

DIKTAT DIKTAT BIOTEKNOLOGI



Disusun Oleh
Dr. drh. Heru Nurcahyo, M.Kes

JURUSAN PENDIDIKAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA

2011

KATA PENGANTAR

Diktat Bioteknologi ini disusun untuk membantu Mahasiswa Prodi Biologi dan Prodidik Biologi, Jurusan Pendidikan (Jurdik) Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta (UNY) dalam melakukan kegiatan perkuliahan Bioteknologi di Jurdik Biologi, FMIPA, UNY.

Diktat ini memuat berbagai prinsip dan aplikasi bioteknologi dalam berbagai bidang. Konsep-konsep dalam diktat ini memiliki peran yang sangat berarti dalam membantu mahasiswa memahami dasar-dasar bioteknologi baik saat ini maupun yang akan datang.

Menyadari adanya kekurangan dalam penyusunan buku diktat ini, maka saran yang sifatnya membangun dari berbagai pihak sangat diharapkan demi kesempurnaan penyusunan buku ini untuk waktu yang akan datang.

Akhirnya sebagai harapan penulis semoga keberadaan buku diktat ini dapat bermanfaat khususnya bagi Mahasiswa Jurdik Biologi FMIPA UNY.

Edisi Pertama
Yogyakarta, 14 April 2011
Penyusun,

Dr. drh. Heru Nurcahyo, M.Kes
NIP. 19620414 198803 1 003

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
SILABUS	iv
BIOTEKNOLOGI	1
BIOTEKNOLOGI FERMENTASI	9
KULTUR JARINGAN/SEL TUMBUHAN	19
KULTUR JARINGAN/SEL HEWAN	26
PRODUKSI ANTIBODI MONOKLONAL	36
REKAYASA GENETIKA	48

SILABUS

Mata kuliah	: Bioteknologi
Kode	: BIO 242
SKS	: 2 SKS
Semester	: VI
MK Prasyarat	: Mikrobiologi (BIO 236)
Dosen	: Dr. drh. Heru Nurcahyo, M.Kes

Deskripsi Mata Kuliah

Matakuliah bioteknologi ini terutama menjelaskan bioteknologi mengenai: pengertian bioteknologi, manfaat, aplikasi, dan produk-produk yang dihasilkan.

Kompetensi Mata Kuliah

Setelah mengikuti matakuliah bioteknologi ini diharapkan mahasiswa memiliki kompetensi menjelaskan dan membandingkan: pengertian bioteknologi, manfaat, aplikasi, dan produk-produk yang dihasilkan.

Strategi Perkuliahan

A. Tatap muka: (1) Kuliah tatap muka, (2) Diskusi, (3) Presentasi, (4) Seminar

B. Non tatap muka: (1) Tugas mandiri, (2) Tugas kelompok.

Sumber Bahan

A. Textbook:

1. Primrose, S.B. (1987). *Modern Biotechnology*. Blackwell Scientific Publications, London.

B. Acuan/Referensi:

1. Baret, J.M., Peter Abramoff, Kumaran, A.K., and Millington, W.F. (1986). *Biology*. Prentice Hall: New Jersey
2. Higgins, I.J. (1985). *Biotechnology Principles and Applications*. Blackwell Scientific Publications, London.
3. Raven, P.H. (1986). *Biology*. Times Mirror/Mosby College Publishing. New York.

Penilaian

No.	Jenis Tagihan	Bobot (%)
1.	Kehadiran dan partisipasi kuliah	10
2.	Presentasi dan diskusi	15
3.	Tugas-tugas	15
4.	Ujian tengah semester (sisipan)	20
5.	Ujian semester (final)	40
Jumlah		100

Kegiatan Perkuliahan

No.	Kompetensi Dasar	Materi Pokok	Strategi Perkuliahan	Buku Acuan
1.	Dapat menjelaskan pengertian, sejarah, dan ruang lingkup biotek	1. Pengertian bioteknologi 2. Ruang lingkup biotek 3. Sejarah perkembangan biotek: biotek konvensional dan modern	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1
2.	Dapat menjelaskan manfaat, prospek, dan produk-produk biotek	1. Manfaat aplikasi biotek 2. Perencanaan strategis dalam biotek 3. Prospek bioteknologi: kedokteran, energi, makanan, pertanian, dan lingkungan 4. Produk-produk bioteknologi biotek	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1
3.	Dapat menjelaskan teknologi fermentasi dan manfaatnya bagi biotek	1. Sifat fermentasi 2. Prinsip Kultivasi mikroba dalam sistem cair 3. Desain bioreaktor 4. Desain media 5. Instrumentasi dan pengendalian proses dalam bioreaktor	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1
4.	Dapat menjelaskan pengukuran hasil teknologi fermentasi pada substrat padat	1. Teknik pengukuran 2. Pemindahan massa dan energi 3. Peningkatan skala 4. Fermentasi substrat padat	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1
5.	Dapat menjelaskan enzim dan perannya dalam bioteknologi	1. Peranan komersial enzim terisolasi 2. Sumber enzim 3. Produksi enzim 4. Legislasi enzim 5. Imobilisasi enzim 6. Sifat imobilisasi enzim	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1
6.	Dapat menjelaskan metode-metode pendukung biotek (teknobiologi)	1. Seleksi dan penyaringan 2. Pemeliharaan kultur 3. Mutagenesis 4. Hibridisasi seksual 5. Proses paraseksual 6. Polimerase chains reaction (PCR)	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1
7	Dapat menjelaskan struktur gena prokariot dan eukariot, dan rekayasa	1. Gen: struktur dasar gena prokariot dan eukariot, plasmid 2. Dogma sentral ekspresi gena	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1

	genetika	3. Rekayasa genetika		
8	Dapat menjelaskan teknologi DNA rekombinan dan transgenik	1. Teknologi DNA rekombinan 2. Regulasi dan pengendalian eksperimentasi DNA rekombinan 3. Individu transgenik 4. Prospek individu transgenik	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1
9.	Ujian Sisipan I			
10.	Dapat menjelaskan produksi massal enzim untuk komersial	1. Prinsip penanganan massa cair 2. Teknologi penanganan massa cair 3. Pemisahan fase padat dan cair 4. Produk dalam fase padat 5. Isolasi produk dari fase encer bening 6. Stabilitas produk	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1
11.	Dapat menjelaskan biotek tanaman, manfaat dan aplikasinya	1. Bioteknologi tumbuhan 2. Kultur sel tumbuhan: prinsip dasar, dan aplikasi 3. Prospek tumbuhan transgenik	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1
12.	Dapat menjelaskan biotek hewan, manfaat dan aplikasinya	1. Bioteknologi hewan 2. Kultur sel hewan: prinsip dasar, dan aplikasi 3. Antibodi monoklonal	Presentasi, Diskusi dan Klarifikasi	1
13.		Peran Biotek dalam Berbagai Bidang Kehidupan	Presentasi dan diskusi	
14.		Peran Biotek dalam Berbagai Bidang Kehidupan	Presentasi dan diskusi	
15.		Kontribusi Biotek bagi Kesejahteraan Umat Mnausia	Seminar dan diskusi	
16.	Ujian Final			

Keterangan:

No. Pertemuan ke/minggu ke

Yogyakarta, 20 Januari 2005
Dosen Pengampu

Dr. Heru Nurcahyo

Bab 1

Pendahuluan Bioteknologi



Gambar 1.1. Kapang, sebagai representasi jamur multiseluler

Pada bab ini akan dipelajari tentang:

- Pengertian Bioteknologi
- Kultivasi mikroba
- Medium kultur
- Bioreaktor
- Proses *downstream*
- Aplikasi fermentasi dalam produksi minuman dan makanan

Kemajuan dan perkembangan bioteknologi tidak dapat terlepas dari kemajuan dan dukungan ilmu-ilmu dasar seperti: mikrobiologi, biokimia, biologi molekuler, dan genetika. Kompetensi menguasai bioteknologi tersebut dapat tercapai manakala pembinaan sumber daya manusia diorientasikan pada kompetensi meneliti dan menerapkan metode-metode mutakhir bioteknologi. Kemampuan menguasai dan mengaplikasikan metode-metode mutakhir bioteknologi (*current methods of biotechnology*) seperti: kultur jaringan, rekayasa genetik, hibridoma, kloning, dan *polymerase chains reaction* (PCR) secara prospektif telah mampu menghasilkan produk-produk penemuan baru.

Definisi dan Pengertian Bioteknologi

Dalam kurun waktu 20 tahun terakhir ini, bioteknologi telah mengalami perkembangan sangat pesat. Di beberapa negara maju, bioteknologi mendapatkan perhatian serius dan dikembangkan secara intensif dengan harapan dapat memberi solusi untuk mengatasi berbagai permasalahan yang dihadapi manusia pada saat ini maupun yang akan datang yang menyangkut; kebutuhan pangan, obat-obatan, penelitian, yang pada gilirannya semuanya bertujuan untuk meningkatkan kesejahteraan hidup umat manusia.

Sebagai ilustrasi; penemuan-penemuan baru dibidang imunologi (ilmu yang mempelajari sistem kekebalan tubuh) telah berhasil diproduksi antibodi-monoklonal (MAB) secara massal. Penemuan MAB dengan metode klonasi (*clone*), memiliki kelebihan antara lain: peka (sensitivitas), khas (spesifitas), dan akurat. Selain itu, MAB dapat pula digunakan untuk memberikan jasa pelayanan dalam berbagai hal seperti: diagnosis suatu penyakit dengan akurat, pencegahan dan pengobatan penyakit. Kontribusi MAB telah dapat dirasakan manfaatnya khususnya dalam dunia riset (*research*) seperti: *enzymeimmunoassay* (EIA), *radioimmunoassay* (RIA), dan immunositokimia (*immunocytochemistry*).

Istilah bioteknologi untuk pertama kalinya dikemukakan oleh Karl Ereky, seorang insinyur Hongaria pada tahun 1917 untuk mendeskripsikan produksi babi dalam skala besar dengan menggunakan bit gula sebagai sumber pakannya (Suwanto, 1998). Beragam batasan dan pengertian dikemukakan oleh berbagai lembaga untuk menjelaskan tentang Bioteknologi. Beberapa diantaranya akan diulas singkat sebagai berikut:

1. Menurut Bull *et al.* (1982), bioteknologi merupakan penerapan asas-asas sains (ilmu pengetahuan alam) dan rekayasa (teknologi) untuk pengolahan suatu bahan dengan melibatkan aktivitas jasad hidup untuk menghasilkan barang dan/atau jasa.
2. Bioteknologi merupakan penerapan prinsip-prinsip ilmu pengetahuan dan kerakayasa untuk penanganan dan pengolahan bahan dengan bantuan agen biologis untuk menghasilkan bahan dan jasa (OECD, 1982).
3. Bioteknologi adalah teknik pendayagunaan organisme hidup atau bagian organisme untuk membuat atau memodifikasi suatu produk dan meningkatkan/memperbaiki sifat tanaman atau hewan atau mengembangkan mikroorganisme untuk penggunaan khusus (OTA-US, 1982).
4. Menurut Primrose (1987), secara lebih sederhana bioteknologi merupakan eksploitasi komersial organisme hidup atau komponennya seperti; enzim.
5. Bioteknologi berasal dari dua kata, yaitu 'bio' yang berarti makhluk hidup dan 'teknologi' yang berarti cara untuk memproduksi barang atau jasa. Dari paduan dua kata tersebut *European Federation of Biotechnology* mendefinisikan bioteknologi sebagai perpaduan dari ilmu pengetahuan alam dan ilmu rekayasa yang bertujuan meningkatkan aplikasi organisme hidup, sel, bagian dari organisme hidup, dan/atau analog molekuler untuk menghasilkan produk dan jasa.
6. Atau secara tegas dinyatakan, Bioteknologi merupakan penggunaan terpadu biokimia, mikrobiologi, dan ilmu-ilmu keteknikan dengan bantuan mikroba, bagian-bagian mikroba atau sel dan jaringan organisme yang lebih tinggi dalam penerapannya secara teknologis dan industri (EFB., 1983)

Berdasarkan terminologinya, maka bioteknologi dapat diartikan sebagai berikut:

1. “*Bio*” memiliki pengertian agen hayati (*living things*) yang meliputi; organisme (bakteri, jamur (ragi), kapang), jaringan/sel (kultur sel tumbuhan atau hewan), dan/atau komponen sub-selulernya (enzim).
2. “*Tekno*” memiliki pengertian teknik atau rekayasa (*engineering*) yaitu segala sesuatu yang berkaitan dengan rancang-bangun, misalnya untuk rancang bangun suatu bioreaktor. Cakupan teknik disini sangat luas antara lain; teknik industri

dan kimia.

3. “*Logi*” memiliki pengertian ilmu pengetahuan alam (sains) yang mencakup; biologi, kimia, fisika, matematika dsb. Ditinjau dari sudut pandang biologi (biosain), maka bioteknologi merupakan penerapan (*applied*); biologi molekuler, mikrobiologi, biokimia, dan genetika. Dengan demikian, bioteknologi merupakan penerapan berbagai bidang (disiplin) ilmu (interdisipliner). Oleh karena itu, tidak ada seorangpun yang dapat menguasai seluruh aspek bioteknologi.

Berdasarkan definisi dan pengertian di atas, maka bioteknologi tidak lain adalah suatu proses yang unsur-unsurnya sebagai berikut:

1. Input yaitu bahan kasar (*raw material*) yang akan diolah seperti; beras, anggur, susu dsb.
2. Proses yaitu mekanisme pengolahan yang meliputi; proses penguraian atau penyusunan oleh agen hayati.
3. Output yaitu produk baik berupa barang dan/atau jasa, seperti; alkohol, enzim, antibiotika, hormon, pengolahan limbah.



Gambar 1: Skema Proses Bioteknologi

Apapun batasan yang diberikan oleh para ahli yang pasti dalam proses bioteknologi terkandung tiga hal pokok :

1. Agen biologis (mikroba, enzim, sel tanaman, sel hewan)
2. Pendayagunaan secara teknologis dan industrial
3. Produk dan jasa yang diperoleh.

Dahulu bioteknologi dianalogikan dengan industri mikrobiologi (industri yang berbasis pada peran agen-agen mikrobia). Tetapi perkembangan selanjutnya, tanaman dan hewan juga dieksploitasi secara komersial seperti; hortikultura dan agrikultura. Dengan demikian, “payung” bioteknologi sangatlah luas mencakup semua teknik untuk menghasilkan barang dan jasa dengan memanfaatkan sistem biologi.

Sejarah Bioteknologi

Bioteknologi dalam artian pemanfaatan mikroorganisme untuk mengolah makanan dan minuman, telah dikenal sejak jaman dahulu sebelum masehi. Orang mesir kuno telah mengenal pemanfaatan mikroorgansime untuk membuat bir, anggur, vinegar, keju, tuak, yoghurt dsb. Bioteknologi telah mengalami perkembangan sesuai jamannya untuk memproduksi; alkohol, penisilin, dan akhirnya antibodi monoklonal.

Prospek ke depan, terdapat indikasi bahwa perkembangan penerapan bioteknologi dalam segala bidang kehidupan akan semakin meningkat dengan didukung oleh penemuan-penemuan baru dan penerapan metode-metode baru. Kemajuan yang sangat menggembirakan dalam bioteknologi adalah penerapan rekayasa genetika dengan menyisipkan gen-gen tertentu yang dikehendaki kedalam

sel yang telah dikultur dengan tujuan untuk memproduksi insulin dan/atau beberapa hormon pertumbuhan dalam skala besar. Demikian pula penggunaan antibodi monoklonal sangat meluas baik untuk penelitian maupun uji klinis termasuk diagnosis dan bahkan upaya mencapai target spesifik untuk pengobatan.

Perencanaan strategis dalam Bioteknologi: kompetensi menguasai bioteknologi dapat tercapai manakala pembinaan sumber daya manusia diorientasikan pada kompetensi meneliti dan menerapkan metode-metode mutakhir bioteknologi. Kemampuan menguasai dan mengaplikasikan metode-metode mutakhir bioteknologi seperti: kultur jaringan, rekayasa genetik, hibridoma, kloning, dan *polymerase chains reaction* (PCR) secara prospektif akan mampu menghasilkan produk-produk penemuan baru.

Bull, *et al.*, (1982) menyatakan bahwa: Istilah bioteknologi mempunyai pengertian sebagai penerapan teknik-teknik biologi, biokimia dan rekayasa dalam pengolahan bahan dengan memanfaatkan agensia jasad hidup dankomponan-komponen untuk menghasilkan barang dan jasa (Triwibowo Juwono, 2001). Secara umum, bioteknologi dapat diklafikasikan menjadi dua aras yaitu: bioteknologi konvensional dan bioteknologi modern.

Aplikasi bioteknologi sesungguhnya telah berlangsung cukup lama, dalam peradapan manusia; seperti upaya produksi antibiotik, fermentasi, alkohol, pangan dan teknologi pengolahan limbah ; yang kesemuanya dapat dikelompokan ke dalam bioteknologi konvensional. Tetapi mengapa nampaknya bioteknologi baru saja berkembang pada kurun abad ke dua puluh ini? Karena secara implisit yang dimaksud bioteknologi adalah bioteknologi modern, yang intinya adalah rekayasa genetik, dengan teknik gen kloning yang berkembang berdasar penemuan struktur dan fungsi DNA oleh Watson dan Creck.

Dalam perkembangannya, bioteknologi telah mencapai tingkat rekayasa yang lebih terarah, sehingga hasilnya dapat dikendalikan. Dengan teknik yang dikenal sebagai teknik DNA rekombinan, atau secara populer dikenal sebagai rekayasa genetika. Para ilmuwan dapat menyambung molekul-molekul DNA yang berbeda menjadi suatu molekul DNA rekombinan yang inti prosesnya adalah “kloning gena”

Perkembangan Bioteknologi

1. Bioteknologi konvensional

Ciri-ciri bioteknologi konvensional; kurang steril, jumlah sedikit (terbatas), kualitas belum terjamin. Contoh: industri tempe, tape, anggur, yoghurt, dsb.

2. Bioteknologi modern

Ciri-ciri bioteknologi modern; steril, produksi dalam jumlah banyak (massal), kualitas standar dan terjamin. Selain itu, bioteknologi modern tidak terlepas dengan aplikasi metode-metode mutakhir bioteknologi (*current methods of biotechnology*) seperti:

- 1) Kultur jaringan merupakan suatu metode untuk memperbanyak jaringan/sel yang berasal atau yang didapat dari jaringan orisinal tumbuhan atau hewan setelah terlebih dahulu mengalami pemisahan (*disagregasi*) secara mekanis, atau kimiawi (enzimatis) secara *in vitro* (dalam tabung kaca).
- 2) Teknologi DNA rekombinan (*recombinant DNA technology*) adalah suatu metode untuk merekayasa genetik dengan cara menyisipkan (*insert*) gena

yang dikehendaki ke dalam suatu organisme. Transgenik adalah suatu metode untuk. Rekayasa protein (*protein engineering*).

- 3) Hibridoma adalah suatu metode untuk menggabungkan dua macam sel eukariot dengan tujuan mendapatkan sel hibrid yang memiliki kemampuan kedua sel induknya.
- 4) Kloning adalah suatu metode untuk menghasilkan keturunan yang dikehendaki sama persis dengan induknya.
- 5) *Polymerase chains reaction* (PCR) merupakan metode yang sangat sensitif untuk mendeteksi dan menganalisis sekuen asam nukleat. RT-PCR untuk memperbanyak (amplifikasi) rantai RNA menjadi DNA; tissue/cells → *extracted* → RNA/mRNA → rT-PCR → copy DNA (cDNA).
- 6) Hibridisasi DNA adalah metode untuk menyeleksi sekuen DNA dengan menggunakan probes DNA untuk hibridisasi (pencangkakan) rantai DNA. Pita ganda

Skema Klasifikasi	Kingdom	Organisme
Linnaeus (1753)	Plantae Animalia	Bakteri, fungi, alga, tanaman Protozoa dan hewan
Haeckel (1865)	Plantae Animalia Protista	Alga multiseluler dan tanaman Hewan Mikroorganisme (bakteri, protozoa, alga, kapang dan khamir)
Whittaker (1969)	Plantae Animalia Protista Fungi Monera	Alga multiseluler dan tanaman Hewan Protozoa dan alga bersel tunggal Kapang dan khamir Semua bakteri (prokariot)
Whose (1977)	Archaeobacteria Eubacteria Eucaryotes	Bakteri yang menghasilkan gas metan, memerlukan garam dan suhu tinggi Semua bakteri lain, termasuk bakteri penyebab penyakit, bakteri tanah dan air, bakteri fotosintetik Protozoa, alga, fungi, tanaman dan hewan

Bakteri

Termasuk prokariot (tidak mempunyai membran internal yang memisahkan nukleus dari sitoplasma)

Eubacteria: mempunyai bentuk bulat (coccus), batang (bacillus) atau spiral (spirillum).

- Ukuran sel : 0,5 – 5,0 µm
- Uniseluler, namun dapat berpasangan, membentuk rantai, tetrad atau kelompok
- **Archaeobacteria:** mirip Eubacteria, namun berbeda komposisi kimia, aktivitas dan lingkungan hidupnya. mampu hidup pada lingkungan yang keras (garam/asam/suhu tinggi). → memproduksi metan pada kondisi anaerob)

Fungi

- Termasuk eukariot, mempunyai dinding sel kaku
- Dapat berupa uniseluler (sel tunggal) maupun multiseluler
- Tidak mengandung klorofil
- Fungi (mikroskopik) terbagi menjadi Kapang dan Khamir

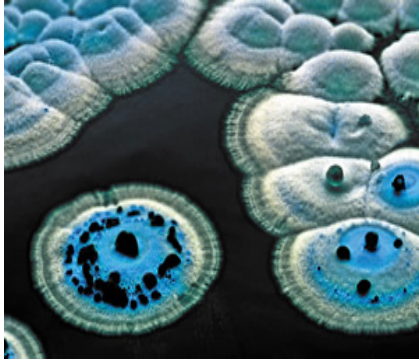
Kapang

- Berbentuk silindris dan saling melekat membentuk filamen yang disebut “hifa” yang dapat mengandung spora → berakumulasi menjadi “miselium” digunakan untuk memproduksi antibiotika (e.g penisilin), kecap, keju dll)

Khamir

- Uniseluler
- digunakan untuk membuat roti, minuman beralkohol dll

Kapang	Produk	Kegunaan
<i>Aspergillus niger</i>	Asam sitrat	Produk pangan, obat
<i>Rhizopus oryzae</i>	Asam laktat	Produk pangan, industri kimia, farmasi, kulit, tekstil, bioplastik PLA
<i>Aspergillus aureus</i>	pektinase	Penjernih sari buah
<i>Rhizopus nigricans</i>	Asam fumarat	Pembuatan resin, “wetting agent”
<i>Penicillium notatum/chrysogenum</i>	penisilin	antibiotika
<i>Candida tropicalis/ Saccharomyces cerevisiae</i>	PST	Protein non konvensional
<i>S. cerevisiae/ S. fragilis</i>	Etanol	Pelarut, bahan bakar, bahan baku industri



- 7) (*double stranded*, ds) DNA secara artifisial dapat dipisahkan dengan pemanasan atau agen kimia untuk mendapatkan pita tunggal (*single stranded*, ss), disebut proses denaturasi. Dengan pendinginan dan terkontrol, pita yang terpisah dapat disatukan lagi (*reanneal*) tetapi hanya dalam sekuen komplementer.
- 8) *Northern blot analysis* adalah metode untuk analisis sekuen asam amino messenger RNA (mRNA).
- 9) *Western blot analysis* adalah metode untuk analisis sekuen asam amino DNA. Biasanya tahapan meliputi; seleksi dan penyaringan → pemeliharaan kultur → propagasi.

Agen Hayati

Produk-Produk yang Dihasilkan dari Pemanfaatan Aplikasi Bioteknologi

1. Aplikasi pada bidang pertanian:

Aplikasi bioteknologi untuk pertanian menawarkan berbagai keuntungan. Perbaikan sifat tanaman dapat dilakukan dengan teknik modifikasi genetik dengan bioteknologi melalui rekayasa genetika. Aplikasi bioteknologi dalam bidang pertanian melalui teknologi perbaikan sifat tanaman dengan teknik rekayasa genetika.

Keuntungan bioteknologi pertanian antara lain:

- ✚ Meningkatkan produksi pangan misalnya dengan menciptakan kultivar unggul seperti tanaman padi tahan wereng, kapas tahan hama sehingga dapat meningkatkan hasil panen.
- ✚ Ternak yang dapat memproduksi asam amino tertentu.
- ✚ Pengolahan makanan; tempe, tape, oncom, kecap.
- ✚ Pengolahan minuman; anggur, bir, yoghurt, tuak, brem, dsb.
- Meningkatkan produksi peternakan
- Meningkatkan efisiensi dan kualitas pakan seperti manipulasi mikroba rumen
- Menciptakan jenis ternak unggul
- Menyediakan benih dan induk ikan berkualitas unggul.
- Meningkatkan system kekebalan ikan dengan menggunakan vaksin, imunostimulan, dan bioremediasi.
- Aplikasi probiotik pada pakan atau dalam lingkungan perairan budidaya sebagai penyeimbang mikroba dalam pencernaan dan lingkungan perairan.

- Potensi hasil panen yang lebih tinggi,
- Mengurangi penggunaan pupuk dan pestisida,
- Toleran terhadap cekaman lingkungan,
- Pemanfaatan lahan marjinal,
- Identifikasi dan eliminasi penyakit di dalam makanan ternak,
- Kualitas makanan dan gizi yang lebih baik, dan perbaikan defisiensi mikronutrien.

Sehingga akan:

- ✚ Meningkatkan produksi pangan misalnya dengan menciptakan kultivar unggul seperti tanaman padi dan tanaman semusim sehingga dapat memenuhi kebutuhan pangan masyarakat.
- ✚ Meningkatkan produksi dan kualitas melalui transgenic antara lain kapas, jagung, dll.
- ✚ Mempercepat swasembada jagung dengan jagung yang dihasilkan mempunyai kualitas yang lebih baik dan kebal terhadap hama

2. Aplikasi pada bidang peternakan:

Aplikasi bioteknologi dalam bidang peternakan menawarkan berbagai keuntungan antara lain:

- Meningkatkan produksi peternakan
- Meningkatkan efisiensi dan kualitas pakan seperti manipulasi mikroba rumen
- Menghasilkan embrio yang banyak dalam satu kali siklus reproduksi
- Ternak yang dapat memproduksi asam amino tertentu
- Menciptakan jenis ternak unggul

3. Aplikasi pada bidang perikanan:

Aplikasi bioteknologi dalam bidang perikanan menawarkan berbagai keuntungan antara lain:

- a. Menyediakan benih dan induk ikan
- b. Meningkatkan system kekebalan ikan dengan menggunakan vaksin, imunostimulan, probiotik dan bioremediasi.

Aplikasi probiotik pada pakan atau dalam lingkungan perairan budidaya sebagai penyeimbang mikroba dalam pencernaan dan lingkungan perairan.

4. Aplikasi pada bidang kesehatan dan pengobatan:

Aplikasi bioteknologi dalam bidang kesehatan dan pengobatan telah mandatkan manfaat antara lain:

- 1) Memproduksi obat-obatan terhadap penyakit infeksi (antibiotik) seperti; penisilin, streptomysin.
- 2) Memproduksi vaksin untuk pencegahan jenis penyakit tertentu sesuai dengan jenis vaksinnya seperti; polio, cacar, hepatitis-B, TBC dsb. Selain pada manusia, vaksin juga digunakan untuk melindungi ternak (ayam, sapi dsb) dari serangan berbagai penyakit menular.
- 3) Memproduksi zat kebal antibody untuk diagnosis penyakit, penelitian dan terapi. Antibodi monoclonal.
- 4) Untuk terapi gen misalnya untuk terapi penyakit genetis (bawaan).
- 5) Untuk memproduksi hormon; Insulin untuk terapi penderita kencing manis.
- 6) Untuk terapi gen; Sel somatis (*somatic gene therapy*); sel darah atau otot, terapi penyakit genetis (bawaan). Sel embrional (*Germ line gene therapy*);

4. Aplikasi pada bidang lingkungan

Aplikasi bioteknologi dalam bidang lingkungan antara lain:

- a. Untuk pengolahan limbah
- b. Pelestarian plasma nutfah

2. Aplikasi pada bidang kesehatan dan pengobatan:

Aplikasi bioteknologi dalam bidang kesehatan dan pengobatan telah mandatkan manfaat antara lain:

- Memproduksi obat-obatan terhadap penyakit infeksi (antibiotik) seperti; penisilin, streptomysin.
- Memproduksi vaksin untuk pencegahan jenis penyakit tertentu sesuai dengan jenis vaksinnnya seperti; polio, cacar, hepatitis-B, TBC dsb. Selain pada manusia, vaksin juga digunakan untuk melindungi ternak (ayam, sapi dsb) dari serangan berbagai penyakit menular.
- Memproduksi zat kebal (Antibodi monoclonal) untuk diagnosis penyakit, penelitian dan terapi.
- Untuk memproduksi hormon; Insulin untuk terapi penderita kencing manis.
- Untuk terapi gen; Sel somatis (*somatic gene therapy*); sel darah atau otot, terapi penyakit genetik (bawaan). Sel embrional (*Germ line gene therapy*);

3. Aplikasi pada bidang lingkungan

Aplikasi bioteknologi dalam bidang lingkungan adalah untuk penanganan dan pemanfaatan material sampah organik yang volumenya cenderung bertambah dengan pesat. Pemanfaatan sampah berdampak dapat mengeliminasi sumber polusi terutama pencemaran air, dan dengan penerapan proses biotek dapat mengubah limbah menjadi produk-produk yang bermanfaat. Beberapa limbah yang dapat digunakan untuk substrat fermentasi:

- Molase, sebagai produk sampingan (limbah) industri gula masih mengandung kadar gula 50 %. Molase digunakan secara luas sebagai bahan baku fermentasi dan untuk produksi antibiotik, asam organik, dan khamir untuk pembuatan roti, bumbu masak (MSG) atau diberikan langsung untuk makanan ternak.
- Whey sebagai produk sampingan (limbah) industri keju digunakan sebagai substrat fermentasi.
- Batang padi (damen) untuk produksi jamur merang.
- Bagase (ampas tebu) banyak mengandung ligno selulose.

Peran biotek dalam pemanfaatan bahan sampah organik:

- Mengubah kualitas makanan limbah agar sesuai untuk konsumsi manusia.
- Memberi makan bahan sampah secara langsung atau setelah pemrosesan ke unggas, babi, ikan, atau ternak lainnya yang dapat mencerna secara langsung.
- Limbah yang banyak mengandung selulose diberikan pada sapi atau ruminansia.
- Produksi biogas methane dan poduk fermentasi lain jika tidak dapat diberikan ternak.

1. Untuk memproduksi protein manusia (*human protein*) seperti: *blood clotting factor*, dan interferon, diperlukan penguasaan metode-metode mutakhir bioteknologi (*current methods of biotechnology*) berikut ... KECUALI

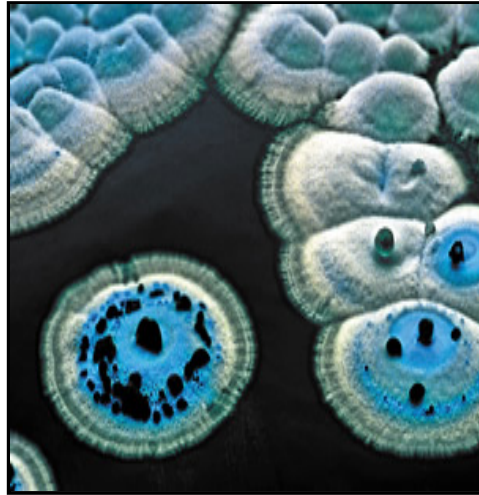
- A. Kultur jaringan
C. Terapi gena
- B. Rekayasa genetic
D. *Polymerase chains reaction* (PCR)
2. Dalam konteks bioteknologi, yang dimaksud jasad hidup (*living things*) untuk memproduksi MAb adalah ...
- A. Bakteriofage
C. Kapang transgenik
- B. Enzim komponen subseluler
D. Kultur sel hewan
3. Penemuan-penemuan baru dibidang immunologi telah berhasil diproduksi antibodi-monoklonal (MAb) secara massal dengan metode klonasi, karena MAb memiliki kelebihan antara lain ... KECUALI
- A. Peka (sensitivitas)
C. Akurat
- B. Khas (spesifitas)
D. Aseptik
4. Kontribusi bioteknologi yang bermanfaat untuk pengobatan penyakit gangguan metabolisme karena faktor keturunan adalah ...
- A. Rekayasa genetika
C. Hibridoma
- B. Terapi gena
D. Kloning
5. Berikut ini merupakan kata kunci bioteknologi, KECUALI
- A. Penerapan prinsip-prinsip ilmu pengetahuan dan rekayasa
B. Agen biologis
C. Barang dan jasa
D. Eksploitasi
6. Dalam konteks bioteknologi, yang dimaksud jasad hidup (*living things*) untuk memproduksi MAb adalah ...
- A. Bakteriofage
C. Kapang transgenik
- B. Enzim komponen subseluler
D. Kultur sel hewan
7. Berikut ini merupakan ciri-ciri bioteknologi modern, KECUALI
- A. Kurang steril
C. Kualitas standar dan terjamin
- B. Produksi dalam jumlah banyak (massal)
D. Menerapkan rekayasa genetika
8. Kontribusi bioteknologi yang bermanfaat untuk pengobatan penyakit gangguan metabolisme karena faktor keturunan adalah ...
- A. Rekayasa genetika
C. Hibridoma
- B. Terapi gena
D. Kloning
9. Jasad hidup (*living thing*) meliputi organisme (mikroba) yang digunakan untuk produksi Nata de coco adalah ...
- A. *Bacillus sp.*
C. *Lactobacillus sp.*
- B. *Acetobacter xylinum*
D. *Aspergillus sp.*
10. Metode mutakhir bioteknologi (*current methods of biotechnology*) yang digunakan untuk memperbanyak jaringan/sel dari jaringan orisinal tumbuhan atau hewan adalah ...
- A. Kultur jaringan
C. Hibridoma
- B. Rekayasa genetik
D. Kloning

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim (-). *Manual of Progesterone Enzyme Immunoassay Kit*. USA: Cayman Chemical Company.
- (1995). *Instruction Manual OmniTags: Universal Streptavidin/Biotin Affinity Immunostaining Systems*. USA: Lipshaw.
- Artama, W.T. (1990). *Teknik Hibridoma untuk Porduksi Antibodi Monoklonal*. Makalah Kursus Immuno-bioteknologi. Yogyakarta: PAU UGM.
- Boenisch, T. (1989). Staining Methods. Dalam: Nais S.J., (ed.): *Immunochemical Staining Methods*. USA: Dako Corps.
- Heru Nurcahyo (1997). Strategi Pengembangan Sumber Daya Manusia Berorientasi pada Penguasaan Bioteknologi *Cakrawala Pendidikan*. Edisi Khusus Dies Mei , 1997.
- , & Soejono, S.K. (2001). Pengaruh Curcumin dan Pentagamavunon-0 (PGV0) terhadap Steroidogenesis yang Dihasilkan oleh Kultur Sel Granulosa Berbagai Ukuran Folikel. *Mediagama*. Vol. III, No. 3. Hal.: 1-11.
- Primrose, S.B. (1987). *Modern Biotechnology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Pringgo Soedigdo (1992). Menyiapkan Para Ahli Biologi Guna Dapat Ikut dalam Pembangunan Bioteknologi di Indonesia. *Makalah Seminar Biologi Molekuler 1995*. Bandung: Kerjasama ITB dan Dirjen Dikti.
- Shupnik, M.A. (1999). Introduction to Molecular Biology. In: Fauser, B.C.J.M., Rutherford, A.J., Strauss, III., J.F., and Van Steirteghem, A. (eds.) *Molecular Biology in Reproductive Medicine*. The Parthenon Publishing Group.

Bab 1

Bioteknologi Fermentasi



Gambar 1.1. Kapang, sebagai representasi jamur multiseluler

Pada bab ini akan dipelajari tentang:

- Pengertian fermentasi
- Kultivasi mikroba
- Medium kultur
- Bioreaktor
- Proses *downstream*
- Aplikasi fermentasi dalam produksi minuman dan makanan

Pengolahan dan pengawetan makanan atau minuman dengan menggunakan mikroba bertujuan agar zat makanan tidak lekas busuk (rusak), selain itu, juga memiliki rasa dan bau yang enak (khas) serta kandungan gizi yang kaya dan lengkap. Beberapa produk minuman hasil fermentasi antara lain: bir, yoghurt, keju, cuka, sirkol, acar, sosis, kecap, tempe, tape, oncom, dsb.

Pengertian Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu cara yang telah dikenal dan digunakan sejak lama sejak jaman kuno. Fermentasi merupakan suatu cara untuk mengubah substrat menjadi produk tertentu yang dikehendaki dengan menggunakan bantuan mikroba.

Bioteknologi berbasis fermentasi sebagian besar merupakan proses produksi barang dan jasa dengan menerapkan teknologi fermentasi atau yang menggunakan mikroorganisme untuk memproduksi makanan dan minuman seperti: keju, yoghurt, minuman beralkohol, cuka, sirkol, acar, sosis, kecap, dll.

Produk-produk tersebut biasanya dimanfaatkan sebagai minuman atau makanan.

Bioteknologi fermentasi, teknologi fermentasi merupakan teknologi yang menggunakan mikroba untuk memproduksi makanan dan minuman.

Sejarah Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu cara yang telah dikenal dan digunakan sejak lama sejak jaman kuno.

- ✚ 6000-4000 SM: teknologi fermentasi pembuatan bir di Sumeria dan Mesir
- ✚ Abad ke-14: distilasi untuk menghasilkan minuman beralkohol tinggi di Cina

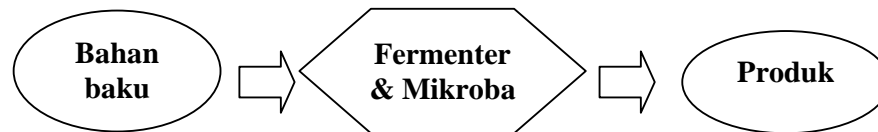
- ✚ Sebelum 1865 : teknologi pembuatan bir, anggur, keju, yogurt, dan makanan lainnya sebagai hasil dari proses fermentasi (era pra-Pasteur)
- ✚ 1865-1940: teknologi pembuatan etanol, butanol, aseton, gliserol, asam-asam organik (era Pasteur).

Fermentasi dapat dibedakan menjadi:

- (1) fermentasi aerob jika memerlukan oksigen mengubah substrat gula menjadi dan hasil akhirnya asam piruvat dan karbondioksida (CO₂), dan
- (2) fermentasi anaerob jika tidak memerlukan oksigen, gula akan diubah menjadi asam piruvat, kemudian asetaldehida dan akhirnya menjadi alkohol; etanol atau methanol dan asam laktat.

Sebagai suatu proses fermentasi memerlukan:

1. Mikroba sebagai inokulum (starter).
2. Tempat (wadah) untuk menjamin proses fermentasi berlangsung dengan optimal.
3. Substrat sebagai tempat tumbuh (medium) dan sumber nutrisi bagi mikroba.
4. Produk, sesuatu yang dihasilkan dari proses fermentasi.



Gambar 1: Skema Proses Fermentasi
Fermentasi sebagai suatu proses memerlukan:

Prinsip-prinsip Fermentasi

Hal-hal yang perlu diperhatikan agar fermentasi dapat berjalan dengan optimal, maka harus memperhatikan faktor-faktor berikut ini:

1. Aseptis: terbebas dari kontaminan
2. Volume kultur relatif konstan (tidak bocor atau menguap)
3. Kadar oksigen terlarut harus memenuhi standar
4. Kondisi lingkungan seperti: suhu, pH harus terkontrol.
5. Komposisi medium pertumbuhan harus mencukupi kebutuhan mikroba.
6. Penyiapan inokulum harus murni.
7. Sifat fermentasi
8. Prinsip kultivasi mikroba dalam sistem cair
9. Desain bioreaktor (fermenter)
10. Desain medium
11. Instrumentasi dan pengendalian proses dalam bioreaktor
12. Teknik pengukuran
13. Pemindahan massa dan energi
14. Peningkatan skala
15. Fermentasi substrat padat
16. Kultur biakan murni (isolat)
17. Tahap produksi akhir.

Sifat Fermentasi

1. Aerob memerlukan adanya oksigen.
2. Anaerob tidak memerlukan adanya oksigen.

Desain fermenter (bioreaktor)

Istilah fermenter (bioreaktor) digunakan untuk tempat berlangsungnya proses fermentasi. Pada prinsipnya fermenter harus menjamin pertumbuhan mikroba dan produk dari mikroba di dalam fermenter. Semua bagian di dalam fermenter pada kondisi yang sama dan semua nutrisi termasuk oksigen harus tersedia merata pada setiap bagian dalam fermenter dan produk limbah seperti; panas, CO₂, dan metabolit harus dapat dikeluarkan (*remove*). Fermenter sebagai wadah harus dapat memberikan kondisi lingkungan fisik yang cocok bagi katalis sehingga dapat berinteraksi secara optimal dengan substrat. Oleh karena itu, wadah perlu didesain sedemikian rupa sehingga proses dalam wadah dapat dimonitor dan dikontrol.

Masalah utama fermenter untuk produksi skala besar adalah pemerataan medium kultur dalam fermenter. Harus homogen artinya medium kultur harus tercampur merata. Oleh karena itu, wadah perlu didesain sedemikian rupa sehingga proses dalam wadah dapat dimonitor dan dikontrol. Fermenter memberikan kondisi lingkungan fisik yang cocok bagi katalis sehingga dapat berinteraksi secara optimal dengan substrat. Desain fermenter mulai dari yang sederhana (tangki dengan putaran) sampai yang *integrated system* dengan komputer.

Teknologi medium

Medium sebagai tempat tumbuh dan berkembang harus menjamin ketersediaan dan kebutuhan mikroba untuk hidup dan tumbuh berkembang. Medium biasa disebut substrat. Medium harus mengandung nutrisi dan oksigen yang dibutuhkan mikroba. Mikroba berada dalam medium yang mengandung nutrisi sebagai substrat untuk tumbuh dan berkembang bercampur dengan produk-produk yang dihasilkan termasuk limbah. Medium kebanyakan berasal dari tumbuhan dan sedikit dari produk hewani. Sebagai contoh; biji-bijian (*grain*), susu (milk). *Natural raw material* berasal dari hasil pertanian dan hutan. Karbohidrat; gula, pati (tepung), selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Berdasarkan bentuknya substrat dapat dibedakan menjadi: (1) Substrat cair sebagai contoh air untuk pembuatan anggur. (2) Substrat semi cair sebagai contoh media untuk pembuatan yoghurt. (3) Substrat padat sebagai contoh media yang digunakan untuk produksi tempe, oncom, kecap, kompos dsb. *Solid substrate fermentation* (SSF), melibatkan jamur berfilamen, yeast atau *Streptomyces*.

Inokulum

Inokulum adalah agen hayati (*living thing*) meliputi organisme dan komponen subseleuler. Mikroba memiliki sifat khas sehingga dapat digunakan sebagai agen untuk memproduksi bahan-bahan kimia yang diperlukan oleh manusia. Mikroba memiliki kemampuan mensintesis berbagai senyawa di alam dan juga dapat menghasilkan berbagai jenis enzim yang dapat dimanfaatkan dalam industri pengolahan makanan, bahan kimia, dan/atau bahan farmasi. Enzim yang dihasilkan merupakan katalisator yang mendorong terjadinya proses sintesis dan perombakan

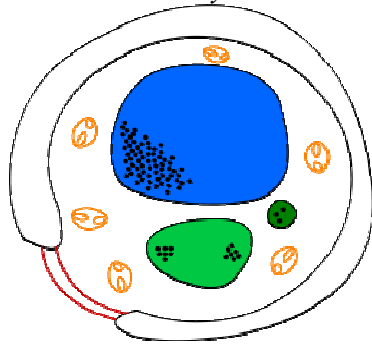
bahan baku.

Mikroba industri merupakan kunci kegagalan atau keberhasilan suatu fermentasi atau kultivasi. Kriteria Mikroba Industri:

- Merupakan galur murni
- Sifat genetiknya stabil
- Dapat menghasilkan sel vegetatif, spora atau unit-unit reproduktif lain
- Mampu tumbuh dengan cepat setelah diinokulasi
- Mampu menghasilkan produk yang diinginkan dalam waktu yang pendek & tidak menghasilkan produk sampingan yang toksik
- Mampu melindungi diri dari kontaminasi (pH, suhu, inhibitor)
- Dapat disimpan dalam jangka waktu yang panjang
- Galur dapat dikembangkan kualitasnya, sehingga produksinya meningkat

Mikrobia yang umumnya terlibat dalam fermentasi adalah bakteri, khamir, dan kapang

- Bakteri *Acetobacter xylinum* pada pembuatan nata decoco
- Khamir *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan alkohol



- Kapang *Rhizopus* sp pada pembuatan tempe

Mikroba dapat digolongkan menjadi: (1) kelompok bakteri: *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. *Eschericia* sp. (2) kelompok jamur: *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. (3) kelompok khamir (yeast): *Saccharomyces* sp.

Tabel 1: Berbagai jenis inokulum dan produknya

Jenis	Inokulum	Substrat	Produk
Jamur	<i>Rhizopus oligoporus</i>	Kedele Ampas kacang	Tempe, Oncom
	<i>Aspergillus wentii</i>	Kedele	Kecap
	<i>Neurospora crassa</i>	Bungkil kacang tanah	Oncom
Khamir (Yeast)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bahan roti, tetes tebu	Roti
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bahan dasar karbohidrat: beras, ketan, ketela	Tape
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Air anggur, bir, brem	anggur, bir, brem
Bakteri	<i>Acetobacter xylinum</i>	Air kelapa	Nata de coco
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Air susu	Yoghurt
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		Keju

Produk-produk Aplikasi Industri Bioteknologi Fermentasi

Dalam dimensi baru teknologi fermentasi mikroba berperan untuk menghasilkan:

1. Bir, minuman beralkohol. Sari buah, atau gula diiberi *Saccharomyces cerevisiae* kemudian diinkubasikan akan didapatkan minuman beralkohol.
2. Yoghurt, diproduksi dengan cara memfermentasi air susu dengan bakteri bukan khamir. Biasanya menggunakan campuran *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Pada pembuatan yoghurt air susu dipasteurisasi pada suhu 73°C selama 15 detik. Kemudian ditambahkan kultur starter bakteri. Fermentasi pada suhu 40°C selama 2,5 -3,5 jam sampai susu menggumpal, dan asam laktat dihasilkan. Bakteri mengubah gula susu (laktosa) pada kondisi anaerobic. Lactose diubah menjadi asam laktat yang bersifat menggumpalkan casein (protein susu). Dihasilkan krem yoghurt tebal dengan rasa sedikit asam. Yoghurt sebaiknya disimpan pada suhu 4°C untuk mengurangi aktivitas mikroba.
3. Keju, berbagai jenis bakteri dapat digunakan untuk memfermentasi susu menjadi keju, tergantung jenis keju yang dihasilkan. Biasanya digunakan spesies *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Enzim yang diperlukan untuk menghasilkan keju adalah *rennet* yang mengandung chymosin yang bersifat menggumpalkan casein.
4. VCO, santan kelapa bagian kanil (lapisan atas) diberikan inokulum dieramkan beberapa hari kemudian didapatkan minyak kelapa murni (VCO) yang memiliki khasiat sebagai obat.
5. Nata de coco (air kelapa), Nata de pina (nanas), nata de soya (limbah tahu). *Acetobater xylinum* ditumbuhkan pada substrat gual yang diberi air kelapa dieramkan beberapa hari didapatkan nata de coco. Yang kaya serat dan baik untuk sumber makanan berserat tinggi.
6. Protein sel tunggal. Biomassa (*single cell protein*). Mikroorganisme selain berperan dalam fermentasi juga sebagai penghasil protein yang disebut *single cell protein* (SCP). SCP selain mengandung protein juga mengandung karbohidrat, lemak, vitamin dan mineral. Untuk memenuhi kebutuhan pangan terutama sumber protein yang semakin meningkat sejalan dengan pertumbuhan jumlah penduduk diperlukan langkah bioteknologi untuk memproduksi protein dalam kuantitas cukup dan kualitas baik. Mengapa mikroorganisme karena pertumbuhannya cepat yaitu 20 – 120 menit (bakteri), algae (2 – 6 jam). Sedangkan ayam (3 – 4 minggu). Hal-hal yang mesti diperhatikan dalam pemanfaatan mikroorganisme sebagai penghasil protein antara lain: keamanan, nilai nutrisi, dan penerimaan masyarakat. Kelebihan mikroorganisme untuk produksi SCP antara lain: pertumbuhan cepat, mudah dimodifikasi secara genetic, mengandung protein relatif tinggi, memerlukan ruang yang relatif sempit, dan dapat tumbuh pada berbagai substrat (*raw material*).
7. Produksi antibiotik. Streptomycin oleh streptomyces, penisilin oleh penicilium notatum.

Reaksi fermentasi multifase

1. Fase gas (mengandung N₂, O₂ dan CO₂)
2. Fase cair (medium cair dan substrat cair), dan

3. Fase padat.

Prinsip kultivasi mikroba dalam sistem cair

Medium sebagai tempat tumbuh dan berkembang harus menjamin ketersediaan dan kebutuhan sel untuk hidup dan tumbuh berkembang. Medium mengandung nutrisi dan oksigen yang dibutuhkan sel. Mikroba berada dalam cairan yang mengandung nutrisi sebagai substrat untuk tumbuh dan berkembang bercampur dengan produk-produk yang dihasilkan termasuk limbah. Nutrisi dan oksigen yang diperlukan untuk pertumbuhan optimal mikroba harus tercampur merata (homogen) pada semua bagian fermenter. Mikroba berada dalam cairan yang mengandung nutrisi sebagai substrat untuk tumbuh dan berkembang bercampur dengan produk-produk yang dihasilkan termasuk limbah. Nutrisi dan oksigen yang diperlukan untuk pertumbuhan optimal mikroba harus tercampur merata (homogen) pada semua bagian fermenter.

Untuk mendapatkan sistem fermentasi yang optimum, maka fermenter harus memenuhi syarat sebagai berikut:

- Bebas dari kontaminan
- Volume kultur relatif konstan (tidak bocor atau menguap)
- Kadar oksigen terlarut harus memenuhi standar
- Kondisi lingkungan seperti: suhu, pH harus terkontrol. *Stirred tank reactor* system model yang banyak dipakai.

Sistem fermenter tertutup dan terbuka

1. Tertutup, semua nutrisi ditambahkan pada awal fermentasi dan pada akhir fermentasi dikeluarkan bersama produknya. Sebagai contoh: pembuatan bir (*brewing*), antibiotik, dan enzim. *All in all out*.
2. Terbuka (kontinyu), jika seluruh komponen sistem seperti mikroorganisme dan nutrisi secara terus menerus terjadi pemasukan medium kultur dan pengeluaran biomas bersama produk-produk fermentasi lainnya. Sebagai contoh: SCP (petrokimia).

Tipe fermenter

Desain fermenter mulai dari yang sederhana (tangki dengan putaran) sampai yang *integrated system* dengan komputer. Fermenter berdasarkan sistem tipe operasinya dapat dibedakan menjadi 2 jenis yaitu:

1. Septis untuk pembuatan pengembang roti, bir (*brewing*).
2. Aseptis untuk memproduksi *fine product* seperti: antibiotik, asam amino, polisakarida dan *single cell protein* (SCP).

Skala fermenter

Fermenter berdasarkan skala produksinya dapat dibedakan menjadi 2 jenis yaitu:

1. Skala kecil (*small scale*); untuk industri rumah tangga (*home industry*).

2. Skala besar (*large scale*); untuk industri skala besar (*petrokimia industry*). Masalah utama fermenter untuk produksi skala besar adalah pemerataan medium kultur dalam fermenter. Harus homogen artinya medium kultur harus tercampur merata.

Desain Media

Medium untuk fermentasi biasa disebut substrat. Biasanya pada teknologi fermentasi digunakan bahan dasar yang mengandung karbon. Oleh karena itu, kebanyakan berasal dari tumbuhan dan sedikit dari produk hewani. Sebagai contoh; biji-bijian (*grain*), susu (*milk*). *Natural raw material* berasal dari hasil pertanian dan hutan. Karbohidrat; gula, pati (tepung), selulosa, hemiselulosa, dan lignin.

1. Gula, bahan makanan yang mengandung gula mudah dan relatif mudah didapatkan untuk proses biotek.
2. Pati, jagung, padi, ganum, kentang, dan pohong (kassava) didegradasi menjadi gula sederhana (monosakarida) dengan hidrolisis sebelum fermentasi. Pati juga dapat digunakan sebagai bahan bakar non minyak (etanol).
3. Selulosa
4. Substrat dari limbah industri: Molase (tetes tebu), mengandung 50 % gula sebagai substrat untuk produksi antibiotik, asam organik. Whey (air dadih), Damen dan ampas tahu, bahkan urine hewan ternak.

Berdasarkan bentuknya substrat dapat dibedakan menjadi:

1. Substrat cair sebagai contoh air untuk pembuatan anggur. Media ini digunakan untuk menambah biomassa sel pada pertumbuhan bakteri, ragi dan mikroalga.
2. Substrat semi cair sebagai contoh media untuk pembuatan yoghurt. Media ini digunakan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup anaerobic untuk menambah biomassa sel.
3. Substrat padat sebagai contoh media yang digunakan untuk produksi tempe, oncom, kecap, kompos dsb. *Solid substrate fermentation* (SSF), melibatkan jamur berfilamen, yeast atau *Streptomyces*. Media padat umumnya dipergunakan untuk menumbuhkan bakteri, jamur dalam peremajaan dan pemeliharaan kultur murni dalam bentuk agar miring.

Substrat dari limbah industri seperti: Molase (tetes tebu), mengandung 50 % gula sebagai substrat untuk produksi antibiotik, asam organik. Whey (air dadih), Damen dan ampas tahu, bahkan urine hewan ternak.

Adalah Untuk menumbuhkan dan mengembangkan mikroba

- ▣ Media mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba
- ▣ Media mempunyai tekanan osmosa dan derajat keasaman yang sesuai untuk mikroba
- ▣ Media harus dalam keadaan steril

Inokulum

Jasad hidup (*living thing*) meliputi organisme (mikroba) dan komponen sub selulernya dalam konteks bioteknologi merupakan organisme renik yang ada di alam. Mikroba memiliki sifat khas sehingga dapat digunakan sebagai sarana untuk memproduksi bahan-bahan kimia yang diperlukan oleh manusia. Mikroba memiliki kemampuan mensintesis berbagai senyawa di alam dan juga dapat menghasilkan berbagai jenis enzim yang dapat dimanfaatkan dalam industri pengolahan makanan, bahan kimia, dan/atau bahan farmasi.

Enzim yang dihasilkan merupakan katalisator yang mendorong terjadinya proses sintesis dan perombakan makhluk hidup.

1. Bakteri: *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Eschericia sp.*
2. Jamur: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*
3. Jamur filamentous:
4. Khamir (yeast): *Saccharomyces sp.*

Tabel 1: Berbagai jenis inokulum dan produknya

Jenis	Inokulum	Substrat	Produk
Jamur	<i>Rhizopus oligoporus</i>	Kedele Ampas kacang	Tempe Oncom
Khamir (Yeast)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bahan roti, tetes tebu	Roti
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bahan dasar karbohidrat: beras, ketan, ketela	Tape
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Air anggur, bir, brem	anggur, bir, brem
Bakteri	<i>Acetobacter xylinum</i>	Air kelapa	Nata de coco
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Air susu	Yoghurt
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		

- KULTUR ALAMI: dilakukan pada proses fermentasi tradisional yang memanfaatkan mikroorganisme yang ada di lingkungan (gatot dan growol yang dibuat dari singkong)
- KULTUR MURNI: mikroorganisme yang akan digunakan dalam fermentasi dengan sifat dan karaktersitik yang diketahui dengan pasti sehingga produk yang dihasilkan memiliki stabilitas kualitas yang jelas

Sebagai contoh:

- Kultur murni tunggal: *Lactobacillus casei* pada fermentasi susu
- Kultur murni campuran: pada kecap yang menggunakan *Aspergillus oryzae* (fermentasi kapang), bakteri *Pediococcus sp* (fermentasi garam), dan khamir *Saccharomyces ruuxii*.

Sumber Mikroba

- Sumber mikroba industri: sumber alami atau lembaga koleksi kultur
→ Sumber alami: tanah, air, sayuran segar/busuk, tanaman/hewan, limbah dll → jumlah dan jenis mikroba sangat beragam

- Tahap pertama dalam seleksi mikroba yang akan digunakan untuk industri :
 → isolasi mikroba, sehingga diperoleh kultur murni (semua sel dlm populasi identik & berasal dari sel induk yang sama → sifat morfologi & fisiologi seragam).
- Setelah itu dilakukan seleksi sehingga diperoleh galur dengan kinerja terbaik
- Terakhir baru dilakukan identifikasi dengan menggunakan kunci-kunci yang sesuai, sehingga diketahui nama (klasifikasi) mikroba tersebut
- Mikroba yang telah diperoleh harus disimpan dengan teknik penyimpanan yang baik, sehingga kemurniannya terpelihara dalam jangka waktu yang panjang.



Seleksi Mikroba

Tujuannya adalah mendapatkan galur dengan kinerja terbaik, rendemen lebih tinggi, tidak menghasilkan produk sampingan yang tidak dikehendaki, peningkatan kemampuan penggunaan sumber C dan N yang murah, Perubahan morfologi sel menjadi bentuk yang lebih mudah dipisahkan dari produk, Pendekatan genetika untuk memperbaiki kualitas mikroba:

1. Mutasi
2. Rekombinasi

Desain Bioreaktor (Fermenter)

Wadah (fermenter) memberikan kondisi lingkungan fisik yang cocok bagi katalis sehingga dapat berinteraksi secara optimal dengan substrat. Pada prinsipnya fermenter harus menjamin pertumbuhan mikroba dan produk dari mikroba di dalam fermenter. Semua bagian di dalam fermenter pada kondisi yang sama dan semua nutrisi termasuk oksigen harus tersedia merata pada setiap sel dalam fermenter dan produk limbah seperti; panas, CO₂, dan metabolit harus dapat dikeluarkan (*remove*). Oleh karena itu, wadah perlu didesain sedemikian rupa sehingga proses dalam wadah dapat dimonitor dan dikontrol.

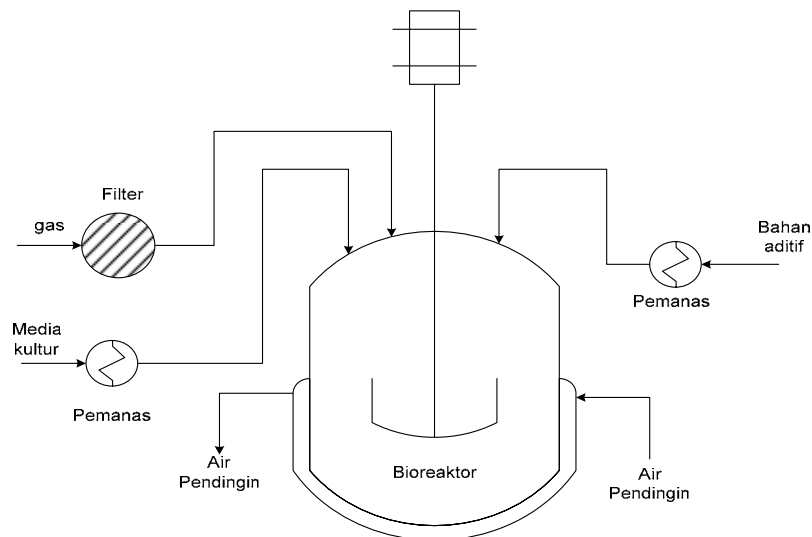
Bioreaktor adalah suatu tangki yang di dalamnya terjadi proses kimia yang melibatkan mikroorganisme atau zat-zat biokimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme.

Proses aktivitas organisme dalam bioreaktor sangat dipengaruhi oleh kondisi-kondisi: pH, suhu dan lain-lain, oleh karena itu pada bioreaktor dilengkapi oleh Kontrol Aliran Gas (seperti O₂, N₂, CO₂), suhu, pH, Kadar oksigen terlarut, kecepatan putar pengaduk.

Untuk mencegah terjadinya kontaminasi produksi dari lingkungan luarnya bioreaktor dan semua pipa pendukung harus disterilkan (biasanya dengan uap yang bertekanan tinggi).

Sterilisasi berarti hilangnya berbagai macam bentuk organisme yang dapat tumbuh, baik organisme yang menguntungkan maupun yang merugikan dan organisme yang dapat merusak maupun mematikan kultur murni yang dilakukan. Organisme ini dapat berbentuk seperti bakteri, virus, fungi, spora dan mikroorganisme yang lainnya (Bact, 2006).

Untuk mencegah masuknya kontaminan melalui udara ke dalam sistem, udara yang masuk harus terlebih dahulu dilewatkan melalui *glass wool* yang steril.



Pada skala laboratorium atau industri skala kecil (*small scale*), pemerataan medium dalam fermenter dapat dilakukan cukup dengan mengocok atau memakai *shaker*. Pada skala besar (*large scale*) dengan volume 2.000 liter, maka perlu desain fermenter khusus yang menjamin medium dapat tercampur homogen. Masalah utama fermenter untuk produksi skala besar adalah pemerataan medium kultur dalam fermenter. Harus homogen artinya medium kultur harus tercampur merata. Untuk mendapatkan sistem fermentasi yang optimum, maka fermenter harus memenuhi syarat sebagai berikut:

1. Terbebas dari kontaminan
2. Volume kultur relatif konstan (tidak bocor atau menguap)
3. Kadar oksigen terlarut harus memenuhi standar
4. Kondisi lingkungan seperti: suhu, pH harus terkontrol. *Stirred tank reactor* system model yang banyak dipakai.

KULTIVASI MIKROBA

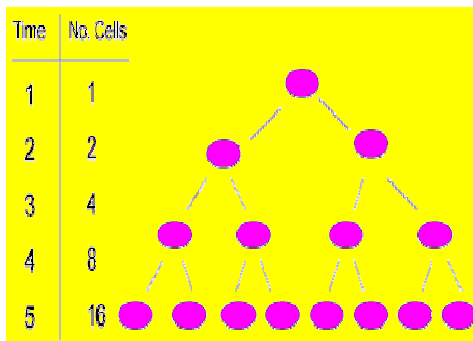
Adalah Upaya pemeliharaan bagi pertumbuhan mikroba. Untuk berhasilnya kultivasi mikroba diperlukan teknik aseptik, medium serta lingkungan fisik yang sesuai.

Lingkungan dipengaruhi oleh:

- Temperatur
- Kelembaban
- kadar oksigen
- pH, dan
- tekanan osmosis

Kurva Pertumbuhan

Bila sel ditumbuhkan pada kultur curah, maka sel akan tumbuh dengan melalui : fase lag, fase eksponensial (fase log), fase stasioner dan akhirnya fase kematian



- Mengapa populasi sel meningkat dengan cara eksponensial ?
- Perhatikan sel tunggal di dalam bioreaktor → Sel ini membelah diri tiap jam (pembelahan biner).
- Populasi sel pada tiap waktu generasi dapat digambarkan sbb.
Bila 1 sel membelah menjadi 2 sel → 2 → 4 → 8 dst
 $1 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow 2^4 \dots \rightarrow 2^n = N$ (jumlah sel)
Pangkat (eksponen) n = jumlah generasi

Peningkatan Skala (*Up Scalling*)

Proses fermentasi berkembang dalam 3 tahap.

1. Tahap perintisan (laboratorium)
2. *Pilot plan*, dan
3. Skala lapangan (ekonomi).

Kondisi lingkungan meliputi: faktor kimia (konsentrasi substrat) dan faktor fisik (perpindahan medium, pencampuran medium). Faktor fisik menimbulkan problem pada skala besar. Sehingga perlu designer dari teknik kimia.

Proses Menghilir (*Downstreaming Process*)

Merupakan suatu proses pemurnian bahan baku sebelum dimasukkan dalam bioreaktor untuk proses fermentasi. Terdiri dari 2 proses:

1. Proses pemurnian bahan baku: Menghilangkan kotoran-kotoran atau bahan pengganggu yang terkandung dalam media kultur seperti pada proses fermentasi alkohol, dilakukan proses pemisahan kandungan Ca dan Mg yang terkandung dalam gula dengan menggunakan H₂SO₄ dengan reaksi sbb :
 - $\text{Ca} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CaSO}_4 \downarrow + \text{H}_2\text{O}$
 - $\text{Mg} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{MgSO}_4 \downarrow + \text{H}_2\text{O}$
 - Setelah diperoleh endapan CaSO₄ dan MgSO₄ dipisahkan menggunakan separator sentrifugal.
2. Proses sterilisasi: Mematikan mikroorganismenya yang dianggap mengganggu proses fermentasi dengan cara pemanasan sampai suhu 120 °C.



Aplikasi Kultur Curah:

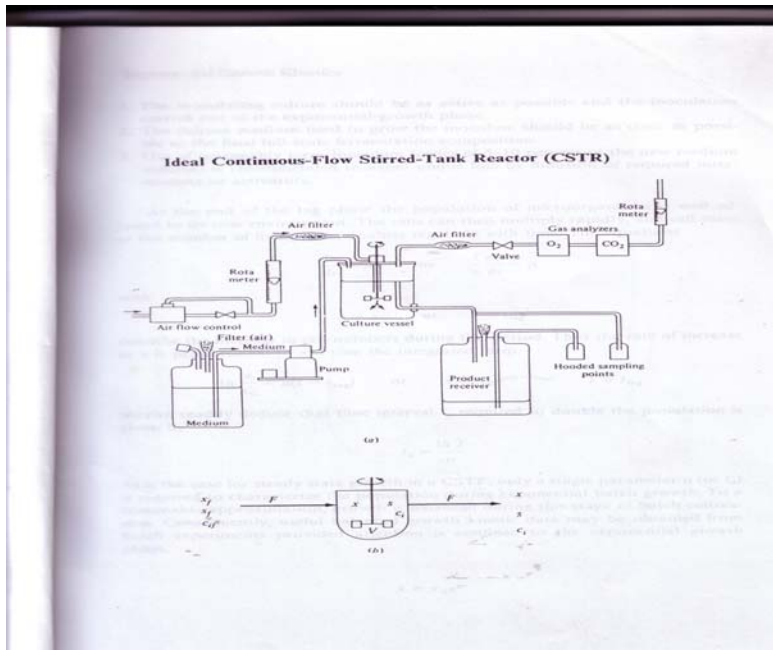
- Digunakan untuk memproduksi biomassa, metabolit primer dan metabolit sekunder
- Untuk produksi biomassa → digunakan kondisi kultivasi yang mendukung pertumbuhan biomassa, sehingga mencapai maksimal
- Untuk produksi metabolit primer → kondisi kultivasi harus dapat memperpanjang fase eksponensial yang dibarengi dengan sintesis produk
- Untuk produksi metabolit sekunder → kondisi kultivasi harus dapat memperpendek fase eksponensial dan memperpanjang fase stasioner

KULTUR SINAMBUNG

- Media segar secara kontinyu ditambahkan ke dalam bioreaktor, dan pada saat yang bersamaan cairan kultivasi dikeluarkan (Sistem Terbuka)

- Sel mikroba secara kontinu berpropagasi menggunakan media segar yang masuk, dan pada saat yang bersamaan produk, produk samping metabolisme dan sel dikeluarkan dari bioreaktor → volume tetap
- Bioreaktor kultur sinambung membutuhkan lebih sedikit pembersihan dibandingkan sistem curah.
- Dapat menggunakan sel mikroba imobil untuk memaksimalkan waktu tinggalnya (retensi), sehingga meningkatkan produktivitasnya.

Imobilisasi sel: penempatan mikroba pada ruang/daerah tertentu, sehingga dapat mempertahankan kestabilannya & dapat digunakan berulang-ulang (contoh : menumbuhkan/melekatkan mikroba pada *carrier*)



Kultur Sinambung

Kelebihan:

Produktivitas lebih tinggi, penyebab:

- lebih sedikit waktu persiapan bioreaktor per satuan produk yang dihasilkan
- laju pertumbuhan & konsentrasi sel dapat dikontrol → dengan mengatur laju dilusi
- pemasokan oksigen dan pembuangan panas dapat diatur

Dengan demikian hanya butuh pabrik lebih kecil (pengurangan biaya modal untuk fasilitas baru)

2. Dapat dijalankan pada waktu yang lama
3. Cocok untuk proses yang resiko kontaminasinya rendah (contohnya penanganan limbah cair) & produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan
4. Pemantauan dan pengendalian proses lebih sederhana
5. Tidak ada akumulasi produk yang menghambat

Dengan mengontrol laju dilusi → dimungkinkan untuk mempertahankan laju pertumbuhan spesifik yang optimal untuk pembentukan produk.

Kelemahan:

- Aliran umpan yang lama → risiko kontaminasi besar (operasi harus hati-hati & desain peralatan lebih baik).
- Peralatan untuk operasi dan pengendalian proses harus bisa tetap bekerja baik untuk waktu yang lama.
- Memerlukan mikroba dengan kestabilan genetik tinggi, karena akan digunakan pada waktu yang lama → Terjadinya degenerasi galur mikroba yang digunakan akibat mutasi spontan menyebabkan penurunan produk yang dihasilkan.
- Sebaiknya ada konsumen/permintaan yang tetap terhadap produk spy efisien

Start-Up

- Kultivasi sinambung diawali dengan kultivasi curah.
- Setelah kultur mencapai fase eksponensial, lalu umpan dimasukkan.
- Bila komposisi media saat start-up sama dengan umpan, perubahan dari curah ke sinambung menyebabkan konsentrasi sel atau produk berosiilasi (A) → penyebab: kultur mikroba mengalami hambatan oleh substrat). → dicegah dengan komposisi media saat start-up 1/2 umpan (B)
- Penambahan umpan dilakukan kira-kira setelah konsentrasi sel $\frac{1}{2}$ konsentrasi sel saat “*steady-state*” (biomassa, substrat & produk tidak berubah dan laju metabolisme sel konstan).

Aplikasi Kultur Sinambung

Digunakan untuk penelitian fisiologi dan biokimia mikroba, dikarenakan kondisinya mantap, laju pertumbuhan dapat diatur oleh laju alir dan laju pertumbuhan dibatasi oleh konsentrasi substrat pembatas → dapat digunakan untuk penelitian pengaruh substrat pembatas terhadap kinerja mikroba, untuk perbaikan sistem curah/semi sinambung.

- Untuk isolasi dan seleksi mikroba penghasil enzim menggunakan media diperkaya
- Untuk produksi biomassa, contoh ICI (Imperial Chemical Industries, kapasitas bioreaktor 3000 m³, substrat metanol)
- Untuk produksi bir menggunakan bioreaktor menara (tower bioreactor)

Kultur Semi Sinambung (*Fed-Batch*)

- Media segar ditambahkan ke dalam bioreaktor tanpa pengeluaran isi bioreaktor.
- Pada kultur *fed batch*, media segar ditambahkan ke dalam bioreaktor tanpa pengeluaran isi bioreaktor secara kontinyu.
- Harus disediakan ruang dalam bioreaktor untuk penambahan media
- Pada saat isi bioreaktor penuh, bioreaktor dikosongkan, baik sebagian atau seluruhnya dan proses dimulai kembali.
- Dapat mengurangi efek represif sumber karbon akibat penggunaan kons substrat yang tinggi dan mempertahankan kapasitas aerasi dalam bioreaktor

Dapat mencegah efek toksik komponen media

Aplikasi Kultur Semi Sinambung (*Fed-Batch*)

- Untuk produksi antibiotika penisilin (metabolit sekunder)
 - - kultivasi 2 tahap: fase pertumbuhan sel cepat dan fase produksi yang diatur dengan mengatur umpan substrat glukosa

- Na-fenilasetat (prekursor) toksik thd *Penicillium chrysogenum*
 → pengumpulan harus diatur

- Untuk memproduksi enzim yang rentan terhadap represi katabolit. Sebagai contoh: Enzim selulase oleh *Trichoderma reesei*

	Kultur Curah	Semi Sinambung	Kultur Sinambung
Aliran masuk (F_{in}) Aliran keluar (F_{out})	$F_{in} = F_{out} = 0$	$F_{in} > 0, F_{out} = 0$	$F_{in} = F_{out} > 0$
Volume kultur	Konstan	Meningkat	Konstan
Pengendalian kons substrat	Tdk mungkin (menurun)	Mungkin (konstan)	Mungkin (konstan)
Konsentrasi Sel	Rendah (<5 g/l)	Kons. tertentu (> 100 g/l)	
Konsentrasi produk	Meningkat s.d tk rendah	Meningkat s.d tk tinggi	Konstan
Kemudahan bagi pengguna	Mudah	Agak mudah	Sulit
Bahaya kontaminasi	Tidak serius	Tidak serius	Serius

APLIKASI BIOTEK FERMENTASI DALAM PRODUKSI MAKANAN DAN MINUMAN

- Fermentasi Tempe
- Fermentasi Tape
- Fermentasi alkohol
- Fermentasi Vitamin
- Fermentasi Yogurt
- Fermentasi Kefir
- Fermentasi Keju
- Fermentasi Nata deCoco
- Fermentasi teh Kombucha
- Fermentasi Kecap

Fermentasi tempe

Tempe merupakan hasil fermentasi dari kedelai (yang telah direbus ~_~) menggunakan jamur *Rhizopus oryzae*

Bahan Baku Tempe:

- ▣ Usar: Mengandung *Rhizopus*
- ▣ Kedelai: Bahan baku utama, kaya protein
- ▣ Air
- ▣ Asam asetat/laktat: Digunakan untuk menghambat bakteri



Kedelai
 Perebusan I air
 Perendaman
 Penghilangan Kulit
 Perebusan II asam
 Penirisan
 Inokulasi usar
 Pengemasan
 Inkubasi
 Tempe

Fermentasi tape

Tape dibuat dari ubi kayu ataupun beras ketan

Ada 3 mikroorganisme yang berperan:

- *Endomycopsis fibuliger*: merombak pati menjadi gula
- *Saccharomyces* dan *Candida*: mengubah tape menjadi alkohol
- *Acetobacter aceti*: mengubah alkohol menjadi asam asetat dan membuat berasa asam

Fermentasi alkohol

Mikroorganisme yang terlibat terutama adalah khamir dari genus *Saccharomyces* sp. (*S. cerevisiae* dan *S. carlbergensis*): Mengubah gula pada substrat menjadi alkohol pada kondisi aerob.



Fermentasi vitamin terutama vit B

Mikroorganisme yang terlibat dalam produksi vitamin ini adalah kapang askomisetes

Eremothecium ashbyii dan *Ashbya gossypii*.

Fermentasi yogurt

Produksi yogurt dimulai dengan kondisioning susu. Bakteri yang berperan *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*.

Pembuatan Yogurt

1. Susu segar beku
2. Perendaman susu (*tawing*)
3. Pembukaan kemasan susu
4. Pasteurisasi
5. Penyiapan bakteri
6. Pencampuran bakteri dengan susu
7. Inkubasi (wadah inkubator bisa berupa lampu listrik 25 watt selama 4 jam/ stiroformbox)
8. Penyimpanan



Fermentasi Kefir

Spesies mikrobial dalam bibit kefir diantaranya *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus parakefir*: mempunyai fungsi dalam pembentukan asam laktat dari laktosa.

Lactobacillus kefiranofaciens sebagai pembentuk lendir (matriks butiran kefir)

Leuconostoc sp. Membentuk diasetil dari sitrat

Candida kefir pembentuk etanol dan karbondioksida dari laktosa.



Produk Fermentasi

Dalam dimensi baru teknologi fermentasi mikroorganisme berperan untuk menghasilkan:

1. Biomass (*single cell protein*)
2. Metabolit primer penting tertentu dalam skala yang lebih besar seperti gliserol, asam asetat, asam laktat, aseton, butanol dan butanadiol, serta berbagai asam organik, asam amino, vitamin, polisakarida dan xanthan.
3. Metabolit sekunder yang berguna (kelompok metabolit yang tidak memainkan peranan langsung dalam kehidupan mikroorganisme) seperti penisilin, streptomisin, oksitetrasiklin, sefalosporin, gibelerin, alkaloid dan aktinomisin.
4. Enzim dalam skala industri, seperti enzim interseluler-invertase, asparaginase, urik oksidase, restriksi endonukl dan DNA ligase.

Fermentasi Keju

Dibuat dengan menambahkan kultur bakteri pembentuk asam laktat (*Lactobacillus* sp) ke dalam susu yang telah dipasteurisasi, kemudian dilanjutkan dengan menambahkan enzim rennin sebagai bahan penggumpal susu.



Fermentasi Nata deCoco

Adalah Selulosa murni produk kegiatan mikrobial *Acetobacter xylinum*: merubah gula menjadi selulosa

Fermentasi Kombucha

Minuman tradisional hasil fermentasi larutan teh dan gula dengan menggunakan starter mikrobial kombucha (*Acetobacter xylinum* dan beberapa jenis khamir) dan difermentasi selama 8 – 12 hari.



Fermentasi Kecap

Kedelai rebus difermentasi oleh kapang *Aspergillus* sp. dan *Rhizopus* sp. menjadi semacam tempe kedelai.

Kemudian "tempe" ini dikeringkan dan direndam di dalam larutan garam (Mikroba yang tumbuh pada rendaman kedelai pada umumnya dari jenis khamir dan bakteri tahan garam, seperti khamir *Zygosaccharomyces* dan bakteri susu *Lactobacillus*): Merombak protein menjadi asam-asam amino dan komponen rasa dan aroma, serta menghasilkan asam.



Bioteknologi Berbasis Fermentasi dalam Pengolahan Limbah

Salah satu tujuan utama biotek adalah meningkatkan manajemen penanganan dan pemanfaatan material sampah organik yang volumenya cenderung bertambah dengan pesat. Pemanfaatan sampah tersebut akan mengeliminasi sumber polusi terutama pencemaran air, dan dengan penerapan proses bioteknologi, maka dapat mengubah limbah menjadi produk-produk yang bermanfaat.

Limbah untuk substrat fermentasi:

1. Molase, sebagai produk sampingan (limbah) industri gula masih mengandung kadar gula 50 %. Molase digunakan secara luas sebagai bahan baku fermentasi dan untuk produksi antibiotik, asam organik, dan khamir untuk pembuatan roti, bumbu masak (MSG) atau diberikan langsung untuk makanan ternak.
2. Whey sebagai produk sampingan (limbah) industri keju digunakan sebagai substrat fermentasi.
3. Batang padi (damen) untuk produksi jamur merang.
4. Bagase (ampas tebu) banyak mengandung lignoselulose.

Peran biotek dalam pemanfaatan bahan sampah organik:

1. Mengubah kualitas makanan limbah agar sesuai untuk konsumsi manusia.
2. Memberi makan bahan sampah secara langsung atau setelah pemrosesan ke unggas, babi, ikan, atau ternak lainnya yang dapat mencerna secara langsung.

3. Limbah yang banyak mengandung lignoselulose diberikan pada sapi atau ruminansia.
4. Produksi biogas methane dan poduk fermentasi lain jika tidak dapat diberikan ternak.

Peran mikroorganisme dalam proses fermentasi

Jasad hidup (living thing) yang meliputi organisme (mikroba) dan komponen sub selulernya dalam konteks bioteknologi merupakan organisme renik yang ada di alam.

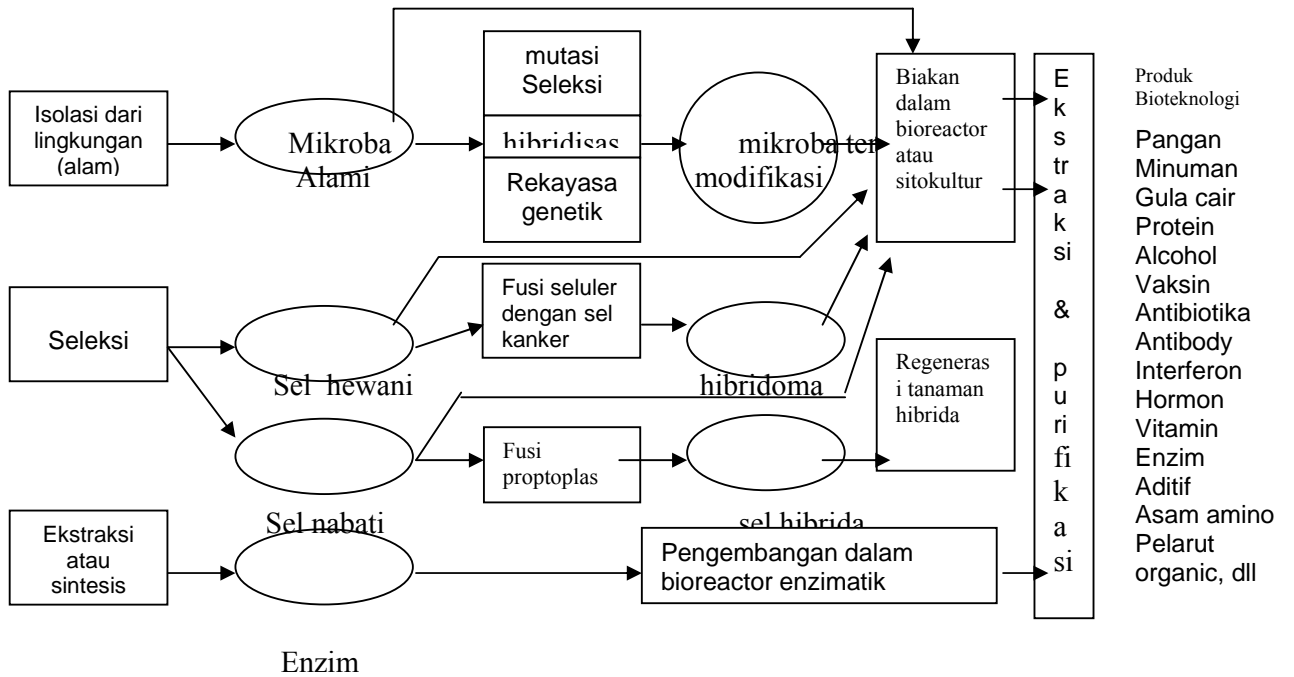
- Mikroba memiliki sifat khas sehingga dapat digunakan sebagai sarana untuk memproduksi bahan-bahan kimia yang diperlukan oleh manusia.
- Mikroba memiliki kemampuan mensintesis berbagai senyawa di alam dan juga dapat menghasilkan banyak enzim yang dapat dimanfaatkan dalam industri pengolahan makanan, bahan kimia dan bahan farmasi.
- Enzim yang dihasilkan merupakan katalisator yang mendorong terjadinya proses sintesis dan perombakan makhluk hidup.

Teknologi fermentasi sebagian besar merupakan teknologi yang menggunakan mikroorganisme untuk produksi makanan dan minuman seperti keju, yoghurt, minuman alcohol, cuka, sirkol, acar, sosis, kecap, dll.

Dalam dimensi baru teknologi fermentasi mikroorganisme berperan untuk menghasilkan:

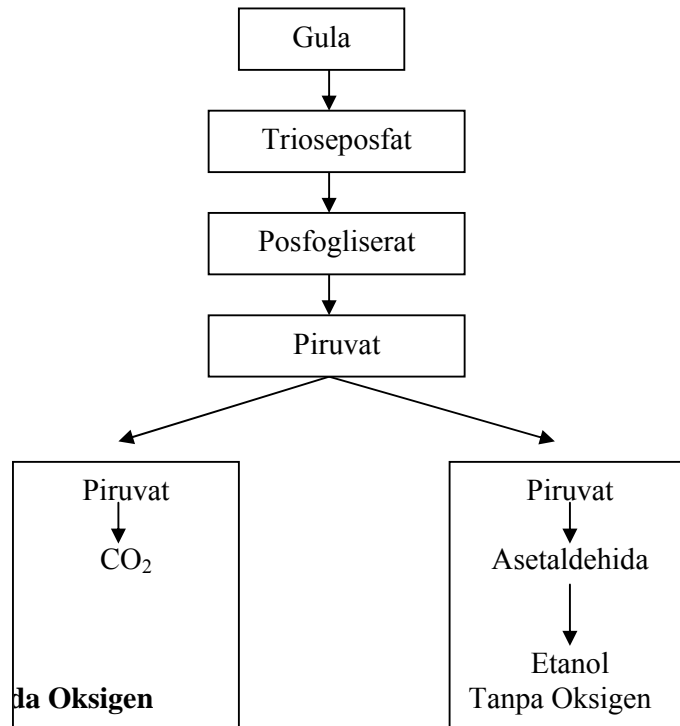
- Metabolit primer penting tertentu dalam skala yang lebih besar seperti gliserol, asam asetat, asam laktata, aseton, butanol dan butanadiol, serta berbagai asam organic, asam amino, vitamin, polisakarida dan xanthan.
- Metabolit sekunder yang berguna (kelompok metabolit yang tidak memainkan peranan langsung dalam kehidupan mikroorganisme) seperti penisilin, steptomisin, oksitetrasiklin, sefalosporin, giberelin, alkaloid dan aktinomisin.
- Enzim dalam skala industri, seperti enzim interseluler-invertase, asparaginase, urik oksidase, restruksi endonukl dan DNA ligase.

Prosedur pemanfaatan mikroorganisme untuk menghasilkan output bioteknologi



Fermentasi substrat padat

Tempe



Gambar 2: Skema Perubahan Gula Menjadi Alkohol (Fermentasi)

1. *Single cell protein* (SCP) merupakan bioteknologi yang diharapkan dapat mengatasi permasalahan yang dihadapi umat manusia pada saat ini maupun yang akan datang terutama mengenai kebutuhan ...
 - A. Pangan
 - B. Sandang
 - C. Papan (lingkungan)
 - D. Kesehatan & obat-obatan
2. Bioteknologi berbasis fermentasi memerlukan komponen berikut, KECUALI ...
 - A. Mikroba
 - B. Tempat (wadah)
 - C. Substrat (medium)
 - D. Oksigen
3. Agar fermentasi dapat berjalan dengan optimal, maka harus memperhatikan faktor-faktor berikut ini:
 - A. Aseptis (setril)
 - B. Komposisi medium pertumbuhan
 - C. Penyiapan inokulum
 - D. Kultur biakan murni (isolat)
4. Untuk mendapatkan sistem fermentasi yang optimum, maka fermenter harus memenuhi syarat sebagai berikut:
 - A. Terbebas dari kontaminan
 - B. Volume kultur relatif konstan
 - C. Kadar oksigen terlarut harus memenuhi standar
 - D. Kondisi lingkungan seperti: suhu, pH harus terkontrol
5. Sistem fermentasi yang mana semua nutrisi ditambahkan pada awal dan akhir fermentasi dikeluarkan bersama produknya disebut
 - A. Tertutup
 - B. Terbuka (kontinyu)
 - C. Septis
 - D. Aseptis
6. Medium untuk fermentasi biasa disebut substrat yang merupakan limbah industri:
 - A. Molase (tetes tebu)
 - B. Whey (air dadih)
 - C. Dams dan ampas tahu
 - D. Urine hewan ternak.
7. Salah satu tujuan utama biotek adalah meningkatkan manajemen penanganan dan pemanfaatan material sampah organik yang volumenya cenderung bertambah dengan pesat menjadi produk-produk yang bermanfaat. Untuk memproduksi bumbu masak (MSG) diperlukan limbah ...
 - A. Molase (tetes tebu)
 - B. Whey
 - C. Batang padi (damen)
 - D. Bagase (ampas tebu)
8. Hal-hal yang mesti diperhatikan dalam pemanfaatan mikroorganisme sebagai penghasil protein antara lain
 - A. Keamanan
 - B. Nilai nutrisi
 - C. Penerimaan masyarakat
 - D. Aseptabilitas
9. Kelebihan mikroorganisme untuk produksi SCP antara lain:
 - A. Pertumbuhan cepat
 - B. Mudah dimodifikasi secara genetik
 - C. Mengandung protein relatif tinggi
 - D. Memerlukan ruang yang relatif sempit

DAFTAR PUSTAKA

- Primrose, S.B. (1987). *Modern Biotechnology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Peter Chen (1997). *Microorganisms & Biotechnology*. London: John Murray Ltd.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., and Gary Higton (2001). *Industrial Microbiology: An Introduction*. USA: Blackwell science.

Bab 4

Bioteknologi Tanaman



Gambar 1.1. Kapang, sebagai representasi jamur multiseluler

Pada bab ini akan dipelajari tentang:

- Pengertian Bioteknologi
- Kultivasi mikroba
- Medium kultur
- Bioreaktor
- Proses *downstream*
- Aplikasi fermentasi dalam produksi minuman dan makanan

Kultur jaringan merupakan pengembangan dari teori sel, yaitu dengan menumbuhkan sel atau sekumpulan sel (jaringan) pada medium yang mengandung zat hara yang sesuai dengan kebutuhan sel atau jaringan tanaman. Jaringan yang ditumbuhkan pada medium padat akan membentuk kalus, yaitu massa atau kumpulan sel yang tidak beraturan. Kalus yang terbentuk dicacah menjadi bagian kecil-kecil kemudian dipindahkan ke medium baru, dengan susunan hara yang tepat supaya kalus dapat tumbuh menjadi tunas dan tanaman baru yang sempurna.

Pengantar

Pada awalnya telah dicoba dan berhasil mengembang-biakan tanaman secara vegetatif dari berbagai bagian tanaman selain dari biji seperti; batang, pucuk, daun, dan akar. Realitas itu kemudian memunculkan ide untuk memperbanyak tanaman dengan menggunakan metode kultur jaringan/sel tumbuhan (*plant tissue/cell culture*). Kultur jaringan merupakan suatu metode untuk memperbanyak jaringan/sel yang berasal atau yang didapat dari jaringan orisinal tanaman secara vegetatif dalam medium secara *in vitro* (dalam tabung kaca).

Menurut teori sel yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann bahwa sel tumbuhan memiliki sifat autonom dan totipotensi. Autonom berarti dapat mengatur rumah tangganya sendiri; metabolisme, tumbuh dan berkembang secara independen. Totipotensi berarti memiliki kemampuan beregenerasi menjadi tanaman lengkap. Hal ini merupakan salah satu pembeda sel tumbuhan dengan sel hewan. Selain itu, pada

sel tanaman terdapat dinding sel. Sel tanaman hidup apabila diletakkan pada suatu lingkungan yang sesuai, akan tumbuh dan berkembang menjadi tanaman baru yang sempurna.

Prinsip Dasar

Kultur jaringan merupakan pengembangan dari teori sel, yaitu dengan menumbuhkan sel atau sekumpulan sel (jaringan) pada medium yang mengandung zat hara yang sesuai dengan kebutuhan sel atau jaringan tanaman. Jaringan yang ditumbuhkan pada medium padat akan membentuk kalus, yaitu massa atau kumpulan sel yang tidak beraturan. Kalus yang terbentuk dicacah menjadi bagian kecil-kecil kemudian dipindahkan ke medium baru, dengan susunan hara yang tepat supaya kalus dapat tumbuh menjadi tunas dan tanaman baru yang sempurna.

Beberapa prinsip dasar yang harus diperhatikan dan dipenuhi dalam rangka mendapatkan kultur jaringan/sel tanaman yang bersih dan tumbuh dengan baik antara lain:

1. Prinsip sterilitas yang meliputi peralatan dan medium harus aseptik dan steril,
2. Prinsip ketersediaan nutrisi; medium harus menyediakan semua nutrisi yang diperlukan oleh sel tanaman dalam jumlah yang cukup dan seimbang.
3. Preservasi sel.

Oleh karena itu, penguasaan pengetahuan dasar merupakan syarat pokok dan keterampilan seseorang sangat menunjang kesuksesan di dalam melakukan kultur sel tanaman. Penanganan kultur sel tanaman hendaknya dijalankan dalam kondisi benar-benar aseptik, karena sel/jaringan hewan tumbuh dan berkembang lebih lambat dari kontaminan umum seperti bakteri, *yeast* (jamur), dan *mycoplasma*.

Tahapan Kultur Tanaman

1. Preparasi medium kultur
2. Penanaman dalam kultur
3. Organogenesis
4. Amplifikasi anakan
5. Penanaman dalam tanah

Preparasi Media Kultur Jaringan Tanaman

Syarat suatu medium kultur jaringan tanaman adalah harus mengandung zat-zat anorganik yang terdiri dari unsur-unsur hara makro dan mikro, asam amino, gula-gula, vitamin dan hormon. Asam amino esensial seperti glutamin, serin dan zat pengatur pertumbuhan sitokinin. Salah satu jenis medium yang paling banyak digunakan adalah medium dasar Murashige dan Skoog (medium MS). Medium MS mengandung garam mineral yang tinggi dan senyawa N dalam bentuk NO_3^- dan NH_4^+ .

Mikronutrien

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2230	mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	860	mg
H_3BO_3	620	mg
KI	83	mg
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25	mg

CuSO ₄ . 4H ₂ O	2,5 mg
COCl ₂ . 6H ₂ O	2,5 mg
Vitamin	
Glycine	100 mg
Nicotinic acid	25 mg
Pyridoxine-HCl	25 mg
Thiamin HCl	5 mg
Hormon	
IAA	mg/100 mL
NAA	mg/100 mL
2,4-D	mg/100 mL
IBA	mg/100 mL
Makronutrien	
NH ₄ NO ₃	1650 mg
KNO ₃	1900 mg
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440 mg
MgSO ₃ . 7H ₂ O	370 mg
KH ₂ PO ₃	170 mg

Teknik Kultur Sel Tanaman

Ada beberapa metode kultur sel tanaman. Prosedur kultur untuk masing-masing jenis tanaman berbeda, tetapi secara prinsip hampir sama. Hal ini karena karakter jaringannya berbeda. Untuk daun tembakau penyeterilan dengan menggunakan larutan **Clorox**.

Kultur sel embrional dan endosperm

Benih terdiri dari embrio dan endosperm. Embrio dapat tumbuh dan berkembang antara lain karena adanya nutrisi yang disediakan oleh endosperm. Hasil percobaan Laibach (1925-1928) telah dibuktikan bahwa embrio tanaman dapat ditumbuhkan. Embrio dapat tumbuh apabila terdapat nutrisi yang cukup untuk mendukung pertumbuhannya.

Kultur Somatik Embriogenesis

Metode kultur somatik embriogenesis bertujuan memperoleh tanaman secara **vegetatif** yang memiliki sifat sama dengan induknya.

Ada dua cara yaitu:

1. Organ langsung ditanam (eksplan)

Eksplan (*explant*) adalah suatu bagian kecil dari tanaman (sel, jaringan, atau organ) yang digunakan untuk memulai suatu kultur. Eksplan yang digunakan untuk kultur jaringan harus yang masih muda (primordia), sel-selnya masih bersifat meristematis dan belum mengalami proses diferensiasi seperti; sel-sel mesofil dan stomata pada daun, kambium, korteks dsb.

Menggunakan metode liquid agitative.

Eksplan dari jaringan meristem tanaman → disterilkan berulang kali → dicacah (*trimming*) → pencacahan final → inkubasi → subkultur.

Merupakan bentuk sel-sel yang telah mengalami diferensiasi.

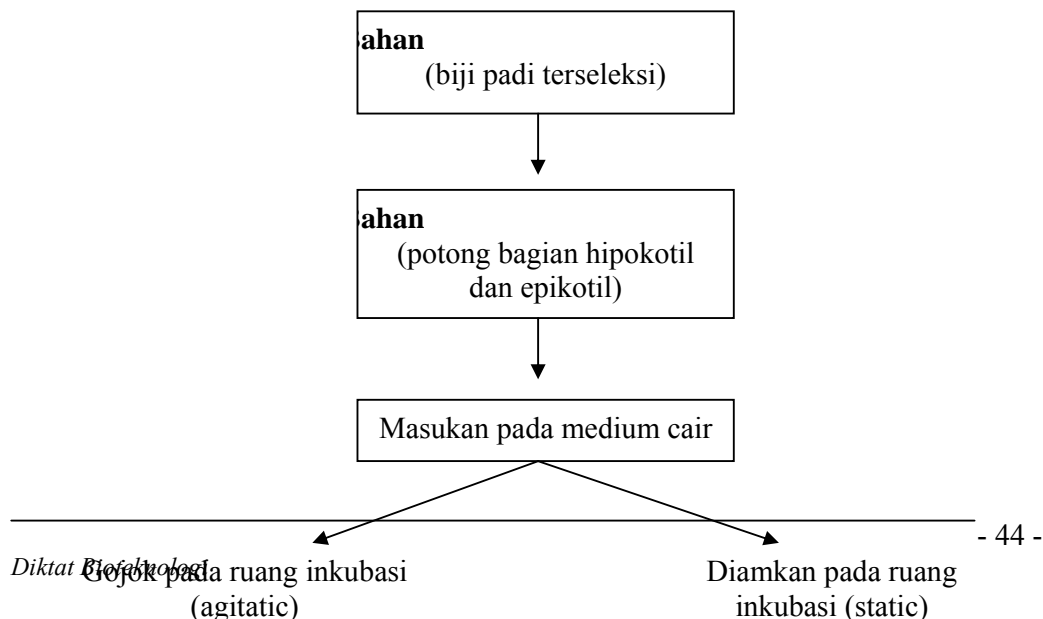
2. Induksi kalus terlebih dahulu kemudian kalus ditanam.

Eksplan ketika dihadapkan pada kondisi stress, yang akan mengubah pola metabolisme, sel akan memulai siklus sel baru, selanjutnya akan tumbuh dan berkembang di dalam kultur. Sel tumbuhan akan mengalami proliferasi menjadi kalus jaringan yang tak terkordinasi. Kultur kalus sangat tergantung pada keberadaan sitokinin dan auksin. Peningkatan sitokinin pada kalus akan merangsang pembentukan pucuk. Sedangkan auksin akan merangsang pembentukan akar. Akhirnya anakan tanaman muncul melalui perkembangan akar liar dari kuncup yang terbentuk. Pertumbuhan akar dari kuncup jaringan kalus dikenal sebagai organogenesis.

Kalus ditransfer ke → medium cair → diaduk → massa sel akan memisah menghasilkan suspensi sel yang terisolasi dan kumpulan sel-sel yang membentuk agregat. → ditempatkan pada medium yang sesuai akan mampu membelah.

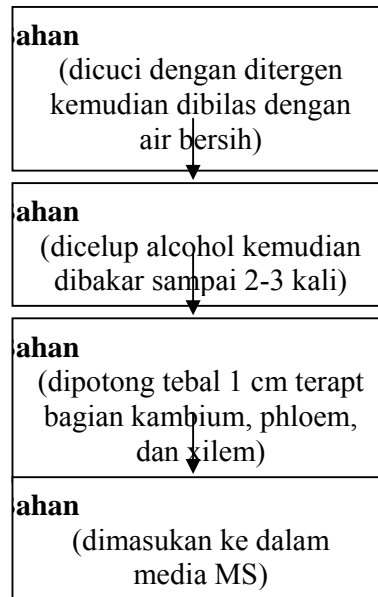
Respon yang pertama kali terlihat yaitu terbentuknya jaringan kalus, sel-selnya terus membelah, jika pembelahannya tidak terkendali akan membentuk massa sel yang tidak terorganisir atau disebut kalus. Pembelahan sel yang tidak terkendali karena sel tumbuhan secara alami bersifat autotrof, dikondisikan menjadi heterotrof dengan cara memberikan nutrisi yang cukup kompleks di dalam medium kultur. Sel-sel kalus ini berbeda dengan sel-sel eksplannya, menjadi tidak terdiferensiasi, sehingga prosesnya disebut dediferensiasi.

Pada kondisi kultur tertentu kalus dapat diinduksi menjadi embriogenesis somatik. Pada proses ini sel kalus mengalami diferensiasi yang dikenal dengan embriogenesis somatis. Sel kalus menjalani suatu pola diferensiasi yang serupa dengan yang terjadi pada saat zygot setelah fertilisasi untuk menghasilkan embrioid. Embrioid ini selanjutnya → akan berkembang menjadi tumbuhan yang fungsional dan lengkap.



Gambar 1: Skema Kultur Somatik Embriogenesis

Eksplan



Gambar 1. Skema Eksplan

Fase Pertumbuhan Kultur Sel Tanaman

1. Fase tenang
2. Fase eksponensial
3. Fase seimbang

Overplanting adalah pemindahan bibit tanaman dari dalam botol kultur ke botol lain yang mengandung media baru yang komposisinya sama dan bibit yang ditanam lebih sedikit jumlahnya. Adapun maksud overplanting adalah untuk menjaga agar pH tetap stabil dan nutrisi yang tersedia cukup untuk mendukung pertumbuhan tanaman.

Kelebihan dan Kekurangan Kultur Sel

Kultur jaringan/sel tanaman (*in vitro*) memiliki beberapa kelebihan dan keuntungan dibanding dengan menggunakan cara perbanyakan secara alami antara lain sebagai berikut:

- 1) Pengambilan kesimpulan relatif lebih mudah dengan menggunakan populasi sel yang homogen.
- 2) Kultur sel primer tetap memiliki integritas morfologi dan biokimiawi dalam jangka waktu lama, dengan demikian memungkinkan melakukan penelitian ulang (*reproducible*) dan terkontrol.

Kultur sel tidak terdapat pengaruh sistemik

PROPAGULA MIKRO SUMBER PENGHASIL UMBI KENTANG

Tanaman kentang merupakan tanaman pangan dunia sesudah padi, gandum dan jagung. Di Indonesia kentang merupakan tanaman *cash crop* bagi petani, pangan bernilai gizi tinggi, pangan karbohidrat non beras, dan merupakan komoditi ekspor non migas. Konsumsi kentang pada beberapa tahun terakhir ini cenderung meningkat

terutama dalam bentuk kentang olahan sebagai makanan ringan dan di kota-kota besar sebagai *fast food*. Akibat dari perubahan pola konsumsi ini permintaan terhadap kentang menjadi meningkat.

Dibandingkan dengan beberapa negara di Asia, produksi kentang di Indonesia masih tergolong rendah. Rata-rata produksi kentang pada tahun 1989 adalah 14,25 ton per hektar (BPS, 1991), sedangkan di Jepang atau di Taiwan, rata-rata produksi dapat mencapai 30-37 ton per hektar. Kendala utama produksi kentang di Indonesia antara lain adalah tidak tersedianya kultivar standar yang sesuai dengan lingkungan di Indonesia, bibit kentang masih diimpor dari luar negeri, dan adanya beberapa penyakit yang sukar dikendalikan seperti virus (PVX, PVY, PVLR), hawar daun, layu bakteri, dan nematoda, yang semuanya dapat sudah berada di dalam bibit (*seed borne disease*) dan akan berakumulasi sepanjang terus diperbanyak secara vegetatif (dengan umbi).

Petani atau pengusaha kentang harus bermain-main dengan resiko gagal total akibat dari penyakit tersebut, sehingga bibit kentang harus terus-menerus diimpor dari luar negeri di mana infeksi penyakit tersebut dapat ditekan seminimal mungkin. Di Indonesia, untuk menghasilkan bibit kentang yang mempunyai kualitas sebaik di luar negeri adalah tidak mungkin, karena vektor virus (aphid) dan semua mikroorganisme dapat hidup sepanjang tahun, sehingga tidak ada suatu lokasi atau periode waktu dimana pertanaman kentang bisa dibebaskan atau terhindar dari infeksi ini.

Untuk mengantisipasi rencana pemerintah menurunkan atau menghentikan impor bibit dan kentang konsumsi, beberapa alternatif pengganti bibit impor harus mulai dipinggirkan. Paling tidak ada dua alternatif untuk mengatasi, yaitu penggunaan biji botani (true seed) atau penggunaan propagula yang berasal dari kultur jaringan. Penggunaan biji botani di Indonesia adalah sangat memungkinkan oleh karena banyak kultivar komersial yang dapat berbunga dan berbuah di Indonesia.

Penggunaan biji botani akan dapat mengatasi masalah virus dan penyakit-penyakit lainnya yang ditularkan melalui umbi, selain itu produksi total tanaman asal biji juga tidak banyak berbeda dengan bibit biasa. Sedangkan untuk satu hektar lahan hanya membutuhkan 100 gram biji saja, sehingga lebih murah baik dalam penyimpanan maupun dalam transportasi. Masalahnya terutama berhubungan dengan variasi genetik yang cukup tinggi dan umbi yang dihasilkan berukuran lebih kecil, sehingga untuk tujuan industri harus dilakukan langkah-langkah lain untuk mengatasinya.

Kultur Jaringan sebagai Alternatif Penghasil Propagula

Umbi mikro dan stek mikro

Penggunaan kultur jaringan sebagai penghasil bibit kentang merupakan alternatif yang paling mungkin dilakukan. Penggunaan teknik kultur jaringan dalam penyediaan bibit kentang terutama untuk menumbuhkan tunas kentang secara *in vitro* kemudian dipanen sebagai bibit, atau dirangsang supaya menghasilkan bibit *in vitro* yang juga dapat dipakai sebagai bibit. Tunas yang ditumbuhkan adalah tunas yang telah dieliminasi semua penyakit sistemiknya, termasuk virus. Kedua macam bibit ini (stek dan umbi *in vitro*) adalah bibit yang sangat bermutu, dalam arti bebas dari penyakit sistemik karena induknya telah dibebaskan dari berbagai mikroorganisme, persis sama dengan induknya karena diperbanyak secara vegetatif dan dapat

diperbanyak secara tepat tidak memerlukan tempat yang luas serta tidak tergantung musim.

Stek mikro diperbanyak secara *in vitro* dengan menggunakan media Murashige dan Skoog (1962) tanpa zat pengatur tumbuh, diinkubasi pada intensitas cahaya 1000-2000 lux, pada suhu sekitar 25°C dengan lama penyinaran 16 jam per hari atau lebih. Dengan cara ini, setiap tunas samping dapat menjadi diperbanyak 3-4 stek (10-12 tunas samping) dalam waktu 4 minggu. Di dalam satu botol berdiameter 7 cm dapat ditanam 6-8 tunas samping, dalam waktu 4 minggu akan dapat dipanen 21-32 stek atau dalam ruangan 1 m² dalam waktu 4 minggu akan menghasilkan 2100-3200 stek per 4 minggu. Potensi perbanyakan stek ini dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan bibit dalam jumlah banyak.

Stek mikro dapat dipaksa untuk menghasilkan umbi mikro dengan cara merangsang tanaman kentang *in vitro* dengan menambahkan media tumbuh dan lingkungannya yang sesuai. Media tumbuh yang ditambahkan sama dengan media perbanyakan stek mikro, akan tetapi sumber karbohidrat dalam media ditingkatkan dengan menambah sukrosa (gula) sampai 90 gram per liter, sedangkan pertumbuhan vegetatif dihambat dengan memberikan zat penghambat (*growth retardant*) seperti cycocel, paclobutrasol, atau diaminozide. Dengan menurunkan suhu inkubasi menjadi 18-22°C, setiap tunas samping dari tunas secara teoritis akan memproduksi satu umbi mikro dengan berat setiap umbi sekitar 100-200 mg.

Umbi mikro ini dapat merupakan sumber propagula untuk menghasilkan bibit yang bermutu. Kelebihan dari umbi mikro ini adalah mudah dalam transportasi dan penyimpanan. Untuk 1 ha hanya memerlukan sekitar 5 kg umbi mikro saja. Produksi umbi mikro dapat dilakukan secara mekanis dengan membuat peralatan sederhana semacam bioreaktor, akan tetapi tetap memungkinkan kondisi aseptik, sehingga panen umbi dapat dilakukan secara berulang-ulang (Joice dan McCown, 1991).

Di luar negeri produksi umbi dari propagul umbi mikro maupun stek mikro menghasilkan umbi konsumsi yang tidak kalah dengan umbi biasa (McCown dan Wattimena, 1991). Sedangkan di Indonesia percobaan yang dilakukan beberapa kali di kawasan Cipanas menunjukkan hasil lebih rendah dibandingkan umbi biasa. Oleh karena itu pada saat ini dilakukan modifikasi dalam penyediaan propagula bermutu dengan cara memproduksi stek mini dan umbi mini.

Stek Mini dan Umbi Mini

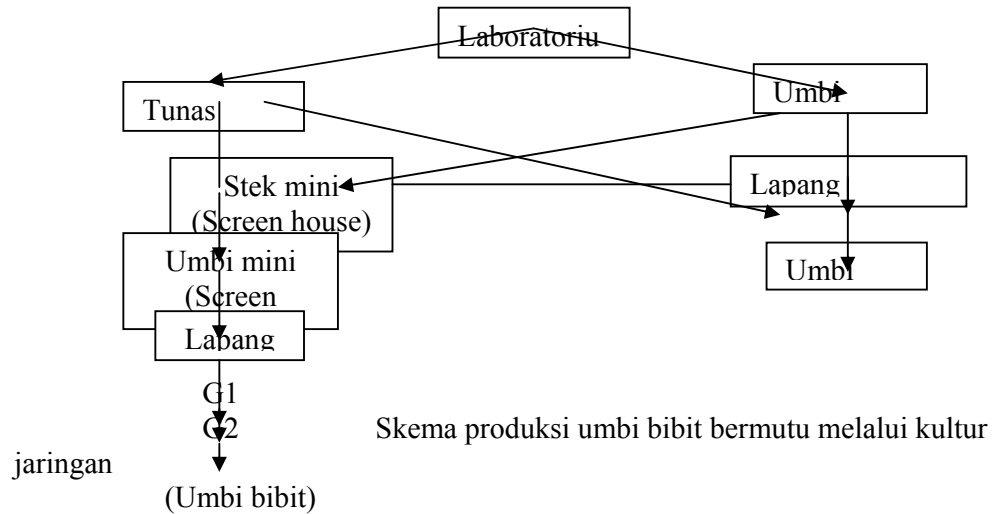
Perbedaan antara propagul mikro dan propagul mini adalah dalam hal asal propagul tersebut dihasilkan. Propagul mikro dihasilkan secara *in vitro* (aseptik), sedangkan propagul mini dihasilkan secara *in vivo* (non aseptik). Stek mini dihasilkan dengan cara memanen tunas yang dihasilkan oleh stek mikro dan umbi mikro yang ditanam pada media tanah atau kompos. Dari setiap umbi mikro atau stek mikro dapat dihasilkan paling tidak 4-5 stek mini. Dengan cara ini pekerjaan yang dilakukan laboratorium dapat dikurangi. Umbi mini dihasilkan dengan cara menanam stek mikro, umbi mikro atau stek mini pada suatu media tanah dan kompos dengan jarak tanam yang rapat (500 tanaman/m²). Pada keadaan penanaman seperti ini, umbi mini dapat dipanen pada umur 8-10 minggu. Umbi mini biasanya mempunyai berat antara 3-10 g.

Umbi mikro, stek mikro, umbi mini, dan stek mini adalah suatu produk antara untuk menghasilkan umbi bibit untuk petani. Untuk mempertahankan kualitas bibit maka infeksi penyakit selama proses produksi secara *in vivo* harus ditekan serendah

mungkin, oleh karena itu penggunaan rumah ketat serangga (screen house) dan sterilisasi media tumbuh mutlak harus dilakukan. Dengan cara demikian umbi mini sebagai produk akhir dari proses aseptik merupakan bibit kentang bermutu setingkat lebih tinggi dibandingkan umbi bibit impor.

Bagi petani atau pengusaha kentang di Indonesia, bibit impor biasanya tidak langsung dipakai sebagai bibit untuk menghasilkan umbi konsumsi, akan tetapi diperbanyak, oleh penangkar bibit sampai pada generasi ke-2 atau ke-3 kemudian dijual kepada petani dengan harga lebih rendah dari umbi impor. Untuk memperbesar ukuran dan menurunkan biaya produksi, umbi mini dengan cara yang sama dapat diperbanyak di lapang sampai pada generasi ke-2 untuk dijual sebagai bibit biasa. Hasil percobaan di Cipanas menunjukkan bahwa produksi kentang dari bibit tersebut pada kultivar Nooksack dapat mencapai 30 ton per hektar (Yasfianti, 1990).

Produksi umbi bibit dapat juga dilakukan dengan cara yang lebih sederhana yaitu dengan menanam stek mikro atau stek mini yang sudah berakar (bibit dalam bungkusan daun pisang) di lapang dengan jarak tanam 25 cm x 70 cm. Dengan metode ini dapat diproduksi umbi bibit yang siap dijual di petani. Cara ini dapat dilakukan jika rumah ketat serangga terletak tidak jauh dari lapang produksi, sehingga tidak terjadi stres pada bibit akibat pengangkutan.



Alternatif Pengusahaan Kentang

Di Vietnam pernah dicoba menggunakan petani untuk mengerjakan proses produksi propagula secara in vitro dengan peralatan yang sangat sederhana (Van Nguyen, 1987), akan tetapi cara ini pada akhirnya tidak berhasil dilakukan karena tidak semua petani siap untuk mengerjakan itu. Pengusahaan yang baik adalah kembali pada pola PIR (Perkebunan Inti Rakyat), dimana pengusaha besar berperan sebagai inti yang memfasilitasi laboratorium dan rumah ketat serangga, untuk menghasilkan stek mini atau umbi mini. Pada plasma tingkat I adalah petani penangkar yang mengembangkan stek mini dan/atau umbi mini, sedangkan plasma tingkat II adalah petani yang memproduksi umbi untuk dikonsumsi. Pihak inti akan menyediakan sarana produksi termasuk penerapan Pengendalian Hama Terpadu (PHT) dimana sudah tersedia paket untuk tanaman kentang. Dengan model seperti

ini, pemodal dapat membuat sentra produksi kentang baru di beberapa tempat yang memungkinkan tumbuhnya tanaman kentang.

Pemanfaatan Kultur Sel Tanaman dalam Bioteknologi

Semakin berkembangnya dukungan dan penguasaan teknologi laboratorium sangat memungkinkan membuat kultur sel primer dari berbagai jenis sel tanaman maupun manusia. Perkembangan kultur jaringan sebagai teknik baru dalam bidang biologi mempunyai kaitan erat dengan perkembangan bioteknologi. Penerapan kultur jaringan dalam bidang industri (bioteknologi) antara lain:

1. Produksi tanaman bebas virus.
2. Produksi zat-zat alkaloid untuk industri farmasi seperti; alkaloid, glikosida jantung, anti tumor kodeina.

Kultur jaringan tanaman

Jaringan tanaman seperti ujung akar dan kambium relatif mudah ditanam secara aseptis dalam kultur buatan. Ada empat tahap daurnya :

1. penanaman dalam kultur
2. organogenesis
3. amplifikasi anakan
4. penanaman dalam tanah

Penerapan kultur jaringan tanaman pada bioteknologi membutuhkan penguasaan teknik kultur sel berskala besar.

TOTIPOTEN

Manfaat kultur jaringan tumbuhan:

- Penyimpanan jangka panjang plasma nutfah, sehingga memberikan bahan genetik yang stabil, mengurangi ruang simpan dan menurunkan biaya pemeliharaan.
- Menghasilkan bermacam-macam produk farmasi, zat pewarna, dan peningkat citarasa.

10. Menurut teori sel yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann bahwa sel tumbuhan memiliki kemampuan beregenerasi menjadi tanaman lengkap disebut

...

- | | |
|----------------|--------------|
| A. Totipotensi | B. Autonom |
| C. Independen | D. Sempurna. |

11. Jika

1. Preparasi medium kultur
- i. Penanaman dalam kultur
- ii. Organogenesis
- iii. Amplifikasi anakan
- iv. Penanaman dalam tanah

Tahapan kultur tanaman yang urut adalah ...

- | | |
|--------------|--------------|
| A. 1-2-3-4-5 | B. 2-3-5-4-1 |
| C. | |

12. Zat pengatur pertumbuhan yang ditambahkan ke dalam medium kultur jaringan tanaman adalah ...
- | | |
|--------------|---------------|
| A. Glutamin | B. Asam amino |
| C. Sitokinin | D. Vitamin |
13. Merupakan hormon
- | | |
|-------------------|-------------------|
| A. Pyridoxine-HCl | B. NAA |
| C. Glycine | D. Nicotinic acid |
14. Pada metode kultur sel tanaman, larutan Clorox digunakan untuk
- | | |
|-----------------|--|
| A. Penyeterilan | |
| C. Benih embrio | |
15. Metode kultur tanaman yang bertujuan memperoleh tanaman secara vegetatif yang memiliki sifat sama dengan induknya adalah ...
- | | |
|---------------------------------------|--|
| A. Kultur somatik embriogenesis | |
| B. Organ langsung ditanam (eksplan) | |
| C. Kultur sel embrional dan endosperm | |
16. Syarat eksplan untuk kultur jaringan adalah ...
- | | |
|---|--|
| A. Jaringan masih muda (primordia) | |
| B. Sel-selnya masih bersifat meristematis | |
| C. Belum mengalami proses diferensiasi | |
| D. | |
17. Eksplan dari jaringan meristem tanaman → dicacah (*trimming*) → disterilkan berulang kali → pencacahan final → inkubasi → subkultur
18. Induksi kalus terlebih dahulu kemudian kalus ditanam. Eksplan ketika dihadapkan pada kondisi stress, yang akan mengubah pola metabolisme, sel akan memulai siklus sel baru, selanjutnya akan tumbuh dan berkembang di dalam kultur. Sel tumbuhan akan mengalami proliferasi menjadi kalus jaringan yang tak terkordinasi. Kultur kalus sangat tergantung pada keberadaan sitokinin dan auksin.
19. Untuk merangsang pembentukan pucuk pada kalus diberikan hormon
- | | |
|--------------|--|
| A. Sitokinin | |
|--------------|--|
20. Pertumbuhan akar dan akhirnya anakan tanaman yang berasal dari kuncup jaringan kalus dikenal sebagai
- | | |
|------------------|--|
| A. Organogenesis | |
| C. Autotrof | |
21. Berikut ini merupakan fase-fase pertumbuhan kultur sel tanaman, KECUALI ...
- | | |
|------------------|----------------------|
| A. Fase tenang | B. Fase eksponensial |
| C. Fase seimbang | D. Fase kematian |
22. Pindahkan bibit tanaman dari dalam botol kultur ke botol lain yang mengandung media baru yang komposisinya sama dan bibit yang ditanam lebih sedikit jumlahnya disebut ...
- | | |
|--|-------------|
| A. Overplanting | B. Trimming |
| C. Kelebihan dan Kekurangan Kultur Sel | |
23. Pemanfaatan kultur sel tanaman dalam bioteknologi
- | | |
|---------------------------------|--|
| A. Produksi tanaman bebas virus | |
| B. Produksi zat-zat alkaloid | |

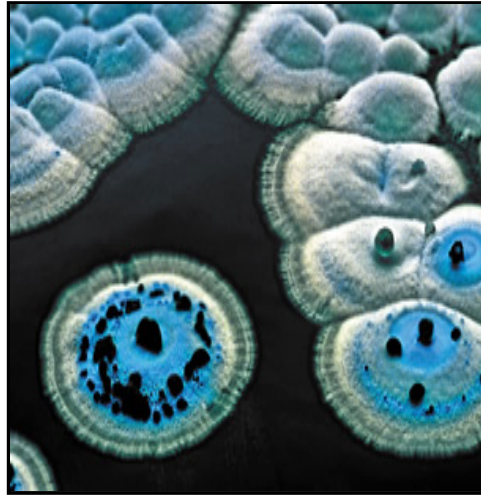
24. Prinsip dasar yang harus diperhatikan dan dipenuhi dalam rangka mendapatkan kultur jaringan/sel yang bersih dan tumbuh dengan baik, KECUALI ...
- A. Medium harus aseptik dan steril
 - B. Medium harus menyediakan semua nutrisi yang diperlukan oleh sel
 - C. Medium harus memelihara pH 7.0 – 7.4
 - D. Konservasi sel. Suhu

DAFTAR PUSTAKA

- Joice, P.J. and B.H. McCown (1991). *Automated Propagation of Microtuber of Potato* in I.K. Vasil (ed). *Scale up and Automation in Propagation*. Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plant, Vol.8.
- Hartmann, H.T., & Kester, D.E. (1983). *Plant Propagation, Principles & Practices*. 4th-ed. London: Prentice-Hall International Inc.
- Primrose, S.B. (1987). *Modern Biotechnology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- McCown, B.H. and G.A. Wattimena (1987). *Field Performance of Micropropagation Plants*. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol.3. Potato. Y.P.S. Bajaj (ed). Springer Verlag, Berlin, Germany. Pp 80-88.
- Yasfianti (1990). *Produksi Kentang dan Mikropropagula*. Karya ilmiah S1. Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Bab 3

Bioteknologi Enzim



Gambar 1.1. Kapang, sebagai representasi jamur multiseluler

Pada bab ini akan dipelajari tentang:

- Pengertian fermentasi
- Kultivasi mikroba
- Medium kultur
- Bioreaktor
- Proses *downstream*
- Aplikasi fermentasi dalam produksi minuman dan makanan

Pendahuluan

Enzim merupakan biomolekul organik kompleks biasanya tersusun atas polipeptida (protein globuler). Enzim memiliki bentuk (konformasi) tertentu yang spesifik terutama pada sisi tempat berikatan dengan substrat sehingga enzim hanya berikatan dengan substrat yang spesifik atau terbatas. Enzim bersifat spesifik sebab memiliki tempat aktif yang mengakomodasi substratnya.

Enzim memiliki peran sebagai biokatalisator dalam perubahan substansi kimia. Enzim sebagai biokatalisator berperan mempercepat terjadinya suatu reaksi tetapi tidak ikut bereaksi. Zat yang dikerjain oleh enzim disebut substrat, sedangkan hasilnya disebut dengan produk. Pada prinsipnya, nggak hidup tanpa enzim.

Sebagai contoh, dalam metabolisme glukosa yaitu perubahan glukosa menjadi alkohol atau asam laktat melibatkan berbagai jenis enzim yang terdapat dalam mikroba fermenter. Selain itu, produk dari reaksi awal digunakan sebagai substrat reaksi enzim berikutnya dan seterusnya sampai dihasilkan produk akhir.

Perkembangan ipteks khususnya biokimia telah dapat diidentifikasi berbagai jenis enzim dalam makhluk hidup dan cara kerjanya. Beberapa peran enzim adalah memecah ikatan molekul-molekul zat makanan dari rantai panjang menjadi rantai

Teknologi enzim memiliki pengertian penggunaan enzim dalam berbagai proses industri. Teknologi enzim meliputi purifikasi, isolasi, produksi, immobilisasi dan penggunaan enzim pada sistem reaktor. Kontribusi teknologi enzim dalam produksi makanan, preservasi dan sortasi energi, dan meningkatkan kualitas lingkungan.

pendek. Pada umumnya enzim pencernaan bekerja sebagai enzim hidrolitik (hidrolase).

Teknologi enzim memiliki pengertian penggunaan enzim dalam berbagai proses industri. Teknologi enzim meliputi **purifikasi, isolasi, produksi, immobilisasi** dan **penggunaan enzim** pada sistem reaktor. Kontribusi teknologi enzim dalam produksi makanan, preservasi dan sortasi energi, dan meningkatkan kualitas lingkungan. Teknologi baru ini berasal dari biokimia, dan kontribusi mikrobiologi, kimia, dan rekayasa. Ke depan, teknologi enzim dan rekayasa genetika akan sangat diperlukan untuk ini.

Jenis enzim	Produksi per ton
Bacillus protease	500
Amylo glucosidase	300
Bacillus amylase	300
Glucose isomerase	50
Rennet	20
Amylase fungal	20
Pectinase	20
Protease fungal	10

Cara Penamaan Enzim

Penamaan enzim menggunakan nama trivial. Nama enzim menyesuaikan dengan nama substratnya ditambah akhiran **ase**. Sebagai contoh, enzim yang mengkatalisir perubahan maltosa menjadi glukosa diberi nama *maltase*.

Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

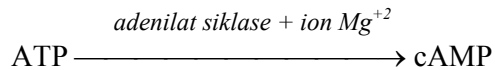
Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah:

1. Derajat keasaman (**pH**). Enzim dapat bekerja optimal pada pH tertentu yang sesuai sebab untuk mengubah ionisasi substrat atau residu asam amino dalam enzim. Kebanyakan enzim bekerja pada cairan *buffer* untuk mencegah perubahan pH selama proses berlangsung.
2. **Suhu**. Pada umumnya pada suhu yang semakin meningkat aktivitas enzim juga semakin meningkat sampai pada batas suhu maksimal. Jika sudah mencapai suhu batas maksimal, maka enzim akan mengalami kerusakan (denaturasi) karena panas sehingga aktivitasnya berkurang. Aktivitas enzim menjadi optimal pada suhu tertentu tergantung enzimnya yang disebut suhu optimal. Enzim menjadi stabil (inaktif) pada suhu penyimpanan biasanya di bawah 0°C.
3. **Konsentrasi substrat**. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim mengikuti persamaan *Michaelis-Menten*. Kurvanya berbentuk parabola.

Kofaktor dan Koenzim

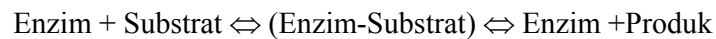
Beberapa enzim memerlukan konsentrasi yang cocok dari kofaktor spesifik untuk aktivitas maksimumnya. Bagian enzim yang berupa **logam** anorganik (mineral) seperti Mn^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , dsb. Selain itu, beberapa enzim juga

memiliki bagian organik (non protein), berat molekul kecil, yang secara aktif berperan menerima atau melepaskan gugus kimia tertentu sehingga membantu aktivitas maksimum disebut **koenzim**; misalnya: vitamin B,



Cara Kerja Enzim

Teori Lock and key



Enzim digesti

Enzim allosteric adalah enzim yang memiliki beberapa bentuk yang diinduksi oleh ikatan modulator-modulator metabolit kecil atau kofaktor.

Inhibitor enzim penghambatan aktivitas enzim merupakan suatu mekanisme kontrol yang penting di dalam sistem biologis (*feedback*), oleh produk.

1. Enzim dehidrogenase bekerja sebagai pemecahan gugus hidrogen. Sebagai contoh; *hydroxysteroid dehydrogenase*.
2. Enzim *oxido-reductase* untuk mengkatalisis oksidasi dan reduksi keton atau alkohol pada C-3, 11, 17, atau 20.
3. Enzim sitokrom P-450 (*cytochrome P-450*) untuk mengkatalisis pemecahan rantai samping karbon dari inti sterol, memberi gugus OH, sebagai contoh; sitokrom P-450_{sidechain cleavage} (P-450_{scc}); sitokrom P-450_{17 α -hydroxylase} (P-450_{c17}).

Biosintesis Enzim

Biosintesis suatu enzim bermula dari instruksi gena yang terdapat pada DNA sel. Sesuai dengan dogma sentral biologi bahwa:



Tahapan Biosintesis Enzim

1. Transkripsi yaitu protein regulator (*regulatory protein*) \rightarrow bagian pengatur gena (*regulatory site of gene*) \rightarrow transkripsi \rightarrow mRNA (*messenger Ribonucleic acid*).

2. Translasi: mRNA → ribosoma → translasi menggunakan triplet asam amino (kodon) → protein.

Aplikasi enzim

Telah sejak lama enzim digunakan sebagai suatu cara untuk mengolah produk minuman atau makanan dengan menggunakan enzim mikroba yang belum dikenali. Proses fermentasi memerlukan enzim dari mikroba terutama jamur.

Kekurangan fermentasi menggunakan mikroba:

1. Sebagian besar substrat diubah menjadi biomasa.
2. Terjadi produk tidak bermanfaat.
3. Kondisi untuk pertumbuhan organisme kemungkinan tidak sama dengan produk
4. Isolasi dan purifikasi produk yang diinginkan dari cairan fermentasi kemungkinan sangat sulit.

Keterbatasan tersebut memunculkan ide isolasi dan purifikasi, kemudian imobilisasi enzim. Ke depan, tradisional akan digantikan dengan multienzim reaktor yang memiliki efisiensi tinggi dalam penggunaan substrat, hasil yang lebih tinggi, dan hasil yang seragam.

Pemanfaatan enzim murni:

1. Proses industri
2. Kedokteran klinis
3. Laboratorium praktis
4. Detergen biologis, proteinase (dihasilkan oleh ekstraseluler bakteri), digunakan untuk merendam dan diberikan langsung pada cairan.

Alasan Pengembangan Teknologi Enzim

Beberapa alasan yang menyebabkan teknologi enzim terus dikembangkan:

1. Bagi beberapa mikroorganisme, produksi enzim ekstraseluler merupakan kebutuhan utama untuk pertumbuhan secara normal.
2. Penggunaan organisme utuh untuk menghasilkan enzim dirasa memiliki berbagai kesulitan, mulai dari kesulitan untuk menghasilkan kondisi optimum untuk pertumbuhan dan pembentukan produk, kemungkinan perubahan substrat menjadi biomassa, kemungkinan terjadinya reaksi samping yang tidak berguna, kecepatan menghasilkan produk yang tidak sesuai harapan, kesulitan pemisahan produk dll.
3. Pemisahan produk yang dikehendaki dari fermentasi sulit terjadi. Berbeda jika menggunakan enzim yang disolasi dan/atau yang dimurnikan, maka sebagian besar kesulitan tersebut dapat dikurangi (diatasi).
4. Enzim terdapat dalam semua organisme hidup dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi kimia tertentu.
5. Enzim memiliki spesifikasi kerja yang tinggi, karena enzim dapat bekerja dengan kecepatan perubahan yang besar dan pada keadaan fisiologis yang lunak yaitu pada tekanan dan suhu rendah serta dalam larutan air.
6. Dengan menggunakan enzim yang diisolasi dan dimurnikan, maka kesulitan-kesulitan apabila kita menggunakan organisme sebagaimana disebutkan di atas dapat dikurangi atau bahkan diatasi.
7. Keuntungan yang paling nyata yakni pemakaian enzim menjadi mudah ditangani, aktivitas dan peningkatan spesifitas katalisnya dapat diatur. Karena

pemakaian enzim mudah ditangani, aktivitas dan peningkatan spesifitas katalisisnya dapat diatur.

Prosedur imobilisasi enzim

Prosedur imobilisasi enzim dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu:

1. Pengikatan enzim secara kovalen pada zat padat pendukung

Pengikatan enzim dilakukan dengan cara mengikat enzim secara kovalen ke permukaan bahan yang **tak larut dalam air**. Sedikitnya prosedur ini terdiri dari dua tahap, yaitu aktivasi zat pendukung dan pengikatan enzim.

2. Penjebakan enzim dalam Gel

Penjebakan (*entrapment*) enzim dalam gel dilakukan dengan cara menjebak enzim ke dalam suatu **matrik atau gel** yang permiabel terhadap enzim. Dalam hal ini enzim tetap berada dalam bentuknya yang asli tanpa resiko adanya penutupan bagian aktif, gugus atau molekul enzim oleh ikatan kimia. Bahan yang biasa digunakan sebagai penjebak adalah silika gel, karet silikon, pati, dan poliakrilamid. Cairan yang digunakan antara lain: kolagen, gelatin, agar karagenan, dll. Untuk memobilisasi dengan akrilamid sel dicampur dengan monomer akrilamid, agen polimerizer seperti n-n metilenebisakrilamid, potasium persulfat untuk memulai polimerisasi, beta-dimetil amino propinil yang merupakan akselerator polimerisasi, sesudah 30 – 60 menit pada suhu ambient membentuk gel yang keras dan dapat dibentuk butir-butir untuk ukuran yang sesuai, kemudian dipak dalam kolom dan dicuci dengan garam untuk menghilangkan residu bahan kimianya.

3. Enkapsulasi enzim

Metode enkapsulasi ini menggunakan membran **semipermiabel**. Membran ini tidak permiabel terhadap enzim dan makro molekul yang lain, namun permiabel terhadap substrat dan produk yang mempunyai berat molekul yang tinggi.

4. Adsorpsi enzim pada permukaan zat padat

Metode *physical binding* ini terhitung metode yang **paling sederhana**, makanya **banyak digunakan**. Enzim dicampur dengan adsorbent kemudian dipacking dalam sebuah kolom. Kondisi adsorpsi tidak melibatkan spesies yang reaktif dan tidak ada modifikasi enzim. Adsorban yang banyak dipakai seperti: alumina, selulose, tanah liat, kaca, hidroksilapatit, karbon dan berbagai bahan silika.

5. Pengikat-silangan dengan bahan bergugus ganda

Metode *cross linking* ini dilakukan dengan cara pengikat-silangan dengan bahan yang cocok untuk menghasilkan partikel yang larut. Enzim dapat diimmobilisasi dengan cara pengikatan dengan dua atau lebih reagen fungsional seperti glutaraldehid atau toluenadiisosinat, atau dapat juga diikat pada cairan yang tidak larut yakni menggunakan reagen yang sama. Senyawa yang dapat digunakan dalam pengikat-silangan ini seperti: diamin alifatik, dimetil adipimat, dimetil suberimidat, dan terutama glutaraldehida. Retensi yang baik dapat diperoleh dengan metode ini, namun hal ini dapat disertai dengan hilangnya aktivitas enzim secara lebih luas.

Manfaat Enzim Terimobilisasi

Ada beberapa manfaat enzim terimobilisasi, antara lain:

Manfaat Serta Keuntungan Enzim Terimobilisasi

Immobilisasi enzim digunakan untuk: meningkatkan proses maupun untuk menghasilkan sesuatu yang baru.

Analisis dan penerapan medis

BIOTEKNOLOGI ENZIM **PROTEASE**

Protease adalah enzim pemecah protein yang merupakan salah satu primadona ditinjau dari aplikasinya yang luas di industri, dengan nilai komersial yang tinggi. Pangsa pasar protease mencapai 60% dari total penjualan enzim dunia yang saat ini sudah mencapai 2 milyar AS (Tabel 1). Dengan peranan yang demikian menonjol, studi dan penelitian di segala aspek protease telah banyak dilakukan. Aplikasi enzim di dunia industri, bidang medis maupun sebagai alat yang membantu sejumlah metodologi penelitian telah menjadi populer karena berbagai alasan.

Enzim adalah biokatalisator yang bekerja sangat efisien dan tidak pernah diperlukan dalam jumlah banyak, spesifik tanpa produk samping, dan ramah lingkungan karena merupakan komponen alamiah sel hidup. Daya guna enzim protease dalam dunia industri berkaitan dengan peranan alamiah yang sangat luas dari enzim tersebut. Enzim protease yang bersifat ekstraseluler umumnya bertugas menghidrolisa substrat polimer protein berukuran besar menjadi kecil sehingga dapat dimanfaatkan oleh sel yang menghasilkannya (Yamamoto, 1975; Aunstrup, 1980; Ward, 1983).

Jenis protease intraseluler, yaitu yang berada di dalam sel memegang peranan penting di dalam proses pembentukan dan germinasi spora, aktifitas sifat patoganik beberapa virus, proses pematangan protein, proses fertilisasi pada mamalia, proses koagulasi darah, fibrinolisis, pengontrolan tekanan darah, turn over protein, proses diferensiasi, modifikasi dan sekresi berbagai enzim (Matsubara dan Feder, 1971; Liener, 1974; Ward, 1983).

Sumber dan Klasifikasi

Enzim protease terdapat pada **semua makhluk hidup**. Namun demikian terdapat beberapa sumber penghasil protease yang sudah dimanfaatkan oleh dunia industri. Dari dunia tumbuh-tumbuhan dikenal **getah pepaya** sebagai penghasil **papain** dan **nanas** (daun, batang, buah) sebagai penghasil **bromelin**. Bagian hewan yang digunakan sebagai penghasil protease komersial adalah saluran pencernaannya (lambung, perut, usus), yang dikenal adalah bagian abomasum anak sapi sebagai penghasil **renin**.

Pada saat ini, yang paling banyak dimanfaatkan sebagai sumber protease adalah mikroorganisme, terutama bakteri golongan Bacillus, dan kapang Rhizopus, Aspergillus, dan Mucor. Jenis mikroorganisme lain yang telah dilaporkan sebagai penghasil protease adalah Proteus, Seratia, Endithia, Streptomyces, Thermus, Pseudomonas, dsb.

Kecenderungan penggunaan protease asal mikroorganisme yang semakin meningkat ada kaitannya dengan kemudahan di dalam membudidayakan mikroorganisme sebagai pabrik hidup penghasil enzim, peningkatan efisiensi dalam

waktu dan penanganan proses produksi, pengurangan ketergantungan terhadap lingkungan di dalam produksi enzim serta peluang yang lebih baik di dalam peningkatan produksi enzim maupun perbaikan kualitas enzim melalui optimasi media dan lebih-lebih lagi teknik mutasi rekayasa genetik (Eveleigh, 1981; Rehm dan Reed, 1987).

Tabel 1. Pangsa pasar enzim komersial

No.	Penggunaan Industri	1980 Juta (US \$)	1990 (Juta US \$)
1.	Protease serinalkalis	105	265
	Amilase	40	225
	Amiloglukosidase	40	225
	Glukosa isomerase	60	190
	Renin	75	130
	Tripsin	40	65
	Papain	35	58
	Pektinase	20	56
	Invertase	25	36
		440	1250
2.	Penggunaan biomedis		
	Enzim untuk penelitian	40	140
	Urokinase	55	75
	Enzim untuk diagnostik	30	50
	Enzim untuk pencernaan	30	35
		155	300
3.	Keperluan lain	30	180
	Total :	625	1730

Berdasarkan lingkungan pH dan daya kerjanya, protease dibedakan menjadi protease asam, protease netral dan protease alkalis. Renin dan sejumlah protease kapang termasuk dalam protease asam yang bekerja optimum pada pH asam. Sebagian protease bakteri, bromelin, dan papain termasuk protease netral, sedangkan sejumlah protease bakteri bekerja pada lingkungan alkalis (Yamamoto, 1975; Schwimmer, 1981).

Berdasarkan spesifitasnya enzim protease dibedakan menjadi eksoprotease yang memotong substrat, rantai protein dari ujung, dan endoprotease yang memotong rantai protein secara acak di tengah-tengah. Eksoprotease yang memotong rantai peptida dari ujung amino dikenal sebagai aminopeptidase. Spesifitas golongan endopeptidase lebih kompleks. Protease jenis **tripsin** menghidrolisa ikatan peptida pada asam amino lisin dan arginin, sedangkan **khimotripsin** memecah ikatan peptida pada sisi asam amino hidrofobik. Dengan spesifitas yang demikian sempit, beberapa jenis protease dimanfaatkan di dalam teknik penderetan asam amino (Ferdinand, 1978).

Berdasarkan sifat-sifat kimia sisi aktifnya, enzim protease dibedakan menjadi protease serin yang memiliki asam amino serin, protease sulfhidril yang aktifitasnya

bergantung pada satu atau lebih residu sulfhidril, protease metal yang memerlukan logam untuk aktifitasnya serta protease asam yang aktifitasnya disebabkan oleh adanya gugus karboksil pada sisi aktifnya. Pemahaman mengenai sisi-sisi aktif pada enzim tersebut penting di dalam memanfaatkan teknologi yang tepat untuk melindungi enzim dan sisi aktifnya dari inaktivasi oleh lingkungan.

Pemanfaatan Protease di berbagai Industri

Industri Deterjen

Saat ini pengguna terbesar enzim protease jenis **serin alkalis** adalah industri deterjen. Adanya komponen enzim protease di dalam deterjen membantu daya bersihnya terhadap sejumlah kotoran yang merupakan protein. Protease yang merupakan senyawa hayati dapat menjadi alternatif yang menarik di samping usaha mereduksi penggunaan komponen fosfat sehingga dihasilkan deterjen ramah lingkungan.

Industri Pengolahan Susu (Pembuatan Keju)

Pengguna protease kedua terbesar adalah industri pembuatan keju yang memanfaatkan protease **rennin**. Jenis protease tersebut digunakan untuk menggumpalkan protein susu sebelum diperam menjadi berbagai jenis keju. Kecenderungan saat ini adalah mencari protease jenis renin dari mikroorganisme mengingat semakin berkurangnya sumber penghasil renin, yaitu anak sapi, karena kebutuhan penggunaannya sebagai sumber makanan manusia mikroorganisme **Mucor dan Endothia** dilaporkan dapat menghasilkan protease serupa renin. Usaha lain yang dilakukan oleh para ahli adalah memindahkan gen renin pada mikroorganisme inang yang cocok.

Industri Kecap, Flavor, Bir, Pengempuk Daging dan Bakery

Pengguna protease asam dan netral dari kapang **Aspergillus dan Rhizopus** yang paling banyak adalah industri kecap. Di Jepang dan negara Asia Timur penambahan protease (di samping penggunaan kapangnya sendiri) dilakukan untuk mereduksi waktu pembuatan kecap sehingga proses produksinya menjadi lebih efisien. Penguraian protein bahan seperti kedele, dan sel ragi membentuk aroma tersendiri yang disukai di dalam bahan makanan sehingga protease juga dimanfaatkan untuk memproduksi flavor protein.

Industri yang memanfaatkan protease jenis **papain** secara besar-besaran adalah industri bir dan pengempuk daging. Di dalam pembuatan bir, papain digunakan untuk menjernihkan bir, yakni mengurangi kekeruhan yang ditimbulkan oleh kompleks protein **tanin** (Whitaker, 1972; Schimmer, 1981). Industri penghasil “*meat tenderizer*” yang digunakan rumah tangga modern dan pabrik pengolah daging adalah pengguna lain enzim protease. Daya urai protease terhadap protein daging kolagen dan elastin menjadi penentu efektifitas proses pengempukan tersebut. Penggunaan protease jenis papain memungkinkan pabrik pengolah daging memanfaatkan hewan yang relatif agak tua. Industri bakery memanfaatkan protease untuk membuat roti, kue atau produk seperti pizza dengan tekstur khusus yang diinginkan. Jenis protease yang banyak dimanfaatkan untuk keperluan tersebut adalah protease **netral dari kapang**.

Industri Sutra dan Kulit

Pemanfaatan protease lain yang telah dilaporkan adalah di dalam industri pemintalan **benang sutra** dan pengolahan **kulit**. Di dalam industri sutra, protease

serin alkalis dimanfaatkan untuk menguraikan **skleroprotein ulat sutra** sebelum dihasilkan benang-benang sutra yang kemudian dipintal. Di dalam industri pengolahan kulit, protease serin alkalis bakteri digunakan di dalam proses penghilangan bulu dan untuk memudahkan proses pewarnaan kulit berkualitas tinggi, khususnya untuk pembuatan sepatu dan tas. Penggunaan protease di kedua jenis industri tersebut dapat menekan keperluan menggunakan pereaksi atau kondisi proses yang dapat merusak lingkungan (Eveleigh, 1981).

Dunia Medis dan Peternakan

Protease asal mikroorganisme digunakan sebagai komponen salep **penghalus bekas operasi** dan sebagai komponen obat-obatan pembantu **pencernaan** (Wiseman, 1979). Dengan daya proteolitiknya protease juga merupakan enzim yang digunakan besar-besaran sebagai campuran makanan ternak. Penambahan enzim dilaporkan telah memperbaiki kualitas pertumbuhan beberapa hewan ternak.

Protease dan Bioteknologi Mutakhir

Protease dimanfaatkan juga di dalam teknik-teknik bioteknologi mutakhir, misalnya proses **ekstraksi dan isolasi DNA** menggunakan proteinase (termosil) untuk menguraikan komponen protein sel yang dapat mengganggu atau bersifat sebagai kontaminan. Telah disebutkan terdahulu, protease tripsin, khimotripsin dan termosilin sudah dimanfaatkan di dalam teknik penderetan asam amino yang sangat penting untuk usaha kloning dan rekayasa protein. Protease juga dimanfaatkan untuk analisis protein yang bersifat terapeutik (keperluan biomedis) serta pengolahan sejumlah protein rekombinan (Steel dan Walker, 1991).

Berbagai Aspek Penting di dalam Produksi Protease Mikroorganisme

Perbedaan yang nyata antara produksi protease dari mikroorganisme, tumbuhan dan hewan antara lain adalah sebagai berikut. Jarang tumbuhan ditanam khusus untuk diekstrak enzimnya. Umumnya, produksi enzim dari tanaman dikaitkan dengan usaha memperoleh produk lain, misalnya papain diproduksi dari getah pepaya bersamaan dengan pemanfaatan daging buahnya sebagai sumber pektin atau dijadikan manisan. Hewan tidak dipelihara semata-mata untuk menghasilkan enzim. Lain halnya dengan produksi enzim dari mikroorganisme yang **secara khusus dipelihara** dan dibiakkan untuk diambil enzimnya.

Pemilihan galur mikroorganisme unggul penghasil enzim menjadi langkah awal yang menentukan. Oleh karena itu, mencari galur tersebut merupakan usaha yang tidak pernah berhenti. Negara-negara dengan keragaman hayati seperti Indonesia telah menjadi obyek para peneliti (termasuk peneliti luar negeri) di dalam mencari galur mikroorganisme penghasil protease yang bersifat unik dan dengan aktifitas yang tinggi.

Usaha terhadap perbaikan kualitas galur yang telah diperoleh dapat dilakukan dengan teknik **mutasi dan rekayasa genetika** industri enzim multinasional seperti NOVO dan Gist Brocades diperlengkapi oleh fasilitas R & D yang memungkinkan penelitian-penelitian sejenis **mutagenesis terarah** ("*Site Directed Mutagenesis*"), rekayasa protein dan rekayasa genetika untuk memperbaiki sifat enzim diantaranya enzim **substilin** yang juga menjadi salah satu enzim primadona mereka. Teknik-teknik tersebut umumnya diaplikasikan untuk memperoleh enzim dalam jumlah

banyak, dengan aktifitas yang tinggi, sifat yang baik/lebih baik, atau memperoleh mikroorganisme penghasil enzim yang lebih mudah tumbuh, lebih cepat dan lebih banyak menghasilkan enzim.

Perkembangan teknologi yang pesat telah terjadi di dalam produksi protease dari mikroorganisme. Pemilihan media tumbuh yang murah, mudah diperoleh dan efektif di dalam memacu sintesis protease yang menjadi obyek penelitian yang terus-menerus. Pengetahuan akan mekanisme sintesis protease serta regulasinya menjadi penting di dalam desain fermentor, desain proses maupun waktu produksinya. Jenis **fermentasi padat** cocok untuk produksi protease dari kapang, namun untuk protease dari bakteri umumnya dipilih **fermentasi cair**.

Jenis protease ekstraseluler umumnya bersifat induktif sehingga adanya senyawa induser di dalam media fermentasi dapat meningkatkan biosintesis protease. Umumnya adanya ion fosfat cenderung meningkatkan sintesis enzim, termasuk protease. Adanya asam amino tertentu atau gula sederhana pada konsentrasi tinggi bersifat represif terhadap sintesis enzim, sehingga hal ini harus dicegah (Meyrath dan Volavsek, 1983).

Menjaga Stabilitas Enzim

Salah satu kelemahan enzim yang membatasi aplikasinya di dunia industri adalah **stabilitas molekul** tersebut terhadap lingkungan. Karena merupakan molekul protein, enzim juga rapuh terhadap semua faktor yang dapat merusak atau menguraikan protein, seperti **panas** yang tinggi, **pH** ekstrim, adanya **oksidator atau inhibitor** di lingkungan (Ferdinand, 1978).

Dengan demikian mulai proses produksi, penyimpanan sampai penggunaannya harus diusahakan lingkungan yang tidak merusak enzimnya sendiri. Sebagai enzim ekstraseluler, protease tidak termasuk enzim yang terlalu rapuh, bahkan terdapat jenis-jenis protease yang tahan panas, tahan pH dan tahan senyawa oksidator. Apabila protease disimpan dalam bentuk **kering** (tepung/bubuk) maka peluang degradasi selama penyimpanan dapat ditekan. Namun enzim yang disimpan dalam bentuk cair akan lebih rapuh terhadap lingkungan.

Kunci menjaga stabilitas enzim adalah menjaga **konfirmasi enzim** dalam bentuk aslinya, mempertahankan sebanyak mungkin interaksi non kovalen di dalam molekul enzim, menekan peluang terbukanya rantai protein enzim dan mencegah reaksi yang mungkin terjadi antara gugus fungsional asam amino penyusun enzim dengan beberapa kimiawi lingkungan (Ferdinand, 1978; Underkofler, 1980).

Penambahan bahan-bahan aditif pada enzim yang disimpan dalam bentuk cair telah dilakukan dan dipraktekan di industri. Penambahan senyawa-senyawa **beralkohol** seperti sorbitol, gliserol, polietilen glikol dan senyawa gula, efektif bagi beberapa enzim karena senyawa-senyawa tersebut bersifat menarik air sehingga menciptakan lingkungan yang lebih "hidrofobil" dan memungkinkan enzim mencapai struktur yang kompak dan sulit terbuka. Penambahan beberapa ion logam dapat melindungi sisi aktif enzim sedangkan penambahan senyawa anti oksidan efektif didalam melindungi gugus fungsional yang mudah teroksidasi seperti halnya gugus sulfhidril (Leaner, 1974; Ward, 1983).

Banyak juga enzim yang diawetkan dengan **penambahan polimer alamiah** seperti kolagen, ekstrak khamir, dan sebagainya yang mekanismenya masih belum jelas namun sudah di laporkan efektif. Kombinasi beberapa aditif bahkan telah menjadi sejumlah hak paten yang amat berharga. Teknik lain yang dilaporkan efektif dalam

meningkatkan stabilitas enzim adalah teknik **amobilisasi enzim** yang membuat filtrat enzim cair menjadi bentuk padatan. Bentuk tersebut stabil, sekaligus memungkinkan penggunaan enzim secara berulang. Pada gambar 2 terlihat pengaruh penyimpanan enzim terhadap aktifitas enzim tersebut

25. Teknologi enzim memiliki pengertian penggunaan enzim dalam berbagai proses industri. Teknologi enzim meliputi:
 - A. Purifikasi
 - B. Isolasi
 - C. Produksi
 - D. Immobilisasi
26. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah ...
 - A. Derajat keasaman (pH)
 - B. Suhu
 - C. Konsentrasi substrat
 - D. Isolasi
27. Contoh pemanfaatan enzim dalam kehidupan sehari-hari adalah ...
 - A. Detergen biologis
 - B. Proteinase
 - C. Ekstraseluler
 - D. Bakteri
28. Beberapa alasan yang menyebabkan teknologi enzim terus dikembangkan ...
 - A. Penggunaan organisme utuh memiliki berbagai kesulitan
 - B. Kemungkinan perubahan substrat menjadi biomassa
 - C. Kemungkinan terjadinya reaksi samping yang tidak berguna
 - D. Kecepatan menghasilkan produk yang tidak sesuai harapan
 - E. Kesulitan pemisahan produk dll.
29. Prosedur imobilisasi enzim dengan cara mengikat enzim secara kovalen ke permukaan bahan yang tak larut dalam air disebut
 - A. Pengikatan enzim
 - B. Penjebakan enzim dalam Gel
 - C. Metode enkapsulasi
 - D. Adsorpsi enzim pada permukaan zat padat
30. Ada beberapa manfaat enzim terimobilisasi, antara lain:
 - A. Imobilisasi mencegah difusi enzim ke dalam campuran reaksi dan memperoleh kembali enzim tersebut dari aliran produk dengan teknik pemisahan padat/cair yang sederhana.
 - B. Imobilisasi enzim digunakan untuk meningkatkan proses yang sudah ada atau menghasilkan sesuatu yang baru. Hingga tahun 1983 penerapan imobilisasi enzim terbatas pada 7 (tujuh) glukosa isomerase, 4 (empat) penisilin amidase, 3 (tiga) amino asilase dan laktase, 2 (dua) glukoamilase, 1 (satu) aspartase, dan 1 (satu) fumarase.
 - C. Penggunaan lebih lanjut dari imobilisasi enzim dapat dilakukan untuk analisis dan penerapan medis dan dihasilkan lebih banyak dari ide baru.

DAFTAR PUSTAKA

Aunstrup, K. 1980. *Production of Extracellular Enzymes*. dalam: *Enzymes Technology* Vol II (L.B. Wingard, E.K-Katzir dan L. Goldstein eds). Academic Press, New York.

- Busche, R.M. dan R.W.F. Hardy, 1985. *Biotechnological Potential Impact Issues*. Biotechnology and Bioengineering Symp. No. 15. John. Wiley & Sons. Inc.
- Eveleigh, D.K. 1981. *The Microbial Production of Industrial Chemicals*. dalam: *Industrial Microbiology and The Advent of Genetic Engineering*. Scie. Am. W.H. Freeman and Comp. San Fransisco.
- Ferdinand, W. 1978. *The Enzyme Molecule*. John Wiley and Sons. New York.
- Liener, I.E. 1974. *The Sulfhidril Protein*. dalam: *Food Related Enzymes* (Whitaker eds.) A. Chem Soc. Washington DC.
- Matsubara H. Dan J. Feder. 1971. *The Bacterial, Yeast and Mold Protease*. dalam: *Enzymes Vol III* (P.D. Boyer eds). Acad Press. New York.
- Meyrath, J dan G. Volavseek. 1975. *Production of Microbial Enzymes*. dalam: *Enzymes and Food Processing*. (G. Reed eds.) Acad. Press. New York.
- Peter Chen (1997). *Microorganisms & Biotechnology*. London: John Murray Ltd.
- Presscot, J dan Dunn. 1982. *Industrial Microbiology*. Avl Publ. Co. Inc. Westport, Connecticut.
- Priest, F.G. 1971. *Extracelluler Enzyme Synthesis in The Genus Bacillus*. Bacteriol. Rev. 41:711-753.
- Primrose, S.B. (1987). *Modern Biotechnology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Rehm, H.J. dan G. Reed. 1987. *Biotechnology*. Vol 7a. Edisi khusus mengenai Enzyme Technology VCH Weinheim, Federal Rep. of Germany.
- Schwimmer, S. 1981. *Source Book of Food Enzymology*. The AVI Pub. Co. Wstport.
- Scott, S. 1981. *Cheesemaking Practise*. Applied Sci. Publ. Ltd. London.
- Steel, D.M. dan J.M. Walker. 1991. *Thermosable Protein*. Life Chemistry Report. Vol. 8, 49-96. Hardwood Acad. Pbl. Singapore.
- Underkofler, L.A. 1980. *Enzymes*. dalam: *Handbook of Food Additives*. (T.E. Furia eds.) CRC, Press. New York.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., and Gary Higton, (2001). *Industrial Microbiology: An Introduction*. USA: Blackwell science.
- Ward, O.P. 1983. *Properties of Microbial Proteinase*. Dalam: *Microbial and Biotechnology*. (Fogarty, W. Eds.) Appl. Publ. London.
- Whitaker, J.R. 1972. *Principles of Enzymology for The Food Science*. John Willey and Sons. New York.
- Yamamoto, A. 1975. *Proteolytic Enzyme*. Dalam: *Enzymes in Food Processing*. Second ed. (G. Reed eds). Acad. Press. New York.

Bab 5

Bioteknologi Hewan



Gambar 1.1. Kapang, sebagai representasi jamur multiseluler

Pada bab ini akan dipelajari tentang:

- Pengertian Bioteknologi
- Kultivasi mikroba
- Medium kultur
- Bioreaktor
- Proses *downstream*
- Aplikasi fermentasi dalam produksi minuman dan makanan

Pada mulanya (sekitar tahun 1910), kultur jaringan/sel hewan (*animal tissue/cell culture*) merupakan metode untuk mempelajari tingkah laku atau sifat-sifat sel hewan dalam keadaan fisiologis maupun dalam kondisi artifisial karena suatu perlakuan (*treatment*). Pada awalnya yang digunakan untuk kultur adalah jaringan sehingga kembangkan kultur jaringan menjadi istilah yang digunakan.

Pengantar

Pada mulanya (sekitar tahun 1910), kultur jaringan/sel hewan (*animal tissue/cell culture*) merupakan metode untuk mempelajari tingkah laku atau sifat-sifat sel hewan dalam keadaan fisiologis maupun dalam kondisi artifisial karena suatu perlakuan (*treatment*). Pada awalnya yang digunakan untuk kultur adalah jaringan sehingga kembangkan kultur jaringan menjadi istilah yang digunakan.

Kultur jaringan (*tissue culture*) dalam arti luas menyangkut pengertian umum yang meliputi: kultur organ (*organ culture*), kultur jaringan (*explant culture*), dan kultur sel (*cell culture*). Padahal sebenarnya, batasan mengenai kultur organ adalah kultur dari organ utuh atau sebagian organ yang secara histologis seperti halnya *in vivo*. Sedangkan kultur jaringan dan/atau kultur sel merupakan kultur dispersi sel (sel yang telah dipisahkan) yang berasal atau yang didapat dari jaringan orisinal setelah terlebih dahulu mengalami pemisahan (*disagregasi*) secara mekanis, atau kimiawi (enzimatis).

Kultur sel yang didapat dari jaringan secara langsung disebut kultur sel primer, sedangkan kultur sel yang telah mengalami penanaman berulang-kali (*passage*) disebut kultur *cell line* atau sel strain.

Kultur jaringan merupakan suatu metode untuk memperbanyak jaringan/sel yang berasal atau yang didapat dari jaringan orisinal tumbuhan atau hewan setelah terlebih dahulu mengalami pemisahan (*disagregasi*) secara mekanis, atau kimiawi (enzimatis) secara *in vitro* (dalam tabung kaca).

Masalah

bagaimanakah teknik memperbanyak sel hewan secara *in vitro*.

Rumusan masalah yang dapat menjadi pedoman bagi mahasiswa dalam penelitian kultur sel otot embrio ayam adalah. syarat dasar yang dibutuhkan sel untuk dapat tumbuh dalam medium penumbuh dan bagaimana teknik pelaksanaan kultur sel hewan secara *in vitro*.

Hipotesis

Sel yang ditumbuhkan secara aseptik pada medium penumbuh dan ditempatkan pada suhu 37°C memiliki kemampuan untuk menempel, beradaptasi dan berproliferasi

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian kultur sel otot embrio ayam adalah *laminar air flow*, *magnetic stirrer*, autoclave, *binocular microscope*, *inverted microscope*, pH meter digital, pipet volumetrik (ukuran 1 ml, 5 ml, dan 10 ml) pipetor, hemasitometer, inkubator CO₂, inkubator telur, *beakker glass*, gunting dan pinset, botol media, vortex, cawan petri, konikel, pembakar spritus, *counting chamber*, timbangan elektrik, *multiwells plate* 24 sumuran, saringan 0,22 µm (Strivex-GV, Milipore, Bedford, Massachusetts, USA).

Bahan yang digunakan dalam penelitian kultur sel otot embrio ayam adalah *Minimum Essensial Medium* (MEM), *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *penicilin-streptomycin*, *fungizone* (Gibco, Life Technologies, USA), *Trypan Blue Stain* (TBS), Na₂CO₃.

Prosedur kerja penelitian meliputi:

1. Menginkubasi telur ayam dalam inkubator selama 11 hari.
2. Menyiapkan alat dan bahan untuk kultur sel otot embrio ayam.
3. Membuat media kosong dan medium penumbuh
4. Melapisi *multiwells plate* 24 sumuran dengan kolagen
5. Melakukan kultur sel otot embrio ayam.
6. Menginkubasi kultur sel otot embrio ayam selama 7 hari
7. Mengganti medium penumbuh
8. Mengamati kondisi sel otot embrio ayam selama diinkubasi
9. Mewarnai sel dan menghitung jumlah sel otot embrio ayam pada waktu pemanenan sel.

Data yang diperoleh adalah jumlah sel otot embrio ayam sebelum diinkubasi dan jumlah sel otot embrio ayam pada inkubasi hari ke-7.

Sel otot embrio ayam mengalami pertumbuhan sesuai dengan tahap-tahap pertumbuhan sel yang disebutkan oleh Freshney (1990: 239-241) yaitu *lag phase*, *log phase*, dan *stationer phase*. Pertumbuhan sel otot embrio ayam dapat dilihat dari bertambah banyaknya jumlah sel, ukuran sel semakin besar, terjadinya perubahan

morfologi sel yaitu penjuruan sel. *Log phase* terjadi pada inkubasi umur 48 jam (2 hari), pada fase ini sel mulai beradaptasi dengan medium penumbuh dan mulai tumbuh kemudian menempel (*plating*) serta menyebar pada substrat. Berdasar hasil foto mikroskopis sel otot embrio ayam pada inkubasi 48 jam (2 hari) terlihat beberapa sel sudah menempel (*plating*) dan menjulur. *Log phase* terjadi pada inkubasi 120 jam (5 hari), pada fase ini sel sudah menggunakan nutrisi pada medium penumbuh dengan baik. Berdasar hasil foto mikroskopis sel otot embrio ayam pada inkubasi 120 jam (5 hari) terlihat terjadi peningkatan pembelahan sel, pertumbuhan sel sudah menyebar dan terjadi persinggungan antar sel tapi belum memenuhi dasar *multiwells plate*. *Stationer phase* terjadi pada inkubasi 168 jam (7 hari), pada fase ini pertumbuhan sel telah menyebar memenuhi permukaan dasar *multiwells plate* dan terjadi persinggungan antar sel sehingga sel berdesak-desakan dan menyebabkan pertumbuhan berhenti. Berdasar hasil foto mikroskopis sel otot embrio ayam pada inkubasi 158 jam (7 hari), terlihat ukuran sel yang semakin besar, terjadi persinggungan antar sel dan pertumbuhan sel menyebar memenuhi permukaan dasar *multiwells plate*.

Sel otot embrio ayam dapat tumbuh pada medium penumbuh karena sel tersebut mampu beradaptasi terhadap medium penumbuh dan memanfaatkan nutrisi yang terkandung dalam medium tersebut. Nutrisi-nutrisi yang terkandung dalam medium penumbuh antara lain:

- a) MEM (*Minimum Essential Medium*) mengandung asam-asam amino esensial, vitamin dari kelompok vitamin B, dan garam-garam sebagai penentu osmolalitas yaitu Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , HCO_3^- .
- b) FBS (*Fetal Bovine Serum*) merupakan serum yang menjadi faktor yang mempengaruhi kondisi lingkungan sel dalam kultur sel. Serum mengandung hormon, protein, vitamin, glukosa, garam-garam mineral, faktor pertumbuhan dan faktor penghambat. Hormon dibutuhkan untuk pengambilan glukosa dan asam amino. Protein merupakan komponen besar dalam serum yang digunakan sebagai protein cadangan dan pentranspor bahan seperti mineral, asam lemak, dan hormon. Vitamin berperan membantu mempertahankan kegiatan-kegiatan normal suatu jaringan. Vitamin yang berperan langsung dalam proliferasi sel adalah vitamin B. Glukosa sangat diperlukan untuk proliferasi sel sebagai sumber energi. Mineral yang terkandung dalam serum antara lain Fe, Cu, Zn dan Se. Faktor pertumbuhan digunakan untuk memacu proliferasi sel, sementara faktor penghambat (*inhibitor*) berupa pencemaran sebelum filtrasi dan akibat pemanasan.
- c) Antibiotik yaitu *penicillin-streptomycin* dan *fungiszone* yang berfungsi untuk membunuh bakteri dan mikroorganisme serta jamur yang tidak diinginkan dalam medium penumbuh (Agung Janika Sitasiwi, 1990: 44).

Medium penumbuh pada *multiwells plate* diganti dengan medium penumbuh baru setelah inkubasi 24 jam (penggantian I) dan setelah inkubasi 150 jam (penggantian II). Penggantian medium penumbuh dimaksudkan untuk menjaga ketersediaan nutrisi bagi pertumbuhan sel. Warna medium penumbuh yang sudah digunakan tampak lebih pucat (merah pucat).

Penghitungan jumlah sel otot embrio ayam dilakukan dua kali pada sampel sel yang belum diinkubasi dan pada sampel sel saat pemanenan sel yaitu inkubasi hari ke-7 dengan menggunakan bilik hitung. Selain penghitungan jumlah sel, pada saat

pemanenan sel dilakukan pewarnaan dengan TBS. Sebelum diinkubasi jumlah sel otot embrio ayam 967×10^4 sel/ml dan jumlah sel otot embrio ayam setelah diinkubasi selama 7 hari adalah 1307×10^4 sel/ml. Terlihat adanya kenaikan jumlah sel yang menunjukkan adanya proliferasi sel.

Pembahasan hasil penelitian sebagai bahan ajar disesuaikan dengan konsep yang ingin dicapai pada kurikulum. Tinjauan kesesuaian hasil penelitian dengan konsep yang ada dalam kurikulum disajikan pada halaman 60.

1) Penarikan kesimpulan

Kegiatan ini berupa menarik jawaban rumusan permasalahan berdasarkan fakta dan interpretasi dari analisis data. Kesimpulan dari penelitian ini adalah persyaratan yang diperlukan untuk pertumbuhan sel pada kultur sel hewan antara lain medium penumbuh harus aseptik, memiliki pH 7,2-7,4, menyediakan semua nutrisi yang dibutuhkan sel dan mengkondisikan temperatur supaya optimal bagi pertumbuhan sel yaitu 37°C .

2) Mengkomunikasikan hasil

Praktik kultur sel hewan sangat sulit dilakukan pada mahasiswa semester 4 karena adanya keterbatasan waktu pada proses pembelajaran dan keterbatasan sarana dan prasarana sehingga penelitian kultur sel otot embrio ayam dikomunikasikan melalui dokumentasi kegiatan penelitian yang dikemas dalam CD pembelajaran.

b. Identifikasi produk penelitian

1) Fakta-fakta dari hasil penelitian meliputi:

- a) Terjadi kenaikan pH medium standar setelah dilakukan penyaringan dengan saringan $0,22 \mu\text{m}$ yaitu 7,4.
- b) Medium penumbuh terbuat dari campuran homogen medium standar, FBS, *fungizone* dan *penicillin-streptomycin*.
- c) Terjadi perubahan warna pada medium penumbuh yang sudah digunakan menjadi lebih pucat dari warna medium penumbuh yang belum digunakan
- d) Suhu optimal bagi pertumbuhan sel hewan yaitu 37°C diperoleh dengan menempatkan *multiwells plate* pada inkubator CO_2 5% udara 95%.
- e) Pada inkubasi umur 48 jam (2 hari), sel mulai beradaptasi dengan medium penumbuh dan mulai tumbuh kemudian menempel (*plating*) serta menyebar pada substrat
- f) Pada inkubasi 120 jam (5 hari), sel sudah menggunakan nutrisi pada medium penumbuh dengan baik, terjadi peningkatan pembelahan sel, pertumbuhan sel sudah menyebar dan terjadi persinggungan antar sel tapi belum memenuhi dasar *multiwells plate*.
- g) Pada inkubasi 168 jam (7 hari), pertumbuhan sel telah menyebar memenuhi permukaan dasar *multiwells plate* dan terjadi persinggungan antar sel sehingga sel berdesak-desakan dan menyebabkan pertumbuhan berhenti.
- h) Penghitungan sel pada hari ke-7 menunjukkan adanya peningkatan sel dibanding dengan hasil penghitungan sel sebelum pengkulturan.

2) Konsep hasil penelitian meliputi:

- a) Persyarat dasar dalam kultur sel hewan adalah medium harus aseptik, memiliki pH antara 7,2-7,4, medium mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel, inkubasi sel dilakukan pada suhu 37°C {fakta yang mendukung yaitu no a), b), c) dan d) }.
- b) Tahap pertumbuhan sel dalam medium kultur meliputi *lag phase*, *lag phase* dan *stationer phase* {fakta yang mendukung no e), f) dan g) }.

Kultur sel hewan adalah metode perbanyakan sel secara *in vitro*

Kelebihan dan Kekurangan Kultur Sel

Menurut Bedetti & Cantafora (1990), penggunaan kultur jaringan/sel (*in vitro*) memiliki beberapa kelebihan dan keuntungan dibanding dengan menggunakan hewan hidup (*in vivo*) antara lain sebagai berikut:

- 3) Pengambilan kesimpulan relatif lebih mudah dengan menggunakan populasi sel yang homogen.
- 4) Kultur sel primer tetap memiliki integritas morfologi dan biokimiawi dalam jangka waktu lama, dengan demikian memungkinkan melakukan penelitian ulang (*reproducible*) dan terkontrol.
- 5) Kultur sel tidak terdapat pengaruh sistemik.

Meskipun demikian penggunaan KSG memiliki beberapa kekurangan antara lain:

- 1) Dalam kasus kultur sel telah mengalami perubahan sifat aslinya, maka hasil pengamatan yang diperoleh akan menyimpang.
- 2) Tidak ada pengaruh sistemik dan kerjasama antar-sel yang berbeda dalam suatu jaringan yang kemungkinan memegang peran penting dalam aktivitas fisiologis.

Prinsip Dasar

Penguasaan pengetahuan dasar merupakan syarat pokok dan keterampilan seseorang sangat menunjang kesuksesan di dalam memelihara kultur sel. Penanganan kultur sel hendaknya dijalankan dalam kondisi benar-benar aseptik, karena sel/jaringan hewan tumbuh dan berkembang lebih lambat dari kontaminasi umum seperti bakteri, *yeast* (jamur), dan *mycoplasma*. Beberapa prinsip dasar yang harus diperhatikan dan dipenuhi dalam rangka mendapatkan kultur jaringan/sel yang bersih dan tumbuh dengan baik antara lain: medium harus aseptik dan steril, medium harus menyediakan semua nutrisi yang diperlukan oleh sel, medium harus memelihara pH 7.0 – 7.4, dan preservasi sel.

1. Medium harus aseptik dan steril

Kultur sel sebaiknya dilakukan di dalam ruangan tersendiri yang dilengkapi dengan *laminar air flow hoods*, *incubator*, dan mikroskop. Tempat tersebut sebaiknya juga berdekatan dengan ruang penyimpanan bahan untuk kultur jaringan, ruang persiapan, dan pencucian. Ruang laboratorium perlu dibersihkan secara rutin. Meskipun ada petugas kebersihan laboratorium, seseorang yang bekerja dengan kultur sel juga harus mengetahui dan bertanggung-jawab atas kebersihan ruang kultur.

Semua pekerjaan manipulasi medium kultur dan sel dikerjakan di dalam ruang steril untuk mencegah kontaminasi oleh mikroorganisme yang ada di udara atau yang terbawa oleh kita. Hal tersebut dilakukan di dalam *laminar air flow cabinets* atau *hoods*, karena alat tersebut akan mengalirkan udara yang telah

difilter ke tempat kerja. Filter yang digunakan adalah *high-efficiency particle filters* (HEPAs) yang dapat menyaring berbagai partikel dari udara dengan diameter $> 0,03 \mu\text{m}$. Dengan demikian hampir semua bakteri, spora jamur, dan sebagainya yang normal terdapat di udara dapat tersaring. Ada beberapa model/tipe cabinet yang tersedia saat ini dengan variasi ukuran dan dilengkapi *vertikal* atau *horizontal air flow*. Biasanya *cabinets* juga dilengkapi dengan lampu UV untuk membantu mempertahankan sterilitas ruangan. Lampu UV ini harus dimatikan pada saat *cabinets* sedang digunakan.

Kultur sel dan medium perlu disimpan dalam *container* steril. *Container* dapat berupa botol gelas atau plastik *disposable*. Botol gelas biasanya tidak digunakan untuk kultur sel tetapi untuk menyimpan medium, karena botol ini dapat digunakan lagi setelah proses sterilisasi. Ada berbagai bentuk container plastik *disposable* yang dapat digunakan untuk kultur sel, bervariasi dari *mikroplate* dengan volume 200 μL per sumuran sampai botol (*flask*) besar. Selain containers tersebut di atas, untuk kultur sel juga diperlukan *centrifuge tube* (*conical tube*) steril, yang digunakan dalam pencucian sel. Ukuran yang biasanya digunakan adalah 11 – 15 ml dan 50 ml. Berbagai container kecil (*vial*) juga diperlukan untuk menyimpan sel di dalam Liquid Nitrogen.

Berbagai cairan, alat gelas, filter dan sebagainya dapat disterilkan dengan pemanasan di dalam *autoclave* (minimal 20 menit pada tekanan 10 – 15 lb/in^2 , suhu 120°C). Cairan (selain medium kultur) yang akan disterilkan di simpan dalam botol gelas. Pada saat disterilkan tutup botol dilonggarkan dan dibungkus dengan aluminium foil. Pada saat mengangkat botol dari *autoclave*, tutup segera dikencangkan untuk menjaga sterilitas isinya. Benda-benda kecil yang akan disterilkan dapat dibungkus dengan aluminium foil, kassa, kertas payung atau kantong nylon sebelum di *autoclave*. Pipet kaca harus disumbat secara individual dengan kapas pada ujung belakangnya dan biasanya disterilkan dalam satu container metal. Berbagai alat gelas alat *dissecting* dapat juga disterilkan dengan cara pemanasan kering (90 menit pada suhu 160°C). Medium kultur tidak dapat disterilkan dengan cara pemanasan, tetapi dengan filter $0,22 \mu\text{m}$ yang dapat memfilter berbagai mikroorganisme yang dapat mengkontaminasi kultur. Filter $0,45 \mu\text{m}$ atau prefilter tidak dapat menyaring mikroorganisme, tetapi berguna untuk menghilangkan berbagai material sebelum filtrasi steril, dan pemakaian prefilter ini bermanfaat meningkatkan volume yang dapat difilter steril. Volume yang dapat difilter tergantung pada diameter filter, ukuran pori-pori, tekanan pada saat filtrasi dan viskositas cairan.

2. Temperatur

Kebanyakan sel yang berasal dari hewan perlu disimpan pada suhu 37°C agar dapat tumbuh secara optimal. Keadaan tersebut dapat dilakukan dengan menyimpannya dalam inkubator yang dapat menyediakan temperatur secara konstan dan terdistribusi secara merata di dalam inkubator. Untuk itu, kebanyakan inkubator dilengkapi dengan *thermostatically controlled water jacket* dan temperature control.

3. Medium harus memelihara pH 7.0 – 7.4

Untuk produksi antibodi monoklonal sel hibridoma memerlukan bikarbonat sebagai ion buffer untuk membantu mempertahankan pH pada medium kultur. Agar sistem bufer ini dapat bekerja maka kultur dan mediumnya harus mendapatkan CO₂. Dengan demikian diperlukan inkubator yang dapat mempertahankan kadar CO₂ 5 % di dalam udara CO₂ dapat disuplai dari gas CO₂ yang dihubungkan dengan CO₂ sensor ke dalam incubator. Ruangan di dalam incubator juga harus dijaga kelembabannya dengan menempatkan nampan yang diisi dengan aquadest steril supaya tidak terjadi kekeringan.

2. Medium

Medium penumbuh yang mengandung 10% serum (FBS), 1% antibiotik (*penicillin-streptomycin*) dan 0,5% antifungi (*fungizone*), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO₂ (95% udara).

1. Bahan: (1) botol steril 1 L, (2) aquabidest 1 L, (3) RPMI Powder 1 sachet (10, 4 gr), (4) NaHCO₂ sol. (7,5 %) 27 ml per liter medium atau 2 gr/L, (5) Hepes 2,86 gr, (6) 50 mM Mercapto Ethanol (ME) 1 mL, Filter 0,2 µm.

Cara Membuat (Preparasi) Medium Kultur

1. Bahan-bahan esensial

- Bikarbonat/Hepes: untuk mempertahankan pH pada medium kultur dengan keseimbangan antara bikarbonat terlarut dan konsentrasi CO₂.
- Glutamin: konsentrasi 2 mM perlu ditambahkan pada medium cair, karena sifatnya yang tidak stabil dan mempunyai waktu paruh 3 minggu pada 4°C dan 2 minggu pada 37°C.
- Serum: FBS dengan konsentrasi 10 %.

2. Bahan-bahan tidak esensial

- Antibiotik: penisilin 100 µg/mL dan steptomycin 100 µg/mL untuk mencegah pertumbuhan bakteri.
- Antifungi: Fungizone untuk mencegah pertumbuhan jamur.
- Phenol red: sebagai indikator pH untuk mengetahui perubahan pH medium kultur.
- Mercapto Ethanol (50 mM): untuk meningkatkan sintesis antibody oleh sel limpa.

3. Preparasi larutan PBS

1) Timbang kemikalia sebagai berikut:

Kemikalia	Kuantitas
<i>NaCl</i>	8 gram
<i>KCl</i>	0.2 g
<i>KH₂PO₄</i>	0.2 g
<i>Na₂HPO₄</i>	15 g

- 2) Siapkan 900 ml aquabidest dalam gelas piala ukuran 1 liter, kemudian masukkan bar *magnetic stirrer* ke dalamnya.
- 3) Tempatkan gelas piala tersebut di atas papan pemutar *magnetic stirrer*, kemudian atur agar putaran pelan-pelan dengan maksud agar jangan sampai terjadi pusaran air yang dapat menyerap udara.
- 4) Tambahkan kemikalia di atas satu per satu dan sedikit demi sedikit sampai semua larut.

- 5) Atur volume hingga 1 liter dan jaga agar pH 7,4.
- 6) Sterilisasi dengan menggunakan autoklav.
- 7) Simpan dilemari es.

Cara Membuat Medium RPMI

- a. RPMI powder ditambahkan dalam 800 ml, aquadest steril
- b. Tambahkan NaHCO₂ cair atau powder, Hepes dan ME
- c. Campur homogen dengan cara di *magnetic stirrer*
- d. Ukur pH pada 7,4 dengan penambahan NaOH 0,1 N atau HCl 0,1 N
- e. Sterilkan dengan cara difilter menggunakan filter 0,2 µm di dalam hood
- f. Beri label pada botol: nama medium, tanggal dan pemakai serta disimpan pada suhu 4°C.

Bahan Tambahan

2.1.1. Esensial

- Bikarbonat/Hepes: berfungsi untuk mempertahankan pH pada medium kultur dengan keseimbangan antara bikarbonat terlarut dan konsentrasi CO₂.
- Glutamin: konsentrasi 2 mM perlu ditambahkan pada medium cair, karena sifatnya yang tidak stabil dan mempunyai waktu paruh 3 minggu pada 4°C dan 2 minggu pada 37°C.
- Serum: FBS dengan konsentrasi 10 – 20 %.

2.1.2. Tidak esensial

- Antibiotik: penisilin 100 µg/mL dan steptomycin 100 µg/mL.
- Antifungi: *fungizone* 0,5%.
- Mercapto Ethanol (50 mM): untuk meningkatkan biosintesis antibody oleh sel limpa.

Tahap-Tahap Pertumbuhan Kultur Sel Granulosa

Tahap-tahap pertumbuhan kultur sel granulosa dalam medium kultur menurut Freshney (1990), meliputi tahap:

- Pertumbuhan sel yang lamban (*lag phase*),
- Pertumbuhan sel sangat pesat (*log phase* atau *exponential phase*), dan
- Tanpa pertumbuhan sel (*plateau phase* atau *stationer phase*). Pada fase stasioner (konfluen), pertumbuhan sel granulosa telah menyebar memenuhi seluruh permukaan dasar cawan kultur dan terjadi persinggungan antara sel satu dengan lainnya sehingga sel berdesak-desakan dan menyebabkan pertumbuhan terhenti (Becker *et al.*, 1999). Pada kondisi konfluen, sel granulosa menampakkan morfologi dan fungsi mirip dengan jaringan aslinya (Freshney, 1990). Kultur sel primer lapis tunggal (*monolayer*) menunjukkan sifat-sifat seperti jaringan aslinya dengan pola rangsangan hormonal seperti *in vivo* (Bedetti & Cantafora, 1990). waktu yang diperlukan untuk pertumbuhan sel dari fase awal sampai dengan terbentuknya sel anakan baru (satu siklus sel) berkisar antara 18-24 jam (Becker *et al.*, 1999).

1. Sel Turunan (Cell Line)

Validitas kultur sel sebagai model fungsi *in vivo* sering mendapat kecaman. Banyak hal yang menjadi masalah untuk menentukan apakah sifat-sifat sel yang dikultur sama dengan sifat sel *in vivo*, karena perubahan-perubahan lingkungan sel dalam kultur, proliferasi sel *in vitro* yang tidak terjadi seperti *in vivo*, interaksi antar-sel dengan sel dan sel dengan matriks menurun, karena kemurnian turunan sel kehilangan heterogenitas dan bentuk 3 dimensinya yang ada pada *in vivo*, dan juga perubahan lingkungan hormonal ataupun nutrisi. Lingkungan kultur sel menyebabkan sel untuk menyebar, migrasi, dan proliferasi sel yang tidak mengalami deferensiasi khusus. Adanya lingkungan yang sesuai, nutrisi, hormon dan substrat merupakan dasar untuk jaringan itu supaya dapat menunjukkan tanda-tanda fungsi khusus. Sebelum mempertimbangkan syarat-syarat khusus, lebih dahulu diuraikan proses pembentukan kultur sel primer dan turunan sel yang dikembangkan dari sel primer.

Manfaat Kultur Jaringan

1. Pemanfaatan Kultur Sel dalam Penelitian

Saat ini, kultur jaringan/sel hewan telah menjadi khasanah fundamental dalam bidang ilmu pengetahuan, seperti; biologi, kedokteran, farmasi, imunologi, dan bioteknologi. Setelah periode 1970-an banyak penemuan-penemuan dalam berbagai disiplin ilmu yang tidak terlepas dari pemanfaatan kultur jaringan seperti;

1. Transport intramembran seperti: (1) aktivitas dan perpindahan RNA dari inti ke sitoplasma dan translokasi hormon, (2) pompa ion kalsium dan natrium, (3) molekul karier untuk transport glukosa, (4) reseptor hormon dan molekul lainnya.
2. Aktivitas intraselular seperti: (1) replikasi DNA, (2) ekspresi gena, (3) sintesis protein, (2) isolasi beberapa sel mediator, dan (3) (4) analisis kromosom untuk mengetahui kelainan genetik dari bayi dalam kandungan, mempelajari efek toksik dari komponen obat, penentuan (diagnosis) adanya infeksi virus/ bakteri, dan monitoring efek pencemaran lingkungan.
3. Metabolisme intra-seluler seperti; (1) nutrisi, (2) inversi dan adanya induksi transformasi dari virus atau agen kimiawi (obat-obatan), (3) mekanisme regulasi steroidogenesis pada sel-sel steroidogenik, (4) peran molekul *Insulin-like growth factor I* (IGF-I) terhadap pertumbuhan dan diferensiasi berbagai jenis sel. (4) metabolisme energi, lemak, dan protein, (5) reseptor kompleks dan fluktuasi mediator kimia dan metabolit dalam sel.
4. Interaksi antar-sel, seperti: (1) sinyal antar-sel, (2) populasi kinetik dan adhesi sel, (3) peran berbagai hormon pada sel-sel ovarium secara langsung misalnya pengaruh estrogen terhadap ekspresi R-LH.

Oleh karena itu, teknologi kultur jaringan/sel saat ini menjadi kebutuhan pokok untuk menunjang penelitian-penelitian dibidang: tumor, virologi, dan imunologi, terlebih lagi setelah diperkenalkannya fusi sel somatik. Selain itu, kultur jaringan telah diaplikasikan dalam bidang industri (bioteknologi) dan kesehatan seperti; analisis kromosom untuk mengetahui kelainan genetik dari bayi dalam kandungan, mempelajari efek toksik dari komponen obat, penentuan (diagnosis) adanya infeksi virus/ bakteri, dan monitoring efek pencemaran lingkungan.

Semakin berkembangnya dukungan dan penguasaan teknologi laboratorium sangat memungkinkan membuat kultur sel primer dari berbagai jenis sel hewan maupun manusia. Perkembangan kultur jaringan sebagai teknik baru dalam bidang biologi mempunyai kaitan erat dengan perkembangan bioteknologi. Terlebih lagi setelah diperkenalkannya fusi sel somatik Kemajuan yang sangat menggembirakan dalam bioteknologi adalah penerapan rekayasa genetika dengan menyisipkan gen-gen tertentu yang dikehendaki kedalam sel yang telah kultur dengan tujuan untuk memproduksi insulin dan/atau beberapa hormon pertumbuhan dalam skala besar.

Selain itu, kultur jaringan telah diaplikasikan dalam bidang industri (bioteknologi) untuk memproduksi vaksin, protein, dan antibodi monoklonal. Saat ini, antibodi monoklonal (monoklonal antibodi = MAB) menjadi semakin populer karena penggunaan yang sangat meluas baik untuk penelitian maupun uji klinis termasuk diagnosis dan bahkan upaya mencapai target spesifik untuk pengobatan.

2. Pemanfaatan Kultur Sel dalam Bioteknologi

Semakin berkembangnya dukungan dan penguasaan teknologi laboratorium sangat memungkinkan membuat kultur sel primer dari berbagai jenis sel hewan maupun manusia. Perkembangan kultur jaringan sebagai teknik baru dalam bidang biologi mempunyai kaitan erat dengan perkembangan bioteknologi. Penerapan kultur jaringan dalam bidang industri (bioteknologi) antara lain:

1. Produksi virus yang kemudian dibuat vaksin.
2. Produksi Antibodi-monoklonal (MAB).

Kultur Jaringan hewan UNIPOTEN

Pinsip dasar yang harus diperhatikan dalam membuat kultur jaringan hewan, antara lain:

- Aseptik dan steril
- Seleksi dan preparasi sel
- Kloning (perbanyakl dan hasilnya sama persis)
- Propagasi (perbanyak)
- Preservasi sel (pengawetan / memeliharanya dengan disimpan)
 - a. Media kultur : (1) medium dasar, (2) serum, (3) aditif, (4) system penyangga
 - b. Faktor yang paling krusial dalam kultur sel adalah susunan dari meium pertumbuhan. Untuk memperoleh medium yang sesuai beberapa criteria harus dipenuhi :
 1. medium harus menyediakan makanan yang diperlukan oleh sel
 2. medium harus mempunyai nilai pH antara 7,0 – 7,3.
 3. Medium harus isotonic terhadap sitoplasma sel
 4. Medium harus steril
 - c. Komponen dasar dari medium ini adalah larutan garam seimbang fungsinya untuk menyediakan :
 5. ion-ion anorganik esensial
 6. koreksi pH
 7. sumber energi dalam bentuk glukosa
 8. indicator pH, phenol merah

- d. Penyangga dari medium kultur jaringan/sel hewan biasanya disediakan sodium bikarbonat. Disosiasi di dalam larutan membebaskan karbondioksida ke atmosfer dan menghasilkan ion hidroksil di dalam medium.

Manfaat kultur jaringan hewan:

- a. dalam bidang penelitian :
 - menganalisis kromosom untuk mengetahui kelainan genetic dari bayi dalam kandungan
 - mengetahui efek toksik dari komponen obat
- b. dalam bidang industri :
 - produksi virus yang kemudian dibuat vaksin
 - produksi antibody monoklonal

Produksi Vaksin Viral

Salah satu permasalahan untuk memproduksi vaksin adalah pada teknologi memperbanyak bahan vaksin yaitu vitus hidup. Virus merupakan mikroorganisme yang bersifat sebagai parasit obligat intraseluler sehingga untuk keiduoan dan memperbanyak virus diperlukan sel hidup. Jika menggunakan sel hewan, maka memerlukan banyak hewan. Solusi, menggunakan kultur jaringan hewan lebih efisien. Berbagai problem dengan produksi vaksin secara konvensional di atas, terutama masalah keamanan, digunakan teknologi rekombinan DNA (rekayasa genetika) untuk memproduksi vaksin yang lebih aman dan potensial. Subunit virus diproduksi oleh bakteri atau yeast (kapang).

Salah satu pemanfaatan kultur sel secara komersial pertama kali sebagai media untuk memproduksi virus.

Vaksin viral dapat dibedakan menjadi 2 tipe yaitu:

1. Vaksin hidup (*life vaccine*) dari virus hidup yang kurang poten terhadap manusia.
2. Vaksin mati (*killed vaccine*) dari agen yang telah dimatikan.

Biasa digunakan kultur sel dari embrio ayam (*chicken embryo*) untuk memproduksi vaksin influenza dan *yellow fever*.

No	Jenis Virus	Sel yang digunakan Kultur
1.	Cacar air	Fibroblas embrio ayam
2	Polio (inaktif)	Sel ginjal monyet
3	Polio (aktif/hidup)	Sel diploid manusia, ginjal kera
4	Rabies	Sel diploid manusia

Keuntungan teknologi rekombinan DNA dapat dihasilkan vaksin yang melawan virus yang tidak dapat tumbuh pada medium kultur terhadap titer tinggi untuk memberi antigen yang cukup untuk keberhasilan vaksinasi.

Sekali vaksinasi dapat memberikan beberapa kekebalan sekaligus terhadap berbagai jenis virus dengan cara menyisipkan gena berbagai imunogen pada plasmid bakteri. Sebagai contoh: penyakit tetelo, Marek's, cacar ayam.

- C. Preparasi
D. Preservasi
41. Sel hewan memiliki karakter yang sangat berbeda dengan sel tumbuhan yang dikenal dengan istilah ...
A. Totipoten
B. Unipoten
C. Potensial sel
D. Impoten
42. Pada proses produksi vaksin viral, penanaman virus dilakukan pada tahap pertumbuhan sel ...
A. *Lag phase*
C. *Plateau phase*
43. Produk bioteknologi yang berupa protein manusia (*human protein*) dan bermanfaat untuk pencegahan kanker adalah ...
A. Antibiotika
B. Hormon pertumbuhan
C. Interferon
D. Antibodi monoklonal
44. Bahan yang digunakan sebagai indikator pH pada medium kultur adalah ...
A. Penisilin
B. Fungizone
C. Phenol red
D. Mercapto Ethanol
45. Kultur jaringan yang didapat dari jaringan orisinal secara langsung setelah terlebih dahulu mengalami pemisahan (*disagregasi*) secara mekanis, atau kimiawi (enzimatis) disebut ...
A. Kultur sel primer
B. Kultur *cell line*
C. Sub-kultur
D. Kultur sel strain
46. Prinsip yang harus diperhatikan dan dipenuhi dalam rangka mendapatkan kultur jaringan/sel yang tidak terkontaminasi adalah ...
A. Sterilisasi
B. Seleksi
C. Preparasi
D. Preservasi

Problem Based Learning

1. Bioteknologi hewan, jelaskan pengertian!
2. Metode yang digunakan dalam biotek hewan
3. produk-produk biotek hewan
4. Manfaat biotek hewan bagi hewan dan manusia

DAFTAR PUSTAKA

- Freshney, R.I. (1990). *Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique Second Edition*. New York: John Wiley and Sons, INC. Publication
- Primrose, S.B. (1987). *Modern Biotechnology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Shupnik, M.A. (1999). Introduction to Molecular Biology. In: Fauser, B.C.J.M., Rutherford, A.J., Strauss, III., J.F., and Van Steirteghem, A. (eds.) *Molecular Biology in Reproductive Medicine*. The Parthenon Publishing Group.

ANTIBODI-MONOKLONAL (MONOCLONAL ANTIBODY = MAB)

Pengantar

Penemuan-penemuan baru dibidang imunologi (ilmu yang mempelajari sistem kekebalan tubuh) telah berhasil diproduksi antibodi-monoklonal (MAB) secara massal. Penemuan MAB dengan metode hibridoma dan kloning memiliki kelebihan untuk penelitian antara lain: peka (sensitivitas), khas (spesifitas), dan akurat. Kontribusi pengaplikasian MAB telah dapat dirasakan manfaatnya khususnya dalam dunia riset (*research*) seperti: *enzymeimmunoassay* (EIA), *radioimmunoassay* (RIA), dan immunositokimia (*immunocytochemistry*). Selain itu, MAB dapat pula digunakan untuk memberikan jasa pelayanan dalam berbagai hal seperti: diagnosis suatu penyakit dengan akurat, pencegahan dan pengobatan penyakit.

Manusia dan Vertebrata lainnya memiliki sistem pertahanan tubuh yang berperan untuk melindungi dirinya dari serangan agen-agen penyebab penyakit. Sistem pertahanan tersebut dapat dibedakan menjadi 2 macam yaitu:

1. Pertahanan nonspesifik yang memiliki sifat alami (*innate*) artinya sudah ada sejak organisme itu lahir dan berlaku bagi semua agen infeksi, dan
2. Pertahanan spesifik atau disebut juga pertahanan perolehan (*acquired*) karena pertahanan ini diperoleh setelah adanya rangsangan oleh benda asing (agen infeksi). Pertahanan spesifik merupakan tanggungjawab dari klon-klon sel limfosit B yang masing-masing spesifik terhadap antigen. Adanya interaksi antara antigen dengan klon limfosit B akan merangsang sel tersebut untuk berdiferensiasi dan berproliferasi sehingga didapatkan sel yang mempunyai ekspresi klonal untuk menghasilkan antibodi.

Pertahanan spesifik timbul karena adanya rangsangan oleh benda asing (antigen). Antigen adalah semua benda asing yang menginvasi (menginfeksi) ke dalam tubuh suatu organisme seperti: protein asing, virus, bakteri, protozoa, jamur, cacing, dsb. Perlu dibedakan antara antigen dengan imunogen karena tidak semua antigen dapat bersifat imunogen. Imunogen adalah semua benda asing yang apabila berada dalam tubuh organisme akan merangsang timbulnya respon imun (reaksi kekebalan). Hapten adalah antigen yang memiliki berat molekul kecil sehingga tidak dapat merangsang terjadinya respon imun, akan tetapi apabila hapten tersebut digabungkan dengan molekul protein yang lebih besar (karier), maka akan bersifat imunogen. Setiap imunogen memiliki bagian yang karakteristik yang merupakan penentu antigen atau yang disebut *antigen determinant* (epitope). Antigen determinan merupakan molekul glikoprotein yang menempel pada membran sel dan berperan sebagai penentu terbentuknya molekul imunoglobulin (antibodi). Berdasarkan jumlah epitope yang terdapat pada permukaan sel antigen, maka dapat dibedakan menjadi:

1. Antigen polivalen jika memiliki banyak epitope
2. Antigen oligovalen jika memiliki sedikit epitope
3. Antigen monovalen jika hanya memiliki satu epitope.

Pengertian

Antibodi atau antiserum atau disebut juga sebagai immunoglobulin (Ig) merupakan molekul glikoprotein yang tersusun atas asam amino dan karbohidrat dan

banyak dijumpai dalam serum atau plasma darah. Ilmu yang mempelajari sistem kekebalan tubuh (imunitas) disebut Imunologi. Menurut Roitt (1990), secara sederhana molekul Ig dapat digambarkan menyerupai huruf Y dengan engsel (*hinge*). Molekul immunoglobulin dapat dipecah oleh enzim papain atau pepsin (protease) menjadi 2 bagian yakni Fab (*fragment antigen binding*) yaitu bagian yang menentukan spesifitas antibodi karena berfungsi untuk mengikat antigen, dan Fc (*fragment crystalizable*) yang menentukan aktivitas biologisnya dan yang akan berikatan dengan komplemen. Sifat biokimiawi molekul Antibodi adalah memiliki spesifitas yang tinggi sehingga menjadi keunggulan yang kemudian dimanfaatkan menjadi suatu teknik untuk mendeteksi, mengukur, dan mengkarakterisasi molekul antigen spesifiknya (Shupnik, 1999: 4). Ada 2 macam Ab.:

- 1) **Antibodi poliklonal** yaitu Ab yang dihasilkan oleh berbagai sel limfosit sehingga sebagai konsekuensinya, Ab poliklonal memiliki imunokimia berbeda dan bereaksi dengan berbagai jenis epitope pada berbagai antigen kurang spesifik. Sejak lama telah dikenal teknik pembuatan Ab poliklonal secara konvensional yaitu dengan memasukkan antigen ke tubuh organisme, maka akan merangsang pembentukan Ab yang sering dikenal dengan istilah vaksinasi (immunisasi). Antibodi yang dihasilkan secara konvensional mempunyai sifat poliklonal yakni mempunyai beberapa sifat yang disebabkan antigen yang digunakan belum dimurnikan, sehingga kurang spesifik untuk tujuan tertentu seperti riset dan terapi.
- 2) **Antibodi monoklonal** yaitu Ab yang dihasilkan oleh sel limfosit (klone sel plasma) yang terpilih dan memiliki sifat sangat spesifik.

Teori Pembentukan Immunoglobulin

Molekul immunoglobulin (Antibodi) dihasilkan oleh sel limfosit B yang telah berdiferensiasi menjadi sel plasma. Molekul Ig disekresikan langsung ke cairan tubuh dan sirkulasi darah, oleh karena itu disebut sebagai kekebalan humoral. Selain itu, limfosit B juga akan berdiferensiasi menjadi sel memori yang mampu menyimpan ingatan terhadap antigen sejenis.

Menurut Roitt (1988) terdapat 2 teori mengenai mekanisme pembentukan antibodi yaitu:

1. Teori instruktif (oleh Erlich). Menurut teori ini, pada setiap organisme memiliki prekursor limfosit B yang hanya sejenis. Antigen akan memerintahkan prekursor limfosit B tersebut untuk menyesuaikan dengan antigen yang masuk yang kemudian berkembang menjadi sel plasma untuk membentuk antibodi. Teori instruktif saat ini telah ditinggalkan oleh para ahli.
2. Teori selektif (oleh Jerne & Burnet). Pembentukan antibodi berdasarkan *clonal selection theory* sebagai berikut: pada setiap organisme terdapat berjuta-juta prekursor limfosit B. Oleh Jerne & Burnet (1978) dikatakan ada sekitar 10^8 - 10^{12} jenis sel limfosit B. Dengan adanya antigen yang masuk ke dalam tubuh suatu organisme, maka akan merangsang interaksi antara antigen determinan (epitope) dengan sel limfosit B yang sesuai yang kemudian akan memacu diferensiasi dan proliferasi dari sel tersebut menjadi sel plasma yang memiliki kemampuan menghasilkan antibodi (immunoglobulin).

Molekul Immunoglobulin (Ig)

1. Struktur molekul immunoglobulin

Molekul Ig merupakan molekul glikoprotein yang tersusun atas asam amino dan karbohidrat. Antara asam amino satu dengan lainnya dihubungkan oleh ikatan peptida dengan gugus karboksil (COOH^-) sebagai ujung karboksil dan gugus amina (NH_3^+) sebagai ujung amina. Secara sederhana molekul Immunoglobulin dapat digambarkan menyerupai huruf Y dengan engsel (*hinge*) (**gambar**).

Molekul Ig dapat dipecah oleh enzim papain atau pepsin (protease) menjadi 2 bagian yakni Fab (*fragment antigen binding*) yaitu bagian yang menentukan spesifitas antibodi karena berfungsi untuk mengikat antigen, dan Fc (*fragment crystalizable*) yang menentukan aktivitas biologisnya dan yang akan berikatan dengan komplemen. Sebagai contoh immunoglobulin G mempunyai kemampuan menembus membran plasenta.

2. Kelas-kelas molekul immunoglobulin

Molekul Ig berdasarkan ukuran molekulnya dapat dibedakan menjadi 5 kelas yakni Ig G, Ig A, Ig M, Ig D, dan Ig E. Masing-masing kelas masih dapat dibedakan menjadi subkelas-subkelas. Tiap kelas Ig memiliki karakteristik tersendiri misalnya berat molekul, komposisi asam amino, dan strukturnya.

IgG : 70% dalam tubuh, dapat diwariskan, diberikan lewat kolostrum, ada 4 subkelas yaitu: IgG₁, IgG₂, IgG₃, dan IgG₄.

IgM : 6% dalam tubuh, merupakan makromolekul karena strukturnya pentamer.

IgA : 10% dalam tubuh kebanyakan terdapat pada air mata, air liur, air mani dan kolostrum.

IgD : 1%, pada kanker (myeloma)

IgE : sedikit, pada alergi (hipersensitivitas)

Fungsi molekul immunoglobulin

Sifat biokimiawi molekul Antibodi adalah memiliki spesifitas yang tinggi sehingga menjadi keunggulan yang kemudian dimanfaatkan menjadi suatu teknik untuk mendeteksi, mengukur, dan mengkarakterisasi molekul antigen spesifiknya (Shupnik, 1999: 4).

Teknik Produksi Antibodi

1. Secara konvensional

Sejak lama telah dikenal teknik pembuatan antibodi secara konvensional yaitu dengan memasukan antigen ke tubuh organisme (misalnya tikus), maka akan merangsang pembentukan antibodi yang sering dikenal dengan istilah vaksinasi (immunisasi). Antibodi yang dihasilkan secara konvensional mempunyai sifat poliklonal yakni mempunyai beberapa sifat yang disebabkan antigen (vaksin) yang digunakan belum dimurnikan, sehingga kurang spesifik untuk tujuan tertentu seperti riset dan terapi.

2. Secara modern (produksi MAb)

Produksi molekul Ab merupakan tanggungjawab dari klon-klone sel limfosit B (sel plasma) yang masing-masing spesifik terhadap antigen. Menurut teori klonal,

adanya interaksi antara antigen dengan klon limfosit B akan merangsang sel tersebut untuk berdiferensiasi dan berproliferasi sehingga diperoleh sel yang mempunyai ekspresi klonal untuk memproduksi antibodi. Produksi antibodi monoklonal merupakan gabungan penerapan teknik hibridoma dan kloning. Dengan berkembangnya teknologi dan pengetahuan tentang molekul Ig, maka kini dikenal teknik hibridoma untuk tujuan menghasilkan antibodi monoklonal dalam jumlah banyak dan tidak terbatas oleh waktu dengan cara kloning. Teknik hibridoma adalah suatu teknik dengan cara menggabungkan dua macam sel eukariot dengan tujuan mendapatkan sel hibrid yang memiliki kemampuan kedua sel induknya. Pada hakekatnya produksi antibodi monoklonal tetap mengikuti prinsip teori seleksi klonal (Artama, 1990: 165).

Prosedur Produksi MAB:

1. Antigen yang telah dimurnikan disuntikkan ke hewan percobaan mencit (*mice*) untuk mendapatkan sel limfosit B yang spesifik.
2. Limpa (*spleen*) dikeluarkan dari tikus setelah lebih dulu dimatikan dan dikerjakaan secara aseptis.
3. Sel limfosit B sebagai penghasil Ab tersebut kemudian diisolasi dari limpa (*spleen*) dipisahkan dari eritrosit dan cairan limpa dengan cara sentrifus (*gradient centrifuge*).
4. Sel penghasil Ab tersebut kemudian diisolasi dan selanjutnya dikawinkan dengan sel myeloma (sel kanker) dalam media PEG (*polyethylene glycol*) atau dapat juga dengan virus Sendai.
5. Sel hibrid yang diperoleh kemudian diseleksi dalam medium HAT (*hypoxanthine aminopterin thimidin*), oleh karena tidak semua sel hibrid yang dihasilkan sesuai dengan yang diharapkan yakni sel limfosit B dengan sel myeloma, akan tetapi dapat terjadi hibrid antara sel limfosit B dengan sel limfosit B, atau sel myeloma dengan sel myeloma.
6. Sel hibrid yang terseleksi kemudian diuji untuk mengetahui kemampuan menghasilkan Ab yang diharapkan, jika hasilnya pasti maka sel tersebut dikultur (*cloning*) kemudian dipropagasi pada kultur jaringan (bioreaktor) atau disuntikkan ke tikus (*in vivo*) untuk produksi MAb atau dapat pula dibekukan untuk koleksi.
7. Sel hibrid yang terseleksi kemudian diuji (*assay*) untuk mengetahui kemampuan menghasilkan Ab yang diharapkan dengan menggunakan kultur sel dan diuji antibodi.
8. Jika hasilnya pasti, maka sel tersebut kemudian dipropagasi dengan menggunakan kultur jaringan dalam skala besar (bioreaktor) untuk mendapatkan sel turunan yang sama persis dengan induknya (*cloning*), atau disuntikkan ke tikus (*in vivo*) untuk produksi MAB, atau dapat pula dibekukan untuk koleksi (*stock cell culture*).

Antibodi monoklonal secara imunokimia identik dan memiliki sifat: homogenitasnya tinggi, tidak ada Ab tidak spesifik, dan mudah dikarakterisasi (Boenisch, 1989: 4). Penemuan MAb dengan metode klonasi (*clone*), memiliki kelebihan antara lain: peka (sensitivitas), khas (spesifitas), dan akurat. Selain itu, MAb dapat pula digunakan untuk memberikan jasa pelayanan dalam berbagai hal seperti: diagnosis suatu penyakit dengan akurat, pencegahan dan pengobatan

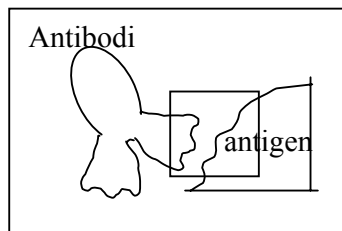
penyakit. Kontribusi MAb telah dapat dirasakan manfaatnya khususnya dalam dunia riset (*research*) seperti: *enzymeimmunoassay* (EIA), *radioimmunoassay* (RIA), dan immunositokimia (*immunocytochemistry*).

Molekul antibody (immunoglobulin / Ig)

Antibodi atau disebut juga immunoglobulin (Ig) merupakan molekul glikoprotein yang tersusun atas asam amino dan karbohidrat dan banyak dijumpai dalam serum atau plasma dara. Ada dua macam antibody, yaitu *Ab poliklonal* yang dihasilkan oleh berbagai sel limfosit sehingga konsekuensinya memiliki immunokimia berbeda dan bereaksi dengan berbagai jenis epitope pada berbagai antigen kurang spesifik. Sedangkan *Ab monoclonal* adalah *Ab* yang dihasilkan oleh sel limfosit (klon sel plasma) yang terpilih dan memiliki sifat sangat spesifik.

Antibodi dibuat oleh sel khusus dalam limpa, darah dan kelenjar getah bening. Sel yang disebut sel-B ini melepaskan antibodi yang menjelajahi tubuh, memilih dan menempel pada mikroba dan bahan asing lain. Sekali penyerbu telah dikenal oleh natibodi, sisa system kekebalan melancarkan aksinya, dan berakhir dengan peniadaan benda asing yang mengikatnya.

Bentuk setiap molekul antibodi ditentukan oleh urutan asam amino yang digunakan untuk menyusunnya. Semua antibodi mempunyai bentuk dasar yang sama, yaitu menyerupai huruf Y. Setiap natibodi mempunyai dua lekuk yang identik, masing-masing satu pada ujung tangan molekul. Bentuk lekuk menunjukkan variasi yang kecil antara jenis antibodi yang satu dengan yang lain. Variasi inilah yang memberikan antibodi ciri khasnya yang paling penting. Dalam tubuh manusia terdapat jutaan antibodi yang berbeda, masing-masing dengan lekuk-lekuk yang khas.

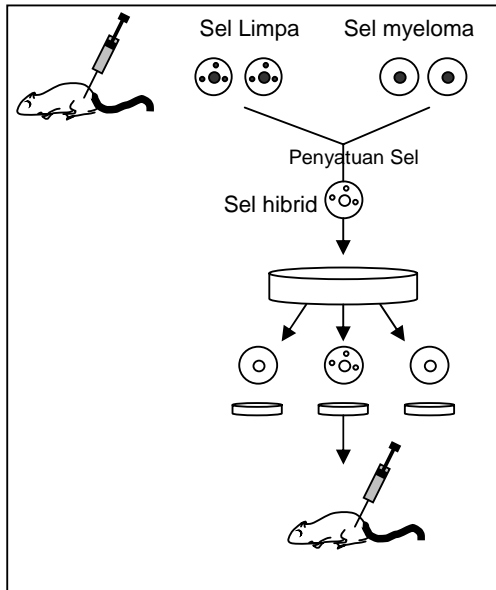


Permukaan setiap substansi (virus, bakteri, plastik yang licin) bertaburan molekul-molekul yang menonjol ke dalam lingkungannya. Jika antibodi menjumpai tonjolan yang kebetulan sesuai dengan lekuk-lekuknya, tonjolan akan masuk ke dalam lekukan dan terjadilah pelekatan yang erat seperti terkunci. Badan yang diikat oleh antibodi disebut antigen.

Antibodi hanya mengikat antigen yang bentuknya benar-benar sesuai.

Menurut teori para pakar bioteknologi dapat mengembangkan antibody monoclonal yang spesifik untuk setiap senyawa yang sangat penting dalam bidang pengobatan. Teknologi ini sekarang dimantapkan untuk memberi dampak utamanya pada praktek kedokteran yang mencakup seluruh spectrum penyakit pada manusia, dari masalah penyakit kanker dan kegagalan ginjal sampai penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus dan bakteri. Penerapan antibodi monoklonal yang potensial adalah meningkatkan pertahanan alami pasien, meningkatkan keberhasilan pencangkokan organ, penyampaian obat ke bagian spesifik tubuh dan pemurnian obat sebelum diberikan ke pasien.

Teknik memproduksi antibody monoclonal (MAB) secara massal dengan metode klonasi



Antigen yang telah dimurnikan disuntikkan ke hewan percobaan mencit untuk mendapatkan sel limfosit B yang spesifik

1. Sel limfosit B sebagai penghasil Ab tersebut kemudian diisolasi dari limpa dan selanjutnya dikawinkan dengan sel *myeloma* (sel kanker leher rahim yang telah diisolasi) dalam media PEG (*poliethilena glycol*) atau dapat juga dengan bantuan virus sendai.
2. Sel hybrid yang diperoleh kemudian di seleksi dalam medium HAT (*hypoxanthine aminopterin thimidin*). Oleh karena tidak semua sel hybrid yang dihasilkan sesuai dengan

yang diharapkan (sel limfosit B dengan sel myeloma dapat tumbuh cepat dan memproduksi antibody), akan tetapi dapat terjadi hybrid antara sel limfosit B dengan limfosit B, atau sel myeloma dengan sel myeloma.

3. Sel hybrid yang terseleksi kemudian diuji (*assay*) untuk mengetahui kemampuan menghasilkan Ab yang diharapkan dengan menggunakan kultur sel dan diuji antibody.
4. Jika hasilnya, pasti maka sel tersebut dipropagasi dengan menggunakan kultur jaringan dalam skala besar (*bioreactor*) untuk mendapatkan selketurunan yang sama persis dengan induknya (*cloning*), atau disuntikkan ke tikus (*in vivo*) untuk produksi MAB, atau dapat pula dilakukan untuk koleksi (*stock cell culture*).

Manfaat dan kelebihan MoAB

Antibodi monoclonal telah digunakan untuk berbagai keperluan antara lain:

1. Untuk kepentingan penelitian (*riset*): *enzymeimmunoassay* (EIA), *radioimmunoassay* (RIA) dan *imonositokimia* (*immunocytochemistry*).
2. Untuk Uji Klinis
 - a. Tes **kehamilan** dengan menggunakan antiserum terhadap hormon β -hCG yang dihasilkan oleh plasenta ibu yang hamil muda. Anti B-hCG
 - b. Tes **golongan darah** dengan menggunakan antiserum A dan B
3. Untuk Diagnosis

Tes selorogis mendiagnosis penyakit seperti *Sexually transmitted disease* (AIDS), *Toxoplasma*, *Hepatitis*, dsb. Anti-HIV, HBsAg
4. Untuk **Pengobatan**
 - a. Untuk terapi sel tumor dengan menitipkan obat sitotoksik pada molekul MAB. Dengan metode ini obat langsung tertuju pada sel-sel tumor yang berbahaya dan obat tidak merusak sel-sel tubuh lainnya yang sehat.
 - b. Koreksi ketergantungan obat

- c. Deteksi metastasis tumor
- d. Mengurangi resiko yang berkaitan dengan transplantasi sumsum tulang.

Kelebihan MAb

- Peka (sensitivitas)
- Khas (spesifitas)
- Akurat.

Kegunaan antibodi monoklonal

Kegunaan antibodi monoklonal bagi kepentingan manusia antara lain:

1. Terapi:

Oleh karena antibodi monoklonal memiliki spesifitas tinggi, maka pada gilirannya nanti dapat dititipi obat-obatan tertentu dengan tujuan langsung pada antigen yang spesifik. Keuntungan cara ini obat langsung tertuju pada sel target sehingga tidak meracuni sel lainnya.

2. Diagnosis:

Saat ini telah banyak diterapkan cara diagnosis penyakit dengan menggunakan antibodi monoklonal karena ketelitiannya sangat tinggi.

- a. Uji **kehamilan** dengan hambatan aglutinasi menggunakan anti- β hCG: partikel latek + anti- β hCG + urine: ? jika tidak menggumpal berarti positif.
- b. Uji golongan darah ABO: dengan serum anti-A dan serum anti-B, jika darah diberi anti-A menggumpal berarti memiliki aglutinogen A, jika anti-B menggumpal berarti memiliki aglutinogen B.
- c. Uji serum: misalnya untuk mendiagnosa apakah seseorang pernah mengidap virus HIV (*human immunodeficiency virus*) penyebab penyakit AIDS (*Acquired Immuno Deficiency Syndrome*) dengan cara mengambil serum kemudian diperiksa dengan menggunakan teknik ELISA.

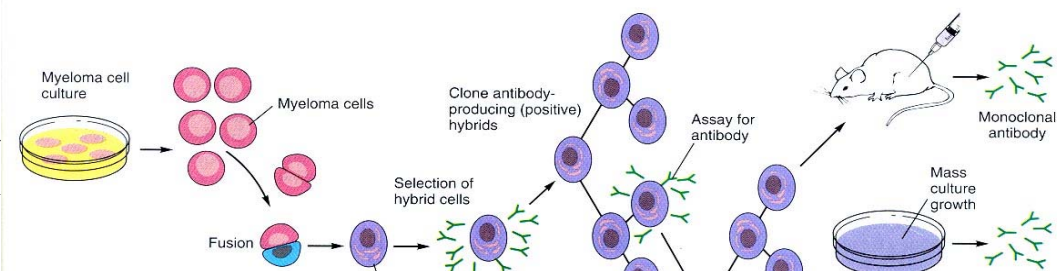
3. Penelitian:

Antibodi monoklonal telah banyak dipergunakan untuk kepentingan penelitian misalnya dengan teknik: ELISA (**enzyme linkage immunosorbent assay**), untuk mengetahui suatu antibodi dalam serum dengan teknik Elisa dilakukan dengan menggunakan antigen yang telah diketahui kemudian ditambahkan antibodi spesifik antispesies yang telah dilabel dengan enzim dan ditambahkan substrat hasilnya berupa perubahan warna yang intensitasnya proporsional dengan kadar antibodi.

- a. **RIA (radioimmuno assay)** dapat digunakan untuk mengetahui karakteristik protein integral pada membran sel.
- b. **FAT (fluorescent antibody technique)** atau disebut uji imunofluoresen yaitu untuk mengetahui adanya suatu antigen dengan menggunakan antibodi yang telah dilabel dengan zat fluoresen apabila ada interaksi antigen antibodi, maka jika disinari dengan ultraviolet akan berpendar.

The production of monoclonal antibodies.

These are antibodies produced by the progeny of a single B lymphocyte, so that all of the antibodies are directed against a specific antigen.

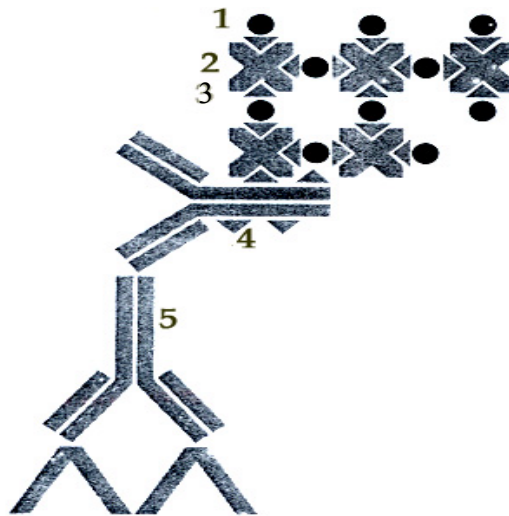


Gambar 1. Skema produksi antibodi-monoklonal (Sumber: Boenisch, 1989).

- 1) ELISA (*enzyme linkage immunosorbent assay*), atau disebut EIA (*enzymeimmunoassay*) merupakan salah satu penerapan pemanfaatan MAb. Pemanfaatan EIA dalam riset antara lain untuk pengukuran kadar hormon progesteron (P) dan 17β -estradiol (E_2) dalam medium yang diproduksi oleh kultur sel dalam kadar yang sangat sedikit. Prinsip kerja EIA berdasarkan pada kompetisi antara P atau E_2 bebas dengan P atau E_2 terikat pada molekul asetilkolinesterase (traser P atau E_2). Konsentrasi traser P atau E_2 konstan sedangkan konsentrasi P atau E_2 bebas bervariasi, sehingga jumlah traser P atau E_2 yang dapat berikatan dengan antiserum berbanding terbalik dengan konsentrasi P atau E_2 bebas. Progesteron atau E_2 bebas maupun yang terikat pada traser berikatan dengan antibodi monoklonal anti-P atau anti- E_2 yang telah ditempelkan pada dinding sumuran. Reagen yang tak terikat pada sumuran dicuci, kemudian ditambahkan reagen Elman (mengandung substrat asetilkolinesterase) sehingga timbul warna kuning yang dapat dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm. Interpretasi hasil berbanding terbalik artinya semakin tinggi ikatan Ab berlabel enzim dengan hormon berarti semakin kecil jumlah hormon dalam sampel.
- 2) Metode *radioimmunoassay* (RIA) semenjak diperkenalkan oleh Yalow dan Berson pada tahun 1964 (Yalow, 1998: 1456), telah berkembang menjadi metode baku terpilih yang banyak dipakai untuk mengukur kadar suatu zat dalam cairan tubuh seperti: hormon, dan untuk mengetahui karakteristik protein integral pada membran sel. Saat ini, RIA telah dikembangkan untuk semua jenis hormon: polipeptida, steroid, dan tironin dan terbukti memiliki memiliki sifat: peka (*sensitivity*), akurat (*precision*), dan khas (*specificity*). Oleh karena pertimbangan keunggulan tersebut, maka *radioimmunoassay* maupun *nonradioactiveimmunoassay* menjadi metode yang banyak dipakai untuk mengukur kadar hormon. Prinsip kerja RIA berdasarkan kompetisi antara P bebas dengan P terikat pada radioisotop. Antibodi anti-P yang telah dilapiskan pada tabung berikatan secara kompetitif dengan P sampel dan P berlabel radioisotop I^{125} (Biomedical Inc., Carson, USA). Konsentrasi P berlabel radioisotop konstan sedangkan konsentrasi P bebas bervariasi, sehingga jumlah P berlabel yang berikatan dengan antibodi anti-P pada dinding tabung berbanding terbalik dengan konsentrasi P bebas apabila dibaca dengan menggunakan *gamma counter*. Interpretasi hasil berbanding terbalik artinya semakin tinggi ikatan Ab berlabel dengan hormon berarti semakin kecil jumlah hormon dalam sampel. Isotope adalah atom yang sama tetapi memiliki neutron yang berbeda sehingga nomer atomnya sama tetapi

berat atomnya berbeda, seperti: I^{125} , dan I^{133} . Pemancar sinar gamma yang sering dipakai dalam RIA adalah Co^{57} , Co^{60} , I^{125} , dan I^{133} . Pemancar sinar beta yang sering dipakai dalam RIA adalah H^3 , dan Co^{60} .

- 3) Immunositokimia (*immunohistochemistry*) atau Immunositokimia (*immunocytochemistry*) telah digunakan secara luas dalam riset terutama untuk mendeteksi lokasi protein-protein fungsional dalam jaringan seperti: enzim-enzim steroidogenesis pada sel ovarium (Takayama *et al.*, 1996: 1391). Reagen terpenting dan menentukan keakuratan dan kualitas hasil immunositokimia adalah antibodi yang digunakan. Pengecatan PCNA dengan metode immunositokimia menggunakan antibodi monoklonal anti-PCNA (MAb-PCNA) dan enzim *avidin-biotin immunoperoxidase* (ABIP) terbukti sangat bermanfaat untuk mengevaluasi proporsi sel granulosa yang mengalami proliferasi. Prinsip kerja pengecatan PCNA dengan metode immunositokimia menggunakan antibodi-monoklonal *proliferating cell nuclear antigen* (MAb-PCNA) dan enzim *avidin-biotin immunoperoxidase* (ABIP) berdasarkan ikatan antara antigen spesifik (PCNA) dengan antibodi primer (MAb-PCNA) yang diikat dengan antibodi sekunder yang bersifat polivalen dan dikonjugasikan dengan biotin (**Gambar 2**). Biotin pada antibodi sekunder berikatan dengan enzim *streptavidin* berlabel (telah dikonjugasikan dengan enzim *horseradish peroxidase*). Penambahan substrat enzim dan kromogen (AEC) memberi warna merah kecoklatan pada letak ikatan antibodi dan antigen jaringan.



Gambar 2. Skema prinsip kerja metode immunositokimia dengan menggunakan MAb-PCNA dan enzim ABIP. (1) enzim streptavidin, (2) enzim *horseradish peroxidase*, (3) biotin, (4) antibodi sekunder berlabel biotin, dan (5) antibodi primer PCNA (Sumber: Boenisch, 1989).

47. Molekul antibodi atau immunoglobulin (Ig) merupakan molekul glikoprotein yang tersusun atas asam amino dan karbohidrat yang secara alami dihasilkan oleh

- ...
- | | |
|-------------------|------------------|
| A. Sel limfosit B | B. Sel makrofage |
| C. Sel hybridoma | D. Sel Myeloma |

48. Pada hakekatnya produksi antibodi monoklonal mengikuti prinsip teori seleksi klonal dengan memanfaatkan sel yang memiliki sifat tumbuh dengan cepat yang diperoleh sel ...
- A. Hapten
B. Limpa mencit (*mice*)
C. Limfosit B
D. Myeloma
49. Untuk menyeleksi sel hibrid yang dihasilkan dari proses penyilangan (fusi) digunakan ...
- A. Medium HAT
B. Kultur sel sekunder
C. Disuntikkan ke mencit (*mice*)
D. Bioassay
50. Antibodi monoklonal memiliki spesifitas dan sensitivitas yang sangat tinggi. Oleh karena itu, kontribusi MAb telah dapat dirasakan manfaatnya dalam dunia riset (*research*) antara lain dalam teknik ... KECUALI ...
- A. *Enzymeimmunoassay* (EIA)
B. *Radioimmunoassay* (RIA)
C. Immunositokimia
D. Bioassay
51. Polyethylene glicol (PEG) digunakan untuk ...
- A. Fusi sel
B. Seleksi sel hibrid
C. Kloning
D. Preservasi sel hibrid
52. Tes kehamilan dengan menggunakan antiserum β -hCG memiliki hasil yang sangat akurat. Hal ini merupakan bentuk penggunaan MAB untuk ...
- A. Uji Klinis
C. Terapi gena pada sel embrional
D. Koreksi kelainan gen
53. Penemuan-penemuan baru dibidang imunologi telah berhasil diproduksi antibodi-monoklonal (MAb) secara massal dengan metode klonasi, karena MAB memiliki kelebihan antara lain ... KECUALI
- A. Peka (sensitivitas)
B. Khas (spesifitas)
C. Akurat
D. Aseptik

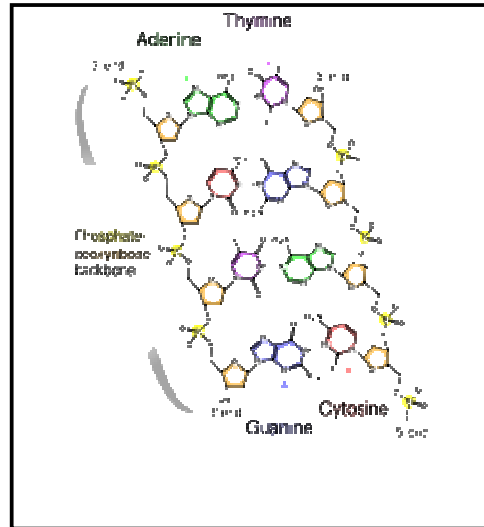
DAFTAR PUSTAKA

- Anonim (-). *Manual of Progesterone Enzyme Immunoassay Kit*. USA: Cayman Chemical Company.
- (1995). *Instruction Manual OmniTags: Universal Streptavidin/Biotin Affinity Immunostaining Systems*. USA: Lipshaw.
- Artama, W.T. (1990). *Teknik Hibridoma untuk Porduksi Antibodi Monoklonal*. Makalah Kursus Immuno-bioteknologi. Yogyakarta: PAU UGM.
- Boenisch, T. (1989). Staining Methods. Dalam: Nais S.J., (ed.): *Immunochemical Staining Methods*. USA: Dako Corps.
- Heru Nurcahyo (1997). Strategi Pengembangan Sumber Daya Manusia Berorientasi pada Penguasaan Bioteknologi *Cakrawala Pendidikan*. Edisi Khusus Dies Mei, 1997.

- , & Soejono, S.K. (2001). Pengaruh Curcumin dan Pentagamavunon-0 (PGV0) terhadap Steroidogenesis yang Dihasilkan oleh Kultur Sel Granulosa Berbagai Ukuran Folikel. *Mediagama*. Vol. III, No. 3. Hal.: 1-11.
- Freshney, R.I. (1990). *Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique Second Edition*. New York: John Wiley and Sons, Inc. Publication. Hal 284.
- Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. (1988). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Pringgo Soedigdo (1992). Menyiapkan Para Ahli Biologi Guna Dapat Ikut dalam Pembangunan Bioteknologi di Indonesia. *Makalah Seminar Biologi Molekuler 1995*. Bandung: Kerjasama ITB dan Dirjen Dikti.
- Roitt, I.M. (1990). *Pokok-pokok Ilmu Kekebalan*. P.T. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Shupnik, M.A. (1999). Introduction to Molecular Biology. In: Fauser, B.C.J.M., Rutherford, A.J., Strauss, III., J.F., and Van Steirteghem, A. (eds.) *Molecular Biology in Reproductive Medicine*. The Parthenon Publishing Group.
- Takayama, K., Fukaya, T., Sasano, H., Funayama, Y., Suzuki, T., Takaya, R., Wada, Y., and Yajima, A. (1996). Immunohistochemical Study of Steroidogenesis and Cell Proliferation in Polycystic Ovarian Syndrome. *Hum. Reprod.* Vol. 11, No.7. pp.: 1387-92.
- Yalow, R.S. (1998). Radioimmunoassay of Hormones. In: Wilson, J.D., & Foster, D.W. (eds.) *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th.ed. W.B. Saunders Company.

Bab 6

Teknologi DNA Rekombinan (TDR)



Gambar 1.1. Kapang, sebagai representasi jamur multiseluler

Pada bab ini akan dipelajari tentang:

- Pengertian fermentasi
- Kultivasi mikroba
- Medium kultur
- Bioreaktor
- Proses *downstream*
- Aplikasi fermentasi dalam produksi minuman dan makanan

Teknologi transgenik bertujuan untuk mengubah sifat alami suatu individu menjadi sifat yang dikehendaki oleh manusia. Dengan demikian, istilah transgenik digunakan untuk menyebut suatu individu yang telah mengalami perubahan gena aslinya. Sebagai contoh; bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) yang hidup simbiotik dalam kolon manusia yang semula (aslinya) tidak dapat mensintesis hormon insulin, karena telah disisipkan

Pengertian Rekayasa Genetika

Teknologi DNA rekombinan (*recombinant DNA technology*) adalah suatu metode untuk merekayasa genetik dengan cara menyisipkan (*insert*) gena yang dikehendaki ke dalam suatu organisme. Teknologi transgenik bertujuan untuk mengubah sifat alami suatu individu menjadi sifat yang dikehendaki oleh manusia. Dengan demikian, istilah transgenik digunakan untuk menyebut suatu individu yang telah mengalami perubahan gena aslinya. Sebagai contoh; bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) yang hidup simbiotik dalam kolon manusia yang semula (aslinya) tidak dapat mensintesis hormon insulin, karena telah disisipkan gena insulin manusia, maka ia dapat menghasilkan insulin.

Setiap organisme memiliki sifat-sifat spesifik yang diwariskan dari nenek-moyangnya melalui suatu molekul yang terdapat di dalam kromosom yang disebut

gena. Ekspresi (pengejawantahan) gena tersebut akan memunculkan sifat-sifat atau gejala (fenomena) yang tampak dan dapat diamati pada suatu organisme yang disebut fenotip (*phenotype*). Gena atau informasi genetik terdapat dalam pita DNA yaitu suatu molekul yang berbentuk benang *double helix* atau tangga terpilin. Dengan demikian, gena merupakan bagian dari molekul DNA. Sebagai contoh, perbedaan sel-sel penyusun otot dan sel-sel penyusun saraf, bukan diakibatkan oleh perbedaan informasi yang terkandung dalam DNA sel-sel tersebut tetapi ditimbulkan oleh bagaimana informasi tersebut dibaca atau diterjemahkan.

Struktur Dasar Gena Manusia

Kromosom → DNA → Gena

Setiap sel memiliki informasi genetik yang terdapat di dalam inti sel tepatnya pada kromosom. Kromosom tersusun atas pita DNA yang sangat panjang. Molekul DNA pertama kali ditemukan oleh Watson dan Crick pada tahun 1953. Secara struktural, molekul DNA merupakan polimer yang tersusun atas gula ribosa, posfat, dan basa aromatik yang membentuk dua pita linear yang tersusun heliks satu sama lain. Tulang punggung tersusun atas molekul gula sederhana dan posfat, sedangkan anak tangga (*the rungs*) tersusun atas 4 macam basa atau nukleotid: adenin (A), guanin (G), cytosin (C), dan thymin (T) dengan ikatan hidrogen. Pita satu dengan lainnya bersifat komplementer artinya thymin selalu berikatan dengan adenin (T=A), dan guanin dengan cytosin (C=G) sehingga kedua pita tersebut menyerupai bayangan cermin satu dengan lainnya.

Gena adalah unit DNA yang menentukan struktur rantai peptida dalam sintesis asam amino untuk semua jenis protein. Setiap pembentukan asam amino dikode oleh tiga basa yang disebut kodon (*codon*). Ada 64 kemungkinan susunan basa berdasarkan triplet (susunan 3 basa).

Gena tertentu mengkode protein yang sangat vital bagi suatu individu, disebut *housekeeping genes*. Gena lainnya mengkode protein yang sangat spesifik. Struktur gena tersusun atas beberapa bagian yang mengkode protein, yang disebut ekson (*exon*). Ekson dipisahkan oleh sekuen DNA yang tidak mengkode protein, disebut *intervening sequences (IVSs, introns)*.

Komponen suatu gena:

1. Urutan koding; untuk setiap protein terdiri atas beberapa ratus nukleotid.
2. Sinyal translasi; untuk disampaikan ke ribosom.
3. Tempat pengenalan ribosoma: mengacu pada arah gerakan ribosoma, maka dapat dibedakan pita *up stream* dan *down stream*.
4. Sinyal transkripsi
5. Tempat pengikatan enzim polimerase dan *promoters* yang berperan mempromosi transkripsi.
6. Tempat pengaturan: untuk mengatur transkripsi, AUG pada permulaan, dan UGA pada akhir.

Dogma Sentral Ekspresi Gena

Ekspresi gen adalah proses pengejawantahan suatu gen menjadi sebuah unit asam amino (protein) melalui tahap-tahap berikut:

DNA → Transkripsi → mRNA → Translasi → Protein

3. Mekanisme transkripsi: Protein regulator (*regulatory protein*) → bagian pengatur gen (*regulatory site of gene*) → transkripsi → mRNA (*messenger Ribonucleic acid*).
4. Mekanisme translasi: mRNA → ribosoma → translasi menggunakan triplet asam amino (kodon) → protein.

Mekanisme replikasi: Pada saat sebelum pembelahan inti sel (mitosis) sel mengalami fase istirahat (interfase). Pada saat itu, tepatnya pada fase sintesis (S), DNA mengalami replikasi menjadi DNA baru yang akan dibagi pada saat mitosis.

Rekayasa Genetika

Pengetahuan mengenai struktur dan fungsi DNA secara mendalam telah diterapkan untuk kepentingan manusia melalui rekayasa genetika. Rekayasa genetika merupakan salah satu metode penting yang memberi kontribusi pada pengembangan bioteknologi modern. Salah satu ciri karakteristik bioteknologi modern adalah melibatkan rekayasa biologi (teknobiologi).

Rekayasa genetika merupakan suatu metode untuk mengubah gen atau memanipulasi gen dan kemudian memindahkan gen tersebut dari suatu organisme ke organisme lain dalam suatu spesies atau berbeda spesies. Untuk kepentingan ini, biasanya dipilih organisme yang mudah ditangani (*handling*) dan memiliki sifat pertumbuhan cepat dalam waktu singkat, sebagai contoh: bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*). Selain itu, bakteri *E. coli* juga memiliki DNA yang berada di luar kromosom yang disebut plasmid, sehingga mudah dimanipulasi.

Saat ini, rekayasa genetika telah merambah pada semua organisme yang meliputi: bakteri, tumbuhan, maupun hewan. Organisme yang telah disisipi gen dari organisme lain disebut transgenik. Organisme transgenik pada hakekatnya digunakan sebagai “pabrik hidup” untuk memproduksi sesuatu zat yang bermanfaat bagi kepentingan manusia.

Tahapan Rekayasa Genetika

Mengidentifikasi gen spesifik yang dikehendaki →
mengisolasi gen spesifik →
menyisipkan gen spesifik ke dalam DNA vektor →
mengembalikan vektor ke dalam sel hospes →
mengembang-biakan sel hospes dengan metode kultur jaringan.

Tahapan-tahapan untuk menghasilkan individu transgenik biasanya sebagai berikut:

1. Mengidentifikasi gen spesifik yang dikehendaki, misalnya: gen insulin manusia. Untuk mengidentifikasi gen spesifik yang dikehendaki diperlukan

metode-metode mutakhir bioteknologi (*current methods of biotechnology*) seperti: (1) *Polymerase chains reaction* (PCR) atau *reverse Transcription Polymerase chains reaction* (RT-PCR). (2) Hibridisasi DNA. (3) *Northern blot analysis*. dan (4) *Western blot analysis*.

2. Mengisolasi gena spesifik dengan menggunakan enzim endonuklease restriksi untuk memotong DNA yang dikehendaki pada dua ujungnya.
3. Menyisipkan gena spesifik ke dalam DNA vektor dengan menggunakan enzim ligase sehingga didapat DNA rekombinan (rDNA).
4. Mengembalikan vektor ke dalam sel hospes dengan menggunakan beberapa metode. Metode pengiriman gene ke sel Mammalia: (1) Menggunakan vektor virus. (2) Pengambilan DNA diperantarai kalsium posfat. (3) Mikroinjeksi sel telur terbuahi. (4) Fusi DNA ke sel target. (5) Elektroporasi (aliran listrik).
5. Mengembang-biakan sel hospes dengan metode kultur jaringan.

- *Polymerase chains reaction (PCR)* yaitu suatu metode yang sangat sensitif untuk memperbanyak (amplifikasi) rantai RNA menjadi DNA; tissue/cells → *extracted* → RNA/mRNA → rT-PCR → copy DNA (cDNA).
- *reverse Transcription Polymerase chains reaction (RT-PCR)* yaitu suatu metode yang sangat sensitif untuk memperbanyak (amplifikasi) rantai RNA menjadi DNA; tissue/cells → *extracted* → RNA/mRNA → rT-PCR → copy DNA (cDNA).
- Hibridisasi DNA adalah metode untuk menyeleksi sekuen DNA dengan menggunakan probes DNA untuk hibridisasi (pencangkakan) rantai DNA. Pita ganda (*double stranded, ds*) DNA secara artifisial dapat dipisahkan dengan pemanasan atau agen kimia untuk mendapatkan pita tunggal (*single stranded, ss*), disebut proses denaturasi. Dengan pendinginan dan terkontrol, pita yang terpisah dapat disatukan lagi (*reanneal*) tetapi hanya dalam sekuen komplementer.
- *Northern blot analysis* adalah metode untuk analisis sekuen asam amino messenger RNA (mRNA).
- *Western blot analysis* adalah metode untuk analisis sekuen asam amino DNA.

Bull, et al (1982) menyatakan bahwa: Istilah bioteknologi mempunyai pengertian sebagai penerapan teknik-teknik biologi, biokimia dan rekayasa dalam pengolahan bahan dengan memanfaatkan agensia jasad hidup dan komponen-komponen untuk menghasilkan barang dan jasa (Triwibowo Juwono, 2001). Secara umum, bioteknologi dapat diklafikasikan menjadi dua aras yaitu: bioteknologi konvensional dan bioteknologi modern.

Aplikasi bioteknologi sesungguhnya telah berlangsung cukup lama, dalam peradapan manusia; seperti upaya produksi antibiotik, fermentasi, alcohol, pangan dan teknologi pengolahan limbah; yang kesemuanya dapat dikelompokan ke dalam biteknologi konvensional. Tetapi mengapa nampaknya biteknologi baru saja berkembang pada kurun abad ke dua puluh ini? Karena secara implisit yangdimaksud bioteknologi adalah biteknologi modern, yang intinya adalah rekayasa genetik, dengan teknik gen kloning yang berkembang berdasar penemuan struktur dan fungsi DNA oleh Watson dan Crick.

Dalam perkembangannya, bioteknologi telah mencapai tingkat rekayasa yang lebih terarah, sehingga hasilnya dapat dikendalikan. Dengan teknik yangdikenel sebagai teknik DNA rekombinan, atau secara populer dikenal sebagai rekayasa genetik para ilmuan dapat menyambung molekul-molekul DNA yang berbeda menjadi suatu molekul DNA rekombinan yang inti prosesnya adalah “kloning gena”

Prinsip Dasar Teknologi Dna Dan Rekombinan

Dasar pemikiran yang melandasi rekayasa genetika adalah bahwa gen merupakan segmen DNA yang mengendalikan proses metabolisme di dalam sel jasad hidup aliran informasi genetic ini dari DNA ke mRNA dan kemudian ke protein. Dogma inilah yang mendasari biologi modern dalam mengembangkan rekayasa genetika sebagai titik sentral bioteknologi modern.

Perkembangan Bioteknologi:

Bioteknologi dikembangkan untuk meningkatkan nilai tambah suatu bahan dengan memanfaatkan mikroorganisme atau sel tumbuhan dan sel hewan. Contoh bioteknologi lama: pembuatan tempe, tape, roti pengomposan sampah dll. Contoh bioteknologi modern: produksi antibiotika, vaksin, monosodium glutamate, hormone insulin, zat warna insektisida dll. Perkembangan bioteknologi sangat pesat dengan adanya rekayasa genetika.

Munculnya dimensi baru pada perkembangan bioteknologi adalah perkembangan bioteknologi molekuler, melibatkan teknik-teknik khusus untuk menciptakan terobosan baru dalam peningkatan efisiensi dan ekonomi industri bioteknologi, misalnya manipulasi DNA rekombinan dan kultur jaringan.

Rekayasa genetika

Merupakan salah satu usaha untuk memanipulasikan pewarisan sifat suatu organisme. Teknik baru untuk memanipulasikan pewarisan sifat adalah: DNA rekombinan

Manipulasi DNA Murni

Setelah sampel murni DNA dibuat, langkah selanjutnya dalam eksperimen *cloning gena* adalah pembentukan molekul DNA rekombinan, yaitu molekul buatan yang terdiri dari plasmid dan fragmen DNA yang dikehendaki.

Untuk menghasilkan molekul rekombinan ini plasmid (sering disebut dengan vektor) dan DNA yang akan diklon harus dipotong pada tempat-tempat tertentu dan digabung menjadi satu dengan cara yang terkontrol.

Pemotongan dan penyambungan adalah dua contoh teknik memanipulasikan DNA. Molekul DNA dengan demikian dapat diperpendek, diperpanjang, dibuat kopi menjadi molekul RNA atau DNA baru, dimodifikasi dengan penambahan atau pengambilan gugus kimiawi tertentu. Manipulasi tersebut semua dapat dilakukan dalam tabung percobaan, memberi dasar cloning gena, penelitian dasar biokimia DNA, struktur gena dan pengaturan ekspresi gena.

Hampir semua teknik manipulasi DNA menggunakan enzim yang dimurnikan. Di dalam sel enzim-enzim ini berperan serta dalam proses-proses penting seperti replikasi dan transkripsi DNA, penghancuran DNA asing, reparasi DNA serta rekombinasi antar mol DNA yang berbeda. Manipulasi pemotongan dan penyambungan DNA dilakukan oleh enzim yang dinamakan endonuklease restriksi (untuk pemotongan) dan ligase (untuk penyambungan).

Enzim-Enzim Untuk Memanipulasikan DNA

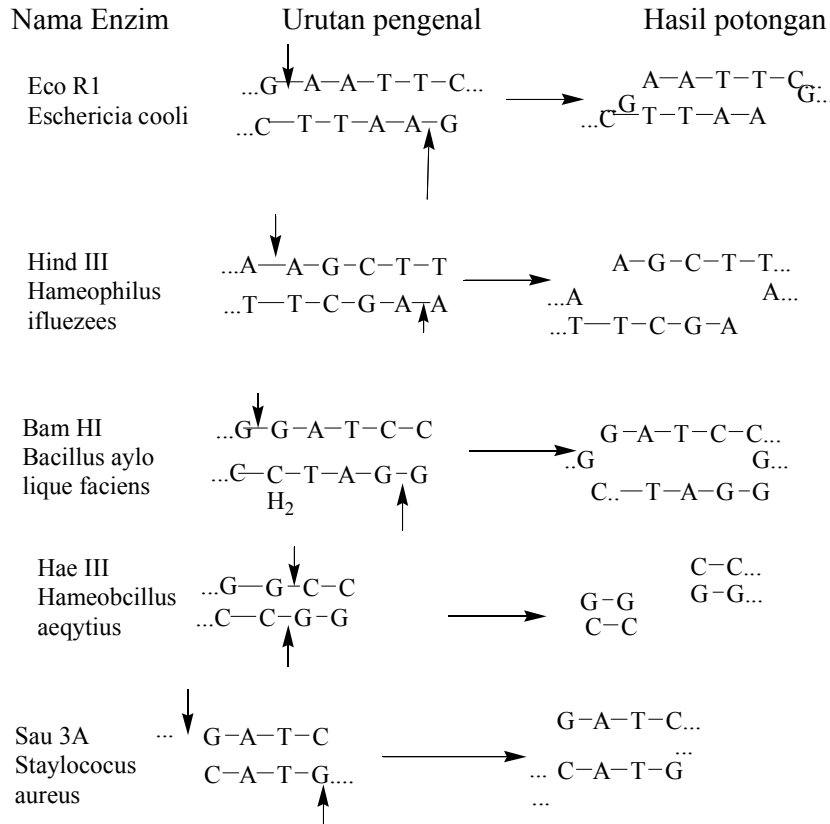
Enzim-enzim ini dapat dikelompokkan menjadi 5 golongan besar:

1. Restriksi endonuklease, enzim yang memotong, memendekkan atau mendegradasikan asam nukleat (DNA dan RNA)
2. Ligase, enzim yang menyambung fragmen asam nukleat menjadi satu pita.
3. Polymerase enzim yang membuat kopi molekul asam nukleat.

Dalam kloning gena molekuler DNA perlu dapat dipotong dengan cara yang sangat tepat dan dapat diulang. Endonuklease restriksi murni dapat digunakan untuk keperluan ini. Enzim ini ditemukan oleh W. Arber, H. Smith dan D. Nathans, mereka mendapat hadiah Nobel pada tahun 1978.

Beberapa contoh endonuklease restriksi dan urutan pengenalnya.

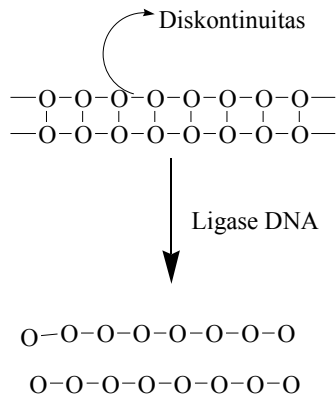
Urutan yang ditunjukkan adalah urutan pada satu untai dengan arah 5' ke 3'. Perhatikan bahwa hampir semua urutan pengenalnya adalah "*palindrom*" yaitu bila mengenai ke dua pita, maka pada pita akan terbaca sama.



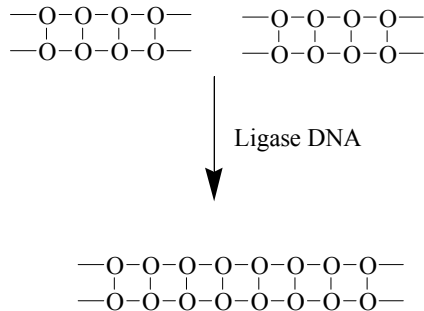
Ligase

Di dalam sel fungsinya adalah untuk memperbaiki tempat putusnya untai tunggal "*diskontinuitas*" yang terjadi pada molekul DNA untai ganda yang mungkin terjadi pada waktu replikasi DNA. Ligase DNA dari kebanyakan organisme juga akan menyambungkan dua fragmen DNA untai ganda.

Reparasi diskontinuitas



Menyambung dua molekul

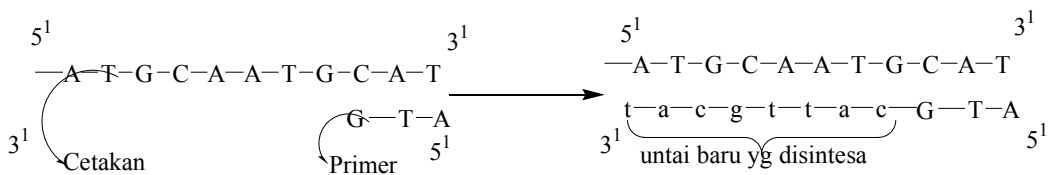


Polymerase

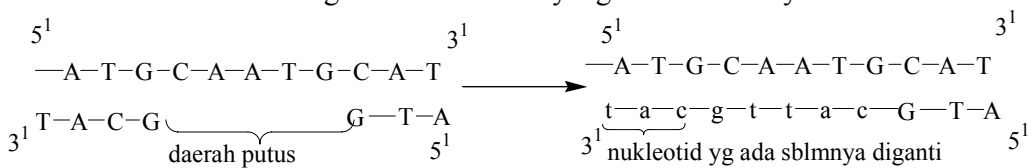
DNA polymerase adalah enzim yang mensintesis untai DNA baru yang komplementer dengan cetakan DNA (*template*) atau RNA. Kebanyakan polymerase hanya dapat berfungsi jika cetakan mempunyai daerah untai-ganda yang berlaku sebagai “primer” untuk permulaan polimerisasi.

Reaksi yang dikatalisis oleh DNA polymerase

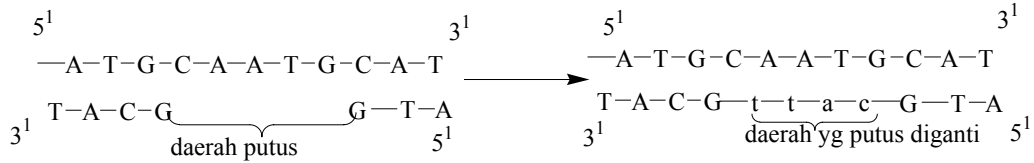
a. Reaksi dasar: untai DNA baru disintesis dengan arah 5` ke 3`



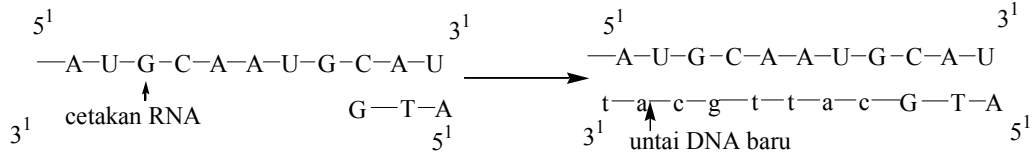
b. DNA polymerase I yang mula-mula mengisi daerah putus (niek) kemudian mensintesis untai baru dengan merusak untai yang ada sebelumnya.



c. fragmen kleonasi



d. transcriptase reversi yang menggunakan cetakan RNA

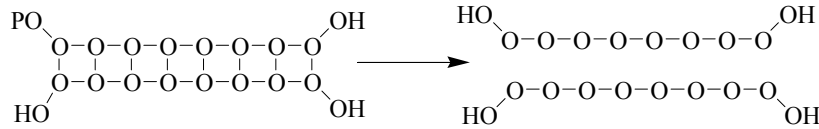


DNA polymerase I adalah contoh enzim dengan aktivitas ganda, yaitu polymerase dan degradasi DNA.

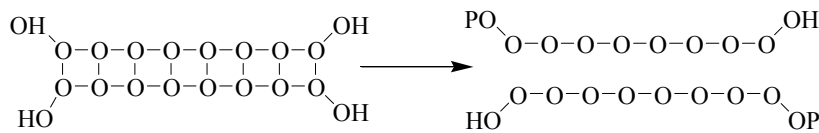
Jenis DNA polymerase yang penting dalam rekayasa genetik adalah: **transkriptase reversi**, suatu enzim yang terlibat dalam replikasi beberapa virus. Transkriptase reverse adalah khas, karena enzim ini menggunakan RNA sebagai cetakan.

Enzim-enzim yang memodifikasi DNA diantara ini yang penting adalah:

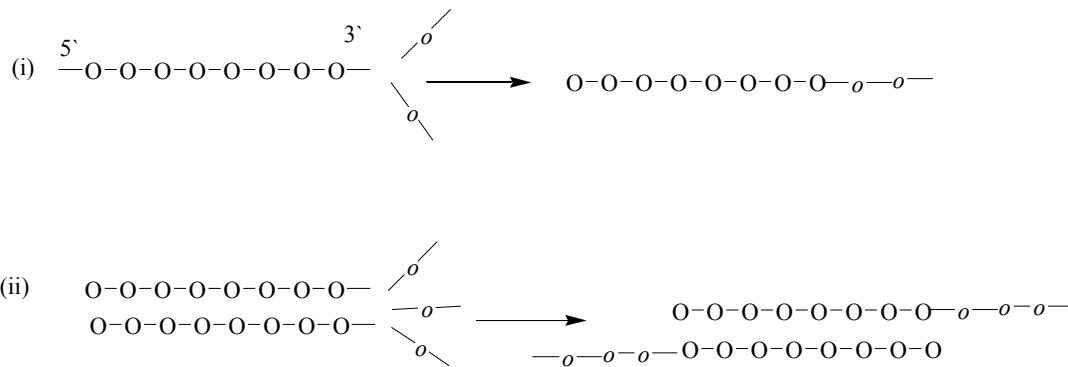
1. Posfotase alkali, yang menghilangkan gugus fosfat pada ujung 5' molekul DNA



2. Polinukleotida kinase, yang menambah gugus fosfat ujung 5' molekul DNA



3. Deosiuikleotidil traferase terminal menambahkan nukleotid pada ujung 3' polinukleotide, baik pada molekul utai tunggal (i) maupun utai ganda (ii)



Topoisomerase: mampu mengubah bentuk DNA sirkuler, namun penggunaannya dalam lingkup genetik, masih harus diteliti lebih lanjut.

Cara PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

PCR adalah suatu cara untuk membuat banyak kopi dari segmen DNA spesifik. Dengan cara demikian, jauh lebih cepat daripada logika yang menggunakan plasmid atau DNA phage.

Bahan yang dibutuhkan: DNA + DNA polymerase + Nukleotid + Primer

Bahan yang diperlukan adalah larutan dari DNA yang mengandung urutan nukleotida yang “ditargetkan” untuk dibuat kopinya. Kemudian ditambahkan DNA polymerase, semua bentuk nukleotid dan primer. Primer ini dibutuhkan untuk memulai sintesis DNA. Primer ini merupakan komplemen dari ujung akhir segmen DNA target.

Garis besar prosedur PCR:

DNA dipanaskan, untuk memisahkan pita

Didinginkan untuk memberi waktu agar primer terikat melalui ikatan hydrogen sampai akhir dari urutan target, satu primer untuk setiap pita.

DNA polymerase memperpanjang primer melalui penambahan nukleotida, menggunakan pita DNA sebagai “template”. Dalam waktu yang singkat jumlah urutan DNA target telah menjadi rangkap. Larutan dipanaskan lagi dimulai siklus yang lain dari pemisahan pita, peningkatan primer dan sintesis DNA.

Apakah cloning gena???

Langkah-langkah Dasar

1. Suatu plasmid (molekul DNA sirkuler) yang disebut dengan vektor dimurnikan dari sel bakteri (biasanya dari *E. Coli*)
2. Suatu fragmen DNA yang mengandung gena yang dikehendaki dimurnikan dari sel-sel hewan, tumbuhan maupun organisme lainnya.
3. Fragmen DNA tersebut disisipkan pada vektor plasmid untuk menghasilkan molekul DNA rekombinan
4. Vektor berlaku sebagai wahana yang membawa gena masuk sel hospes (*hospes*) biasanya berupa sel bakteri, walaupun sel-sel jenis lain dapat juga digunakan. Di dalam sel hospes vektor akan mengadakan replikasi,

- menghasilkan banyak kopi atau turunan yang identik, dari vektornya sendiri maupun gena yang dibawanya.
5. Ketika sel *hospes* membelah kopi molekul DNA rekombinan diwariskan pada anaknya dan terjadi replikasi vector selanjutnya. Setelah terjadi sejumlah besar pembelahan sel, maka dihasilkan koloni hospes yang identik. Tiap sel dalam klon mengandung satu kopi atau lebih molekul DNA rekombinan; dengan demikian dikatakan bahwa gena yang dibawa oleh molekul DNA rekombinan telah diklon.
 6. Langkah terakhir tergantung tujuan penelitian. Misalnya gen yang telah diklon dapat dipindahkan ke dalam organisme lain.

Beberapa Protein Non Bakterial yang Diproduksi Oleh Bakteri E.Coli Sebagai Hasil Kloning Gen

No	Protein	Penggunaan
1	Insulin manusia	Hormon pengatur glukosa darah, terapi diabetes
2	Somatostatin manusia	Hormon pengatur pertumbuhan
3	Somatotropin manusia	Hormon pertumbuhan bekerjasama dengan somatostatin
4	Interferon	Anti viral dan kanker

Bagaimana Dr. Ian Wilmut dan rekannya dari Institute Roslin di Edinburg Inggris mengklon domba dari sel epitel ambing seekor domba.

Wilmut pertama mengambil sel epitel ambing seekor domba jenis Finn Dorset berumur enam tahun yang sedang hamil. Kemudian sel ambing itu dikultur dalam cawan petri dengan sumber makanan yang terbatas. Karena kelaparan, sel berhenti berkembang (mematikan aktivitas gennya).

Sementara itu mereka juga mengambil sel telur yang belum dibuahi dari seekor domba jenis betina jenis *Blackface*. Inti sel telur diambil sekarang sel telur itu kosong hanya berisi organel dan plasma sel.

Selanjutnya dua sel tersebut diikatkan dengan sel yang lain. Kejutkan aliran listrik membuat kedua sel tersebut bergabung seperti dua gelembung sabun. Kejutkan aliran listrik kedua meniru energi alami (yang muncul ketika telur dibuahi sperma), sehingga sel telur dengan inti baru merasa telah dibuahi, kejadian tersebut mengubah sel telur dengan inti baru seakan-akan menjadi sel embrio. Kurang lebih enam hari kemudian, sel embrio disuntikkan ke dalam rahim seekor domba betina *Blackface* yang lainnya yang kemudian mengandung. Setelah mengandung selama 148 hari induk domba (titipan) melahirkan *Dolly*, seekor domba lain seberat 6,6 kg yang secara genetic sama dengan domba jenis Finn.

Prinsip dasar Kloning Sel Hewan

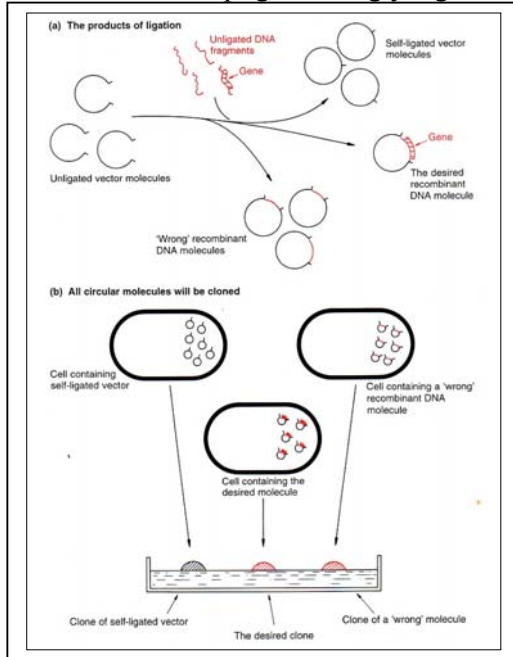
Bakteriofage dan vektor virus dapat digunakan untuk manipulasi gen bakteri, tetapi plasmid tidak ada secara alami pada sel hewan dan hanya vektor virus yang dapat dipakai.

Vektor

Vektor adalah pembawa gena ke hospes, biasanya digunakan plasmid bakteri,

atau virus.

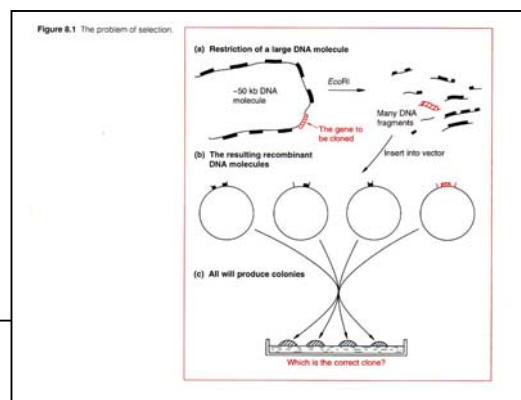
1. Plasmid sebagai vector; plasmid merupakan molekul DNA di luar kromosom (*extrachromosomal*), berbentuk sirkuler, kecil, yang dapat masuk ke bakteri lain dan bereplikasi secara otonom diluar genom hospes.
2. Virus sebagai vector; virus biasanya dipakai sebagai vektor untuk memindahkan rDNA ke sel hewan. Setelah virus dimasukkan ke dalam sel hospes, maka rDNA dilepaskan dari virus untuk kemudian masuk ke system DNA hospes dan kemudian mengalami penggandaan (replikasi) sehingga muncul kopi gene asing yang dikehendaki (kloning gena).

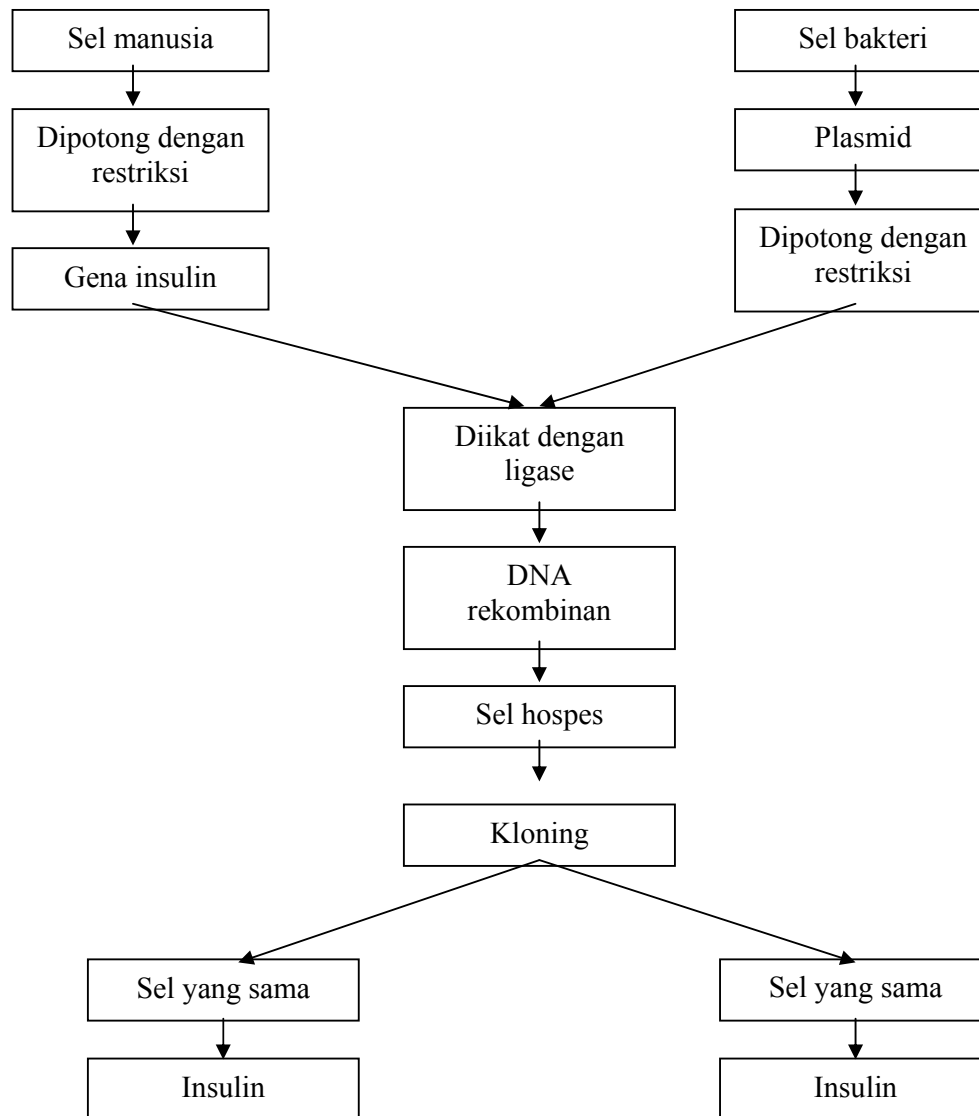


Metode Mikroinjeksi pada Sel Telur Terbuahi

Mikroinjeksi DNA ke sel telur terbuahi diikuti dengan implantasi sel telur termanipulasi ke induk titipan yang telah dipersiapkan. Pada tikus dengan induksi dapat diperoleh 40 buah ova, namun sel telur yang dapat dibuahi sekitar 20 buah.

2 pl buffer yang mengandung klon plasmid DNA diinjeksikan ke salah satu dari pronukleus sel telur terbuahi. Ada 2 buah pronukleus dari jantan dan betina, pronukleus jantan lebih besar sehingga dipilih untuk diinjeksi. Pronuklei mengalami fusi kemudian terbentuklah zygote diploid. Embryo ditumbuhkan pada medium *in vitro*, sampai pembelahan sel tertentu. Kemudian diimplantasikan ke induk titipan. Antara 3 – 10 % hewan yang berkembang mengandung kopi dari DNA eksogen yang bersatu dengan kromosomnya dan hybrid lainnya.





Gambar 2. Skema rekayasa gen untuk mendapat bakteri *E.coli* yang dapat memproduksi hormon insulin

Beberapa Produk Pemanfaatan Rekayasa genetika

1. Produksi Obat Sel Mammalia

Mikroorganisme transgenik yang memiliki sifat dapat memproduksi: (1) obat-obatan terhadap penyakit infeksi (antibiotik) seperti; penisilin, streptomysin. (2) hormon, sebagai contoh insulin untuk terapi penderita kencing manis.

2. Produksi Vaksin Rekombinan

Vaksin rekombinan yang berguna untuk pencegahan jenis penyakit tertentu sekaligus karena mengandung beberapa protein antigen sehingga dapat melindungi dari serangan berbagai penyakit menular. Masalah untuk memproduksi virus (parasit obligat intraseluler) memerlukan sel hidup, jika

menggunakan sel hewan memerlukan banyak hewan. Solusi, menggunakan kultur jaringan hewan lebih efisien. Berbagai problem dengan produksi vaksin secara konvensional di atas, terutama masalah keamanan, digunakan teknologi rekombinan untuk memproduksi vaksin yang lebih aman dan potensial. Subunit virus diproduksi oleh bakteri atau yeast (kapang). Salah satu pemanfaatan kultur sel secara komersial pertama kali sebagai media untuk memproduksi virus. Virus merupakan mikroorganisme yang bersifat sebagai parasit obligat intraseluler.

Vaksin viral dapat dibedakan menjadi 2 tipe yaitu:

3. Vaksin hidup (*live vaccine*) dari virus hidup yang kurang poten terhadap manusia.
4. Vaksin mati (*killed vaccine*) dari agen yang telah dimatikan.

Biasa digunakan kultur sel dari embrio ayam (*chicken embryo*) untuk memproduksi vaksin influenza dan *yellow fever*. Keuntungan teknologi rekombinan DNA dapat dihasilkan vaksin yang melawan virus yang tidak dapat tumbuh pada medium kultur terhadap titer tinggi untuk memberi antigen yang cukup untuk keberhasilan vaksinasi. Sekali vaksinasi dapat memberikan beberapa kekebalan sekaligus terhadap berbagai jenis virus dengan cara menyisipkan gena berbagai imunogen pada plasmid bakteri. Sebagai contoh: penyakit tetelo, Marek's, cacar ayam. Berbagai problem dengan produksi vaksin secara konvensional di atas, terutama masalah keamanan, digunakan teknologi rekombinan untuk memproduksi vaksin yang lebih aman dan potensial. Subunit virus diproduksi oleh bakteri atau yeast (kapang). Keuntungan teknologi rekombinan DNA dapat dihasilkan vaksin yang melawan virus yang tidak dapat tumbuh pada medium kultur terhadap titer tinggi untuk memberi antigen yang cukup untuk keberhasilan vaksinasi. Sekali vaksinasi dapat memberikan beberapa kekebalan sekaligus terhadap berbagai jenis virus dengan cara menyisipkan gena berbagai imunogen pada plasmid bakteri. Sebagai contoh: penyakit tetelo, Marek's, cacar ayam. Produksi zat kebal (antibodi) monoklonal untuk terapi, penelitian, dan diagnosis penyakit.

No	Jenis Virus	Sel yang digunakan Kultur
1.	Cacar air	Fibroblas embrio ayam
2	Polio (inaktif)	Sel ginjal monyet
3	Polio (aktif/hidup)	Sel diploid manusia, ginjal kera
4	Rabies	Sel diploid manusia

3. Terapi Gena

Terapi gena bertujuan untuk membetulkan kelainan metabolisme karena bawaan sejak lahir dengan cara menyisipkan gene normal ke organisme penderita. Terapi gene sel somatik dari sudut pandang sosial masih menimbulkan masalah pro dan kontra. Masih dipertimbangkan dengan alasan karena resiko dan keamanan. Untuk terapi gena dengan tujuan untuk mereparasi gena karena cacat bawaan yang menyebabkan perubahan genotipe keturunannya.

Sel diekstrasi (dikeluarkan) dari tubuh kemudian ditumbuhkan dalam medium kultur selanjutnya genenya dimanipulasi dikembalikan ke pasien (penderita) yang jaringannya diambil. Permasalahan pada penderita kelainan genetik yang dibawa sejak dalam kandungan belum ada terapi sehingga perlu

terapi gene.

- 1) Sel somatis (*somatic gene therapy*).
- 2) Sel embrional (*Germ line gene therapy*).

Seleksi dan isolasi gena → memodifikasi “*germ cells*” atau sel embrional → pemeliharaan kultur → transgenesis ke hewan

Terapi gena bertujuan untuk membetulkan kelainan metabolisme karena bawaan sejak lahir dengan cara menyisipkan gene normal ke organisme penderita. Terapi gene sel somatik dari sudut pandang sosial masih menimbulkan masalah pro dan kontra. Masih dipertimbangkan.

Biasanya tahapan meliputi; seleksi dan isolasi gena → pemeliharaan kultur → propagasi.

Sel diekstrasi (dikeluarkan) dari tubuh kemudian ditumbuhkan dalam medium kultur selanjutnya genenya dimanipulasi dikembalikan ke pasien (penderita) yang jaringannya diambil, misalnya *bone marrow* atau sel kulit, karena keduanya dapat dipelihara dalam medium kultur. Transgenesis menyebabkan perubahan genotipe keturunannya.

Teknologi Hewan Transgenik

Memodifikasi “*germ cells*” atau sel embrional, kemudian transgenesis ke hewan.

Metode pengiriman gene ke sel Mammalia:

1. Menggunakan vektor virus
2. Pengambilan DNA diperantarai kalsium posfat
3. Mikroinjeksi sel telur terbuahi
4. Fusi DNA ke sel target
5. Elektroporasi (aliran listrik)

Mikroinjeksi DNA ke sel telur terbuahi diikuti dengan implantasi sel telur termanipulasi ke induk titipan yang telah dipersiapkan. Pada tikus dengan induksi dapat diperoleh 40 buah ova, namun sel telur yang dapat dibuahi sekitar 20 buah.

2 pl buffer yang mengandung klon plasmid DNA diinjeksikan ke salah satu dari pronukleus sel telur terbuahi. Ada 2 buah pronukleus dari jantan dan betina, pronukleus jantan lebih besar sehingga dipilih untuk diinjeksi. Pronuklei mengalami fusi kemudian terbentuklah zygote diploid. Embryo ditumbuhkan pada medium *in vitro*, sampai pembelahan sel tertentu. Kemudian diimplantasikan ke induk titipan. Antara 3 – 10 % hewan yang berkembang mengandung kopi dari DNA eksogen yang bersatu dengan kromosomnya dan hybrid lainnya.

Produksi protein manusia

Ada beberapa protein manusia yang memiliki potensi sebagai obat tetapi jumlahnya terbatas. Protein mamalia untuk terapi (pengobatan), Keterbatasan suplai dan kontaminasi. Sebagai contoh: Human growth factor, Faktor pembekuan darah (Clothing Factor) VII dan IX, dan interferon B. Untuk mengatasi, salah satu alternatif

yang terpilih dengan menumbuhkan sel yang memiliki kemampuan menghasilkan protein tadi pada medium kultur dengan skala besar.

Menggunakan kultur sel fibroblas pada embryo manusia yang ditumbuhkan dalam 20 *roller bottles* tiap botol mengandung 750 mL medium. Hanya 5×10^6 unit (0,02 mg) interferon- β dihasilkan per liter medium setelah diinduksi dengan interferon dengan **PolyI:C**.

Tabel 1. Protein yang diproduksi oleh sel line mamalia

No.	Produk	Sel Line	Sumber
1	Asetilkolinesterase	BP4 1AS	Neuroblastoma tikus
2	Interferon- α	Namalwa	Darah manusia
3	Interferon- β	Flow 7000	Kuloit embryo manusia
4	Interleukin	EL4 CL14	Darah tikus
5	Aktivator plasminogen	GPK	Hepatosit marmot
6	Urokinase	Ht 1080	Fibrosarkoma manusia

Prinsip dasar Kloning Sel Hewan

Bakteriofage dan vektor virus dapat digunakan untuk memanipulasi gen bakteri, tetapi plasmid tidak ada secara alami pada sel hewan dan hanya vektor virus yang dapat dipakai.

Virus Sebagai Vektor

Produksi Obat dan vaksin Rekombinan Sel Mammalia

Isolasi DNA

Teknologi DNA rekombinan (*recombinant DNA technology*) adalah suatu metode untuk merekayasa genetik dengan cara menyisipkan (*insert*) gena yang dikehendaki ke dalam suatu organisme. Transgenik adalah suatu metode untuk. Rekayasa protein (*protein engineering*).

Isolasi DNA

- 10) *Polymerase chains reaction* (PCR) merupakan metode yang sangat sensitif untuk mendeteksi dan menganalisis sekuen asam nukleat.
- 11) RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chains reaction*) untuk memperbanyak (amplifikasi) rantai RNA menjadi copy DNA (cDNA). Prosedur sebagai berikut: tissue/cells \rightarrow *extracted* \rightarrow RNA/mRNA \rightarrow rT-PCR \rightarrow cDNA.
- 12) Hibridisasi DNA adalah metode untuk menyeleksi sekuen DNA dengan menggunakan probes DNA untuk hibridisasi (pencangkakan) rantai DNA. Pita ganda (*double stranded, ds*) DNA secara artifisial dapat dipisahkan dengan pemanasan atau agen kimia untuk mendapatkan pita tunggal (*single stranded, ss*), disebut proses denaturasi. Dengan pendinginan dan terkontrol, pita yang terpisah dapat disatukan lagi (*reanneal*) tetapi hanya dalam sekuen komplementer.

13) *Northern blot analysis* adalah metode untuk analisis sekuen asam amino messenger RNA (mRNA).

14) *Western blot analysis* adalah metode untuk analisis sekuen asam amino DNA.

Terapi Gen pada sel somatis

- ✓ Terapi gen pada sel somatis (*somatic gene therapy*) yaitu usaha mereparasi gen karena cacat bawaan dengan cara menyisipkan gen normal ke organisme penderita, sebagai contoh kelainan metabolisme. Langkah-langkah terapi gen sebagai berikut: sel sumsum tulang (*bone marrow*) atau sel kulit diekstraksi (dikeluarkan) dari tubuh pasien kemudian dipelihara dalam medium kultur untuk memperbanyak. Kemudian disisipkan gen normal ke dalam DNA sel tadi dengan rekayasa gen ini diharapkan dapat menyebabkan perubahan genotipe sel yang semula cacat. Transgenesis untuk mengembalikan rDNA tubuh pasien yang menderita cacat bawaan. Terapi gen sel somatik dari sudut pandang sosial masih menimbulkan masalah pro dan kontra. Masih dipertimbangkan dengan alasan karena risiko dan keamanan.

Terapi Gen pada sel embrional

- ✓ Terapi gen pada sel (*Germ line gene therapy*) yaitu usaha mereparasi gen karena cacat bawaan, sebagai contoh kelainan metabolisme. Langkah-langkah terapi gen sebagai berikut: misalnya sumsum tulang (*bone marrow*) atau sel kulit diambil kemudian keduanya dipelihara dalam medium kultur vektor ke dalam sel hospes dengan menggunakan metode mikroinjeksi DNA ke sel telur terbuahi diikuti dengan implantasi sel telur termanipulasi ke induk titipan yang telah dipersiapkan. Pada tikus dengan induksi dapat diperoleh 40 buah ova, namun sel telur yang dapat dibuahi sekitar 20 buah. 2 pl buffer yang mengandung klon plasmid DNA diinjeksikan ke salah satu dari pronukleus sel telur terbuahi. Ada 2 buah pronukleus dari jantan dan betina, pronukleus jantan lebih besar sehingga dipilih untuk diinjeksi. Pronuklei mengalami fusi kemudian terbentuklah zygote diploid. Embryo ditumbuhkan pada medium *in vitro*, sampai pembelahan sel tertentu. Kemudian diimplantasikan ke induk titipan. Antara 3 – 10 % hewan yang berkembang mengandung kopi dari DNA eksogen yang bersatu dengan kromosomnya dan hybrid lainnya.

Produksi Protein Manusia

Ada beberapa protein manusia yang memiliki potensi sebagai obat, tetapi persoalannya terdapat dalam jumlah yang sangat terbatas. Rekayasa protein (*protein engineering*) untuk memproduksi protein manusia dalam skala besar untuk mengatasi keterbatasan suplai dan kontaminasi. Untuk mengatasi, salah satu alternatif yang terpilih dengan menumbuhkan sel yang memiliki kemampuan menghasilkan protein tadi pada medium kultur dengan skala besar. Protein mamalia untuk terapi (pengobatan) yang berguna bagi peningkatan kesehatan seperti:

- 1) *Human growth factor*
- 2) Faktor pembekuan darah (*Clotting Factor*) VII dan IX
- 3) Interferon B.

Menggunakan kultur sel fibroblas paru embryo manusia yang ditumbuhkan dalam 20 *roller bottles* tiap botol mengandung 750 mL medium kultur. Hanya 5 x

10⁶ unit (0,02 mg) interferon-β dihasilkan per liter medium setelah diinduksi sintesis interferon dengan **PolyI:C**.

Tabel 1. Protein yang diproduksi oleh sel line mamalia

No.	Produk	Sel Line	Sumber
1	Asetilkolinesterase	BP4 1AS	Neuroblastoma tikus
2	Interferon-α	Namalwa	Darah manusia
3	Interferon-β	Flow 7000	Kulit embryo manusia
4	Interleukin	EL4 CL14	Darah tikus
5	Aktivator plasminogen	GPK	Hepatosit marmot
6	Urokinase	Ht 1080	Fibrosarkoma manusia

Teknologi tanaman transgenik

Ahli rekayasa genetik tanaman melakukan transformasi gen dengan tujuan untuk memindahkan gen yang mengatur sifat-sifat yang diinginkan dari satu organisme ke organisme lainnya. Beberapa sifat yang banyak dikembangkan untuk pembuatan tanaman transgenik misalnya (1) gen resistensi terhadap hama, penyakit dan herbisida, (2) gen kandungan protein tinggi, (3) gen resistensi terhadap stres lingkungan seperti kadar alumium tinggi ataupun kekeringan dan (4) gen yang mengekspresikan suatu ciri fenotipe yang sangat menarik seperti warna dan bentuk bunga, bentuk daun dan pohon yang eksotik.

Dalam hubungannya dengan pembuatan tanaman transgenik terdapat tiga komponen penting yaitu:

1. Isolasi gen target. Gen target yang kita inginkan misalnya gen *Bt* (gen tahan terhadap penggerek yang diisolasi dari bakteri *Bacillus thuringensis*) diekstrak kemudian dipotong dengan enzim restriksi. Gen yang sudah terpotong-potong kemudian diseleksi bagian gen mana yang menyandikan gen *Bt* dan diisolasi. Potongan gen *Bt* kemudian disisipkan ke dalam DNA sirkular (plasmid) sebagai vektor menghasilkan **molekul DNA rekombinan gen *Bt***. Vektor yang sudah mengandung molekul DNA rekombinan gen *Bt* dimasukkan kembali ke dalam sel inang yaitu bakteri untuk diperbanyak. Sel inang akan membelah membentuk progeni baru yang sudah merupakan **sel DNA rekombinan gen *Bt***.
2. Proses transfer gen ke tanaman target. Agar sel DNA rekombinan get *Bt* dapat terintegrasi pada inti sel tanaman maka diperlukan vektor yang lain lagi untuk memindahkan gen *Bt* ke dalam inti sel tanaman. Vektor tersebut adalah bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Bakteri ini menyebabkan penyakit tumor pada tanaman. Penyakit ini akan terjadi bila terdapat luka pada batang tanaman sehingga memungkinkan bakteri menyerang tanaman tersebut. Luka pada tanaman mengakibatkan tanaman mengeluarkan senyawa opine yang merangsang bakteri untuk menyerang tanaman dimana senyawa ini merupakan sumber carbon dan nitrogen dari bakteri. Akibat masuknya bakteri menyebabkan terjadinya proliferasi sel yang berlebihan sehingga menimbulkan penyakit tumor pada tanaman. Kemampuan untuk menyebabkan penyakit ini pada tanaman ternyata ada hubungannya dengan DNA sirkular (plasmid) *Ti* (*Tumor inducing plasmid*) dalam sel bakteri *A. tumefaciens*. Sifat yang menyolok pada plasmid *Ti* ialah bahwa setelah infeksi oleh *A. tumefaciens*, sebagian dari molekul DNANYa berintegrasi dalam DNA kromosom tanaman. Segmen ini dikenal dengan nama

T-DNA (*transfer DNA*). Metode kerjasama antara tanaman dan *A. tumefaciens* ini digunakan oleh ahli rekayasa genetika tanaman untuk memindahkan gen *Bt* agar dapat terintegrasi dalam sel tanaman. Oleh karena itu langkah selanjutnya adalah menyisipkan DNA rekombinan yang sudah membawa gen *Bt* ke dalam plasmid *Ti* dari *A. tumefaciens*. Setelah itu *A. tumefaciens* yang membawa gen *Bt* diinokulasikan pada tanaman. Proses inokulasi tersebut dilakukan pada tanaman target yang sedang diregenerasikan dalam kultur jaringan. Hal ini memudahkan bagi proses transfer gen *Bt* ke dalam inti jaringan tanaman dimana tanaman masih dalam proses pembelahan sel yang sangat aktif.

3. Ekspresi gen pada tanaman transgenik. Gen yang sudah dimasukkan ke dalam tanaman target dalam hal ini adalah gen *Bt* yang mengekspresikan tanaman transgenik tahan terhadap hama penggerek harus dapat diekspresikan. Untuk mengetahui apakah gen tersebut terekspresi atau tidak digunakan penanda yaitu *selectable and scoreable marker*, dimana apabila tanaman target dapat tumbuh pada media yang mengandung antibiotika atau tanaman target menampakkan warna khusus (warna biru untuk penanda gen *gus*) maka tanaman target itu adalah **tanaman transgenik**.
4. Tanaman transgenic yang memiliki sifat tahan terhadap serangan hama, atau tahan terhadap cekaman lingkungan garam dengan tujuan untuk peningkatan produksi pangan.
5. Hewan ternak transgenic yang memiliki sifat dapat memproduksi asam amino tertentu.

Isolasi Gen A36 dari Kedelai (*Glycine max* (L.) Merryl)

cDNA A36 telah berhasil diklonkan ke dalam vektor pSport1 pada situs *NotI-SalI* (Yuniati, 2000). cDNA tersebut disintesis menggunakan tehnik RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction), dengan cetakan mRNA dari gen kedelai kultivar Slamet yang diinduksi oleh cekaman 0.6 mM Aluminium (Al) pada pH4, dan telah diisolasi melalui penapisan diferensial. cDNA memiliki urutan nukleotida yang tidak lengkap karena hanya mengandung daerah penyandi saja dan ada kemungkinan merupakan gen yang terpotong. Isolasi dan karakterisasi gen A36 secara utuh dari genom kedelai sangat diperlukan untuk mengetahui urutan nukleotidanya secara lengkap (daerah penyandi, bukan penyandi, dan regulator ekspresi gen). Regulasi ekspresi dari gen tersebut yang diinduksi oleh cekaman Al akan dapat dimanfaatkan untuk perbaikan genetika tanaman kedelai sehingga menghasilkan kedelai-kedelai yang toleran terhadap cekaman Al.

Isolasi gen A36 dari pustaka genom dilakukan melalui penapisan terhadap pustaka genom kedelai kultivar Slamet dan Lumut menggunakan pelacak cDNA A36. Klon-klon bakteri yang membawa plasmid yang diduga mengandung gen A36 dari kultivar Lumut dan Slamet dianalisis untuk mengisolasi fragmen DNA yang hanya mengandung gen A36 utuh. Melalui pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI* dari klon pL4 yang berasal dari kultivar Lumut dan hibridisasi Southern, fragmen berukuran 3.6 kb yang mengandung gen A36 telah berhasil diisolasi. Fragmen tersebut telah disisipkan ke dalam vektor plasmid pSport1 membentuk plasmid rekombinan pL4E dan dimasukkan ke dalam bakteri *Escherichia coli* galur DH5 α . Verifikasi plasmid pL4E menunjukkan bahwa fragmen *EcoRI* 3.6 kb telah tersisip ke dalam pSport1.

Kata kunci: cekaman aluminium, cDNA A36, gen A36, dan plasmid pL4

Dimensi filsafat teknologi tanaman transgenik

A. Secara Ontologi;

Ontologi merupakan uraian tentang *apa* yang sedang dikaji; dalam tulisan ini produk transgenik merupakan jawaban terhadap apa yang dikaji. Sehingga secara ontologi, tanaman transgenik adalah suatu produk rekayasa genetika melalui transformasi gen dari makhluk hidup dengan spesies lain kepada makhluk hidup lain. Tanaman tersebut dihasilkan dengan tujuan menciptakan tanaman baru yang memiliki kualitas lebih baik dari tanaman yang ada sebelumnya. Alasan secara tak langsung, tanaman transgenik diciptakan atas desakan kebutuhan pangan dalam jumlah banyak dan cepat. Jadi secara ontologi, tanaman transgenik dapat dibenarkan; namun perlu kajian lebih lanjut yaitu, bagaimana tanaman transgenik diciptakan, bagaimana proses atau tahapannya, bagaimana bahan atau asal bahan tersebut; apakah sudah memenuhi kaidah ilmiah atau belum. Selain itu, apakah tanaman transgenik lebih banyak memberikan manfaat, dibanding mudlarnya bagi kehidupan manusia secara keseluruhan. Untuk dapat menjawab pertanyaan-pertanyaan tersebut, berikut adalah kajian secara epistemologi dan aksiologi terhadap tanaman transgenik.

B. Secara Epistemologi;

Epistemologi merupakan *bagaimana, metode ilmiah* terhadap apa yang sedang dikaji; dalam tulisan ini berarti bagaimana metode ilmiah dari tanaman transgenik. Berdasarkan integritas ilmiah; suatu produk harus merupakan hasil penelitian, melalui studi kelayakan melalui fasilitas uji terbatas, kemudian mengikuti uji lapangan dengan pengawasan ketat, dan analisis dampak lingkungan; dan diakhiri dengan evaluasi secara keseluruhan; Kehadiran makhluk lain dari luar ekosistem pasti sedikit banyak mengganggu ekosistem tersebut. Sehingga, setiap introduksi selayaknya dilakukan melalui kajian tentang ekologi makhluk yang akan dimasukkan; ekologi penerima makhluk, dan daya dukung lingkungannya. Lebih lanjut sebelum tanaman transgenik dipasarkan atau diterapkan kepada masyarakat secara luas harus melalui tahapan secara ketat; termasuk harus melalui analisis dampak lingkungan, dalam jangka panjang, dan beberapa generasi. Berdasarkan batasan tersebut, tanaman transgenik merupakan produk hasil penelitian yang dilakukan oleh pakar-pakar dengan rentang waktu tertentu, dan telah dilakukan melalui uji terbatas di laboratorium-laboratorium tertentu maupun lahan-lahan terbatas. Namun uji lapangan secara luas dengan pengawasan ketat sampai saat ini belum ada laporan atau kajian yang lebih jauh. Oleh karena itu, tanaman transgenik masih membutuhkan kajian lebih jauh untuk dapat diterapkan di masyarakat.

C. Secara Aksiologi;

Aksiologi merupakan uraian tentang untuk apa atau manfaat dari apa yang sedang dikaji; dalam tulisan ini, secara aksiologi berarti: Apa manfaat atau untuk apa tanaman transgenik diciptakan? Apakah manfaat langsung lebih besar dari dampaknya. Berdasarkan uraian tentang pendapat kelompok yang pro dan kontra; dapat disimpulkan bahwa tanaman transgenik memiliki manfaat sesuai tujuan awal

memenuhi kebutuhan pangan penduduk yang meningkat tajam; tetapi manfaat tersebut belum teruji akan lebih besar manfaatnya dari tingkat kerugian yang ditimbulkan; misalnya adanya penyimpangan gen-gen pada hama atau tanaman transgenik sendiri; sehingga akan berdampak lebih buruk. Kajian tentang dampak tanaman transgenik secara langsung saat ini memang belum tampak, tetapi beberapa pakar sudah memberikan “warning”. Oleh karena itu, sebaiknya pemanfaatan tanaman transgenik secara luas di masyarakat ditangguhkan sampai beberapa tahun, tetapi kajian terhadap dampaknya terus dilakukan. Sehingga, akan lebih pasti bahwa manfaat tanaman transgenik lebih besar dari dampaknya.

Secara Etika Moral

Beberapa rambu yang perlu diperhatikan dalam mengkaji apakah pemanfaatan tanaman transgenik saat ini benar secara etika moral, adalah:

1. Jangan hanya karena menguntungkan secara bisnis dan dalam jangka pendek;
2. Merubah desain alam secara tidak alami;
3. Bagaimana masyarakat yang tidak diberi informasi lengkap dapat mengambil keputusan dengan benar;
4. Jangan memberi tekanan/pemaksaan kepada petani/ konsumen agar menggunakan tanaman transgenik;
5. Jangan manipulasi data;

Dari bahasan diatas, dapat dikatakan bahwa secara moral kita harus melakukan evaluasi etika terhadap suatu teknologi baru. Dalam konteks tanaman transgenik, moral hanya mampu memberikan penilaian yang bersifat aksiologis supaya kita dapat menggunakannya untuk kebaikan. Masih banyak hal yang belum jelas dengan tanaman transgenik. Oleh karena itu, keberadaan dan pengembangannya perlu diteliti dan dikaji lebih lanjut terutama mengenai dampak negatif yang mungkin ditimbulkannya, baik mengenai keamanannya bagi kesehatan maupun bagi lingkungan. Jika hal tersebut sudah jelas dan tuntas, maka langkah selanjutnya adalah memberikan penerangan atau penyuluhan (jika perlu) tentang keunggulan dan dampak negatif tanaman transgenik kepada masyarakat secara rinci. Setelah itu, biarkan masyarakat sebagai konsumen produk tanaman transgenik yang menyaring informasi tersebut dan menentukan sikap atau pilihannya sendiri.

Kesimpulan

Teknologi transgenik merupakan hasil perkembangan rekayasa genetik yang sudah berlangsung sejak era Mendel. Iptek ini diharapkan dapat menjawab kebutuhan umat manusia dalam memenuhi kebutuhan sandang, pangan dan sebagainya. Namun iptek ini telah membangun tiga persepsi masyarakat, yaitu: persepsi yang pro, persepsi yang kontra, serta persepsi yang bersifat netral.

Keberpihakan terhadap teknologi transgenik memiliki alasan bahwa tanaman transgenik memiliki kualitas yang lebih baik dan pembudidayaannya tidak menimbulkan pencemaran yang ditimbulkan oleh penggunaan bahan-bahan kimia. Sedangkan kritik terhadap tanaman transgenik lebih banyak menekankan bahwa iptek ini memiliki lebih banyak dampak lingkungan dan ekology.

Perdebatan ini masih berlangsung di kalangan ilmuan, penentu kebijakan, petani dan masyarakat umum lainnya. Oleh karena itu masyarakat yang memiliki pandangan

yang netral menganjurkan agar penelitian tentang teknologi transgenik masih harus dikembangkan lagi lebih sistematis, serta pengembangan institusi penyuluhan yang akan menginformasikan hasilnya kepada masyarakat luas.

Saran

1. Beberapa himbauan :
 - a. moratorium pelepasan tanaman dan produk hasil rekayasa genetika ke alam, baik secara komersial atau di ladang uji coba terbuka, paling tidak untuk lima tahun;
 - b. penarikan dan pelarangan pemberian paten bagi proses kehidupan, organisme hidup, benih, garis sel dan gen;
 - c. penyelidikan publik yang komprehensif terhadap masa depan pertanian dan ketahanan pangan untuk semua orang;
2. Bukan menghentikan eksperimentasi ilmiah tetapi penghentian sementara komersialisasi produk; perkembangan ilmu lebih lanjut diperlukan untuk memastikan bahwa produk rekayasa genetika yang dilepas nantinya aman bagi lingkungan dan masyarakat;
3. Koordinasi berbagai institusi termasuk peraturan yang ketat dalam memasyarakatkan produk transgenik;
4. **BIOTEKNOLOGI PERTANIAN**
5. **Peningkatan Kualitas Bahan Tanam**
6. Padi yang berjejer rapi di sawah-sawah pedesaan bukan merupakan sesuatu yang kebetulan terjadi, tetapi merupakan hasil dari kerja keras nenek moyang kita selama beberapa abad. Selama berabad-abad manusia telah membudidayakannya dengan menyilangkan dan menyeleksi dari tanaman galur liar hingga diperoleh galur padi seperti yang ada saat ini. Dalam pekerjaan penyilangan dan penyeleksi tersebut sesungguhnya manusia telah melakukan transaksi gen (pertukaran bahan genetik) dari berbagai macam kerabat liar menjadi tanaman dengan sifat-sifat yang diinginkan, seperti produksinya tinggi, masa panen singkat, berasnya pulen, tahan wereng, dan lain-lain. Hal yang sama terjadi pada produk-produk pertanian, peternakan, dan perikanan yang merupakan hasil transaksi gen selama berabad-abad.
7. Transaksi gen dengan cara konvensional membutuhkan waktu yang relatif lama dengan hasil yang sulit diprediksikan. Bioteknologi menawarkan cara alternatif baru dalam transaksi gen dalam waktu yang relatif singkat dengan hasil yang lebih dapat diprediksikan. Metode konvensional transaksi gen dilakukan pada taraf organisme, sedangkan bioteknologi melakukan transaksi gen pada taraf sel atau molekuler. Bahkan bioteknologi mampu menembus batasan taksonomi yang sebelumnya tidak mungkin dilakukan dengan cara konvensional.
8. Peningkatan kualitas bahan tanam melalui bioteknologi berdasarkan pada empat kategori peningkatan: peningkatan kualitas pangan, resistensi terhadap hama atau penyakit, toleransi terhadap stress lingkungan, dan manajemen budidaya (Huttner, 2003). Kelompok peneliti yang diketuai oleh Dr. Ingo Potrykus telah berhasil memasukkan dan mengekspresikan dua gen penting dalam pembentukan provitamin A di dalam endosperma padi (Ye *et. al.*,

2000). Padi yang dihasilkan berwarna kuning karena mengandung β -Karoten dan dikenal dengan "Golden Rice". Rekayasa genetika ini dapat membantu mengurangi gangguan kebutaan dan gangguan kesehatan lain yang disebabkan oleh defisiensi vitamin A yang banyak terjadi di negara-negara miskin dan sedang berkembang.

9. Penggunaan pestisida oleh petani di pedesaan sudah sangat berlebihan. Residu pestisida yang tertinggal tidak hanya berbahaya bagi lingkungan, tetapi juga berbahaya bagi manusia yang memakannya. Perakitan tanaman yang resisten terhadap hama tertentu dapat mengurangi secara signifikan penggunaan pestisida dan biaya perawatan (Carpenter dan Gianessi, 2001). Contoh tanaman transgenik yang resisten terhadap hama adalah jagung Bt dan kapas Bt, yaitu tanaman yang telah memiliki gen *Cry* IA yang mematikan jenis hama tertentu.
10. Perakitan tanaman untuk mengatasi stres lingkungan saat ini telah banyak dilakukan. Sebagai contoh, untuk mengatasi cekaman Al di tanah-tanah masam saat ini tengah dirakit kedelai yang tahan cekaman Al oleh sekelompok peneliti yang diketuai Dr. M. Yusuf dari IPB. Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI) melakukan penelitian untuk merakit tanaman tebu yang tahan terhadap cekaman kekeringan.

Biofertilizer dan Biodecomposer

Daya dukung sebagian lahan pertanian, terutama di lahan-lahan marginal tergolong rendah sebagai akibat dari rendahnya bahan organik tanah. Bahan organik tanah sebagai sumber energi sangat penting artinya bagi aktivitas mikroba tanah. Sebagian dari mikroba tanah tersebut sangat berperan dalam mekanisme efisiensi pelarutan unsur hara di dalam tanah, baik hara yang berasal dari tanah maupun yang dari pupuk. Oleh karena kadar bahan organik yang rendah, maka aktivitas mikroba tersebut juga rendah. Akibatnya, pupuk kimia yang diberikan ke tanah untuk tanaman, sebagian besar terbuang oleh proses pencucian, penguapan, dan fiksasi. Oleh karena itu, apabila aktivitas mikroba tanah dan/atau bahan organik tanah ditingkatkan, maka efisiensi penyediaan unsur hara dapat ditingkatkan.

Pemanfaatan mikroba tanah untuk pertanian telah dimulai sejak abad ke 19, yaitu pemanfaatan mikroba penambat nitrogen untuk meningkatkan kandungan hara N di dalam tanah. Mikroba tanah yang dapat dimanfaatkan sebagai biofertilizer adalah mikroba pelarut hara, penambat hara, pengikat hara, dan/atau pemantap agregat. Pada dasarnya biofertilizer bukan pupuk dalam pengertian konvensional, seperti urea, SP36, atau MOP, sehingga aplikasinya tidak dapat menggantikan seluruh hara yang dibutuhkan tanaman (Goenadi *et. al.*, 1998). Aplikasi biofertilizer ke dalam tanah, dapat meningkatkan aktivitas mikroba di dalam tanah, sehingga ketersediaan hara berlangsung optimum dan dosis pupuk konvensional dapat dikurangi tanpa menimbulkan penurunan produksi tanaman dan tanah. Salah satu produk biofertilizer bernama **Emas** (*Enhancing Microbial Activity in the Soils*) telah dirakit oleh BPBPI (Paten ID 0 000 206 S), dilisensi oleh PT Bio Industri Nusantara dan digunakan di berbagai perusahaan perkebunan (BUMN dan BUMS) (Goenadi, 1999).

Kandungan bahan organik tanah dapat ditingkatkan dengan menambahkan bahan organik limbah pertanian yang telah terdekomposisi (kompos) ke dalam tanah. Proses dekomposisi memerlukan secara alami waktu yang lama (3-6 bulan). Proses dekomposisi dapat dipercepat melalui pengecilan bahan baku dan pemberian aktivator dekomposisi (*Biodecomposer*) (Goenadi, 1997). Pemanfaatan *biodecomposer* dapat mempercepat proses pengomposan menjadi 2-3 minggu. Selain itu, sebagian mikroba bahan aktif *biodecomposer* yang masih tertinggal di dalam kompos juga berperan sebagai musuh alami penyakit jamur akar atau busuk pangkal batang.

Biokontrol dan Bioremediasi

Mikroba juga telah dimanfaatkan untuk mengendalikan hama dan penyakit tanaman. Aplikasi mikroba untuk biokontrol hama dan penyakit tanaman meliputi mikroba liar yang telah diseleksi maupun mikroba yang telah mengalami rekayasa genetika. Contoh mikroba yang telah banyak dimanfaatkan untuk biokontrol adalah *Bauveria bassiana* untuk mengendalikan serangga, *Metarhizium anisopliae* untuk mengendalikan hama boktor tebu (*Dorysthenes* sp) dan boktor sengon (*Xyxtrocera festiva*), dan *Trichoderma harzianum* untuk mengendalikan penyakit tular tanah (*Gonoderma* sp, Jamur Akar Putih, dan *Phytophthora* sp). Biokontrol tidak selalu menggunakan mikroba sebagai bahan aktinya, Puslit Kopi dan Kakao di Jember saat ini tengah mengembangkan semut hitam untuk mengendalikan hama Penggerek Buah Kakao (PBK). Keuntungan pemanfaatan biokontrol untuk pertanian antara lain adalah ramah lingkungan, dan mengurangi konsumsi pestisida yang tidak ramah lingkungan.

Salah satu penyebab menurunnya kualitas lahan pertanian di Indonesia adalah banyaknya residu bahan kimia sintetik, seperti herbisida. Menurut data dari FAO (1998) penggunaan herbisida di Indonesia pada tahun 1996 sebesar 26.570 ton. Jumlah ini meningkat sebesar 395% jika dibandingkan pengguna herbisida pada tahun 1991 (6.739 ton). Upaya untuk memperbaiki kondisi lingkungan yang terkena polusi herbisida tersebut telah dilakukan. Salah satu teknologi alternatif untuk tujuan tersebut adalah melalui **bioremediasi**. Bioremediasi didefinisikan sebagai proses penguraian limbah organik/anorganik polutan secara biologi dalam kondisi terkendali. Penguraian senyawa kontaminan ini umumnya melibatkan mikroorganisme (khamir, fungi, dan bakteri). Pendekatan umum yang dilakukan untuk meningkatkan biodegradasi adalah dengan cara: (i) menggunakan mikroba *indigenous* (bioremediasi instrinsik), (ii) memodifikasi lingkungan dengan penambahan nutrisi dan aerasi (biostimulasi), (iii) penambahan mikroorganisme (bioaugmentasi) (Sulia, 2003).

Peternakan dan Perikanan

Bioteknologi juga telah melakukan beberapa terobosan penting dalam dunia peternakan dan perikanan. Salah satu keberhasilan yang beberapa waktu lalu cukup mengemparkan dunia adalah keberhasilan Dr. Ian Helmut mengkloning domba yang dikenal dengan "Dolly". Keberhasilan ini membuka peluang bagi dunia peternakan untuk mengembangbiakan tenak dengan sifat-sifat yang relatif seragam. Keberhasilan lain adalah rekayasa genetik untuk meningkatkan efisiensi

metabolisme ternak/ikan, seperti peningkatan penyerapan pakan, peningkatan kualitas daging, dan produksi susu (Huttner, 2003).

PERTANIAN ORGANIK

Permintaan masyarakat dunia akan produk pertanian organik atau pangan yang berbahan baku hasil pertanian organik menunjukkan peningkatan yang sangat pesat. Peningkatan ini seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat akan bahaya memakan makanan yang mengandung bahan-bahan sintetis/kimia. Banyak bukti menunjukkan bahwa banyak penyakit yang ditimbulkan oleh residu bahan sintetis/kimia yang terkandung di dalamnya, misalnya kanker akibat bahan-bahan karsinogenik. Mereka mau membayar lebih untuk pangan organik agar mendapatkan kesehatan yang memang mahal harganya.

Permintaan pangan organik di pasaran dunia cenderung naik. Sampai dengan tahun 2005 pangsa pasar pangan organik di negara-negara Eropa, Oseania, Amerika Serikat, Kanada, dan Jepang diperkirakan akan tumbuh rata-rata sekitar 12,5 % per tahun. Diperkirakan pada tahun 2003 mencapai \$23 – 25 Milyar dan menjadi \$29 – 31 Milyar pada tahun 2005 (Yussefi, 2003). Prospek pasar yang sangat besar ini membuka peluang bagi negara-negara berkembang seperti Indonesia untuk memproduksi pangan organik. Banyak produk-produk pertanian organik yang tidak dapat diproduksi di negara eropa dan hanya diproduksi di negara-negara tropis, misalnya : kopi, teh, kakao, rempah-rempah, buah-buahan tropis, dan sayuran tropis (FAO, 1999). Untuk meningkatkan produksi pertanian organik pemerintah Indonesia telah meluncurkan program Go Organic 2010.

Pertanian organik adalah sistem produksi pertanian yang holistik dan terpadu, yang mengoptimalkan kesehatan dan produktivitas agro-ekosistem secara alami, sehingga mampu menghasilkan pangan dan serat yang cukup, berkualitas, dan berkelanjutan. Bioteknologi pertanian berpeluang besar untuk memajukan pertanian organik di Indonesia. Produk-produk bioteknologi yang dapat digunakan dalam pertanian organik antara lain adalah perakitan bahan tanaman unggul yang memiliki produktivitas tinggi dan resisten terhadap hama/penyakit, sehingga tidak memerlukan input pestisida sintetis. Produk-produk biofertilizer dan biodecomposer yang dikombinasikan dengan pupuk hijau dapat menggantikan input pupuk kimia konvensional.

Konversi pertanian konvensional ke pertanian organik tidaklah mudah. Petani akan mengalami penurunan produksi yang cukup besar dibandingkan dengan cara konvensional. Hal ini disebabkan karena kondisi lahan pertanian yang miskin hara dan proses biologi tanah yang telah mengalami gangguan. Pemasaran produk pertanian organik ke negara konsumen utama (Amerika dan Eropa) memerlukan sertifikasi yang memerlukan proses yang tidak mudah dan mahal.

Salah satu produk pertanian organik Indonesia yang telah diakui dan memiliki pasar internasional adalah kopi dan teh. *Gayo Mountain Coffee* yang diproduksi oleh petani kopi di Aceh telah mendapatkan sertifikasi dari *Skal International* dan telah di ekspor ke negara Eropa, Amerika, dan Jepang (Winarso, 2003). Teknologi budidaya teh organik telah dikembangkan oleh peneliti di Puslit Teh dan Kina Gambung (Puslit Teh dan Kina, 2003). Pada saat ini PT Astra Agro Lestari sedang menyiapkan sistem pengelolaan kebun kelapa sawit secara organik (Palgunadi, 2003, komunikasi pribadi).

TANTANGAN APLIKASI BIOTEKNOLOGI DI PEDESAAN

Petani di pedesaan pada umumnya adalah masyarakat dengan tingkat pendidikan yang rendah dengan pola pikir yang sederhana. Petani pada umumnya agak sulit untuk menerima dan mempraktekkan teknologi baru seperti bioteknologi pertanian tanpa menyaksikan dan mempraktekkan sendiri. Aplikasi bioteknologi pada petani di pedesaan memerlukan usaha yang sungguh-sungguh dan dilakukan secara terus menerus. Ada semacam keraguan bahwa bioteknologi dapat diterapkan dengan sukses di pedesaan oleh petani. Pendapat ini tentunya dilandasi oleh asumsi bahwa bioteknologi merupakan cara atau teknik yang rumit.

Bioteknologi dapat berupa teknik yang sederhana seperti fermentasi tempe atau memerlukan teknik-teknik yang rumit dengan biaya besar. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam merakit produk bioteknologi untuk diaplikasikan di pedesaan adalah bahwa serumit apapun proses perakitannya hasil akhir dari proses tersebut harus sesederhana mungkin (*user friendly*). Petani sebagai pengguna bioteknologi dapat dengan mudah mempraktekkan. Bagi petani hal terpenting adalah bahwa aplikasi bioteknologi dapat menciptakan efisiensi dan peningkatan keuntungan usaha taninya.

Progresifitas usaha tani di pedesaan hanya mungkin berlangsung optimal jika teknologi maju yang diciptakan di perkotaan segera ditransfer ke lahan petani. Tanpa upaya-upaya yang intensif dan konsisten jurang antara kemajuan teknologi dan produktivitas pertanian di pedesaan tidak akan pernah dapat terjembatani. Kemampuan kewirausahaan berbasis teknologi (*Technopreneurship*) menjadi sangat penting untuk secara terus-menerus dibina dikalangan para petani sebagai pelaku usaha di bidang agribisnis.

RENUNGAN

Produksi pertanian di Indonesia mengalami penurunan dan tidak mencukupi kebutuhan masyarakat Indonesia. Kondisi ini disebabkan karena beberapa hal, antara lain semakin sempitnya luas lahan pertanian dan menurunnya kualitas lahan pertanian. Bioteknologi pertanian menawarkan salah satu alternatif untuk meningkatkan efisiensi pertanian di Indonesia. Aplikasi bioteknologi pertanian di pedesaan antara lain adalah peningkatan kualitas bahan tanam meliputi kualitas pangan, resisten terhadap hama dan penyakit, dan toleran terhadap cekaman lingkungan. Aplikasi biofertilizer dan biodecomposer yang berbahan aktif mikroba dapat mengurangi konsumsi pupuk konvensional tanpa menurunkan produktivitas pertanian. Selain itu aplikasi biokontrol dapat dimanfaatkan untuk mengatasi berbagai hama dan penyakit pertanian. Sejalan dengan program *Go Organic 2010* yang diluncurkan pemerintah, aplikasi bioteknologi dapat digunakan untuk mengembangkan pertanian organik di pedesaan.

Salah satu hambatan aplikasi bioteknologi di pedesaan adalah tingkat pendidikan petani yang rendah dan sulit untuk mengadopsi teknologi baru. Permasalahan ini dapat diatasi dengan melakukan sosialisasi yang intensif oleh pemerintah dan perakitannya produk bioteknologi yang sederhana dan mudah dipraktikkan oleh petani di pedesaan. Hal lain yang tidak kalah pentingnya adalah promosi terhadap nilai tambah produk organik bagi kesehatan, sehingga konsumen bersedia membayar lebih

mahal daripada produk konvensional. Dengan cara ini insentif bagi petani dapat tercipta dan merangsang bagi kegiatan usaha tani yang berkelanjutan.

F. Latihan

1. Jelaskan kedudukan gena dalam kromosom !
2. Apakah perbedaan DNA bakteri dengan DNA manusia !
3. Jelaskan secara skematis ekspresi gena !
4. Jelaskan manfaat metode *polimerase chain reaction* (PCR) dalam rekayasa genetika !
5. Jelaskan secara skematis prosedur rekayasa genetika untuk memproduksi insulin manusia !
6. Sebutkan 5 contoh produk pemanfaatan rekayasa genetika yang berguna bagi kesejahteraan manusia !

A. Pilih benar atau salah dengan melingkari huruf B jika benar dan S jika salah.

	B	S	NSA terdapat pada dinding ventrikel kiri jantung manusia
	B	S	Immunoglobulin dihasilkan oleh sel limfosit B
	B	S	Proses reabsorpsi zat-zat sisa metabolisme terjadi pada simpai Bowman
	B	S	Kekurangan yodium mengakibatkan kelainan kelenjar paratiroid
	B	S	Pembuluh darah kapiler tersusun atas selapis sel endotel
	B	S	Proses spermatogenesis pada hewan jantan dirangsang oleh FSH
	B	S	Krenasi terjadi jika sel hewan ditempatkan pada cairan hipertonis
	B	S	Gonadotropin disintesis dan disekresikan oleh hipotalamus
	B	S	Depolarisasi terjadi ketika neuron terkena rangsangan sehingga muatan listrik dalam sel meningkat pesat menjadi sekitar 30 mV
	B	S	Gas oksigen (O ₂) dimanfaatkan untuk membakar zat gula di dalam sel

B. Cocokkanlah antara pernyataan dengan pasangan yang tepat!

No		Pernyataan		Pasangan
1	D	Antigen	A	Kontraksi otot
2	A	Aktin-Miosin	B	Reseptor
3	F	Pepsin	C	Filtrasi darah
4	C	Glomerulus	D	Antibodi
5	E	Progesteron	E	Korpus luteum
6	G	Respirasi	F	Pencernaan protein di lambung
7	B	Hormon	G	Alveoli
8	H	Fagositosis	H	Makrofag
9	I	LH	I	Ovulasi
10	J	Myelin	J	Sel Schwann
			K	Kromomer

			L	Polimerase II
			N	Helikase

C. Pilihlah Salah Satu Jawaban Yang Paling Dengan Memberi Tanda Silang Pada Lembar Jawaban Yang Tersedia

- Molekul yang berperan mengkode pembentukan protein tertentu adalah ...
 - Kromosom
 - Gena
- Untuk memanipulasi pemotongan pita DNA digunakan enzim ...
 - Ligase
 - Endonuklease restriksi
 - Topoisomerase
 - Polimerase
- Penyambungan pita DNA dapat dilakukan dengan menggunakan enzim ...
 - Endonuklease restriksi
 - Helicase
 - Topoisomerase
 - Ligase
- Tahap paling awal dalam proses rekayasa genetika adalah ...
 - Isolasi gena
 - Identifikasi gena
 - Pemurnian produk
 - Kloning
- Produksi hormon insulin melalui rekayasa genetika memerlukan hospes ...
 - Sel pankreas babi
 - Bakteri *E. coli*
 - Jamur *Pinicilium*
 - Bakteri *Streptococcus*
- Berikut ini merupakan produk-produk rekayasa genetika yang bermanfaat bagi kepentingan manusia, KECUALI ...
 - Vaksin hepatitis B
 - Toksin
 - Hormon pertumbuhan
 - Antibiotik
- Organisme yang telah mengalami perubahan DNA aslinya karena telah disisipkan gena tertentu disebut ...
 - Transkripsi
 - Transgenik
- Prinsip teknologi rekayasa genetika adalah menyisipkan gen hewan vertebrata (manusia) ke dalam ...
 - Kromosom
 - Kultur jaringan
 - Gena virus
 - Hospes sebagai “pabrik hidup”
- Polymerase chains reaction* (PCR) merupakan metode yang sangat sensitif untuk mendeteksi dan menganalisis sekuen asam nukleat melalui ...
 - Perbanyakan (amplifikasi) rantai DNA
 - Pemotongan rantai DNA
 - Pemisahan *double stranded DNA* menjadi *single stranded DNA*
 - Pengrusakan pita DNA
- Metode untuk menyeleksi sekuen DNA dengan menggunakan probes DNA disebut ...
 - Hibridisasi DNA
 - RT-PCR
 - Western Blotting*
 - Northern Blotting*
- Prospek ke depan, terdapat indikasi bahwa perkembangan terapi gena semakin meningkat dengan didukung penerapan metode ...
 - Rekayasa genetika dan kultur jaringan
 - Hibridoma dan kloning
 - Rekayasa genetika dan kloning

- D. Kultur jaringan dan hibridoma
14. Bagian dari bakteri *E coli* yang diperlukan sebagai vektor untuk memproduksi hormon insulin melalui teknik rekayasa genetika adalah ...
 A. Gena insulin
 B. Inti sel
 C. Plasmid
 D. Kromosom
15. Urutan yang benar untuk menghasilkan hewan transgenik adalah ...
 1. Mengisolasi gena spesifik dengan menggunakan enzim restriksi
 2. Mengidentifikasi gena spesifik yang dikehendaki
 3. Mengembalikan vektor ke dalam sel hospes
 4. Menyisipkan gena spesifik ke dalam DNA vektor menggunakan enzim ligase
 5. Mengembang-biakan sel hospes dengan metode kultur jaringan (*cloning*).
 A. 1, 4, 3, 2, dan 5
 C. 1, 3, 4, 5, dan 2
16. Pengembalian vektor ke dalam sel hospes mammalia dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode berikut, KECUALI ...
 A. Plasmid
 B. Elektroporasi (aliran listrik)
 C. Mikroiinjeksi sel telur terbuahi.
 D. Fusi DNA ke sel target
17. Urutan langkah-langkah terapi gena pada sel somatis (*somatic gene therapy*) yang benar adalah ...
 1. sel sumsum tulang (*bone marrow*) diekstrasi (dikeluarkan) dari tubuh pasien
 2. disisipkan gen normal ke dalam DNA sel tersebut
 3. dipelihara dalam medium kultur untuk perbanyakan
 4. transgenesis untuk mengembalikan *rDNA* ke tubuh pasien
 A. 1, 2, 3, dan 4
 B. 2, 1, 3, dan 4
 C. 3, 2, 1, dan 4
 D. 4, 3, 2, dan 1
18. Produk bioteknologi yang berupa protein manusia (*human protein*) yang bermanfaat untuk pencegahan kanker adalah ...
 A. Antibiotika
 B. Hormon pertumbuhan
 C. Interferon
 D. Antibodi monoklonal
19. Terapi gena pada sel embrional (*germ line gene therapy*), pengambilan nucleus sel telur yang telah dibuahi dilakukan pada fase ...
 A. Zygote
 B. Morula
 C. Blastula
 D. Gastrula
20. Prospek ke depan, terdapat indikasi bahwa perkembangan terapi gena semakin meningkat dengan didukung penerapan metode ...
 A. Rekayasa genetika dan kultur jaringan
 B. Hibridoma dan kloning
 C. Rekayasa genetika dan kloning
 D. Kultur jaringan dan hibridoma
21. Kontribusi bioteknologi yang bermanfaat untuk pengobatan penyakit gangguan metabolisme karena factor keturunan adalah ...
 A. Rekayasa genetika
 C. Hibridoma
 D. Kloning
24. Pengembalian vektor ke dalam sel hospes mammalia dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode berikut, KECUALI ...
 A. Plasmid
 B. Elektroporasi (aliran listrik)
 C. Mikroiinjeksi sel telur terbuahi.
 D. Fusi DNA ke sel target

B. 2, 1
 D. 2, 1

B. Ter

26. Produksi hormon insulin melalui rekayasa genetika memerlukan hospes ...
 A. Sel pankreas babi
 B. Bakteri *E. coli*
 C. Jamur *Pinicilium*
 D. Bakteri *Streptococcus*
27. Langkah-langkah replikasi virus adalah: 1) Sintesis protein virus 2) Fusi membran virus dengan membran sel 3) Penyusunan protein-protein 4) Pelepasan kapsid 5) Pelepasan virus dari sel 6) Replikasi RNA dari virus. Bagaimana urutan yang benar dari langkah-langkah tersebut ...
 A. 4-2-1-6-3-3
 B. 2-6-4-5-1-3
 C. 5-6-1-3-4-2
 D. 6-4-1-3-5-2
28. Fungsi utama kromosom adalah ...
 A. Replikasi
 B. Penyimpan kode genetik
 C Sintesis protein
 D. Semua jawaban benar
29. Bahan awal untuk *Polymerase Chain reaction* (PCR) adalah...
 A. Gen
 B. mRNA
 C Kromosom
 D. DNA
30. PCR merupakan metode yang banyak digunakan untuk ...
 A. Kloning gen
 B. Deteksi polimorfisme
 C Diagnosis penyakit
 D. Semua jawaban benar
31. Tahap peleburan (*melting*) atau denaturasi terjadi peristiwa berikut .. KECUALI ...
 A. Ikatan hidrogen DNA terputus
 B. DNA menjadi berberkas tunggal
 C. Tahap PCR agak lama
 D. DNA diterjemahkan menjadi mRNA
32. Tahapan terjadinya penempelan primer pada bagian DNA template adalah ...
 A. Annealing
 B. Denaturasi
 C Elongasi
 D. Transkripsi
33. Proses elongasi diperlukan enzim khusus yaitu ...
 A. RNA Polimerase
 B. Taq-polimerase
 C Topisomerase
 D. Helikase
34. Urutan yang benar untuk menghasilkan hewan transgenik adalah ...
 6. Mengisolasi gena spesifik dengan menggunakan enzim restriksi
 7. Mengidentifikasi gena spesifik yang dikehendaki
 8. Mengembalikan vektor ke dalam sel hospes
 9. Menyisipkan gena spesifik ke dalam DNA vektor menggunakan enzim ligase
 10. Mengembang-biakan sel hospes dengan metode kultur jaringan (*cloning*).
 A. 1, 2, 3, 4, dan 5
 C. 1, 3, 4, 5, dan 2
35. Jika: 1. Urutan koding; 2. Sinyal translasi; 3. Tempat pengenalan ribosoma; 4. Sinyal transkripsi; 5. Tempat pengikatan enzim polimerase dan *promoters*; 6. AUG pada permulaan. Maka komponen suatu gena adalah ..
 A. 1, 2, 3, 4, 5, dan 6
 C. 2, 3, 4, 5, dan 6

DAFTAR PUSTAKA

Primrose, S.B. (1987). *Modern Biotechnology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Shupnik, M.A. (1999). Introduction to Molecular Biology. In: Fauser, B.C.J.M., Rutherford, A.J., Strauss, III., J.F., and Van Steirteghem, A. (eds.) *Molecular Biology in Reproductive Medicine*. The Parthenon Publishing Group.