

Nama : Brigitta Maharani

NIM : 1904604

UTS Kapita Selekt Biokimia

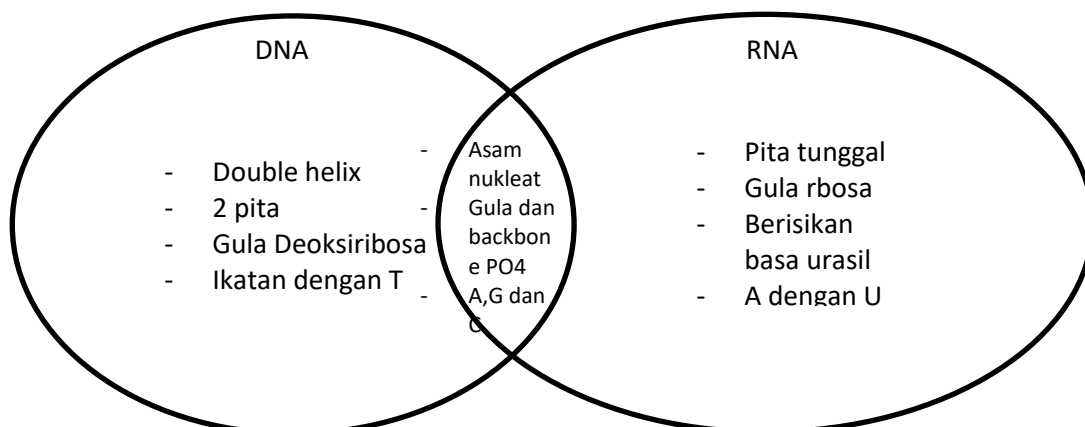
Jenjang Magister Kimia

1. Terdapat dua galur atau varietas bakteri yang menginfeksi tikus pada percobaan, yaitu galur kasar yang tidak berbahaya dan galur halus yang menyebabkan penyakit (patogenik). Galur halus memiliki kapsul pelindung polisakarida yang membuatnya tahan terhadap sistem kekebalan tubuh tikus sehingga mengakibatkan kematian tikus, sementara galur kasar tidak memiliki kapsul pelindung tersebut sehingga dapat dikalahkan dengan kekebalan tubuh dari tikus.

Pada percobaan nomor 3 digunakan galur halus yang dimatikan melalui pemanasan sehingga mengakibatkan tikus tetap hidup, artinya tidak berbahaya. Akan tetapi pada percobaan nomor 4, galur halus yang sudah dimatikan dengan panas kemudian dicampurkan dengan galur kasar yang tidak patogen sehingga menyebabkan tikus mati.

Hal ini dikarenakan masih ada senyawa aktif yang tidak rusak dengan pemanasan sehingga menyebabkan penyakit (*pneumonia*). Oleh karena itu, Griffith menyimpulkan bahwa molekul dari sel-sel galur halus yang mati secara genetika telah mentransformasi beberapa bakteri galur kasar yang hidup menjadi bakteri galur halus dan perubahan bakteri non patogen (galur kasar) menjadi bakteri patogen (galur halus) dikenal sebagai prinsip transformasi yang menunjukkan reproduksi bakteri memindahkan materi genetiknya dari satu bakteri ke bakteri lainnya. Frederick Griffith juga menyimpulkan bahwa DNA adalah molekul warisan. Dengan melakukan percobaan *Diplococcus pneumoniae* pada tikus, ternyata bakteri bisa diturunkan melalui gen.

-
2. Diagram venn DNA dan RNA:



3. Perbedaan ekspresi genetik pada organisme eukariot dan prokariot.

Level of Regulation	Bacteria	Eukaryotes
Chromatin remodeling	<ul style="list-style-type: none"> Limited packaging of DNA Remodeling not a major issue in regulating gene expression. 	<ul style="list-style-type: none"> Extensive packaging of DNA Chromatin must be decondensed for transcription to begin.
Transcription	<ul style="list-style-type: none"> Positive and negative control by regulatory proteins that act at sites close to the promoter Sigma interacts with promoter. 	<ul style="list-style-type: none"> Positive and negative control by regulatory proteins that act at sites close to and far from promoter Large set of basal transcription factors interact with promoter. Mediator required.
RNA processing	<ul style="list-style-type: none"> Rare 	<ul style="list-style-type: none"> Extensive processing: alternative splicing of introns
mRNA stability	<ul style="list-style-type: none"> Rarely used for control 	<ul style="list-style-type: none"> Commonly used: RNA interference limits life span or translation rate of many mRNAs.
Translation	<ul style="list-style-type: none"> Regulatory proteins bind to mRNAs and ribosomes and affect translation rate. 	<ul style="list-style-type: none"> Regulatory proteins bind to mRNAs and ribosomes and affect translation rate.
Post-translational modification	<ul style="list-style-type: none"> Folding by chaperone proteins Chemical modification (e.g., phosphorylation) changes protein activity. 	<ul style="list-style-type: none"> Folding by chaperone proteins Chemical modification (e.g., phosphorylation) changes protein activity. Ubiquitination targets proteins for destruction by proteasome.

Ekspresi gen jauh lebih rumit dalam sel eukariotik daripada sel prokariotik. Hal ini sebagian besar disebabkan oleh fakta bahwa sel eukariotik harus berdiferensiasi menjadi jenis sel yang berbeda, dan mereka juga mengandung lebih banyak gen daripada sel prokariotik. Diferensiasi sel inilah yang menyebabkan tidak semua DNA diekspresikan. Organisme eukariotik mengekspresikan subset DNA yang dikodekan dalam sel tertentu. Subset DNA menentukan ekspresi sel tertentu misalnya sel saraf, epitel, nefron, dsb. Ekspresi genetik eukariot diatur sedemikian rupa untuk mengekspresikan protein yang dibutuhkan. Beberapa faktor yang mempengaruhi regulasi ekspresi genetik yaitu proses metabolisme, faktor lingkungan, dan pembelahan sel.

4. Proses regulasi ekspresi genetik dimulai dari transkripsi sampai translasi. Pada DNA terjadi proses transkripsi, pada RNA terjadi modifikasi pada eukariot, kemudian RNA divariasikan menjadi protein.

DNA → pre-mRNA → Pembentukan matriks → Splice → mRNA → protein → protein fungsional

<p>Transkripsi</p> <p>Proses ini terjadi tingkat gen yang diatur oleh suatu protein yang menyebabkan meningkat atau menurunnya proses transkripsi. Terdapat 2 protein, yakni sebagai aktivator (meningkatkan transkripsi) dan represor (menghambat transkripsi/ inhibitor).</p> <p>Terjadi juga proses sintesis RNA dengan template gen-gen yang terdapat dalam untai DNA. Transkripsi dari setiap gen akan menghasilkan RNA untai tunggal yang seharusnya merupakan komplemen dari sekuens nukleotida. DNA template kemudian dibaca dari arah 3' → 5', sedangkan sintesis RNA berlangsung dari arah 5' → 3'</p>	<p>Contoh:</p> <p>Pada bakteri, terdapat gen yang diatur oleh satu promotor. gen ini disebut operon. Pada bakteri E.coli terdapat operon-Lac yang menghasilkan protein yang berperan dalam metabolisme laktosa.</p> <p>Contoh regulasi gen pada level transkripsi yaitu regulasi heat-shock genes pada Drosophila.</p>
---	--

<p>proses transkripsi ini juga terjadi dalam tiga tahap, yaitu inisiasi, elongasi, dan terminasi. Setelah terjadi transkripsi, DNA yang telah ditranskripsi menjadi pre-RNA dan setelahnya akan menjadi mRNA. Pada eukariot akan terjadi proses modifikasi RNA sebelum ditranslasikan menjadi protein.</p> <p>Pada transkripsi, protein mengatur genetika berikatan dengan DNA dan mengontrol laju transkripsi (Gene → mRNA)</p>	
<p>Translasi</p> <p>Proses ini terjadi di mRNA. Protein repressor translasi dapat berikatan dengan mRNA dan mencegah dimulainya translasi. Proses translasi terjadi 3 tahap juga, yaitu inisiasi, elongasi, dan terminasi.</p> <p>Inisiasi dimulai dengan ikatan antara sub unit kecil ribosom dengan untai mRNA (start kodon), kemudian muncul tRNA yang berisi asam amino dan antikodon di ujungnya. Anti kodon bersifat komplementer dengan kodon sehingga terbentuk ribosom subunit besar. Hal ini menyebabkan terbentuknya kompleks translasi.</p> <p>Tahap elongasi dimulai dengan ribosom sub unit besar yang terdiri dari 3 bagian (A, P, E) dimana bagian A akan masuk dan berikatan dengan tRNA yang membawa asam amino tertentu (bagian ujung tRNA ada antikodon yang sesuai dengan kodon mRNA). Bagian P merupakan asam amino yang saling menempel dari tRNA satu ke yang lain. Bagian E merupakan tRNA yang sudah tidak mengandung asam amino akan masuk ke bagian E kemudian keluar.</p> <p>Start kodon → bagian A → bagian P → bagian E</p> <p>proses elongasi terus berlangsung sampai tRNA berikatan dengan stop kodon dan terjadi terminasi. Pada stop kodon akan ada release factor yang berfungsi memerintah pelepasan dari polipeptida yang telah dibuat.</p> <p>Terminasi merupakan deretan asam amino baru</p>	<p>Contoh:</p> <p>Gen troponin T di otot, meskipun gennya hanya satu tetapi ketika translasi maka dapat menghasilkan 64 macam mRNA berbeda karena ketika splicing, pembuangan ekson dapat beranekaragam.</p> <p>Contoh:</p> <p>Gen kalsitonin yang mengandung lebih dari satu ekson dan setelah ditranskripsikan terjadi modifikasi pasca transkripsi sehingga menghasilkan gen kalsitonin yang berbeda karena eksonnya berbeda.</p>

yang akan membentuk polipeptida (protein).	
Post-translasi Penghambatan umpan balik dapat menyebabkan penghambatan pembentukan enzim. Modifikasi kovalen pada struktur protein juga dapat mengakibatkan perubahan fungsi protein.	Contoh: Fosforilasi protein adalah modifikasi posttranslational umum di mana bagian fosfat terikat secara kovalen dengan asam amino. Fosforilasi terjadi melalui aksi pengubah protein spesifik yang disebut kinase.

5. Kelenjar tiroid mengekskresikan thyroxine. Thyroxine ini menghambat hypothalamus dan anterior pituitary. Saat kelenjar tiroid diangkat, thyroxine tidak lagi dihasilkan sehingga hypothalamus dapat mengekskresikan TRH yang kemudian menginduksi anterior pituitary untuk menghasilkan TSH. Proses yang berkontribusi pada peningkatan TSH pada regulasi ekspresi genetik melalui umpan balik oleh hormon tiroksin yaitu proses berkurangnya inhibisi umpan balik negatif pada hipofisis. Kontrol umpan balik hormon tiroksin termasuk regulasi tingkat transkripsi pada RNA.

6. Contoh penggunaan DSC dalam menentukan karakteristik protein:

Jawab:

a. Pengertian DSC

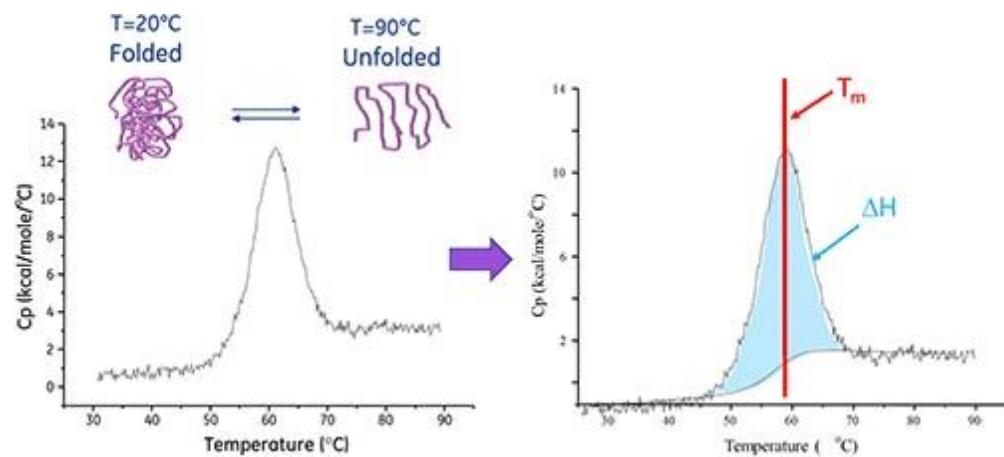
Differential Scanning Calorimetry (DSC) adalah teknik analisis yang digunakan untuk mengkarakterisasi stabilitas protein atau biomolekul lain secara langsung dalam bentuk aslinya. Ini dilakukan dengan mengukur perubahan panas yang terkait dengan denaturasi termal molekul ketika dipanaskan pada laju konstan.

b. Prinsip pengukuran

Biomolekul dalam larutan berada dalam kesetimbangan antara konformasi asli (terlipat) dan terdenaturasi (tidak terlipat). Semakin tinggi titik tengah transisi termal (T_m), semakin stabil molekul tersebut. DSC mengukur entalpi (ΔH) dari lipatan yang dihasilkan dari denaturasi akibat panas. Ini juga digunakan untuk menentukan perubahan kapasitas panas (ΔC_p) denaturasi. DSC dapat menjelaskan faktor-faktor yang berkontribusi pada pelipatan dan stabilitas biomolekul asli. Ini termasuk interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, entropi konformasi dan lingkungan fisik.

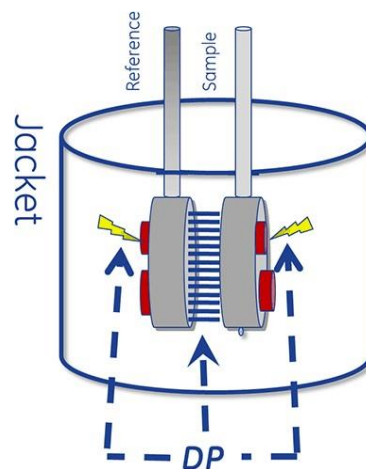
Data yang tepat dan berkualitas tinggi yang diperoleh dari DSC memberikan informasi penting tentang stabilitas protein dalam pengembangan proses, dan dalam perumusan kandidat terapi yang potensial.

Makromolekul dan rakitan makromolekul (>5000 Dalton), seperti protein, asam nukleat, dan lipid, dapat membentuk struktur yang terdefinisi dengan baik yang mengalami perubahan konformasi yang diinduksi secara termal. Penataan ulang struktural ini menghasilkan penyerapan panas yang disebabkan oleh redistribusi ikatan non-kovalen. Kalorimeter pemindaian diferensial mengukur serapan panas ini.



c. Cara Kerja DSC

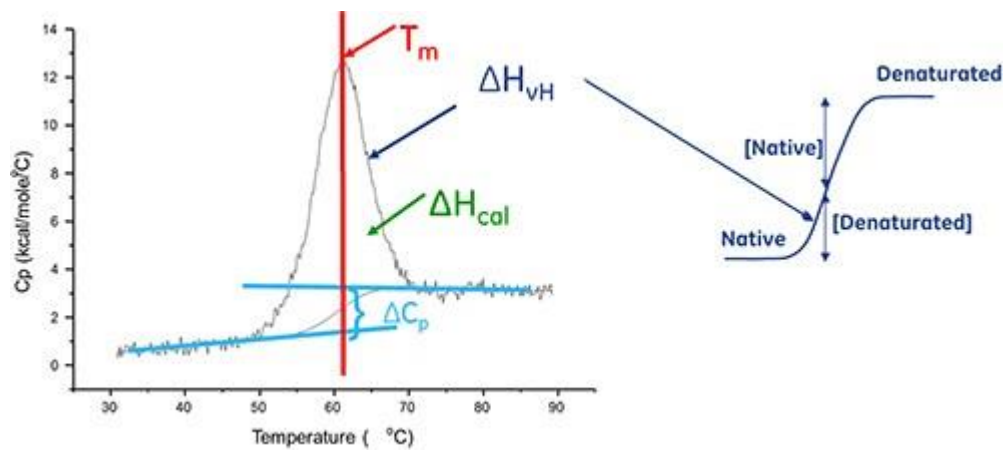
Inti termal dari sistem DSC terdiri dari dua sel, referensi dan sel sampel. Perangkat ini dirancang untuk menjaga kedua sel pada suhu yang sama, saat dipanaskan.



Untuk melakukan pengukuran DSC, sel referensi terlebih dahulu diisi dengan buffer dan sel sampel diisi dengan larutan sampel. Ini kemudian dipanaskan pada kecepatan pemindaian konstan. Penyerapan panas yang terjadi ketika protein terungkap menyebabkan perbedaan suhu (ΔT) antar sel, menghasilkan gradien termal melintasi unit Peltier. Ini mengatur tegangan, yang diubah menjadi daya dan digunakan untuk mengontrol Peltier untuk mengembalikan ΔT (perbedaan suhu) ke 0°C . Alternatifnya, sel dapat dibiarkan mencapai kesetimbangan termal secara pasif melalui konduksi.

d. Analisis Data DSC

Entalpi protein yang terbuka adalah area di bawah puncak DSC yang dinormalisasi konsentrasi dan memiliki satuan kalori (atau joule) per mol. Dalam kasus tertentu, model termodinamika dapat disesuaikan dengan data untuk memperoleh energi bebas Gibbs (ΔG), entalpi kalorimetrik (ΔH_{cal}), entalpi van't Hoff (ΔH_{vH}), entropi (ΔS) dan perubahan panas kapasitas (ΔC_p) terkait dengan transisi.

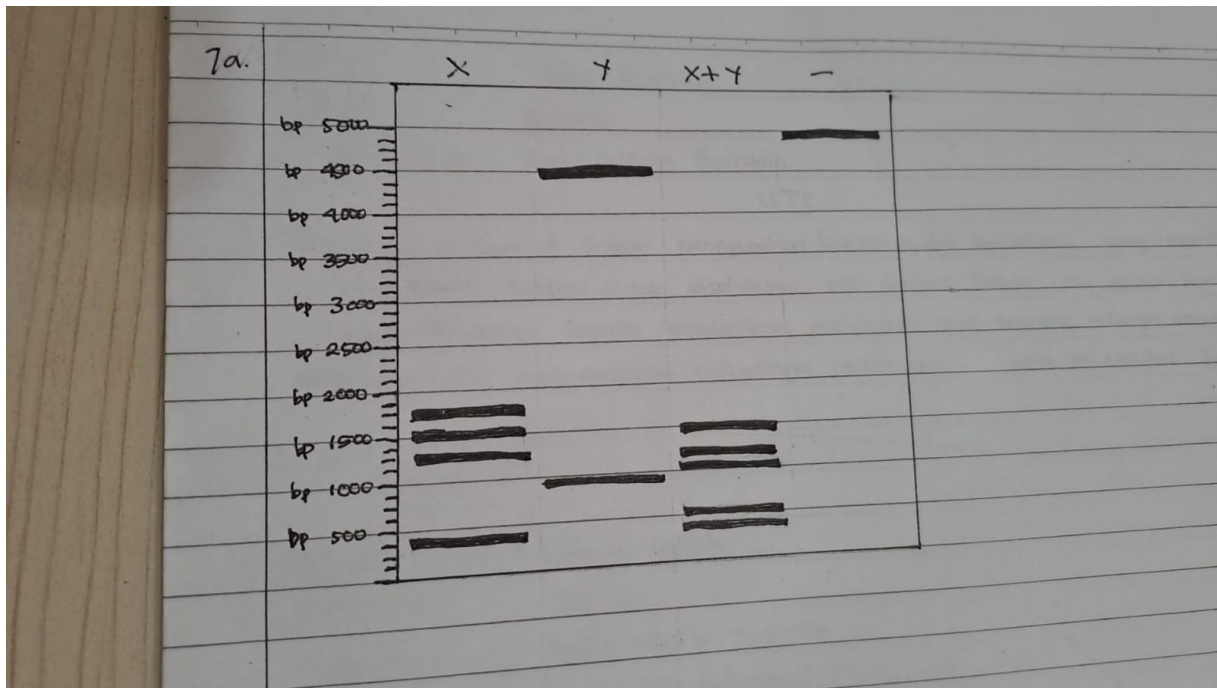


e. Contoh Penggunaan DSC pada karakteristik protein.

Sumber: Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F., & Varidi, M. J. (2015). Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(15), 3165-3176.

Pada artikel ini, DSC digunakan untuk pengukuran kalorimetri pada protein terisolasi biji *fenugreek* dan biji kedelai. Pada saat karakterisasi, penulis menggunakan panci tahan tekanan Al sebagai referensi pembanding nilai DSC yang didapat. Perbedaan serapan energi panas antara sampel dan sel referensi diperlukan untuk mempertahankan suhu yang sama, sesuai dengan perbedaan kapasitas panas yang tampak. Hasilnya terdapat dua suhu transisi untuk kedua isolat protein tersebut.

7. Pemotongan Enzim



MODIFIKASI GENETIK

- Jelaskan tahapan modifikasi genetic yang dilakukan oleh peneliti dalam memodifikasi organisme *Anabaena* sp. PCC7120 galur alami (wild type) untuk diubah menjadi galur mutan yang diharapkan.

Proses isolasi DNA yang akan dikombinasikan (DNA target) dan Teknik untuk memotong DNA (asing dan vektor, teknik untuk menggabungkan DNA (pembentukan DNA rekombinan):

Knock out vector gen *hglT* dibangun sebagai berikut. Fragmen DNA hulu dan hilir gen *hglT* diamplifikasi dengan PCR menggunakan pasangan primer Fw1 (ACTAGTGGATCCCCCTC-GACAAATCCGACG) dan

Rv1(GAATTCCTGCAGCCCGGGCGCAATGCGAAGCTTTG),

dan Fw2(TACCGTCGACCTCGATTGGTCAGCCTGTATG) dan Rv2

(CGGGCCCCCCTCGAAGTTITAGCCACAGTTC). Fragmen upstream dikloning ke situs *SmaI* pMobKm1 (lihat di bawah) oleh In-Fusion HD Cloning Kit dengan Cloning Enhancer (Takara Bio., Shiga Jepang), dan kemudian fragmen downstream dikloning ke situs *Apal* untuk membuat vektor knock out, pMK1 *hglTKO*.

pMobKm1 dibangun dengan fragmen DNA termasuk atau iVT dari pRL271 (diperoleh dari Dr. CP Wolk, Michigan State University) dan *SacB* dari pK18mob*SacB* (diperoleh dari Proyek BioResource Nasional Jepang). Gen resistensi kanamisin berasal dari pRL161 dan disubklon ke situs *HindIII* pBlue-script II SK+, kemudian diamplifikasi ulang dengan situs multi kloning dan diikat dengan oriVT dan *SacB* dengan sistem In-Fusion.

Teknik memasukkan DNA ke alam sel hidup (host/sel inang) sehingga DNA rekombinan dapat bereplikasi dan diekpresikan (Transformasi sel)

Plasmid dimasukkan ke dalam sel hidup menggunakan triparental mating yang dijelaskan oleh Elhai dan Wolk.

Seleksi sel rekombinan (transforman)

DNA genomik dari tipe liar dan transforman digunakan untuk genotipe sebagai templat untuk PCR dengan primer yang dijelaskan di bawah dan HybriPol DNA polimerase (Bioline). Konfirmasi gangguan gen berbasis PCR dilakukan menggunakan primer Fw1 dan Rv2 untuk amplifikasi hglT panjang penuh, Fw3 (CCGCITCCITTAGCAGC) dan Rv2 untuk penyisipan gen resistensi kanamisin ke dalam hglT, dan Fw1 dan Rv3 (ACTACTGGAGTACCAGAG) untuk deteksi penghapusan bagian tengah hglT.

- b. Jelaskan produk yang dihasilkan dan bagaimana produk tersebut dideteksi.

Hasil Produk: hglT null mutants (heterocyst glycolipid synthase) dari *Anabaena*

Deteksi Produk: Mikroskop, RT-PCR, spektrum absorbansi seluruh sel (spektrofotometer UV-VIS), Western blotting dan immunodetection, elektroforesis, pemisahan menggunakan GC dengan detektor flame ionization.