

Prinsip dan Aplikasi BIOTEKNOLOGI



Hafsan • Zulkarnain
Hajrah • Kurnia Makmur

PRINSIP DAN APLIKASI BIOTEKNOLOGI

Hafsan
Zulkarnain
Hajrah
Kurnia Makmur

Editor:
Muhammad Khalifah Mustami

Alauddin University Press

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang:

Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini ke dalam bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penerbit

All Rights Reserved

Prinsip dan Aplikasi Bioteknologi

Penulis:

Hafsan

Zulkarnain

Hajrah

Kurnia Makmur

Editor:

Muhammad Khalifah Mustami

Cetakan I: 2021

vii + 151 hlm.; 15,5 x 23 cm

ISBN: 978-602-328-420-7

Alauddin University Press

UPT Perpustakaan UIN Alauddin

Jl. H. M. Yasin Limpo No. 36 Romangpolong,

Samata, Kabupaten Gowa

Website: <http://ebooks.uin-alauddin.ac.id/>

PENGANTAR REKTOR

Alhamdulillah wa Syukrulillah atas segala rahmat Allah SWT beserta salawat dan salam kepada Rasulnya Muhammad SAW, mengiringi aktivitas keseharian kita dalam menjalankan tugas dan tanggungjawab akademik dan peran-peran kehidupan lainnya sehari-hari.

Publikasi karya akademik adalah salah satu ruh perguruan tinggi, karena perguruan tinggi adalah ruang produksi ide dan gagasan yang harus selalu *di-update* dan *di-upgrade*. Buku adalah salah satu produk akademik yang kelahirannya, mesti diapresiasi setinggi-tingginya. Karena dibalik proses lahirnya, ada kerja keras yang menguras waktu, tenaga dan pikiran. Kerja keras dan upaya sungguh-sungguh untuk menghadirkan sebuah karya akademik, adalah bukti nyata dedikasi serta khidmat seorang insan universitas bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Sebagai kampus yang memiliki visi menjadi pusat pencerahan dan transformasi ipteks berbasis peradaban Islam, kehadiran buku terbitan Alauddin University Press ini, diharapkan menjadi sumbangan berharga bagi desiminasi ilmu pengetahuan di lingkungan kampus peradaban, sekaligus semakin memperkaya bahan bacaan bagi penguatan integrasi keilmuan.

Akhirnya, sebagai Rektor, saya mengapresiasi setinggi-tingginya atas penerbitan buku yang menjadi bagian dari Program Penerbitan 100 Buku Referensi UIN Alauddin Makassar tahun 2021 ini. Semoga membawa kemaslahatan bagi warga kampus dan masyarakat secara umum.

Gowa, 17 Agustus 2021

Rektor UIN Alauddin Makassar

Prof. H. Hamdan Juhannis, MA., Ph.D

PENGANTAR PENULIS

Maha suci Allah swt., sang maha kasih atas segala nikmat dan karunia-Nya yang tak terhingga. Kesyukuran mendalam penulis panjatkan kepada Allah SWT karena berkat ridhaNya sehingga penyusunan buku ini rampung sebagaimana yang diharapkan.

Buku ini mengenalkan pemahaman mengenai prinsip-prinsip sebagai kunci dasar dari berbagai aplikasi bioteknologi dalam berbagai aspek kehidupan manusia. Harapan terbesar atas terbitnya buku ini adalah melalui pemahaman yang utuh atas konsep dasar tersebut dapat menjadi pegangan untuk mengembangkan diri dalam upaya mengimplementasikan wawasan tentang bioteknologi, misalnya ke arah pengembangan dan aplikasi bioteknologi dalam bidang pangan, pertanian, lingkungan, dan kesehatan dan lain-lain.

Sebagai buku referensi yang masih jauh dari kesempurnaan karena penyajiannya masih banyak kekeliruan, maka penulis mengharapkan saran-saran yang konstruktif demi kesempurnaan tulisan berikutnya. Terima kasih yang mendalam penulis haturkan kepada semua pihak yang tak terkira perannya. Semoga karya ini mendatangkan faedah bagi segenap pembaca khususnya pemerhati bidang bioteknologi. Setulus-tulus permohonan maaf penulis haturkan atas segala kekurangan dan kesalahan yang terdapat dalam karya ilmiah ini. Semoga Allah swt. senantiasa melimpahkan rahmatNya dalam setiap aktivitas kita semua.

Makassar, 15 Juli 2021

Tim Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----------|
| Pengantar Rektor | I |
| Pengantar Penulis | IV |
| Daftar Isi..... | V |
| Daftar Gambar..... | VII |
| Daftar Tabel | IX |
| BAB I | 1 |
| KARAKTERISTIK BIOTEKNOLOGI | 1 |
| 1. Bioteknologi Sebagai Teknologi Inovatif | 1 |
| 2. Keamanan Produk Bioteknologi..... | 4 |
| 3. Bioteknologi Dan Perkembangan Dunia | 5 |
| BAB II | 7 |
| TEKNOLOGI FERMENTASI..... | 7 |
| 1. Fermentasi Sebagai Perintis Bioteknologi | 7 |
| 2. Media Untuk Proses Fermentasi | 8 |
| 3. Prosedur Kultur Mikroba..... | 10 |
| 4. Peralatan Kultur Mikroba..... | 12 |
| 5. Ragam Kultur Mikroba | 14 |
| 6. Kinetika Pertumbuhan Dan Laju Pertumbuhan Spesifik.. | 17 |
| 7. Isolasi Produk Mikroba..... | 20 |
| BAB III | 23 |
| TEKNOLOGI ENZIM | 23 |
| 1. Sifat Enzim | 23 |
| 2. Penerapan Pemanfaatan Enzim..... | 25 |
| 3. Seleksi Dan Pengembangan Strain Produsen Enzim..... | 31 |
| 4. Teknologi Produksi Enzim | 34 |
| BAB IV | 42 |
| TEKNOLOGI GENERATOR BIO-FUEL..... | 42 |
| 1. Pemanasan Global Dan Kritisnya Bahan Bakar Fosil | 42 |
| 2. Biodiesel..... | 51 |
| 3. Metana | 54 |
| 4. Hidrogen..... | 58 |
| 5. Microbial Fuel Cels: Bioelektrik Dari Biomassa Bakteri.... | 59 |
| 6. Prospek Masa Depan Biofuel | 63 |

| | |
|---|----------------|
| BAB V | 66 |
| TEKNOLOGI STEM-CELL..... | 66 |
| 1. Stem-Cell Sebagai Sel Master..... | 66 |
| 2. Identifikasi Stem-Cell: Pendekatan Morfologi..... | 68 |
| 3. Uji Klonal <i>In-vitro</i> | 70 |
| 4. Sel Sumsum Tulang..... | 70 |
| 5. Kultur Stem-Cell Embrio | 71 |
| 6. Pengembangan Tikus Chimera..... | 73 |
| 7. Rekayasa Sel Dan Jaringan: Aplikasi Stem-Cell..... | 74 |
| BAB VI | 77 |
| TEKNOLOGI ANTIBODI MONOKLONAL..... | 77 |
| 1. Mieloma (Plasmasitoma) | 79 |
| 2. Produksi Antibodi Monoklonal | 81 |
| BAB VII | 88 |
| TEKNOLOGI KULTUR SEL..... | 88 |
| 1. Kultur Mikroba Dan Aplikasinya | 88 |
| 2. Kultur Sel Tanaman Dan Aplikasinya | 96 |
| 3. Kultur Sel Hewan Dan Aplikasinya | 113 |
| BAB VIII | 124 |
| TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN | 124 |
| 1. Enzim Untuk Teknologi Dna Rekombinan..... | 127 |
| 2. Konstruksi Dna Rekombinan | 129 |
| 3. Dna-Lybrary | 130 |
| 4. Transgenik: Inseri Dna Rekombinan Ke Sel Inang | 133 |
| 5. Identifikasi Rekombinan | 135 |
| 6. Dna Probes..... | 136 |
| 7. Teknik Hibridisasi | 137 |
| 8. Dna Sequensing..... | 138 |
| Daftar Pustaka..... | 142 |
| Biografi Penulis..... | 149 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-----------|--|----|
| Gambar 1. | Pohon bioteknologi yang mendeskripsikan keterlibatan berbagai bidang ilmu dalam aplikasi bioteknologi sebagai teknologi inovatif (Smith, 2009)..... | 2 |
| Gambar 2. | Sketsa komponen penting fermentor laboratorium (Smith, 2009)..... | 13 |
| Gambar 3. | Diagram alir yang menggambarkan langkah-langkah berbeda yang terlibat dalam isolasi dan pemurnian metabolit mikroba (Nair, 2007)..... | 21 |
| Gambar 4. | Diagram alir untuk pemurnian contoh produk mikroba ekstraseluler berupa streptomisin oleh <i>S. griseus</i> (Nair, 2007) | 22 |
| Gambar 5. | Pengolahan pati secara enzimatis menjadi pemanis..... | 30 |
| Gambar 6. | Skema dua elektroda MFC dengan PEM (Reddy et al., 2010)..... | 59 |
| Gambar 7. | Tahapan Hematopoiesis: diferensiasi Stem-cell hematopoietik pluripotensi yang mengarah ke pembentukan sel darah matang melalui sel uni atau bi-potensi (Smith, 2009)..... | 71 |
| Gambar 8. | Pengembangan tikus chimera dengan menyuntikkan stem-cell embrionik ke dalam embrio yang sedang berkembang pada tahap blastula (Smith, 2009)..... | 73 |
| Gambar 9. | Penggunaan stem-cell embrionik sebagai terapi. (A) Pengembangan dan kultur in-vitro Stem-cell embrionik manusia dari massa sel dalam (ICM) tahap blastula embrio atau dari (B) sel germ-line sebelum meiosis. Stem-cell ini dapat berdiferensiasi dalam kultur untuk membentuk Stem-cell yang lebih terbatas seperti saraf, darah, | |

| | | |
|------------|---|-----|
| | otot, dan lain-lain. (C) Diferensiasi sel ES dalam kultur menjadi sel yang dibatasi garis keturunan. Jenis sel ES yang sama berdiferensiasi menjadi sel glial dan sel saraf dengan mengubah komponen dalam media kultur (Nair, 2007)..... | 74 |
| Gambar 10. | Terapi stem-cell. Penggunaan kultur stem-cell untuk pengembangan stem-cell garis keturunan spesifik dan penggunaannya dalam terapi transplantasi (Nair, 2007)..... | 76 |
| Gambar 11. | Representasi teknik hibridoma (Delves, 1985).... | 81 |
| Gambar 12. | Diagram alir pemrosesan hilir intraseluler insulin rekombinan sebagai contoh produk mikroba yang diproduksi oleh E. coli..... | 89 |
| Gambar 13. | (A) Sumber eksplan untuk kultur jaringan. (B) Regenerasi planlet (Smith, 2009) | 99 |
| Gambar 14. | Regenerasi planlet dari kultur kalus (Smith, 2009)..... | 100 |
| Gambar 15. | Teknik umum konstruksi molekul DNA rekombinan (Smith, 2009)..... | 130 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|----------|--|-----|
| Tabel 1. | Perkiraan jumlah produksi beberapa enzim | 25 |
| Tabel 2. | Organisme produsen enzim terpilih | 32 |
| Tabel 3. | Beberapa tanaman sumber energi biologis utama | 46 |
| Tabel 4. | Potensi bahan baku untuk produksi bahan bakar etanol | 51 |
| Tabel 5. | Beberapa mikroba penghasil produk yang dihasilkan. | 95 |
| Tabel 6. | Metabolit sekunder diproduksi dalam jumlah tinggi oleh kultur sel tumbuhan | 109 |
| Tabel 7. | Produk kultur sel hewan yang telah tersedia di pasaran | 120 |



BAB I

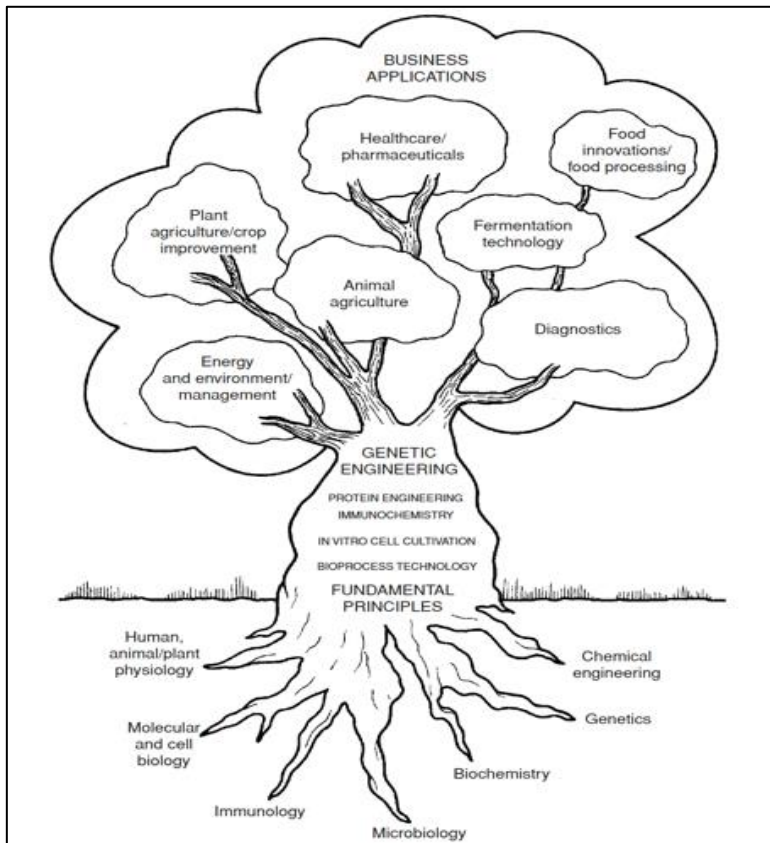
KARAKTERISTIK BIOTEKNOLOGI

1. Bioteknologi Sebagai Teknologi Inovatif

Bioteknologi merupakan teknologi pemanfaatan makhluk hidup (bakteri, fungi, virus, dan lain-lain) maupun produk dari makhluk hidup (enzim, antibiotik, alkohol dan lain-lain) dalam proses produksi untuk menghasilkan barang dan jasa. Perkembangan bioteknologi ditunjang oleh berbagai ilmu murni dan terapan, seperti biokimia, teknik kimia, komputer, biologi sel dan molekular, mikrobiologi, genetika, imunologi, fisiologi, imunologi, dan lain sebagainya sebagaimana deskripsi pada Gambar 1.1. Dengan kata lain, bioteknologi adalah teknologi inovatif dengan pemanfaatan makhluk hidup yang mengimplementasikan berbagai bidang ilmu dalam proses produksi barang dan jasa yang dikehendaki (Carstoiu et al., 2007).

Penerapan bioteknologi secara sederhana sejak lama sudah dilakukan oleh manusia. Sebagai contoh, di bidang teknologi pangan adalah pembuatan bir, roti, maupun keju yang sudah dikenal sejak abad ke-19, pemuliaan tanaman untuk menghasilkan varietas-varietas baru di bidang pertanian, serta pemuliaan dan reproduksi hewan. Di bidang medis, penerapan

bioteknologi di masa lalu dibuktikan antara lain dengan penemuan vaksin, antibiotik, dan insulin walaupun masih dalam jumlah yang terbatas akibat proses fermentasi yang tidak sempurna. Perubahan signifikan terjadi setelah penemuan bioreaktor oleh Louis Pasteur. Dengan alat ini, produksi antibiotik maupun vaksin dapat dilakukan secara massal. Pada masa ini, bioteknologi berkembang sangat pesat, terutama di negara-negara maju. Kemajuan ini ditandai dengan ditemukannya berbagai macam teknologi terutama rekayasa genetika dan ditunjang teknologi lainnya seperti kultur jaringan, pengembangan stem-cell, kloning, dan lain-lain. Teknologi-teknologi tersebut memungkinkan kita untuk memperoleh spesies dengan sifat unggul juga dapat menjadi opsi penyembuhan berbagai penyakit-penyakit genetik maupun kronis yang sulit disembuhkan, seperti kanker, AIDS dan kerusakan jaringan organ lainnya (Godbey, 2020).



Gambar 1. Pohon bioteknologi yang mendeskripsikan keterlibatan berbagai bidang ilmu dalam aplikasi bioteknologi sebagai teknologi inovatif (Smith, 2009)

Penelitian di bidang pengembangan stem-cell misalnya yang juga telah memungkinkan para penderita stroke ataupun penyakit lain seperti covid-19 yang menderita kehilangan atau kerusakan pada jaringan tubuh tertentu dapat sembuh seperti sediakala (Dauletova et al., 2021). Di bidang pangan, dengan menggunakan teknologi rekayasa genetika, kultur jaringan dan rekombinan DNA, dapat dihasilkan tanaman dengan sifat dan produk unggul karena mengandung nutrisi dan kualitas fisik yang lebih jika dibandingkan pangan ataupun tanaman biasa, serta juga lebih tahan terhadap hama maupun tekanan lingkungan dan memiliki daya simpan yang lebih panjang. Penerapan bioteknologi di masa ini juga telah diterapkan pada pelestarian lingkungan hidup dari polusi. Sebagai contoh, pada penguraian minyak bumi yang tertumpah ke laut oleh bakteri, dan penguraian zat-zat yang bersifat toksik (racun) di sungai atau laut dengan menggunakan bakteri jenis baru yang bersifat *biodegradable* (Khan, 2020).

Proses bioteknologi dapat dibedakan atas bioteknologi konvensional/tradisional dan bioteknologi modern. Bioteknologi konvensional mengkhusus pada proses bioteknologi terhadap suatu makanan/minuman atau bahan pakan dengan cara menambahkan suatu enzim atau mikroba tertentu sehingga terjadi perubahan fisik, penampilan, kandungan dan rasa akibat proses biologis dalam bahan tersebut. Contoh produk bioteknologi konvensional antara lain yogurt, keju, kecap, tempe dan antibiotik. Bioteknologi modern merupakan proses bioteknologi yang terjadi akibat rekayasa genetika baik melalui transfer DNA dari satu sel ke sel yang lain yang lebih baik pada spesies yang sama maupun antar spesies yang berbeda. Teknik dengan DNA rekombinan seperti antibodi monoklonal, kloning dan transformasi tanaman/hewan merupakan contoh bioteknologi modern (Nair, 2007).

Bioteknologi mencakup proses fermentasi, pengelolaan air dan sampah, sebagian besar teknologi pangan, dan berbagai penerapan baru mulai dari biomedis hingga daur ulang logam dari batuan mineral berkualitas rendah. Kemajuan bioteknologi tak lepas dari berbagai kontroversi yang melingkupi perkembangan teknologinya. Sebagai contoh, teknologi kloning dan transgenik terhadap tanaman pangan mendapat kecaman dari berbagai golongan. Bioteknologi secara umum berarti meningkatkan kualitas suatu organisme melalui aplikasi teknologi. Aplikasi teknologi tersebut dapat memodifikasi fungsi biologis suatu organisme dengan menambahkan gen dari organisme lain atau merekayasa gen pada organisme tersebut.

2. Keamanan Produk Bioteknologi

Prinsipnya, bioteknologi menghadirkan potensi yang sangat besar dalam berbagai aspek kehidupan seperti pemeliharaan kesehatan serta produksi, pemrosesan, dan kualitas pangan melalui rekayasa genetika tanaman, pupuk, pestisida, vaksin, berbagai spesies hewan dan ikan, bahkan implikasi dari proses bioteknologi kini telah jauh melampaui manfaat teknis yang ditawarkan sebelumnya. Namun, dalam aplikasi bioteknologi, kebijakan pemerintah akan menjadi penentu penting terhadap waktu dan anggaran yang diperlukan untuk membawa produk bioteknologi tertentu ke pasar sebelum sampai kepada masyarakat selaku konsumen.

Lembaga pemangku kebijakan dapat bertindak sebagai pembuka gerbang untuk pengembangan dan ketersediaan produk bioteknologi yang baru, tetapi juga dapat menjadi faktor penghambat yang cukup berarti untuk pengembangan industri bioteknologi. Dalam praktiknya, hambatan tersebut berasal dari tingginya biaya pengujian produk untuk memenuhi standar kelayakan, kemungkinan penundaan dan ketidakpastian dalam persetujuan peraturan, dan bahkan dapat berupa penolakan langsung terhadap produk baru atas dasar keamanan. Biaya yang sangat besar yang mungkin diperlukan untuk memastikan keamanan produk tertentu tak jarang dapat menghambat pelaksanaan penelitian baru atau bahkan membatasi pengembangan suatu produk. Penggunaan teknologi DNA rekombinan misalnya, kini telah menciptakan potensi keamanan produk bioteknologi, namun sikap publik terhadap bioteknologi umumnya masih dikaitkan dengan masalah anggapan bahaya yang akan ditimbulkan atau dibayangkan dalam aplikasi teknik manipulasi genetik. Terkait dengan manipulasi genetik ada beragam pertanyaan tentang keamanan, etika, dan kesejahteraan. Langkah konkrit yang perlu dilakukan adalah meningkatkan pemahaman masyarakat tentang teknologi inovatif tersebut. Tingginya tingkat melek ilmiah akan berimplikasi pada kemampuan masyarakat memahami masalah-masalah penting tentang aplikasi bioteknologi. Komunitas pemerhati dan penggiat bioteknologi perlu duduk, berdiskusi dan bekerja sama dengan masyarakat dan para pemangku kebijakan agar mampu menggiring opini publik yang mengarah pada implementasi bioteknologi sebagai sebuah teknologi inovatif yang solutif, bukan sebaliknya, karena mengabaikan pemahaman masyarakat akan berdampak merugikan industri produk bioteknologi (Vinet & Zhedanov, 2018).

3. Bioteknologi dan Perkembangan Dunia

Suksesnya sektor pertanian menjadi salah satu jawaban atas masalah kesenjangan kemiskinan antara negara kaya dan miskin. Di negara maju ilmu pertanian berkembang dengan baik dan telah menghasilkan berbagai produk berkualitas tinggi. Bioteknologi pertanian terus meningkatkan kualitas, varietas, dan produktifitas. Potensi spesies tanaman-tanaman baru yang berkualitas tersebut, yang ditingkatkan dengan rekayasa genetika, menemukan jalan mulus memasuki negara maju untuk mendukung produktivitas yang lebih tinggi, ketahanan yang lebih tinggi terhadap penyakit, dan lebih mudah dipasarkan. Suatu keniscayaan bahwa negara-negara maju tersebut akan semakin dianugerahi dengan pangan yang melimpah dari produk-produk bioteknologi sebagai konsekuensi penerimaan mereka terhadap produk bioteknologi. Masa depan seluruh dunia akan ketercukupan pangan diproyeksikan terjamin dengan hadirnya berbagai produk bioteknologi yang sangat menjanjikan. Di sisi lain, perkembangan bioteknologi menuntut kualitas yang tinggi dalam hal permodalan dan tenaga kerja yang terampil. Kedua aspek tersebut umumnya menjadi faktor pembatas pada sebagian besar negara berkembang, sehingga terbentang kesenjangan yang semakin besar antara bioteknologi di negara-negara industri maju dan kebutuhan negara-negara berkembang yang berbasis bioteknologi, dan inilah tantangannya.

Salah satu tujuan yang dicanangkan oleh Perserikatan Bangsa-Bangsa (PBB) adalah menargetkan pengentasan kemiskinan, peningkatan pendidikan dan kesehatan, serta kelestarian lingkungan. Bidang utama bioteknologi yang dapat berkontribusi untuk tujuan tersebut diantaranya: diagnostik molekuler, vaksin rekombinan, pengurutan genom patogen, perlindungan dan pengendalian penyakit menular seksual pada perempuan, bioremediasi, bioinformatika, peningkatan nutrisi tanaman hasil rekayasa genetika serta protein terapeutik rekombinan. Namun, harus dipahami bahwa perkembangan bioteknologi tidak hanya bergantung pada kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, tetapi juga akan tunduk pada penerimaan politik, ekonomi dan yang terpenting penerimaan publik sesuai pemahaman. Setelah melewati zaman perkembangan, bioteknologi kini telah memasuki periode keemasan sejak dikembangkan dengan pendekatan baru bernuansa rekayasa genetika yang telah membuka lebar pintu gerbang bagi perluasan produk dan jasa yang cepat dan

mendasar, sehingga masa depan yang spektakulerpun terbentang luas. (Khan, 2020; Tang, 2019; Gosal and Wani, 2018; Bhatia and Goli, 2018; Hilgartner, 2015; Gahlawat et al., 2018; Bhowmik and Patil, 2018; Vaishnav and Demain, 2017; Fao, 2011; Pandey and Teixeira, 2010). Faktanya, kini produk-produk bioteknologi hasil pengembangan dengan pendekatan molekuler mendominasi pemenuhan kebutuhan masyarakat dunia dalam berbagai aspek.

BAB II

TEKNOLOGI FERMENTASI

1. Fermentasi sebagai Perintis Bioteknologi

Bioteknologi tertua adalah teknologi bioproses atau dikenal dengan istilah fermentasi, menggunakan sel hidup atau komponen molekuler dengan mesin produksi untuk menghasilkan produk yang diinginkan berupa katalisator. Sel hidup yang paling umum digunakan adalah mikroba bersel satu, seperti ragi dan bakteri, dan komponen biomolekuler yang paling sering digunakan adalah enzim, yaitu protein yang mengkatalisasi berbagai reaksi biokimia.

Berbagai bentuk bioproses yaitu fermentasi oleh mikroba telah diimplementasikan sejak ribuan tahun silam, sekalipun tanpa disadari oleh masyarakat terdahulu. Pembuatan anggur, roti, makanan acar dan tape sejatinya menerapkan teknologi fermentasi. Pada pertengahan 1800-an, ketika mikroba ditemukan dan disadari berperan sebagai “motor atau mesin” biokimia yang bertanggung jawab atas produk yang bermanfaat, sejak itu penggunaan fermentasi mikroba melesat dengan sangat cepat. Saat ini kita sangat mengandalkan kemampuan mikroba yang sangat beragam untuk menghasilkan berbagai produk seperti antibiotik, asam amino, vitamin, pigmen, pestisida, bahan tambahan pengolahan makanan dan ragam produk lainnya. Sejalan dengan beragam formasi produk yang bermanfaat tersebut, berbagai peran lainnya yang dapat diperankan oleh mikroba dalam mengatasi limbah yang merusak lingkungan dan

kesehatan juga telah dieksplorasi, misalnya dalam proses pemurnian air, pengolahan limbah cair dan padat pada berbagai industri, bahkan penanganan dampak tumpahan minyak pada badan-badan air (Bamforth & Cook, 2019; Chisti, 2014; El-Mansi, 2018; McNeil & Harvey, 2008; Behera et al., 2019).

Teknologi bioproses atau fermentasi merupakan komponen penting dari sebagian besar proses bioteknologi konvensional maupun bioteknologi modern dan akan selalu melibatkan sel hidup (mikroba, mamalia atau tumbuhan), organel atau enzim sebagai biokatalis, dan akan bertujuan untuk menghasilkan bahan kimia dan/ atau perubahan fisik bahan biokimia yang berasal dari medianya. Agar dapat bertahan dalam pemanfaatannya pada industri tertentu, bioproses harus memiliki keunggulan dibandingkan metode produksi teknologi kimia. Dalam praktiknya, berbagai teknik bioproses telah digunakan pada skala industri karena merupakan cara yang paling praktis dalam produksi produk tertentu, misalnya vaksin dan antibiotik. Rekayasa biokimia mencakup desain bejana dan peralatan yang sesuai untuk mendukung berlangsungnya reaksi atau transformasi produk yang diharapkan. Bioproses dalam berbagai bentuknya melibatkan banyak reaksi yang dikatalisis oleh enzim yang kompleks dalam sistem seluler, dan reaksi ini sangat bergantung pada kondisi fisik dan kimiawi yang ada di lingkungan sekitarnya. Hal tersebut sangat penting karena bioproses yang diharapkan hanya akan terjadi jika semua faktor penting dipastikan sesuai kebutuhan.

Di sisi lain, aplikasi teknologi DNA rekombinan terhadap mikroba potensial pelaku fermentasi telah dikembangkan untuk memproduksi berbagai macam produk berbasis biologis termasuk insulin manusia, vaksin hepatitis B, enzim anak sapi yang digunakan dalam pembuatan keju, plastik yang dapat terurai secara hayati, dan enzim deterjen. Teknologi bioproses juga mencakup rekayasa jaringan dan serta formulasi biofarmasi.

2. Media untuk Proses Fermentasi

Seperti sistem kehidupan lainnya, mikroba juga membutuhkan sumber energi, karbon, nitrogen, oksigen, besi dan mineral lainnya, mikronutrien, dan air untuk pertumbuhan dan reproduksi. Semua nutrisi yang penting untuk pertumbuhan dan replikasi organisme mikroba tersebut disediakan dalam bentuk media yang mengandung nutrisi. Untuk kultur skala laboratorium, umumnya menggunakan komponen media yang relatif mahal, tetapi untuk

keperluan industri, produsen harus menyediakan media yang ekonomis. Media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba dapat bersifat sintetis, semi sintetis, atau sepenuhnya alami. Jika komponen nutrisi dari media tersebut tidak berasal dari alam, maka media nutrisi tersebut dikenal sebagai media sintetis, yang dapat kita sintesis di laboratorium dengan mengikuti formula tertentu, mencampurkan garam, mineral, dan sumber karbon yang dibutuhkan. Sejumlah besar media mikroba kini ada yang tersedia secara komersial, yang mengandung bermacam nutrisi lengkap sesuai kebutuhan mikroba tertentu. Media nutrisi semacam itu dikenal sebagai media semi sintetis. Nutrien Agar (NA) yang tersedia secara komersial, Trypticase Soya Broth (TSB), infus otak-jantung (Brain-Heart Infuse), ekstrak yeast, Potato Dextrose Agar (PDA), kasein, dan lain sebagainya merupakan beberapa contoh media semi-sintetik. Untuk kultur bakteri dan mikroba lain pada skala laboratorium, media sintetis atau semi-sintetik ini lebih disukai, tetapi untuk kultur skala industri media ini tidak disarankan karena pertimbangan ekonomis. Untuk tujuan komersial, media yang direkomendasikan harus murah dan tersedia sepanjang masa produksi. Uraian berikut merupakan komponen minimal yang dibutuhkan dalam suatu media mikroba untuk kultivasi mikroba di laboratorium.

Sumber karbon. Sumber karbon sederhana, pilihan dapat dijatuhkan pada jenis karbohidrat yang mudah digunakan dan mudah didapat. Gula seperti glukosa, laktosa, sukrosa, dan polisakarida kompleks seperti pati, glikogen selulosa, campuran berbagai karbohidrat, dan senyawa lain seperti bubuk biji-bijian sereal, tetes tebu, dapat digunakan sebagai sumber karbon dalam media kultur mikroba. Tujuan utama sumber karbon adalah menyediakan energi dan berperan sebagai kerangka karbon untuk sintesis berbagai senyawa biologis yang dibutuhkan mikroba.

Sumber Nitrogen. Jenis utama sumber nitrogen yang digunakan dalam media kultur adalah garam amonium, urea, ekstrak jaringan hewan, campuran berbagai asam amino, dan ekstrak jaringan tumbuhan.

Elemen mikro. Unsur-unsur yang dibutuhkan dalam jumlah kecil atau sedikit harus ditambahkan ke dalam media sebagai komposisi dalam jumlah yang dibutuhkan, inilah yang dimaksud sebagai elemen mikro. Unsur-unsur seperti tembaga, kobalt, besi, seng, mangan, magnesium, adalah contoh unsur mikro yang seringkali ditambahkan pada media pertumbuhan mikroba.

Faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan adalah senyawa organik tertentu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan memperbanyak sel mikroba, tetapi tidak dapat disintesis oleh sel. Senyawa semacam itu harus ditambahkan dalam medium. Asam amino dan vitamin tertentu termasuk dalam kategori ini dalam komposisi media mikroba.

Anti-foam. Komposisi ini bukan komponen nutrisi media. Media yang kaya akan komponen nutrisi seperti pati, protein, dan bahan organik lainnya serta protein dan produk lain yang disekresikan oleh sel tumbuh dapat menyebabkan pembusaan yang berlebihan saat media kultur diaduk untuk aerasi. Untuk mencegah pembentukan busa, beberapa bahan anti pembusaan dimasukkan ke dalam media. Jenis asam lemak tertentu seperti minyak zaitun dan minyak bunga matahari dan silikon biasanya digunakan dalam kultur sel sebagai agen anti buih.

Sumber energi. Sumber karbon yang digunakan dalam media kultur seperti karbohidrat, gula, protein, lipid, dan lain-lain, dapat berfungsi sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan metabolisme sel mikroba.

Air. Air adalah dasar dari setiap media kultur mikroba, baik cair maupun padat. Pada media kultur padat seperti media fermentasi *solid state* atau media agar jumlah air relatif lebih sedikit dibandingkan dengan media cair. Dalam skala laboratorium, akuades atau akuabides biasanya digunakan. Tetapi dalam kultur mikroba skala besar untuk keperluan industri, dapat menggunakan air lainnya, sepanjang pH dan garam terlarut pada air yang digunakan tersebut dapat dipertimbangkan dengan baik saat merumuskan kebutuhan media dan konsentrasinya. Air juga diperlukan untuk sejumlah besar layanan lain di laboratorium seperti pendinginan, pemanasan, penguapan, dan lain-lain. Oleh karena itu, setiap laboratorium harus dilengkapi dengan sumber air bersih dengan kualitas yang konsisten (Stanbury et al., 2016; Smith, 2009; McNeil & Harvey, 2008; 'Shang-Tian Yang, 2007).

3. Prosedur Kultur Mikroba

Sterilisasi. Media dan wadah kultur harus disterilkan untuk mencegah pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan dan mengontaminasi kultur. Jika percobaan skala laboratorium dilakukan dalam labu 100 sampai 1.000 ml, atau dalam volume yang lebih kecil seperti 50 ml atau 10 ml, media bersama dengan labu kultur atau vial dapat disterilkan dengan uap bertekanan

yaitu autoklaf. Bergantung pada jumlah bahan yang diautoklaf, sterilisasi dapat dilakukan sebagai alternatif dalam panci presto dengan ukuran yang sesuai. Sterilisasi uap bertekanan dengan autoklaf atau *pressure cooker* dilakukan pada suhu 121 °C selama 15 hingga 20 menit di bawah tekanan 15 psi. Ketika mikroba dikultur dalam fermentor untuk operasi skala besar, akan lebih mudah untuk mensterilkan fermentor secara keseluruhan dengan atau tanpa media. Media dapat disterilkan secara terpisah atau *in situ* di dalam fermentor.

Lingkungan untuk pertumbuhan mikroba. Komposisi nutrisi media, konsentrasi ionik garam, pH, dan suhu mempengaruhi pertumbuhan mikroba dalam kultur dan status metabolisme. Sebagian besar bakteri tumbuh pada pH netral, sedangkan ragi dan fungi lebih menyukai pH asam. Demikian pula, organisme yang berbeda lebih menyukai suhu optimal yang berbeda untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan yang aktif. Suhu optimal harus dipertahankan dalam kultur dengan bantuan inkubator dalam kultur skala kecil dan air yang bersirkulasi pada suhu yang sesuai melalui selubung fermentor pada skala industri.

Aerasi dan pengadukan. Pengadukan media cair sangat penting untuk memastikan distribusi nutrisi yang seragam bagi populasi mikroba dalam kultur. Aerasi diperlukan untuk memudahkan pertukaran gas antara medium dan lingkungan. Media yang diaerasi dengan baik akan berimplikasi pada melimpahnya oksigen pada sistem tersebut. Aerasi dan pengadukan dapat dengan mudah dicapai dengan mengocok media pada shaker jika pembiakan dilakukan pada skala kecil (kultur labu goyang). Dalam kultur bioreaktor skala besar, transfer oksigen ke organisme sangat sulit karena memerlukan pencampuran yang tepat dalam ruang yang besar. Dalam fermentor, pencampuran sel, komponen media, dan oksigen yang tepat dilakukan dengan mengaduk media dengan bantuan pengaduk mekanis khusus pada penyekat yang terpasang pada fermentor. Terdapat *Baffle* yang membantu dalam mempertahankan turbulensi akibat pengadukan. Aerasi yang tepat juga dipastikan terjaga pada sistem fermentor karena akan membantu dalam proses pencampuran media, sel, dan oksigen (Satyanarayana et al., 2012; Shang-Tian Yang, 2007; Smith, 2009; Vinet & Zhedanov, 2018).

4. Peralatan Kultur Mikroba

Di laboratorium, sel mikroba dapat ditumbuhkan dalam tabung dan vial, bila volumenya lima sampai sepuluh ml, dan di labu Erlenmeyer bila volumenya 100 sampai 1.000 ml. Pembiakan kultur mikroba juga dapat dilakukan dengan dengan menyesuaikan labu yang digunakan dan dengan menggunakan shaker.

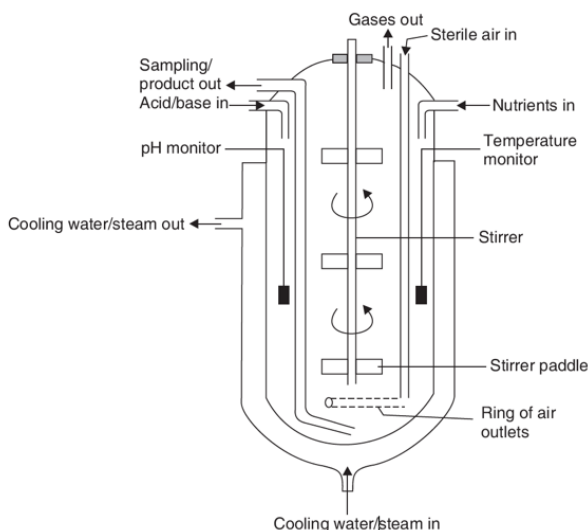
Baffle Flasks. Baffle flask adalah termos hasil modifikasi untuk kultur mikroba, yang di dalamnya terdapat lekukan atau lekukan berbentuk V di sisi-sisi labu. Keberadaan sekat tersebut berfungsi untuk meningkatkan efisiensi transfer oksigen dan dengan demikian pertumbuhan mikroba dapat meningkat karena sekat akan mempertahankan turbulensi saat media diaduk pada alat pengocok.

Shaker/Pengocok. Pengocok adalah peralatan khusus yang dirancang untuk memutar orbital platform, sehingga labu kultur dengan media yang disimpan di platform pengocok akan terus teraduk. Agitasi ini membantu media menjadi homogen dalam distribusi massa sel, komponen media, dan transfer oksigen yang efisien untuk menunjang pertumbuhan mikroba secara maksimal.

Fermentor. Alat ini adalah bioreaktor yang digunakan untuk kultur sel mikroba dalam skala besar dalam kondisi terkontrol untuk keperluan industri. Bejana logam atau kaca tertutup ini memiliki pengaturan yang memadai untuk aerasi, pencampuran media dengan agitasi, pengatur suhu, pengatur pH, anti-pembusaan, pengontrolan luapan, sterilisasi media dan bejana, dan pendinginan. Agitasi media dalam bioreaktor dapat dilakukan melalui pengadukan atau aerasi maupun keduanya. Peralatan ini dapat digunakan untuk pengoperasian terus menerus selama beberapa hari. Bagian penting dari fermentor laboratorium dideskripsikan pada Gambar 2.1.

Bioreaktor merupakan “motor” dari setiap proses produksi berbasis bioteknologi, baik itu untuk pembuatan asam organik atau amino, antibiotik, enzim, wine, vaksin atau untuk bioremediasi. Untuk setiap proses bioteknologi, sistem bioproses pada fermentor yang paling sesuai harus dirancang untuk memberikan lingkungan yang tepat untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan aktivitas metabolisme biokatalis. Bioreaktor dapat berupa wadah terbuka sederhana yang dapat diaduk ataupun tertutup tanpa pengadukan manual, atau berupa sistem

terintegrasi yang kompleks dan aseptik yang melibatkan berbagai kontrol komputer tingkat lanjut (Smith, 2009).



Gambar 2. Sketsa komponen penting fermentor laboratorium (Smith, 2009)

Sebagaimana yang dideskripsikan pada gambar, bioreaktor dilengkapi dengan kontrol untuk memantau dan menyesuaikan berbagai parameter fisik dan kimia seperti suhu, pH, komposisi nutrisi, dan pembusaan. Pertumbuhan sel mikroba secara optimum dan pembentukan produk dapat dicapai dengan mengontrol parameter-parameter yang menunjang pertumbuhan sel dan metabolisme yang mengarah pada output produk yang tinggi. Tangki bioreaktor berpengaduk adalah bioreaktor yang paling umum digunakan untuk kultur mikroba, di mana media mikroba diaduk secara konsisten. Kepadatan sel mikro yang meningkat aktif dalam medium secara metabolik dapat mengakibatkan penipisan oksigen terlarut secara tiba-tiba sehingga dapat menciptakan kondisi anaerobik dalam medium. Hal ini dapat mengakibatkan konsekuensi serius pada kualitas produk atau bahkan pada jenis produk yang terbentuk dalam reaksi fermentasi. Demikian pula, pertumbuhan sel dan pembentukan produk dapat mengubah pH medium, yang juga dapat menimbulkan masalah dalam pertumbuhan dan metabolisme kultur sel selanjutnya. Pertumbuhan yang cepat juga mengakibatkan menipisnya nutrisi penting yang secara langsung

berhubungan dengan pertumbuhan dan metabolisme yang menyebabkan produksi produk target. Semua perubahan ini dipantau oleh aksesoris fermentor atau bioreaktor dan ditunjukkan atau dikendalikan secara otomatis. Misalnya, setiap kali ada perubahan pH dari nilai optimum, secara otomatis asam atau basa dalam jumlah yang cukup ditambahkan ke media untuk menjaga agar pH optimum tetap konstan. Demikian pula, jika ada pembusaan di media, sensor akan mendeteksi pembentukan busa dan karenanya, bahan antifoam dikirim ke dalam media untuk mencegah pembusaan berlangsung lama.

Selain jenis bioreaktor atau fermentor yang digunakan untuk industri, terdapat fermentor volume kecil yang cocok untuk dioperasikan di laboratorium yang disebut dengan fermentor laboratorium. Fermentor laboratorium ini memiliki volume 10 hingga 100 liter dan digunakan untuk mengoptimalkan kondisi kultur dan parameter nutrisi untuk pertumbuhan sel yang lebih baik dan produksi metabolit untuk melakukan studi penelitian di laboratorium.

Dalam semua bentuk fermentasi, tujuan utamanya adalah untuk memastikan bahwa semua bagian sistem mengalami kondisi yang sama. Di dalam bioreaktor, mikroba tersuspensi dalam media nutrisi cair yang mengandung substrat yang diperlukan untuk pertumbuhan organisme dan pembentukan produk yang dibutuhkan. Semua nutrisi, termasuk oksigen, harus disediakan dan terdistribusi secara maksimal ke setiap sel dan produk sampingan seperti panas, karbon dioksida, dan metabolit limbah dihilangkan secara sistematis (Carstou et al., 2007; Mosier & Ladisch, 2009; Nair, 2007; Smith, 2009; Vinet & Zhedanov, 2018; Walker & Rapley, 2002).

5. Ragam Kultur Mikroba

Kultur sistem mikroba dapat dilakukan dengan berbagai cara. Jenis/metode kultur terkadang bergantung pada jenis mikroba atau pada jenis produk target yang kita harapkan. Misalnya, seseorang bisa mendapatkan dua produk yang sama sekali berbeda dari organisme yang sama dengan mengubah parameter nutrisi dan lainnya atau bahkan wadah pembiakan yang digunakan.

Kultur batch/tertutup. Cara ini umumnya dilakukan pada percobaan laboratorium skala kecil di mana kultur mikroba tumbuh dalam labu bervolume kecil. Kultur ini terdiri dari volume

kultur cair yang terbatas dalam labu yang diinokulasi dengan inokulum bakteri atau mikroba dan mengikuti fase pertumbuhan normal. Disebut sebagai sistem kultur tertutup karena medianya mengandung nutrisi dalam jumlah terbatas dan akan dikonsumsi oleh mikroba yang sedang tumbuh untuk pertumbuhan dan perkembangbiakannya dengan ekskresi metabolit tertentu sebagai produk. Dalam kultur batch, nutrisi tidak diperbarui dan pertumbuhan sel eksponensial terbatas pada beberapa generasi. Fase pertumbuhan kultur terdiri dari fase lag awal, fase log atau fase pertumbuhan eksponensial, dan fase deklinasi atau menuju kematian. Selama fase log konsumsi nutrisi akan menjadi maksimal sehingga menghasilkan keluaran biomassa maksimum dengan ekskresi produk. Pada fase deklinasi, laju pertumbuhan menurun bahkan menjadi nol karena pada fase tersebut sel terpapar pada lingkungan yang berubah di mana hanya ada sedikit nutrisi dan lebih banyak sel seiring dengan akumulasi metabolit, yang mungkin berdampak negatif pada pertumbuhan sel.

Kultur feed-batch/ Semi kontinyu. Kultur batch dapat dibuat menjadi kultur semi kontinyu atau kultur *feed-batch* dengan cara mengumpulkannya menggunakan media segar secara berurutan di akhir fase log atau di awal fase deklinasi tanpa membuang sel mikroba di dalamnya. Oleh karena itu, volume kultur akan terus meningkat seiring dengan penambahan media segar yang baru. Metode ini merupakan kultur di mana konsentrasi substrat yang tinggi menghambat multiplikasi sel dan pembentukan biomassa. Dalam situasi seperti itu, substrat dapat diberi nutrisi dengan konsentrasi rendah untuk mencapai pertumbuhan sel. Metode ini dapat dengan mudah menghasilkan kepadatan sel yang tinggi dalam media kultur, yang mungkin tidak dapat dilakukan dalam fermentor batch atau kultur labu kocok. Hal ini sangat penting ketika pembentukan produk bersifat intraseluler untuk mencapai keluaran produk maksimum per biomassa.

Kultur kontinyu. Kultur bakteri dapat dipertahankan dalam keadaan pertumbuhan eksponensial dalam jangka waktu yang lama menggunakan sistem kultur kontinyu atau berkelanjutan, kultur tersebut dirancang untuk menyediakan kondisi untuk menghentikan pertumbuhan eksponensial dalam kultur batch. Kultur kontinyu, dalam perangkat yang disebut *chemostat*, dapat digunakan untuk mempertahankan populasi bakteri pada kepadatan konstan, dan mengkondisikan situasi yang lebih mirip dengan pertumbuhan bakteri di lingkungan alami.

Kultur kontinyu adalah metode yang sangat tepat untuk mendapatkan pertumbuhan sel dan pembentukan produk yang berkelanjutan dalam jangka waktu yang lama. Dalam kultur kontinyu, media nutrisi termasuk bahan mentah dipasok dengan kecepatan yang sama dengan volume media dengan sel dan produk yang dipindahkan atau dikeluarkan dari kultur. Volume yang terbuang dan volume yang ditambahkan harus sama, sehingga tidak akan terjadi perubahan volume demikian pula lingkungan kimiawi dari kultur dalam fermentor dipertahankan stabil.

Dalam *chemostat*, ruang pertumbuhan terhubung ke reservoir media steril. Setelah pertumbuhan dimulai, media segar terus menerus disuplai dari reservoir. Volume fluida dalam ruang pertumbuhan dipertahankan pada tingkat yang konstan dengan semacam drainase. Media segar dibiarkan masuk ke dalam ruang pertumbuhan dengan kecepatan konstan yang membatasi pertumbuhan bakteri. Sel-sel bakteri tumbuh/ terbentuk pada kecepatan yang sama di mana sel-sel bakteri dan medium yang dihabiskan. Laju penambahan medium segar menentukan laju pertumbuhan karena medium segar selalu mengandung sejumlah nutrisi esensial yang terbatas. Dengan demikian, *chemostat* mengurangi kekurangan nutrisi, akumulasi zat beracun, dan akumulasi sel berlebih dalam kultur, yang merupakan parameter dimulainya fase statis dari siklus pertumbuhan. Kultur bakteri dapat dikulturkan dan dipertahankan pada kondisi yang relatif konstan, tergantung pada laju aliran nutrisi. *Chemostat* mengurangi kondisi lingkungan yang membatasi pertumbuhan dengan terus menerus memasok nutrisi ke sel dan menghilangkan zat buangan dan sel sisa dari media kultur.

Jika lingkungan kimia konstan dalam kultur kontinu *chemostat*, maka kepadatan sel dalam kultur menjadi konstan. Karena kultur diberi nutrisi dengan media segar pada kecepatan tertentu, serta pertumbuhan dan metabolisme yang stabil dapat terus tercapai. Pada kondisi yang sesuai, duplikasi sel dan konsumsi substrat untuk pertumbuhan dan pembentukan produk terjadi pada kecepatan tetap. Tingkat pertumbuhan dipertahankan secara konstan, karena pembentukan biomassa baru diimbangi dengan pengangkutan sel ke saluran untuk keluar dari kultur. Kultur berkelanjutan sangat cocok untuk produksi biomassa sel dan produknya yang diekskresikan ke dalam medium. Ini banyak digunakan untuk produksi protein sel tunggal dari limbah cair sebagai produk sampingan dari pengolahan limbah. Limbah

organik yang ada dalam efluen diubah menjadi biomassa mikroba, yang dikenal sebagai protein sel tunggal (Chaudhuri & Al-Rubeai, 2005; Chisti, 2014; Mosier & Ladisch, 2009; Nair, 2007; Shang-Tian Yang, 2007; Smith, 2009; Vinet & Zhedanov, 2018; Whiteurst & Law, 2002).

6. Kinetika Pertumbuhan dan Laju Pertumbuhan Spesifik

Pertumbuhan adalah peningkatan jumlah konstituen seluler yang teratur. Hal tersebut tergantung pada kemampuan sel untuk membentuk protoplasma baru dari nutrisi yang tersedia di lingkungan. Pemahaman yang tepat mengenai pertumbuhan mikroba sangat penting agar dapat memanfaatkan proses mikroba untuk mendapatkan hasil produk yang maksimal. Di antara berbagai jenis mikroba pada dasarnya terdapat empat pola umum perbanyakan sel. Bakteri terutama bertambah jumlahnya dengan pembelahan biner, ragi berkembang biak dengan bertunas, fungi meningkatkan biomassa dengan pemanjangan miselium dan percabangannya, dan terkhusus virus, tidak ada pola perbanyakan yang teratur, terutama karena perkaliannya bergantung pada inang dan tumbuh secara intraseluler.

Pengukuran Pertumbuhan Mikroba

Pada bakteri, perkalian terjadi dengan pembelahan sel menjadi dua melalui proses yang disebut pembelahan biner. Pertumbuhan dan pembelahan sel bakteri melibatkan peningkatan massa sel dan jumlah ribosom, duplikasi kromosom bakteri, sintesis dinding sel baru dan membran plasma, partisi dua kromosom, pembentukan septum, dan pembelahan sel. Proses reproduksi aseksual ini disebut pembelahan biner.

Selama proses pembelahan biner, terjadi peningkatan yang teratur dalam struktur dan komponen seluler, replikasi dan pemisahan DNA bakteri, dan pembentukan septum atau dinding yang membelah sel menjadi dua sel anakan. Prosesnya dikoordinasikan oleh membran bakteri, yaitu mesosom. Molekul DNA diyakini terikat pada suatu titik di membran tempat ia direplikasi. Kedua molekul DNA tetap menempel pada titik-titik berdampingan pada membran sementara bahan membran baru disintesis di antara dua titik tersebut, selanjutnya menarik molekul DNA ke arah yang berlawanan sementara dinding dan membran sel baru diletakkan sebagai septum di antara dua kompartemen kromosom. Ketika pembentukan septum selesai, sel membelah

menjadi dua sel anakan. Interval waktu yang diperlukan sel bakteri untuk membelah atau untuk populasi sel bakteri menjadi dua kali lipat disebut generation time (waktu generasi). Waktu generasi untuk spesies bakteri yang tumbuh di alam ada yang sesingkat 15 menit dan bahkan ada yang membutuhkan waktu selama beberapa hari. Untuk organisme uniseluler seperti bakteri, pertumbuhan dapat diukur dalam dua parameter berbeda, yaitu perubahan massa sel dan perubahan jumlah sel.

Kinetika Pertumbuhan dan Laju Pertumbuhan Spesifik

Ketika bakteri tumbuh dalam sistem tertutup (kultur batch) seperti tabung reaksi, populasi sel hampir selalu menunjukkan dinamika pertumbuhan. Sel awalnya menyesuaikan diri dengan medium (fase lag) sampai mereka dapat mulai membelah secara teratur di fase eksponensial. Ketika pertumbuhannya menjadi terbatas, sel-sel tersebut berhenti membelah (fase statis), sampai akhirnya sel-sel menunjukkan hilangnya kelangsungan hidup (fase kematian). Pertumbuhan dinyatakan sebagai perubahan dalam jumlah sel yang layak terhadap waktu atau biomassa sel terhadap waktu.

Pertumbuhan sel dalam kultur mikroba di bawah kondisi stabil atau pertumbuhan seimbang dapat dibandingkan dengan reaksi kimia, di mana substrat diubah menjadi produk. Dalam reaksi seperti itu, kecepatan pertumbuhan akan sebanding dengan biomassa sel yang ada dalam kultur. Ketika kultur mikroba dalam keadaan mapan, laju peningkatan biomassa sel dX/dt sama dengan produk pertumbuhan spesifik dan konsentrasi sel (konsentrasi biomassa).

$$DX / dt = \mu X \quad (1)$$

dengan X adalah konsentrasi sel (gm/L) dan μ adalah laju pertumbuhan spesifik perjam. Laju pertumbuhan spesifik $\mu = dX / dt \times 1 / X$, yang merupakan indeks laju pertumbuhan sel dalam kondisi tertentu tersebut. Laju pertumbuhan spesifik dapat ditentukan dengan memplot dX / dt terhadap X , konsentrasi sel, dan menentukan kemiringan garis lurus. Dimungkinkan untuk menghitung waktu generasi atau waktu penggandaan organisme atau sel bakteri, jika kita mengetahui konsentrasi sel awal dan akhir dari kultur dan laju pertumbuhan spesifik. Biomassa sel pada awal pertumbuhan eksponensial adalah X dan waktu t menjadi $2X$. Waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan biomassa atau waktu pembangkitan sel dapat dihitung dengan mengikuti persamaan tersebut (Persamaan No. 1).

$$\ln 2X/t = \mu X$$

$$\ln 2X/X = \mu t$$

$$\ln 2 = \mu t$$

$$t = \ln 2/\mu$$

$$t = 0.693/\mu \quad (2)$$

Di sini t adalah waktu penggandaan sel. Jika pertumbuhan spesifik ' μ ' dari sel dihitung, maka dapat diganti dalam persamaan di atas untuk menentukan waktu pembangkitan atau waktu penggandaan. Dari sini sangat jelas bahwa waktu penggandaan dan tingkat pertumbuhan spesifik berhubungan secara terbalik. Ketika waktu penggandaan meningkat, laju pertumbuhan spesifik menurun. Kultur sel mikroba biasanya memiliki laju pertumbuhan spesifik yang tinggi, karena memiliki waktu penggandaan atau waktu generasi yang singkat.

Jumlah sel kultur mikroba pada interval waktu yang berbeda dapat dihitung dan data ini dapat digunakan untuk menghitung laju pertumbuhan spesifik sebagai berikut:

$$\ln 2X/X = \mu t \text{ or } \ln 2X - X = \mu (t - t_0)$$

$$\log_{10} 2X - \log_{10} X = \mu/2.303 (t - t_0)$$

$2X$ dan X merepresentasikan jumlah sel mikroba pada t dan t_0 .

Misalkan jika media kultur mengandung 104 sel / mL pada waktu t_0 , dan setelah 4 jam (t) jumlah sel adalah 108 sel / mL, maka laju pertumbuhan spesifik kultur tersebut adalah:

$$\mu = (t - t_0) 2.303/\log_{10} (108 - 104) = (8 - 4) 2.303/4$$

$$= 4 \times 2.303/4 = 2.303/\text{jam}$$

Jadi, tingkat pertumbuhan spesifiknya adalah 2.303/ jam

$$t = 0.693/\mu$$

$$t = 0.693/2.303$$

$$t = 0.3 \text{ jam}$$

$$0.3 \text{ jam} = 20 \text{ menit}$$

Contoh ini dengan jelas menggambarkan bahwa ketika tingkat pertumbuhan spesifik meningkat, waktu penggandaan kultur akan menurun. Laju pertumbuhan spesifik sel mikroba berubah sesuai dengan perubahan fase pertumbuhan. Biasanya pertumbuhan spesifik suatu kultur dihitung selama pertumbuhan mapan, yaitu selama fase pertumbuhan eksponensial. Pertumbuhan spesifik selama fase eksponensial atau fase log menunjukkan kapasitas pertumbuhan kultur di lingkungan tersebut karena pertumbuhan spesifik suatu kultur juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu, pH, komposisi nutrisi media, dan faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan sel dalam kultur (Shang-Tian Yang, 2007; Virdis et al., 2011; Walker & Rapley, 2002).

7. Isolasi Produk Mikroba

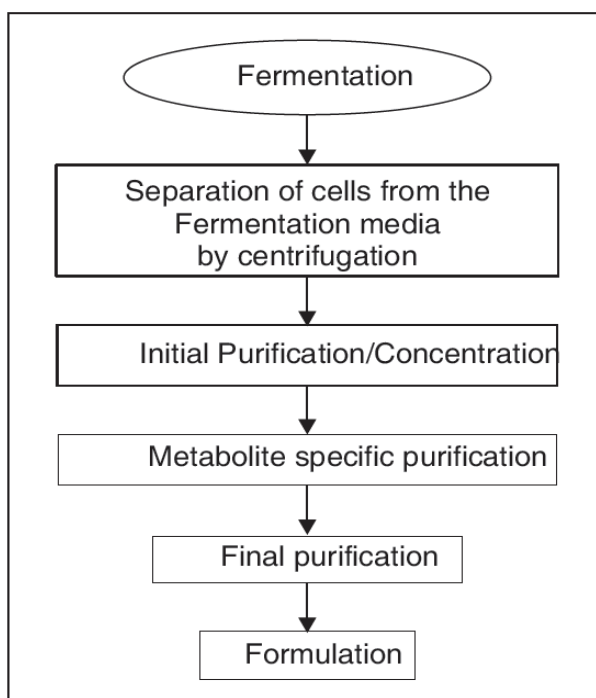
Proses pemisahan dan pemurnian produk yang diinginkan dari kultur mikroba bioproses disebut pemrosesan hilir. Proses ini melibatkan pemisahan sel dari medium, jika produk ada di dalam medium. Teknik pemurnian yang lazim digunakan diantaranya kromatografi. Jika metabolit diproduksi secara intraseluler, maka prosedurnya termasuk destruksi sel dan ekstraksi metabolit. Langkah-langkah utama dan umum dari proses hilir yang khas dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

- (1) Pemisahan sel dari media fermentasi.
- (2) Destruksi sel dan ekstraksi produk yang bersifat intraseluler atau ekstraksi langsung dari kultur cair jika produk bersifat ekstraseluler (terdapat pada di media).
- (3) Pemurnian awal metabolit, seperti presipitasi atau pemisahan kromatografi umum.
- (4) Prosedur atau teknik pemurnian khusus produk seperti kromatografi afinitas atau kromatografi pertukaran ion.
- (5) Pemolesan produk, yang melibatkan pemurnian atau konsentrasi produk tertentu ke tingkat kemurnian tinggi (kemurnian 98 hingga 100%) dan membuatnya siap untuk komersialisasi.

Gambar berikut mengilustrasikan beberapa langkah yang terlibat dalam pemrosesan hilir untuk isolasi dan pemurnian produk dari media fermentasi. Bergantung pada jenis produk, langkah isolasi dan pemurnian dapat bervariasi dengan melibatkan lebih banyak langkah. Tetapi disarankan untuk memasukkan lebih sedikit langkah pemurnian agar biaya produksi produk dapat ditekan dan juga kerugian produk selama proses hilir

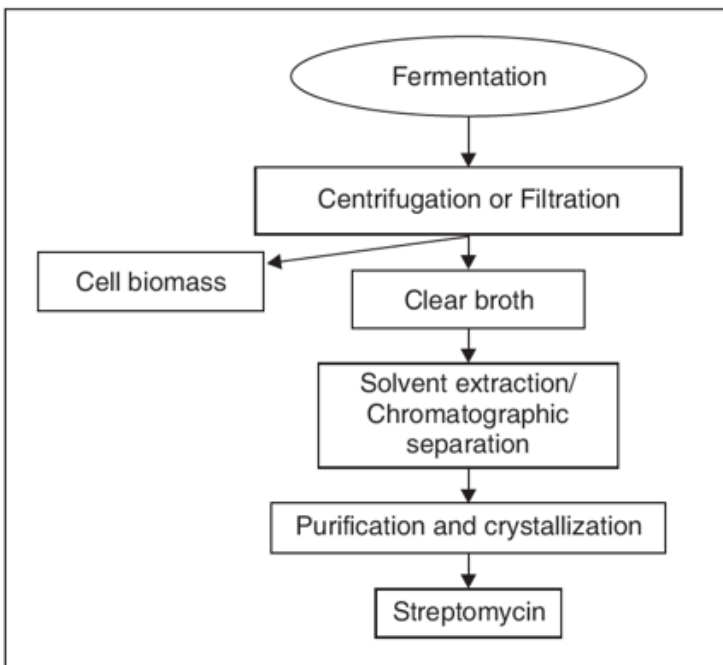
dapat dikurangi (Vinet & Zhedanov, 2018; Mosier & Ladisch, 2009; Smith, 2009; Carstoiu et al., 2007; Nair, 2007; Shang-Tian Yang, 2007; Evans & Furlong, 2003; Walker & Rapley, 2002; Whiteurst & Law, 2002).

Langkah pertama dari setiap proses hilir adalah pemisahan sel dari media fermentasi. Hal ini umumnya dicapai dengan sentrifugasi atau dalam beberapa kultur, sel dengan cepat mengendap saat aerasi dan media cair fermentasi dihentikan. Sedimentasi sel dapat terjadi dengan cepat melalui penambahan agen flokulasi. Pemisahan sel dari media kultur fermentasi dapat pula dilakukan dengan sentrifugasi. Selain itu pemisahan juga dapat dilakukan dengan ultra-filtrasi. Dalam metode ini kultur difilter menggunakan membran dengan ukuran pori 0,5 mm. Media kultur cair yang dilewatkan pada membran akan terbebas dari sel-sel.



Gambar 3. Diagram alir yang menggambarkan langkah-langkah berbeda yang terlibat dalam isolasi dan pemurnian metabolit mikroba (Nair, 2007)

Media kultur cair yang telah bebas sel mengandung metabolit mikroba, enzim, dan senyawa lainnya. Ada banyak metode untuk menangani pemisahan dan pemurnian produk yang diinginkan, misalnya untuk produk antibiotik. Metodenya meliputi pengendapan, ekstraksi pelarut, dan kromatografi. Jika produk yang diinginkan dilokalisasi secara internal, keinginannya juga akan berubah. Gambar berikut mengilustrasikan diagram alir yang proses isolasi dan pemurnian produk. Dimisalkan produk antibiotik kelompok streptomisin, yang sifat metabolitnya disekresikan ke dalam media.



Gambar 4. Diagram alir untuk pemurnian contoh produk mikroba ekstraseluler berupa streptomisin oleh s. gresius (Nair, 2007)

BAB III

TEKNOLOGI ENZIM

1. Sifat Enzim

Enzim adalah protein globular kompleks yang ada dalam sel hidup di mana mereka bertindak sebagai katalis yang memfasilitasi perubahan kimiawi zat tertentu. Pada tahun 1878 K^ouhne memperkenalkan istilah 'enzim' dari bahasa Yunani *enzumos*, yang mengacu pada ragi. Dengan perkembangan ilmu biokimia, telah menghadirkan pemahaman yang lebih lengkap tentang berbagai macam enzim yang ada dalam sel hidup dan mekanisme kerjanya masing-masing. Tanpa enzim, maka dipastikan tidak akan ada kehidupan. Meskipun enzim hanya terbentuk di sel hidup, namun karakteristiknya dapat diekstraksi atau dipisahkan dari sel dan dapat tetap berfungsi secara *in-vitro*. Kemampuan unik enzim untuk melakukan transformasi kimia spesifiknya menyebabkan penggunaan enzim terus meningkat dari masa ke masa dalam berbagai proses industri, bioremediasi dan pengobatan. Proses produksinya secara kolektif dan masif dikembangkan sebagai teknologi enzim (Punekar, 2018; Sataloff et al., 2009; Whiteurst & Law, 2002).

Aktivitas enzim disebabkan oleh sifat katalitiknya. Enzim menjalankan aktivitasnya tanpa dikonsumsi dalam reaksi, sedangkan reaksi terjadi pada kecepatan yang jauh lebih tinggi bila enzim ada pada sistem tersebut. Enzim sangat spesifik dan hanya berfungsi pada jenis senyawa tertentu, yaitu substrat. Sejumlah kecil enzim dapat bereaksi dan mengkatalis substrat

dalam jumlah besar. Fungsi katalitik enzim tidak hanya disebabkan oleh struktur molekul utamanya tetapi juga karena konfigurasi pelipatan yang rumit dari seluruh molekul enzim. Konfigurasi inilah yang memberikan kekhususan protein tersebut dengan fungsi katalitik spesifiknya. Perubahan konfigurasi enzim, misalnya, melalui perubahan pH atau suhu, dapat mengakibatkan hilangnya aktivitas. Untuk beberapa enzim, terdapat kebutuhan khusus untuk faktor tambahan, yang disebut ko-faktor, yang dapat berupa ion logam, nukleotida, dan lain-lain. Karena kekhususannya, enzim dapat membedakan antara bahan kimia dengan struktur yang tepat dan dapat mengkatalisasi reaksi tersebut pada berbagai suhu (0–110°C) dan dalam kisaran pH 2–14. Dalam aplikasi industri, hal ini dapat menghasilkan produk yang berkualitas tinggi, produk sampingan yang lebih sedikit, dan prosedur pemurnian yang lebih sederhana. Selain itu, enzim tidak beracun dan dapat terurai secara hayati dan dapat diproduksi terutama dari mikroba dalam jumlah besar tanpa memerlukan peralatan khusus (Vogel & May, 2019; Ray & Rosell, 2017; Sataloff et al., 2009; Aehle, 2007).

Teknologi enzim mencakup produksi, isolasi, pemurnian, dan penggunaannya baik dalam bentuk yang dapat larut atau bersifat amobil. Enzim yang diproduksi secara komersial tidak diragukan lagi akan berkontribusi pada solusi dari beberapa masalah-masalah vital yang dihadapi masyarakat modern, misalnya produksi pangan, penanganan kekurangan dan pelestarian energi, perbaikan lingkungan, dan berbagai aplikasinya dalam bidang medis. Teknologi tersebut berasal dari biokimia, dengan lebih banyak memanfaatkan mikrobiologi, kimia dan rekayasa proses untuk mencapai status sains. Untuk masa depan, teknologi enzim dan rekayasa genetika akan menjadi dua bidang yang berkaitan erat dengan penerapan gen dan produknya. Secara bersama-sama, ilmu-ilmu tersebut akan berusaha untuk secara kreatif mengeksplorasi secara berkelanjutan untuk terus menerus menghasilkan produk berdasarkan penemuan oleh para pakar genetika molekuler dan ahli enzim.

Diperkirakan bahwa pasar dunia untuk enzim mencapai lebih dari US \$ 2 miliar dan akan berlipat ganda selama dekade berikutnya. Produksi dan pemanfaatan enzim adalah salah satu bidang bioteknologi modern yang paling pesat kemajuannya dan telah meningkat sebesar 12% setiap tahun selama sepuluh tahun terakhir. Sekarang terdapat lebih dari 400 perusahaan di seluruh dunia yang terlibat dalam produksi enzim, dengan perusahaan

Eropa mendominasi (60%) dan Amerika Serikat juga Jepang memproduksi kebutuhan enzim dunia sebanyak 30%. Produksi enzim tertentu ditunjukkan pada tabel berikut (Vogel & May, 2019; Ray & Rosell, 2017; Sataloff et al., 2009; Aehle, 2007).

Tabel 1. Perkiraan jumlah produksi beberapa enzim

| Enzim | Ton Enzim murni |
|--------------------------|-----------------|
| protease <i>Bacillus</i> | 550 |
| Amiloglukosidase | 350 |
| Amilase <i>Bacillus</i> | 350 |
| Isomerase glukosa | 60 |
| Rennet mikroba | 25 |
| Amilase fungi | 20 |
| Pektinase | 20 |
| Protease fungi | 15 |

2. Penerapan Pemanfaatan Enzim

Selama ribuan tahun proses seperti pembuatan wine, pembuatan roti dan produksi keju telah melibatkan penggunaan enzim secara kebetulan sebagaimana Tabel 3.1. Di Barat, pemahaman industri tentang enzim berkisar pada ragi dan malt di mana industri pembuatan kue dan pembuatan bir tradisional berkembang pesat. Sebagian besar perkembangan awal biokimia berpusat di sekitar fermentasi ragi dan proses konversi pati menjadi gula. Di Timur, industri yang sebanding adalah produksi sake dan beberapa makanan fermentasi lainnya, yang semuanya memanfaatkan bakteri dan fungi berfilamen sebagai sumber aktivitas enzim. Awal perkembangan teknologi enzim mikroba modern adalah pemasaran pertama takadiastase di Barat, campuran enzim hidrolitik yang agak kasar yang dibuat dengan menumbuhkan fungi *Aspergillus oryzae* pada dedak gandum. Sebuah paten diajukan ke Kantor Paten AS pada tahun 1884 oleh seorang ilmuwan Jepang, Dr. Jokichi Takamine. Metode produksi takadiastase sedikit berbeda dari yang dipraktekkan selama ribuan tahun di Asia, tetapi metode inilah yang mewakili transfer teknologi yang penting dari Timur ke Barat.

Kulit yang selalu menjadi komoditas penting, dimana proses produksinya yang dimulai pada proses penghalusan sebelum penyamakan, awalnya menggunakan kotoran anjing dan kotoran merpati. Namun, pada pergantian abad ke-20, Otto Rohm, seorang ahli kimia Jerman terkemuka, menetapkan bahwa komponen aktif dalam kotoran anjing adalah protease, jenis enzim yang

mendegradasi protein. Dia mampu menunjukkan bahwa ekstrak dari organ hewan yang menghasilkan enzim serupa dapat digunakan sebagai pengganti penggunaan kotoran, dan dari tahun 1905 pankreas babi dan sapi menyediakan sumber enzim protease yang lebih dapat diterima dan dapat diandalkan secara sosial.

Penggunaan enzim dalam berbagai proses selanjutnya bergantung pada sumber tumbuhan dan hewan. Protease seperti papain dari pepaya, ficin dari buah ara dan bromelain dari nanas masih merupakan sumber komersial yang penting. Sementara enzim yang bersumber dari hewan diantaranya esterase, protease dan lipase, seperti rennet, pepsin, kimosin dan lisozim. Sumber enzim tersebut untuk menopang kebutuhan industri, memiliki keterbatasan termasuk kurangnya kualitas dan ketersediaan yang konsisten dan tergantung pada waktu/ musim. Dalam kasus beberapa enzim tanaman, gangguan pasokan karena cuaca dan ketidakstabilan politik menjadi faktor pembatas yang sangat signifikan. Baru pada pertengahan tahun 1950-an terjadi perkembangan pesat dalam teknologi enzim, dengan menggunakan mikroba sebagai sumber enzim yang kemudian dikenal sebagai enzim mikroba (Vogel & May, 2019; Ray & Rosell, 2017; Sataloff et al., 2009; Aehle, 2007). Beberapa alasan pengembangan produksi enzim mikroba diantaranya:

- Terjadi perkembangan pesat dalam praktik kultivasi mikroba yang terutama terkait dengan proses produksi penisilin setelah Perang Dunia II, dan pengetahuan yang baru diperoleh tersebut siap diterapkan untuk kultur mikroba lain dalam skala besar dan kemudian untuk produksi enzim mikroba.
- Pengetahuan dasar tentang sifat enzim berkembang pesat dan mengarah pada realisasi potensi penggunaan enzim sebagai katalis dalam bidang industri.
- Sebagian besar enzim yang potensial berkontribusi dalam industri dapat diproduksi dari beberapa mikroba.

Ekspansi industri enzim yang lebih baru datang dengan munculnya rekayasa genetika. Mikroba rekombinan sekarang menjadi sumber enzim terbesar untuk berbagai aplikasi di seluruh sektor kehidupan manusia. Perkembangan lebih lanjut dari enzim sebagai aditifpun tak luput menjadi fokus pengembangan. Bahkan saat ini, sebagian besar produksi enzim kasar umumnya dimanfaatkan untuk menghidrolisis ikatan glukosidik karbohidrat seperti pati dan pektin, dan dengan protease yang menghidrolisis

tautan peptida protein. Sekitar 90% produksi enzim massal berasal dari mikroba seperti fungi berfilamen, bakteri dan khamir, dan hanya sisanya yang bersumber dari hewan (6%) dan tumbuhan (4%).

Penggunaan enzim yang dihasilkan oleh sel-sel mikroba yang bersifat bebas memiliki banyak keunggulan dibandingkan proses kimia lainnya yang melibatkan sejumlah reaksi berurutan. Namun dalam proses fermentasi penggunaan enzim sel mikroba sebagai katalis memiliki beberapa keterbatasan, yaitu:

- Sebagian besar substrat biasanya akan diubah menjadi biomassa.
- Reaksi samping yang sia-sia dapat terjadi.
- Kondisi pertumbuhan mikroba mungkin tidak sama untuk pembentukan produk.
- Isolasi dan pemurnian produk yang diinginkan dari cairan fermentasi agak sulit.

Keterbatasan ini dapat diatasi dengan penggunaan enzim yang dimurnikan dan dengan penggunaan enzim lebih lanjut dalam bentuk yang tidak dapat bergerak amobil, yaitu suatu enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak sehingga dapat dikendalikan atau diatur kapan enzim harus kontak dengan substrat. Di masa depan, banyak fermentasi konvensional dapat digantikan oleh reaktor multienzim yang akan menciptakan tingkat penggunaan substrat yang sangat efisien, hasil yang lebih tinggi dan keseragaman produk yang lebih tinggi.

Dalam beberapa industri, seperti proses sakarifikasi anggur dan jus, pengendalian bir dingin dan meningkatkan kekalisan adonan roti, penggunaan enzim kasar kemungkinan besar hanya akan menambah sedikit biaya produksi namun dapat meningkatkan kualitas dan kuantitas produksi. Sebagian besar enzim yang digunakan dalam skala industri adalah enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang biasanya diekskresikan oleh mikroba untuk bekerja pada substratnya di lingkungan eksternal, dan dianalogikan dengan enzim pencernaan manusia dan hewan. Jadi, ketika mikroba menghasilkan enzim untuk memecah molekul eksternal yang besar menjadi bentuk yang dapat diasimilasi, enzim biasanya diekskresikan ke dalam media fermentasi. Dengan cara ini, media cair fermentasi dari kultur mikroba tertentu, misalnya bakteri, ragi atau fungi berfilamen, kemudian menjadi sumber utama protease, amilase dan pada tingkat yang lebih rendah

selulase, lipase, dan lain-lain. Sebagian besar enzim industri adalah hidrolase. dan mampu bertindak tanpa faktor pendamping yang kompleks; enzim-enzim tersebut mudah dipisahkan dari mikroba tanpa merusak dinding sel dan bersifat larut dalam air (Vogel & May, 2019; Ray & Rosell, 2017; Sataloff et al., 2009; Ahle, 2007).

Beberapa enzim intraseluler sekarang diproduksi secara komersial dan termasuk oksidase glukosa untuk pengawetan makanan, asparaginase untuk terapi kanker dan penisilin asilase untuk konversi antibiotik. Karena sebagian besar enzim seluler pada dasarnya bersifat intraseluler, maka peluang kemajuan dapat diharapkan lebih banyak pada bidang-bidang tersebut.

Pemasaran enzim industri relatif kecil sampai sekitar tahun 1965, ketika enzim dalam deterjen mulai digunakan secara umum. Terjadi peningkatan besar-besaran dalam penggunaan enzim dalam deterjen antara tahun 1966 dan 1969 tetapi kemudian mengalami kendala antara tahun 1969 dan 1970, ketika gejala alergi yang jelas ditemukan pada pekerja yang menangani enzim di tingkat pabrik dan akhirnya penggunaan enzim sebagian besar tidak digunakan pada industri deterjen. Namun kemudian, dengan tindakan pencegahan dengan mengenkapsulasi enzim sebelum mencapai pengguna, risiko yang dipostulasikan berangsur hilang. Bahkan studi yang cermat membuktikan tidak adanya efek lingkungan yang merugikan dari penggunaan enzim maupun efek apa pun pada pengguna rumah tangga. Aplikasi enzim dalam deterjen kembali berkembang pesat dan mengalami pertumbuhan yang stabil dalam penggunaannya pada bagian industri deterjen di mana enzim dapat meningkatkan hasil pencucian. Aplikasi enzim dalam industri deterjen meluas pada penggunaannya untuk produk pencuci piring dan dalam operasi pembersihan industri dan kantor-kantor (Vogel & May, 2019; Puneekar, 2018; Liu, 2017; Shukla & Pletschke, 2013; Illanes, 2008; Ahle, 2007; Whiteurst & Law, 2002).

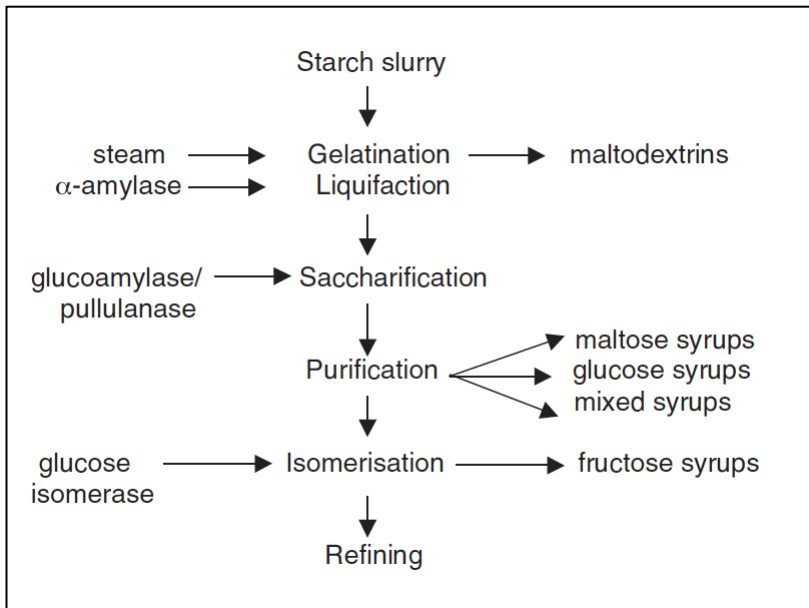
Sebelum penggunaan enzim dalam industri deterjen, di Eropa Barat misalnya, pencucian air panas (65-70°C) dianggap penting untuk proses pencucian pakaian, sedangkan di AS dan Kanada sebagian besar mesin cuci beroperasi pada suhu 55°C. Sebaliknya, di Jepang pakaian biasanya dicuci untuk waktu yang lebih lama dengan air dingin. Dengan demikian, secara universal penggunaan enzim pada deterjen yang berfungsi dengan baik

pada suhu yang relatif rendah, yaitu 20–30°C menjanjikan prospek yang sangat efisien.

Sementara protease telah mendominasi pasar deterjen, terjadi peningkatan penggunaan amilase dan lipase untuk menghilangkan pati dan lemak. Selulase juga telah memasuki pasar deterjen dan tidak seperti enzim lain, yang menurunkan noda tertentu, selulase bekerja langsung pada kain. Saat baru, kapas terdiri dari serat halus, tetapi dengan penggunaan yang lama dan mencuci mikrofibril atau untaian serat yang putus menciptakan 'bulu halus' atau berserabut pada permukaan kain. Selulase mengatasi masalah tersebut dan dengan demikian meningkatkan tampilan dan kehalusan kain. Selulase juga digunakan untuk mengembalikan warna kapas yang telah dicuci beberapa kali dan memberikan tampilan 'stone-wash' pada jeans (Vogel & May, 2019; Puneekar, 2018; Liu, 2017; Shukla & Pletschke, 2013; Illanes, 2008; Aehle, 2007; Whiteurst & Law, 2002).

Dalam industri pengolahan pati, pati jagung merupakan bahan baku yang paling banyak digunakan disusul oleh pati gandum, tapioka dan kentang. Berbagai macam pemanis dapat diturunkan dari proses enzimatis pati (Gbr. 3.1). α -amilase yang tahan panas ditemukan pada awal 1970-an dan telah merevolusi sakarifikasi pati industri, menggantikan hidrolisis asam. Pati dari bahan mentah terbarukan seperti jagung, gandum, beras dan singkong kini dapat dihidrolisis menjadi glukosa oleh enzim, yang selanjutnya diubah menjadi etanol dengan fermentasi ragi dan digunakan untuk produksi biofuel atau bioetanol.

Namun, sebagian besar cadangan kimia dan energi dalam bahan tanaman terbarukan terkunci dalam bentuk bahan dinding sel yang terdiri dari selulosa, polisakarida kompleks, dan polimer fenolik seperti lignin. Sementara pati akan selalu menjadi substrat utama untuk produksi bioetanol, bahan mentah utamanya adalah lignoselulosa terbarukan. Teknik hidrolisis baru dan metode enzimatik kini sedang dipertimbangkan untuk mencapai destruksi struktur kompleks tersebut yang tepat secara komersial. Ada persyaratan yang ketat untuk katalis yang lebih baik dan lebih beragam baik secara biologis dan kimiawi untuk memecah biopolimer kompleks tersebut menjadi senyawa kimia yang sangat banyak yang saat ini umumnya berasal dari bahan bakar fosil.



Gambar 5. Pengolahan pati secara enzimatik menjadi pemanis

Harga enzim mengalami penurunan secara riil selama beberapa dekade terakhir. Misalnya, sejumlah besar enzim untuk sebagian besar diaplikasikan pada produksi makanan sekarang setidaknya secara relatif lebih murah 20–35% dibandingkan pertengahan tahun 1970-an. Enzim yang lebih khusus, digunakan dalam konsentrasi yang lebih kecil dan dalam kemurnian yang lebih tinggi, telah meningkat penggunaannya karena diproduksi dengan metode produksi yang lebih baik dan presisi. Penggunaan enzim sebagai katalis dalam skala besar dan masif serta berkelanjutan hanya akan tercapai jika biayanya terus mengalami penurunan.

Dalam istilah finansial, 80% dari penjualan enzim industri masuk ke tiga pasar utama - konversi pati (40%), deterjen (30%) dan aplikasi produk susu terutama rennet (10%). Penjualan rennet hewan untuk pembuatan keju mendekati US \$ 100 juta dan sedang ditingkatkan secara kuat oleh rennet mikroba dan rekayasa genetika. Namun, pertumbuhan penjualan enzim telah dan terus sangat dipengaruhi oleh industri pati dan deterjen. Inovasi seperti teknologi DNA rekombinan dan metode fermentasi yang lebih baik serta pemrosesan hilir akan semakin mengurangi

biaya produksi, terutama enzim berbiaya tinggi, akan membuatnya lebih kompetitif dengan proses kimia lainnya.

Meskipun berbagai enzim spesifik semakin banyak digunakan dalam aplikasi klinis atau diagnostik, jumlah enzim yang sebenarnya dibutuhkan cukup kecil. Hal ini muncul dari pengembangan prosedur otomatis yang menggunakan enzim yang bersifat amobil atau tidak dapat bergerak dan berusaha untuk membuat miniatur sistem, dengan enzim menjadi analog dengan microchip di komputer. Jadi, meskipun enzim itu vital, kebutuhan pasarnya cukup kecil karena dapat ditekan (Vogel & May, 2019; Puneekar, 2018; Liu, 2017; Shukla & Pletschke, 2013; Illanes, 2008; Aehle, 2007; Whiteurst & Law, 2002).

Ketika enzim digunakan sebagai aditif secara masif, biasanya hanya satu atau dua kilogram yang dibutuhkan untuk mengkatalisis sebanyak 1000 kilogram substrat. Dengan cara tersebut biaya enzim akan berkisar antara 10–14% dari nilai produk akhir. Enzim semacam itu biasanya dijual dalam formulasi cair dan jarang dimurnikan. Sebaliknya, enzim diagnostik umumnya akan digunakan dalam jumlah miligram atau mikrogram dan dapat menghabiskan biaya yang tinggi per kilogram. Enzim tersebut dibutuhkan dengan kemurnian tinggi.

Pertumbuhan lebih lanjut dari pasar enzim dunia akan berputar di sekitar (a) produk enzim tingkat industri bervolume tinggi, dan (b) produk enzim bervolume rendah dan kemurnian tinggi untuk aplikasi analitis, diagnostik, atau terapeutik. Dalam produksi enzim industri dunia, menarik bahwa dua negara kecil di Eropa yaitu Belanda dan Denmark mendominasi pasar.

3. Seleksi dan Pengembangan Strain Produsen Enzim

Strategi dasar pengumpulan kultur (skrining) dan perbaikan strain untuk produksi enzim sama dengan yang dilakukan untuk aktivitas mikroba. Diperlukan pengujian yang presisi untuk memilih kultur yang diinginkan, apakah isolat baru atau strain yang lebih baik. Perusahaan enzim memelihara koleksi mikroba yang besar yang berasal dari berbagai sumber alami dan dapat menggunakan beragam teknik pengayaan untuk memilih karakteristik yang diperlukan dalam produksi enzim mikroba.

Sebagian besar perusahaan mempertahankan *gene-library* yang dapat menghasilkan skrining molekuler dan sekuensing genom, yang dapat mengarah pada penemuan enzim baru.

Sebagian besar produksi enzim industri melibatkan aktivitas enzim yang dipilih yang ditransfer ke mikroba produktif yang telah teruji kemampuannya untuk menghasilkan aktivitas enzim yang tinggi. Secara umum, enzim fungi diproduksi oleh fungi, misalnya spesies dari genus *Aspergillus* dan *Trichoderma*, sedangkan enzim bakteri menggunakan bakteri sebagai penghasil enzim, misalnya spesies kelompok *Bacillus* (Tabel di bawah).

Tabel 2. Organisme produsen enzim terpilih

| Aktivitas enzim | Aplikasi/ industri | Organisme penghasil enzim | Organisme donor |
|-------------------------|--|--|---|
| Amilase (fungi) | Memanggang, pembuatan bir, pati | <i>Aspergillus oryzae</i> | <i>Aspergillus</i> spp. |
| Amilase (bakteri) | pati | <i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>B. amylolique faciens</i> | <i>Bacillus</i> spp. |
| Selulase | Baking, pembuatan bir, deterjen, tekstil | <i>Trichoderma tsesei</i> | <i>Trichoderma</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. |
| Pectate lyase | Buah dan sayuran, tekstil | <i>Bacillus licheniformis</i> | <i>Bacillus</i> spp. |
| Protease (alkali) | deterjen | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus</i> spp. |
| Protease (asam) | Produk susu (penggumpalan susu) | <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i> | <i>Mucor</i> spp. <i>Rhizamucor</i> spp. |
| Xilanase (hemiselulase) | Tekstil, pulp dan kertas | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Actinomedira</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp. |

Rekayasa genetika atau teknologi DNA rekombinan telah memungkinkan transfer gen enzim target dari satu organisme ke organisme lain. Jadi, ketika kandidat enzim yang baik untuk keperluan industri telah diidentifikasi, gen yang relevan dapat dikloning menjadi mikroba inang yang lebih produktif. Dengan cara ini menjadi mungkin untuk menghasilkan enzim industri dengan kuantitas dan kemurnian yang sangat tinggi.

Mikroba rekombinan saat ini menjadi sumber yang dominan dari berbagai jenis enzim. Tren ini akan meningkat di masa depan karena kemudahan rekayasa genetika dan variasi enzim yang hampir tidak terbatas tersedia dari mikroba di lingkungan yang beragam dan ekstrim, dari mikroba yang memiliki syarat pertumbuhan yang rumit hingga dari organisme lainnya yang

merupakan patogen potensial. Enzim dari ekstremofil seperti mikroba yang mampu tumbuh pada suhu tinggi (90–100°C) kini dapat ditumbuhkan pada mikroba mesofilik penghasil enzim yang memiliki ketahanan suhu tinggi dan dapat digunakan dalam proses industri.

Contoh terbaru dari teknologi ini adalah enzim deterjen Lipolase yang diproduksi dan telah memperbaiki proses penghilangan noda lemak pada kain. Enzim ini pertama kali diidentifikasi pada fungi *Humicola lanuginosa* pada tingkat yang tidak sesuai untuk produksi komersial. Fragmen DNA gen untuk enzim target diklon ke dalam fungi produktif *Aspergillus oryzae* dan tingkat komersial enzim tercapai. Enzim ini diproduksi massal dan terbukti efisien dalam banyak kondisi pencucian. Enzim tersebut juga sangat stabil pada berbagai suhu dan kondisi pH yang relevan dengan pencucian. Lebih lanjut, Lipolase sangat resisten terhadap aktivitas proteolitik dari protease deterjen yang umum digunakan.

Modifikasi enzim untuk memperbaiki/ mengubah sifat katalitiknya telah dilakukan selama beberapa dekade. Di masa lalu, proses ini dicapai dengan program mutasi acak, tetapi dalam beberapa tahun terakhir, teknologi canggih telah membawa perubahan besar di lapangan. Rekayasa protein atau 'operasi molekuler' telah digunakan untuk mengubah kinerja molekul enzim. Rekayasa protein melibatkan penggantian asam amino spesifik secara selektif di dalam protein untuk dengan sengaja mengubah karakteristik biokimia tertentu protein tersebut. Rekayasa protein enzim melibatkan pembuatan model grafis tiga dimensi dari enzim yang dimurnikan yang diperoleh dari data kristalografi sinar-X. Perubahan struktur enzim kemudian dapat dipertimbangkan untuk menyeleksi sisi yang mungkin menghasilkan peningkatan stabilitas, misalnya, pH dan suhu, dan perubahan molekuler yang diperlukan yang dibuat dalam pengkodean gen untuk enzim, misalnya amilase dengan stabilitas oksidasi yang ditingkatkan.

Dua jalan utama penelitian telah dilakukan untuk memodifikasi kinerja enzim. Dalam satu pendekatan, mutagenesis produk gen kloning, residu asam amino pada posisi yang ditentukan dalam struktur enzim dapat diganti dengan residu asam amino berkode lain yang sesuai. Gen yang diubah kemudian diubah menjadi organisme inang yang sesuai dan enzim mutan selanjutnya diproduksi dengan perubahan posisi yang diperlukan.

Proses ini dikenal sebagai mutagenesis situs terarah. Metode kedua yang digunakan melibatkan isolasi enzim alami dan modifikasi strukturnya dilakukan dengan cara kimiawi atau enzimatik, kadang-kadang disebut sebagai mutasi 'kimiawi'. Contoh sukses rekayasa protein baru-baru ini adalah enzim fosfolipase A2, yang dimodifikasi secara struktural untuk menahan konsentrasi asam yang lebih tinggi. Enzim ini kini banyak digunakan sebagai pengemulsi dalam produksi pangan.

Jelas, rekayasa genetika dan rekayasa protein akan berdampak dramatis pada industri enzim dalam berbagai bentuknya. Rekayasa genetika akan memastikan ekonomi produk yang lebih baik, produksi enzim dari mikroba langka, program pengembangan yang lebih cepat, dan lain sebagainya. Juga uji ekstensif enzim yang sekarang digunakan tidak menunjukkan ada tidaknya efek berbahaya pada lingkungan.

4. Teknologi Produksi Enzim

Meskipun banyak enzim yang berguna telah diturunkan dari sumber tumbuhan dan hewan, dapat diprediksi bahwa sebagian besar perkembangan teknologi enzim di masa depan akan bergantung pada enzim yang berasal dari mikroba. Bahkan dalam proses pembuatan bir, di mana amilase yang digunakan berasal dari kecambah jelai (barley) yang menghidrolisis pati dengan biaya relatif murah dan telah menunjang pengembangan teknologi pembuatan bir, kini terdapat beberapa proses kompetitif yang melibatkan enzim mikroba.

Penggunaan mikroba sebagai bahan sumber untuk produksi enzim telah berkembang karena beberapa alasan penting, yaitu:

- Biasanya ada aktivitas spesifik yang tinggi per unit berat kering produk.
- Fluktuasi musiman bahan baku dan kemungkinan kekurangan karena perubahan iklim atau pergolakan politik tidak terjadi.
- Memiliki spektrum yang luas dalam hal karakteristik enzim, seperti kisaran pH dan ketahanan suhu tinggi serta masa produksi yang singkat.
- Genetika industri telah sangat meningkatkan kemungkinan untuk mengoptimalkan hasil dan jenis enzim melalui seleksi strain, mutasi, induksi dan seleksi kondisi pertumbuhan dan terkini, dengan dukungan inovasi dari teknologi transfer gen dan rekayasa protein.

Enzim baru dari sumber yang tidak biasa kini dapat diproduksi dengan mengkloning gen yang relevan menjadi mikroba terpilih yang dikarakterisasi dengan baik dan mudah tumbuh seperti *Aspergillus oryzae*. Alasan pemilihan antara mikroba yang berbeda adalah kompleks dan melibatkan banyak faktor, apakah enzim disekresikan ke dalam media kultur atau diproduksi dan ditahan di dalam sel, dan adanya enzim berbahaya. Tergantung pada bahan sumbernya, enzim sangat berbeda dalam stabilitasnya terhadap suhu dan pH yang ekstrim. Jadi protease *Bacillus subtilis* relatif stabil terhadap panas dan aktif dalam kondisi basa dan paling cocok sebagai aditif bubuk deterjen. Sebaliknya, amilase fungi, karena kepekaannya yang lebih besar terhadap panas, lebih berguna dalam industri kue.

Ketika memilih untuk produksi enzim, ahli genetika industri harus berusaha untuk mengoptimalkan sifat yang diinginkan (hasil enzim yang tinggi, stabilitas, karakteristik penginduksi, dan lain-lain.) Sambil juga mencoba untuk menghilangkan atau menekan sifat yang tidak diinginkan (metabolit yang menyertai, bau, warna, dan lain-lain). Di masa lalu, teknik genetika tidak dipraktikkan secara luas, sebagian besar produsen mengandalkan mutagenesis terutama yang dikombinasikan dengan metode seleksi yang ketat. Ciri umum dari sebagian besar organisme penghasil enzim industri pada awalnya dianggap rumit karena genetika mereka kurang dipahami. Namun, teknologi transfer gen bersama dengan rekayasa protein dengan cepat mengubah opini tersebut dan menghadirkan cakrawala baru untuk teknologi enzim.

Bahan mentah untuk fermentasi enzim industri biasanya terbatas pada zat yang tersedia dalam jumlah besar dengan biaya rendah, dan aman secara pemenuhan nutrisi. Beberapa substrat yang paling umum digunakan adalah pati hidrolisat, molase, minuman keras berbahan jagung, whey dan beberapa sereal lainnya. Produksi enzim industri dari mikroba bergantung terutama pada kondisi media cair maupun fermentasi dengan substrat padat atau semi padat. Metode substrat padat untuk menghasilkan enzim fungi memiliki aplikasi sejarah yang panjang, terutama di Jepang dan negara-negara Timur lainnya. Dalam praktiknya, metode ini menggunakan dedak gandum lembab atau dedak padi dengan tambahan garam nutrisi sebagai substratnya. Lingkungan tumbuh biasanya terdiri dari nampan persegi panjang atau melingkar yang diadakan di ruangan bersuhu konstan. Enzim komersial yang penting diproduksi dengan cara ini termasuk amilase fungi, protease, pektinase dan selulase.

Karena enzim mikroba sebagian besar merupakan produk bervolume rendah dan berbiaya menengah, metode produksi yang menggunakan sistem kultur cair umumnya mengandalkan bioreaktor yang desain dan fungsinya serupa dengan yang digunakan dalam proses produksi antibiotik. Pemilihan media fermentasi penting dilakukan karena dapat menyuplai kebutuhan energi serta sumber karbon dan nitrogen. Biaya bahan baku akan terkait erat dengan nilai produk akhir.

Sintesis enzim dalam mikroba biasanya diatur regulasinya, yaitu enzim hanya akan diproduksi dengan adanya molekul penginduksi, paling sering terdapat pada substrat. Fungsi induker dicontohkan penggunaan pati sebagai induker dalam produksi amilase dan sukrosa untuk produksi invertase. Represi umpan balik dapat terjadi dalam biosintesis molekul kecil di mana biasanya enzim pertama dalam rantai produksi dihambat oleh produk akhir. Dalam beberapa kasus kelebihan nutrisi tertentu seperti karbon, nitrogen, dan lain-lain., dapat menghentikan atau menekan produksi enzim yang terlibat dalam senyawa terkait atau tidak terkait, mekanisme inilah yang dimaksud sebagai represi katabolik. Penggunaan penginduksi untuk produksi enzim industri seringkali sulit dan solusi yang paling umum adalah menghasilkan mutan represi katabolik di mana ketergantungan penginduksi telah dihilangkan dengan membuat mutan represi katabolik. Mutan represi katabolik yang resisten telah dikembangkan, dan juga dimungkinkan untuk mengontrol efek substrat ini dengan memasukkannya ke dalam bioreaktor dengan sistem represi umpan-balik.

Bioreaktor yang diperuntukkan sebagai penghasil enzim umumnya terbuat dari baja tahan karat dan memiliki kapasitas 10–50 m³. Secara umum, enzim diproduksi dalam fermentasi batch yang berlangsung dari 30 hingga 150 jam. Proses kultur kontinyu jarang diaplikasikan dalam produksi enzim industri. Sterilitas sistem bioreaktor menjadi hal yang sangat penting diperhatikan selama produksi hingga isolasi berlangsung.

Pada penyelesaian proses fermentasi, enzim bisa terdapat di dalam mikroba atau diekskresikan ke dalam media cair atau padat. Sediaan enzim komersial yang akan diperjualbelikan biasanya tersedia dalam bentuk padat atau cair, kasar (*crude*) atau murni. Pemurnian enzim akan dilakukan hanya jika biaya tambahan dibenarkan oleh aplikasi enzim yang dimaksudkan setelah memperhitungkan aspek urgensinya. Skala pemurnian

atau pemrosesan hilir akan menentukan pilihan teknik pemisahan, karena beberapa di antaranya sulit dioperasikan dalam skala besar.

Semua produk enzim mikroba yang akan diaplikasikan dalam makanan atau aplikasi yang berhubungan dengan medis harus memenuhi spesifikasi yang ketat terkait dengan toksisitas. Saat ini hanya sejumlah kecil mikroba yang digunakan untuk produksi enzim. Tanggung jawab untuk keamanan produk enzim tetap berada pada produsen dengan kendali pihak berwenang. Dalam praktiknya, produk enzim yang aman harus memiliki potensi alergen yang rendah, dan bebas dari bahan beracun dan mikroba berbahaya. Enzim dari sumber hewani dan tumbuhan tidak memerlukan studi toksikologi untuk dilakukan. Ketika enzim berasal dari mikroba yang secara tradisional telah digunakan dalam makanan atau pengolahan makanan yang sudah lazim dan beredar di kalangan masyarakat, maka tidak memerlukan pengujian. Enzim dari mikroba lain yang baru memerlukan pengujian ekstensif dan juga analisis untuk metabolit toksik seperti *exo-* dan *endotoksin* serta *mikotoksin*. Semua enzim komersial yang dipasok harus disertai dengan Lembar Data Keamanan Bahan secara detail, yang mencakup potensi bahaya, dan juga prosedur penanganan untuk menggunakan enzim. Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (AMFEP) adalah organisasi industri yang menetapkan pedoman untuk aspek kesehatan dan keselamatan lingkungan terkait dengan pembuatan enzim.

Enzim amobil

Hampir 95% dari semua enzim komersial dibeli dalam bentuk yang dapat larut dengan sebagian besar digunakan secara langsung dalam sekali pakai. Penggunaan enzim dalam bentuk larut atau bebas dianggap sangat boros karena enzim umumnya tidak dapat diperoleh kembali pada akhir reaksi. Bidang teknologi enzim yang terkini adalah yang berkaitan dengan amobilisasi enzim pada polimer yang tidak larut, seperti membran dan partikel, yang bertindak sebagai pendukung atau pembawa aktivitas enzim. Enzim secara fisik dibatasi selama proses katalitik yang kontinyu dan dapat diperoleh kembali dari campuran reaksi dan digunakan kembali berulang kali, sehingga meningkatkan keekonomisan proses. Proses ini hanyalah kembali ke keadaan tidak bergerak alami dari kebanyakan enzim dalam sistem kehidupan. Beberapa enzim yang cepat tidak aktif oleh panas ketika dalam bentuk

bebas dari sel dapat distabilkan dengan menempel pada penyangga polimer *inert*, sedangkan dalam contoh lain seperti enzim yang tidak larut dapat digunakan dalam lingkungan yang tidak bersifat cair. Sel mikroba utuh juga dapat diimobilisasi di dalam manik-manik poliakrilamida dan digunakan untuk berbagai fungsi katalitik. Variasi enzim baru dan seluruh sistem organisme yang kemungkinan besar tersedia dengan harga murah menghadirkan kemungkinan yang menarik untuk masa depan, terutama di bidang farmasi dan diagnostik.

Aplikasi katalis amobil saat ini terutama terbatas pada proses industri, misalnya, produksi asam amino-L, asam organik, dan sirup fruktosa. Potensi masa depan untuk biokatalis yang bersifat amobil terletak pada aplikasi baru dan pengembangan produk-produk baru sebagai alternatif dari proses yang menggunakan biokatalis yang diamobilisasi.

Enzim amobil biasanya lebih stabil daripada enzim yang dapat larut dan dapat digunakan kembali dalam bentuk sel yang dimurnikan, semi-murni atau murni. Sifat katalitik dari enzim yang tidak dapat bergerak seringkali dapat diubah dengan baik untuk memungkinkan operasi dalam kondisi reaksi yang lebih luas atau lebih ketat; misalnya isomerase glukosa amobil dapat digunakan terus menerus selama lebih dari 1000 jam pada suhu antara 60 dan 65°C. Bagaimana enzim diamobilisasi? Dalam praktiknya, metode fisik dan kimia secara rutin digunakan untuk amobilisasi enzim. Secara fisik, enzim dapat diserap ke dalam matriks yang tidak dapat larut, terperangkap di dalam gel atau dienkapsulasi dalam mikrokapsul atau di belakang membran semi-permeabel. Secara kimiawi, enzim dapat terikat secara kovalen pada penyangga padat atau ikatan silang.

Sejumlah besar reaksi kimia telah digunakan untuk pengikatan kovalen enzim melalui gugus fungsi non-esensial ke pembawa anorganik seperti keramik, kaca, besi, zirkonium dan titanium, ke polimer alami seperti sepharosa dan selulosa, dan untuk polimer sintetik seperti nilon, poliakrilamida dan polimer vinil lainnya serta kopolimer yang memiliki gugus kimia reaktif. Mekanismenya adalah melalui pengikatan kovalen enzim ke pembawa yang tidak spesifik, yaitu pengikatan enzim ke pembawa melalui gugus aktif enzim yang didistribusikan secara acak. Studi yang lebih baru telah mengembangkan teknik imobilisasi enzim di mana enzim mengikat pembawa dengan aktivitas tinggi tanpa mempengaruhi aktivitas katalitiknya. Pengikatan enzim dalam

matriks gel dicapai dengan melakukan reaksi polimerisasi atau pengendapan/ koagulasi enzim tersebut. Poliakrilamida, kolagen, silika gel, telah terbukti dapat bekerja sebagai matriks yang sesuai, tetapi proses penambatan relatif sulit dan menghasilkan aktivitas enzim yang rendah.

Seluruh sel mikroba yang tidak dapat bergerak semakin banyak digunakan dan cenderung menghilangkan langkah-langkah pemurnian enzim yang panjang, memakan waktu dan mahal. Amobilisasi seluruh sel biasanya dicapai dengan metode yang sama seperti untuk menghasilkan enzim bebas. Potensi terbesar untuk sistem sel amobilisasi terletak pada penggantian fermentasi kompleks, seperti pembentukan produk sekunder misalnya antibiotik semi sintetik dalam proses kimia yang berkelanjutan melalui elektroda enzim, analisis air dan pengolahan limbah, proses malting berkelanjutan, fiksasi nitrogen, sintesis steroid dan produk medis penting lainnya.

Sebagai konsekuensi dari teknik amobilisasi yang berhasil dalam bentuk kapsul enzim, manik-manik enzim, kolom enzim, dan membran enzim, banyak jenis bioreaktor telah dikembangkan pada skala laboratorium dan pada skala industri. Pengembangannya termasuk bioreaktor tangki batch berpengaduk, bioreaktor kontinu, dan bioreaktor terfluidisasi kontinu. Dalam praktik industri, sifat katalitik dari enzim yang diisolasi, enzim yang tidak dapat bergerak atau sel utuh yang tidak dapat bergerak umumnya digunakan dalam batas-batas bejana bioreaktor. Sistem bioreaktor dapat memiliki banyak bentuk, tergantung pada jenis reaksi dan kestabilan enzim. Di Eropa, penisilin asilase amobil digunakan untuk membuat asam 6-aminopenicillanic (6-APA) dari penisilin G atau V yang diproduksi secara alami. Senyawa ini merupakan perantara penting dalam sintesis penisilin semisintetik yang sangat penting dalam memerangi penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Dua jenis penisilin diproduksi oleh fermentasi industri: penisilin G (fenil asetil-6-APA) dan penisilin V (fenoksi asetil-6-APA) masing-masing mengandung inti 6-APA dan rantai samping. Aktivitas antibiotik molekul penisilin diatur oleh rantai samping, yang bila dilepas dan diganti dengan yang lain dapat sangat mengubah spektrum antibiotik dan sifat lainnya. Berbagai perusahaan farmasi sekarang mengoperasikan proses enzim yang tidak dapat bergerak untuk produksi 6-APA pada skala industri. Setidaknya 3500 ton 6-APA diproduksi setiap tahun yang membutuhkan produksi sekitar 30

ton enzim (Khan, 2020; Vogel & May, 2019; Illanes, 2008; Aehle, 2007).

Isomerase glukosa amobil digunakan di AS, Jepang, dan Eropa untuk produksi industri sirup fruktosa tinggi dengan isomerisasi parsial glukosa yang berasal dari pati. Ribuan ton sirup fruktosa tinggi diproduksi setiap tahun oleh proses enzim isomerase, yang merupakan enzim yang paling banyak digunakan dari semua enzim amobil lainnya. Keberhasilan industri dan komersial dari proses ini disebabkan oleh fakta-fakta berikut: glukosa yang diperoleh dari pati relatif murah; fruktosa lebih manis dari glukosa; sirup fruktosa tinggi mengandung glukosa dan fruktosa dalam jumlah yang kira-kira setara, dan dari aspek nutrisinya mirip dengan sukrosa.

Penggunaan penting lain dari enzim amobil adalah produksi asam amino aminoacylase. Kolom aminoacylase digunakan di Jepang untuk menghasilkan ribuan kilogram L-metionin, L-fenilalanin, L-triptofan dan L-valin. Konjugat polimer-enzim sekarang digunakan secara luas dalam kimia analitik dan klinis. Kolom atau tabung enzim yang tidak dapat bergerak dapat digunakan berulang kali sebagai katalis khusus dalam pengujian substrat.

Enzim telah lama digunakan dalam berbagai macam diagnostik dari pengujian komprehensif yang banyak digunakan hingga biosensor yang kompleks. Senyawa yang akan dianalisis menjadi substrat dalam reaksi yang dikatalisis oleh enzim yang menghasilkan sinyal yang dapat dideteksi seperti perubahan absorbansi, yang kemudian dapat direkam dan diperoleh kalkulasi yang sesuai. Kekhususan sistem pengujian akan berhubungan dengan kekhususan substrat dari enzim yang digunakan. Enzim amobil secara teratur digunakan untuk tujuan analitis. Enzim dapat terikat secara non-kovalen ke kertas khusus dan menjadi strip uji untuk pengujian dalam sampel biologis, mis. darah, urin, dan lain-lain. Ketika digunakan biosensor inkompleks, misalnya berupa oksidoreduktase, yang dapat bertindak sebagai pengenalan analit perantara spesifik. Interaksi enzimatik yang dihasilkan kemudian ditransfer melalui komponen 'transduser' menjadi sinyal listrik, kemudian diperkuat dan diproses secara elektronik.

Elektroda enzim adalah jenis detektor atau biosensor baru yang dirancang untuk pengujian potensiometri atau amperometri substrat seperti urea, asam amino, glukosa, alkohol, dan asam

laktat. Dalam desainnya, elektroda terdiri dari sensor elektrokimia yang diberikan dalam kontak dekat dengan membran enzim yang bersifat permeabel dan tipis yang mampu bereaksi secara khusus dengan substrat yang diberikan. Enzim yang tertanam dalam membran menghasilkan oksigen, ion hidrogen, amoniumion, karbon dioksida atau molekul kecil lainnya tergantung pada reaksi enzimatik yang terjadi, yang dapat dideteksi oleh sensor spesifik. Besarnya respons menentukan konsentrasi substrat. Meskipun komponen biologis dalam biosensor lebih sering berupa sistem enzim atau multienzim, juga dapat berupa antibodi, organel, sel mikroba, atau seluruh sayatan jaringan.

Penerapan teknologi enzim pada berbagai proses, misalnya pembuatan wine, pengolahan makanan, obat-obatan, farmasi, industri kimia, pengolahan limbah, dan lain-lain, memiliki potensi yang sangat besar dan melihat ke masa depan. Tampaknya tidak berlebihan untuk mengharapkan bahwa produksi dan aplikasi enzim akan terus berkembang. Kepedulian dunia yang berkembang tentang lingkungan dan sumber daya alam, kenaikan harga minyak dan bahan mentah lainnya, dan kekhawatiran akan pemanasan global mendorong terbukanya jalan baru untuk penelitian dan akan semakin berkurang berbagai keraguan bahwa enzim akan memainkan peran utama dalam memecahkan beberapa masalah ini (Khan, 2020; Vogel & May, 2019; Kuddus, 2019; Punekar, 2018; Ray & Rosell, 2017; Liu, 2017; Andrés Illanes, 2008; Ahle, 2007).

BAB IV

TEKNOLOGI GENERATOR BIO-FUEL

1. Pemanasan Global dan Kritisnya Bahan Bakar Fosil

Secara perlahan namun sangat pasti, kita terus menghabiskan energi bahan bakar fosil yang hingga kini masih tersedia sehingga perlu mencari sumber energi alternatif. Sumber energi alternatif yang dimaksud termasuk pemanfaatan biomassa berbasis tanaman, tenaga air, pasang surut, gelombang dan angin, penangkapan pasokan energi matahari dan panas bumi, dan tenaga nuklir. Saai ini, sistem energi surya biologis yang telah dikembangkan dan menjadi kebanggaan atas kemajuan bioteknologi di bidang sumber daya energi akan membuka jalan lebar menuju penanganan krisis energi yang berimplikasi pada realitas peningkatan ekonomi global. Keterbatasan sumber daya bahan bakar fosil yang semakin menipis dan menjadi semakin mahal juga membuka peluang untuk mengembangkan teknologi konversi residu organik menjadi bahan bakar.

Ada tiga arah utama yang dapat ditempuh untuk mencapai pasokan biomassa sebagai opsi sumber bahan bakar: (1) budidaya tanaman yang menghasilkan energi, (2) pemanenan tumbuhan alami, dan (3) pemanfaatan limbah pertanian dan organik lainnya. Konversi biomassa yang dihasilkan menjadi bahan bakar yang dapat digunakan dapat dilakukan dengan cara biologis atau kimiawi atau dengan kombinasi keduanya. Dua produk akhir utama yang akan terbentuk adalah metana atau etanol meskipun produk lain dapat muncul tergantung pada biomassa awal dan

proses yang digunakan, misalnya bahan bakar padat, hidrogen, gas energi rendah, metanol, dan hidrokarbon rantai panjang (Srivastava et al., 2020; Viele et al., 2020; De Blasio, 2019; Collins et al., 2015; Michaelides, 2012; Hallenbeck, 2012;).

Meskipun biomassa pada akhirnya hanya dapat memasok sejumlah kecil kebutuhan energi dunia, namun nilai keseluruhannya sangat besar. Di beberapa belahan dunia, seperti Brazil dan negara-negara dengan kondisi iklim serupa, biomassa telah dan akan dieksploitasi dan dimanfaatkan secara lebih luas. Sekalipun masih dapat diidentifikasi beberapa kerugian ketika membandingkannya dengan batu bara atau minyak, tetapi fakta bahwa biomassa berbasis tanaman bersifat terbarukan serta tidak harus menuntut penelitian lebih lanjut. Pada waktunya, biomassa akan menjadi jauh lebih mudah tersedia dan berguna secara ekonomi sebagai sumber energi bagi umat manusia.

Energi untuk keperluan industri, komersial dan perumahan, pembangkit listrik dan transportasi terutama dipasok oleh bahan bakar fosil (batu bara, gas dan minyak) dan tenaga nuklir. Saat ini disinyalir secara luas bahwa perubahan iklim sangat terkait dengan peningkatan gas rumah kaca di atmosfer, dan bahwa aktivitas manusia terutama melalui pembakaran bahan bakar fosil merupakan faktor penyumbang utama atas fenomena tersebut.

Salah satu gas rumah kaca utama, yang menyumbang 65% dari pemanasan global, adalah karbon dioksida. Bahan bakar fosil adalah energi yang tersimpan dari ribuan tahun lalu yang telah dibakar umat manusia secara ekstensif selama beberapa abad dan lebih subur dalam beberapa dekade terakhir. Ketika bahan bakar fosil dibakar untuk energi, karbondioksida yang telah terkunci selama bertahun-tahun dilepaskan ke atmosfer yang akan sangat berkontribusi dalam menambah gas rumah kaca secara global. Sebaliknya, ketika bahan tanaman saat ini dibakar, karbon yang terkunci dalam biomassa untuk waktu yang relatif singkat dilepaskan kembali ke atmosfer sehingga mendaur ulang karbon dioksida. Akibatnya, sistem ini relatif netral karbon, tidak seperti pembakaran bahan bakar fosil.

Emisi global karbondioksida dari bahan bakar fosil selama lima tahun pertama milenium ketiga ini empat kali lebih besar daripada sepuluh tahun sebelumnya, terlepas dari keputusan Perjanjian Kyoto untuk mengurangi emisi karbon dioksida. Kadar karbon dioksida di atmosfer dunia adalah 380 ppm, sekitar 100ppm lebih tinggi daripada sebelum Revolusi Industri 200

tahun lalu. Terungkap bahwa jika tingkat karbon dioksida meningkat menjadi sekitar 450-500 ppm maka akan terjadi perubahan iklim yang tidak lagi dapat diubah (Srivastava et al., 2020; Viele et al., 2020; De Blasio, 2019; Collins et al., 2015; Michaelides, 2012; Hallenbeck, 2012;).

Masalah energi telah menjadi obyek perhatian global dan telah terjadi peningkatan yang nyata dari kepentingan publik dan politik. Permintaan energi diperkirakan akan meningkat dua kali lipat antara tahun 2000 dan 2050 sebagai akibat dari peningkatan populasi global dan pertumbuhan produk domestik bruto. Akibatnya, permintaan dan pasokan energi masa depan menjadi masalah yang semakin krusial bagi negara-negara di seluruh dunia.

Sumber energi bahan bakar fosil telah menjadi sumber kehidupan semua peradaban industri, dan telah memberikan kontribusi besar terhadap kepedulian terhadap gas rumah kaca saat ini. Sementara sebagian besar negara industri sekarang berusaha untuk mengurangi emisi karbon dari aktivitas produksi, bahkan sekarang diwajibkan untuk membantu negara berkembang yang berusaha untuk meningkatkan standar hidup dengan membantu mereka untuk menghentikan penggunaan teknologi energi yang tidak tepat dan tidak efektif saat ini yang memicu perkembangan industri di negara-negara tersebut, tetapi menggadaikan lingkungan dalam prosesnya (Chang, 2020; Viele et al., 2020; De Blasio, 2019; Gupta & Tuohy, 2013; Lee, 2013; Pogaku & Sarbatly, 2013).

a) Fotosintesis: sumber energi tertinggi

Di seluruh dunia, tanaman dan ganggang melakukan reaksi kimia yang sulit dieksperimenkan di laboratorium, karena tanaman tersebut menggunakan energi dari sinar matahari untuk memecah air menjadi hidrogen dan oksigen. Enzim yang bertanggung jawab atas reaksi pemisahan air adalah reduktase foto-oksidase. Di dalam sel fotosintesis, hidrogen akan bergabung dengan karbon dioksida dari atmosfer untuk menghasilkan segudang senyawa organik yang mengandung karbon termasuk gula, pati, protein, dan lain-lain, yang menjadi tumpuan kehidupan di seluruh dunia. Oksigen yang dilepaskan ke atmosfer sangat penting untuk sebagian besar bentuk kehidupan di planet ini, selain itu juga membantu menjaga lapisan ozon yang melindungi planet dari radiasi ultraviolet yang merusak.

Organisme fotosintetik, baik darat maupun laut, dapat dianggap sebagai konverter energi matahari berkelanjutan dan selalu dapat diperbarui. Fotosintesis tanaman saja memperbaiki sekitar 2×10^{11} ton karbon dengan kandungan energi 2×10^{21} Joule, yang mewakili sekitar 10 kali penggunaan energi tahunan dunia dan 200 kali konsumsi energi makanan kita. Besarnya dan peran fotosintesis sebagian besar tidak dihargai karena kita menggunakan sebagian kecil dari karbon tetap. Jangan dilupakan bahwa fotosintesis di masa lalu menyediakan semua sumber karbon fosil saat ini, yaitu batu bara, minyak, dan gas alam. Dengan demikian, biomassa turunan fotosintesis yang ada dalam berbagai bentuk yang tersedia di lingkungan dapat dengan baik diubah menjadi bahan bakar penyimpanan dan bahan baku kimia, seperti bioetanol, biodiesel dan gas metana. Efisiensi aktual penangkapan energi matahari oleh tanaman hijau dapat mencapai 3–4%, tanaman fotosintesis yang lebih efektif seperti jagung, sorgum, dan terutama tebu menjadi sumber yang paling produktif.

Ketika tanaman ditanam untuk produksi biofuel, dapat dianggap sebagai bagian penting dari masyarakat yang terbarukan dan berkelanjutan. Terbarukan karena tanaman dapat dipanen dan ditanam kembali, dan berkelanjutan karena emisi karbon yang dihasilkan selama pembakaran diserap kembali oleh pertumbuhan tanaman baru. Dengan demikian, siklus dapat berlanjut tanpa batas.

Cadangan bahan bakar fosil memiliki sifat yang terbatas. Istilah 'minyak puncak' digunakan untuk mengidentifikasi titik di masa depan ketika, misalnya, produksi minyak akan mencapai puncak dan mulai menurun. Terkait dengan peningkatan dramatis industrialisasi saat ini, misalnya di Cina dan India, hal ini menimbulkan tekanan ekonomi dan perdagangan yang meningkat untuk pasokan energi alternatif dan dapat diandalkan. Hal ini melampaui kekhawatiran dunia yang terus berlanjut tentang pemanasan global. Biomassa dapat dianggap sebagai sumber energi terbarukan, dan dapat diubah menjadi energi langsung atau senyawa pembawa energi dengan pembakaran langsung, sistem pencernaan anaerobik, distilasi destruktif, gasifikasi, hidrolisis kimiawi, dan hidrolisis biokimia.

b) Biofuel dari biomassa

Bioenergi (biofuel) pada dasarnya adalah produksi energi yang dapat terbakar/ dapat digunakan dari sumber biologis. Energi

tersebut bisa berupa bahan bakar cair, misalnya bioetanol dan biodiesel, bahan bakar gas seperti metana, atau energi panas padat langsung, misalnya kayu.

Beberapa tanaman berkayu yang dapat segera ditebang, dapat ditanam untuk menawarkan sumber bahan bakar langsung untuk digunakan sebagai pembangkit listrik untuk menghasilkan energi listrik. Beberapa keberhasilan yang cukup besar diraih di luar negeri seperti Skandinavia dan Kanada. Di bagian lain Eropa dengan lahan pertanian yang sangat luas akibat pengurangan penanaman sereal, lahan tersebut telah digunakan untuk budidaya tanaman berkayu untuk produksi energi bahan bakar.

Tabel 3. Beberapa tanaman sumber energi biologis utama

| | |
|--------------------------|--|
| Tanaman penghasil gula | Tebu: gula diekstraksi dan difermentasi menjadi bioetanol. |
| Tanaman penghasil pati | Jagung, barley, gandum, oat, singkong: pati dihidrolisis secara enzimatis menjadi gula dan difermentasi menjadi bioetanol. |
| Tanaman/ limbah selulosa | Jerami, ampas tebu, limbah kayu, pohon yang ditebang: hemiselulosa dapat dihidrolisis secara enzimatis menjadi gula dan difermentasi menjadi bioetanol. |
| Tanaman penghasil minyak | Rapeseed, biji rami, bunga matahari, minyak jarak, kacang tanah: minyak diekstraksi dan ditransesterifikasi menjadi biodiesel. |
| Sampah/ kotoran organik | Fermentasi mikroba yang kompleks menjadi metana/ metanol. |
| Tanaman energi padat | Pohon yang ditebang, sorgum, alang-alang, rerumputan, Eucalyptus: pembakaran langsung sendiri atau dengan sumber konvensional lainnya, misalnya batu bara. |

Inisiatif pengembangan tanaman non-pangan mendorong budidaya tanaman yang dapat diproses menjadi biofuel, bahan bangunan, pengemasan, bahan kimia khusus, dan obat-obatan. Program serupa terjadi di negara-negara Uni Eropa lainnya yang menggunakan lahan yang disisihkan untuk mengurangi produksi berlebih tanaman pangan. Konversi biomassa menjadi bahan bakar yang dapat digunakan dapat dilakukan dengan cara biologis atau kimiawi atau dengan kombinasi keduanya. Produk akhir utamanya adalah metana, etanol, dan biodiesel, meskipun produk lain dapat muncul tergantung pada biomassa awal dan proses

yang digunakan, misalnya bahan bakar padat, hidrogen, gas berenergi rendah, metanol, dan hidrokarbon rantai panjang.

Konsep budidaya biomassa tanaman khusus untuk pasokan energi didasarkan pada fakta bahwa hasil karbon tetap yang jauh lebih tinggi dapat diperoleh dari metode penanaman yang direncanakan dengan baik daripada dari memanen tumbuhan alami atau mengumpulkan limbah pertanian atau industri. Program tersebut kini sedang direncanakan dan dipraktikkan secara luas di banyak negara di seluruh dunia. Tebu dan jagung adalah dua tanaman utama yang sedang dikembangkan (terutama untuk produksi bioetanol) di Brazil, Australia, Amerika Serikat dan Afrika Selatan, di sisi lain program berbasis lignoselulosa pun sedang dikembangkan di Swedia, Kanada dan Amerika Serikat. Dalam kasus terakhir, rencana sedang dibuat untuk menumbuhkan hutan untuk dikonversi menjadi bahan bakar cair. Analisis biaya dari semua proses ini menawarkan dorongan yang cukup besar, khususnya dengan konversi tebu menjadi energi.

Perkebunan tanaman sumber energi diyakini akan memasok energi dalam jumlah yang berarti dalam waktu dekat. Masalah kekurangan air didorong dengan rendahnya curah hujan yang paling sering menjadi faktor pembatas suksesnya perkebunan dalam kondisi intensitas radiasi matahari yang ideal, jam sinar matahari tahunan, musim dingin yang sejuk dan berlimpahnya lahan berkualitas baik. Di wilayah-wilayah tertentu di dunia mungkin saja perkebunan seperti itu akan cepat menjadi kenyataan, tetapi untuk sebagian besar negara pembangunan akan berpusat pada pemanfaatan limbah organik, yaitu pertanian, kota dan industri. Konversi menjadi biofuel bisa berfungsi sebagai pengganti energi minyak bumi dan sebagai bahan baku kimia (Luque et al., 2011; Virdis et al., 2011; Smith, 2009).

Pengolahan teknis biomassa tergantung pada banyak faktor, termasuk tingkat kelembaban dan kompleksitas kimiawi. Dengan bahan yang memiliki kadar air tinggi, pemrosesan air adalah normal untuk menghindari kebutuhan pengeringan substrat. Fermentasi alkohol menjadi etanol, pencernaan anaerobik menjadi metana, serta reduksi kimiawi menjadi hidrokarbon berminyak, semuanya sangat dimungkinkan. Bahan dengan tingkat kelembaban rendah seperti kayu, jerami dan ampas tebu dapat dibakar untuk menghasilkan panas atau meningkatkan uap untuk pembangkit listrik. Secara umum semua itu mengalami proses termokimia seperti gasifikasi dan pirolisis untuk menghasilkan

senyawa kaya energi seperti gas minyak, arang dan akhirnya metanol dan amonia. Dapat pula diolah dengan alkali atau hidrolisis biologis. Produksi alkohol melalui fermentasi gula dan pati merupakan seni kuno dan sering dianggap sebagai salah satu proses mikroba pertama yang digunakan oleh manusia, yang secara kimiawi terjadi reaksi sebagai berikut:



Produksi alkohol industri dengan fermentasi sangat mengandalkan pengetahuan yang terkumpul dari pembuat/penyuling. Saat ini produksi alkohol oleh industri sebagian besar bersifat sintetis, yaitu non-mikroba, yang berasal dari proses petrokimia. Petrokimia etanol dibuat dengan hidrasi etena, dan penurunan produksi alkohol oleh mikroba, sehingga hampir semua berasal dari produksi etena skala besar sejak tahun 1940-an. Dalam 20 tahun berikutnya pengembangan pemecahan minyak bumi skala besar, produksi industri alkohol fermentasi turun di bawah produksi alkohol yang dapat diminum di sebagian besar negara industri. Jadi, di negara-negara yang secara teknologi lebih maju, etanol diproduksi dengan cara kimiawi. Sekalipun pada beberapa negara berkembang di mana bahan baku murah tersedia, etanol masih diproduksi untuk keperluan industri dengan menggunakan teknik fermentasi tradisional.

Meskipun manfaat etanol sebagai bahan bakar cukup besar, karena bersifat hemat energi, tidak menghasilkan karbon monoksida beracun selama pembakaran sehingga jauh lebih sedikit mencemari dibanding bahan bakar konvensional, dan masih lebih murah untuk memproduksi etanol dari minyak secara kimiawi daripada dengan proses fermentasi sebagaimana harga minyak saat ini. Dengan cara ini, penggunaan etanol, seperti halnya bahan bakar alternatif lainnya, secara ekonomi terhambat di negara-negara industri hingga harga minyak kembali naik. Tidak dapat dipungkiri bahwa hal itu akan terjadi, walaupun masih sulit untuk diprediksi. Namun, kekhawatiran dunia tentang pemanasan global perlahan dan pasti secara dramatis akan mempengaruhi pilihan bahan bakar.

Perubahan dramatis dalam ekonomi produksi alkohol akibat kenaikan besar-besaran harga minyak mentah dunia terjadi sejak tahun 1970-an. Sementara harga minyak telah meningkat lebih dari empat kali lipat sejak tahun 1975, harga karbohidrat murah yang sesuai telah meningkat jauh lebih sedikit secara rata-rata. Negara-negara pengimpor minyak sangat ingin mengurangi biaya

impor dan banyak negara yang akhirnya mengambil langkah alternatif dengan mensubsidi bahan bakar yang diproduksi dalam negeri. Karena etanol dapat digunakan sebagai bahan bakar formotor pengganti parsial atau lengkap dan juga dapat dengan mudah diubah menjadi etana dan senyawa terkait, produksinya dari sumber daya asli dan terbarukan sekarang menjadi strategi alternatif yang menarik untuk dikembangkan.

Secara historis, etanol dan metanol digunakan secara luas sebagai bahan bakar motor di Eropa sebelum Perang Dunia II dan, memang, mobil model T Henry Ford dirancang untuk beroperasi dengan alkohol, bensin, atau campuran apa pun di antaranya. Proses bioteknologi yang luas beroperasi di berbagai negeri, mengubah tebu dan singkong menjadi bioetanol dengan fermentasi ragi. Program Etanol Nasional Brasil misalnya yang dikenal sebagai proalcohol merupakan tanggapan atas guncangan minyak pada tahun 1970-an dan kini telah berhasil mengurangi ketergantungan negara tersebut pada bahan bakar fosil. Bioetanol sekarang menyumbang 40% dari bahan bakar motor Brasil. Program etanol Brasil mencapai kejayaan dengan output produksi sekitar 5 miliar liter etanol pada awal 1980-an kini melejit dengan cepat menjadi 15 miliar liter pada tahun 2005. Keberhasilan Brasil yang tidak diragukan lagi dalam memelopori produksi 'green-bensin' tersebut akhirnya menarik minat dunia, terutama di antara negara-negara yang lebih miskin dengan iklim dan lahan yang sangat memadai untuk menanam tanaman sumber bahan bakar mereka sendiri dan memiliki keterbatasan dalam kecukupan dengan mata uang untuk membeli minyak. Bahkan negara majupun, seperti Australia, AS, Swedia, dan Kanada, ikut mengembangkan proses produksi etanol biologis ekstensif yang memanfaatkan surplus pertanian atau limbah kehutanan yang relatif besar dan kurang termanfaatkan sebelumnya.

Tiga miliar Liter bahan bakar alkohol difermentasi di AS dari jagung pada tahun 1987 dan sepertiga dari seluruh bensin yang tersedia di Amerika adalah 10% etanol atau gasohol yang berasal dari limbah pertanian dan kehutanan. Para pemangku kepentingan Brasil kemudian memperkirakan bahwa seluruh kebutuhan bensin negara mereka dapat dipenuhi dari menanam 0,3% dari luas negara mereka dengan tanaman penghasil alkohol. Lebih dari 500 pabrik fermentasi dan destilasi telah dibangun di berbagai penjuru negeri yang bertujuan untuk memproses tanaman yang diproduksi sepanjang tahun. Surplus tambahan yang diperoleh untuk pembangkit energi adalah tersedianya lebih

dari 700.000 lapangan pekerjaan secara langsung yang baru dan 300.000 lapangan pekerjaan tidak langsung di daerah pedesaan Brasil.

Namun, skenario ekonomi untuk program bioetanol Brasil dipengaruhi oleh harga minyak dunia dari masa ke masa. Pada tahun 1985, produksi etanol telah meningkat menjadi 12 miliar liter dan pada tahun 1988, 88% mobil baru menggunakan mesin etanol. Produksi etanol relatif stabil sekitar 12 miliar liter pada tahun 1990-an, dan sejauh itu penggunaannya sangat signifikan meningkatkan perekonomian nasional di Brazil.

Ada banyak keuntungan tidak langsung bagi Brasil dalam menggunakan bioetanol sebagai pengganti bensin. Selain ada pengurangan yang pasti dalam kontribusinya terhadap pemanasan global. Penambahan bioetanol anhidrat ke bensin terbukti mampu menekan kebutuhan untuk meningkatkan oktan demi menaikkan peringkat oktan. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa mesin bertenaga etanol menghasilkan 57% lebih sedikit karbon monoksida, 64% lebih sedikit hidrokarbon, dan 13% lebih sedikit oksida nitrat daripada kendaraan bertenaga bensin.

Armada mobil bahan bakar fleksibel di Brasil adalah satu-satunya negara di dunia yang dapat menggunakan 100% bioetanol atau green-bensin. Pertimbangan ekonomi terus berubah demi produksi bioetanol, dengan antisipasi fluktuasi harga minyak di masa depan dan konsep desain baru untuk mesin berbasis bioetanol. Lebih jauh lagi, pada aspek global, produksi green-bensin akan membantu mengurangi beban negara terhadap tekanan dari produk minyak bagi seluruh dunia, mengurangi ketegangan persaingan dan bahkan mungkin perang. Program bioetanol untuk bahan bakar tersebut memerlukan investasi modal yang besar dan akan sesuai dengan kebutuhan skala besar dan tidak cukup dengan sistem pertanian skala kecil, di mana produk metana lebih cocok untuk diproduksi secara massal.

Untuk menyediakan gula yang dapat difermentasi yang diperlukan, sebagian besar bahan mentah memerlukan beberapa tingkat perlakuan awal, tergantung pada komposisi kimianya. Dengan tebu, perawatan ini minimal dan terutama terdiri dari operasi penggilingan biasa, sedangkan jagung atau singkong, yang mengandung pati, memerlukan tindakan zat sakarifikasi yang sesuai - baik hidrolisis asam atau hidrolisis enzim. Bahan baku selulosa seperti kayu dan jerami membutuhkan perlakuan awal

yang lebih ekstensif, dan ini tercermin dari peningkatan input energi yang dibutuhkan.

Tabel 4. Potensi bahan baku untuk produksi bahan bakar etanol

| Mengandung pati | Mengandung selulosa | Mengandung gula | Lainnya |
|---|---|--|--|
| Sereal: <ul style="list-style-type: none"> • Jagung • Sorgum • Gandum • Barley | <ul style="list-style-type: none"> • Kayu • Serbuk gergaji • Limbah kertas • Residu hutan • Residu pertanian | <ul style="list-style-type: none"> • Sukrosa • Gula tetes • Bit gula • Bit pakan • Tebu | <ul style="list-style-type: none"> • Kismis • Pisang |
| Produk penggilingan: <ul style="list-style-type: none"> • Tepung terigu • Tepung gandum • Pakan bubur jagung. | <ul style="list-style-type: none"> • Kota padat limbah • limbah ternak intensif | <ul style="list-style-type: none"> • Laktosa • Air dadih • Glukosa • Limbah sulfat | |
| Umbi bertepung: <ul style="list-style-type: none"> • Singkong • Kentang | | | |

Peningkatan ekonomi global melalui pengembangan produk etanol fermentasi dari budidaya tanaman tertentu di negara berkembang akan memperoleh dukungan secara tidak langsung oleh perluasan pertanian, dan bermuara pada terciptanya lebih banyak lapangan kerja, karena harga minyak akan terus melampaui bahan baku pertanian, dan karena teknologi baru dalam produksi bahan bakar etanol akan menciptakan penguatan ekonomi yang berkelanjutan. Terhadap volume limbah atau sisa dari produksi alkohol yang dihasilkan dalam jumlah yang sangat besar, terus dilakukan upaya pencarian pengolahan menjadi produk akhir yang bermanfaat. Beberapa produk yang dapat diharapkan dari pengolahan limbah tersebut diantaranya:

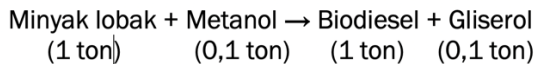
- (1) bahan pengolahan pakan atau pupuk dalam pertanian
- (2) mineralisasi menjadi abu
- (3) fermentasi anaerobik untuk menghasilkan metanol
- (4) konversi mikroba menjadi Protein Sel Tunggal (PST).

2. Biodiesel

Solar konvensional sebagai bahan bakar transportasi yang penting, merupakan produk sampingan dari proses penyulingan

minyak mentah, yang juga menghasilkan pembentukan bensin, serta memiliki kandungan aromatik dan sulfur yang tinggi. Sebaliknya, biodiesel diproduksi dari minyak nabati (misalnya minyak lobak) dan sekarang menjadi alternatif yang layak diperhitungkan untuk bahan bakar diesel menggantikan yang konvensional.

Metode yang paling berhasil dalam memproduksi biodiesel adalah dengan trans-esterifikasi minyak nabati dengan metanol (atau etanol) dengan adanya katalis, natrium hidroksida, pada suhu 50°C yang menghasilkan pembentukan asam lemak metil ester dan gliserol. Gliserol dibiarkan mengendap dan biodiesel dimurnikan dan digunakan secara langsung, atau sebagai campuran, dengan solar sebagai bahan bakar. Ilustrasi produksi biodiesel dari minyak nabati berupa minyak lobak sebagai berikut:



Biodiesel memiliki karakteristik kimiawi yang mirip dengan bahan bakar diesel konvensional dalam hal pembakaran pada mesin diesel modern. Minyak yang dapat digunakan antara lain rapeseed, kedelai, canola dan juga minyak jelantah; metanol mudah diperoleh dari gas alam, biogas atau batu bara, sedangkan gliserol adalah produk sampingan yang berharga dan mudah dijual, sehingga dapat mengimbangi sebagian biaya produksi. Metode dasar ini sekarang banyak digunakan di seluruh dunia, terutama di beberapa bagian Eropa dan Amerika Serikat. Keunggulan utama biodiesel dibandingkan diesel yang berasal dari bahan bakar fosil adalah sebagai berikut:

- Mengurangi ketergantungan pada penggunaan/ impor bahan bakar fosil;
- Memiliki titik nyala yang lebih rendah sehingga tidak mudah menyala;
- Bebas senyawa aromatik dan sulfur beracun;
- Biodegradable - mengurangi kerusakan lingkungan akibat tumpahan;
- Biodiesel berasal dari bahan baku yang dapat diperbarui.

Mesin diesel konvensional tidak memerlukan modifikasi untuk dioperasikan dengan biodiesel yang digunakan dalam kondisi murni atau dicampur dengan diesel. Ekonomi bahan bakar dan tenaga yang dihasilkan relatif sama. Keunggulan utama yang paling

penting adalah bahwa tidak seperti diesel, biodiesel menghasilkan peningkatan kualitas karbon dioksida yang dilepaskan ke atmosfer melalui pembakaran, yaitu karbon netral.

Uni Eropa, khususnya Prancis, Italia dan Jerman, telah menjadi pendukung utama industri biodiesel. Prancis mendukung untuk alasan pertanian, Italia untuk alasan lingkungan, dan Jerman untuk keduanya. Berbagai sistem transportasi umum perkotaan di negara-negara tersebut menggunakan mesin yang membakar biodiesel, sehingga meningkatkan citra lingkungan menjadi lebih baik. Italia bahkan telah memberikan preferensi untuk penggunaan biodiesel sebagai bahan bakar untuk menghancurkan bangunan kota.

Produksi biodiesel masih lebih mahal daripada bahan bakar diesel konvensional, maka untuk menunjangnya pemerintah di Uni Eropa menerapkan kebijakan dalam bentuk berbagai bentuk insentif pajak untuk mendorong penggunaan, yaitu pengurangan pajak bahan bakar yang lebih rendah dibandingkan dengan bahan bakar fosil. Subsidi produksi minyak lobak di negara-negara Uni Eropa terus dilakukan dengan mendorong para petani agar menanam tanaman untuk kepentingan industri, ekonomi dan ekologi daripada melanjutkan dengan tanaman pangan komersial konvensional yang umumnya diproduksi berlebihan. Namun, di belahan dunia lain, substitusi biodiesel akan sangat dipengaruhi oleh luas lahan pertanian yang dapat dialihkan dari produksi pangan ke produksi minyak nabati untuk dijadikan sebagai bahan baku biofuel. Bioetanol juga dapat digunakan untuk menggantikan metanol asal fosil yang digunakan dalam reaksi esterifikasi. Dengan cara ini, penggunaan bioetanol akan meningkat dan biodiesel akan diperoleh dari sumber daya terbarukan sepenuhnya.

Amerika Serikat memiliki program industri baru yang menarik dengan menggabungkan produksi bioetanol dengan produksi biodiesel dengan menggunakan jagung sebagai bahan baku. Produksi bioetanol dari jagung dilakukan dengan mengolah biji-bijian penyuling kaya minyak yang dihasilkan melalui penggilingan jagung, yang biasanya diambil untuk pakan ternak, itulah yang digunakan untuk produksi biodiesel. Menciptakan bahan bakar terbarukan lain dari produk sampingan yang ada dari proses produksi bioetanol adalah bisnis yang ramah lingkungan dan bernilai ekonomi yang baik. Keseluruhan proses masih menghasilkan pakan yang lebih efektif dengan kandungan protein

dan lemak yang lebih tinggi dibandingkan dengan campuran sebelumnya, sehingga proses tersebut betul-betul mampu menghasilkan produk sampingan yang bermanfaat.

Estimasi yang dilakukan untuk setiap 100 juta galon bioetanol, 7–8 juta galon biodiesel akan diproduksi. Formulasi yang diusulkan untuk menggunakan biodiesel dengan campuran 2% dengan solar yang diturunkan dari bahan bakar fosil. Sedangkan bioetanol harus dikirim ke kilang dengan kereta api, biodiesel akan diangkut melalui jalur pipa minyak yang ada. Diharapkan pabrik ini akan menghasilkan 30 juta galon biodiesel per tahun, yang berarti lima kali produksi fasilitas biodiesel yang ada.

3. Metana

Gas metan dapat digunakan untuk pembangkit energi mekanik, listrik dan panas, dan sekarang banyak digunakan sebagai sumber bahan bakar untuk keperluan rumah tangga dan industri melalui jaringan pipa gas atau dapat diubah menjadi metanol dan digunakan sebagai bahan bakar pada mesin pembakaran. Sumber gas alam tersebut pada awalnya berasal dari biomassa pada zaman dahulu. Gas metana juga ada di atmosfer dan terutama berasal dari kinerja mikroba di lahan basah alami, sawah, dan fermentasi enterik pada hewan, masing-masing berkontribusi sekitar 20%, 20% dan 15% terhadap total fluks metana. Sapi domestik adalah kontributor utama yang menghasilkan sekitar 75% dari seluruh emisi hewan sedangkan manusia menghasilkan sekitar 0,4%. Setelah karbon dioksida, metana dianggap sebagai gas rumah kaca terpenting berikutnya dan diperkirakan akan menyumbang 18% dari pemanasan global di masa depan.

Produksi metana secara mikrobiologi melalui proses yang kompleks, melibatkan campuran mikroba anaerob. Pada prinsipnya, fermentasi anaerobik dari campuran organik kompleks diyakini melalui tiga fase biokimia utama yang masing-masing membutuhkan parameter mikrobiologi tertentu. Tahap awal membutuhkan pelarutan molekul kompleks seperti selulosa, lemak dan protein, yang menyusun sebagian besar bahan organik mentah. Molekul kompleks yang terlarut memiliki berat molekul rendah yang dihasilkan dari tahap ini kemudian diubah menjadi asam organik. Pada fase akhir aktivitas mikroba, asam-asam ini, terutama asetat secara khusus diuraikan oleh bakteri metanogenik menjadi metana dan karbon dioksida.

Sistem yang sejauh ini berperan sebagai penghasil metana yang paling efisien dan kompleks di alam adalah rumen. Sistem anaerobik ini diketahui belum pernah dapat berkembang biak sepenuhnya di luar rumen sapi, dan dikenal sebagai interaksi kompleks dari sejumlah besar bakteri, protozoa, dan fungi. Berbeda dengan semua sistem bioreaktor pada skala laboratorium, faktor-faktor penunjang yang dipelajari secara intensif diatur untuk menghasilkan metana dalam kondisi terkendali. Hasil percobaan menunjukkan bahwa keluaran gas dalam jumlah banyak yang konsisten memerlukan pengendalian laboratorium yang substansial dengan kontrol variabel lingkungan yang sangat akurat seperti suhu, pH, tingkat kelembapan, agitasi serta masukan dan keseimbangan bahan baku. Sampai saat ini, sebagian besar aplikasi praktis metanogenesis berada pada tingkat teknologi yang relatif rendah. Ada beberapa cara yang memungkinkan metana dapat diproduksi dalam sistem perekonomian yang terencana, yaitu dari limbah pertanian dan perkotaan, dan dalam reaktor biogas yang terkendali.

Penguraian anaerobik terhadap limbah adalah teknik yang telah lama dipraktikkan dan banyak sistem kota telah menemukan metode tersebut untuk menangkap metana dan memanfaatkannya sebagai energi untuk kebutuhan operasional pabrik dari pembuangan limbah. Dalam beberapa tahun terakhir, metanogenesis dari limbah pertanian maupun limbah perkotaan yang tersedia sangat berlimpah telah dikembangkan sebagai cara yang sesuai dan menguntungkan untuk menghasilkan energi alternatif. Pertimbangan energik produksi metana dari limbah semacam itu rumit dan memiliki banyak keterbatasan. Penggunaan limbah perkotaan hanya memungkinkan untuk mengubah 30 hingga 50% dari energi yang mudah terbakar menjadi metana, sementara dengan penggunaan bahan nabati atau hijauan tertentu lainnya dimungkinkan untuk mencapai konversi 70%. Nilai ekonomi dari keseluruhan produksi metana harus disertai dengan pengidentifikasian produk sampingan yang dihasilkan oleh proses tersebut yang bernilai dan bermanfaat, yaitu limbah dan residu yang kaya amonia, fosfat, dan sel mikroba yang dapat digunakan sebagai pupuk, restrukturisasi tanah atau bahkan sebagai pakan ternak. Selain itu, proses tersebut dapat mengubah limbah yang berbau busuk menyengat dan mengandung patogen menjadi bahan yang tidak berbahaya dan bermanfaat.

Namun, masih banyak masalah inheren yang harus diatasi sebelum ada harapan untuk mencapai keseimbangan energi. Saat ini, biaya pengumpulan bahan organik hanya untuk tujuan metanogenesis masih terlalu mahal. Laju produksi metana tidak konsisten dan relatif masih rendah di sebagian besar proses, dan masih memerlukan banyak penelitian lebih lanjut terkait keseimbangan nutrisi untuk pengoptimalan proses. Selain itu, ada masalah krusial yang menjadi kendala adalah keberadaan lignin pada sebagian besar limbah pertanian dan perkotaan. Lignin tidak mudah dicerna oleh proses anaerobik, dan pengolahan awal fisik dan kimia memberikan beban energi dan biaya yang cukup besar pada keseluruhan proses.

Ketika metana diproduksi melalui fermentasi kotoran hewan, produk gas tersebut biasanya disebut sebagai biogas dan instalasi tersebut disebut bioreaktor. Biogas adalah campuran yang mudah terbakar dari 50-80% metana, 15-45% karbon dioksida, 5% air dan beberapa gas. Biogas diproduksi melalui biometanasi dan pada kenyataannya merupakan proses simbiosis oleh seluruh populasi mikroba di dalamnya dengan mengatur peran masing-masing yang berinteraksi pada kondisi anaerobik. Kondisi suhu optimum mendukung proses tersebut berlangsung maksimal yaitu pada suhu sekitar 30°C. Organisme yang terlibat semuanya ditemukan secara alami dalam kotoran hewan ruminansia. Dalam sistem seperti itu, kotoran hewan dicampur dengan air dan dibiarkan berfermentasi dalam kondisi mendekati anaerobik. Produksi biogas dengan metode seperti itu sudah ada sejak jaman dahulu dan sangat diandalkan di India, Cina dan Pakistan. Sistem produksi biogas Gobar di Timur digunakan oleh para petani kecil hingga industri pabrik yang cukup besar yang terus menerus menghasilkan gas dalam jumlah besar. Dalam istilah energi, sistem Gobar yang sederhana sangat dekat dengan penghasil energi netto dalam skala kecil. Tanaman pertanian skala kecil keluarga di desa-desa beroperasi dengan mengandalkan sumber energi tersebut.

Dalam kondisi ideal, 10 kg bahan organik kering dapat menghasilkan 3m³ biogas, yang dapat menyediakan waktu memasak selama 3 jam, penerangan 3 jam, atau pendinginan 24 jam dengan peralatan yang standar. Biogas, pada kenyataannya, telah mampu menyediakan sebagian besar sumber energi dunia; Cina adalah pengguna terbesar dengan lebih dari 7 juta unit biogas menyediakan energi yang setara dengan 22 juta ton batu bara, dan dengan subsidi saat ini, pembangkit listrik tenaga biogas

di Cina lebih murah dibandingkan lainnya. Sistem yang lebih besar dari jenis ini tidak mencapai keseimbangan energi bersih. Pembakaran biogas telah digunakan untuk memanaskan uap untuk menggerakkan turbin listrik dan di California, satu pabrik menyediakan listrik untuk 20.000 rumah melalui biometanasi kotoran sapi. Ada juga beberapa pertimbangan untuk menanam tanaman dalam skala besar untuk menyediakan 'ekonomi metana'. Tanaman dengan hasil energi yang tinggi dalam bentuk megajoule per hektar yang dibudidayakan di lahan yang luas atau wilayah perairan telah dikembangkan secara konsisten.

Produksi metana melalui fermentasi anaerobik

Fementasi an aerobik menawarkan sumber energi yang berharga dan dapat langsung digunakan untuk berbagai fungsi. Lebih lanjut, produk sampingan yang dihasilkan memiliki potensi untuk dimanfaatkan dalam bentuk pupuk yang berguna untuk pertanian. Namun, sebelum realisasi utuh dari sistem ini dapat dicapai, studi bioteknologi yang sangat penting harus dilakukan. Aspek biologis terkait kultur mikroba campuran yang kompleks dan efisiensi termodinamika fermentasi harus dikendalikan agar dapat meningkatkan hasilnya. Jadi penekanannya adalah harus dikendalikan untuk meningkatkan desain proses dan perbaikan teknologi sistem yang terkontrol. Rangkaian lengkap bioteknologi anaerobik untuk menghasilkan jenis bahan yang dapat terurai secara hayati lainnya juga dapat terjadi. Meskipun metana akan menjadi produk akhir utama, bahan bakar seperti propanol dan butanol serta pupuk juga akan menambah keefektifan biaya dari keseluruhan proses karena juga bernilai ekonomis.

Metana sebagai sumber energi alternatif memiliki nilai ekonomi pada produksi skala kecil dan tingkat lokal, namun prediksi keberlanjutan tentang masa depan proses komersialisasi skala besar untuk produksi metana masih terkendala pada beberapa hal. Beberapa pertimbangan ekonomi sehingga produksi metana skala besar oleh proses mikroba masih mengalami hambatan yaitu:

- Ketersediaan metana yang melimpah terdapat di alam, terutama di ladang gas alam dan hamparan ladang minyak.
- Produksi metana dengan gasifikasi batubara secara komersial lebih menarik.
- Produksi metana mikroba lebih mahal daripada gas alam.

- Biaya penyimpanan, pengangkutan dan pendistribusian bahan bakar gas belum memberikan manfaat yang ekonomis.
- Metana tidak dapat digunakan di dalam mobil dan sulit serta mahal untuk diubah menjadi bentuk cair.

Di sisi lain, pencernaan anaerobik terhadap limbah kota, industri dan pertanian dapat memiliki nilai lingkungan yang positif, karena dapat menggabungkan pembuangan dan stabilisasi limbah dengan pembentukan bahan bakar netto (biogas). Residu padat atau cair selanjutnya dapat digunakan sebagai pupuk, kondisioner tanah atau pakan ternak. Produksi biogas akan terus mendapat prioritas tinggi dalam penelitian pengembangan energi alternatif.

4. Hidrogen

Pertimbangan penggunaan hidrogen sebagai bahan bakar seluler atau bahan bakar untuk produksi listrik telah dikembangkan. Produksi hidrogen dapat terjadi melalui bakteri fotosintetik, biofotolisis air dan melalui fermentasi. Dalam dua sistem pertama, produksi hidrogen telah dicapai secara alami, tetapi masih memerlukan banyak penelitian untuk menilai signifikansi metode ini pada tingkat terapan. Diperkirakan bahwa diperlukan setidaknya 20 hingga 30 tahun masa penelitian hingga semua jenis sistem fungsional dapat terungkap untuk dimaksimalkan dalam pemanfaatan.

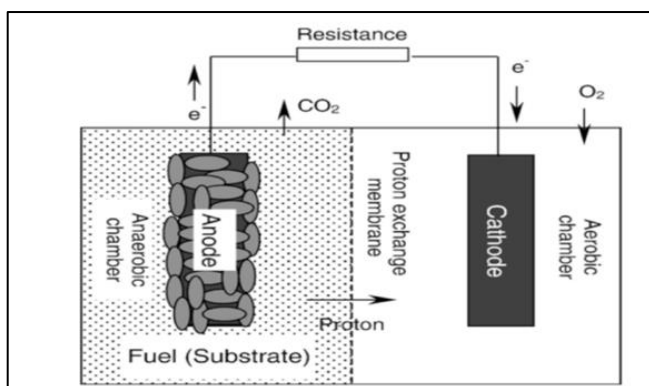
Meskipun dimungkinkan untuk menghasilkan hidrogen dari glukosa melalui kinerja bakteri, laju produksinya masih terlalu kecil untuk membuat genesis mikroba dari hidrogen yang ekonomis. Efisiensi produksi hidrogen dengan fermentasi anaerobik jauh lebih rendah daripada produksi metana dengan metode yang sama. Karena metana juga memiliki kandungan energi yang lebih tinggi, produksi metana melalui proses mikroba memiliki potensi praktis yang jauh lebih tinggi daripada hidrogen. Namun, penelitian lebih lanjut tetap dapat membuka peluang untuk meneruskan pertimbangan tersebut.

Produksi biohidrogen membutuhkan penemuan yang segera terkait cara penyimpanan yang praktis dan ekonomis, belum lagi peningkatan yang besar dalam kemandirian teknologi bahan bakar seluler saat ini. Selain itu, sebagian besar mesin dan sistem transportasi dunia tidak dibuat untuk bahan bakar seperti hidrogen dan metana. Belum ada proses biohidrogen skala

komersial yang digunakan, meskipun beberapa proses yang menjanjikan sedang dalam pengembangan secara konsisten. Banyak harapan yang melekat pada bakteri fotosintetik seperti *Rhodospseudomonas palustris*, yang dapat menghasilkan biohidrogen tanpa input energi.

5. Microbial Fuel Cels: Bioelektrik dari Biomassa Bakteri

Teknologi Microbial Fuel Cels (MFC) merupakan pendekatan terbaru untuk menghasilkan pembangkit listrik-bioelektrik dari biomassa menggunakan bakteri. MFC mulai meningkat. Namun, percobaan yang dilakukan memerlukan penggunaan mediator kimia, atau angkutan elektron, yang dapat membawa elektron dari dalam sel ke elektroda eksogen. Terobosan dalam MFC terjadi pada tahun 1999 ketika diketahui bahwa mediator tidak perlu ditambahkan.



Gambar 6. Skema dua elektroda MFC dengan PEM (Reddy et al., 2010)

Dalam MFC, mikroorganisme mendegradasi (mengoksidasi) bahan organik, menghasilkan elektron yang berjalan melalui serangkaian enzim pernapasan di dalam sel dan membuat energi untuk sel dalam bentuk ATP. Elektron kemudian dilepaskan ke terminal electron acceptor (TEA) yang menerima elektron dan menjadi tereduksi. Misalnya, oksigen dapat direduksi menjadi air melalui reaksi katalis elektron dengan proton. Banyak TEAS seperti oksigen, nitrat, sulfat, dan lainnya dengan mudah berdifusi ke dalam sel di mana mereka menerima elektron yang membentuk produk yang dapat berdifusi keluar dari sel. Namun, sekarang kita tahu bahwa beberapa bakteri dapat mentransfer elektron secara

eksogen (yaitu, di luar sel) ke TEA seperti oksida logam seperti oksida besi. Bakteri inilah yang dapat mentransfer elektron secara eksogen, yang disebut eksoelektrogen, yang dapat digunakan untuk menghasilkan daya dalam MFC. Nomenklatur yang digunakan untuk proses kategorisasi, mikroorganisme, dan reaktor untuk pembentukan metana adalah: metanogenesis, metanogen, dan digester anaerobik. Demikian pula, kami mengklasifikasikan metode proses pembangkit elektron ini sebagai elektrogenesis, dengan bakteri eksoelektrogen dan reaktor sel bahan bakar mikroba (MFC).

Skema sistem MFC ditunjukkan pada gambar 4.1. Oksigen dalam ruang anoda akan menghambat pembangkitan listrik, sehingga sistem harus dirancang untuk menjaga agar bakteri tetap terpisah dari oksigen (katolit dalam contoh ini). Pemisahan bakteri dari oksigen dapat dicapai dengan menempatkan membran yang memungkinkan transfer muatan antara elektroda, membentuk dua ruang terpisah: ruang anoda, tempat bakteri tumbuh; dan ruang katoda, tempat elektron bereaksi dengan catholyte. Katoda dilepaskan dengan udara untuk menyediakan oksigen terlarut untuk reaksi. Kedua elektroda dihubungkan dengan kabel yang mengandung beban (mis., Perangkat yang diberi daya), tetapi di laboratorium resistor digunakan sebagai beban. Pada prinsipnya membran permeabel terhadap proton yang diproduksi di anoda, sehingga dapat bermigrasi ke katoda dimana dapat bergabung dengan elektron yang ditransfer melalui kawat dan oksigen, membentuk air. Arus yang dihasilkan oleh MFC biasanya dihitung di laboratorium dengan memantau penurunan tegangan pada resistor menggunakan (a) voltmeter (pengambilan sampel intermiten) atau (b) multimeter atau potensiostat yang dihubungkan ke komputer untuk akuisisi data yang pada dasarnya berkelanjutan (Reddy et al., 2010).

Perkembangan proses yang dapat menggunakan bakteri untuk menghasilkan listrik merupakan metode yang fantastis untuk produksi bioenergi karena bakteri tersebut mereplikasi diri sendiri, dan dengan demikian katalis untuk oksidasi bahan organik bersifat mandiri. Reaksi bakteri dapat dilakukan pada beberapa rentang suhu yang berbeda tergantung pada toleransi bakteri, mulai dari suhu sedang atau tingkat kamar (15-35 °C) hingga suhu tinggi (50-60 °C) yang dapat ditoleransi oleh termofil dan suhu rendah (<15°C) di mana psikrofil dapat tumbuh. Seperti yang akan kita lihat, hampir semua bahan organik yang dapat terurai secara hayati dapat digunakan dalam MFC, termasuk asam volatil,

karbohidrat, protein, alkohol, dan bahkan bahan yang relatif bandel seperti selulosa.

Meskipun gagasan membuat listrik dengan menggunakan MFC mungkin bukan hal baru dalam teori, namun sebagai metode praktis produksi energi ini cukup baru. Persyaratan untuk membuat MFC layak secara ekonomi sebagai metode produksi energi sangat menuntut. Harga minyak saat ini tetap rendah, dan terdapat banyak metode produksi energi alternatif yang telah mencapai tingkat pengembangan yang tinggi sehingga dapat bersaing untuk produksi energi. MFC sangat baru sehingga relatif sedikit usaha telah dimasukkan ke dalam arsitektur praktis menggunakan bahan yang terjangkau. Namun, seperti yang disoroti dalam buku ini, hal itu sudah berubah dan banyak pendekatan baru untuk desain MFC membuahkan hasil yang menjanjikan. Ketika sebuah teknologi baru dikembangkan, cara tercepat untuk memasarkannya adalah dengan menerapkannya di area yang paling mungkin menghasilkan keuntungan terbesar. Seiring perkembangan teknologi lebih lanjut, ia kemudian dapat menjangkau pasar baru. Hard drive komputer membutuhkan pengembangan bertahun-tahun, misalnya, sebelum menjadi cukup kecil untuk dapat dibawa-bawa sebagai pemutar musik. Demikian pula, MFC harus dikembangkan untuk diterapkan di area yang kemungkinan besar akan menghasilkan keuntungan terbesar. Karena banyak alasan tersebut, tampaknya penerapan MFC yang pertama dan paling berguna adalah sebagai metode pemulihan energi untuk membuat infrastruktur air berkelanjutan.

Lebih dari dua miliar orang di planet ini kekurangan sanitasi yang memadai, dan satu miliar tidak memiliki akses yang memadai ke air minum. Tuntutan energi untuk proses air dan air limbah konvensional adalah sebagian besar masalah. Di AS, kami menggunakan sekitar 4-5% dari produksi listrik kami untuk infrastruktur air, yang mencakup pengolahan dan distribusi air, serta pengumpulan dan pengolahan air limbah. Sekitar 1,5% listrik kita digunakan untuk pengolahan air limbah saja. Biaya pemeliharaan infrastruktur cukup signifikan, dengan biaya tahunan untuk pengolahan air limbah sebesar \$ 25 miliar. Diharapkan selama dua puluh tahun ke depan, tambahan \$ 45 miliar perlu dikeluarkan untuk memelihara dan meningkatkan infrastruktur ini.

Air limbah mengandung energi, dalam bentuk bahan organik yang dapat terurai secara hayati, yang kita keluarkan untuk

membuang energi daripada mencoba memulihkannya. Di instalasi pengolahan air limbah konvensional di Toronto, Kanada, diperkirakan ada 9,3 kali lebih banyak energi dalam air limbah daripada yang digunakan untuk mengolah air limbah. Limbah cair domestik, hewan dan pengolahan makanan diperkirakan mengandung total 17 GW. Jumlah energi ini sama dengan yang saat ini digunakan untuk seluruh infrastruktur air di AS. Jadi, jika kita dapat memulihkan energi ini, kita dapat membuat infrastruktur air menjadi mandiri. Pencapaian seperti itu akan menjadi manfaat besar bagi kesehatan dan kesejahteraan AS di tahun-tahun ketidakpastian energi yang akan datang. Lebih penting lagi, proses pengolahan tersebut dapat meningkatkan kualitas hidup manusia secara global, serta berkontribusi pada pengurangan penyebaran penyakit yang ditularkan melalui air melalui limbah yang tidak diolah. Proses penguraian anaerobik berdasarkan pembentukan metana dapat menjadi bagian penting dari pembangkitan energi dari bahan limbah. Namun, alat ini membutuhkan suhu yang relatif tinggi (36°C) dan waktu detensi yang lama, sehingga hanya cocok untuk air limbah berkekuatan tinggi.

Teknologi MFC untuk penanganan limbah

Teknologi sel bahan bakar mikroba (MFC) adalah pendekatan yang menjanjikan namun sangat berbeda untuk pengolahan air limbah karena proses pengolahannya dapat menjadi metode menangkap energi dalam bentuk listrik atau gas hidrogen, daripada menguras energi listrik. Pada akhir 1990-an, Kim dan rekan kerjanya menunjukkan bahwa bakteri dapat digunakan dalam sel biofuel sebagai metode untuk menentukan konsentrasi laktat dalam air, dan kemudian pembangkit listrik dalam MFC dapat dipertahankan oleh pati. menggunakan air limbah industri. Namun, produksi daya rendah dan tidak jelas apakah teknologi tersebut akan berdampak besar pada pengurangan kekuatan air limbah. Pada tahun 2004, hal ini berubah dan hubungan antara listrik yang menggunakan MFC dan pengolahan air limbah ditempa dengan jelas ketika ditunjukkan bahwa air limbah rumah tangga dapat diolah ke tingkat praktis sekaligus menghasilkan listrik. Jumlah listrik yang dihasilkan dalam studi ini, meskipun rendah (26 mW/m^2), ternyata jauh lebih tinggi (beberapa lipatnya) daripada yang diperoleh sebelumnya dengan menggunakan air limbah. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa materi organik dan anorganik dalam sedimen laut dapat digunakan dalam jenis baru

MFC, yang menunjukkan bahwa berbagai macam substrat, material, dan arsitektur sistem dapat digunakan untuk menangkap listrik dari bahan organik dengan bakteri. Namun, tingkat daya di semua sistem ini relatif rendah. Perkembangan terakhir yang memicu minat saat ini di MFC yang mendemonstrasikan kepadatan daya dua lipat lebih besar dimungkinkan dalam MFC menggunakan glukosa, sekali lagi tanpa perlu mediator kimia eksogen.

Pegembangan aplikasi praktis MFC, dengan tujuan utama adalah pengembangan teknologi berskala untuk pengolahan air limbah domestik, industri, dan jenis lainnya. Selagi energi yang dapat diambil dari air limbah tidak cukup untuk menggerakkan kota, cukup besar untuk menjalankan instalasi pengolahan. Dengan kemajuan, memanfaatkan kekuatan ini dapat mencapai keberlanjutan energi dari infrastruktur air. Sebagai contoh daya yang dapat diperoleh dari air limbah, perhatikan contoh berikut untuk pemulihan energi untuk kota berukuran sedang.

MFC mungkin memiliki aplikasi lain di masa depan selain pengolahan air limbah dan energi terbarukan. Dengan meletakkan elektroda anoda di sedimen laut dan meletakkan katoda di air di atasnya, dimungkinkan untuk menghasilkan listrik dari penguraian bakteri dari bahan organik di sedimen. Tidak ada listrik yang cukup yang dihasilkan untuk menjadikannya layak secara ekonomi sebagai sumber energi terbarukan, tetapi cukup untuk menyalakan perangkat di lokasi laut dan muara yang terpencil. Mungkin juga MFC dapat dimodifikasi dan digunakan sebagai metode bioremediasi. Meskipun aplikasi ini jauh kurang berkembang dibandingkan aplikasi lain, sejauh ini telah ditunjukkan bahwa teknologi berbasis MFC dapat digunakan untuk menghilangkan nitrat (konversi menjadi nitrit) dan U [konversi dari U terlarut (V1) menjadi U tidak larut (IV)] dari air.

6. Prospek Masa Depan Biofuel

Kebutuhan energi dunia saat ini didominasi oleh kemampuan beradaptasi yang berkelanjutan dari bahan bakar fosil, bahan bakar fosil yang sama yang sekarang kita sadari terus menyebabkan kerusakan permanen pada iklim dunia. Kemampuan biofuel untuk memasuki pasar energi secara realistis akan ditentukan oleh beberapa faktor: (a) ketersediaan rantai energi yang ada untuk biofuel; (b) resistensi terhadap adopsi biofuel oleh manajemen energi saat ini; (c) kemampuan untuk

mengurangi biaya biofuel; dan (d) retrofit rantai pasokan energi yang ada untuk mengakomodasi biofuel. Masuknya biofuel ke sistem pasokan energi saat ini akan lambat dan bertahap, tetapi dunia harus memulai proses lambat untuk melepaskan diri dari ketergantungan total pada bahan bakar fosil.

Tiga aspek bio-sains energi akan dieksplorasi:

- mengembangkan komponen biofuel baru dan meningkatkan efisiensi dan fleksibilitas dari komponen yang saat ini dicampur dengan bahan bakar transportasi
- merancang teknologi baru untuk meningkatkan dan mempercepat konversi bahan organik menjadi molekul biofuel, dengan tujuan meningkatkan proporsi tanaman yang dapat digunakan untuk menghasilkan bahan baku
- menggunakan ilmu tumbuhan modern untuk mengembangkan spesies yang menghasilkan hasil molekul energi yang lebih tinggi dan dapat tumbuh di lahan yang tidak cocok untuk produksi pangan.

Pertanyaan terakhir harus dipertimbangkan adalah seberapa ramah lingkungan biofuel?. Para penggiat biofuel menganggapnya sebagai alternatif ekologis untuk bahan bakar fosil, karena sebagian besar diproduksi oleh tumbuhan dan bila digunakan sebagai bahan bakar, karbon yang dipancarkan didaur ulang kembali menjadi tumbuhan yang menghasilkan karbon netral. Namun, studi siklus hidup, yang mengungkap keseimbangan energi keseluruhan untuk biofuel, telah mengidentifikasi banyak aspek input energi netto dalam pembuatan biofuel diantaranya jenis tanaman, yaitu tebu, jagung, kedelai, lignoselulosa, tingkat pupuk yang dibutuhkan, pengumpulan dan pengangkutan ke kilang, kebutuhan pra-produksi yaitu maserasi, hidrolisis enzimatis/ asam, pemurnian produk sampingan, pengolahan limbah, dan terakhir penyimpanan dan distribusi biofuel. Selain itu, berapa banyak lahan yang dapat digunakan untuk bahan bakar nabati tanpa mempengaruhi produksi pangan untuk populasi dunia yang terus berkembang?, semua itu membutuhkan kajian yang lebih jauh.

Secara umum, kekurangan input untuk produksi energi netto dengan tanaman bioenergi skala besar, dapat mempertimbangkan dukungan kemajuan masa depan implementasi bioteknologi tanaman dan pertanian. Potensi penggunaan tanaman hasil rekayasa genetika, peningkatan teknologi bioproses, peningkatan fiksasi karbon fotosintesis, peningkatan jalur enzim dan fiksasi

nitrogen pada tanaman bioenergi harus terus dimaksimalkan. Tidak dapat dipungkiri bahwa sumber energi fosil dunia semakin menipis dan harus digunakan dengan hati-hati dengan menghargai lingkungan. Identifikasi sumber energi alternatif akan terus menjadi kegiatan komitmen ilmiah yang intens untuk menjawab Kebutuhan bahan bakar minyak dimasa mendatang yang diperkirakan masih akan dominan dalam memenuhi kebutuhan energi sektor transportasi, rumah tangga dan industri serta untuk pembangkitan listrik. Melalui program konservasi dan diversifikasi (penganekaragaman) energi, pemanfaatan bio-fuel sebagai salah satu alternatif energi dalam substitusi bahan bakar minyak, diharapkan dapat menciptakan pembangunan nasional yang berwawasan lingkungan, mengurangi ketergantungan pada bahan bakar minyak serta membuka lapangan kerja di berbagai daerah dan meningkatkan pertumbuhan industri nasional di Indonesia dan dunia.

BAB V

TEKNOLOGI STEM-CELL

1. Stem-Cell Sebagai Sel Master

Kemajuan dalam penggunaan kultur jaringan konvensional untuk diaplikasikan pada manusia kini difokuskan pada kultur stem-cell. Stem-cell adalah jenis sel khusus yang memiliki kemampuan meregenerasi jaringan dan dapat digunakan untuk menumbuhkan jaringan atau organ untuk penggantian sel-sel penyusunnya. Stem-cell adalah jenis sel primitif yang mampu berkembang menjadi sebagian besar dari 220 jenis sel yang ditemukan dalam tubuh manusia. Stem-cell dapat diisolasi dari darah, otak, sumsum tulang belakang atau jaringan otot, tetapi sekarang juga dapat dibiakkan dari embrio manusia. Keuntungan dari penggunaan stem-cell embrionik adalah merupakan sel 'master' yang mampu berkembang dan berdiferensiasi menjadi semua jenis jaringan (misalnya, tulang, otot, jaringan saraf, sel darah, sel jantung, dan lain-lain). Beberapa peneliti menganggap hal ini adalah sebuah peluang yang menawarkan potensi terbesar untuk meringankan penderitaan manusia selain pengembangan antibiotik.

Stem-cell adalah sel yang memiliki dua karakteristik khusus, ketika membelah secara mitosis, sel anakan dapat masuk ke jalur menuju ke sel yang berdiferensiasi penuh atau tetap menjadi stem-cell sehingga memastikan bahwa kumpulan stem-cell tidak akan 'habis'. Beberapa sifat totipotensi perkembangan stem-cell didasarkan pada banyaknya jenis sel yang berdiferensiasi berbeda sehingga sel tersebut dapat terbentuk.

a) Sel totipotensi

Pada mamalia, sel totipotensi berpeluang berdiferensiasi menjadi semua jenis sel dalam tubuh orang dewasa. Sel tipe ini dapat berkembang menjadi sel apa pun, mulai dari sel ekstraembrionik (misalnya, plasenta), sel somatik dan sel seksual. Satu-satunya sel totipotensi adalah telur yang telah dibuahi yang membelah menjadi empat, delapan, enam belas dan seterusnya yang dihasilkan oleh proses pembelahannya. Seperti yang ditunjukkan oleh kemampuan mamalia untuk menghasilkan turunan yang kembar identik, kembar tiga, dan lain-lain. Pada mamalia, ekspresi stem-cell totipotensi tidak tepat karena sel tersebut gagal memenuhi kriteria kedua, yaitu tidak dapat berduplikasi lebih banyak dari selnya sendiri.

b) Stem-cell pluripotensi

Sel ini merupakan stem-cell sejati, dengan potensi untuk membuat sel yang terdiferensiasi di dalam tubuh, tetapi tidak dapat berkontribusi untuk membuat membran embrionik ekstra yang berasal dari trofoblas. Tiga jenis stem-cell pluripotensi telah ditemukan pada mamalia:

- Stem-cell Embrionik. Sel ini dapat diisolasi dari massa sel dalam (*inner cell mass*) blastosit (sel pada tahap perkembangan embrio saat implantasi terjadi).
- Sel Germinal Embrionik. Sel ini dapat diisolasi dari prekursor ke gonad pada janin yang diaborsi.
- Sel Karsinoma Embrionik. Sel ini dapat diisolasi dari teratokarsinoma, tumor yang kadang-kadang terjadi pada gonad janin. Berbeda dengan dua lainnya, jenis ini biasanya aneuploid.

Ketiga jenis Stem-cell pluripotensi yang bermakna berpotensi majemuk ini hanya dapat diisolasi dari jaringan embrio atau janin dan dapat ditumbuhkan dalam kultur, tetapi hanya dengan metode khusus untuk mencegahnya berdiferensiasi.

c) Stem-cell multipotensi

Stem-cell multipotensi adalah stem-cell sejati tetapi hanya dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel tertentu. Misalnya, sumsum tulang mengandung stem-cell multipotensi yang memunculkan semua sel darah tetapi tidak untuk jenis sel lain. Stem-cell multipotensi ditemukan pada hewan dewasa, misalnya

otak dan hati yang memiliki potensi untuk dapat menggantikan sel yang mati atau rusak.

Stem-cell multipotensi yang paling banyak dipelajari adalah stem-cell hematopoietik yang ada di sumsum tulang dan limpa. Pembentukan sel darah dari stem-cell hematopoietik dikenal sebagai hematopoiesis. Pada manusia diperkirakan bahwa sekitar satu juta stem-cell hematopoietik menghasilkan satu miliar sel darah merah, satu miliar trombosit, satu juta sel T, dan jumlah sel B yang sama per Kg berat badan. Meskipun berbagai jenis stem-cell manusia belum diisolasi dan dimurnikan, para ilmuwan telah menemukan bahwa sel-sel nenek moyang yang mampu menghasilkan serangkaian sel darah jika tidak benar-benar mereproduksi dirinya sendiri membawa penanda permukaan sel CD34. Sel-sel ini dapat disortir dari sumsum dan darah dengan antibodi monoklonal yang mengenali CD34. Dalam program eksperimental, sel CD34 sedang diuji sebagai motor berumur panjang untuk terapi gen dan sebagai alternatif untuk transplantasi sumsum tulang.

2. Identifikasi Stem-cell: Pendekatan Morfologi

Berbagai jenis stem-cell dapat diidentifikasi dengan metode yang berbeda. Identifikasi stem-cell dengan pemeriksaan mikroskopis untuk menera karakteristik morfologi merupakan salah satu metode yang dapat dilakukan. Tetapi metode ini tidak terlalu efektif karena ada sejumlah besar jenis stem-cell dengan ciri morfologi yang sama atau mirip. Sebagai contoh, sistem hematopoietik mamalia dari populasi sel dewasa yang besar secara numerik, yang secara kolektif mewakili berbagai macam hasil pembentukan sel darah tepi. Upaya untuk mengidentifikasi stem-cell hematopoietik yang berbeda yang ada di jaringan sumsum tulang dengan pemeriksaan mikroskopis tidak efektif karena terdapat morfologi yang serupa untuk berbagai jenis sel. Terdapat metode tidak langsung untuk mengidentifikasi atau memahami jenis stem-cell hematopoietik yang terus memperbarui sel darah. Metode tersebut melibatkan studi tentang kemampuan populasi sel darah pada tikus yang diradiasi kembali.

Populasi tikus yang identik secara genetik dibesarkan melalui perkawinan sedarah; artinya, dengan kawin saudara selama lebih dari 20 generasi. Populasi tikus yang identik secara genetik ini digunakan untuk penelitian. Dua kelompok tikus diiradiasi mematikan untuk menghancurkan kemampuan memproduksi sel

darah dalam sistem peredaran darah. Dari dua kelompok tersebut, satu disuntik dengan sel sumsum tulang, sel hematopoietik dari tikus normal yang identik secara genetik. Tikus-tikus ini mampu bertahan hidup sedangkan kelompok tikus lain yang diradiasi, yang tidak menerima sel sumsum tulang, mati. Pada penelitian terhadap limpa tikus yang telah ditreatmen dengan iradiasi dan bertahan hidup, diamati bahwa mereka mengembangkan sel yang menghasilkan koloni yang berbiak. Koloni-koloni ini dinamai unit pembentuk koloni limpa atau CFU-S, dan teknik ini dikenal sebagai uji populasi ulang. Ketika sel-sel pembentuk koloni dari limfa ini disuntikkan ke dalam kelompok tikus yang diradiasi serupa, mereka juga bertahan hidup. Studi ini dan pengamatannya telah memunculkan pemahaman tentang Stem-cell, secara umum, dan hematopoiesis, pada khususnya.

Hematopoiesis memperbarui diri dan menyerupai sistem perkembangan lain seperti usus halus, epidermis, dan folikel rambut pada kulit. Jenis jaringan lain seperti sistem saraf pusat, hati, dan otot cenderung jauh lebih lambat dalam mengisi kembali jenis sel yang matang atau merespons cedera yang terjadi. Lebih dari empat dekade studi transplantasi *in-vivo* telah mampu menentukan aktivitas stem-cell sumsum tulang yang langka yang keduanya merupakan memperbaharui diri dan multipotensial (berpotensi majemuk) dalam kemampuannya untuk menghasilkan semua jenis sel darah pada inang yang bentuk secara permanen dan klonal.

Seiring tuntutan pengembangan, sejumlah besar strategi diekspansi untuk memurnikan stem-cell hematopoietik secara fisik dari sumsum tulang dewasa dan dari sumber lain seperti hati dan janin. Skema pemurnian stem-cell hematopoietik individu datang dalam berbagai bentuk. Terdapat protokol umum bahwa tingkat pengayaan secara kuantitatif serupa di sebagian besar strategi dan bahwa satu-satunya ukuran yang dapat diandalkan dari aktivitas stem-cell dalam populasi yang dimurnikan secara fisik adalah dengan transplantasi *in vivo*. Salah satu strategi pemurnian khusus yang relevan dengan pembahasan ini menggunakan penyerapan pewarna yang vital dan sifat-sifat eflux bersama dengan aliran sitometri untuk menentukan subset sel sumsum tulang yang disebut populasi samping. Sel-sel ini sangat diperkaya dalam aktivitas Stem-cell yang dapat ditransplantasikan. Kompleksitas sistem uji seluruh hewan tidak memungkinkan perkiraan akurat dari homogenitas absolut dari protokol pemurnian apa pun; yaitu, tidak mungkin untuk mendapatkan

'pemetaan' aktivitas Stem-cell satu-ke-satu yang ketat secara kuantitatif pada sel-sel yang dimurnikan secara fisik secara individu. Hebatnya, bagaimanapun, dalam beberapa kasus, telah dimungkinkan untuk menunjukkan bahwa satu Stem-cell yang ditransplantasikan diperlukan dan cukup untuk mentransfer sistem hematopoietik normal yang utuh ke inang penerima. Meskipun kurang ekstensif, penelitian lain telah sukses mengidentifikasi secara fisik bakal Stem-cell dari sejumlah jaringan lainnya.

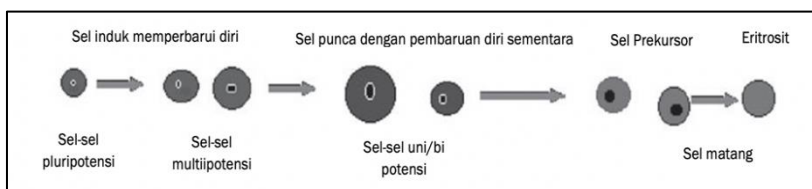
3. Uji Klonal *In-vitro*

Uji Klonal *In-vitro* didasarkan pada kultur stem-cell secara *in-vitro* seperti sel hematopoietik dan pengujiannya namun dengan metode yang berbeda. Stem-cell dikembangkan di media kultur untuk membentuk klon atau koloni dari berbagai jenis sel. Teknik ini dapat membantu para peneliti melakukan sejumlah besar pengujian pada stem-cell untuk mengidentifikasinya dan mempelajari diferensiasi sel-sel yang tumbuh. Pengujian *in-vitro* ini juga membantu mempelajari kebutuhan hormonal untuk memulai atau mendorong pembentukan atau diferensiasi sel tertentu. Misalnya, dengan pengujian tersebut dimungkinkan untuk mengidentifikasi faktor pertumbuhan yang diperlukan untuk pembentukan berbagai jenis sel darah seperti sel darah merah dan berbagai jenis limfosit dari sel hematopoietik sumsum tulang. Jenis kultur stem-cell ini membentuk sistem yang sangat sempurna untuk mempelajari pengaruh hormon tertentu dan faktor pertumbuhan pada diferensiasi sel dan proses terkait. Peran eritropoietin, salah satu produk bioteknologi pertama dari kultur sel hewan yang dipasarkan, juga telah diuji dengan prosedur tersebut.

4. Sel Sumsum Tulang

Kultur sel sumsum tulang secara *in-vitro* pada permukaan plastik atau kaca telah membantu mengungkap proses hematopoiesis dalam kondisi *in-vitro* yang menghasilkan perkembangan berbagai jenis sel darah. Gambar 7 berikut menunjukkan perbedaan tahapan dalam diferensiasi stem-cell sumsum tulang menjadi eritrosit *in-vitro*. Proses hematopoiesis dapat dibagi menjadi empat tahap:

- 1) Stem-cell yang dapat mempertahankan kapasitas untuk memperbaharui diri. Sel-sel ini adalah sel berpotensi majemuk atau sel multipotensi.
- 2) Stem-cell dengan kapasitas memperbaiki diri secara terbatas, yang merupakan sel uni atau bi-potensial. Kapasitas diferensiasinya sangat terbatas, dan dapat berkembang menjadi satu atau dua jenis sel yang matang atau berdiferensiasi.
- 3) Sel prekursor yang tidak memiliki kemampuan memperbaiki diri, dan oleh karena itu tidak dapat membelah, tetapi dapat mengalami diferensiasi untuk membentuk sel dewasa yang berdiferensiasi tinggi.
- 4) Tahap terakhir dari proses hematopoiesis, yang menghasilkan sel yang matang dan berdiferensiasi sempurna.



Gambar 7. Tahapan Hematopoiesis: diferensiasi Stem-cell hematopoietik pluripotensi yang mengarah ke pembentukan sel darah matang melalui sel uni atau bi-potensi (Smith, 2009)

Teknik ini juga sangat berguna untuk memahami pembentukan berbagai sel darah dari stem-cell multipotensi sumsum tulang dengan proses hematopoiesis dan juga untuk mempelajari pengaruh atau peran berbagai hormon dan faktor pertumbuhan terhadap diferensiasi sel-sel tersebut. Informasi yang dikumpulkan dari penelitian ini telah membantu melakukan transplantasi sumsum tulang sebagai pengobatan untuk leukemia atau kanker darah. Transplantasi atau pencangkokan sumsum tulang dilakukan dengan jaringan sumsum tulang yang mengandung populasi stem-cell hematopoietik murni yang tinggi.

5. Kultur Stem-cell Embrio

Zigot, tepat setelah pembentukannya melalui pembuahan, berkembang menjadi tahap bersel delapan dan kemudian menjadi sekelompok sel melalui pembelahan mitosis. Sel-sel pada tahap bersel delapan (morula) bersifat totipotensi dan disebut sebagai sel embrionik. Sel tersebut dapat menghasilkan semua jenis jaringan. Tahap ini adalah fase paling awal setelah sel telur baru

mengalami pembuahan. Tahap selanjutnya adalah menjadi sekelompok sel yang dikenal sebagai blastula, sel bagian dalam terkonsentrasi ke samping dan menjadi berpotensi majemuk. Stem-cell embrionik ini bisa berdiferensiasi menjadi hampir semua jenis sel. Pada perkembangan selanjutnya, sel menjadi lebih terdiferensiasi dan menjadi Stem-cell dewasa. Stem-cell dewasa biasanya disebut sel multipoten seperti sel sumsum tulang, yang dapat menghasilkan berbagai macam sel darah yang berbeda.

Stem-cell embrionik yang berpotensi majemuk 'dipanen' atau dikumpulkan dari tahap paling awal dari telur yang dibuahi yang disebut blastokista dan dipertahankan dalam kultur jaringan bersama dengan sel fibroblas. Sel totipotensi dan pluripotensi embrionik ini juga dapat diturunkan dengan fertilisasi *in-vitro* dan dilakukan pembiakan zigot hingga tahap sel delapan dan blastokista. Jika sel diturunkan dari tahap bersel delapan, mereka adalah sel embrionik totipotensi, yang tidak stabil dan dapat berdiferensiasi menjadi Stem-cell berpotensi majemuk dalam kultur. Jika sel dalam kultur berasal dari sel dalam blastokista, mereka adalah Stem-cell embrionik berpotensi majemuk. Stem-cell dewasa atau sel multipoten dikumpulkan dari sejumlah jenis sel di dalam tubuh. Biasanya merupakan sel sumsum tulang atau sel dari tahap paling awal perkembangan jaringan.

Studi yang dilakukan pada stem-cell embrionik tikus telah mengungkapkan bahwa:

- Sel-sel ini mampu mempertahankan sifat embrio dan pluripotensi mereka untuk waktu yang sangat lama dalam kultur tanpa adanya penurunan sifat.
- Sel-sel tersebut mampu berintegrasi kembali ke dalam proses embriogenesis jika dikembalikan ke kondisi embrionik awal seperti tahap blastula. Hal ini dibuktikan benar dengan menciptakan tikus chimera.
- Kultur sel embrionik berpotensi majemuk ditemukan mempertahankan kariotipe euploid (nomor kromosom diploid sebenarnya dari suatu spesies) yang konstan dan stabil.
- Poin terpenting adalah bahwa sel-sel tersebut dapat membelah dan menghasilkan jenis sel embrionik yang sama tanpa mengalami diferensiasi lebih lanjut dalam kondisi *in-vitro* yang spesifik.

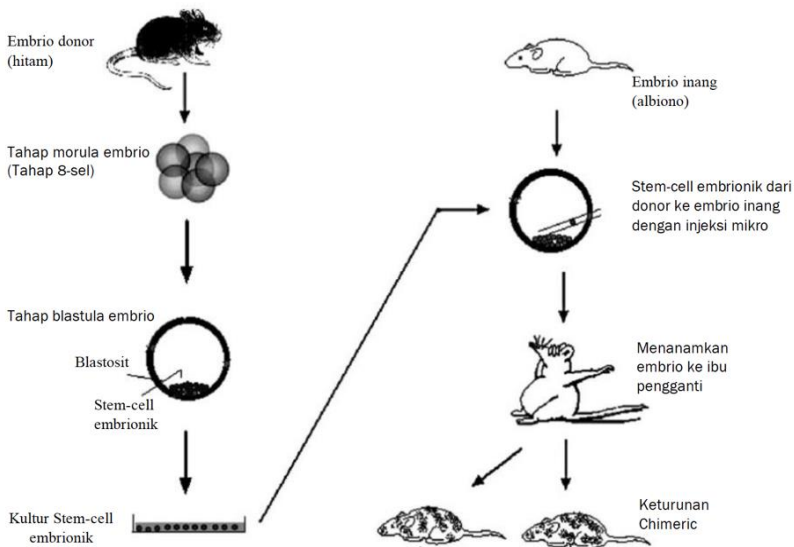
Stem-cell embrionik ini dapat dimanipulasi secara genetik dengan memasukkan gen asing atau menghilangkan gen secara selektif dan dapat digunakan untuk membuat berbagai jenis

model tikus untuk mempelajari berbagai penyakit genetik. Model eksperimental yang dibuat dengan menghilangkan atau membungkam gen atau gen tertentu yang dikenal sebagai gen *knock-out*.

6. Pengembangan Tikus Chimera

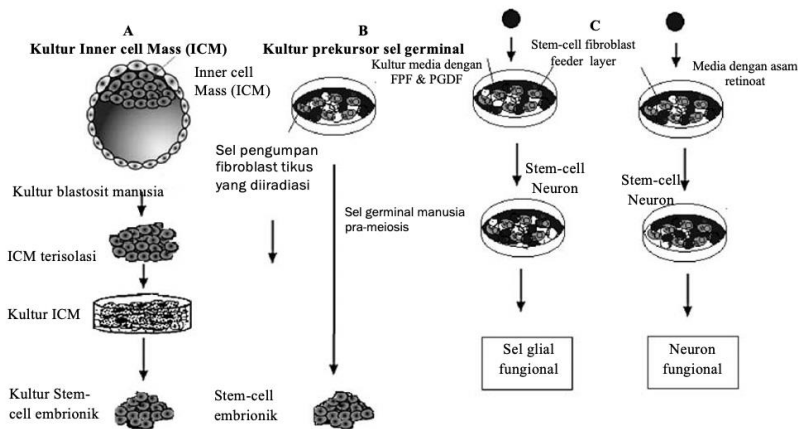
Stem-cell embrionik pluripotensi telah digunakan untuk mengembangkan tikus chimera. Sel stem-cell embrionik yang diambil dari tikus hitam dipertahankan dalam kultur. Sel ini ditanamkan ke dalam embrio tikus albino pada tahap blastula seperti yang diilustrasikan pada gambar 8. Keturunan yang berkembang dari embrio ini memiliki warna kulit dengan bercak putih dan hitam yang disebut chimera.

Telah dibuktikan bahwa Stem-cell embrionik manusia dapat dibiakkan dan dipelihara seperti sel stem-cell embrionik tikus. Massa sel dalam blastokista dapat berasal dari embrio yang dikembangkan dari fertilisasi *in-vitro* atau dari prekursor sel germinal. Stem-cell berpotensi majemuk atau Stem-cell embrionik ini dapat dipertahankan dalam medium bersama dengan sel fibroblas induser.



Gambar 8. Pengembangan tikus chimera dengan menyuntikkan stem-cell embrionik ke dalam embrio yang sedang berkembang pada tahap blastula (Smith, 2009)

Stem-cell embrionik dapat dibiakkan menjadi jaringan sel tertentu yang dapat diturunkan atau dibuat dengan bantuan faktor pertumbuhan spesifik seperti faktor pertumbuhan fibroblast (FGF) atau faktor pertumbuhan turunan trombosit (PDGF). Studi tentang manipulasi stem-cell embrionik dan studi diferensiasi *in-vitro* bersama dengan teknik transformasi genetik telah membuka jalan baru dalam penyembuhan berdasarkan rekayasa sel dan jaringan dan terapi gen.



Gambar 9. Penggunaan stem-cell embrionik sebagai terapi. (A) Pengembangan dan kultur *in-vitro* Stem-cell embrionik manusia dari massa sel dalam (ICM) tahap blastula embrio atau dari (B) sel germ-line sebelum meiosis. Stem-cell ini dapat berdiferensiasi dalam kultur untuk membentuk Stem-cell yang lebih terbatas seperti saraf, darah, otot, dan lain-lain. (C) Diferensiasi sel ES dalam kultur menjadi sel yang dibatasi garis keturunan. Jenis sel ES yang sama berdiferensiasi menjadi sel glial dan sel saraf dengan mengubah komponen dalam media kultur (Nair, 2007)

7. Rekayasa Sel dan Jaringan: Aplikasi Stem-cell

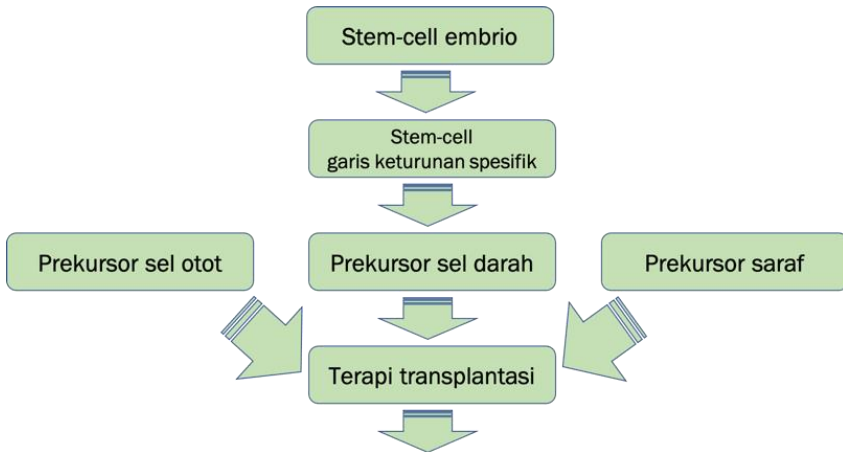
Harapan untuk mengaplikasikan stem-cell dalam terapi manusia telah terwujud sejak beberapa tahun silam. Peluangnya untuk dapat digunakan dalam pengobatan terhadap banyak masalah medis yang timbul akibat kerusakan sel sangat besar. Misalnya, diabetes mellitus yang bergantung pada insulin di mana sel beta pankreas telah dihancurkan oleh serangan autoimun. Penyakit Parkinson, di mana sel-sel otak yang mensekresi dopamin telah dihancurkan. Cedera tulang belakang yang menyebabkan kelumpuhan otot rangka. Stroke iskemik, di mana bekuan darah di otak menyebabkan neuron mati karena kekurangan oksigen.

Sklerosis multipel dengan hilangnya selubung mielin di sekitar akson, dan kasu-kasu penyakit lainnya adalah beberapa penyakit yang disebabkan oleh kerusakan jaringan, yang dapat disembuhkan dengan terapi stem-cell yang dikombinasikan dengan terapi gen. Potensi perkembangan yang besar dari teknik stem-cell telah membangun ragam penelitian intensif untuk menginduksi penggantian sel-sel rusak dan mengalami kelainan. Sebagaimana banyaknya keberhasilan yang telah dicapai dengan percobaan terhadap hewan uji di laboratorium, yang telah dicapai dengan penyembuhan penyakit manusia pun telah banyak dibuktikan.

Ahli bioteknologi kini telah mampu menumbuhkan sel kulit, jaringan dan sel jantung, sel darah dan sel hematopoietik serta sel-sel lainnya yang membutuhkan pemulihan. Secara *in-vitro*, stem-cell dapat digunakan untuk tujuan terapeutik. Lembaran jaringan kulit yang dikultur sudah tersedia untuk dicangkokkan ke korban luka bakar. Kultur sel *in-vitro* dari berbagai jenis stem-cell dan rekayasa jaringan dapat memasok jaringan atau sel yang diperlukan untuk memperbaiki jaringan dan organ yang rusak, tanpa menimbulkan respons imun, infeksi, atau merusak bagian tubuh lain dari pasien. Jenis sel primer seperti keratinosit, hepatosit epitel, dan sel endotel memiliki potensi komersial yang besar dalam berbagai teknologi baru dan aplikasi terapeutik. Seperti disebutkan sebelumnya, aplikasi penting lainnya dari rekayasa jaringan adalah terapi stem-cell, terapi gen, pseudogen dan jaringan, dan sistem model lain yang dikembangkan untuk pendekatan dan metode terapeutik baru untuk mengobati genetik manusia dan jenis kelainan lainnya. Diagram alir untuk kultur Stem-cell dan penggunaannya dalam terapi diilustrasikan pada gambar 10 berikut.

Ada sejumlah masalah dalam penggunaan stem-cell untuk terapi manusia. Satu masalah utama yang harus diselesaikan sebelum terapi stem-cell manusia menjadi kenyataan adalah ancaman penolakan sel yang ditransplantasikan oleh sistem kekebalan tubuh inang. Salah satu cara untuk menghindari masalah tersebut adalah dengan menggunakan stem-cell yang secara genetik identik dengan inang. Dalam teknik ini, sel telur manusia memiliki nukleusnya sendiri yang dikeluarkan dan digantikan oleh nukleus yang diambil dari sel somatik (misalnya kulit) pasien. Telur yang sekarang diploid dibiarkan berkembang dalam kultur ke tahap blastokista, dari mana stem-cell embrionik dapat dipanen dan ditumbuhkan dalam kultur. Ketika kultur telah

memperoleh sifat yang diinginkan, dapat ditanamkan pada pasien tanpa takut ditolak. Meski ini merupakan prospek yang menggembirakan, namun masih ada masalah dengan metode yang harus diselesaikan.



Gambar 10. Terapi stem-cell. Penggunaan kultur stem-cell untuk pengembangan stem-cell garis keturunan spesifik dan penggunaannya dalam terapi transplantasi (Nair, 2007)

BAB VI

TEKNOLOGI ANTIBODI MONOKLONAL

Ketika zat asing masuk ke dalam tubuh, seperti bakteri dan virus penyebab penyakit maupun agen infeksi lain yang dikenal sebagai antigen, sistem kekebalan tubuh akan mengenalinya sebagai agresor. Sebagai respons, mekanisme pertahanan alami kita akan menghasilkan protein tertentu yang dikenal sebagai antibodi. Protein tersebut sangat spesifik untuk antigen tertentu dan menetralkan racun atau partikel asing yang menyerang dengan cara mengikatnya. Proses inilah yang membantu menghancurkan patogen. Antibodi yang diproduksi oleh sistem kekebalan mengikat situs atau domain spesifik tertentu pada makromolekul antigen. Situs antigen ini dikenal sebagai epitop.

Ada dua karakteristik dasar dan sangat krusial dari antibodi yang diproduksi oleh sel pada sistem kekebalan tubuh. Pertama, bersifat sangat spesifik, artinya setiap antibodi mengikat dan menyerang satu antigen tertentu. Kedua, sebagian besar antibodi, setelah diaktifkan oleh antigen (melalui terjadinya suatu infeksi/penyakit), akan terus memberikan resistensi terhadap penyakit atau patogen tersebut. Antibodi untuk penyakit masa kanak-kanak seperti cacar air dan campak adalah contoh yang sangat representatif. Karakteristik kedua dari antibodi tersebut memungkinkan untuk dikembangkan menjadi vaksin. Vaksin adalah sediaan dari bakteri atau virus yang dimatikan atau

dilemahkan, yang ketika dimasukkan ke dalam tubuh akan merangsang produksi antibodi melawan antigen yang dikandungnya. Hal tersebut merupakan sifat utama dari sebuah antibodi. Spesifisitasnya yang tinggi membuat teknologi produksi antibodi menjadi sangat esensial. Dengan demikian, antibodi spesifik tidak hanya dapat bertindak sebagai agen terapeutik untuk melindungi dari penyakit, tetapi juga dapat membantu mendiagnosis berbagai macam penyakit, dan dapat mendeteksi keberadaan obat, produk virus dan bakteri, serta zat yang tidak seharusnya (abnormal) di dalam darah.

Antibodi monoklonal sangat penting untuk produksi protein hasil rekayasa genetika. Antibodi monoklonal juga merupakan kunci untuk mengembangkan jenis vaksin baru melalui bioteknologi. Dengan pengalaman yang terus berkembang, para ilmuwan telah menemukan beberapa varian canggih dari antibodi monoklonal. Misalnya, telah diproduksi beberapa antibodi monoklonal manusia yang tidak lagi berasal dari tikus. Antibodi monoklonal manusia kini dapat digunakan untuk terapi tanpa mempertaruhkan reaksi kekebalan terhadap protein tikus. Selain itu juga telah berhasil "memanusiakan" antibodi tikus dengan menyambungkan gen tikus untuk bagian antibodi yang mengenali antigen yang sangat spesifik ke dalam gen manusia yang menyandikan sisa molekul antibodi. Teknologi hibridoma seperti teknologi rekombinan semakin mendorong popularitas bioteknologi modern.

Jenis baru antibodi monoklonalpun telah dirancang untuk berperilaku seperti yang disebut *antibodi katalitik* atau *abzim* yang mempercepat atau mengkatalisasi reaksi kimia dengan mengikat reaktan kimia dan menahannya dalam "keadaan transisi" yang tidak stabil. Dengan memotong protein yang mengikatnya, antibodi berperan untuk melarutkan gumpalan darah. dengan menggabungkan dua sel hibridoma yang menghasilkan dua antibodi, telah menciptakan hibridoma hibrid yang mengeluarkan hasil dari dua bagian non-identik. Sementara satu lengan dari satu antigen bispesifik, lengan kedua terikat ke yang lain. Seseorang dapat mengikat misalnya, dan yang kedua ke sel target, membuat sel yang sama sekali baru. Atau, satu lengan dari antibodi chimera mungkin mengikat sel pembunuh sementara mengunci ke sel tumor, menciptakan jembatan mematikan antara keduanya, ke sel tumor.

Antibodi yang diproduksi dalam sistem kehidupan adalah populasi heterogen yang berasal dari berbagai jenis sel kekebalan (limfosit B), dan oleh karena itu dikenal sebagai antibodi poliklonal. Sifatnya dapat mengikat lebih dari satu epitop antigen. Metode konvensional untuk produksi antibodi adalah dengan menyuntikkan antigen pada hewan uji laboratorium dan kemudian, setelah antibodi terbentuk, mengumpulkan antibodi tersebut dari serum darah (serum darah yang mengandung antibodi disebut antiserum). Ada dua masalah yang ditemui dengan mengaplikasikan metode ini, yaitu menghasilkan antiserum yang mengandung zat yang tidak diinginkan yakni, antibodi yang diproduksi oleh limfosit yang berbeda dan hanya memberikan sejumlah kecil antibodi yang dapat digunakan. Masalah ini dipecahkan dengan pengembangan teknik untuk produksi antibodi yang disekresikan oleh satu jenis sel kekebalan. Antibodi ini dikenal sebagai **antibodi monoklonal**.

Antibodi monoklonal dapat diproduksi dengan teknologi hibridoma. Hibridoma dapat diproduksi dengan menyuntikkan antigen tertentu ke dalam tikus, mengumpulkan sel penghasil antibodi dari limpa tikus, dan kemudian menggabungkannya dengan sel kekebalan kanker yang berumur panjang. Sel hibrid dari limfosit B yang diaktifkan antigen dan limfosit kanker atau sel mieloma ini dikenal sebagai hibridoma. Sel hibridoma individu diklon dan disaring untuk menemukan hibridoma yang menghasilkan antibodi yang diinginkan. Hibridoma yang dipilih adalah kloning dan klon anak yang identik akan mengeluarkan antibodi monoklonal dalam jangka waktu lama, dan dapat digunakan untuk aplikasi komersial. Langkah-langkah berbeda dalam produksi hibridoma dan produksi antibodi monoklonal diilustrasikan pada Gambar 11. Hibridoma tersebut dikembangkan dengan menggabungkan limfosit B penghasil antibodi yang memiliki umur terbatas dengan mieloma atau sel-B kanker dengan adanya polietilen glikol (PEG).

1. Mieloma (Plasmasitoma)

Tumor yang disebabkan oleh sel-sel yang mensekresi antibodi yang berubah menjadi ganas dikenal sebagai plasmacytoma atau myeloma. Mieloma spontan jarang terjadi pada tikus, tetapi cukup umum pada tikus galur LOU/C. Myeloma kadang-kadang terjadi pada spesies lain dan cukup umum, yaitu pada manusia. Pada tahun 1959, secara tidak sengaja ditemukan bahwa iritasi peritoneum dapat menyebabkan perkembangan mieloma pada

tikus BALB/c. Selanjutnya, ditemukan bahwa minyak mineral atau pristane merupakan penyebab kuat terjadinya myeloma pada mencit BALB/ c.

Perkembangan plasmacytomas pada tikus biasanya dikaitkan dengan translokasi kromosom antara kromosom 15, yang mengandung onkogen *c-myc*, dan lokus rantai berat pada kromosom 12. Translokasi menyebabkan ekspresi abnormal dan konstitutif dari gen *c-myc*, dan merupakan langkah penting dalam transformasi sel ganas. Dalam beberapa kasus, translokasi varian melibatkan 4 lokus pada kromosom 6 bukan rantai berat pada kromosom 12. Meskipun ada bukti kuat bahwa translokasi ini secara kausal terlibat dalam patogenesis plasmacytomas tikus dan tikus dan limfoma Burkitt pada manusia, itu tidak cukup untuk menghasilkan fenotipe yang sepenuhnya ganas, yang memerlukan peristiwa genetik tambahan, yang sebagian besar masih belum diketahui. Perkembangan sejumlah besar mieloma tikus yang dicirikan dengan baik telah bertanggung jawab atas sebagian besar pengetahuan kita saat ini tentang struktur imunoglobulin, biosintesis, dan genetika. Myeloma tikus yang telah diteliti jumlahnya mencapai ribuan.

Dalam sebagian besar kasus, spesifisitas pengikatan antigen protein myeloma belum diketahui, dan upaya untuk menghasilkan antigen spesifik mieloma dengan stimulasi antigen yang intens sebelum induksi tumor telah gagal. Namun, program skrining ekstensif telah menghasilkan sejumlah myeloma pengikat antigen, dan ini sangat berguna dalam studi situs penggabungan antigen. Spesifisitas yang paling umum adalah untuk antigen karbohidrat dan fosforil kolin, mungkin mencerminkan stimulasi antigenik oleh mikroorganisme dalam usus.

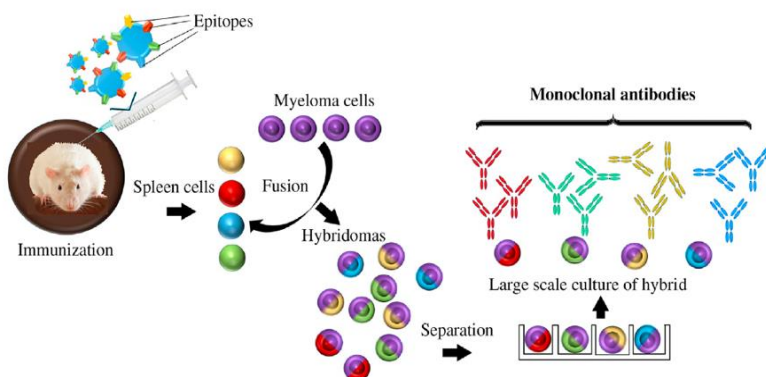
Tingkat sintesis imunoglobulin oleh plasmacytomas cukup tinggi, dan biasanya berkisar 20-30% dari total sintesis protein. Sintesis rantai ringan biasanya agak mirip dengan rantai berat, kemungkinan karena rantai berat yang terisolasi merupakan selnya. Mekanisme untuk toksisitas ini mungkin adalah kelebihan muatan yang mengikat protein yang tidak dilipat dan sebagian dirakit di retikulum. Cahaya berlebih biasanya dikeluarkan. Asalkan sel tidak mati dan melepaskan isi sitoplasmanya selama pelabelan dengan asam amino radioaktif. imunoglobulin akan menjadi protein berlabel utama dalam supernatan myeloma (Mosier & Ladisch, 2009; S. Pandey, 2010).

2. Produksi Antibodi Monoklonal

Antibodi monoklonal diproduksi dari jenis sel B tertentu. Untuk menemukan dan memurnikannya, sel B tertentu cukup sulit karena sel B memiliki rentang hidup yang pendek. Karena tidak digunakan sebagai sumber antibodi berkelanjutan, mereka dikembangkan dengan teknologi hibridoma. Teknologi ini, yang dikembangkan pada kuartal terakhir abad ke-20, sangat penting untuk produksi mAb. Selain itu, tampilan faga rekombinan dapat diproduksi dengan baik pada tumbuhan transgenik maupun hewan transgenik.

a) Teknik hibridoma

Pada tahun 1975, sebuah teknik dikembangkan oleh G. Köhler dan C. Milstein di Universitas Cambridge. Teknik ini memungkinkan sejumlah besar produksi antibodi yang spesifik hanya untuk satu epitop, teknik tersebut dikenal sebagai teknologi "hibridoma". Sebagai hasil dari penemuan ini, para peneliti ini dianugerahi Penghargaan Nobel dalam bidang Fisiologi-Kedokteran.



Gambar 11. Representasi teknik hibridoma (Delves, 1985)

Dalam teknologi hibridoma, sel tumor digabungkan dengan sel mamalia penghasil antibodi; sel hibridoma yang diperoleh memiliki kapasitas untuk menghasilkan antibodi dalam jumlah yang tidak terbatas. Karena sel-sel ini diproduksi dari satu jenis sel, mereka disebut sel monoklonal, dan antibodi yang dihasilkan dari sel-sel ini disebut mAbs (Pandey, 2010). Immunoglobulin terapeutik biasanya diproduksi pada sel inang mamalia seperti sel

myeloma murine NSO, sel manusia PER.C6, dan sel CHO. Sel CHO digunakan untuk produksi 70% protein rekombinan. Alasan utama penggunaan sel CHO untuk produksi antibodi monoklonal adalah:

- Sel CHO terbukti aman selama 20 tahun terakhir, dan karenanya memudahkan untuk mendapatkan persetujuan dari beberapa lembaga seperti Food and Drug Administration (FDA).
- Sel CHO ditemukan kompatibel dengan teknik amplifikasi gen seperti dihidrofolat reduktase (DHFR) dan glutamin sintetase (GS).
- Sel CHO memiliki repertoar molekuler yang sesuai untuk modifikasi alami dan pasca-translasi yang bentuknya sebanding dengan yang ada pada manusia.
- Sel CHO tumbuh dengan baik dalam lingkungan suspensi tanpa serum. Untuk produksi skala besar, baja tahan karat dan bioreaktor sekali pakai dapat digunakan.

Teknologi hybridoma dapat diringkas dalam tujuh tahap (Pandey, 2010)

Tahap 1: Imunisasi tikus

Untuk produksi mAb yang spesifik terhadap antigen, model hewan percobaan diimunisasi dengan antigen ini melalui injeksi. Imunisasi mengaktifkan sel B dan menyebabkan sintesis limfosit B di limpa (Pandey, 2010).

Tahap 2: Persiapan splenosit

Limpa dibedah dan splenosit disiapkan pada langkah kedua. Untuk dapat memperoleh sel tunggal, sampel diinkubasi dengan buffer lisis Red Blood Cell (RBC) kemudian dicuci (Pandey, 2010).

Tahap 3: Menggabungkan sel

Pada langkah ini, splenosit dan sel myeloma digabungkan dalam rasio yang ditentukan. Lebih direkomendasikan jika garis sel myeloma yang dipilih tidak boleh menghasilkan antibodi. Beberapa agen seperti polietilen glikol atau virus sendai digunakan untuk mencampur suspensi sel (Pandey, 2010).

Tahap 4: Pemilihan sel hibrida

Campuran sel hibridoma dibawa ke lingkungan yang mengandung hipoksantin, aminopterin, dan timidin. Aminopterin bertindak sebagai antagonis folat dan menghambat biosintesis nukleotida de novo. Jadi sel hibridoma menyediakan sintesis purin dan pirimidin melalui jalur "sintase penyelamatan" menggunakan hipoksantin

dan timidin di lingkungan sel. Akhirnya, sel β mati karena masa hidup yang pendek, dan sel myeloma yang tidak terhibridisasi juga mati karena pemblokiran jalur produksi *de novo* mereka. Satu-satunya sel hidup adalah yang dihibridisasi dengan sel tumor (Pandey, 2010).

Tahap 5: Seleksi klonal

Setelah mengamati hibridoma gabungan, yang terpenting adalah memilih sel hibrid optimal yang menghasilkan antibodi yang diinginkan daripada memilih sel hidup. Untuk percobaan ini, plat 96 sumur digunakan, dan peneliti mencoba untuk menempatkan hanya satu sel di setiap sumur. Setelah inkubasi, sel berkembang biak. Dengan peningkatan jumlah sel ini, produksi antibodi dimulai pada tingkat tertentu, dan sel hibrida tertentu dipilih dengan memeriksa supernatan kultur menggunakan berbagai metode (Pandey, 2010).

Tahap 6: Ekspansi klon

Setelah penentuan klon spesifik, klon diperluas dengan metode *in vivo* dan *in-vitro*. Dalam metode *in-vitro*, sel diangkut ke piring yang lebih besar (misalnya, piring 6 12 24 48 96-sumur). Kemudian, sel-sel yang tumbuh di pelat ini selanjutnya dipindahkan ke labu kultur jaringan. Setelah tumbuh dalam botol-botol tersebut, klon dibekukan untuk eksperimen selanjutnya. Pada metode *in vivo*, klon seluler penghasil antibodi dapat disuntikkan ke dalam rongga peritoneum mencit. Sel-sel ini kemudian menunjukkan pertumbuhan mirip tumor dan antibodi mulai diproduksi dari sel hibridoma di rongga peritoneum dalam cairan asam (Pandey, 2010).

Tahap 7: Pemurnian

antibodi monoklonal tidak harus selalu dimurnikan setelah diproduksi; namun, perlu dimurnikan dalam beberapa kondisi kritis. Kondisi kritis tersebut adalah:

- jumlah antibodi rendah;
- ada kontaminasi oleh senyawa lain atau cairan asam;
- antibodi akan digunakan untuk pengobatan tertentu;
- antibodi akan digunakan untuk diagnosis;
- antibodi yang disintesis akan diproses lebih lanjut (konjugasi, basa fosfatase, pewarnaan fluoresensi, dan proses lainnya).

Dalam situasi ini, kromatografi kolom afinitas biasanya digunakan untuk pemurnian antibodi monoklonal. Ada beberapa pedoman untuk pemurnian antibodi (Pandey, 2010).

b) Teknik phage-display

Gen yang mengkode protein yang berbeda, baik pada organisme prokariotik atau eukariotik, berhasil dikloning dan diekspresikan dengan bantuan beberapa vektor (faga, plasmid, kosmid, fagaemid, virus, bakteri) pada mikroorganisme (biasanya pada bakteri basil) dan/atau sel eukariotik. Ada beberapa gen Ig di antara gen tersebut. Karena tidak hanya ada satu urutan DNA dalam gen Ig, mereka dapat dibentuk dengan reorganisasi gen yang terpisah. Karena tidak mungkin memperoleh gen yang terpisah pada saat yang sama, gen Ig fungsional belum diklon. Namun, bagian Fc dari rantai berat atau hanya bagian spesifik dari antibodi (dikloning secara terpisah (Sataloff et al., 2009; Walker & Rapley, 2002; Burrell, 1993)).

Molekul antibodi dapat diproduksi dengan menggunakan teknologi DNA rekombinan. Dalam pengertian yang paling umum, teknologi tampilan faga dapat diringkas sebagai presentasi protein rekombinan dan struktur peptida yang mampu mengenali molekul target spesifik pada permukaan faga berfilamen. Biasanya vektor faga M13, f1 atau fd dipilih. Semua vektor ini adalah bakteriofaga yang memiliki mantel protein eksternal. Gen antibodi (fragmen) diikat ke DNA faga, yang memungkinkan ekspresi pada lapisan protein eksternal fagaa. mRNA dari daerah VH dan VL yang mengenali antigen diisolasi. mRNA ditranskripsi terbalik menjadi cDNA dan diperkuat oleh reaksi berantai polimerase. Gen VH dan VL yang diperkuat ini dihubungkan oleh penghubung DNA sintesis pendek. Sebuah penaut dibentuk oleh kira-kira 15 asam amino, dan interval dalam panjang 3,5 nm diisi antara ujung terminal 50-amino dan ujung terminal 30-karboks dari VH. Akhirnya, stabilitas dan afinitas molekul yang disiapkan serupa dengan molekul antibodi alami. Gen VH dan VL yang terbentuk ini disebut fragmen variabel rantai tunggal (scFVs). Sebuah scFV ditempatkan di antara gen protein pIII, yang merupakan protein mantel utama dari M13 atau fd. Kemudian, faga ini diubah menjadi *Escherichia coli*, dan replikasi fagaa di dalam *E. coli* akan berlangsung. Produk gen fusi diekspresikan pada protein lapisan permukaan partikel faga yang baru terbentuk. Beberapa antibodi terikat protein g3p diekspresikan pada permukaan partikel faga yang membawa urutan gen scFv (Azzazy dan Highsmith, 2002). Kehadiran antibodi

di ujung faga yang meninggalkan sel diperiksa menggunakan metode imunologi (analisis imunosorben yang bergantung pada enzim, ELISA, misalnya). Faga dan antibodi yang tidak terikat dihilangkan dengan mencuci. Faga yang membawa antibodi pada akhirnya dan *E. coli* TG1 terinfeksi sekali lagi, dan disemai ke lingkungan yang padat. Koloni murni dihasilkan, dan partikel faga pembawa antibodi dalam jumlah ekstra diperoleh. Segmen antibodi ini kemudian dimurnikan dengan ekstraksi dari *E. coli* dan elemen faga (Antibodies, 2009; King et al., 1998).

c) Menggunakan hewan transgenik

Kemampuan untuk membuat perubahan genetik pada tingkat molekuler telah dipastikan sebagai revolusi dalam biologi. Teknologi transgenik merupakan persilangan antara embriologi, biologi seluler, dan teknik genetika molekuler. Produksi Ig transgenik bergantung pada produksi hewan transgenik. Transgen Ig pertama yang diekspresikan pada tikus transgenik mengkodekan rantai ringan isotipe murine. Limpa digunakan untuk ekspresi transgen, dan protein yang diekspresikan terdeteksi dalam serum hewan transgenik.

Transgen tidak hanya diekspresikan dalam sel B dan T tikus transgenik, tetapi juga dikombinasikan dengan rantai cahaya endogen inang untuk menghasilkan IgM fungsional. Jadi, ketika transgen yang mengkode ringan rantai berat Ig digabungkan dengan molekul endogen yang sesuai, Ig yang berfungsi penuh dapat diproduksi. Ig spesifik penyakit dan Ig manusia dapat diproduksi menggunakan hewan transgenik (Davis, 1995).

Injeksi mikro pada segmen besar DNA (Translocus), yang membawa lokus Ig manusia, adalah pendekatan lain. Jadi sejumlah besar lokus gen ekspresi Ig manusia yang fungsional ditransmisikan ke tikus transgenik. Ketika hewan ini diimunisasi dengan antigen tertentu, ia menghasilkan Igs manusia khusus antigen secara *in vivo*. Dalam beberapa tahun terakhir, fokusnya adalah pada produksi “sapi transgenik”.

Untuk dapat memperbanyak hewan transgenik, sel telur mencit hasil fertilisasi yang diperoleh setelah superovulasi disuntikkan ke pronukleus jantan secara mikroinjeksi. Dengan demikian diperoleh hewan transgenik yang membawa banyak salinan Ig manusia. Lokus IgH, yang panjangnya B100 kb, diatur ulang melalui integrasi ekor dari dua plasmid; kombinasi ini dibangun oleh segmen di setiap kosmid, kemudian.

Memperoleh protein dari susu hewan adalah pendekatan lain yang menjanjikan untuk produksi protein skala besar. Keberhasilan pendekatan ini dibuktikan dengan diperolehnya lebih dari 20 protein. Secara khusus, sapi, kambing, babi, kelinci, dan tikus adalah model hewan yang menjanjikan untuk produksi mAb. Meskipun produksi protein rekombinan dapat disediakan oleh jaringan yang berbeda, susu adalah sumber yang paling umum karena susu adalah produk yang dapat dengan mudah dikumpulkan dan dimurnikan. Ada sekitar 5 g protein rekombinan mirip mAb per liter susu. Jika dihitung lebih lanjut, jumlah protein yang dihasilkan bisa mencapai 4 kg per tahun. Untuk alasan ini, bahkan kawanan kambing dapat menghasilkan beberapa ratus kilogram antibodi dalam setahun dengan biaya yang rendah. Produksi telur transgenik adalah pendekatan lain: produksi protein dalam jumlah besar dapat diperoleh dari isi telur. Selain itu, pemanenan protein bahkan lebih mudah menggunakan metode ini (Burrell, 1993; Sataloff et al., 2009; Walker & Rapley, 2002).

d) Menggunakan tanaman transgenik

Produksi protein rekombinan pada tanaman transgenik diusulkan sebagai alternatif yang baik untuk sistem ekspresi tradisional. Setelah gen penyandi Ig diekspresikan dalam tembakau, kemungkinan produksi protein heterolog aktif menjadi topik penelitian yang hangat. Dimungkinkan untuk menggunakan tanaman untuk produksi antibodi skala besar dengan biaya yang dapat diterima. Antibodi yang diperoleh dari tumbuhan disebut “*plantibodies*”.

Dengan menggunakan metode ini, produksi mAbs melalui integrasi gen penyandi antibodi ke dalam Ti-plasmid dan infeksi tanaman dengan strain *Agrobacterium* dapat dilakukan; itu disebut transformasi yang dimediasi *Agrobacterium*. Selain itu, plasmid ini dipindahkan ke dalam sel tumbuhan menggunakan elektroporasi, pemboman partikel (dengan senjata gen), dan sonikasi. Dengan metode ini, gen yang ditangkap menyediakan cara untuk menghasilkan antibodi target di celah seluler sel tumbuhan (apoplas). Antibodi ini adalah IgG dan IgA ukuran penuh, IgG dan IgA chimera, IgG sekretori (sIgG) dan IgA (sIgA), fragmen Fv rantai tunggal (scFv), fragmen Fab, dan domain variabel rantai berat. Selain itu, sistem tanaman memenuhi syarat untuk memproduksi antibodi dimerik fungsional seperti antibodi sekretorik mamalia. Molekul scFv fungsional diekspresikan di daun, dan terutama di organ penyimpanan tanaman. Sebagian

besar molekul scFv juga terakumulasi baik di retikulum endoplasma atau di apoplas lebih banyak daripada di sitosol.

Tidak ada konsensus tentang jenis tanaman terbaik untuk produksi antibodi komersial. Untuk keperluan ini biasanya digunakan tanaman tembakau, kedelai, alfalfa, dan padi karena mAb dapat tetap stabil di dalam biji dan umbi tanaman tersebut. Melalui molekul scFv, mAbs dapat disimpan di dalam media beras selama 6 bulan, dan dapat mempertahankan 50% fungsinya selama 18 bulan dalam umbi kentang. Selain itu, scFv dan IgG kehilangan sejumlah kecil mAb ketika ditanam di tembakau kering dan tanaman alfalfa selama 5-7 hari.

Produk Ig paling menarik yang dihasilkan dari tumbuhan adalah sIgAs. SIgA melindungi dari bakteri *Streptococcus mutans*, yang menyebabkan kerusakan gigi, yang digunakan untuk pengobatan kondisi itu. Antibodi IgA ini dioleskan ke gigi, di mana ia menghalangi kolonisasi *S. mutans*. Contoh kedua adalah antibodi humanized anti-herpes simplex virus (HSV) yang diproduksi dalam kedelai. Antibodi ini efektif pada transmisi HSV-2 pada tikus. Contoh ketiga adalah antibodi terhadap antigen karsinoembrionik yang diproduksi sebagai antigen permukaan pada beras. Jelas bahwa produksi antibodi yang berasal dari tumbuhan akan lebih umum untuk terapi kekebalan manusia dan aplikasi lain di masa depan.

Sebagai sumber protein, tanaman transgenik hasil rekayasa genetika memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan yang diproduksi dalam serum/ jaringan hewan, garis sel yang ditransfeksi dengan mikroba rekombinan, dan hewan transgenik. Beberapa kemungkinan adalah produksi bahan mentah pada skala pertanian dengan biaya rendah dengan keuntungan biaya rendah sehubungan dengan fermentasi; peningkatan produksi yang cepat dan perakitan protein multimerik eukariotik yang benar seperti antibodi. Selain itu, tanaman akan menjadi lebih aman karena HIV, prion, virus hepatitis, dan molekul berbahaya lainnya yang bersifat patogen bagi manusia tidak tersimpan di dalam tanaman. Selain itu, tumbuhan tidak memberikan respons Human anti-mouse antibody (HAMA); Namun, antibodi memiliki beberapa efek samping pada tumbuhan, dan sulit dikembangkan (Büyükköroğlu & Şenel, 2018; Delves, 1985; M. Pandey & Mahadevan, 2014).

BAB VII

TEKNOLOGI KULTUR SEL

1. Kultur Mikroba dan Aplikasinya

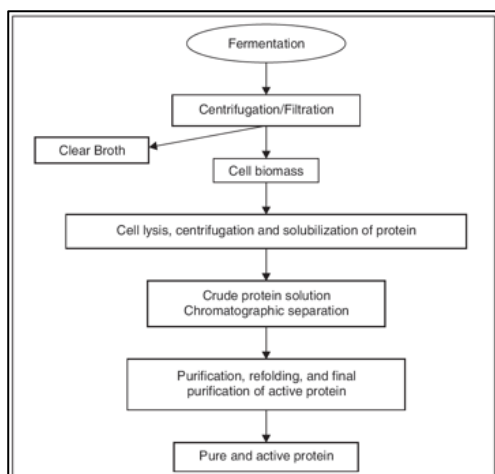
Populasi mikroba mendominasi biosfer baik dalam hal dampak maupun dalam hal jumlah metabolik. Di antara berbagai jenis mikroba, prokariota adalah bentuk kehidupan yang paling menyebar di planet ini, pada umumnya memiliki kemampuan mentolerir pH, suhu, konsentrasi garam yang ekstrem, dan lain-lain. Keragaman metabolik di antara prokariota jauh lebih besar dibandingkan dengan gabungan semua eukariota. Manusia telah sejak lama memanfaatkan populasi bakteri dan ragi serta fungi untuk pembuatan berbagai bahan kimia, biokimia, antibiotik, minuman, makanan dan lain-lain.

Produksi antibiotik, alkohol, cuka, asam amino, vitamin, antibodi terapeutik, aseton dan pelarut lain, dan rekombinan protein diproduksi dengan kultur sel mikroba skala besar seperti bakteri, alga, ragi, dan fungi pada skala industri. Dalam semua aplikasi industri tersebut, aktivitas metabolisme atau jalur biokimia digunakan untuk produksi bahan kimia tertentu dengan memanfaatkan substrat atau sumber karbon seperti sukrosa. Di sini, kultur mikroba berperan sebagai pabrik, dimana substrat sebagai bahan bakunya. Itu diubah menjadi produk dan disekresikan ke media. Produk dapat dipulihkan dari media dengan proses yang disebut pemrosesan hilir. Ada batasan bagi satu sel untuk mengubah bahan mentah menjadi produk dalam jangka waktu tertentu. Hal ini dimungkinkan untuk menghitung

laju pembentukan produk oleh satu sel di bawah kondisi metabolisme tertentu, jika kita mengetahui jumlah produk yang terbentuk selama periode waktu tertentu dan jumlah sel dalam kultur. Jika kita ingin menghasilkan jumlah produk tertentu selama periode waktu tertentu, dimungkinkan untuk menghitung jumlah sel bakteri atau mikroba yang diperlukan untuk mengoperasikan bioproses pada skala industri.

Kultur mikroba harus dilengkapi dengan lingkungan kimia dan fisik yang diperlukan untuk perkalian dan keadaan fisiologis yang tepat, sehingga sel dapat melakukan biokonversi yang diperlukan secara maksimal. Lingkungan kimiawi sel mikroba adalah kondisi nutrisi di mana ia tumbuh, mencakup pH dan suhu yang sesuai kebutuhan mikroba.

Beberapa protein yang dihasilkan oleh bakteri bersifat intraseluler dan tidak disekresikan ke dalam media kultur, terutama protein rekombinan. Dalam kasus seperti itu, pemrosesan hilir melibatkan pemecahan sel yang diikuti dengan ekstraksi dan pemurnian. Produksi insulin rekombinan oleh kultur sel *E.coli* diilustrasikan pada gambar di bawah. Setelah produk dimurnikan, produk dipekatkan ke kemurnian yang diperlukan dan distabilkan oleh bahan yang diperlukan, yang dikenal sebagai eksipien, dan siap untuk dipasarkan setelah evaluasi kualitas.



Gambar 12. Diagram alir pemrosesan hilir intraseluler insulin rekombinan sebagai contoh produk mikroba yang diproduksi oleh *E. coli*

a) Isolasi dan perbaikan strain mikroba

Mikroba, seperti yang telah kita amati, mampu menghasilkan sejumlah besar bahan kimia dan biokimia yang berguna untuk berbagai keperluan. Tujuan utama pembiakan mikroba adalah menggunakannya secara industri untuk produksi senyawa tertentu dalam skala besar. Tetapi langkah pertama dalam produksi mikroba dari senyawa yang berguna adalah isolasi, atau akuisisi, mikroba yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan atau mensintesis bahan yang diinginkan. Lingkungan kita, termasuk tanah, udara, dan air merupakan sumber yang kaya dari berbagai jenis mikroba. Oleh karena itu, untuk mengisolasi mikroba yang memiliki aktivitas enzim tertentu atau mampu menghasilkan senyawa, kita harus mencari di habitat alaminya dan mengisolasinya. Mikroba, terutama bakteri, juga hidup di habitat yang ekstrim seperti lingkungan yang sangat dingin, mata air panas, pH rendah, dan juga dalam kondisi basa. Dengan demikian, mikroba dengan kualitas yang diinginkan dapat diisolasi dari lingkungan alaminya. Kualitas organisme yang diinginkan yang telah diisolasi dapat ditingkatkan dengan berbagai metode termasuk mutasi yang diinduksi.

Akuisisi atau Isolasi

Strain bakteri dapat diperoleh baik dengan membeli sampel komersial atau dari sumber yang dikenal. Jika tidak, strain baru harus diisolasi dari habitat aslinya menggunakan teknik penyaringan yang berbeda. Teknik penyaringan untuk mengisolasi mikroba tertentu bergantung pada jenis aktivitas metabolik atau jenis produk. Dalam beberapa kasus, mikroba dapat menghasilkan perubahan warna yang khas dalam media ketika senyawa indikator ditambahkan ke dalam media. Untuk menyaring organisme kita harus menggunakan media seleksi, di mana komponen atau kondisi tertentu diperkenalkan untuk mengidentifikasi mikroba yang dibutuhkan. Selain teknik penyaringan langsung ini, ada teknik lain untuk mengisolasi mikroba yang dikenal dengan teknik pengayaan. Dalam metode ini sampel yang mengandung mikroba seperti tanah atau air diinokulasi dalam media cair nutrisi dan dibiarkan tumbuh di atas alat pengocok. Komposisi media spesifik dan kondisi pertumbuhan seperti suhu disediakan sedemikian rupa sehingga mendorong pertumbuhan atau pengayaan mikroba yang diinginkan. Kultur yang diperkaya dapat disubkultur dalam medium segar menggunakan inokulum kecil yang diambil dari kultur yang

diperkaya. Dengan cara ini organisme yang diinginkan dapat diperkaya ke tingkat yang lebih tinggi dan pada akhirnya kultur akan menjadi organisme yang diinginkan. Kultur yang diperkaya ini dapat digunakan untuk isolasi kultur murni dengan metode penyaringan menggunakan sifat spesifiknya.

Skrining mikroba juga dapat dilakukan secara langsung dengan bantuan antibodi yang مخصوص untuk mikroba tersebut. Antibodi mungkin melawan beberapa senyawa spesifik organisme yang ada di dinding sel atau membran sel atau mungkin melawan beberapa protein atau senyawa lain yang diproduksi dan disekresikan ke dalam media. Alih-alih antibodi, probe atau penanda DNA khusus organisme dapat dirancang dan digunakan untuk mendeteksi organisme tertentu. Nah ini salah satu teknik diagnosa untuk mendeteksi penyakit tertentu dengan mendeteksi keberadaan organisme patogen. Teknik microarray dapat digunakan untuk mendeteksi dan mengisolasi mikroba atau organisme tertentu yang diketahui menghasilkan satu atau lebih produk yang diinginkan dengan bantuan probe DNA spesifik produk (protein).

Perbaikan strain mikroba

Metode isolasi yang dijelaskan di atas akan memberikan strain yang mampu menghasilkan senyawa yang diinginkan. Tetapi mungkin tidak dapat menghasilkan produk dalam jumlah yang cukup sehingga mungkin sulit untuk mengembangkan proses yang ekonomis. Tetapi strain tersebut dapat dimodifikasi secara genetik untuk mendapatkan produk dalam jumlah yang cukup. Teknik biologi molekuler dan genetika klasik dapat digunakan untuk perbaikan strain untuk mendapatkan karakteristik yang diinginkan. Berikut ini adalah beberapa teknik yang biasa digunakan untuk perbaikan strain mikroba:

Mutasi. Pemilihan galur atau mutan yang bermutasi adalah teknik yang banyak digunakan untuk mendapatkan galur dengan kualitas yang lebih baik. Bakteri yang dapat mentolerir suhu tinggi adalah salah satu contohnya. Terjadi mutasi strain secara alami di habitat dan strain yang diinginkan dapat diisolasi secara langsung. Tetapi mutasi dapat diinduksi dengan mengekspos kultur ke beberapa bahan kimia atau mutagen fisik dan strain yang bermutasi dapat disaring dari kultur. Bahan kimia seperti nitrosoguanidine (atau NTG) atau mutagen fisik seperti sinar UV adalah metode yang sering digunakan untuk menciptakan mutasi pada strain bakteri

atau fungi. Dalam kebanyakan kasus, perlu untuk melakukan beberapa mutasi berturut-turut sebelum mendapatkan jenis variasi genetik yang tepat di antara organisme dalam suatu kultur. Setelah menyebabkan mutasi, organisme yang tepat dengan sifat yang diinginkan diisolasi dengan teknik penyaringan. Strain *pencillium chrysogenum* yang unggul telah dikembangkan dari strain liar dengan menginduksi beberapa mutasi yang berurutan. Strain baru yang dikembangkan mampu menghasilkan penisilin 100 kali lebih pekat daripada strain liar. Strain hasil tinggi ini telah membantu mengembangkan proses yang layak secara ekonomi untuk tujuan komersial.

Rekombinasi Genetik. Merupakan sekelompok proses alami yang membawa elemen genetik dari dua genom berbeda menjadi satu kesatuan sehingga menghasilkan genotipe baru tanpa adanya mutasi. Umumnya ada tiga mekanisme transfer gen antar organisme, yaitu: Transformasi, Transduksi, termasuk transduksi umum dan transduksi khusus dan Konjugasi. Setelah DNA asing berada di dalam sel, daerah homolog DNA donor dipotong dan diikat atau digabungkan ke DNA penerima. Potongan DNA yang dikenali oleh sel inang sebagai benda asing didegradasi oleh restriksi endonuklease.

Teknik Rekayasa Genetik. Ini adalah seperangkat alat (bukan ilmu) yang melibatkan manipulasi DNA di luar sel untuk membuat gen buatan atau kombinasi baru gen dengan elemen kontrol yang telah dirancang sebelumnya. DNA rekombinan umumnya memiliki komponen berikut – gen yang diinginkan bersama dengan jenis elemen kontrol atau promotor yang sesuai, replikasi atau asal replikasi, dan penanda seleksi. Gen yang diinginkan dapat diperoleh melalui salah satu metode berikut – kloning shotgun, hibridisasi, transkripsi balik mRNA, sintesis kimiawi gen jika urutan gen diketahui, atau dengan polymerase chain reaction (PCR) jika primer spesifik gen tersedia.

Pengawetan Strain

Setelah Anda mengisolasi strain karakteristik yang diinginkan, itu harus diawetkan atau disimpan dengan benar. Jika strain tidak diawetkan dengan benar, itu dapat mengubah sifat uniknya atau mungkin menurun seiring berjalannya waktu. Strain dapat disimpan atau diawetkan untuk digunakan di masa mendatang melalui salah satu metode berikut:

Penyimpanan di Agar. Ini adalah metode yang biasa digunakan di semua laboratorium mikrobiologi dan biologi molekuler untuk menyimpan kultur dalam waktu yang singkat. Kultur ditanam dan disimpan pada agar miring atau tusukan dan disimpan pada suhu 5 sampai 20°C. Jenis kultur ini dapat disimpan selama enam bulan dan harus disubkultur setiap enam bulan. Kadang-kadang disarankan untuk melapisi biakan dengan minyak mineral dan biakan semacam itu dapat disimpan setidaknya selama satu tahun. Dalam hal ini, kultur harus disubkultur setiap tahun.

Kriopreservasi. Metode pengawetan lain yang sangat efektif dan sederhana adalah kriopreservasi. Dalam hal ini biakan dicampur dengan agen krioprotektif seperti gliserol (10 sampai 30%) dan disalurkan dalam tabung kecil atau ampul. Kultur gliserin disimpan dalam nitrogen cair (- 176 hingga 196°C) untuk waktu yang sangat lama tanpa perubahan apa pun. Ini juga dapat disimpan pada - 80°C untuk durasi singkat selama enam bulan atau satu tahun.

Liofilisasi. Ini adalah metode di mana kultur dikeringkan pada suhu yang sangat rendah. Proses ini disebut pengeringan beku atau liofilisasi. Ini melibatkan pembekuan tiba-tiba kultur diikuti dengan pengeringan di bawah vakum. Dalam ruang hampa, molekul air akan disublimasikan dan biakan kering akan tetap hidup selama bertahun-tahun. Dalam kondisi ini, sel-sel tidak aktif sehingga dapat disimpan bahkan selama sepuluh tahun atau lebih tanpa kehilangan viabilitasnya.

Pusat Koleksi kultur mikroba

Beberapa pusat resmi yang memelihara strain mikroba yang telah diisolasi dan diidentifikasi di sana atau oleh orang lain dan disimpan ke dalam pusat ini untuk memelihara galur tersebut. Setelah galur baru diisolasi dari habitat alami atau galur baru dikembangkan melalui mutasi, galur tersebut dapat disimpan ke dalam beberapa pusat resmi ini untuk evaluasi atau identifikasi dan pelestarian yang tepat. Pusat-pusat ini juga menyediakan strain organisme bagi para ilmuwan yang terlibat dalam kegiatan penelitian. Tetapi mengingat potensi komersial dari kultur-kultur ini, terdapat peraturan yang ketat untuk penggunaan strain kultur untuk tujuan komersial dan penyimpanan kultur akan dilindungi melalui hak kekayaan intelektual. Pusat utama koleksi kultur mikroba di seluruh dunia adalah American Type Culture Collection (ATCC), National Collection of Industrial bakterion of Britain (NCIB),

dan DSM, Jerman (Deutsche Sammiung von Mikroban dan Zellkulturen, Jerman).

b) Penerapan teknologi kultur mikroba

Kultur mikroba memiliki banyak aplikasi. Dalam kehidupan kita sehari-hari, mereka memainkan peran penting dalam berbagai cara. Sel mikroba dapat digunakan untuk produksi berbagai zat, tergantung pada aktivitas metabolisme sel. Berikut aplikasi utama kultur mikroba untuk penelitian dasar dan aplikasi industri:

- Produksi sel mikroba utuh seperti makanan dan vaksin.
- Produksi metabolit primer seperti asam, alkohol, enzim, dan polisakarida mikroba.
- Produksi metabolit sekunder seperti antibiotik dan plastik biodegradable.
- Pencucian logam, limbah cair dan pengolahan limbah oleh mikroba.
- Sel mikroba seperti agen biotransformasi senyawa organik.
- Sebagai sel inang untuk produksi protein rekombinan, kloning gen, dan penelitian biologi molekuler lainnya.

Kultur mikroba yang paling tua digunakan untuk menghasilkan makanan fermentasi seperti keju dan anggur. Di sini, seluruh sel digunakan. Sel utuh juga digunakan untuk produksi protein sel tunggal dan vaksin tertentu seperti vaksin tetanus, vaksin tifoid, dan vaksin tuberkulosis. Untuk produksi protein sel tunggal, mikroba yang dipilih seperti ragi dan spirulina dibiarkan tumbuh dalam kultur (mungkin limbah pabrik pati) dan seluruh sel mikroba dikeringkan dan digunakan sebagai bahan makanan baik untuk konsumsi manusia maupun pakan ternak. Produksi asam organik, alkohol, berbagai jenis enzim, dan polisakarida adalah contoh metabolit primer. Antibiotik dan jenis molekul organik lainnya seperti hidrokarbon adalah contoh metabolit sekunder. Ekstraksi mikroba logam seperti tembaga dan besi dan pengolahan limbah cair atau limbah menggunakan sistem mikroba adalah contoh di mana metabolisme mikroba digunakan untuk mengubah limbah menjadi produk yang berguna dan dengan demikian pembuangan limbah tanpa menimbulkan pencemaran lingkungan. Dalam biologi modern, khususnya dalam biologi molekuler dan teknik rekombinan, sel mikroba tertentu seperti ekoli digunakan sebagai sel inang untuk kloning dan ekspresi gen tertentu serta produksi protein rekombinan. Produksi insulin manusia dalam *E. coli* dan pengembangan vaksin hepatitis

B dalam khamir merupakan contoh implementasi yang sempurna. Produksi vitamin C mikroba adalah contoh lain dari pemanfaatan metabolisme primer untuk produksi senyawa yang bermanfaat.

Tabel 5. Beberapa mikroba penghasil produk yang dihasilkan

| Mikroba | Produk |
|-----------------------------------|--|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Etanol dan produksi protein rekombinan seperti antigen permukaan hepatitis B |
| <i>Aspergillus niger</i> | Asam sitrat |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | Amilase |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | Penicillin |
| <i>Streptomyces griseus</i> | Streptomycin |
| <i>Propionibacterium shormani</i> | Vitamin B ₁₂ |
| <i>Escherichia coli</i> | Protein rekombinan |
| <i>Alcaligenes eutrophus</i> | Poly 3-hydroxybutyrate |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Dextran |

c) Bioetika dalam teknologi kultur mikroba

Bioteknologi, seperti penelitian dan pengembangan ilmiah lainnya, harus dipantau dan diatur secara ketat untuk menghindari dampak negatifnya terhadap masyarakat dan lingkungan. Bioteknologi adalah pedang bermata dua. Ini juga benar dalam kasus bioteknologi mikroba. Jadi produk dan proses harus aman, dan tindakan keselamatan yang diperlukan harus diterapkan untuk aplikasi industri serta di laboratorium. Beberapa pertimbangan keamanan penting khusus untuk bioteknologi mikroba adalah sebagai berikut:

- Mikroba yang digunakan di laboratorium dan untuk keperluan industri mungkin bersifat patogen dan dapat menginfeksi manusia dan hewan. Langkah-langkah keamanan khusus harus diterapkan saat bekerja dengan organisme semacam itu. Saat menangani organisme hasil rekayasa genetika untuk keperluan industri, perhatian khusus harus diberikan untuk memastikan bahwa organisme tersebut tidak boleh bocor ke lingkungan. Oleh karena itu, informasi yang jelas tentang kemungkinan patogenitas mikroba yang digunakan dalam penelitian harus tersedia.
- Produk mikroba harus dievaluasi aktivitas toksisitas dan alerginya sebelum dilepaskan ke pasar.
- Pembuangan limbah, yang juga termasuk mikroba bekas, tidak boleh membahayakan lingkungan dan makhluk hidup.

- Strain bakteri atau mikroba lain harus dipertahankan tanpa menyebabkan kontaminasi atau mutasi.
- Kultur bakteri yang resisten terhadap antibiotik dapat meningkatkan kolam lingkungan dari organisme yang resisten terhadap antibiotik. Ini tidak boleh dipromosikan.

Jika organisme hasil rekayasa genetika lolos, hal itu dapat menyebabkan perubahan genetik yang serius pada organisme lain, termasuk manusia, dan memengaruhi metabolisme normal. Umumnya, organisme yang aman dan dikenal dengan istilah Generally Recognized as Safe (GRAS) yang banyak ditemukan di alam dapat berubah menjadi potensi bahaya jika dimodifikasi secara genetik, yang dapat menciptakan perubahan lingkungan yang tidak dapat diprediksi dan tidak diinginkan. Panduan telah dibuat untuk mengatasi masalah keamanan bioteknologi ini. Organisme hasil rekayasa genetika yang dilepaskan ke lingkungan untuk pembersihan lingkungan harus dipantau secara teratur untuk melihat apakah menimbulkan masalah dalam keseimbangan lingkungan. Badan Perlindungan Lingkungan (Environmental Protection Agency/ EPA) terlibat dengan aspek keamanan organisme hasil rekayasa genetika yang dilepaskan ke lingkungan. Jika organisme baru yang dimodifikasi secara genetik harus dilepaskan ke lingkungan, itu harus disetujui oleh EPA.

2. Kultur Sel Tanaman dan Aplikasinya

Kultur jaringan adalah kultur dan pemeliharaan sel atau organ tumbuhan dalam kondisi steril, bergizi, dan mendukung lingkungan (*in-vitro*). Ini memiliki aplikasi dalam penelitian dan perdagangan. Dalam setting komersial, kultur jaringan sering disebut sebagai mikropropagasi, yang sebenarnya hanya salah satu bentuk dari sekumpulan teknik. Mikropropagasi mengacu pada produksi seluruh tanaman dari kultur sel yang berasal dari eksplan (potongan jaringan awal yang dimasukkan ke dalam kultur) dari (biasanya) sel meristem. Prinsip dasar kultur jaringan adalah totipotensi sel. Sel tumbuhan memiliki semua informasi genetik untuk berkembang menjadi tumbuhan utuh (Neumann et al., 2020; Satya & Sarkar, 2018; Bahadur et al., 2015; Davey & Anthony, 2010).

Sebagian besar percobaan kultur jaringan awal gagal, setidaknya sebagian, karena jaringan tanaman yang diisolasi sangat rentan terhadap serangan mikroba oleh populasi mikroba bawaan yang bersaing dengan jaringan tanaman dalam media

kultur, tanpa adanya resistensi dari jaringan tanaman. Bakteri, fungi, dan organisme lain, yang dapat bertahan sampai tingkat tertentu oleh seluruh tanaman, dapat dengan mudah mengalahkan fragmen jaringan yang terisolasi dari tanaman di lingkungan yang relatif kaya nutrisi dalam labu kultur. Oleh karena itu, organisme pesaing perlu dikeluarkan dari kultur dan mengisolasi dalam kondisi aseptik, biasanya dalam labu kecil atau tabung reaksi. Hal ini biasanya dilakukan dengan sterilisasi permukaan kimiawi dari eksplan dengan bahan seperti pemutih dengan konsentrasi dan untuk jangka waktu yang akan membunuh atau menghilangkan patogen tanpa melukai sel tanaman setelah pemulihan. Labu media dan kultur yang digunakan juga harus steril.

Pada tahun 1902, untuk pertamakalinya dilakukan kultur sel tanaman yang diisolasi pada media nutrisi buatan. Meskipun saat itu tidak berhasil menumbuhkan dan membedakan sel, namun kultur sel dapat dipertahankan dalam kondisi hidup untuk waktu yang lama. Setelah itu, selama periode 1902 hingga 1930, dilakukan upaya untuk mengkultur jaringan dan organ tanaman yang terisolasi seperti akar, pucuk, puncak, dan embrio yang dikenal sebagai kultur organ. Selama periode ini, berbagai jenis media nutrisi dievaluasi untuk kultur dan diferensiasi organ dan jaringan. Media nutrisi yang sesuai dikembangkan untuk mengkultur embrio, antera, serbuk sari, sel, dan protoplas yang diisolasi dan meregenerasi seluruh tanaman dari sel, jaringan, dan organ yang dikulturkan untuk spesies tanaman yang berbeda. Selama 1940 hingga 1970, banyak percobaan dilakukan untuk memformulasi media nutrisi yang sesuai dan membakukan kondisi kultur termasuk berbagai kombinasi hormon tanaman pada morfogenesis *in-vitro*. Dengan munculnya metode rekayasa genetika pada 1980-an, transfer gen spesifik dari organisme lain termasuk mikroba dan hewan menjadi mungkin untuk dilakukan ke dalam sel tumbuhan dan protoplas serta meregenerasi seluruh tumbuhan-tumbuhan transgenik. Pengenalan tanaman transgenik atau tanaman hasil rekayasa genetika (GM) dengan karakteristik agronomi yang lebih baik merupakan dorongan nyata bagi pertanian dan mungkin bertanggung jawab atas revolusi hijau kedua. Selain aplikasi di bidang pertanian, rekayasa genetika tanaman juga telah membantu untuk memahami mekanisme dasar ekspresi gen dan keterlibatannya dalam berbagai aktivitas seperti morfogenesis dan diferensiasi (Abdin et al., 2017).

a) Teknik Kultur Sel dan Jaringan Tanaman

Teknik Dasar

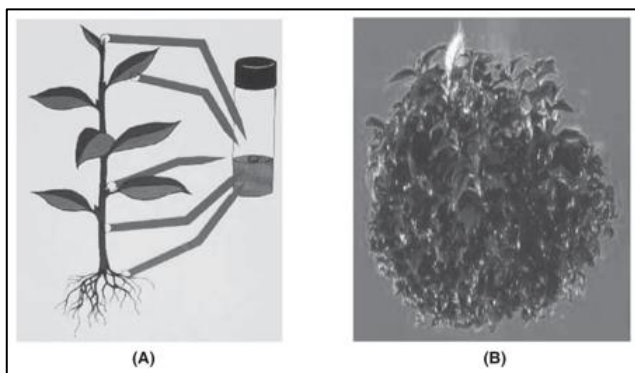
Kultur jaringan tanaman (mikropropagasi) adalah teknik yang dapat digunakan untuk memperbanyak massal tanaman eksotik. Kultur jaringan tanaman adalah alat yang digunakan secara luas dalam bisnis pembibitan dan bioteknologi tanaman untuk produksi cepat banyak tanaman identik secara genetik dengan menggunakan ruang, persediaan, dan waktu yang relatif kecil.

Pada dasarnya, teknik ini terdiri dari mengambil sepotong tanaman (seperti ujung batang, simpul, meristem, embrio, atau bahkan biji) dan menempatkannya di media nutrisi yang steril (biasanya berbasis gel) dalam tabung dan dibiarkan berkembang biak. Formulasi media pertumbuhan berubah tergantung pada apakah seseorang berusaha menghasilkan jaringan kalus somatik yang tidak berdiferensiasi, memperbanyak jumlah planlet, menumbuhkan akar, atau memperbanyak embrio untuk 'benih buatan.' Berikut ini adalah langkah-langkah utama yang terlibat dalam kultur jaringan tanaman:

- Pemilihan eksplan atau jaringan.
- Sterilisasi permukaan eksplan untuk menghilangkan mikroflora yang ada di permukaan menggunakan disinfektan seperti natrium hipoklorit atau merkuri klorida, diikuti dengan pencucian berulang dengan air suling steril.
- Inokulasi eksplan yang lebih dahulu disterilkan permukaannya dengan ukuran yang sesuai ke dalam media kultur dalam kondisi aseptik di dalam ruang aliran udara laminar.
- Media kultur harus mengandung komponen hara yang sesuai dengan komposisi yang tepat termasuk zat pengatur tumbuh.
- Kultur yang diinokulasi dipindahkan ke ruang pertumbuhan atau ruang kultur jaringan yang memiliki kondisi fisik yang sesuai seperti suhu yang tepat (26 hingga 28°C), kelembaban relatif (50 hingga 60%), dan cahaya fluoresen (fotoperiode 16 jam).
- Plantlet diregenerasi dari jaringan dan sel yang dikultur.
- Tanaman yang sepenuhnya beregenerasi (dengan pucuk dan akar) dipindahkan ke rumah kaca dan kemudian ke ladang setelah aklimatisasi yang sesuai.

Langkah-langkah tersebut merupakan metode atau protokol standar untuk mikropropagasi spesies tanaman. Tetapi semua

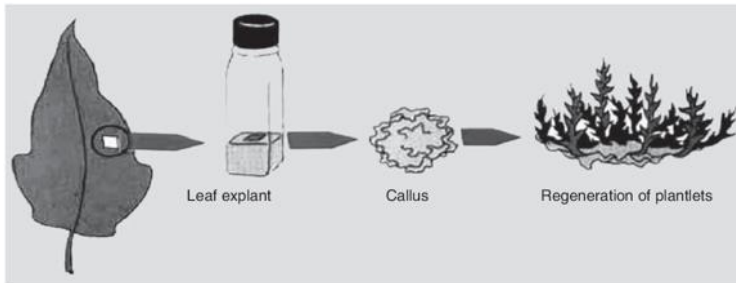
kondisi ini harus distandarisasi untuk setiap spesies tanaman. Perbanyakan mikro memungkinkan produksi sejumlah besar tanaman yang secara genetik identik dari potongan-potongan kecil tanaman stok dalam periode waktu yang relatif singkat. Tergantung pada spesiesnya, potongan jaringan asli dapat diambil dari ujung pucuk, daun, tunas lateral, batang, atau jaringan akar (lihat gambar (A)). Setelah tanaman ditempatkan dalam kultur jaringan, perkembangbiakan tunas lateral dan tunas adventif (lihat gambar (B)) atau diferensiasi tunas langsung dari kalus (massa sel yang tidak terorganisir), menghasilkan peningkatan jumlah yang luar biasa. dari tunas tersedia untuk rooting. Planlet berakar dari banyak spesies telah ditanam dan diproduksi serta telah berhasil ditanam baik di dalam wadah maupun penanaman di lapangan setelah aklimatisasi. Dua hal terpenting yang harus kita ingat adalah bahwa metodologi ini merupakan sarana percepatan perbanyakan tanaman secara asexual dan bahwa tanaman yang dihasilkan dengan teknik ini akan menurunkan sifat yang persis dengan tumbuhan yang diperbanyak secara vegetatif.



Gambar 13. (A) Sumber eksplan untuk kultur jaringan. (B) Regenerasi planlet (Smith, 2009)

Mikropropagasi menawarkan beberapa keuntungan, yang tidak mungkin diperoleh dengan teknik perbanyakan secara konvensional. Satu eksplan dapat diperbanyak menjadi beberapa ribu tanaman dalam waktu yang sangat singkat. Pada kebanyakan spesies, pengambilan eksplan jaringan asli tidak merusak tanaman induk. Setelah mapan, kultur yang membelah secara aktif merupakan sumber stek mikro yang berkelanjutan, yang dapat menghasilkan produksi tanaman dalam kondisi rumah kaca tanpa gangguan musiman. Dengan menggunakan metode

mikropropagasi, pembibitan dapat dilakukan dengan sangat cepat. Untuk permintaan tanaman hias unggul yang tinggi, dapat dikultur dalam jumlah yang cukup sehingga berdampak pada pemenuhan permintaan pasar tanaman lanskap.



Gambar 14. Regenerasi planlet dari kultur kalus (Smith, 2009)

Media Nutrisi

Ketika sebagian kecil tumbuhan diisolasi, maka bagian tersebut tidak lagi dapat menerima nutrisi atau hormon dari tumbuhan asalnya, maka nutrisi harus disediakan untuk memungkinkan berlangsungnya pertumbuhan *in-vitro*. Selain itu, kultur harus dilengkapi dengan kemampuan untuk mengeluarkan produk sisa metabolisme sel dengan cara mengkulturkannya pada media kultur yang sesuai. Media harus ditambahkan secara berkala. Lingkungan yang terkendali diperlukan untuk pertumbuhan sel secara *in-vitro*. Kultur jaringan, dipertahankan oleh media nutrisi dan terkurung dalam wadah pelindung, membutuhkan iklim yang stabil dan sesuai. Dengan demikian, cahaya dan suhu harus diatur lebih hati-hati pada lingkungan tempatnya dikultur.

Media kultur jaringan tanaman yang khas terdiri dari semua zat gizi makro dan mikro selain sumber karbon, vitamin, dan zat pengatur tumbuh. Nutrisi makro dan mikro umumnya ditambahkan sebagai garam anorganik. Sumber karbon yang biasa dalam media kultur jaringan adalah sukrosa dan vitamin penting yang termasuk di dalamnya adalah asam nikotinat, tiamin, dan piridoksin. Di media tertentu, asam amino seperti glisin atau arginin juga ditambahkan. Bahan-bahan ini merupakan media basal. Zat pengatur tumbuh ditambahkan ke media basal sesuai persyaratan kondisi kultur dan tujuan percobaan. Zat pengatur tumbuh penting yang ditambahkan dalam media kultur jaringan adalah auksin seperti indole acetic acid (IAA), indole butyric acid (IBA), dan 2, 4-D,

sitokinin seperti kinetin dan giberelin seperti asam giberelat. Zat pengatur tumbuh ini ditambahkan dalam konsentrasi yang sesuai secara individual atau dalam kombinasi. Konsentrasi dan kombinasi zat pengatur tumbuh memiliki peran kunci dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel dan jaringan yang dikultur. Senyawa organik penting lainnya yang ada di semua media kultur jaringan adalah myoinositol. Dalam beberapa kasus, media akan dilengkapi dengan ekstrak jaringan seperti santan, jus tomat, ekstrak ragi, kasein hidrolisat, atau ekstrak malt untuk memenuhi tujuan khusus. Komposisi media dan suplemen khusus termasuk komposisi hormonal untuk jenis tumbuhan atau jaringan tertentu ditentukan dengan metode trial and error. Ada sejumlah komposisi media dasar yang tersedia untuk kultur jaringan tanaman, yang dikhususkan untuk berbagai jenis tanaman. Media basal yang paling banyak digunakan adalah media Murashige dan Skoog (MS) yang dikembangkan oleh Murashige dan Skoog pada tahun 1962.

Di masa lalu, campuran garam mineral disiapkan sebagai larutan stok mulai dari 10 hingga 100 kali konsentrasi akhir yang digunakan dalam media. Larutan stok dapat dibuat sebagai dua larutan, satu mengandung semua nutrisi makro dan yang lainnya mengandung semua nutrisi mikro. Larutan ini harus dijaga tetap encer (10 sampai 20X) untuk menghindari pengendapan kalsium dan magnesium fosfat dan sulfat. Besi-EDTA kelat dibuat dari besi sulfat dan Na-EDTA dengan mencampurkan jumlah yang tepat dari dua senyawa dengan air dan kemudian diautoklaf. Stok ini harus disimpan dalam wadah gelap di bawah pendingin.

Saat ini, beberapa perusahaan menjual campuran garam dan vitamin yang sudah disiapkan dalam bentuk bubuk dehidrasi. Dengan demikian menjadi lebih mudah ditangani dengan menambahkan bubuk dalam jumlah yang tepat ke air. Campuran juga dapat dibeli sebagai media lengkap atau sebagai garam saja. Kemasannya sering kali berisi bahan yang diperlukan untuk satu liter media. Isinya sangat higroskopis, oleh karena itu lebih baik digunakan sesegera mungkin setelah kemasan dibuka, atau disimpan pada kondisi yang sesuai.

Kualitas air yang digunakan dapat membuat perbedaan yang signifikan pada media akhir. Akuabides atau air deionisasi atau air yang dimurnikan dengan osmosis balik lebih direkomendasikan untuk membuat media. PH sebagian besar media kultur diatur menjadi $5,7 \pm 0,1$ sebelum diautoklaf. PH dapat mempengaruhi kelarutan ion dalam media nutrisi.

Menuang dan Menyimpan Media

Setelah media dibuat dan pH disesuaikan, media dapat dipanaskan untuk melarutkan zat pembentuk gel dan disalurkan ke dalam wadah kultur, seperti tabung, toples makanan bayi, atau kotak magenta, dan kemudian diautoklaf, jika tidak ada komponen yang disterilkan dengan filter perlu ditambahkan. Agar adalah agen pembentuk gel atau pendukung media padat, merupakan polisakarida yang diperoleh dari ganggang merah, gelidium amansii. Media harus disimpan di lemari es atau setidaknya di tempat gelap (terang menyebabkan beberapa reagen rusak). Dalam kondisi yang baik, sebagian besar media dapat disimpan setidaknya selama satu bulan.

Jenis Kultur tumbuhan

Kultur organ. Mengkultur organ atau jaringan yang diisolasi seperti dari akar, batang, atau daun dalam media buatan dalam kondisi terkontrol dikenal sebagai kultur organ. Bergantung pada jenis organ atau jaringan yang digunakan untuk membangun kultur, kultur organ diberi nama yang sesuai. Berikut ini adalah berbagai jenis kultur organ dan tujuan spesifiknya:

Kultur biji. Meningkatkan efisiensi perkecambahan benih yang sulit berkecambah secara *in vivo*, perkecambahan dipacu dengan aplikasi zat pengatur tumbuh, dan dapat memproduksi bibit yang bersih untuk eksplan atau kultur meristem.

Kultur embrio. Mengatasi masalah kegagalan perkembangan embrio akibat hambatan inkompatibilitas, mengatasi dormansi benih dan kemandulan benih, serta penyelamatan embrio pada hibridisasi (interspesifik atau intergenerik) dimana perkembangan endosperm tidak terjadi, serta dapat memperpendek siklus perkembangbiakan, dan lain-lain.

Kultur ovarium atau bakal biji. Merupakan eksplan umum untuk inisiasi kultur embriogenik somatik. Kultur ini dapat menginduksi tanaman haploid (n) yang steril. Apabila sel yang berkembang menjadi plantlet adalah sel sel ovul, sehingga harus dihaploidisasi menggunakan kolkisin untuk mendapatkan tanaman fertil double haploid. Namun sel somatik juga mampu beregenerasi menjadi plantlet yang diploid ($2n$). Ploidi plantlet yang berkembang dari hasil kultur ovarium dievaluasi menggunakan metode Flow Cytometry.

Kultur antera dan mikro. merupakan salah satu teknik kultur in vitro yang dapat mempercepat perolehan galur murni melalui tanaman dihaploid (DH) yang dihasilkan langsung pada generasi pertama melalui penggandaan kromosom dalam waktu kurang dari setahun. Diterapkannya teknik ini pada program pemuliaan konvensional akan meningkatkan efisiensi proses seleksi selain dapat lebih hemat dalam biaya untuk tenaga kerja, sewa lahan, dan waktu pemulia dibandingkan dengan program pemuliaan konvensional biasa.

Kultur Eksplan. Kultur eksplan sebenarnya adalah kultur jaringan. Jaringan atau bagian tanaman yang dipotong seperti jaringan daun, bagian batang, kotiledon, hipokotil, bagian akar, dan lain-lain, Disebut kultur eksplan. Tujuan utama dari pembiakan eksplan adalah untuk menginduksi kultur kalus atau untuk meregenerasi seluruh planlet secara langsung tanpa pembentukan kalus. Kultur meristem apikal adalah salah satu contohnya, dan kegunaan pentingnya adalah sebagai berikut: Produksi plasma nutfah atau planlet bebas virus, produksi massal genotipe yang diinginkan, fasilitasi pertukaran antar lokasi (produksi bahan bersih), dan kriopreservasi (penyimpanan dingin) atau Konservasi plasma nutfah secara in-vitro, dan lain-lain merupakan tujuan utama kultur meristem atau apeks pucuk.

Kultur Kalus. Kalus mewakili massa sel yang tidak terorganisir atau tidak berdiferensiasi. Mereka umumnya terdiri dari sel parenkim dan biasanya mengalami pembelahan. Ketika eksplan dibiakkan dalam media yang dilengkapi dengan auksin dalam jumlah yang cukup, ia mulai menghasilkan massa sel dari permukaan eksplan. Konsentrasi auksin yang dibutuhkan untuk setiap jenis eksplan akan berbeda dan terutama bergantung pada keadaan fisiologis jaringan eksplan. Kultur kalus dapat dipertahankan untuk waktu yang sangat lama dengan sub-kultur intermiten ke media segar. Kultur kalus dapat dimanipulasi untuk tujuan yang berbeda dengan mengubah konsentrasi hormon dalam media. Kultur kalus dapat digunakan untuk regenerasi planlet, preparasi sel tunggal atau kultur suspensi, atau untuk preparasi protoplas. Kultur kalus juga dapat digunakan untuk studi transformasi genetik. Dalam beberapa kasus, perlu melalui fase kalus sebelum regenerasi melalui embriogenesis atau organogenesis somatik. Kultur kalus cocok untuk menghasilkan

varian somaklonal yang berguna (genetik atau epigenetik) dan dapat digunakan untuk seleksi sel dan jaringan secara *in-vitro*.

Kultur Suspensi Sel. Kultur sel tunggal dan kultur suspensi dapat dibuat dari kultur kalus dengan mentransfer sepotong jaringan kalus ke dalam media cair dan membuatnya terus menerus diguncang. Laju pertumbuhan sel kultur suspensi umumnya lebih tinggi dibandingkan dengan kultur padat. Yang pertama lebih diinginkan, terutama untuk produksi metabolit yang berguna dalam skala besar. Sepotong kalus dipindahkan ke media cair di bejana seperti labu Erlenmeyer dan bejana ditempatkan pada pengocok putar atau timbal balik. Kondisi kultur bergantung pada spesies tanaman dan faktor lainnya, tetapi secara umum, sel dikultur pada 100 rpm pada shaker pada suhu 25°C. Dengan subkultur selama beberapa generasi, kultur suspensi sel halus yang mengandung agregat sel kecil dan sel tunggal terbentuk (Carstou et al., 2007; Davey & Anthony, 2010; Hu, 2017; Nair, 2007; Smith, 2009).

Waktu yang dibutuhkan untuk membangun kultur suspensi sel sangat bervariasi dan tergantung pada jaringan spesies tanaman dan komposisi medianya. Sel dalam suspensi juga digunakan untuk kultur skala besar dengan fermentasi botol dan tangki. Kultur suspensi dapat ditanam baik sebagai kultur batch atau sebagai kultur kontinyu untuk menghasilkan fitokimia.

Metode enzimatik juga dapat diadopsi untuk membangun kultur suspensi sel yang baik. Ini didasarkan pada penggunaan enzim pencernaan pektin tertentu dalam media kultur, seperti pektinase atau makerozim. Enzim ini bekerja pada pektin, yang menggabungkan dua sel yang berdekatan dalam jaringan tumbuhan, sehingga sel tersebut menjadi mandiri dan tumbuh bebas sebagai sel tunggal. Kultur suspensi sel dapat digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik dan pembuatan benih buatan, induksi mutasi somatik, dan seleksi mutan dengan menyaring sel seperti kultur mikroba. Aplikasi utama kultur suspensi sel tanaman adalah dapat digunakan untuk bioproduksi fitokimia penting tertentu atau metabolit sekunder dengan menerapkan prinsip rekayasa biokimia. Kultur suspensi dapat dikultur dalam bioreaktor yang dirancang khusus yang dikenal sebagai bioreaktor pengangkutan udara untuk kultur sel massal untuk produksi metabolit sekunder tanaman pada skala industri. Bioreaktor normal dengan pengaduk mekanis tidak dapat digunakan dalam kultur sel tumbuhan karena dapat

mengakibatkan pemecahan sel dan dengan demikian viabilitas sel dapat dikurangi secara drastis. Sedangkan bioreaktor airlift dapat memberikan pengadukan dan aliran udara untuk memenuhi kebutuhan oksigen yang tinggi. Sel juga dapat digunakan untuk eksperimen transformasi genetik untuk menghasilkan tanaman transgenik.

Kultur Protoplas. Protoplas adalah sel tumbuhan tanpa dinding sel. Dinding sel dapat dihilangkan dengan metode enzimatis. Sel mungkin berasal dari jaringan daun atau dari bagian lain tanaman atau mungkin sel dari kultur suspensi. Sel-sel ini diinkubasi dalam campuran enzim yang terdiri dari selulase, hemiselulase, dan pektinase untuk jangka waktu tertentu. Campuran enzim bekerja pada dinding sel dan dicerna sepenuhnya, sehingga membran sel di bawahnya terbuka. Protoplas ini pada kultur pada media yang tepat akan meregenerasi dinding selnya dan menjadi sel normal kemudian dapat beregenerasi menjadi tumbuhan utuh. Protoplas tumbuhan dapat digunakan untuk berbagai studi biokimia dan metabolisme dan dapat digunakan untuk fusi sel somatik untuk membuat hibrida somatik. Fusi protoplas berinti dan berinti dapat menghasilkan jenis hibrida somatik khusus yang dikenal sebagai siber, di mana tidak ada fusi inti, tetapi fusi di antara sitoplasma. Protoplas juga dapat digunakan untuk studi transformasi genetik dengan metode biolistik, teknik elektroporasi, dengan transfer DNA yang dimediasi PEG atau dengan injeksi langsung DNA ke dalam inti protoplas menggunakan jarum suntik mikro.

b) Aplikasi Kultur Sel dan Jaringan Tanaman

Mikropropagasi. Ini adalah metode kultur jaringan yang dikembangkan untuk memperbanyak massal dan memperbanyak tanaman pertanian dan hortikultura sesuai permintaan. Bagian tanaman yang biasa digunakan untuk memperbanyak jenis ini adalah meristem apikal atau tunas pembantu atau bibit yang diperoleh dari perkecambahan benih secara *in-vitro*. Karena metode mikropropagasi ini cepat dan nyaman untuk menghasilkan sejumlah besar planlet yang identik secara genetik, metode ini telah digunakan secara komersial untuk memperbanyak massal tanaman seperti kapulaga, apel, kayu putih, pisang, dan banyak tanaman hias dan hortikultura lainnya.

Tanaman Bebas Virus. Salah satu tujuan utama memperbanyak melalui kultur jaringan adalah untuk menghasilkan tanaman yang bebas virus. Ini sangat penting untuk meningkatkan hasil dan

kualitas. Karena meristem seperti meristem apikal dan meristem tambahan bebas dari infeksi virus, jaringan ini dapat digunakan sebagai eksplan untuk perbanyakan massal untuk mendapatkan sejumlah besar tumbuhan bebas virus. Tanaman pertanian yang memiliki risiko kerusakan tinggi akibat penyakit virus antara lain tanaman seperti pisang, tebu, kentang, tapioka, apel, dan lain-lain. Kultur meristem biasanya dilakukan untuk membasmi virus dan membuat tanaman bebas virus. Kultur jaringan menggunakan meristem kadang-kadang disebut sebagai 'kultur meristem' atau 'meristemming,' dan planlet yang dihasilkan dikenal sebagai 'meriklon.'

Bibit Buatan. Biji tiruan adalah embrio somatik yang dienkapsulasi oleh senyawa polimer inert tertentu seperti alginat. Mereka juga sangat berguna dalam perbanyakan massal varietas pertanian dan hibrida.

Penyelamatan Embrio. Kultur jaringan juga menyediakan sarana untuk mengatasi hambatan isolasi reproduktif antara kerabat jauh tanaman liar melalui penyelamatan embrio dan fertilisasi *in-vitro*. Sangat sulit untuk menghasilkan tanaman hibrida melalui persilangan interspesifik dan antargenerasi. Hibridisasi semacam itu dapat mengakibatkan endosperma abnormal, yang menyebabkan kematian dini embrio sehingga terbentuk benih steril. Embrio dari tanaman hibrida tersebut dapat dipotong dan dikultur dengan nutrisi yang sesuai untuk menghasilkan hibrida baru, yang mungkin tidak dapat dilakukan dengan metode lain. Metode untuk melindungi kelangsungan hidup embrio dan perkembangannya secara *in-vitro* disebut penyelamatan embrio.

Haploid dan Triploid. Kultur kepala sari yang belum matang dan serbuk sari dilakukan untuk mendorong butiran serbuk sari berkembang menjadi bentuk multiseluler, terutama menjadi embrio, dengan separuh jumlah kromosom normal untuk spesies tersebut. Ketika embrio haploid diperlakukan dengan agen pengganda kromosom (misalnya, kolkisin) nomor kromosom normalnya dipulihkan (dan dengan demikian kesuburannya). Jadi, ini adalah metode yang sangat mudah untuk pengembangan genotipe homozigot atau galur murni. Pembentukan garis murni adalah kecenderungan alami untuk spesies pemupukan sendiri. Dalam kasus pemupukan silang spesies, garis murni dapat diperoleh dengan kawin silang berulang selama 10 generasi atau lebih. Pembangkitan garis murni dan haploid sangat membantu

untuk menganalisis ekspresi karakteristik resesif, yang tidak dapat diekspresikan dalam kondisi heterozigot.

Triploid dibesarkan dengan mengkulturkan jaringan endosperm dan berguna untuk menghasilkan tanaman triploid yang steril. Oleh karena itu, sangat berguna untuk membuat tanaman tanpa biji yang diinginkan pada tanaman buah-buahan seperti anggur, jeruk, apel, pir, dan lain-lain.

Hibrida somatik. merupakan tanaman hibrida yang dikembangkan dari hasil fusi dua sel somatik, yang sangat membantu untuk menghasilkan hibrida jauh dengan karakteristik yang diinginkan. Protoplas yang diisolasi dari dua tumbuhan yang berjauhan dapat digabungkan bersama untuk menghasilkan protoplas siber atau hibrid. Protoplas hibrida dapat dipilih secara visual dan dibiakkan secara terpisah untuk berkembang menjadi kalus dan kemudian dibedakan menjadi tanaman lengkap, menghasilkan hibrida somatik. Jenis hibridisasi tanaman yang berhubungan jauh melalui pemupukan seksual tidak pernah mungkin dilakukan di alam. Pada awalnya dilakukan dua tahap pembuatan protoplas dari jaringan tumbuhan. Pertama, lamellae tengah yang menyemen dua sel yang berdekatan dalam jaringan dilarutkan oleh pektinase, dan diikuti dengan pengangkatan dinding sel oleh selulase. Saat ini, metode ini disingkat menjadi hanya satu operasi di mana campuran enzim diterapkan. Karena tekanan osmotik yang tinggi di dalam protoplas, media isotonik digunakan untuk isolasi protoplas. Campuran enzim dalam larutan isotonik terdiri dari pektinase, selulase, dan hemiselulase. Ketika protoplas dibiakkan, dinding baru disintesis, sehingga memulihkan keadaan semula sel tumbuhan. Protoplas ini dapat digunakan untuk memasukkan materi genetik asing dan juga untuk hibridisasi somatik, seperti yang dinyatakan sebelumnya. Hibridisasi somatik juga dikenal sebagai hibridisasi paraseksual. Fusi protoplas terisolasi dapat dilakukan dengan agen kimia seperti PEG (polietilen glikol) atau dengan gaya listrik, metode yang disebut elektrofusi. Hibridisasi somatik juga dapat dilakukan antar tanaman yang tidak dapat dihibridisasi karena beberapa masalah ketidakcocokan seksual, walaupun saling berkaitan erat.

Metabolit Sekunder Tanaman. Tumbuhan adalah sumber sejumlah besar bahan kimia yang termasuk dalam kelas dan kegunaan yang berbeda. Bahan kimia yang diturunkan dari tumbuhan dapat dibagi menjadi dua kelas – metabolit primer dan metabolit sekunder. Bahan kimia seperti protein, asam amino, gula, lipid,

asam nukleat, dan turunannya yang penting untuk aktivitas metabolisme dasar disebut metabolit primer. Metabolit sekunder adalah bahan kimia tertentu yang dibentuk sebagai produk sampingan dari metabolit primer, tetapi tidak penting untuk menjaga fungsi normal sel. Bahan kimia seperti alkaloid, flavanoid, tanin, terpin, minyak atsiri, lateks, dan lain-lain adalah contoh metabolit sekunder yang ada di berbagai jaringan tanaman. Fungsi pasti dari beragam metabolit sekunder ini tidak dipahami dengan jelas. Menurut beberapa orang, itu adalah produk limbah sederhana, dibuang ke sel khusus tertentu. Tetapi mereka tidak dapat dianggap sebagai produk limbah semata, melainkan senyawa yang memiliki fungsi spesifik, yang membantu tanaman untuk bertahan hidup. Beberapa senyawa memiliki fungsi pertahanan karena melawan serangan hama, fungi, bakteri, dan patogen lainnya. Beberapa bahkan bertindak sebagai penolak untuk menjauhkan hewan yang merumput. Metabolit sekunder tumbuhan memiliki banyak kegunaan sebagai obat, senyawa penyedap rasa, wewangian, karet alam, sumber hidrokarbon, bahan bakar nabati, dan lain-lain. Penggunaan tumbuhan secara ekstensif sebagai sumber senyawa ini telah membawanya ke ambang kepunahan. Dengan cara ini jaringan tanaman dan kultur sel menyediakan sumber alternatif untuk metabolit sekunder tanaman.

Kultur sel tumbuhan ini dipandang sebagai cara potensial untuk menghasilkan produk sekunder tumbuhan yang bermanfaat tanpa bergantung pada budidaya tumbuhan sumber ini dalam skala besar. Sejumlah besar masalah yang terkait dengan budidaya tanaman ini juga dapat diatasi dengan mengadopsi teknik kultur sel untuk produksi metabolit sekunder. Masalah-masalah ini meliputi: faktor lingkungan (kekeringan, banjir, dan lain-lain), Penyakit, ketidakstabilan politik dan tenaga kerja di negara-negara penghasil, variasi kualitas tanaman yang tidak terkendali, ketidakmampuan pihak berwenang untuk mencegah pemalsuan tanaman, kerugian dalam penyimpanan dan penanganan, dan produksi metabolit sekunder yang berguna dan berharga dalam bioreaktor besar melalui kultur sel spesies tanaman tertentu merupakan alternatif yang menarik.

Tabel 6. Metabolit sekunder diproduksi dalam jumlah tinggi oleh kultur sel tumbuhan

| Senyawa | Spesies Tanaman | Kegunaan |
|--------------|-----------------------------------|---|
| Shikonin | <i>Lithospermum erythrorhizon</i> | Pigmen merah, digunakan sebagai lipstik, anti mikroba |
| Ginsenosida | <i>Panax ginseng</i> | Tonik stres |
| Antrakuinon | <i>Morinda citrifolia</i> | Anti-bakteri dan anti-inflamasi |
| Ajmalisin | <i>Catharanthus roseus</i> | Anti-karsinogenik |
| Skopolamin | <i>Datura stramonium</i> | Anti-hipertensi |
| Taxol | <i>Taxus buccata</i> | Anti-karsinogenik |
| Diosgenin | <i>Dioscorea deltoides</i> | Anti fertilitas |
| Berberine | <i>Coptis japonica</i> | Anti-bakteri dan anti-inflamasi |
| Berberine | <i>Thalictrum minor</i> | Anti-bakteri dan anti-inflamasi |
| Berberine | <i>Coptis japonica</i> | Anti-bakteri dan anti-inflamasi |
| Vincristine | <i>Catharanthus roseus</i> | Anti-karsinogenik |
| Digoxin | <i>Digitalis lanata</i> | Tonik jantung |
| Azadirachtin | <i>Azadirachta indica</i> | Insektisida, anti-bakteri |
| Kina | <i>Cinchona officinalis</i> | Anti-malaria |
| Artemisinin | <i>Artemisia spp.</i> | Anti-malaria |
| Kodein | <i>Papaver somniferum</i> | Analgesik |

Variasi Somaclonal. Keuntungan dari mikropropagasi untuk memperbanyak massal suatu spesies tanaman adalah dapat menyediakan sejumlah besar tanaman yang identik secara genetik dalam jumlah besar. Tetapi telah diamati bahwa tidak benar dalam kasus tanaman yang beregenerasi dari kultur kalus yang dipelihara untuk waktu yang sangat lama dan juga dari kultur suspensi sel. Tanaman tersebut menunjukkan variasi dan variasi yang diamati selama cara perbanyakan asexual ini disebut variasi somaklonal. Variasi ini sering dikaitkan dengan perubahan kromosom, dan oleh karena itu disebabkan oleh perubahan genetik yang terjadi selama kultur kalus. Variasi somaklonal memiliki aplikasi potensial dalam pertanian dan perbaikan tanaman dengan menghasilkan mutan somaklonal dengan karakter yang diinginkan. Istilah somaklon diajukan oleh Larkin dan Scowcroft [6] pada tahun 1981, untuk tanaman yang dihasilkan dari jaringan (sel somatik) yang diisolasi dari varietas tanaman dan variasi yang diamati di antara somaklon disebut variasi somaklonal. Jika sel atau jaringan yang digunakan untuk menghasilkan klon memiliki asal gamet seperti serbuk sari atau bakal biji, klon tersebut disebut gametoklon dan variasi yang terlihat di antara mereka disebut variasi gametoklonal. Karena kultur suspensi sel jangka panjang rentan terhadap variasi

somaklonal, biakan tersebut digunakan untuk mengisolasi varian sel seperti kultur mikroba.

c) Diagnostik dalam Pertanian dan Pemuliaan Molekuler

Ada sejumlah metode bioteknologi yang tersedia untuk menghasilkan tanaman yang bebas dari patogen atau tahan terhadap infeksi mikroba. Tapi tanaman ini harus diuji. Saat ini, sejumlah tes biokimia dan molekuler tersedia sebagai metode diagnostik untuk menguji atau mendeteksi keberadaan patogen dalam tanaman atau jaringan tanaman. Ada dua jenis metode diagnostik. Yang pertama didasarkan pada protein atau teknik imunologi dan yang kedua didasarkan pada probe DNA. Antibodi spesifik patogen atau fragmen DNA sebagai probe dapat digunakan untuk mendeteksi patogen spesifik di planlet atau jaringan tanaman yang digunakan untuk perkecambahan atau sebagai eksplan untuk mikropropagasi. Demikian pula, menggunakan penanda molekuler — berbasis protein atau berbasis DNA — adalah mungkin untuk memastikan apakah tanaman tahan penyakit atau tidak. Hal ini memberikan kebebasan kepada petani untuk mengadopsi jenis tindakan pengendalian yang tepat jika diperlukan.

Pemuliaan tanaman yang dibantu oleh penanda genetik atau penanda molekuler disebut dengan pemuliaan molekuler. Penanda molekuler atau penanda genetik (keterkaitan) digunakan untuk mengidentifikasi atau menandai ciri-ciri tertentu yang penting untuk berkembang biak. Jika gen yang terletak dalam kromosom sangat berdekatan, mereka tidak dapat dipisahkan dengan menyeberang. Penanda yang berdekatan selalu mewarisi bersama dan peluang untuk menyeberang sangat rendah. Penanda molekuler atau penanda genetik dapat diidentifikasi dengan analisis restriksi seperti analisis RFLP atau dengan eksperimen hibridisasi genetik. Ciri-ciri terkait seperti itu dapat diambil sebagai penanda yang dapat diamati untuk gen yang kita coba temukan atau isolasi. Dengan analisis restriksi genom, penanda DNA dapat ditetapkan ke lokasi gen ini di dalam kromosom. Berdasarkan penanda ini, gen dapat dikloning dan diurutkan. Dengan cara yang sama suatu varietas tanaman dapat dipilih untuk sifat tertentu, misalnya tahan terhadap kekeringan, hanya dengan mencari penanda, yang bisa berupa penanda molekuler atau sifat lain yang dapat diamati yang terkait dengan sifat tahan kekeringan. Jenis kloning gen ini disebut kloning berbasis peta atau kloning berbasis penanda.

Ada tiga jenis penanda yang tersedia untuk berbagai jenis penyaringan dan pembiakan:

Penanda Morfologis. Ini adalah ekspresi fenotipik gen yang dapat diamati. Ciri-ciri morfologi ini dapat dikaitkan dengan beberapa ciri lain, yang tidak dapat dideteksi secara fenotip atau morfologis.

Penanda Biokimia. Penanda ini didasarkan pada pola isoenzim (isozim) yang ditunjukkan oleh varietas atau genotipe tanaman pada elektroforesis gel asli. Genotipe tanaman diidentifikasi oleh profil isozim spesifik dari satu atau lebih enzim yang ada.

Penanda Molekuler. Ini didasarkan pada fragmen DNA. Polimorfisme panjang fragmen restriksi dapat dideteksi dengan urutan DNA yang diketahui dan bahwa polimorfisme membentuk penanda molekuler. Probe DNA adalah urutan yang diketahui, yang dapat dihasilkan oleh PCR atau mungkin VNTR (pengulangan tandem nomor variabel), atau urutan mikrosatelit atau mungkin merupakan fragmen acak yang diisolasi dari genom-library atau mungkin EST (tag urutan yang diekspresikan). Semua probe DNA ini dapat digunakan untuk analisis RFLP untuk mendapatkan penanda yang bermakna. Fragmen DNA yang disebutkan di atas juga dapat digunakan sebagai primer untuk menghasilkan penanda berbasis PCR seperti AFLP (sidik jari amplifikasi) atau RAPD (DNA polimorfik yang diperkuat secara acak).

d) Bioetika dalam Rekayasa Genetika Tanaman

Hampir semua tanaman yang kita tanam saat ini jauh berbeda dengan nenek moyang mereka yang liar. Pemuliaan melalui seleksi dan penyimpanan benih terbaik untuk generasi berikutnya telah berlangsung selama ribuan tahun. Pada kebanyakan tanaman, penggabungan ciri-ciri yang sesuai dengan pertanian, seperti perontokan bebas pada sereal, telah dicapai berabad-abad yang lalu. Pemuliaan ilmiah, bagaimanapun, setelah ditemukannya kembali Hukum Mendel, baru berlangsung selama lebih dari 90 tahun. Misalnya, pada tahun 1950-an, sejenis jagung digunakan untuk produksi hibrida F1 di Amerika Serikat, yang kemudian ditemukan terkait dengan kerentanan terhadap penyakit hawar daun jagung selatan. Selama tahun 1970-an, varietas gandum dengan ketahanan gen utama tunggal terhadap penyakit fungi dilepaskan di Inggris, satu demi satu. Varietas terbaik rata-rata dapat digunakan hanya selama 14 bulan karena populasi fungi berulang kali mengatasi gen yang tahan penyakit. Pasokan gen ketahanan menjadi terbatas dan petani semakin harus bergantung

pada fungisida kimia untuk menjaga tanaman mereka bebas dari penyakit. Kejadian ini, meskipun mahal dan tampaknya sangat serius pada saat itu, tidak menghasilkan efek jangka panjang yang signifikan.

'Transformasi', 'modifikasi genetik', 'rekayasa genetika', dan 'transgenesis' adalah sinonim untuk transfer gen yang diisolasi dan dikloning ke dalam DNA, biasanya DNA kromosom, dari organisme lain. Tanaman yang dimodifikasi secara genetik (tanaman GM) dan makanan GM sekarang menjadi bagian dari pertanian dan industri makanan. Kemajuan yang telah dicapai di bidang bioteknologi tanaman tidak berkontribusi pada promosi industri berbasis pertanian, dan industri makanan, tidak seperti kontribusi yang dibuat di industri farmasi. Masalah utama dalam tanaman RG dan pangan RG adalah tidak diterima oleh publik karena informasi yang salah dan menyesatkan yang diberikan oleh media, pemerhati lingkungan, dan orang-orang anti-ilmiah di masyarakat. Namun, seperti teknik rekayasa genetika dan organisme transgenik, penanganan tanaman transgenik harus dilakukan dengan hati-hati. Perhatian utama publik tentang tanaman GM dan makanan GM adalah sebagai berikut:

- Keamanan makanan GM untuk konsumsi manusia dan hewan.
- Dampak tanaman GM terhadap lingkungan, yaitu pada organisme lain, dan bagaimana tanaman GM akan mempengaruhi keanekaragaman hayati.
- Apa mungkin pengaruh tanaman tahan serangga pada serangga dan mikroba non-target, yang bermanfaat bagi lingkungan. Misalnya bakteri pengikat nitrogen dan serangga yang membantu penyerbukan.
- Tanaman transgenik dapat mengalami penyerbukan alami dengan kerabat liar dari tanaman tersebut, yang dapat mengakibatkan lepasnya gen yang telah dipindahkan ke tanaman tersebut. Hal ini dapat mengakibatkan polusi gen dan pembentukan gulma super.
- Para vegetarian takut jika tanaman diubah dengan beberapa gen hewan, sifat vegetarian tanaman akan berubah.
- Penanda tahan antibiotik yang ditransfer ke tanaman dapat melarikan diri ke mikroba di dalam tanah dan dapat menciptakan masalah patogen resisten antibiotik pada manusia dan hewan.

Semua ketakutan dan keberatan ini dapat dijelaskan atau diselesaikan dengan memuaskan. Namun sayangnya, debat publik

tentang manfaat dan risiko bioteknologi tanaman mengalami banyak keberatan yang tidak terduga, terutama karena informasi yang salah, kesalahpahaman, dan analisis manipulatif dari data survei. Tetapi tampaknya itu adalah fenomena singkat dan seiring berjalannya waktu, dengan dukungan bukti meyakinkan baru tentang keamanan dan efisiensi dan pada saat yang sama tidak adanya bukti yang menunjukkan sebaliknya, semakin banyak konsumen akan menerima makanan dan tanaman GM.

3. Kultur Sel Hewan dan Aplikasinya

Kultur sel didefinisikan sebagai pertumbuhan sel yang dipisahkan dari jaringan induk melalui migrasi spontan atau penyebaran mekanis atau enzimatis. Kultur sel primer mengacu pada kultur sel yang awalnya berasal dari jaringan induk sebelum kultur berikutnya secara *in-vitro*. Kultur jaringan telah dikenal sejak awal abad ini sebagai metode mempelajari perilaku sel hewan. Sejarah kultur sel hewan dimulai pada tahun 1856 ketika Ludwig mempertahankan organ hewan yang hidup di luar tubuh dengan memompa darah melalui organ tersebut. Sebenarnya ini bisa dianggap sebagai awal dari kultur jaringan hewan atau kultur organ. Setelah beberapa tahun, pada tahun 1885, Roux membuang sebagian lempeng meduler dari embrio ayam dan menyimpannya dalam larutan garam hangat selama beberapa hari. Ross Harrison-lah yang mendemonstrasikan pertumbuhan *in-vitro* jaringan hewan hidup dengan mengeksplotasi fragmen tali saraf dari kecebong katak dan meletakkannya di setetes getah bening katak, pada tahun 1907. Ia mengamati bahwa dalam beberapa jam serabut saraf mulai tumbuh dari sel-sel di fragmen jaringan.

Selama tahun 1911 hingga 1912 Burrows dan Alexis Carrell berhasil menumbuhkan fragmen jaringan dari anjing dewasa, kucing, tikus, dan marmot serta menumbuhkan jaringan ganas (kanker). Carrell memulai garis sel dari jaringan yang diambil dari jantung embrio ayam, yang diperbanyak oleh Albert H. Ebeling selama 34 tahun. Ebeling menggunakan kultur untuk menguji toksisitas germisida.

Teknik ini, yang menggunakan fragmen agregat jaringan dari mana sel-sel dibatasi untuk bermigrasi ke luar, mendominasi lapangan selama lebih dari 50 tahun. Namun, itu adalah pekerjaan Enders dan rekan pada tahun 1948 yang memberikan dorongan besar pada kultur jaringan. Para peneliti ini

menunjukkan, dengan menggunakan sel-sel yang tersebar, bahwa virus polio dapat tumbuh secara *in-vitro* tanpa adanya jaringan saraf. Oleh karena itu, asal mula istilah "kultur sel". Pekerjaan ini mendorong perkembangan teknologi kultur sel, yang telah berhasil diadaptasi ke dalam banyak aplikasi rutin baik dalam kedokteran dan industri (misalnya, produksi vaksin antivirus, produksi antigen dan antibodi monoklonal, analisis kromosom sel embrionik (dari amniosentesis) pencangkokan kulit, dan lain-lain). Kultur virus dengan menggunakan kultur sel hewan sebenarnya telah menunjukkan jalan menuju penemuan interferon pada tahun 1966 oleh Alec Isaacs. Dia mengambil filtrat dari kultur sel yang terinfeksi virus dan membuatnya bebas virus. Filtrat ini ditambahkan ke media kultur sel dan sel segar yang dikultur. Dia mengamati bahwa sel-sel ini tidak dapat terinfeksi virus yang sama. Dari pengamatan tersebut ia menyimpulkan bahwa beberapa senyawa disekresikan ke dalam media oleh sel sebagai respons terhadap infeksi virus. Senyawa ini, ketika ditambahkan ke dalam kultur sel segar, mencegah infeksi virus. Senyawa yang mengganggu infeksi virus dinamai interferon. Interferon dimurnikan dari kultur sel yang terinfeksi virus, dan saat ini berbagai jenis interferon seperti bentuk alfa, beta, dan gamma adalah beberapa produk berharga dari bioteknologi yang tersedia di pasar.

a) Teknik Kultur Sel Hewan

Sel eukariotik jauh lebih sulit untuk dibiakkan daripada kebanyakan prokariota. Mereka membutuhkan media yang kompleks dan sangat rentan terhadap kontaminasi dan pertumbuhan berlebih oleh mikroba seperti bakteri, ragi, dan fungi. Sebelum membahas detailnya, mari kita bahas beberapa karakteristik penting dari sel hewan dan pertumbuhannya dalam kultur.

1) Ciri-ciri Pertumbuhan Sel Hewan dalam Kultur

Kultur jaringan hewan dapat dibedakan menjadi kultur organ, kultur jaringan, dan kultur sel. Dalam kultur organ, seluruh embrio, organ, atau jaringan dikeluarkan dari tubuh melalui pembedahan atau segera setelah kematian otak. Dalam kasus seperti itu, fungsi fisiologis normal organ atau jaringan dipertahankan. Sel-sel tetap berdiferensiasi penuh dan peningkatan skala tidak direkomendasikan dalam kultur organ. Ini ditandai dengan pertumbuhan yang lambat dan eksplantasi baru diperlukan untuk

setiap percobaan. Ketika fragmen jaringan yang dipotong tumbuh dalam media yang ditentukan itu disebut kultur jaringan dalam arti sebenarnya. Dalam kasus ini, sebagian besar fungsi normal dari jaringan yang dikultur dapat dipertahankan meskipun organisasi asli jaringan telah hilang. Dibandingkan dengan kultur organ, kultur jaringan lebih baik untuk peningkatan skala tetapi tidak ideal. Ketika jaringan yang dipotong atau pertumbuhan jaringan tersebar, sebagian besar secara enzimatik, ke dalam suspensi sel, yang kemudian dapat dikultur sebagai kultur lapisan tunggal atau suspensi, itu disebut kultur sel hewan. Kultur sel dapat dipertahankan untuk waktu yang sangat lama sebagai jenis garis sel tertentu dan sangat cocok untuk studi peningkatan skala. Tetapi sel-sel ini mungkin kehilangan beberapa karakteristiknya yang berbeda dari waktu ke waktu.

Sel hewan, tidak seperti kultur sel tumbuhan dan mikroba, menunjukkan pertumbuhan yang terbatas bahkan jika kondisi nutrisi dan fisik terbaik dipertahankan. Dalam kultur sel tumbuhan dan mikroba, sel terus tumbuh jika lingkungan fisik dan kimia yang memadai dipertahankan dalam medium. Perilaku sel hewan dalam kultur bergantung pada organ sumber atau jaringan dari mana sel-sel tersebut dikeluarkan. Dalam kebanyakan kasus, ia tumbuh dan membelah hanya ke sejumlah generasi terbatas dan kemudian mati atau menghentikan pertumbuhannya, bahkan jika semua faktor fisik dan nutrisi yang sesuai disediakan. Dalam beberapa kasus, sel tidak akan membelah dalam kultur seperti pada kasus neuron. Tetapi sel-sel seperti fibroblas atau sel kulit dapat mengalami pembelahan sel selama beberapa generasi dan kemudian mereka mencapai fase statis dan akhirnya mati. Dengan demikian, kematian dikaitkan dengan semua kultur sel hewan kecuali itu adalah garis sel abadi atau garis sel kanker. Sel yang berasal dari jaringan seperti ginjal, hati, otot, dan embrio tumbuh dan menyebar sebagai lapisan tunggal dan mengisi permukaan wadah tempat mereka tumbuh. Setelah sel menyebar ke seluruh permukaan dan bersentuhan dengan dinding piring atau wadah, sel menghentikan pertumbuhan lebih lanjut. Fenomena ini disebut penghambatan kontak.

Ciri penting lain dari kultur sel adalah lingkungan buatan, yang dapat diubah dan dikendalikan. Sejumlah fitur yang dapat diterapkan untuk sel *in vivo* kurang dalam kultur *in-vitro*. Interaksi sel-sel dan interaksi matriks-sel berkurang atau hampir tidak ada dalam kultur *in-vitro*. Lingkungan nutrisi dan proliferasi sel juga diubah secara *in-vitro*. Sel-sel dalam kultur mungkin memiliki

kondisi hormonal yang sepenuhnya berubah, yang dapat mengubah keadaan fisiologis sel. Arsitektur tiga dimensi yang ada di jaringan sama sekali tidak ada dalam kultur sel. Kondisi fisiologis yang berubah dari sel yang dikulturkan menghasilkan cara sel melekat pada dukungan dan peningkatan penyebaran dan migrasi sel serta bentuknya. Ciri-ciri ini terutama berlaku untuk sel normal, yang memiliki masa hidup terbatas. Tetapi sel kanker berperilaku berbeda dari sel normal. Mereka kehilangan fenomena penghambatan kontak dan bukannya menyebar sebagai lapisan tunggal, mereka menumpuk satu di atas yang lain untuk membentuk kultur sel berlapis-lapis ke pembelahan sel yang tidak terkendali. Sel-sel tersebut berbentuk bulat dan menunjukkan penggandaan sel yang berkelanjutan jika kondisi nutrisi yang tepat tersedia. Ahli onkologi memanfaatkan sifat-sifat sel kanker ini, terutama pola pertumbuhannya, untuk memastikan diagnosis sifat kanker dari tumor. Kultur sel hewan secara sederhana dapat diklasifikasikan menjadi tiga jenis, yaitu kultur sel primer, kultur sel sekunder, dan kultur sel immortal.

Kultur sel primer adalah sel yang dieksplorasi langsung dari jaringan atau organ organisme donor. Kultur sel dari sel darah putih, fibroblas yang berasal dari kulit, sel otot polos jantung, neuron, dan lain-lain adalah beberapa contoh kultur sel primer. Mereka mungkin mampu satu atau dua divisi dalam budaya, dan jika diberi kondisi yang tepat, dapat bertahan untuk beberapa waktu, tetapi mereka tidak terus tumbuh dan akhirnya menjadi tua dan mati. Jadi, tujuan utama menumbuhkan sel yang menuntut ini adalah bahwa mereka mewakili model eksperimental terbaik untuk situasi *in vivo*, dan mereka dapat mengekspresikan karakteristik yang tidak terlihat dalam sel yang dikultur. Kultur sel epitel dengan silia pemukul adalah contoh yang baik untuk ini.

Jenis kultur primer terutama bergantung pada jaringan sumber organisme yang digunakan untuk menghasilkan sel. Sel dapat tumbuh sebagai kultur suspensi atau sebagai sel berlabuh yang melekat pada penyangga. Kultur sel limfoid (sel darah putih) dapat dikultur sebagai kultur suspensi dan dibuat untuk menjalani sejumlah pembelahan sebelum penuaan dengan menambahkan sitokin dan lektin ke media pertumbuhan. Tidak diperlukan proteinase atau kolagenase untuk membentuk kultur sel limfosit dari getah bening atau darah. Lektin adalah protein, yang bereaksi dengan residu gula spesifik pada permukaan sel, menghubungkannya secara silang dan seringkali menyebabkan pensinyalan intraseluler. Lektin yang berbeda merangsang

pertumbuhan berbagai jenis sel limfoid. Misalnya, phytohaemagglutinin (PHA) hanya menstimulasi sel-T, sedangkan conconavalin-A memiliki aktivitas mitogenik (menginduksi pembelahan sel) untuk sel-T dan sel-B.

Kultur primer yang berasal dari jaringan selain darah atau getah bening harus disebar secara mekanis atau enzimatis dan harus dipelihara dalam media nutrisi yang sesuai dalam wadah kultur yang sesuai. Karena sel-sel ini bergantung pada penjangkaran, permukaan wadah ini berfungsi sebagai penyangga di mana sel dapat tumbuh dan menyebar sebagai lapisan tunggal. Jaringan yang digunakan untuk membangun kultur sel primer berasal dari organ tertentu seperti ginjal atau hati. Sel-selnya tidak bergerak dan tertanam di jaringan ikat. Perlakuan enzim dapat memisahkan sel satu sama lain dengan mencerna bahan penyemen protenaceous yang bergabung dengan sel. Enzim yang digunakan untuk tujuan ini adalah campuran protease seperti tripsin dan kolagenase.

Kultur sel primer menyediakan sistem yang tidak jauh berbeda dengan sistem *in vivo*. Ini mempertahankan sebagian besar fitur karakteristik khusus dari sel-sel di masing-masing organ. Pada saat yang sama, sejumlah faktor fisik dan fisiologis dapat diatur dengan mengubah kondisi budaya. Kelemahan utama kultur primer adalah dibutuhkan banyak waktu untuk menetapkan jenis kultur sel primer tertentu. Setiap kali diperlukan organisme hidup atau organ atau jaringan segar untuk membangun kultur. Kualitas kultur sel dapat bervariasi jika dua orang yang berbeda mempersiapkannya pada waktu yang berbeda. Kultur sel primer dapat dibuat layak dengan subkultur untuk waktu yang sangat lama dengan atau tanpa pembelahan sel. Setelah kultur sel primer dibelah atau disubkultur, itu menjadi kultur sel sekunder, dan dapat mengarah pada pembentukan garis sel dengan karakteristik fisiologis atau genetis khusus.

Sel sekunder awalnya dieksplorasi dari organisme donor dan dipertahankan dengan subkultur untuk waktu yang lama. Jika kultur sel ini diberikan kondisi fisik dan kultur nutrisi yang benar termasuk hormon yang benar secara terus menerus dengan subkultur, mereka dapat membelah dan tumbuh untuk beberapa waktu secara *in-vitro*, setidaknya 50 hingga 100 generasi. Namun, mereka tidak terus membelah tanpa batas dan akhirnya, dan karakteristik fisik mereka dapat berubah, setelah itu sel-sel pada akhirnya akan menjadi tua dan mati. Faktor-faktor yang

mengontrol replikasi sel-sel semacam itu secara *in-vitro* berkaitan dengan tingkat diferensiasi sel — secara umum, sel-sel yang berdiferensiasi akhir lebih sulit dipertahankan daripada sel-sel yang kurang terspesialisasi seperti pada kasus sel-sel embrionik. Misalnya, sel MRC5 adalah fibroblas paru-paru manusia sekunder, yang mengalami penggandaan 60 hingga 70 kali lipat sebelum penuaan. Sel-sel ini banyak digunakan untuk mempelajari virus secara *in-vitro* dan untuk produksi vaksin.

Frekuensi subkultur bergantung pada jenis sel dan sumbernya. Jika sumbernya adalah sel yang berdiferensiasi atau sel yang terdiferensiasi secara terminal, laju perkaliannya mungkin sangat lambat dan oleh karena itu membutuhkan frekuensi subkultur yang lebih sedikit. Sedangkan jika sumber sel adalah sel embrio, ia akan berkembang biak dan menyebar dengan sangat cepat, oleh karena itu perlu sering dilakukan subkultur untuk menghindari pertemuan, untuk menghilangkan produk dan bahan ekskresi, yang dapat mempengaruhi stabilitas sel, dan untuk mengisi nutrisi. Jika tidak, sel dapat menghentikan pertumbuhannya dan mungkin mati seiring waktu karena nutrisi dan ruang yang tidak mencukupi. Tetapi seringkali subkultur atau pemisahan dari kultur yang tumbuh lambat dapat menyebabkan kepadatan sel yang rendah dan akhirnya hilangnya garis sel.

Subkultur budaya suspensi sangat mudah. Ini melibatkan pengenceran kultur yang memiliki kepadatan sel tinggi dengan media nutrisi segar atau dengan memisahkan sel dari kultur lama ke media segar dengan jumlah sel yang cukup untuk mempertahankan kepadatan sel awal. Subkultur budaya yang bergantung pada jangkar melibatkan prosedur khusus. Media pertumbuhan dikeluarkan dari kultur. Piring kultur dicuci berulang kali dengan media segar. Sel-sel yang berlabuh dikeluarkan atau dipisahkan dari piring dengan pengobatan enzimatis dengan protease dan kolagenase. Sel-sel ini dipindahkan ke cawan kultur segar yang dilengkapi dengan media segar. Dalam beberapa kasus, sel dapat dikeluarkan dari pelat secara mekanis dengan bantuan spatula plastik atau dengan memipet secara perlahan.

Kadang kultur sel sekunder ini bisa menjadi secara spontan berubah menghasilkan pembentukan garis sel yang memiliki pertumbuhan tidak terbatas atau keabadian seperti garis sel kanker. Garis sel seperti itu disebut garis sel abadi (*immortal cell lines*).

Immortal cell berbeda dengan sel primer dan sekunder, sel immortal cell terus tumbuh dan membelah tanpa batas secara *in-vitro* selama kondisi kultur dan nutrisi yang benar dipertahankan. Garis sel yang diabadikan juga dikenal sebagai sel yang ditransformasikan — yaitu, sel yang sifat pertumbuhannya telah diubah. Ini tidak berarti bahwa ini adalah sel "kanker" atau "tumor". Sel tumor atau sel kanker dapat membentuk tumor jika dimasukkan ke dalam hewan percobaan. Tetapi sel yang benar-benar berubah atau sel yang diabadikan yang dihasilkan dari kultur sel sekunder normal tidak dapat menghasilkan tumor pada hewan percobaan. Transformasi adalah proses yang kompleks dan dapat terjadi melalui berbagai jalur (misalnya, infeksi dengan mengubah virus tumor atau perubahan kromosom).

Sel HeLa adalah contoh klasik dari garis sel yang diabadikan. Ini adalah sel epitel manusia dari karsinoma serviks fatal yang ditransformasikan oleh human papillomavirus 18 (HPV18) yang secara tidak sengaja disumbangkan oleh Henrietta Lacks pada tahun 1951. Sel HeLa adalah sel yang melekat pada permukaan yang mempertahankan penghambatan kontak secara *in-vitro* (yaitu, saat sel-sel tersebut menyebar melintasi labu kultur, ketika dua sel yang berdekatan bersentuhan, ini menandakan kemudian berhenti tumbuh). Kehilangan penghambatan kontak adalah tanda klasik dari sel onkogenik (yaitu, sel yang membentuk tumor pada hewan percobaan). Sel HeLa tidak bersifat onkogenik pada hewan, tetapi dapat menjadi begitu jika ditransformasikan lebih lanjut oleh onkogen virus.

b) Penerapan Kultur Sel Hewan

Kultur sel hewan digunakan untuk berbagai penelitian dasar serta untuk tujuan komersial sebagai sumber bahan kimia dan agen terapeutik yang berharga. Ada daftar protein dan biologis lain yang terus meningkat yang dapat diproduksi dengan membiakkan mamalia dan jenis sel lainnya. Beberapa layanan utama dan produk berbeda yang diperoleh dari sel mamalia telah diringkas di bawah ini. Selain senyawa alami yang dihasilkan oleh sel yang dibiakkan, sel yang diubah secara genetik dapat digunakan untuk produksi protein rekombinan.

- Produksi vaksin
- Produksi antibodi monoklonal
- Produksi enzim dan hormon

- Kulit *in-vitro* dan jaringan serta organ lain dengan kultur batang
- Kultivasi virus

Beberapa produk, baik rekombinan dan protein alami, yang dihasilkan oleh kultur sel hewan ditabulasikan sebagaimana berikut:

Tabel 7. Produk kultur sel hewan yang telah tersedia di pasaran

| Produk | Aplikasi |
|---|-------------------------------------|
| Urokinase | Serangan jantung |
| Aktivator jaringan plasminogen | Serangan jantung |
| FSH, Factor VIII | Hemofilia A |
| Faktor IX | Hemofilia B |
| Vaksin New Castle Disease, Rabies, Rubella, campak dan lain-lain. | Vaksin |
| Antibodi monoklonal hibridoma | Berbagai alat diagnostik |
| Bioinsektisida Baculovirus | Kultivasi virus |
| Interferon dan Interleukin | Imunoregulator |
| Pengujian toksikologi | Model eksperimen kultur sel |
| Stem-cell | Berbagai aplikasi klinik/pengobatan |

c) Bioetika dalam Rekayasa Genetika Hewan

Penggunaan bioteknologi hewan, terutama teknik transformasi genetik, kultur sel manusia, teknologi hibridoma, dan kemajuan dalam teknik kultur sel telah mengembangkan peluang baru dalam pengobatan untuk mengembangkan obat baru yang lebih efektif serta terapi dan pendekatan lain dalam pengobatan kelainan genetik yang mematikan. Mempelajari genetika manusia memungkinkan kita untuk memahami apa yang terjadi ketika gen salah pada penyakit bawaan, atau kanker, dan mulai mengembangkan terapi baru yang menangani penyebab genetik, bukan gejalanya. Perkembangan hewan ternak transgenik yang tahan terhadap penyakit telah mengubah arah peternakan. Tetapi ada berbagai masalah etika dan perhatian dalam penciptaan hewan ternak transgenik, penelitian Stem-cell, dan kloning dan terapi gen.

Beberapa masalah etika utama yang terkait dengan hewan transgenik adalah sebagai berikut:

- a) Penciptaan hewan transgenik dengan gen manusia. Hewan tertentu yang digunakan untuk makanan seperti domba

direkayasa dengan gen manusia untuk menghasilkan terapi tertentu seperti faktor VIII, faktor IX, t-PA, dan lain-lain.

- b) Transfer gen protein hewani ke tumbuhan pangan; Beberapa vegetarian berpendapat bahwa memakan bagian tumbuhan ini setara dengan makan makanan non vegetarian.
- c) Transfer gen dari sumber tertentu yang dianggap dilarang oleh kelompok agama tertentu, ke hewan makanan yang biasa mereka gunakan.
- d) Penggunaan pakan ternak yang mengandung gen manusia. Protein sel tunggal ragi merupakan pakan ternak yang sangat baik. Ragi juga digunakan sebagai organisme inang untuk menghasilkan protein rekombinan manusia dengan nilai terapeutik. Sel ragi rekombinan bekas dapat digunakan sebagai komponen pakan ternak.

Berdasarkan keprihatinan dan keberatan di atas, direkomendasikan oleh otoritas terkait untuk mengadopsi beberapa tindakan pencegahan atau untuk mencegah penggunaan organisme transgenik sebagai makanan, ketika makanan normal dengan nilai gizi yang sama tersedia. Bahan makanan yang mengandung gen asing harus diberi label yang benar dengan semua detail seperti jenis gen, proteinnya, dan organisme sumbernya, sehingga orang memiliki pilihan untuk menghindari makanan yang mengandung gen dari sumber yang tidak etis sesuai dengan praktik keagamaan mereka. dan keyakinan.

Kemajuan yang dibuat dalam teknologi kultur sel dan kultur jaringan dapat menggantikan model hewan untuk eksperimen spesifik yang terkait dengan pengembangan obat dan metabolisme obat. Hal ini mengakibatkan pengurangan substansial dalam penggunaan berbagai jenis hewan untuk mempelajari biologi kanker dan aspek lain dari genetika dan metabolisme. Tetapi hewan transgenik yang dibuat untuk tujuan khusus seperti produksi vaksin atau beberapa protein atau enzim lain, yang biasanya tidak ada dalam sistem mereka, dapat mempengaruhi perilaku normal dan kesehatan organisme secara negatif. Mempertimbangkan fakta-fakta ini, terdapat tentangan moral yang keras terhadap penciptaan hewan transgenik karena dapat mengakibatkan penderitaan hewan. Misalnya, ada laporan bahwa saat hewan diobati dengan hormon pertumbuhan transgenik yang meningkatkan kualitas daging, mereka mengembangkan arthritis akut. Semua studi rekayasa genetika apakah itu melibatkan hewan, tumbuhan, atau mikroba harus

mempertimbangkan dan mengevaluasi potensi risiko penyalahgunaan atau kesalahan dan kesalahan yang tidak disengaja langsung ke manusia, hewan lain, dan juga lingkungan dengan cara yang sangat sistematis. Semua percobaan dan pengembangan hewan transgenik atau terapi gen atau kultur sel harus memenuhi langkah-langkah keamanan dasar tertentu di laboratorium serta dengan organisme untuk meminimalkan kemungkinan faktor risiko. Berikut ini adalah beberapa risiko yang harus ditangani dengan memuaskan:

- Hewan transgenik dapat melarikan diri ke lingkungan dan berkembang biak dengan jenis liar, yang dapat mengakibatkan transfer gen tersebut ke populasi lain. Jadi hewan transgenik harus dilindungi dari populasi lain.
- Penggunaan virus patogen dan retrovirus sebagai vektor untuk mengirimkan DNA ke dalam genom mungkin sangat berisiko dalam artian bahwa virus ini dapat bermutasi menjadi bentuk patogen dan dapat menyebabkan penyakit atau masalah lain.
- Keprihatinan masyarakat atas kemungkinan risiko terhadap manusia dan hewan lain akibat konsumsi bahan makanan hasil rekayasa genetika. Publik harus mendapat informasi yang benar tentang fakta-fakta yang sebenarnya.
- Penerapan gen yang resistan terhadap obat sebagai penanda transformasi genetik adalah praktik yang biasa dilakukan dalam rekayasa genetika. Ada risiko mentransfer gen ini ke organisme atau patogen lain yang tidak diinginkan, yang dapat menimbulkan ancaman bagi manusia dan organisme lain.
- Produksi organisme tahan penyakit yang tidak terkontrol, baik hewan maupun tumbuhan, dapat menyebabkan ketidakseimbangan di alam akibat rusaknya organisme lain.
- Pada saat kelangkaan organ atau jaringan manusia yang sehat untuk transplantasi, dianjurkan untuk menggunakan jaringan dan organ dari hewan yang sesuai seperti babi. Metode transplantasi organ atau pencangkokan jaringan dari hewan disebut xenotransplantation. Ini juga menimbulkan kekhawatiran tentang kemungkinan infeksi melalui organ dan jaringan jika hewan terinfeksi atau memiliki penyakit dalam bentuk tidak aktif. Namun, penggunaan hewan sehat tanpa jenis infeksi atau penyakit apa pun dapat mengatasi masalah ini lebih jauh.

Darah manusia, produk darah, cairan tubuh, dan jaringan terdaftar sebagai bahan biologis yang berpotensi berbahaya.

Praktik dan prosedur keamanan hayati harus diikuti saat menangani darah manusia, produk darah, cairan tubuh, dan jaringan karena agen infeksi yang mungkin dikandungnya. Praktik dan prosedur keamanan hayati konsisten dengan konsep "Kewaspadaan Universal", yang mengharuskan semua spesimen darah manusia, produk darah, cairan tubuh, dan jaringan diperlakukan seolah-olah menular. Paparan terhadap patogen melalui darah di tempat kerja mengharuskan kombinasi kontrol praktik kerja dan pelatihan bagi karyawan laboratorium untuk mencegah infeksi oleh patogen dan risiko lainnya. Vaksinasi terhadap patogen yang diketahui seperti hepatitis B harus dilakukan di antara karyawan laboratorium.

Sebagian besar masyarakat gagap ilmiah harus diberi tahu tentang fakta ilmiah aktual terkait dengan masalah pangan hasil rekayasa genetika dan hewan dan tumbuhan rekayasa genetika. Mereka harus diberi informasi yang tepat tentang fakta ilmiah yang berkaitan dengan apa yang disebut bahaya dan etika moral dalam praktik beberapa teknik bioteknologi modern. Pendekatan molekuler modern dalam pengobatan penyakit genetik seperti IVF (fertilisasi *in-vitro*), aplikasi stem-cell, transplantasi organ, terapi gen, rekayasa jaringan, dan lain-lain. Harus tersedia untuk umum sehingga mereka akan merespons dan menghargainya dengan cara yang benar tanpa kebingungan. Hal ini sangat penting untuk mencapai perluasan dan aplikasi komersial produk-produk bioteknologi.

BAB VIII

TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN

Secara umum, semua sifat organisme bergantung pada jumlah gen. Ada dua kategori utamanya yaitu gen struktural dan gen regulasi. Struktural gen menyandikan urutan asam amino protein, enzim yang kemudian menentukan kemampuan biokimia organisme untuk mengkatalisis reaksi sintesis atau katabolis, selain itu dapat pula berperan sebagai komponen struktur seluler. Sebaliknya, gen regulasi mengontrol ekspresi gen struktural dengan menentukan laju produksi produk proteinnya sebagai respons terhadap sinyal intra atau ekstraseluler. Prinsip-prinsip tersebut yang menjadi dasar implementasi teknik genetika.

Studi pengembangan model double-heliks yang menggambarkan struktur molekul DNA membuka peluang implikasinya untuk memahami replikasi gen. Sejak itulah penjabaran spektakuler dari interaksi kompleks yang diperlukan untuk mengekspresikan informasi kimia yang disandikan oleh DNA menjadi ekspresi tingkat seluler dan tingkat organisme. Perubahan dalam molekul DNA yang menyusun komplemen genetik suatu organisme adalah cara organisme berevolusi dan menyesuaikan diri dengan lingkungan baru. Peran DNA yang tepat adalah bertindak sebagai reservoir informasi genetik. Secara alami, perubahan DNA suatu organisme dapat terjadi dengan dua cara:

- melalui mutasi, yaitu perubahan (penghapusan atau penambahan) kimiawi satu atau lebih pada urutan basa nitrogen molekul DNA

- dengan pertukaran informasi genetik atau DNA antara organisme serupa yang biasanya melalui reproduksi seksual, dan dengan transfer horizontal pada bakteri. Pada eukariota, reproduksi seksual dicapai melalui proses konjugasi di mana ada donor, yang diperankan oleh jantan, dan betina selaku penerima. Konjugasi bakteri melibatkan transfer DNA dari donor ke sel penerima. DNA yang ditransfer (biasanya DNA plasmid) selalu dalam bentuk untai tunggal dan untai komplementer disintesis di penerima. Transduksi adalah transfer DNA yang dimediasi oleh virus bakteri (bakteriofaga) dan sel yang telah menerima DNA transduksi disebut sebagai transduktan. Transformasi melibatkan isolasi DNA yang ada di lingkungan organisme ke dalam sel penerima, yang kemudian disebut sebagai transforman. Transfer genetik dengan cara ini pada bakteri merupakan karakteristik alami dari berbagai jenis bakteri seperti *Campylobacter*, *Neisseria* dan *Streptomyces*. Strain bakteri yang tidak dapat ditransformasikan secara alami dapat diinduksi untuk mengisolasi DNA melalui perlakuan kimiawi atau dengan elektroporasi.

Genetika klasik, sebelumnya merupakan satu-satunya cara di mana hereditas dapat dipelajari dan dimanipulasi. Namun, kini, teknologi telah memungkinkan perubahan yang belum pernah terjadi sebelumnya dalam susunan genetik organisme, bahkan memungkinkan pertukaran DNA antara organisme yang berbeda di laboratorium. Manipulasi materi genetik pada organisme sekarang dapat dilakukan dengan pada tiga tingkatan yaitu: organisme, seluler dan molekuler (Carstou et al., 2007; Nair, 2007; Shang-Tian Yang, 2007; Smith, 2009).

Manipulasi tingkat organisme. Manipulasi genetik seluruh organisme sejatinya telah terjadi secara alami melalui reproduksi seksual. Perkembangan evolusioner hampir semua makhluk hidup melibatkan interaksi aktif antara genom dan lingkungannya, dan kontrol terhadap reproduksi seksual telah diimplementasikan pada bidang pertanian selama beberapa dekade, bahkan berabad-abad. Dewasa ini, manipulasi genetik tingkat organisme digunakan dengan beberapa mikroba yang berperan dalam aktivitas industri, misalnya pembuatan ragi. Proses tersebut melibatkan seleksi, mutasi, persilangan seksual, hibridisasi, dan lain-lain. Secara keseluruhan, hal tersebut merupakan proses yang sangat kompleks dan dapat memakan waktu lama untuk mencapai hasil terstandar yang diinginkan. Di bidang pertanian dan peternakan, manfaatnya telah banyak dinikmati dengan hadirnya tanaman dan

hewan yang jauh memiliki kualitas lebih baik hasil manipulasi genetik, demikian halnya pada bidang industri bioteknologi telah dihasilkan peningkatan produktivitas yang sangat tinggi, misalnya produksi antibiotik dan enzim oleh mikroba unggul hasil manipulasi genetik (Carstou et al., 2007; Mosier & Ladisch, 2009; Smith, 2009; Vinet & Zhedanov, 2018).

Manipulasi tingkat seluler. Manipulasi tingkat sel dilakukan untuk mengubah respons seluler. Teknologi ini telah digunakan selama lebih dari dua dekade. Metode teknologi ini relatif lebih sederhana dan terarah dibandingkan dengan manipulasi tingkat organisme, dan perubahan dapat lebih mudah diidentifikasi. Contoh bioteknologi yang telah berhasil dari metode ini adalah antibodi monoklonal dan kloning beberapa spesies tanaman (Mosier & Ladisch, 2009; Nair, 2007; Vinet & Zhedanov, 2018).

Manipulasi tingkat molekuler. Manipulasi pada tingkat molekuler, yaitu terhadap DNA dan RNA menandai era baru manipulasi genetik. Teknologi ini merupakan rekayasa genetika atau teknologi DNA rekombinan yang telah membawa perubahan dramatis pada perkembangan bioteknologi. Dalam teknik ini, kita dapat mengetahui lebih banyak tentang perubahan genetik yang terjadi, bahkan dimungkinkan untuk menambah atau menghapus bagian/urutan molekul dengan tingkat presisi yang tinggi, dan produknya dapat diidentifikasi secara jelas. Usaha industri saat ini sangat banyak yang spesies organisme baru yang telah direkayasa materi genetiknya (Vinet & Zhedanov, 2018; Walker & Rapley, 2002).

Bidang bioteknologi modern dimulai ketika insulin manusia rekombinan yang diproduksi oleh bakteri pertama kali dipasarkan di Amerika Serikat pada tahun 1982. Upaya yang mengarah pada peristiwa penting ini dimulai pada awal tahun 1970-an ketika para ilmuwan penelitian mengembangkan protokol untuk membangun jenis baru plasmid atau bakteri vektor, dengan memotong dan menempelkan potongan DNA bersama-sama untuk membuat potongan DNA baru (DNA rekombinan) yang dapat dimasukkan ke dalam bakteri inang seperti *E. coli*. Kita juga mengamati bahwa ragi dapat dibuat untuk menghasilkan vaksin seperti hepatitis B, tanaman yang memiliki sifat khusus seperti ketahanan terhadap penyakit tertentu, hama, dan herbisida serta tanaman dengan kualitas nutrisi yang unggul dapat dihasilkan dengan sangat efisien. Tujuan luar biasa dari rekayasa genetika ini tercapai karena munculnya teknologi DNA rekombinan. Teknologi DNA

rekombinan adalah salah satu dari sedikit teknik yang membuat bioteknologi konvensional mengalami perkembangan menjadi Bioteknologi Modern.

Didefinisikan secara sederhana, merupakan seni memotong dan menempelkan gen. Namun, ada banyak aplikasi baru dari teknologi ini yang ditemukan dari masa ke masa. Teknik ini mencakup sejumlah metodologi atau alat yang memungkinkan kita untuk membangun kombinasi DNA baru (DNA rekombinan atau rDNA) di laboratorium untuk tujuan yang berbeda. Molekul rDNA yang dibangun dapat dimasukkan ke dalam sel inang yang sesuai, di mana ia dapat digandakan dan menghasilkan banyak salinan. Ini membentuk konsep dasar dari proses yang dikenal sebagai kloning gen atau kloning DNA. Dalam bab ini kita akan membahas alat dasar, metodologi, dan aplikasi teknik DNA rekombinan di berbagai bidang penelitian biologi. Tujuan rDNA adalah kloning gen untuk menghasilkan DNA murni dalam jumlah besar yang dapat dimanipulasi dan dipelajari.

1. Enzim untuk Teknologi DNA Rekombinan

Untuk pembentukan molekul DNA rekombinan, kami mensyaratkan fragmen DNA diklon (dikenal sebagai DNA penyisipan) dan DNA kendaraan (dikenal sebagai vektor) untuk membawa DNA ke dalam sel inang dan berkembang biak. Karena proses pembuatan DNA rekombinan memerlukan pemotongan dan penyambungan molekul DNA yang tepat, ini melibatkan sejumlah alat molekuler yang sangat penting yaitu enzim untuk memotong dan memodifikasi DNA, akhirnya menghasilkan molekul DNA rekombinan. Enzim utama yang dibutuhkan untuk pembuatan molekul rDNA adalah sebagai berikut:

- Endonuklease restriksi tipe II
- DNA ligase
- Alkali fosfatase

Peran masing-masing enzim ini dalam pembuatan molekul rDNA dijelaskan di bagian berikut:

a) Retriksi Endonuklease

Pada tahun 1968 sekelompok tiga ilmuwan — H.O. Smith, K.W. Wilcox, dan T.J. Kelley — mengisolasi dan menandai endonuklease restriksi spesifik-urutan pertama. Penemuan enzim ini menandai dimulainya penelitian DNA rekombinan dan modifikasi urutan

tertentu dari molekul DNA. Karena restriksi endonuklease ini bertanggung jawab untuk mengubah molekul DNA menjadi sejumlah fragmen tertentu dengan memotong molekul pada sekuens spesifik tertentu yang dikenal sebagai situs restriksi, enzim ini dikenal sebagai gunting molekuler. Enzim ini, bersama dengan enzim pengubah DNA lain yang sama pentingnya. DNA ligase memungkinkan untuk membuat jenis molekul DNA yang sama sekali baru dan yang sama pentingnya, memanipulasi fungsi gen yang terletak pada molekul baru tersebut.

b) DNA ligase

Enzim ini bertanggung jawab untuk pembentukan ikatan fosfodiester antara dua nukleotida yang berdekatan sehingga menggabungkan dua fragmen DNA beruntai ganda. Hubungan fosfodiester terbentuk antara gugus 3'OH (gugus hidroksil pada karbon 3') dan gugus 5' PO₄ dari gula pentosa dari nukleotida yang berdekatan dari dua fragmen DNA berbeda atau torehan yang dibuat dalam molekul DNA beruntai ganda. Dalam percobaan rDNA, DNA ligase digunakan untuk menggabungkan dua fragmen DNA yang berbeda (plasmid/ vektor dan DNA asing) yang dianil oleh ujung yang lengket. Ada berbagai jenis enzim ligase dari sumber yang berbeda. Namun yang paling sering digunakan adalah DNA ligase T4 yang diproduksi oleh bakteriofaga T4 (Walker & Rapley, 2002).

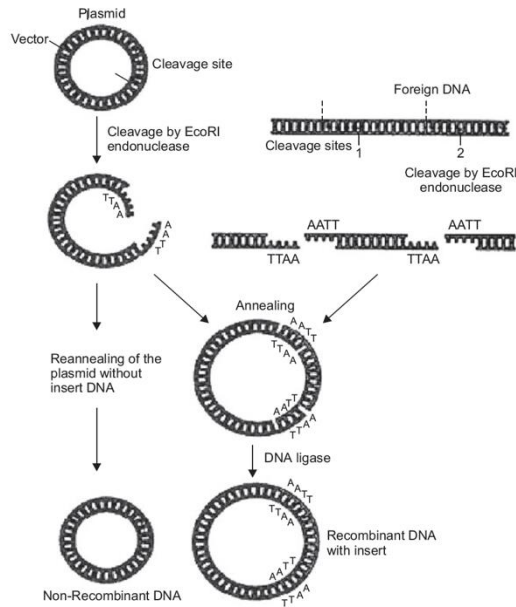
c) Alkaline Phosphatase

Dalam percobaan rDNA selalu ada masalah ligasi sendiri dan reformasi plasmid atau vektor asli. Ini mengurangi efisiensi pembentukan DNA rekombinan. Self-ligasi adalah proses menganil ujung lengket vektor linier tanpa memasukkan fragmen DNA asing. Pada ligasi akan menghasilkan vektor asli tanpa adanya sisipan DNA. Ini dapat dicegah dengan menggunakan alkali fosfatase. Kita tahu bahwa keberadaan gugus 3'OH dan 5' PO₄ merupakan prasyarat enzim ligase untuk bekerja. Jika salah satu kelompok ini tidak ada, DNA ligase tidak dapat berfungsi. Alkali fosfatase dapat menghilangkan gugus fosfat dari ujung 5' molekul DNA yang menghasilkan gugus 5'OH. Sekarang, satu-satunya kemungkinan ligasi adalah antara vektor dan DNA asing yang menghasilkan molekul DNA rekombinan karena DNA yang disisipkan memiliki gugus 5'PO₄. Dengan demikian, self-ligation dapat dicegah dan efisiensi pembentukan rDNA dapat ditingkatkan. Enzim ini diisolasi

dari beberapa bakteri (bakterial alkaline phosphatase-BAP) atau usus anak sapi (calf intestine alkaline phosphatase-CAP). Selain ini ada beberapa enzim lain yang digunakan untuk tujuan khusus tertentu (Walker & Rapley, 2002).

2. Konstruksi DNA rekombinan

Langkah pertama dalam konstruksi DNA rekombinan adalah isolasi dan pemurnian vektor dan fragmen DNA yang mengandung gen yang akan diklon. Ada sejumlah prosedur standar untuk isolasi plasmid dan fragmen DNA yang mengandung gen tersebut. Pertama, cerna DNA vektor dengan endonuklease restriksi yang sesuai dan buat linier dengan atau tanpa ujung lengket, yang ditentukan oleh jenis RE yang digunakan. Selanjutnya, isolasi fragmen DNA yang membawa gen tersebut dengan mencerna genom atau untai DNA sumber dengan RE yang sama yang digunakan untuk memotong vektor. Vektor yang dilinierisasi (dicerna) dan DNA target yang dipotong dengan enzim restriksi yang sama diinkubasi bersama dengan adanya DNA ligase. Selama inkubasi, ujung lengket dari dua untai DNA semakin dekat dengan komplemen basa dan menjadi ikatan hidrogen satu sama lain. Pada titik ini, hubungan fosfodiester dibuat di antara mereka, dimediasi oleh enzim DNA ligase. Ini menghasilkan pembentukan molekul DNA rekombinan dari vektor dan DNA target atau DNA penyisipan. Ini adalah strategi dasar untuk konstruksi molekul DNA rekombinan dari vektor dan fragmen DNA target.



Gambar 15. Teknik umum konstruksi molekul DNA rekombinan (Smith, 2009)

Kerugian dari strategi ini adalah bahwa ada kemungkinan pelapisan ulang pada ujung vektor linier yang mengarah ke pembentukan vektor itu sendiri tanpa fragmen DNA asing. Masalah ini dapat dikurangi secara signifikan dengan mengadopsi salah satu dari strategi berikut:

- Memulihkan vektor yang dilisis dengan alkali fosfatase untuk menghilangkan gugus 5' fosfat seperti yang dijelaskan sebelumnya.
- Linearisasi vektor (pencernaan restriksi vektor) dan isolasi fragmen DNA asing dengan dua enzim restriksi, bukan satu (pencernaan ganda). Sehingga dua ujung lengket dari vektor tidak akan identik, yang akan mencegah anil ulang sampai batas tertentu.

3. DNA-Lybrary

Isolasi suatu gen atau untai DNA yang membawa gen tersebut merupakan langkah pertama dalam percobaan kloning gen. Konstruksi DNA-library merupakan prasyarat untuk tujuan ini. Terutama ada tiga jenis DNA-library —genom-library, kromosom-

library, dan cDNA-library. DNA-library ini dapat digunakan sebagai sumber untuk menyaring gen target. DNA-library ini umumnya dikenal sebagai DNA-library rekombinan.

a) Genomic Library

Genomic-library adalah kumpulan fragmen DNA yang dikloning dan dicerna oleh enzim restriksi yang mengandung setidaknya satu salinan dari setiap urutan DNA dalam sebuah genom. Seluruh genom organisme direpresentasikan sebagai sekumpulan fragmen DNA yang dimasukkan ke dalam molekul vektor. Ini dapat diperbanyak atau dikloning dalam organisme yang sesuai.

Ada tiga cara untuk membuat *genomic-library*. DNA genom organisme diekstraksi dan dipotong menjadi fragmen dengan ukuran yang sesuai dengan salah satu dari tiga metode berikut. DNA genom dicerna sepenuhnya oleh enzim restriksi yang mengubahnya menjadi fragmen dengan ukuran yang sesuai. Enzim restriksi memotong semua lokasi restriksi yang relevan dan menghasilkan sejumlah besar fragmen pendek dengan ujung lengket. Kerugiannya adalah bahwa gen yang mengandung situs restriksi dalam kerangka pembacaan dapat dipotong menjadi dua atau lebih fragmen dan dapat dikloning secara terpisah.

DNA genom dapat difragmentasi secara tidak enzimatis dengan cara pemotongan mekanis seperti sonikasi, yang menghasilkan fragmen DNA yang lebih panjang. Kerugian dalam hal ini adalah ujung fragmen yang dihasilkan tidak seragam dan perlu modifikasi enzimatis untuk dimasukkan ke dalam vektor kloning.

Metode ketiga untuk memecah DNA genom adalah dengan pencernaan enzimatis parsial dengan enzim restriksi. Dengan membatasi jumlah enzim restriksi dan waktu paparan DNA ke enzim aktif, semua situs restriksi yang ada dalam genom tidak akan ditindaklanjuti oleh enzim restriksi. Pencernaan restriksi akan parsial, menghasilkan fragmen DNA yang panjang dengan urutan yang tumpang tindih. Setelah proses pencernaan, fragmen DNA dapat disesuaikan ukurannya dengan elektroforesis agarosa. Seperti fragmen dari digesti lengkap, fragmen memiliki ujung yang lengket dan dapat dimasukkan secara langsung.

Vektor juga diisolasi dari bakteri inang dan dipotong dengan enzim restriksi yang sama dan digunakan untuk mencerna DNA genom. Molekul vektor yang dilinierisasi diinkubasi dengan

fragmen DNA genom bersama DNA ligase sehingga masing-masing fragmen DNA genom tersebut dimasukkan ke dalam setiap molekul vektor sehingga menghasilkan molekul DNA rekombinan. Setiap molekul vektor rekombinan akan memiliki fragmen DNA genom yang berbeda dan semua molekul DNA rekombinan ini dimasukkan ke dalam organisme inang yang sesuai seperti sel bakteri atau partikel faga.

b) Chromosomal Library

Chromosom-library adalah kumpulan fragmen DNA yang dicerna enzim restriksi kloning dari kromosom individu. Ini sangat penting dalam kasus sekuensing genom eukariota dan pemetaan fisik kromosom, yang menunjukkan lokus gen tertentu dalam kromosom tertentu.

c) Complementary DNA Library (cDNA Library)

Dalam kasus sistem eukariotik, *genom-library* mungkin tidak banyak berguna jika tujuannya adalah untuk mengisolasi gen utuh dan mengekspresikan protein dalam sel bakteri dalam bentuk aktif karena alasan berikut:

- Meskipun *genom-library* mewakili urutan genom lengkap, ada kemungkinan bahwa gen tertentu dapat terfragmentasi dan dapat hadir dalam dua klon bakteri yang berbeda.
- Gen eukariotik biasanya mengandung daerah *non-coding* yang mengintervensi yang dikenal sebagai intron. Gen dengan intron dapat diekspresikan dalam sistem prokariotik karena mereka tidak memiliki mesin penyambungan. Jadi gen akan diekspresikan bersama dengan intron dan hasilnya akan menjadi protein yang sama sekali berbeda, yang tidak aktif atau berfungsi.
- Elemen pengatur gen eukariotik mungkin tidak dipahami dengan baik oleh sistem prokariotik dan dapat menimbulkan masalah dalam ekspresi protein yang tepat dalam bentuk aktif.

cDNA-library dapat memecahkan sebagian besar masalah tersebut, jika tujuan kloning gen kita adalah untuk mengekspresikan gen dalam bakteri. cDNA-library adalah kumpulan klon DNA, yang merupakan salinan pelengkap messenger RNA (mRNA) yang diisolasi dari sel masing-masing. Messenger RNA adalah bahan awal untuk konstruksi cDNA-library. DNA-library ini hanya mewakili gen yang diekspresikan oleh

sekelompok sel atau jaringan. Karena mRNA diproduksi setelah penyambungan, mRNA tidak memiliki intron. Oleh karena itu, salinan pelengkap mRNA (cDNA) ini hanya mewakili ekson atau daerah pengkode dari gen eukariotik yang sebenarnya. CDNA ini dapat langsung dimasukkan ke dalam vektor ekspresi seperti pUC18 atau pUC19 dan protein dapat diekspresikan dalam sistem bakteri seperti *E. coli*.

Konstruksi cDNA Library dimulai dengan isolasi mRNA dari sel atau jaringan khusus di mana mRNA tertentu melimpah. MRNA dimurnikan dari total RNA dengan kromatografi afinitas menggunakan kolom oligo dT, yang secara selektif mengikat ekor poli A mRNA. MRNA yang dimurnikan ditranskripsikan kembali menjadi cDNA oleh enzim yang dikenal sebagai *reverse transcriptase*. Pada langkah pertama, satu untai tunggal cDNA diproduksi dan sekali lagi dengan metode enzimatik DNA untai tunggal diubah menjadi molekul cDNA untai ganda. Molekul cDNA ini dimasukkan ke dalam vektor yang sesuai dengan bantuan linker atau adaptor yang sesuai, yang menyediakan situs pembatasan yang diperlukan untuk anil dan ligasi. Adaptor atau penaut adalah oligonukleotida buatan khusus yang membawa situs restriksi untuk enzim restriksi tertentu. Ini dapat dilampirkan ke ujung molekul cDNA untuk menyediakan situs restriksi untuk enzim restriksi tertentu. Setelah molekul DNA rekombinan dengan cDNA sisipan terbentuk, mereka dimasukkan ke dalam sel inang bakteri yang sesuai untuk kloning dan membangun cDNA-library. cDNA-library ini dapat digunakan sebagai sumber untuk isolasi gen tertentu dan ekspresinya dalam sistem prokariotik. Vektor ekspresi harus dilengkapi dengan urutan pengaturan seperti jenis promotor yang benar (Mosier & Ladisch, 2009; Nair, 2007; Shang-Tian Yang, 2007; Smith, 2009; Walker & Rapley, 2002).

4. Transgenik: Inseri DNA Rekombinan ke Sel Inang

Setelah pembentukan molekul DNA rekombinan, ia harus dimasukkan ke dalam sel inang yang sesuai sehingga DNA akan berkembang biak. Ada beberapa metode yang tersedia untuk ini, yang bergantung pada beberapa faktor termasuk jenis vektor yang digunakan dan sel inang. Berikut ini adalah metode umum yang digunakan untuk memasukkan molekul rDNA ke dalam sel inang:

- 1) Transformasi adalah metode yang paling umum diadopsi untuk memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel inang. Selama proses transformasi, sel menarik DNA asing dari

lingkungannya. Tetapi banyak sel termasuk *E. coli*, ragi, dan sel mamalia tidak dapat mengambil DNA dari lingkungannya secara alami. Perlakuan kimiawi tertentu dapat meningkatkan kemampuan sel untuk mengambil DNA asing atau membuat sel menjadi kompeten untuk transformasi. Peningkatan kompetensi untuk transformasi ini ditemukan oleh Mandel dan Higa pada tahun 1970. Mereka mengamati bahwa sel *E. coli* menjadi lebih kompeten untuk mengambil DNA asing ketika sel-sel ini diinkubasi dalam larutan kalsium klorida dingin. Mekanisme ini masih diikuti untuk transformasi sel *E. coli* sebagai bagian dari kloning gen.

- 2) Transfeksi adalah metode lain yang digunakan untuk transformasi sel yang dikultur. Dalam metode ini DNA (vektor rekombinan) dicampur dengan zat bermuatan seperti kalsium fosfat, liposom kationik, atau dekstran DEAE dan dilapisi pada sel inang. Hal ini pada akhirnya menghasilkan pengambilan DNA eksternal oleh sel inang ini.
- 3) Elektroporasi adalah metode efisien lainnya untuk memasukkan rDNA ke dalam sel inang. Selama proses elektroporasi, arus listrik digunakan untuk membuat pori mikroskopis sementara di membran sel sel inang. Melalui lubang sementara ini, DNA asing masuk ke dalam sel. Metode ini sangat cocok untuk sel seperti ragi, sel mamalia, dan protoplas tumbuhan.
- 4) Injeksi mikro adalah teknik khusus di mana fragmen DNA atau gen dapat langsung disuntikkan ke dalam inti sel tumbuhan dan hewan. Metode ini dapat dilakukan tanpa menggunakan vektor khusus apa pun. Prosedur ini melibatkan injeksi langsung DNA ke dalam inti sel inang dengan bantuan tabung atau jarum suntik injeksi mikro. Instrumentasi untuk mikroinjeksi terdiri dari mikroskop perbesaran tinggi, dipasang dengan jarum halus, spuit, dan fasilitas lainnya untuk melakukan pengiriman DNA ke dalam sel terpilih secara otomatis.
- 5) Metode biolistik dikembangkan untuk memasukkan DNA asing ke dalam sel tumbuhan dengan bantuan senjata gen atau partikel. Selama metode biolistik, partikel mikroskopis emas atau tungsten yang dilapisi dengan DNA yang diinginkan dibombardir ke dalam sel dengan kecepatan tinggi. Penembakan partikel dilakukan dengan bantuan alat mekanis yang disebut senapan partikel. Biasanya, metode pemasukan gen asing ke dalam sel tumbuhan dilakukan dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Tetapi bakteri ini

spesifik pada inang dan mungkin tidak menginfeksi dan mentransfer gen pada kasus tertentu, terutama pada kasus monokotil. Metode biolistik dapat diadopsi dalam kasus seperti itu.

Dalam kasus vektor bakteriofaga tidak diperlukan metode atau perawatan khusus untuk memasukkan DNA ke dalam genom karena infeksi faga dan transfer DNA ke dalam genom adalah alami (Gosal & Wani, 2018; Khan, 2018; Nicholl, 2002; Niemann & Wrenzycki, 2018; Tang, 2019).

5. Identifikasi Rekombinan

Pengenalan DNA rekombinan ke dalam sel inang yang sesuai diikuti dengan pemilihan sel tersebut, yang mengandung vektor rekombinan. Selama proses transformasi genetik hanya persentase yang sangat rendah dari total populasi sel yang mengambil atau menerima DNA rekombinan. Oleh karena itu, sangat penting untuk memiliki metode penyaringan yang efisien untuk memilih sel yang diubah atau sel yang telah mengambil DNA asing. Ada berbagai metode seleksi atau teknik skrining yang didasarkan pada ekspresi atau non-ekspresi dari beberapa sifat yang ada dalam vektor atau bersama dengan gen kloning. Beberapa ciri tersebut adalah resistensi terhadap antibiotik tertentu. Jika gen resisten antibiotik ada bersama dengan gen kloning, sangat mudah untuk memilih transforman rekombinan secara langsung pada media yang dilengkapi dengan masing-masing antibiotik. Dalam kebanyakan kasus, ada dua tahap seleksi. Pertama, salah satunya adalah pemilihan sel yang diubah, yaitu sel yang telah mengikat plasmid. Lalu yang kedua adalah mengidentifikasi sel-sel yang ditransformasikan yang memiliki plasmid rekombinan.

Sel yang diubah dan mengandung plasmid dan dapat diidentifikasi dengan metode pemilihan positif. Penanda yang paling umum digunakan untuk seleksi positif adalah gen resistensi antibiotik yang terdapat pada vektor kloning. Misalnya, gen resistensi ampicilin terdapat pada pUC19 dan jenis vektor serupa lainnya. Metode seleksi positif sangat penting ketika DNA dimasukkan ke dalam plasmid melalui transformasi. Hanya sebagian kecil dari sel yang dapat mengikat plasmid dan menjadi resisten terhadap antibiotik. Jadi, sistem seleksi positif yang akurat dapat menghilangkan semua sel yang tidak ditransformasi dan memungkinkan sel yang diubah untuk tumbuh dan berkembang. Dengan melapisi produk transformasi langsung pada pelat

antibiotik, semua bakteri yang tidak ditransformasi mati dan hanya bakteri yang mengandung plasmid dengan gen penanda resisten antibiotik yang dapat tumbuh untuk membentuk koloni.

Dengan metode seleksi ini kita akan bisa mendapatkan sel yang diubah dengan plasmid. Tetapi tidak mungkin untuk mengidentifikasi sel atau koloni yang ditransformasikan yang memiliki plasmid rekombinan dari sel atau koloni yang ditransformasikan dengan plasmid induk tanpa adanya fragmen DNA yang disisipkan (vektor non-rekombinan). Metode seleksi negatif dapat diadopsi untuk mengidentifikasi keberadaan vektor rekombinan di antara sel yang diubah. Untuk mengidentifikasi plasmid yang membawa fragmen DNA asing, situs kloning ganda dalam vektor direkayasa sedemikian rupa sehingga penyisipan untai DNA asing mengganggu ekspresi gen penanda yang dapat dipilih — sebuah fenomena yang dikenal sebagai inaktivasi penyisipan. Dua jenis penanda yang dapat dipilih digunakan untuk seleksi negatif. Salah satunya adalah inaktivasi insersi dari resistensi antibiotik dan yang kedua adalah inaktivasi insersi dari aktivitas enzimatis (Nair, 2007; Walker & Rapley, 2002).

6. DNA Probe

DNA probe adalah fragmen molekul DNA, berlabel fluoresen atau radioaktif yang digunakan untuk menemukan urutan yang serupa atau komplementer di antara bentangan panjang molekul DNA atau koloni bakteri seperti genom-library atau cDNA atau dalam genom. DNA probe semacam itu digunakan dalam eksperimen hibridisasi seperti hibridisasi Selatan untuk mendeteksi sekuens spesifik tertentu, yang melengkapi probe. Karena probe diberi label dengan pewarna fluoresen atau isotop radioaktif fosfor, pengikatannya ke urutan tertentu dapat dideteksi. DNA probe berlabel isotop radioaktif atau pewarna fluoresen dapat digunakan untuk menyaring koloni yang ditransformasikan yang memiliki plasmid rekombinan yang benar.

Secara eksperimental, *gene-library* yang akan disaring, atau elektroforesis pita DNA pada gel agarosa, dipindahkan ke nitroselulosa atau dengan *blotting*. Selanjutnya diproses untuk melepaskan DNA dari faga. Ini kemudian didenaturasi untuk memisahkan pelengkap yang diimobilisasi ke membran, dalam posisi yang ditempati oleh dan dengan cara yang membuat basa bebas untuk berinteraksi dengan molekul. Molekul probe kemudian diberi label (biasanya dengan nukleotida tetapi

sekarang lebih umum dengan kromogenik atau label). Probe dan filter kemudian diinkubasi dalam kondisi dimana hibridisasi setelah probe tak terikat dicuci dari probe yang terikat khusus divisualisasikan. Sinyal positif mengungkapkan identitas tersebut) dari rekombinan yang membawa urutan yang terkait dengan probe (Smith, 2009; Nair, 2007; Walker & Rapley, 2002).

7. Teknik Hibridisasi

Dua molekul asam nukleat beruntai tunggal secara alami akan mencoba untuk berpasangan satu sama lain dalam kondisi yang sesuai. Dalam kebanyakan kasus, struktur hibrid yang terbentuk akan sangat tidak stabil karena jumlah ikatan-H yang terbentuk sangat sedikit. Namun, jika ada komplementaritas urutan yang signifikan antara dua untai, hibrida stabil akan terbentuk. Fenomena hibridisasi asam nukleat ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi rekombinan tertentu jika probe yang sesuai, dan urutan yang dibutuhkan tersedia.

Fragmen DNA dalam genom juga dapat dideteksi dengan hibridisasi Selatan. Teknik ini awalnya dirancang oleh Edward Southern pada tahun 1975 untuk mengidentifikasi fragmen DNA spesifik pada gel agarosa setelah pemisahan dengan elektroforesis. Teknik tersebut melibatkan isolasi DNA genom dengan prosedur yang sesuai. DNA genom dicerna dengan enzim restriksi yang sesuai atau dengan campuran enzim restriksi yang berbeda untuk memotong molekul DNA panjang menjadi fragmen. DNA genom yang dicerna restriksi dipisahkan dengan elektroforesis dan DNA yang dipisahkan pada gel kemudian ditransfer ke membran—membran nitroselulosa atau nilon dengan proses yang disebut blotting, yang didorong oleh aksi kapiler. Blotting juga bisa dilakukan secara elektroforesis, dan kemudian dikenal sebagai *electroblotting*. Ada metode blotting lain yang sama efektifnya yang dikenal sebagai blotting vakum. Fragmen DNA yang ditransfer ke membran tidak dapat bergerak ke permukaannya oleh panas atau ikatan silang yang dimediasi UV. Sekarang membran dihibridisasi dengan segmen 'berlabel' dari pengganti gen yang disebut probe (label mungkin pelabelan kimiawi radioaktif atau fluoresen). Jika filter hibridisasi terkena film sinar-X, hanya pita dengan probe berlabel hibridisasi yang akan ditampilkan pada film. Hibridisasi selatan memungkinkan lokalisasi yang tepat dari urutan DNA tertentu dalam genom, setelah peta pembatasan dibuat. Jika probe diberi label dengan bahan kimia fluoresen maka pita fluoresen dapat divisualisasikan

setelah menerangi membran nilon atau nitroselulosa dengan sinar UV setelah proses blotting.

Karena pita DNA pada membran akan memiliki pola yang sama seperti yang ada di gel, posisi pita berlabel pada membran dapat dilacak ke posisi yang sama di dalam gel. Ada sejumlah variasi hibridisasi Selatan atau noda Selatan yang cocok untuk jenis eksperimen tertentu. Beberapa di antaranya adalah bintik bintik, hibridisasi koloni, dan bintik slot yang relatif lebih mudah. Mirip dengan hibridisasi Selatan, ada bentuk-bentuk teknik hibridisasi molekuler yang diubah yang dikembangkan untuk RNA dan protein. Ada teknik yang dikembangkan di mana RNA dihibridisasi dengan sekuens DNA pelengkap atau protein spesifik seperti antibodi yang dihibridisasi dengan protein lain seperti ligan atau antigennya. Karena hibridisasi DNA dengan molekul DNA lain disebut hibridisasi Selatan atau blotting, hibridisasi antara RNA dan DNA disebut hibridisasi Utara dan hibridisasi protein-protein seperti pengikatan antigen-antibodi atau pengikatan protein-ligan disebut hibridisasi Barat (Mosier & Ladisch, 2009; Nair, 2007; Walker & Rapley, 2002).

8. DNA Sequencing

Untuk memahami kompleksitas struktur gen, ekspresinya, pengaturannya, interaksi protein, dan mekanisme molekuler penyakit genetik, mengingat urutan basa yang terperinci dan tepat dalam DNA sangat penting diketahui. Selama akhir 1970-an dua teknik pengurutan yang berbeda dikembangkan, yaitu:

- Metode pembelahan kimiawi yang dikembangkan oleh Allan Maxam dan Walter Gilbert (Metode Maxam-Gilbert). Metode ini pada awalnya sangat penting tetapi tidak lagi dipraktikkan sekarang. Pada metode ini fragmen-fragmen DNA yang akan disekuens harus dilabeli pada salah satu ujungnya, biasanya menggunakan fosfat radioaktif atau suatu nukleotida pada ujung 3'. Metode Maxam-Gilbert dapat diterapkan baik untuk DNA untai ganda maupun DNA untai tunggal dan melibatkan pemotongan basa spesifik yang dilakukan dalam dua tahap. Molekul DNA terlebih dahulu dipotong-potong secara parsial menggunakan piperidin. Pengaturan masa inkubasi atau konsentrasi piperidin akan menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang bermacam-macam ukurannya. Selanjutnya, basa dimodifikasi menggunakan bahan-bahan kimia tertentu

- Metode pemutusan rantai yang dimediasi enzim yang dikembangkan oleh Frederick Sanger bersama dengan Andrew Coulson dikenal sebagai metode pengurutan Sanger atau metode pengurutan DNA secara enzimatik.

Kedua metode melibatkan pelabelan nukleotida terminal diikuti dengan pemisahan dan deteksi oligonukleotida yang dihasilkan (Carstou et al., 2007) (Nair; Walker and Rapley) Vinet and Zhedanov).

Metode Sanger

Reaksi sekuensing DNA sama seperti reaksi PCR untuk mereplikasi DNA atau mensintesis untai DNA baru. Campuran reaksi mencakup DNA cetakan, 5'deoksiribonukleotida trifosfat bebas, enzim, DNA polimerase (biasanya varian Taq polimerase) dan 'primer' —sebuah kecil DNA untai tunggal sekitar 20 sampai 30 nukleotida bersama dengan a gugus 3'-hidroksil bebas yang dapat berhibridisasi menjadi satu untai DNA template. Primer dengan gugus 3'OH bebas dapat memulai sintesis untai DNA dengan penambahan nukleotida bebas ke primer oleh enzim polimerase. Metode terminasi rantai Sanger menggunakan 2'3'-dideoxyribonucleoside triphosphates (ddNTPs). Molekul ini berbeda dari deoksiribonukleosida trifosfat normal (dNTPs) dengan memiliki atom hidrogen pada karbon 3 'bukan pada gugus hidroksil.

Reaksi dimulai dengan panas sampai dua untai DNA (cetakan) terpisah, kemudian primer mengikat ke lokasi yang diinginkan dan DNA polimerase mulai memanjang dengan menambahkan dNTP yang sesuai seperti yang ditunjukkan. Jika dibiarkan sampai selesai, untai DNA baru akan menjadi hasilnya. Jika kita mulai dengan satu miliar potongan DNA templat yang identik, kita akan mendapatkan satu miliar salinan baru dari salah satu untaianya. Namun, kami menjalankan reaksi sekuensing dengan adanya dideoksiribonukleotida. Setelah nukleotida ini, yang tidak memiliki gugus 3 'hidroksil, ditambahkan ke ujung untai DNA yang sedang tumbuh, tidak ada cara untuk melanjutkan pemanjangannya. Poin kuncinya di sini adalah bahwa dalam campuran reaksi yang kami gunakan untuk pengurutan DNA, sebagian besar nukleotida adalah nukleotida biasa (dNTPs), dan hanya sebagian kecil di antaranya adalah nukleotida dideoksi (ddNTPs). DNA untai ganda (template) dapat diubah menjadi untai tunggal dengan NaOH atau dengan pemanasan hingga 90 °C seperti dalam kasus reaksi PCR.

Reaksi pengurutan DNA mengikuti metode Sanger terdiri dari komponen berikut:

- 1) Sampel DNA yang akan diurutkan atau templatnya: Sampel DNA yang akan diurutkan adalah templatnya. Template harus diubah menjadi untai tunggal dengan denaturasi dengan NaOH. Tetapi jika Anda menjalankan reaksi sekuensing menggunakan mesin PCR, denaturasi template terjadi sebagai bagian dari siklus reaksi.
- 2) Primer DNA: Primer DNA berlabel radio ujung 5', yang merupakan fragmen pendek DNA yang melengkapi DNA cetakan. Primer diberi label dengan radioaktif fosfat di ujung 5'.
- 3) Campuran dari semua dNTP — dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP. Semua dicampur dan didistribusikan ke empat tabung reaksi yang berbeda dalam jumlah yang sesuai dan diberi label A, T, G, dan C.
- 4) Dalam tabung berlabel 'A', sejumlah kecil ddATP ditambahkan. Di tabung 'T' ddTTP ditambahkan, di tabung 'G' ddGTP ditambahkan, dan di tabung 'C' sejumlah kecil ddCTP ditambahkan. Konsentrasi ddNTP kira-kira 1% dari konsentrasi dNTPs.
- 5) Taq DNA polimerase: Ketika semua komponen siap, DNA polimerase Taq ditambahkan ke keempat tabung dan reaksi, *sintesis DNA atau pemanjangan primer, dimulai* (Vinet and Zhedanov, 2018; Carstoiu et al., 2007; Nair, 2007; Walker & Rapley, 2002).

Sequencing DNA Otomatis

Mesin sequencing otomatis telah meningkatkan kualitas serta kecepatan proses pengurutan secara signifikan. Tidak perlu radiolabeling dan autoradiografi. Perbaikan besar dalam teknik pengurutan DNA diamati pada tahun 1960-an dan menghasilkan mesin pengurutan DNA otomatis.

Penggunaan ddNTP berlabel fluoresen (dideoxynucleotide triphosphates) telah membuat pembacaan menjadi sangat mudah, nyaman, dan otomatis dengan bantuan detektor laser UV. Dengan demikian, ini telah sangat meningkatkan kecepatan pengurutan. Masing-masing dari empat jenis ddNTP dapat diberi label dengan pewarna tertentu, sehingga warna tertentu dapat dikaitkan dengan keberadaan nukleotida atau basa tertentu. Misalnya, jika warna pita merah itu mewakili basis 'T,' karena ddTTP diberi label dengan

pewarna merah. Demikian pula, kuning untuk 'G,' hijau untuk 'A,' dan biru untuk dasar 'C'.

Bayangkan kita melakukan reaksi sekuensing dengan keempat dideoksinukleotida (A, G, C, dan T) yang diberi label dengan warna fluoresen yang sesuai bersama dengan deoksinukleotida normal. Campuran reaksi dipisahkan dengan elektroforesis dalam kondisi standar. Sekarang lihat gel untuk melihat pita dalam warna di bawah penerangan UV. Urutan DNA cukup jelas jika kita mengetahui kode warna untuk setiap basis; baca saja warnanya dari bawah ke atas. Campuran reaksi dapat dielektroforesis pada satu jalur, bukan empat jalur.

Setelah elektroforesis, kita bahkan tidak perlu 'membaca' urutan dari gel. Komputer akan melakukan proses tersebut untuk kita secara otomatis. Setelah elektroforesis, pita berwarna dapat dipantau menggunakan sinar laser UV. Sinar laser merangsang pewarna fluoresen dan menghasilkan emisi gelombang spektral tertentu (cahaya berwarna), yang direkam oleh perangkat fotolistrik tertentu. Data yang dihasilkan kemudian diumpankan ke komputer, di mana data emisi dari gel diubah menjadi urutan nukleotida yang sesuai dari sampel DNA (lihat CD). Urutan nukleotida juga ditunjukkan dalam puncak tertentu yang menunjukkan setiap basa nitrogen (Khan, 2020; Vinet & Zhedanov, 2018; Carstoiu et al., 2007; Nair, 2007; Walker & Rapley, 2002).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdin, M. Z., Kiran, U., Kamaluddin, & Ali, A. (2017). Plant Biotechnology: Principles and Applications. In M. Z. Abdin, U. Kiran, Kamaluddin, & A. Ali (Eds.), *Plant Biotechnology: Principles and Applications*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5>
- Aehle, W. (2007). Enzymes in Industry. In W. Aehle (Ed.), *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527617098>
- Antibodies, M. (2009). Monoclonal antibodies: Methods and Protocols (2nd Edition). In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 516).
- Bamforth, C. W., & Cook, D. J. (2019). Food, Fermentation, and Micro-organisms. In *Food, Fermentation, and Micro-organisms*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119557456>
- Bhatia, S., & Goli, D. (2018). Chapter 1 History, scope and development of biotechnology. In *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 1* (Issue July).
- Bhowmik, S. N., & Patil, R. T. (2018). Application of Microbial Biotechnology in Food Processing. In *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology* (pp. 73–106). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00005-0>
- Gupta, V. K & M. G. Tuohy. (2013). *Biofuel Technologies*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34519-7>
- Boulton, C. & D. Quain. (2006). In (Eds.), *Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Science Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470999417>
- Burrell, M. M. (1993). Enzymes of Molecular Biology. In *Humana Press* (Vol. 82, pp. 763–774). Humana Press. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1971.0144>
- Büyükköroğlu, G., & Şenel, B. (2018). Engineering Monoclonal Antibodies. In *Omics Technologies and Bio-Engineering* (Vol. 1, Issue April, pp. 353–389). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00016-6>

- Carstoiu, D., Dyck, E. Van, Glenn, B., Littlehales, C., & Massey, A. (2007). Guide to Biotechnology. In D. Strickland (Ed.), *Biotechnology Industry Organization* (pp. 1–132). Biotechnology Industry Organization.
- Chaudhuri, J., & Al-Rubeai, M. (2005). Bioreactors for Tissue Engineering. In *Springer*. Springer.
- Chisti, Y. (2014). Fermentation (Industrial). In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Vol. 1).
- Climate Change, Photosynthesis and Advanced Biofuels. (2020). In A. Kumar, Y.-Y. Yau, S. Ogita, & R. Scheibe (Eds.), *Climate Change, Photosynthesis and Advanced Biofuels*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-5228-1>
- Collins, J., Broggiato, A., & Vanagt, T. (2015). Blue biotechnology. In *The Dictionary of Genomics, Transcriptomics and Proteomics* (pp. 1–1). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527678679.dg01141>
- Dauletova, M., Hafsan, H., Mahhengam, N., Zekiy, A. O., Ahmadi, M., & Siahmansouri, H. (2021). Mesenchymal stem cell alongside exosomes as a novel cell-based therapy for COVID-19: A review study. *Clinical Immunology*, 226, 108712. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108712>
- Davey, M. R., & Anthony, P. (2010). Plant Cell Culture. In M. R. Davey & P. Anthony (Eds.), *Plant Cell Culture: Essential Methods*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470686522>
- Davis, W. C. (1995). Monoclonal Antibody Protocols. In *Monoclonal Antibody Protocols* (Vol. 45). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0896033082>
- De Blasio, C. (2019). Fundamentals of Biofuels Engineering and Technology. In *Springer*.
- Delves, P. J. (1985). Book Review: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 78(12), 1072–1072. <https://doi.org/10.1177/014107688507801232>
- Efstathios E. Michaelides. (2012). Green Energy and Technology. In *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. <https://doi.org/10.2174/97816080528511120101>

- El-Mansi, M. (2018). Fermentation Microbiology and Biotechnology. In *Fermentation Microbiology and Biotechnology, Fourth Edition* (pp. 3–8). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429506987-1>
- Evans, G. M., & Furlong, J. C. (2003). Environmental Biotechnology: Theory and Application. In *John Wiley & Sons Ltd.*
- Fao. (2011). Biotechnologies for Agricultural Development. In *Agricultural Biotechnologies in Developing Countries (ABDC-10)*.
- Gahlawat, S. K., Duhan, J. S., Salar, R. K., Siwach, P., Kumar, S., & Kaur, P. (2018). Advances in Animal Biotechnology and its Applications. In S. K. Gahlawat, J. S. Duhan, R. K. Salar, P. Siwach, S. Kumar, & P. Kaur (Eds.), *Advances in Animal Biotechnology and its Applications*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4702-2>
- Godbey, W. T. (2020). An introduction to biotechnology. In *Biotechnology and its Applications* (pp. 3–9). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817726-6.00001-0>
- Gosal, S. S., & Wani, S. H. (2018). Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 1. In S. S. Gosal & S. H. Wani (Eds.), *Biotechnologies of Crop Improvement* (Vol. 1). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-78283-6>
- Gupta, Vijai K., & Tuohy, M. G. (2013). Biofuel Technologies. In Vijai Kumar Gupta & M. G. Tuohy (Eds.), *Biofuel Technologies: Recent Developments*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34519-7>
- Hallenbeck, P. C. (2012). Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production. In P. C. Hallenbeck (Ed.), *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production* (Vol. 9781461412). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1208-3>
- Hilgartner, S. (2015). Biotechnology. In *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences* (pp. 676–682). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097086-8.85046-1>
- Hu, W.-S. (2017). Engineering Principles in Biotechnology. In *Engineering Principles in Biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119159056>

- Illanes, A. (2008). Enzyme Biocatalysis. In Andrés Illanes (Ed.), *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>
- Khan, F. A. (2018). Biotechnology Fundamentals. In *Biotechnology Fundamentals*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315370767>
- Khan, F. A. (2020). Biotechnology Fundamentals Third Edition. In *Biotechnology Fundamentals Third Edition*.
- King, D. J., Therapeutics, C., Slough, & UK. (1998). Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies. In *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4324/9780203211694>
- Kuddus, M. (2019). Enzymes in Food Biotechnology. In *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-04555-2>
- Lee, J. W. (2013). Advanced Biofuels and Bioproducts. In James W. Lee (Ed.), *Advanced Biofuels and Bioproducts* (Vol. 9781461433). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4>
- Liu, S. (2017). Chapter 7 – Enzymes. In *Bioprocess Engineering*.
- Luque, R., Campelo, J., & Clark, J. (2011). Handbook of biofuels production. In *Handbook of biofuels production*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857090492>
- McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). Practical Fermentation Technology. In B. McNeil & L. M. Harvey (Eds.), *Practical Fermentation Technology*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470725306>
- Shukla, P. (2020). *Microbial Enzymes and Biotechniques*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-6895-4>
- Barredo, J. L. (2005). *Microbial Enzymes and Biotransformations*. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1592598463>
- Thatoi, H. P. K. Das Mohapatra, S. Mohapatra, & K. C. Mondal. (2020). *Microbial Fermentation and Enzyme Technology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429061257>
- Mosier, N. S., & Ladisch, M. R. (2009). Modern Biotechnology:

- Connecting Innovations in Microbiology and Biochemistry to Engineering Fundamentals. In *John Wiley & Sons, Inc.* <https://doi.org/10.1002/9780470473412>
- Nair, A. J. (2007). Introduction to biotechnology and genetic engineering. In *Infinity Science Press LLC* (pp. 1–604).
- Neumann, K.-H., Kumar, A., & Imani, J. (2020). Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology. In *Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-49098-0>
- Nicholl, D. S. T. (2002). An Introduction to Genetic Engineering. In *An Introduction to Genetic Engineering*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CB09781139168205>
- Niemann, H., & Wrenzycki, C. (2018). Animal Biotechnology 2. In H. Niemann & C. Wrenzycki (Eds.), *Animal Biotechnology 2: Emerging Breeding Technologies*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-92348-2>
- Pandey, A., & Teixeira, J. A. C. (2016). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Foundations of Biotechnology and Bioengineering. *Focus on Catalysts*, 2016(7), 7. <https://doi.org/10.1016/j.focat.2016.06.049>
- Pandey, M., & Mahadevan, D. (2014). Monoclonal antibodies as therapeutics in human malignancies. In *Future Oncology* (Vol. 10, Issue 4). <https://doi.org/10.2217/fon.13.197>
- Pandey, S. (2010). Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1(2).
- Plant Biology and Biotechnology. (2015). In B. Bahadur, M. Venkat Rajam, L. Sahijram, & K. V. Krishnamurthy (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology*. Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6>
- Pogaku, R., & Hj. Sarbatly, R. (2013). Advances in Biofuels. In R. Pogaku & R. H. Sarbatly (Eds.), *Advances in Biofuels* (Vol. 9781461462). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6249-1>
- Principles of Fermentation Technology. (2017). In *Principles of Fermentation Technology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-00186-7>

- Punekar, N. S. (2018). ENZYMES : Catalysis , Kinetics and. In *Springer Nature Singapore Pte Ltd* (pp. 1–562). Springer Nature Singapore Pte Ltd.
- Ray, R. C., & Rosell, C. M. (2017). Microbial Enzyme Technology in Food Applications. In R. C. Ray & C. M. Rosell (Eds.), *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315368405>
- Reddy, M. V., Srikanth, S., Mohan, S. V., & Sarma, P. N. (2010). Phosphatase and dehydrogenase activities in anodic chamber of single chamber microbial fuel cell (MFC) at variable substrate loading conditions. *Bioelectrochemistry*, 77(2). <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.07.011>
- S.Behera, S., C.Ray, R., Das, U., K.Panda, S., & P.Saranraj. (2019). Essentials in Fermentation Technology. In *Learning Materials in Biosciences*.
- Sataloff, R. T., Johns, M. M., & Kost, K. M. (2009). Springer Handbook of Enzymes. In D. Schomburg (Ed.), *Springer Handbook of Enzymes* (2nd ed.). Springer-Verlag.
- Satya, P., & Sarkar, D. (2018). Plant Biotechnology and Crop Improvement. In *Biotechnology for Sustainable Agriculture* (pp. 93–140). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812160-3.00004-0>
- Satyanarayana, T., Prakash, A., & Johri, B. N. (2012). Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology. In T. Satyanarayana & B. N. Johri (Eds.), *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2214-9>
- Shang-Tian Yang. (2007). Bioprcessing for value-added product from renewable resources New Technologies and Applications. In Shang-Tian Yang (Ed.), *Elsevier Science & Technology* (Issue January). Elsevier Science & Technology.
- Shukla, P., & Pletschke, B. I. (2013). Advances in Enzyme Biotechnology. In P. Shukla & B. I. Pletschke (Eds.), *Advances in Enzyme Biotechnology*. Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1094-8>
- Smith, J. E. (2009). Biotechnology. In *Cambridge University Press* (5th ed.). Cambridge University Press.
- Srivastava, N., Mishra, P. K., Gupta, V. K., & Srivastava, M. (2020).

- Biofuel Production Technologies: Critical Analysis for Sustainability. In *Biofuel Production Technologies: Critical Analysis for Sustainability*.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2016). Principles of Fermentation Technology: Third Edition. In *Principles of Fermentation Technology: Third Edition*.
- Tang, W. C. (2019). Advanced Biotechnology. In *Engineering-Medicine* (pp. 201–218). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351012270-18>
- Vaishnav, P., & Demain, A. L. (2017). Industrial Biotechnology (Overview) ☆. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13064-X>
- Viele, B., Ellington, R., Wang, D., Park, Y., Higgins, R., & Coleman, H. D. (2020). Biotechnology for Biofuel Production. In *Biotechnology for Biofuel Production* (pp. 383–403). https://doi.org/10.1007/124_2020_39
- Vinet, L., & Zhedanov, A. (2018). Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. In *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>
- Viridis, B., Freguia, S., Rozendal, R. A., Rabaey, K., Yuan, Z., & Keller, J. (2011). Microbial Fuel Cells. In *Treatise on Water Science* (Vol. 4, pp. 641–665). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53199-5.00098-1>
- Vogel, A., & May, O. (2019). Industrial Enzyme Applications. In A. Vogel & O. May (Eds.), *Industrial Enzyme Applications*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527813780>
- Walker, J. M., & Rapley, R. (2002). Molecular Biology and Biotechnology. In *The Royal Society of Chemistry* (4th ed., pp. 1–563). The Royal Society of Chemistry.
- Whiteurst, R. J., & Law, B. A. (2002). Enzymes in food technology. In *CRC Press*. CRC Press. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000100020>

BIOGRAFI PENULIS



Hafsan. Wanita berkebangsaan Indonesia kelahiran Sabah, Malaysia pada tanggal 12 September 1981. Merupakan putri keenam dari delapan bersaudara yang dilahirkan dari pasangan bersuku bugis, Muhammad Sapile dan Hasnawiah. Penulis dianugerahi dengan tiga orang putra dan putri buah pernikahan dengan seorang putra bugis kelahiran Pangkep Sulawesi Selatan. Penulis menekuni ilmu murni biologi pada jenjang S1 di Fakultas MIPA Universitas Negeri Makassar pada tahun 2000-2004. Bantuan studi dari beasiswa BPPS diperoleh untuk melanjutkan studi ke jenjang S2 pada Program studi Pendidikan Biologi Program Pasca Sarjana Universitas Negeri Malang sejak tahun 2005 hingga 2007. Jenjang karir penulis dimulai sejak tahun 2004 pada jurusan Biologi Universitas Cokroaminoto sebagai dosen tetap yayasan dan terdaftar aktif hingga tahun 2010. Pada akhir tahun 2009 penulis mulai berkarir pula sebagai dosen tetap pada Jurusan Biologi Fakultas sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar hingga sekarang. Bidang ilmu yang ditekuni dalam darma pengajaran, penelitian, dan pengabdian kepada masyarakat serta publikasi ilmiah sejalan dengan matakuliah binaan yang diamanahkan yaitu Bioteknologi, dan lebih mengarah pada pemanfaatan enzim mikroba. Pada tahun 2018 penulis menyelesaikan studi S3 pada program Doktor Ilmu Pertanian di Universitas Hasanuddin, konsentrasi agrobioteknologi dan menyelesaikan disertasi dengan membahas pemanfaatan enzim mikroba dalam industri peternakan. Beberapa publikasi ilmiah baik pada tingkat nasional maupun internasional dapat diakses pada ID orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5821-0164>.



Zulkarnain, Pria kelahiran Ujung Pandang, 15 September 1988. Merupakan putra pertama dari empat bersaudara. Penulis memulai pendidikan pendidikan S1 pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar pada tahun 2007-2011 kemudian melanjutkan jenjang pendidikan S2 pada Prodi Ilmu Biomedik Konsentrasi Fisiologi

Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar pada tahun 2013-2015. Penulis memulai karir sebagai tenaga kependidikan (Laboran) pada Prodi Biologi sejak tahun 2012 hingga 2018 kemudian menjadi dosen tetap Non-PNS Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar pada tahun 2018. Pada tahun yang sama penulis lulus pada penerimaan CPNS 2018 sebagai dosen formasi Asisten Ahli Reproduksi dan Embriologi Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar. Sejak tahun 2020 penulis bergabung dengan tim dosen pada mata kuliah Bioteknologi bersama tiga dosen Bioteknologi lainnya. Saat ini juga penulis bergabung dalam bonggol keilmuan Zoologi yang ada di prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar. Profil publikasi dapat diakses pada laman: <https://scholar.google.com/citations?hl=id&user=j6tWkKOAAAAJ> dengan e-mail untuk korespondensi: zulkarnainbio@uin-alauddin.ac.id.



Hajrah, Tercatat sebagai Dosen tetap jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi pada Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar. Penulis Lahir di kabupaten pinrang 10 Oktober 1992, telah menyelesaikan pendidikan S1 jurusan Biologi di UIN Alauddin Makassar tahun 2014 dan S2 Biologi di UGM tahun 2017. Sebagai seorang tenaga pendidik penulis menekuni bidang Genetika molekular. Penulis memulai karir sebagai dosen luar biasa (LB) pada tahun 2017 dan lulus pada penerimaan CPNS tahun 2018 sebagai dosen bonggol keilmuan Genetika dan Molekuler. Sejak tahun 2020 penulis bergabung dengan tim dosen pada mata kuliah Bioteknologi bersama tiga dosen Bioteknologi lainnya. Profil publikasi dapat diakses pada laman: <https://scholar.google.com/citations?user=LrwROswAAAAJ&hl=id> dengan e-mail untuk korespondensi: hajrah.sukri@uin-alauddin.ac.id.



Kurnia Makmur. Lahir di Ujung Pandang pada tanggal 10 Oktober 1987. Merupakan anak ke dua dari tiga bersaudara. Penulis menyelesaikan Pendidikan jenjang S1 di Fakultas MIPA Universitas Negeri Makassar pada tahun 2008-2012. Bantuan studi dari beasiswa BPP-DN diperoleh untuk melanjutkan studi ke jenjang S2 pada program studi Biologi Tumbuhan program

pasca sarjana Departemen Biologi Institut Pertanian Bogor sejak tahun 2013 hingga tahun 2016. Saat ini penulis tercatat sebagai dosen tetap pada jurusan biologi fakultas sains dan teknologi UIN Alauddin Makassar hingga sekarang. Aktifitas tridrma perguruan tinggi difokuskan pada bidang botani molekuler. Beberapa publikasi ilmiah penulis dapat diakses pada laman: <https://scholar.google.com/citations?hl=id&user=uXykJ4IAAAAJ>

Buku ini mengenalkan pemahaman mengenai prinsip-prinsip sebagai kunci dasar dari berbagai aplikasi bioteknologi yang kini telah memasuki periode keemasan sejak dikembangkan dengan pendekatan baru bernuansa rekayasa genetika, yang telah membuka lebar pintu gerbang bagi perluasan produk dan jasa berbasis organisme yang melejit. Harapan terbesar atas terbitnya buku ini adalah melalui pemahaman yang utuh atas konsep dasar tersebut dapat menjadi pegangan dalam upaya mengimplementasikan wawasan tentang bioteknologi, misalnya ke arah pengembangan dan aplikasi bioteknologi dalam bidang pangan, pertanian, lingkungan, dan kesehatan dan lain-lainnya sehingga masa depan yang spektakuler pun terbentang luas.



Alauddin University Press

Alamat:

UPT Perpustakaan UIN Alauddin Makassar
Jl. H. M. Yasin Limpo No. 63
Romangpolong, Samata,
Kabupaten Gowa

ISBN 978-602-328-420-7

