.
- Liebl, W. 2006. Extremophiles: from genomes to enzymes. *Conference: From Functional Genomics to Natural Products of Marine Microorganism*. June 21-24, 2006. Greifswald, Germany.
- Marx, J. L. 1991. *Revolusi Bioteknologi*. Edisi 1. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta. 513 pp.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda, Bogor. 123 pp.
- Murdiyatmo, U. 1992. *Kloning dan over ekspresi struktural dehalogenase dari Pseudomonas cepacia MBA4 pada E. coli*. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi. LIPI. Bogor. p. 98-109.
- Nicholl, D. S. T. 1994. *An Introduction to Genetic Engineering*. Cambridge University Press, USA. 168 pp.
- Noviendri, D. 2004. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Poli- α -hidroksialkanoat (PHA) Sebagai Bahan Baku Plastik Biodegradabel dan Deteksi Gen Penyandi Enzim PHA Sintase*. Tesis Program Pascasarjana. IPB. Bogor. 78 pp.
- Prentis, S. 1990. *Bioteknologi Suatu Revolusi Industri yang Baru*. Erlangga, Jakarta. 200 pp.
- Seno, D. S. H dan Wirahadikusumah, M. 1992. *Kloning Gen Penisilin G* As karta. 279 pp.
- Stanfield, W. D., Colome, J. S. and Cano, R. J. 1997. *Theory and Problems of Molecular and Cell Biology*. *Schaum's outline series*. McGraw-Hill. p186-195.
- Stryer, L. 2000. *Biokimia*. Ed 4. Vol. 3. Penerbit Buku Kedokteran, EGC. Jakarta. 279 pp
- Suharsono, S. 2000. *Penuntun Praktikum Pelatihan Teknik Pengklonan Gen dan Pengurutan DNA*. Pusat Antar Universitas IPB, Bogor. 100 pp.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Dirjen DIKTI. PAU-IPB, Bogor. 322 pp.
- Suhartono, M. T., Chandra, K. P., Suwanto, A., Wu, I. M dan Junaidi, B. 1995. Kloning gen protease *Bacillus stearothermophilus* DSM297 ke dalam *Escherichia coli* DH5 alfa dan telaah ekspresinya. *Lap. Pen. Dikti-Dikbud*. PAU-IPB, Bogor. 62 pp.
- Suwanto, A. 2004. Bioteknologi untuk menggali potensi mikroorganisme laut. *Forum Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Indonesia: "Optimalisasi Pemanfaatan Sumberdaya Laut Melalui Pengembangan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan"*, Jakarta, 25 Maret 2004.
- Tofighi, H., Fazeli, M. R. and Mirzae, S. 2006. Computer aided test and selection for lycpene α -cyclase inhibitors: Molecular docking of Structurally diverse herbicidal Inhibitors in *Dunaliella salina* CCaP 19/18. *Conference: From Functional Genomics to Natural Products of Marine Microorganism*. June 21-24, 2006. Greifswald, Germany.
- Wahyudi, A. T. 1997. Gen penanda molekuler pada bakteri (*Molecular Marker Gene in Bacteria*). *Hayati*. 4(1): 27-29.
- Webb, V. L., Kilimnik, A. Y., Hulston. D. A., Hopf. S., Hinkley S., Reader, S. and Thomson, A. 2006. Screening for cytotoxic compounds for marine bacteria. *Conference: From Functional Genomics to Natural Products of Marine Microorganism*. June 21-24, 2006. Greifswald, Germany.