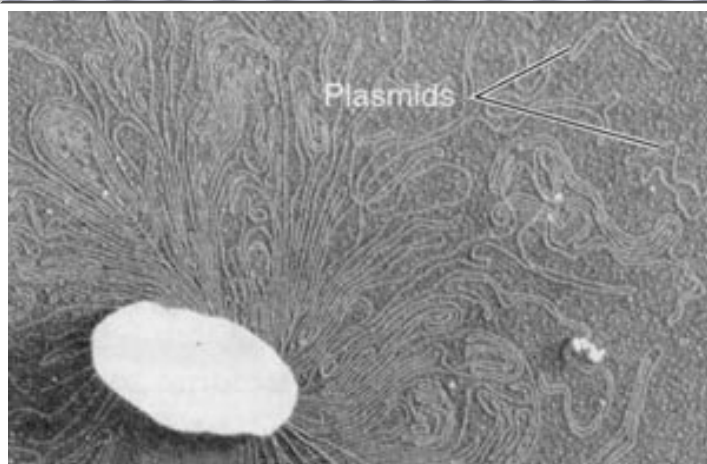
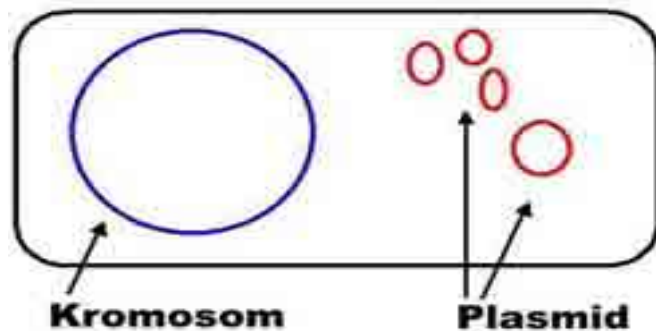


PLASMID

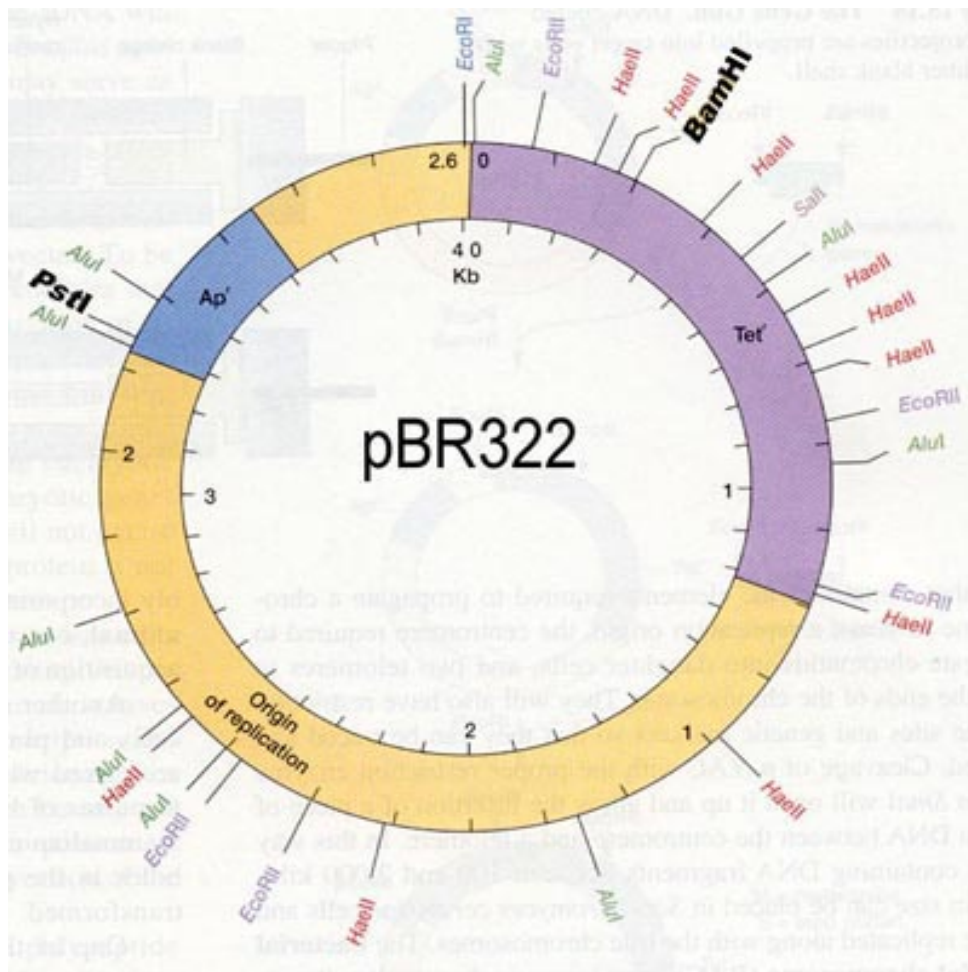
Disusun Oleh: [Aris Tjahjoleksono](#)



Pada umumnya bakteri mempunyai satu kromosom. Kromosom bakteri berupa DNA sirkular atau DNA yang berbentuk lingkaran. Disamping memiliki satu kromosom, berbagai jenis bakteri juga memiliki DNA sirkular lainnya yang ukurannya jauh lebih kecil dari pada DNA kromosomnya. DNA sirkuler selain kromosom yang terdapat pada bakteri dinamakan plasmid. Jadi, plasmid merupakan DNA bakteri yang terpisah dari kromosom bakteri. Plasmid dapat bereplikasi sendiri. Plasmid juga mengandung berbagai gen. Jenis, jumlah jenis, dan jumlah tiap jenis (*copy*) plasmid bervariasi antar sel. Bahkan antar sel dalam satu spesies bakteri.

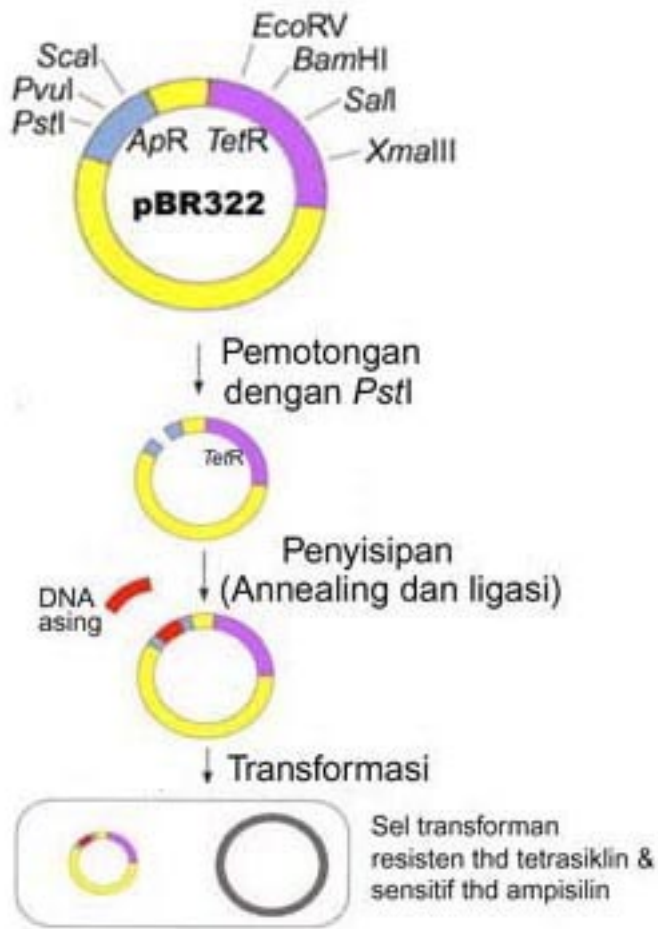


Plasmid mulai digunakan sebagai vektor untuk mengklonkan gen tidak lama setelah David Jackson, Robert Simon, dan Paul Berg berhasil membuat molekul DNA rekombinan itu pada tahun 1972. Dalam hal ini, plasmid digunakan sebagai pembawa fragmen DNA asing. Dengan kata lain, plasmid dikombinasikan dengan DNA asing. Plasmid rekombinan yang pertama kali berhasil bereplikasi di dalam sel bakteri adalah plasmid pSC101 yang telah dikonstruksi oleh Stanley Cohen dan Herbert Boyer (SC=Stanley Cohen).



Salah satu contoh plasmid yang telah lama digunakan sebagai vektor untuk mengklon gen adalah plasmid pBR322. Plasmid pBR322 ini mengandung gen penyandi resistensi terhadap ampisilin dan tetrasiklin. Pada gambar disamping ditunjukkan adanya berbagai situs yang dapat dipotong oleh enzim restriksi. Adanya gen resistensi terhadap antibiotik yang didalamnya mengandung situs enzim restriksi akan memberikan kemudahan dalam menyeleksi plasmid rekombinan atau memudahkan dalam menyeleksi klon bakteri yang telah membawa plasmid rekombinan. Akan lebih memudahkan lagi dengan adanya enzim yang hanya memotong pada bagian gen resistensi terhadap antibiotik. Misalnya, enzim *Pst*I yang hanya akan memotong pBR322 pada bagian gen resistensi terhadap ampisilin (gen *Ap^r*). Demikian pula dengan enzim *Bam*HI yang akan memotong plasmid pBR322 pada bagian gen resistensi terhadap tetrasiklin (gen *Tet^r*).

Beberapa tahap untuk mengklonkan gen atau fragmen DNA



Dari beberapa perangkat diatas (enzim restriksi, enzim DNA ligase, dan plasmid), telah memungkinkan bagi kita untuk mengklonkan gen atau fragmen DNA. Dalam hal ini, kita dapat membuat plasmid rekombinan (plasmid yang mengandung fragmen DNA asing) di dalam tabung reaksi. Bila dikombinasikan dengan salah satu cara bakteri memindahkan DNA, yaitu transformasi, kita dapat memasukkan plasmid rekombinan tersebut ke dalam sel bakteri.

Tahapan utama untuk mengklonkan gen atau fragmen DNA adalah sebagai berikut:

Pemotongan plasmid.

Menyisipkan gen atau fragmen DNA.

Memasukkan DNA kedalam sel bakteri (trasformasi).

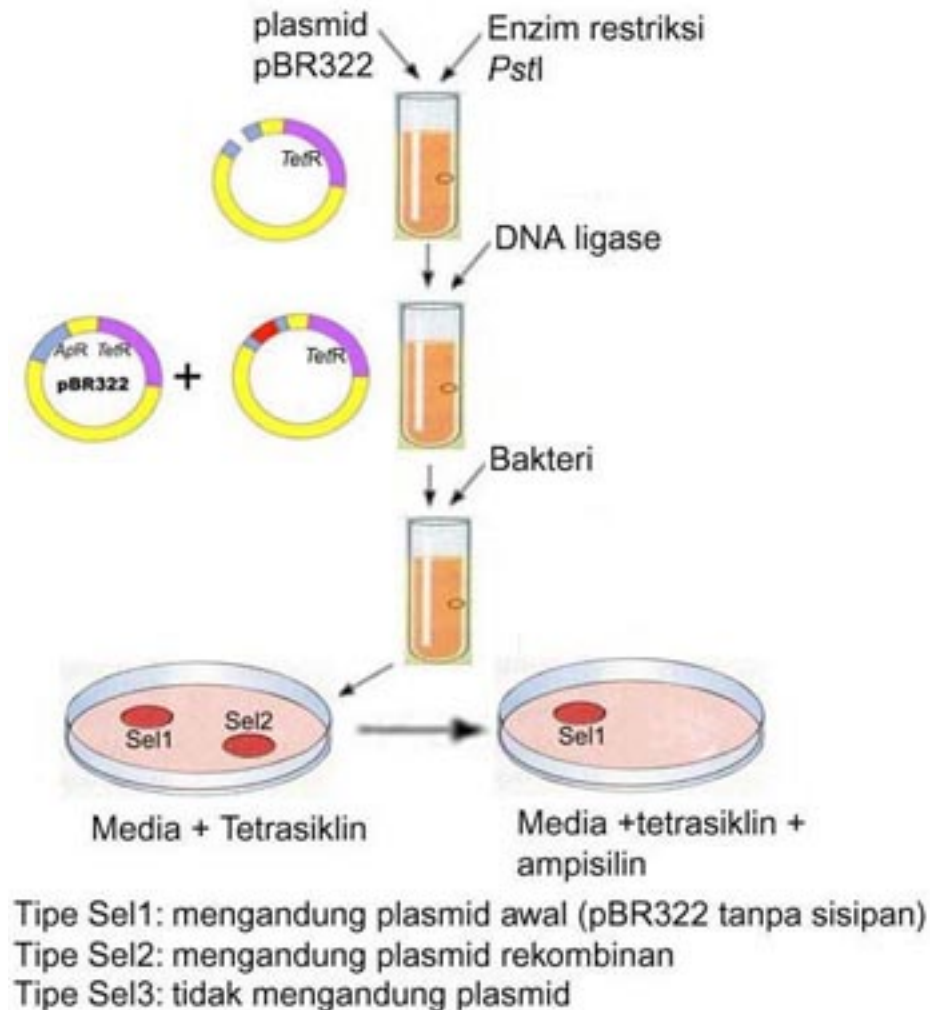
Seleksi klon bakteri yang benar yaitu bakteri yang mengandung plasmid rekombinan.

Pemotongan plasmid. Plasmid pBR322 dipotong di dalam tabung reaksi menggunakan enzim *Pst*I maka pBR322 akan terpotong pada bagian gen *ApR*.

Menyisipkan gen atau fragmen DNA. Bila pBR322 yang sudah terbuka lingkarannya dicampur dengan potongan DNA asing dan kemudian ditambahkan enzim DNA ligase, maka kemungkinan hasilnya adalah berupa campuran yang berisi: 1) plasmid pBR322 yang tersambung kembali atau membentuk lingkaran lagi seperti semula, dan 2) plasmid rekombinan yaitu pBR322 yang telah disisipi oleh DNA asing.

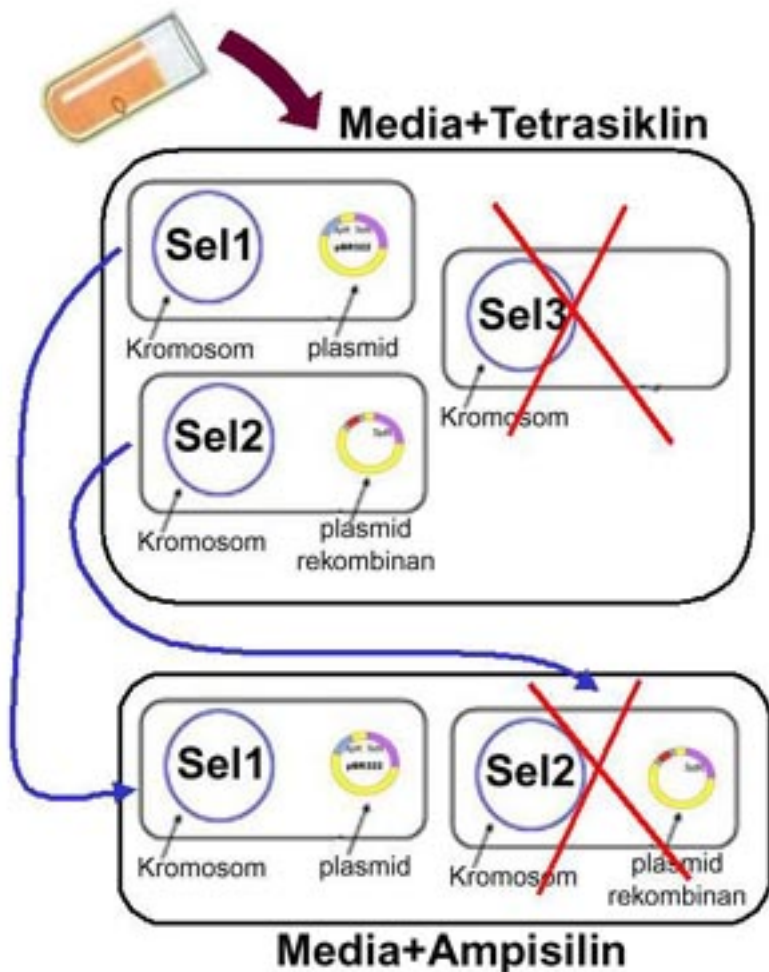
Memasukkan DNA kedalam sel bakteri

(Trasformasi). Campuran kedua bentuk plasmid ini kemudian dicampurkan dengan kumpulan sel bakteri hidup yang tidak mempunyai plasmid. Kemungkinan hasilnya berupa campuran yang berisi: 1) sel bakteri yang mengandung plasmid pBR322 tanpa sisipan, 2) sel yang mendapatkan plasmid rekombinan (pBR322 yang telah disisipi DNA asing), 3) sel bakteri yang tidak mengandung (tidak dimasuki) plasmid.



Seleksi klon bakteri yang mengandung plasmid rekombinan.

A. Seleksi menggunakan antibiotik



Beberapa cara telah dapat digunakan untuk menyeleksi klon bakteri yang benar yaitu klon bakteri yang membawa plasmid rekombinan. Salah satu cara untuk menyeleksi klon yang benar adalah dengan menggunakan media tumbuh yang mengandung antibiotik.

Cairan suspensi dalam pekerjaan transformasi (campuran antara bakteri, plasmid, dan DNA asing yang telah diperlakukan dalam rangka transformasi) disebarkan pada media yang mengandung tetrasiklin. Koloni bakteri yang tumbuh adalah koloni Sel1 dan koloni Sel2 (koloni adalah kumpulan sel yang sama yang semula berasal dari satu sel). Sel bakteri yang tidak mengandung plasmid tidak mampu tumbuh. Masing-masing koloni yang tumbuh pada media+tetrasiklin kemudian dipindahkan pada media+ampisilin. Koloni yang tidak tumbuh pada media+ampisilin adalah koloni yang diinginkan (sel-sel bakterinya mengandung plasmid rekombinan).

B. Seleksi berdasarkan aktivitas enzim β -galactosidase

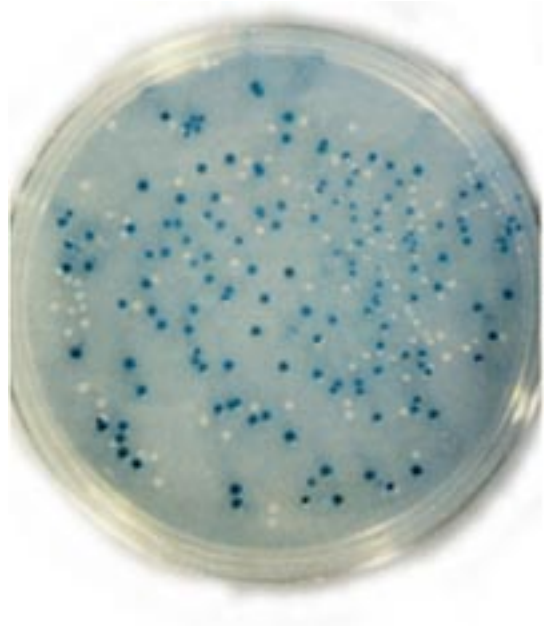


Contoh plasmid lainnya yang telah lama digunakan sebagai vektor untuk mengklonkan gen adalah plasmid pUC118 dan pUC119. Plasmid ini merupakan pengembangan dari pBR322. Plasmid pUC118 dan pUC119 mengandung gen *lacZ* yang menyandikan enzim β -galactosidase.

Enzim β -galactosidase akan memecah Xgal menjadi galaktosa dan 5-bromo-4-chloroindigo (biru). Oleh karena itu koloni bakteri yang mengandung plasmid pUC118 atau pUC119 akan berwarna biru bila ditumbuhkan pada media yang mengandung Xgal.

Pada *lacZ* terdapat daerah yang disebut daerah polikloning. Pada daerah polikloning ini terdapat banyak situs restriksi dari berbagai enzim restriksi. Dalam hal ini, kita dapat menggunakan berbagai enzim restriksi untuk memotong pUC118 atau pUC119 pada bagian *lacZ*. Dengan demikian kita dapat menyisipkan DNA asing pada bagian *lacZ*. Bila gen *lacZ* disisipi oleh DNA asing maka gen *lacZ* tersebut tidak berfungsi (tidak menghasilkan β -galactosidase).

Contoh seleksi koloni bakteri rekombinan dengan menggunakan Xgal



Bila kita menggunakan pUC118 atau pUC119 sebagai plasmid vektor, maka koloni yang membawa plasmid rekombinan dapat dideteksi dengan menggunakan media tumbuh yang mengandung Xgal (5-bromo-4-chloro-indolyl-b-D-galactoside).

Koloni bakteri yang mengandung plasmid pUC118 atau pUC119 akan berwarna biru karena ada gen *lacZ* yang menghasilkan β -galactosidase. Enzim β -galactosidase memecah Xgal menjadi galaktosa dan 5-bromo-4-chloroindigo yang berwarna biru.

Koloni bakteri akan berwarna putih bila pUC118 atau pUC119 telah disisipi DNA asing pada bagian *lacZ*. Dalam hal ini gen *lacZ* tidak berfungsi karena disisipi DNA asing. Jadi, koloni yang mengandung plasmid rekombinan adalah koloni yang berwarna putih.

[Home](#) --- [Glossary](#) --- [Reproduksi Sel](#) --- [Hereditas](#) --- [Struktur Gen](#) --- [Regulasi Ekspresi Gen](#) --- [Teknologi DNA](#) --- [Genom Manusia](#)

Disusun Oleh: [Aris Tjahjoleksono](#)