

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. DENGUE

1. Penyakit infeksi virus dengue

Dengue merupakan penyakit endemik yang menjadi ancaman kesehatan utama bagi 2,5 milyar penduduk dunia yang tinggal di daerah tropis dan subtropis, dengan menyebabkan sekitar 50--100 juta kasus infeksi dan 25.000 kasus kematian setiap tahunnya (Kumarasamy *dkk.* 2007: 75). Peta area distribusi infeksi virus dengue di seluruh dunia dapat dilihat pada Gambar 1. Sebanyak 1,3 milyar (52%) penduduk dunia yang terancam infeksi dengue tinggal di Asia Tenggara, dan sebagian besar kasus infeksi dengue di Asia Tenggara (57%) terjadi di Indonesia (WHO 2007a: 2 & 4).

Berdasarkan data terkini yang dilaporkan oleh WHO, diperoleh informasi bahwa jumlah kasus infeksi dan kematian yang terjadi di daerah Asia dalam kurun waktu bulan Januari--November 2007 mengalami kenaikan sebesar 18% dan 15% dari periode yang sama pada tahun 2006. Sebanyak 127.687 kasus dilaporkan terjadi di Indonesia dengan 1.296 kematian (*case fatality rate* sebesar 1%) (Tabel 1). Lebih dari 25.000 kasus infeksi dilaporkan dari Jakarta dan Jawa Barat, 10.000--20.000 kasus dari Jawa Tengah dan Jawa Timur, sedangkan kasus yang terlapor di wilayah lainnya sekitar 1.000--5.000

kasus. Berdasarkan grafik perkembangan jumlah kasus infeksi dengue di Indonesia dalam kurun waktu 2002--2007 (Gambar 2), sejak *outbreak* pada tahun 2004, lonjakan jumlah kasus infeksi dan kematian terjadi kembali pada awal tahun 2007 (WHO 2007b: 1--2).

Salah satu penyebab tingginya jumlah kasus infeksi virus dengue di Indonesia dan wilayah lainnya adalah bertambah luasnya persebaran vektor penyakit dengue. Virus dengue ditransmisikan dari satu penderita ke penderita lainnya melalui perantaraan vektor nyamuk *Aedes aegypti* (L.) dan *Aedes albopictus* (Skuse) (Henchal & Putnak 1990: 377). Persebaran vektor sangat berperan penting dalam perkembangan epidemi penyakit dengue. Nyamuk *Aedes aegypti* hidup dekat dengan manusia dan mampu beradaptasi dengan lingkungan perkotaan, serta tinggal dan berkembang biak di bejana penyimpanan air yang bersih (Ligon 2004: 60 & 62). Nyamuk *Aedes albopictus* lebih banyak berkembang biak dalam genangan air dan banyak hidup di daerah pedesaan (Chareonviriyaphap *dkk.* 2003: 529)

Infeksi virus dengue yang ditularkan melalui gigitan vektor nyamuk dapat menghasilkan sejumlah spektrum klinis, antara lain demam dengue akut yang relatif ringan, demam berdarah dengue yang lebih berbahaya dengan gejala kelainan permeabilitas vaskular, atau sindrom renjatan dengue dengan syok hipovolemia (berkurangnya volume plasma darah) yang mematikan (Young *dkk.* 2000: 1053). Demam dengue (*dengue fever/DF*) muncul dengan tiba-tiba sekitar 3--15 hari setelah gigitan nyamuk (Jacobs 2005: 19). Demam dengue didefinisikan dengan gejala kenaikan suhu tubuh

secara mendadak mencapai 38--40,5° C selama 2--7 hari diikuti sejumlah manifestasi seperti sakit kepala, mual, nyeri pada daerah belakang bola mata, nyeri sendi, ruam pada kulit, petekia, atau leukopenia (Halstead 1997: 23; Deen *dkk.* 2006: 171).

Dengue hemorrhagic fever (DHF) atau demam berdarah dengue (DBD) merupakan manifestasi klinis infeksi yang lebih berbahaya daripada demam dengue. Kriteria gejala DHF menurut WHO (*lihat* Rigau-Perez 2006: 298) antara lain, demam selama 2--7 hari, manifestasi *hemorrhagic*, trombositopenia (jumlah trombosit ≤ 100.000 sel/mm³ darah), dan peningkatan permeabilitas vaskular yang menyebabkan kebocoran plasma darah. Penyakit dengue dengan tingkat keparahan tertinggi, yaitu *dengue shock syndrome* (DSS), terjadi jika kebocoran plasma dan trombositopenia pada kasus DHF tidak diberikan terapi penggantian cairan secara cepat dan tepat sehingga penderita mengalami syok hipovolemia (Gubler 1998: 486). Gejala DSS mencakup seluruh gejala DHF yang disertai dengan kegagalan sirkulasi, berupa denyut yang cepat, lemah, dan hipotensi. Kematian dapat terjadi dalam kurun waktu 12--24 jam (Ligon 2004: 63).

2. Virus dengue

Virus dengue merupakan anggota genus *Flavivirus* dan famili Flaviviridae. Berdasarkan klasifikasi Baltimore, virus dengue tergolong ke dalam kelas IV, yaitu virus dengan genom asam ribonukleat (RNA) untai tunggal *positive sense* (Voyles 2002: 31). Melalui uji serologi, virus dengue

dibagi menjadi 4 serotipe, antara lain DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4 (Gubler 1997: 8). Keempat serotipe tersebut dapat menyebabkan respons imun terhadap gejala penyakit dengue. Infeksi primer dari salah satu serotipe tidak bersifat fatal dan dapat memberikan kekebalan permanen dari infeksi sekunder serotipe yang sama, namun infeksi sekunder dari serotipe lain justru dapat menimbulkan komplikasi penyakit yang lebih berbahaya dan fatal, yaitu DHF dan DSS (Gubler 1998: 483--484).

Virion matang dengue berukuran sekitar 40--50 nm, memiliki lipid *envelope*, serta memiliki materi genetik RNA berukuran sekitar 11 kb yang dilindungi oleh nukleokapsid berbentuk ikosahedral (Chang 1997: 175). Representasi skematis virion dengue diilustrasikan pada Gambar 3. *Open reading frame* (ORF) tunggal genom RNA virus dengue diapit oleh 2 *untranslated region* (UTR) berukuran 100 pb pada ujung 5' dan 450 pb pada ujung 3'. Urutan gen yang disandi adalah 5'-*C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3'*. Urutan gen tersebut mengkode prekursor poliprotein sekitar 3.400 asam amino yang akan diproses oleh protease virus dan sel inang untuk menghasilkan 3 protein penyusun struktur virus, antara lain kapsid (C), premembran (prM), dan *envelope* (E); serta 7 protein nonstruktural, antara lain NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, dan NS5 (Gambar 4) (Henchal & Putnak 1990: 379 & 381; Alcon *dkk.* 2002: 376).

Daerah *NS2* mengkode dua protein hidrofobik (NS2a dan NS2b) yang berperan dalam pemrosesan poliprotein dan sebagai kofaktor aktivitas protease viral NS3 di sitosol. Daerah *NS4* mengekspresikan dua protein

hidrofobik (NS4a dan NS4b) yang membantu virus membentuk *membrane bound* dalam kompleks replikasi RNA. Berdasarkan sekuen asam amino, protein NS5 yang dikode gen *NS5* diduga merupakan RNA polimerase yang dikode oleh virus (Kautner *dkk.* 1997: 517--518).

Gen *NS1* adalah gen pengkode protein NS1 yang merupakan senyawa glikoprotein dengan berat molekul 46--50 kDa dan mengandung 353--354 asam amino (Chang 1997: 187). Protein NS1 diduga berperan dalam pematangan dan replikasi RNA virion sehingga merupakan elemen penting dalam imunopatogenesis penyakit dengue (Young *dkk.* 2000: 1053). Schlesinger *dkk.* (1987) (*lihat* Costa *dkk.* 2007: 414), melaporkan bahwa protein NS1 memiliki imunogenisitas tinggi dan mampu membangkitkan antibodi melalui aktivitas pengikatan komplemen. Protein NS1 terekspresi pada sel mamalia dalam 2 bentuk, yaitu bentuk terkait membran (mNS1) atau ditranspor melalui jalur sekretori selular ke permukaan sel (sNS1) (Kumarasamy *dkk.* 2007: 75--76). Menurut Costa *dkk.* (2007: 414), pada proses infeksi, protein NS1 ditranslokasi ke retikulum endoplasma serta membran sel dengan *signal sequence* hidrofobik yang terdapat pada C-terminal protein E dan N-terminal protein NS2a. Serum pasien terinfeksi virus dengue mengandung konsentrasi antigen NS1 yang tinggi selama fase klinis awal infeksi primer dan sekunder (Alcon *dkk.* 2002: 376).

Berdasarkan sejumlah karakteristik tersebut, Lemes *dkk.* (2005: 306) menyimpulkan bahwa glikoprotein NS1 berpotensi sebagai bahan dasar pengembangan alat diagnostik dengue. Berbagai penelitian telah dilakukan

untuk mengevaluasi potensi diagnostik dan deteksi protein NS1 tersebut (Tabel 2). Sejumlah kit diagnostik dengue yang menggunakan bahan dasar protein rekombinan NS1 memiliki persentase sensitifitas dan spesifitas yang tinggi terhadap serum penderita infeksi dengue akut. Kit tersebut telah diproduksi dan dipasarkan secara komersial untuk mengakomodasi kebutuhan diagnosis penyakit dengue (Dussart *dkk.* 2008: 1) (Tabel 3).

B. KLONING GEN

1. Definisi dan manfaat kloning gen

Kloning merupakan proses perbanyakan fragmen gen target dengan mengintroduksi DNA rekombinan ke dalam suatu sel inang (Brooker 2005: 490). Molekul DNA rekombinan dibuat dengan menyisipkan fragmen DNA yang mengandung gen target ke dalam vektor. Vektor merupakan pembawa gen target yang akan dikloning ke dalam sel inang (Brown 2006: 6). Vektor rekombinan yang diintroduksi ke dalam sel inang ikut membelah setiap kali sel melakukan pembelahan sehingga koloni sel inang yang membawa vektor rekombinan akan menghasilkan salinan identik gen target (Wong 1997: 4).

Menurut Wong (1997: 13--14), kloning gen memberikan manfaat yang sangat besar bagi bidang bioteknologi. Proses kloning gen dapat menghasilkan protein penting dalam jumlah besar, khususnya protein-protein yang penting untuk terapi dan obat; ataupun menghasilkan tanaman pangan dan hewan ternak yang berkualitas baik untuk dikonsumsi. Aplikasi kloning

lainnya adalah dalam DNA *sequencing*, studi mutagenesis, DNA *fingerprinting*, serta pembuatan produk farmasi (Brooker 2005: 490). Produk farmasi yang dapat diproduksi dengan melakukan kloning gen *NS1* antara lain vaksin, antibodi monoklonal, dan kit diagnostik (Tabel 2 dan 3).

2. Komponen-komponen kloning

a. Sumber DNA

Sumber DNA untuk pengerjaan kloning dapat berupa DNA kromosom yang diisolasi dari inti sel ataupun DNA komplementer yang diperoleh dari penyalinan mRNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*, disebut *complementary DNA* (cDNA) (Watson *dkk.* 1992: 100). Menurut Muladno (2002: 18), DNA dari organel lain dalam sel, seperti mitokondria dan kloroplas, dapat pula digunakan sebagai sumber DNA untuk kloning selain DNA inti dan cDNA. Genom virus dengue merupakan RNA untai tunggal sehingga untuk melakukan penelitian kloning diperlukan sumber DNA berupa cDNA. Costa *dkk.* (2007: 421) melakukan isolasi RNA virus dengue dari sel, RNA tersebut digunakan sebagai cetakan dalam sintesis cDNA.

b. Vektor

Vektor merupakan merupakan wahana pembawa fragmen gen target ke dalam suatu sel inang (Brooker 2005: 490). Persyaratan utama suatu molekul DNA dapat digunakan sebagai vektor, antara lain harus mampu

disisipi DNA asing, dapat diintroduksi ke dalam sel inang, dapat bereplikasi secara independen di dalam sel inang, dan memiliki penanda seleksi (Brown 2006: 14). Vektor yang sering digunakan untuk penelitian kloning dalam sel bakteri adalah virus dan plasmid. Vektor lain yang dapat digunakan dalam kloning adalah kosmid, fagemid, *bacterial artificial chromosome* (BAC), dan *yeast artificial chromosome* (YAC) (Brooker 2005: 491).

Plasmid memiliki karakteristik yang sesuai dengan persyaratan sebagai vektor sehingga banyak digunakan dalam teknologi rekayasa genetika. Plasmid memiliki *multiple cloning site* (MCS) untuk menyisipkan fragmen DNA asing, gen penanda seleksi antibiotik, penanda penapisan, dan berjumlah banyak dalam sel inang (*high copy number*) (Paolella 1998: 180).

Selain berfungsi sebagai vektor kloning, sejumlah plasmid dapat pula berperan sebagai vektor ekspresi. Vektor ekspresi merupakan vektor yang dirancang untuk memaksimalkan ekspresi gen asing yang dibawa (Weaver 2005: 80). Vektor ekspresi hanya memiliki beberapa karakteristik vektor kloning yang diperlukan untuk propagasi DNA, yaitu MCS dan penanda seleksi antibiotik. Vektor ekspresi memiliki fitur tambahan yang penting untuk transkripsi gen dan translasi menjadi protein, antara lain promoter, *ribosome binding site*, ATG *start* kodon, dan sistem *tag* yang berfungsi untuk purifikasi protein rekombinan (Carson & Robertson 2004: 19).

Salah satu contoh plasmid yang digunakan sebagai vektor ekspresi adalah pGEX-6P1 (Gambar 5). Plasmid pGEX-6P1 (berukuran 4.984 pb) mampu mengekspresikan gen asing dalam kontrol promotor *tac* yang dapat

diinduksi dengan isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). Plasmid pGEX-6P1 mengkode situs pengenalan PreScission™ Protease dan sistem *tag* glutathione-S-transferase (GST) Gene Fusion System yang berfungsi dalam proses pemotongan serta purifikasi protein rekombinan. Situs MCS plasmid pGEX-6P1 (terdiri atas 6 situs pengenalan enzim restriksi) yang digunakan untuk menyisipkan fragmen DNA setelah sekuen GST dan PreScission™ Protease (Amersham Biosciences 2002: 9--11; GE Healthcare 2007: 2).

Plasmid pGEX-6P1 digunakan dalam berbagai penelitian untuk menghasilkan protein target dalam sel bakteri *E. coli*. Heimann *dkk.* (2006: 1916) menggunakan vektor ekspresi pGEX-6P1 untuk ekspresi protein core Classical Swine Fever Virus (CSFV) dalam sel *E. coli strain* Rosetta pLysS. Tellinghuisen *dkk.* (2008: 16) menggunakan plasmid pGEX-6P1 untuk ekspresi protein NS5a virus hepatitis C dalam sel *E. coli strain* BL21.

c. Enzim endonuklease restriksi

Enzim endonuklease restriksi yang diisolasi dari bakteri merupakan enzim yang dapat memotong ikatan fosfodiester untai DNA asing pada sekuen pengenalan yang spesifik (Wong 1997: 69). Sekuen pengenalan spesifik enzim restriksi berjumlah 6--8 pb, dinamakan palindrom, merupakan sekuen yang identik dengan untai komplemennya ketika dibaca pada arah yang berlawanan. Pengenalan dan pemotongan spesifik enzim restriksi pada untai DNA dapat menghasilkan potongan tumpul (*blunt ends*) ataupun potongan kohesif (*sticky ends*) (Paolella 1998: 177).

Contoh enzim restriksi yang menghasilkan potongan kohesif adalah *XhoI* dan *BamHI*. Enzim *XhoI* memiliki situs pengenalan dan pemotongan 5' C↓TCGAG 3', sedangkan enzim *BamHI* mengenali dan memotong sekuen 5' G↓GATCC 3' (Fairbanks & Andersen 1999: 257). Situs pengenalan enzim *XhoI* dan *BamHI* terdapat di dalam sekuen MCS plasmid pGEX-6P1. Watashi *dkk.* (2003: 7499) meneliti fragmen gen *core* virus hepatitis C dan Roy *dkk.* (2002: 3770) meneliti fragmen DNA pengkode *poly (A) binding protein* (PABP). Kedua fragmen gen tersebut berhasil disisipkan pada situs pemotongan *BamHI-XhoI* plasmid pGEX-6P1.

d. Enzim ligase

Enzim ligase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan kembali ikatan fosfodiester antara potongan fragmen DNA atau RNA berujung kohesif yang saling berkomplemen hasil pemotongan dengan enzim restriksi (Wong 1997: 70--71). Kofaktor dalam reaksi enzim ligasi adalah ATP atau NAD⁺, tergantung pada jenis enzim ligase yang digunakan. Contoh enzim ligase antara lain *bacteriophage T4 DNA ligase*, ligase *E. coli*, dan ligase bakteri termofilik (Sambrook & Russell 2001: 1.157--1.159).

e. Sel inang

Bakteri *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, dan khamir *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen) Hansen merupakan mikroorganisme yang sangat bermanfaat dalam kloning karena

memiliki karakteristik ideal sebagai sel inang bagi gen yang akan dikloning, antara lain mudah dimanipulasi, mampu tumbuh dengan cepat dan stabil pada medium kultur biasa, non-patogen, serta dapat ditransformasi DNA asing (Brock *dkk.* 1994: 295). Bakteri *E. coli* berbentuk batang dengan genom sekitar 4,5 juta pb, dapat tumbuh cepat dalam medium pengayaan, serta memiliki banyak *strain* yang telah dikarakterisasi (Davis *dkk.* 1994: 47). Bakteri *E. coli* merupakan organisme yang paling banyak digunakan sebagai sel inang dalam penelitian kloning dan ekspresi, karena berbagai gen asing yang mengkode protein target dapat diterima dan diekspresikan dengan baik oleh *E. coli* (Sambrook & Russell 2001: 15.2).

Salah satu *strain E. coli* yang banyak digunakan sebagai sel inang dalam penelitian ekspresi adalah BL21(DE3). *Strain* BL21(DE3) memiliki gen λ DE3 pengkode T7 RNA polimerase yang dapat mengekspresikan gen target pada vektor ekspresi dengan induksi IPTG. *Strain* tersebut juga memiliki mutasi *lon* dan *OmpT* protease sehingga dapat meminimalisir degradasi protein rekombinan yang terekspresi (BioDynamics 2005: 1). Lemes *dkk.* (2005: 306) berhasil memperoleh protein rekombinan NS1 dengue hasil ekspresi gen *NS1* dalam *E. coli strain* BL21(DE3).

Strain BL21 Star™(DE3) merupakan modifikasi dari *strain* BL21(DE3), dengan tambahan mutasi pada gen pengkode RNase sehingga degradasi mRNA hasil ekspresi dapat diminimalisir. *Strain* BL21 Star™(DE3) dapat memaksimalkan ekspresi gen asing yang dibawa oleh vektor ekspresi (Invitrogen 2002: v & 2). Gen *human* eIF4A berhasil disisipkan pada vektor

ekspresi pGEX-6P1, kemudian diekspresikan dalam sel inang *E. coli* BL21 Star™(DE3) (Schütz *dkk.* 2008: 9568).

3. Tahap-tahap kloning

a. Amplifikasi fragmen gen target

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan teknik amplifikasi sekuen DNA spesifik secara *in vitro* dengan proses pemanjangan primer pada untai DNA komplementer (Taylor 1991: 1). Menurut Sambrook dan Russell (2001: 8.4--8.6), reaksi PCR terdiri atas sejumlah komponen esensial, antara lain enzim DNA polimerase yang termostabil, sepasang oligonukleotida spesifik yang berperan sebagai primer, deoksinukleosida trifosfat (dNTP), kation divalen, kation monovalen, *buffer*, serta DNA cetakan.

Sekuen primer membatasi daerah fragmen DNA target yang akan diamplifikasi, kemudian enzim DNA polimerase akan menginisiasi sintesis salinannya (Weaver 2005: 74). Menurut Innis dan Gelfand (*lihat* Chen *dkk.* 2002: 20), persyaratan untuk desain primer yang baik antara lain panjang primer sekitar 17--28 basa, memiliki kandungan basa GC 40--60%, pada ujung 3' terdapat basa G atau C, *temperature of melting* sekitar 55--80° C, dan tidak terjadi *self-complementarity*.

Reaksi PCR ditempatkan pada mesin *thermal cycler* yang dapat mengatur suhu sesuai dengan tiga tahapan dalam siklus PCR. Tahap awal reaksi PCR merupakan pemisahan untai ganda DNA (denaturasi) yang

dilakukan pada suhu 95° C, dilanjutkan dengan pemasangan basa primer dengan untai tunggal DNA cetakan (*annealing*) pada suhu sekitar 50--65° C, kemudian pada suhu 72° C, berlangsung sintesis untai DNA baru oleh enzim DNA polimerase (Fairbanks & Andersen 1999: 278). Setiap siklus pada PCR menghasilkan 2 salinan untai ganda fragmen target. Kedua hasil salinan DNA target dari setiap siklus akan menjadi cetakan bagi siklus berikutnya sehingga reaksi PCR dengan 30 siklus dapat menghasilkan jutaan fragmen DNA target (Weaver 2005: 74).

b. Penyisipan fragmen DNA ke dalam vektor

Penyisipan fragmen DNA atau gen target ke dalam DNA vektor untuk membentuk molekul DNA rekombinan melibatkan 2 tahap, yaitu digesti serta ligasi DNA vektor dan gen target sisipan. Vektor dan sisipan didigesti dengan enzim restriksi yang sama sehingga keduanya memiliki potongan kohesif (*sticky ends*) serupa yang akan saling berlekatan. Enzim ligase mengkatalisis proses perlekatan basa-basa nukleotida yang saling berkomplemen (Brooker 2005: 492--493).

c. Introduksi vektor rekombinan ke dalam sel inang

Tahap lanjutan pada kloning gen setelah pembuatan molekul DNA rekombinan (vektor yang disisipi gen sisipan) adalah introduksi DNA rekombinan ke dalam sel inang. Sel inang akan tumbuh dan membelah membentuk banyak koloni yang mengandung DNA target. Introduksi DNA

vektor plasmid yang mengandung gen sisipan ke dalam sel inang bakteri disebut transformasi; sedangkan introduksi vektor virus dinamakan transfeksi (Wong 1997: 4 & 133).

Sel inang terlebih dahulu dibuat menjadi kompeten sebelum dilakukan proses transformasi sehingga menjadi permeabel terhadap DNA asing (Snustad & Simmons 2003: 420). Sel kompeten dapat dibuat dengan memberikan perlakuan fisik atau kimia yang akan meningkatkan kemampuan sel untuk mengikat dan mengambil DNA. Menurut Mandel dan Higa (1970), serta Cohen *dkk.* (1972) (*lihat* Old & Primrose 2003: 11), perendaman sel dalam larutan garam dingin, seperti kalsium klorida (CaCl_2), merupakan perlakuan kimiawi yang efektif dilakukan dalam pembuatan sel kompeten.

Garam CaCl_2 kemungkinan dapat menyebabkan perubahan struktur dinding sel yang meningkatkan pengikatan DNA pada bagian luar sel. Proses introduksi DNA ke dalam sel terjadi pada saat pemberian kejutan panas terhadap sel kompeten dan DNA dengan menaikkan suhu inkubasi secara drastis dari 0°C menjadi 42°C selama sekitar 1--2 menit (Brown 2006: 90--91). Transformasi pada sel bakteri, khamir, fungi, mamalia, atau tanaman dapat pula dilakukan dengan metode elektroporasi, yaitu dengan memberikan kejutan listrik pada sel sehingga membran plasma sel membentuk pori-pori sehingga DNA asing dapat diintroduksi dengan mudah (Davis *dkk.* 1994: 636; Wong 1997: 134--136).

Menurut Zhiming Tu *dkk.* (2005: 117), keberhasilan introduksi DNA asing ke dalam sel inang merupakan hal yang sangat penting dalam

penelitian kloning. Parameter keberhasilan proses transformasi dapat ditentukan dengan nilai efisiensi transformasi yang tinggi. Jumlah koloni transforman yang tumbuh pada permukaan medium seleksi dihitung, kemudian dimasukkan dalam perhitungan efisiensi transformasi (Queen-Baker 2000: 7). Nilai efisiensi transformasi optimal metode CaCl_2 adalah 10^6 cfu/ μg DNA (Davis *dkk.* 1994: 239).

d. Seleksi hasil kloning

Keberhasilan proses kloning dapat diketahui dengan melakukan seleksi. Melalui proses seleksi, koloni transforman yang membawa DNA rekombinan target (berhasil dikloning) dapat dibedakan dari koloni transforman yang tidak membawa DNA target (Brown 2006: 87--88). Proses seleksi dapat dilakukan dengan sejumlah metode, seperti hibridisasi DNA probe, hibridisasi antibodi monoklonal, dan seleksi nutrisi (Dale & von Schantz 2007: 121--141). Metode yang umum digunakan adalah seleksi antibiotik dan α -komplementasi (*blue-white screening*) (Wong 1997: 100).

Gen penanda seleksi antibiotik ampisilin (*bla*) yang dibawa oleh vektor plasmid akan mengekspresikan sifat resistensi ampisilin kepada sel inang setelah ditransformasi dengan mengkode enzim β -laktamase. Enzim tersebut dapat menghidrolisis cincin β -laktam pada ampisilin (Sambrook & Russell 2001: 1.148). Sel inang yang berhasil mentransformasi plasmid dapat tumbuh membentuk koloni pada medium agar dengan antibiotik,

sedangkan sel yang tanpa plasmid tidak akan tumbuh karena rentan terhadap ampisilin (Brooker 2005: 493).

C. ELEKTROFORESIS

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan fragmen DNA, RNA, atau protein berdasarkan ukurannya dengan arus listrik searah. Arus listrik diberikan di antara elektroda negatif (katoda) dan positif (anoda) yang melalui gel setelah sampel DNA dituangkan ke dalam sumur gel. Molekul DNA bermuatan negatif karena memiliki gugus fosfat sehingga fragmen DNA akan bermigrasi menuju anoda (Fairbanks & Andersen 1999: 278). Kecepatan migrasi fragmen DNA berbanding terbalik dengan ukurannya. Arus listrik yang diberikan selama beberapa waktu akan mendistribusikan fragmen DNA menurut ukurannya, fragmen berukuran besar berada dekat dengan sumur, sedangkan fragmen kecil mendekati bagian ujung gel (Weaver 2005: 91).

Fragmen DNA, RNA, dan protein dapat dielektroforesis dengan media gel agarosa atau gel poliakrilamid. Gel poliakrilamid digunakan untuk memisahkan fragmen berukuran kecil (5--500 pb). Resolusi pemisahan gel agarosa lebih rendah daripada gel poliakrilamid, namun kisaran ukuran fragmen yang dapat dipisahkan oleh gel agarosa lebih besar (50--20.000 pb). Gel agarosa standar dengan konsentrasi 0,8% dapat memisahkan fragmen DNA berukuran 500--15.000 pb (Sambrook & Russell 2001: 5.2 & 5.6).

Fragmen DNA hasil elektroforesis dapat dianalisis setelah divisualisasikan di bawah sinar ultraviolet dengan pewarnaan etidium

bromida (Wong 1997: 80). Elektroforesis bermanfaat dalam berbagai analisis genetika, antara lain untuk mengidentifikasi konsentrasi dan ukuran fragmen DNA hasil amplifikasi PCR atau isolasi, mengidentifikasi persamaan dan perbedaan sifat antar individu, serta mengetahui aktivitas enzimatik dari protein (Fairbanks & Andersen 1999: 278 & 280).

D. SEQUENCING

Sequencing adalah pembacaan urutan basa nukleotida DNA. *Sanger dideoxy* merupakan metode *DNA sequencing* yang banyak digunakan dalam menentukan sekuens nukleotida genom bakteri, khamir *Saccharomyces cerevisiae*, bahkan genom manusia yang berjumlah 3 milyar nukleotida. Metode *automated DNA sequencing* merupakan modifikasi metode *Sanger dideoxy sequencing* dengan menggunakan mesin *sequencer* dan ddNTP yang dilabeli pewarna fluoresens (Fairbanks & Andersen 1999: 287--288).

Automated DNA sequencing mencakup tahapan *cycle sequencing*, purifikasi produk *cycle sequencing*, dan pembacaan sekuens. *Cycle sequencing* adalah tahapan yang menggunakan siklus denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi yang menghasilkan amplifikasi linier dari produk ekstensi fragmen DNA pada mesin *thermal cycler* sehingga masing-masing fragmen DNA memiliki label pewarna fluoresensi pada ddNTP di ujung 3'. Purifikasi bertujuan untuk menghilangkan pewarna fluoresensi berlebih pada produk *cycle sequencing* agar tidak mengganggu pembacaan sekuen. Alat *sequencer* akan mendeteksi fluoresensi dari empat pewarna berbeda yang

digunakan untuk mendeteksi reaksi ekstensi A, C, G, dan T dengan metode elektroforesis kapiler. Hasil pembacaan kemudian diinterpretasikan oleh perangkat keras dan perangkat lunak komputer dalam bentuk grafik elektroferogram (Applied Biosystems 2000: 1-2--1-4).

Basa nukleotida hasil pembacaan *sequencing* dapat diketahui dari grafik elektroferogram yang menampakkan empat warna berbeda untuk masing-masing basa nukleotida. Urutan nukleotida tersebut dapat dibandingkan dengan database DNA pada GenBank, kemudian dianalisis melalui program *basic local alignment search tool* (BLASTN). Program BLAST dapat menentukan *similarity* berbagai sekuen *query* dari seluruh basis data yang tersedia (*subject*) dengan cepat (Madden 2002: 16-1).

Parameter utama untuk menentukan tingkat *similarity* dari hasil analisis BLAST adalah *bit score* dan *identities*. *Bit score* merupakan perhitungan statistik perbandingan antara jumlah seluruh basa yang sama dari sekuen yang dikirimkan ke GenBank (*query*) dan sekuen yang terdapat pada *database* GenBank (*subject*) dikurangi dengan jumlah *gap* yang ada. Semakin tinggi nilai *bit score*, maka semakin tinggi pula nilai *similarity*. *Identities* adalah persentase perbandingan antara sekuen *query* dan *subject* yang tidak cocok dibagi sekuen *query* yang cocok (Hall 2001: 10--15).