

GSLC 1 Computational Biology

Nama : Steven Chowina

NIM : 2702295373

Kode Kelas : LP01

Judul Jurnal:

Kloning Gen pcbC dari Penicillium chrysogenum ke dalam Plasmid pPICZA untuk Pengembangan Produksi Penisilin G.

1. Apa implementasi replikasi DNA sesuai dengan referensi/jurnal?

Dalam jurnal ini, implementasi replikasi DNA diterapkan dalam teknik rekayasa genetika, yaitu melalui Amplifikasi DNA (PCR), Kloning Gen, Transformasi Sel, dan Verifikasi DNA. Proses ini dilakukan untuk memasukkan gen pcbC dari Penicillium chrysogenum ke dalam plasmid pPICZA dan selanjutnya dimasukkan ke dalam bakteri E. coli agar dapat diperbanyak.

2. Berikan keterangan tentang prosedur/ metode/ proses replica sesuai dengan referensi/jurnal!

1. Sumber Gen dan Kloning:

Gen pcbC yang menjadi target penelitian diperoleh dari jamur Penicillium chrysogenum. Gen ini merupakan penyandi enzim Isopenisilin N Sintase (IPNS), yang berperan dalam biosintesis Penisilin G. Untuk keperluan kloning, gen pcbC kemudian dimasukkan ke dalam vektor plasmid pPICZA. Plasmid ini dipilih karena merupakan vektor ekspresi yang dapat digunakan dalam sistem ekspresi genetik di dalam bakteri E. coli.

2. Amplifikasi DNA dengan PCR:

Agar jumlah DNA pcbC yang tersedia cukup untuk kloning, dilakukan amplifikasi menggunakan metode PCR (Polymerase Chain Reaction).

- Proses ini menggunakan primer spesifik, yaitu pcbC-F dan pcbC-R, yang akan menempel pada bagian awal dan akhir gen target.
- Reaksi PCR dilakukan dengan 30 siklus, yang terdiri dari denaturasi (98°C, 10 detik), annealing (58°C, 20 detik), dan elongasi (72°C, 90 detik).
- Setelah PCR selesai, hasil amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa untuk memastikan bahwa fragmen DNA pcbC yang diperoleh memiliki ukuran 996 bp, sesuai dengan target yang diharapkan.

3. Isolasi dan Digesti DNA Plasmid:

Setelah mendapatkan fragmen gen *pcbC*, langkah berikutnya adalah menyiapkan plasmid pPICZA untuk proses kloning.

- Plasmid ini diisolasi dari bakteri *E. coli* menggunakan GeneJET Plasmid Miniprep Kit.
- Agar fragmen *pcbC* dapat dimasukkan ke dalam plasmid, dilakukan pemotongan plasmid menggunakan enzim restriksi *Pml I* dan *Kpn I*.
- Hasil pemotongan ini kemudian diperiksa dengan elektroforesis gel agarosa untuk memastikan bahwa plasmid telah berhasil dipotong pada lokasi yang diinginkan.

4. Kloning Gen *pcbC* ke dalam Plasmid:

Setelah plasmid pPICZA dipotong, fragmen gen *pcbC* dimasukkan ke dalam plasmid melalui proses ligasi menggunakan enzim T4 DNA Ligase.

- Enzim ligase berfungsi untuk menyatukan ujung DNA dari plasmid dan fragmen *pcbC* sehingga terbentuk plasmid rekombinan (pPICZA-*pcbC*).
- Proses ligasi ini dilakukan dengan rasio molar 3:1 antara insert dan vektor, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C semalam untuk meningkatkan efisiensi penyisipan DNA

5. Transformasi ke dalam *E. coli* dengan Metode Heat Shock

Plasmid rekombinan yang telah mengandung gen *pcbC* kemudian dimasukkan ke dalam sel bakteri *E. coli* dengan metode heat shock.

- Bakteri yang telah dibuat kompeten terlebih dahulu diinkubasi dalam es (ice bath) untuk meningkatkan permeabilitas membrannya.
- Setelah itu, bakteri dipanaskan mendadak pada suhu 37°C selama 2 menit untuk membuka pori-pori membran, memungkinkan plasmid masuk ke dalam sel.
- Setelah proses ini, bakteri segera dikultur dalam media Luria Bertani (LB) tanpa antibiotik selama 30 menit untuk pemulihan.
- Setelah transformasi berhasil, bakteri ditumbuhkan dalam media selektif yang mengandung antibiotik Zeocin, di mana hanya bakteri yang memiliki plasmid pPICZA-*pcbC* yang dapat bertahan dan berkembang.

6. Verifikasi Kloning:

Untuk memastikan bahwa plasmid benar-benar telah mengandung gen *pcbC*, dilakukan beberapa metode verifikasi:

1. PCR Verifikasi

- Sampel plasmid rekombinan dari bakteri yang telah bertahan di media Zeocin diisolasi dan diuji kembali dengan PCR menggunakan primer *pcbC-F* dan *pcbC-R*.
- Jika kloning berhasil, elektroforesis akan menunjukkan pita DNA 996 bp, sesuai dengan ukuran gen *pcbC*.

2. Digesti Plasmid Rekombinan

- Plasmid rekombinan dicerna kembali dengan enzim *Kpn I*, lalu dianalisis menggunakan elektroforesis.

- Jika plasmid benar-benar mengandung insert gen *pcbC*, maka pola migrasi DNA akan menunjukkan perubahan ukuran dibandingkan dengan plasmid tanpa insert.

7. Sekuensing DNA dan Analisis Bioinformatika:

Setelah plasmid rekombinan diverifikasi, langkah terakhir adalah sekuensing DNA untuk memastikan bahwa urutan gen *pcbC* yang dimasukkan ke dalam plasmid benar-benar sesuai dengan sekuen aslinya.

- Proses sekuensing dilakukan dengan alat ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, dan hasilnya dibandingkan dengan database GenBank menggunakan program BLASTn.
- Analisis BLASTn menunjukkan bahwa gen *pcbC* yang dikloning memiliki 99% kesamaan dengan *P. chrysogenum* strain Wisconsin 54-1255 dan AS-P-78.
- Hasil ini mengonfirmasi bahwa fragmen DNA yang dikloning benar-benar merupakan gen *pcbC* dan tidak mengalami mutasi atau kesalahan selama proses amplifikasi dan kloning.

8. Kesimpulan:

Proses kloning gen *pcbC* dari *Penicillium chrysogenum* dalam penelitian ini mencakup beberapa langkah utama:

1. Amplifikasi gen *pcbC* menggunakan PCR untuk mendapatkan DNA dalam jumlah cukup.
2. Persiapan plasmid pPICZA melalui isolasi dan pemotongan dengan enzim restriksi.
3. Ligasi gen *pcbC* ke dalam plasmid menggunakan enzim T4 DNA Ligase.
4. Transformasi plasmid rekombinan ke dalam *E. coli* menggunakan heat shock.
5. Seleksi bakteri yang berhasil mendapatkan plasmid dengan media Zeocin.
6. Verifikasi kloning melalui PCR dan digesti enzim untuk memastikan penyisipan gen yang benar.
7. Sekuensing DNA dan analisis BLASTn untuk mengonfirmasi keberhasilan kloning.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen *pcbC* berhasil dikloning dengan tingkat kemiripan 99% terhadap strain *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 dan AS-P-78, yang membuktikan keberhasilan replikasi DNA dalam konteks kloning genetik. Teknik ini dapat menjadi dasar untuk penelitian lebih lanjut dalam rekayasa genetika dan produksi Penisilin G secara industri.

Berikut link referensi jurnal yg saya gunakan:

<https://ejournal.undip.ac.id/index.php/bioma/article/view/9424/7590>