

Teknologi DNA Rekombinan

Oleh: [Aris Tjahjoleksono](#)

Jurusan Biologi FMIPA, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Baranangsiang, Jalan Raya Pajajaran. Bogor
Tel/Fax: (0251) 345011. E-mail: aristj@telkom.net

Sejak jaman dahulu kala, nenek moyang kita telah mengenal beraneka ragam mahluk hidup. Beragamnya mahluk hidup memberikan kemungkinan bagi manusia untuk memilih sesuai dengan yang dikehendaknya. Keanekaragaman ini sudah dapat kita lihat pada salah satu jenis mahluk hidup saja, misalnya padi. Kita mengenal berbagai macam padi yang berbeda-beda sifatnya. Ada padi yang umurnya panennya pendek, ada pula yang umur panennya panjang, ada padi yang bijinya wangi dan ada pula yang tidak wangi, ada padi yang batangnya pendek dan ada pula padi yang batangnya panjang, ada padi yang berasnya pulen dan ada pula yang berasnya keras (tidak pulen). padikehidupan kita sehari-hari, secara langsung maupun tidak langsung, sebagian dari kita pernah berhubungan dengan hasil penggunaan teknologi DNA Rekombinan.

Tidak puas dengan memilih kombinasi sifat yang sudah ada di alam, manusia melakukan usaha untuk membuat kombinasi baru dari sifat-sifat yang diinginkan. Cara klasik yang telah dilakukan oleh para pendahulu kita untuk mendapatkan kombinasi sifat yang diinginkan adalah dengan melakukan persilangan (breeding). Para ahli pemuliaan tanaman telah melakukan persilangan-persilangan untuk menghasilkan berbagai jenis ternak dan berbagai jenis tanaman yang memiliki kombinasi sifat-sifat unggul. Untuk dapat menghasilkan ternak atau tanaman unggul dengan cara breeding ini dibutuhkan waktu yang lama dan lahan yang tidak sedikit. Persilangan tersebut menghasilkan organisme hibrid. Organisme hasil persilangan (hibrid) mempunyai genom yang berbeda dengan kedua tetua sebelumnya. Jadi, persilangan (breeding) merupakan salah satu cara untuk merubah genom suatu organisme.

Mungkin sebagian dari anda bisa melihat tanaman jagung hibrida. Berbagai jagung hibrida telah diproduksi di berbagai wilayah negeri kita. Mungkin juga sebagian dari anda dapat melihat tanaman anggrek yang bunganya berwarna warni. Sebagian dari tanaman anggrek tersebut merupakan hasil persilangan antar varietas dalam satu spesies, atau hasil persilangan antar spesies, dan bahkan mungkin merupakan hasil persilangan antar genus.

Dengan telah ditemukannya **DNA sebagai bahan gen**, manusia pun berupaya untuk mendapatkan kombinasi sifat-sifat baru suatu makhluk hidup dengan cara melakukan perubahan langsung pada DNA genomnya. Usaha untuk mengubah DNA genom secara langsung ini disebut dengan istilah Rekayasa Genetika atau Genetic Engineering. Dalam upaya melakukan rekayasa genetika, manusia menggunakan teknologi DNA rekombinan.

Apakah Teknologi DNA Rekombinan itu ?

Teknologi DNA Rekombinan merupakan kumpulan teknik atau metoda yang digunakan untuk mengkombinasikan gen-gen di dalam tabung reaksi. Teknik-teknik tersebut meliputi:

- Teknik untuk mengisolasi DNA.
- Teknik untuk memotong DNA.
- Teknik untuk menggabung atau menyambung DNA.
- Teknik untuk memasukkan DNA ke dalam sel hidup.

Kumpulan teknik-teknik atau metoda-metoda yang telah dikembangkan oleh para ilmuwan telah memungkinkan bagi kita untuk: mengisolasi DNA dari berbagai organisme, menggabungkan DNA yang berasal dari organisme yang berbeda sehingga terbentuk kombinasi DNA (DNA rekombinan), memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel organisme prokariot maupun eukariot hingga DNA rekombinan tersebut dapat bereplikasi dan bahkan dapat diekspresikan.

Teknologi DNA Rekombinan telah memberikan banyak manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan maupun bagi kehidupan manusia sehari-hari. Beberapa jenis obat-obatan, vaksin, bahan pangan, bahan pakaian dan lainnya telah diproduksi dengan memanfaatkan teknologi DNA Rekombinan.

Dalam kehidupan kita sehari-hari, secara langsung maupun tidak langsung, sebagian dari kita pernah berhubungan dengan hasil penggunaan teknologi DNA Rekombinan. Contoh: insulin telah digunakan untuk mengobati penyakit diabetes. Penyakit diabetes pada manusia diobati dengan insulin manusia. Bagaimanakah kita dapat memperoleh insulin manusia ini ?. Apakah untuk mengobati orang yang sakit diabetes ini kita harus mengorbankan orang yang sehat untuk diekstrak insulinnya ?. Tentu saja tidak. Saat ini insulin manusia telah berhasil diproduksi secara massal dengan menggunakan bakteri. Kemampuan bakteri untuk memproduksi insulin manusia ini adalah karena manusia telah berhasil memasukkan dan mengintegrasikan gen yang menyandikan insulin manusia kedalam genom bakteri.

Contoh lainnya adalah kapas transgenik. **Kapas transgenik** pernah ramai dibicarakan di media masa kita pada awal abad 21 ini. Salah satu kapas transgenik adalah kapas-bt. Tanaman kapas-bt telah mengandung gen penyandi toksin yang berasal dari bakteri *Bacillus turingiensis* (Bt). Toksin tersebut dapat membunuh hama kapas sehingga kapas-bt tersebut tahan terhadap serangan hama. Tanaman kapas ini tahan terhadap serangan hama (ulat) karena tanaman ini menghasilkan toksin yang dapat membunuh hamanya (ulat). Toksin tersebut disandikan oleh gen yang berasal dari bakteri *Bacillus turingiensis*

Genom tanaman kapas ini mengandung gen yang berasal dari bakteri *Bacillus turingiensis*. Oleh karena itu, tanaman kapas ini seringkali disebut sebagai kapas-Bt (Bt = *Bacillus turingiensis*). Kapas-bt merupakan salah satu contoh organisme transgenik. Organisme transgenik adalah organisme yang mengandung gen yang berasal dari jenis organisme lainnya. Oleh karena tanaman kapas ini mengandung gen yang asalnya dari organisme lainnya, maka kapas ini secara umum disebut tanaman kapas transgenik.

Bakteri penghasil insulin dan tanaman kapas-bt tersebut merupakan sebagian dari hasil rekayasa yang dilakukan manusia terhadap makhluk hidup dengan menggunakan teknologi DNA rekombinan.

Teknologi DNA rekombinan berdasarkan pada mekanisme yang terdapat pada bakteri. [Hasil Percobaan Lederberg dan Tatum \(1946\)](#) menunjukkan bahwa bakteri mempunyai mekanisme seksual. Mekanisme seksual pada bakteri ini menyebabkan terbentuknya kombinasi gen-gen yang berasal dari dua sel yang berbeda. Mekanisme seksual pada bakteri ini merupakan pertukaran DNA atau gen dari satu sel ke sel lainnya. Jadi mekanisme seksual pada bakteri ini tidak bersifat reproduktif (tidak menghasilkan anak atau zuriat).

Transfer DNA atau perpindahan DNA ke dalam bakteri dapat melalui tiga cara yaitu konjugasi, transformasi, dan transduksi. DNA yang masuk ke dalam sel bakteri selanjutnya dapat berintegrasi dengan DNA atau kromosom bakteri sehingga terbentuk [kromosom rekombinan](#).

[Konjugasi](#) merupakan perpindahan DNA dari satu sel (sel donor) ke dalam sel bakteri lainnya (sel resipien) melalui kontak fisik antara kedua sel. Sel donor (sel jantan) memasukkan sebagian DNA-nya ke dalam sel resipien (sel betina). Transfer DNA ini melalui pili seks yang dimiliki oleh sel jantan. Sel betina tidak memiliki pili seks. DNA dari sel jantan berpindah ke dalam sel betina secara replikatif. Oleh karena itu, setelah proses konjugasi selesai, sel jantan tidak kehilangan DNA. Setelah konjugasi selesai kedua sel berpisah kembali dan jumlah sel tidak bertambah (setelah konjugasi tidak dihasilkan anak sel). Oleh karena itu, proses konjugasi ini disebut juga sebagai proses atau mekanisme seksual yang tidak reproduktif.

[Transformasi](#) merupakan pengambilan DNA oleh bakteri dari lingkungan di sekelilingnya. DNA yang berada di sekitar bakteri (DNA asing) dapat berupa potongan DNA atau fragmen DNA yang berasal dari sel bakteri lainnya atau dari organisme lainnya. Masuknya DNA dari lingkungan ke dalam sel bakteri ini dapat terjadi secara alami. Fenomena transformasi ini telah diamati oleh Griffith (1928) dan kelompok Avery (1944). Griffith (1928) telah menemukan bahwa strain bakteri yang tidak virulen (strain yang penampilan koloninya kasar) dapat berubah sifatnya menjadi strain yang virulen (penampilan koloninya halus). Perubahan sifat ini disebabkan karena strain yang tidak virulen (strain kasar) dicampur dengan sel-sel bakteri strain virulen (strain halus) yang telah dimatikan.

Avery, McCleod, dan McCarty (1944) menemukan bahwa perubahan sifat atau transformasi dari bakteri kasar menjadi menjadi bakteri halus atau perubahan dari tidak virulen menjadi virulen tersebut disebabkan oleh adanya DNA dari sel bakteri halus yang masuk ke dalam sel bakteri kasar. Berdasarkan pada mekanisme transformasi alami ini, kita dapat melakukan transformasi bakteri secara buatan. Dengan perlakuan tertentu, kita dapat memasukkan potongan DNA ke dalam sel bakteri. Prinsipnya sederhana yaitu mencampurkan sel-sel bakteri hidup dengan potongan DNA tertentu di dalam tabung reaksi. Beberapa waktu kemudian kita dapat menyeleksi sel-sel bakteri yang sudah mengandung potongan DNA tertentu tersebut.

Transduksi adalah cara pemindahan DNA dari satu sel ke dalam sel lainnya melalui perantara fage. Beberapa jenis virus berkembang biak di dalam sel bakteri. Virus-virus yang inangnya adalah bakteri seringkali disebut bakteriofage atau fage. Pada waktu fage menginfeksi bakteri, fage memasukkan DNA-nya ke dalam bakteri. DNA fage ini kemudian bereplikasi di dalam sel bakteri atau berintegrasi dengan kromosom bakteri (ingat siklus hidup fage: siklus litik dan siklus lisogenik). Pada waktu DNA fage dikemas di dalam pembungkusnya untuk membentuk partikel fage-fage baru, DNA fage tersebut dapat membawa sebagian dari DNA bakteri yang telah menjadi inangnya. Selanjutnya bila fage menginfeksi bakteri lainnya, maka fage akan memasukkan DNA-nya yang mengandung sebagian dari DNA bakteri inangnya yang sebelumnya. Dengan demikian, fage tidak hanya memasukkan DNA-nya sendiri ke dalam sel bakteri yang diserangnya tetapi juga memasukkan DNA dari sel bakteri lainnya yang ikut terbawa pada DNA fage. Jadi, secara alami fage memindahkan DNA dari satu sel bakteri ke sel bakteri lainnya.

Perangkat yang digunakan dalam teknologi DNA rekombinan adalah perangkat-perangkat yang ada pada bakteri. Perangkat tersebut antara lain adalah: enzim restriksi, enzim DNA ligase, plasmid, transposon, pustaka genom, enzim transkripsi balik, pelacak DNA/RNA.

Enzim restriksi digunakan untuk memotong DNA. Pada tahun 1960, Werner Arber & Hamilton Smith menemukan enzim dari mikroba yang dapat memotong DNA utas ganda. Enzim tersebut sekarang dikenal dengan nama enzim restriksi atau endonuklease restriksi. Enzim tersebut mengenal dan memotong DNA pada sekuens spesifik yang panjangnya 4 sampai dengan 6 pasang basa. Enzim tersebut sekarang dikenal dengan nama enzim restriksi atau enzim endonuklease restriksi. Secara alami, bakteri menghasilkan enzim restriksi untuk menghancurkan DNA fage yang menginfeksi (yang masuk ke dalam sel bakteri). Sampai saat ini sudah banyak jenis enzim restriksi yang telah ditemukan dan diisolasi dari berbagai spesies bakteri. Nama setiap enzim restriksi diawali dengan tiga huruf yang menyatakan nama bakteri yang menghasilkan enzim tersebut. Setiap enzim restriksi mengenal sekuens dan situs pemotongan yang khas. Enzim restriksi memotong DNA bukan pada sembarang tempat, tetapi memotong DNA pada bagian tertentu. Bagian pada DNA yang dikenai aksi pemotongan oleh enzim restriksi ini dinamakan sekuens pengenalan. Suatu sekuens pengenalan adalah urutan nukleotida (urutan basa) tertentu yang dikenal oleh enzim restriksi sebagai tempat atau bagian yang akan dipotongnya. Salah satu contoh enzim restriksi ini adalah enzim *EcoRI* yang telah diisolasi pertama kali oleh Herbert Boyer pada tahun 1969 dari bakteri *Escherichia coli*. Enzim *EcoRI* memotong DNA pada bagian yang urutannya adalah GAATTC (sekuens pengenalan bagi *EcoRI* adalah GAATTC). Di dalam sekuens pengenalan tersebut, enzim *EcoRI* memotongnya tidak pada sembarang situs tetapi hanya memotong pada bagian atau situs antara G dan A. Pada DNA utas ganda, sekuens GAATTC ini akan berpasangan dengan sekuens yang sama tetapi berlawanan arah. Enzim *EcoRI* ini memotong setiap utas dari utas ganda tersebut pada bagian antara G dan A. Sebagai akibatnya, potongan-potongan atau fragmen-fragmen DNA utas ganda yang dihasilkan akan memiliki ujung berutas tunggal. Ujung seperti ini yang dikenal dengan istilah *sticky ends* atau *cohesive ends*.

Enzim DNA ligase digunakan untuk menyambung DNA. Pada tahun 1972, David Jackson, Robert Simon, dan Paul Berg melaporkan bahwa mereka berhasil membuat molekul DNA rekombinan. Mereka berhasil menggabungkan fragmen-fragmen DNA dengan cara memasang (anneal) ujung *sticky ends* dari satu fragmen dengan ujung *sticky ends* fragmen lainnya, kemudian menyambungkan kedua ujung fragmen-fragmen tersebut secara kovalen dengan menggunakan enzim DNA ligase. Keberhasilan membuat DNA rekombinan ini terjadi tidak lama setelah enzim restriksi ditemukan dan diisolasi pertama kali dari *E.coli* oleh Herbert Boyer yaitu pada tahun 1969 .

Plasmid digunakan sebagai vektor untuk mengklonkan gen atau mengklonkan fragmen DNA atau mengubah sifat bakteri. 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 plamid rekombinan atau memudahkan dalam menyeleksi klon bakteri yang telah membawa plamid rekombinan. Akan lebih memudahkan lagi dengan adanya enzim yang hanya memotong pada bagian gen resistensi terhadap antibiotik. Misalnya, enzim *PstI* yang hanya akan memotong pBR322 pada bagian gen resistensi terhadap ampisilin (gen *ApR*).

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

Tahapan dalam mengklonkan gen meliputi: pemotongan plamid, menyisipkan gen atau fragmen DNA, memasukkan DNA kedalam sel bakteri (trasformasi), seleksi klon bakteri yang benar yaitu bakteri yang mengandung plamid rekombinan.

Pemotongan plamid. Plamid pBR322 dipotong di dalam tabung reaksi menggunakan enzim restriksi *PstI* maka pBR322 akan terpotong atau terbuka 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) plamid pBR322 yang tersambung kembali atau membentuk lingkaran lagi seperti semula,
- 2) plamid 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-sel bakteri hidup yang tidak mempunyai plasmid. Kemungkinan hasilnya berupa campuran yang berisi:

- 1) sel bakteri yang mendapatkan 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 benar yaitu bakteri yang mengandung plasmid rekombinan. Dalam contoh ini, seleksi dilakukan dengan menggunakan media tumbuh bakteri yang mengandung antibiotik. Sel yang tidak mengandung plasmid tidak akan tumbuh pada media yang mengandung ampisilin maupun tetrasiklin. Sel bakteri yang mengandung plasmid tanpa sisipan (pBR322 semula) tumbuh pada media yang mengandung tetrasiklin maupun ampisilin. Sel bakteri yang mengandung plasmid rekombinan tumbuh pada media yang mengandung tetrasiklin tetapi tidak tumbuh pada media yang mengandung ampisilin karena gen *ApR* disisipi DNA asing sehingga tidak berfungsi. Dalam teknis pelaksanaannya, 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).

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. 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). Bila kita menggunakan pUC188 atau pUC119 sebagai plasmid vektor, maka koloni yang membawa plasmid rekombinan dapat dideteksi dengan menggunakan Xgal (5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactosida). Enzim β -galactosidase akan memecah Xgal menjadi galatosa dan 5-bromo-4-chloroindigo berwarna biru.

Koloni bakteri yang mengandung plasmid pUC118 atau pUC119 akan berwarna biru bila ditumbuhkan pada media yang mengandung Xgal. Hal ini karena bakteri menghasilkan enzim β -galactosidase. Oleh karena mediana mengandung Xgal maka enzim β -galactosidase memecahkan Xgal sehingga dihasilkan 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 sel bakteri tidak menghasilkan enzim β -galactosidase karena gen *lacZ*. Gen *lacZ* tidak berfungsi karena disisipi oleh DNA asing.

Transposon digunakan sebagai alat untuk melakukan mutagenesis dan untuk menyisipkan penanda. Keberhasilan para ahli dalam melakukan rekayasa genetika terhadap berbagai organisme tidak lepas dari peranan transposon. Transposon atau elemen loncat mula-mula ditemukan oleh Barbara McClintock. Untuk sampai pada penemuan tentang adanya transposon, Barbara McClintock mempelajari penyebab terjadinya variasi warna biji jagung. Seperti yang pernah anda pelajari sebelumnya bahwa biji jagung terbentuk sebagai hasil dari pembuahan ganda (dua pembuahan). Satu pembuahan menghasilkan zigot yang kemudian berkembang menjadi embrio yang tersimpan dalam biji jagung. Satu pembuahan lainnya menghasilkan endosperma. Endosperma inilah yang kita lihat penampilmannya (yang nampak sebagai biji jagung). Endosperma ini merupakan bagian terbesar dari biji dan merupakan bagian penyimpan makanan. Endosperma inilah yang kita gunakan kandungan karbohidratnya untuk makanan kita maupun makanan ternak.

Oleh karena endosperma ini awalnya berasal dari satu sel (sel triploid yang merupakan hasil peleburan antara satu inti sel sperma dengan dua inti sel kutub) yang kemudian membelah secara mitosis. Oleh karena itu seharusnya endosperma tersebut merupakan kumpulan sel yang sama sifatnya. Bila kumpulan sel endosperma warnanya sama maka setiap titik pada permukaan setiap biji jagung itu warnanya sama atau seragam. Bila berwarna putih, maka seluruh permukaan biji jagung (endospermanya) berwarna putih. Atau bila kuning, maka seluruh permukaan biji jagung (endospermanya) berwarna kuning. Oleh karena itu, anda apat menemukan di pasar atau di penjual sayur keliling, jagung yang setiap bijinya berwarna kuning atau putih.

Barbara McClintock mempelajari mengapa ada biji jagung yang warnanya tidak seragam sehingga nampak kuning dengan bercak-bercak coklat. Pola bercaknya tidak teratur. Biji yang satu dengan biji lainnya juga berbeda pola bercaknya. Dengan melakukan persilangan-persilangan antar tanaman jagung yang berbeda warna bijinya, akhirnya Barbara McClintock menemukan bahwa ketidak-seragaman atau variasi warna biji jagung disebabkan oleh adanya bagian dari kromosom yang berpindah-pindah. Bagian dari kromosom tersebut pindah dari satu tempat ke tempat lain pada kromosom yang sama atau pindah dari satu kromosom ke kromosom lainnya. Bagian dari kromosom yang dapat berpindah tempat tersebut dinamakan transposon.

Jadi, transposon adalah DNA yang dengan sendirinya dapat berpindah-pindah tempat atau berpindah posisinya. Transposon dapat berpindah-pindah tempatnya pada satu molekul DNA atau pada satu kromosom. Transposon juga dapat pindah dari satu molekul DNA ke molekul DNA lainnya atau pindah dari satu kromosom ke kromosom lainnya. Karena memiliki kemampuan untuk berpindah tempat dengan sendirinya maka sering kali transposon disebut juga dengan nama elemen loncat.

Transposon dapat ditemukan pada berbagai jenis tanaman, cendawan, dan bakteri. Jenis transposon bermacam-macam berdasarkan ukuran atau panjangnya, gen-gen yang dikandungnya, dan cara berpindahnya. Transposon yang paling sederhana hanya mengandung gen penyandi enzim transposom (transposase). Enzim transposon ini dibutuhkan untuk melepaskan diri dari tempat semula dan menyisip ke tempat lain. Transposon yang lebih kompleks dapat mengandung satu atau beberapa gen tertentu misalnya gen-gen penyandi resistensi terhadap antibiotik.

Bila transposon menyisip pada suatu gen tertentu maka gen tertentu tersebut akan terganggu fungsinya. Oleh karena itu, transposon sering digunakan oleh para peneliti untuk melakukan mutagenesis (melakukan proses mutasi) sehingga dihasilkan mutan. Misalnya, untuk mempelajari gen yang menyebabkan warna hijau, seorang peneliti dapat menggunakan transposon untuk mendapatkan mutan yang tidak berwarna hijau. Mutan menjadi tidak hijau karena gen penentu warna hijau disisipi oleh transposon. Dengan melacak posisi dimana transposon berada maka peneliti tersebut dapat mempelajari gen yang menentukan warna hijau karena gen tersebut telah disisipi transposon (gen warna hijau bersatu bersama transposon).

Transposon juga dapat digunakan untuk menandai suatu sel. Transposon yang membawa gen resistensi terhadap antibiotik sering digunakan oleh para peneliti sebagai penanda. Kita dapat menandai suatu strain bakteri dengan menyisipkan gen resistensi terhadap suatu antibiotik. Untuk menyisipkan gen resistensi terhadap antibiotik, kita dapat menggunakan transposon. Misalnya, kita dapat menandai strain bakteri-B dengan menggunakan transposon Tn5-*kanR* (transposon Tn5 yang mengandung gen *kanR*. Gen *kanR* menyandikan resistensi terhadap antibiotik kanamisin). Kita dapat menggunakan Tn5-*kanR* untuk menandai agar bakteri-B menjadi resisten terhadap kanamisin. Bila Tn5 masuk ke dalam sel bakteri-B maka Tn5 beserta gen *kanR* yang dikandungnya akan menyisip ke dalam DNA (kromosom) bakteri-B. Dengan demikian bakteri-B yang semula tidak tahan terhadap kanamisin, setelah disisipi Tn5 menjadi tahan terhadap kanamisin. Selanjutnya bila sel bakteri-B yang sudah ditandai tersebut tercampur dengan sel bakteri lainnya, maka kita masih dapat memilihnya atau menyeleksinya yaitu menggunakan media yang mengandung kanamisin. Dalam hal ini, bakteri lain tidak tumbuh, sedangkan bakteri-B (yang sudah ditandai) dapat tumbuh pada media dengan antibiotik kanamisin tersebut. Transposon dapat digunakan untuk menandai sel, menandai suatu gen, melacak keberadaan suatu gen, menemukan letak suatu gen di dalam kromosom. Jadi, transposon merupakan salah satu perangkat penting di dalam teknologi DNA rekombinan.

Pustaka Genom digunakan untuk menyimpan gen atau fragmen DNA yang telah diklonkan. Salah satu cara yang digunakan untuk mempelajari genom suatu organisme adalah dengan menggunakan pendekatan *Shot-Gun*. Dengan pendekatan ini, DNA total dipotong menggunakan enzim restriksi. Oleh karena jumlah potongannya sangat banyak maka sangatlah sulit untuk mempelajari setiap potongan tersebut dalam waktu yang bersamaan. Oleh karena itu, potongan-potongan tersebut perlu untuk disimpan lebih dulu sebelum mendapatkan gilirannya untuk dipelajari. Untuk menyimpan potongan atau fragmen DNA genom digunakan Pustaka Genom. Pustaka genom merupakan koleksi berbagai klon bakteri yang berisi plasmid rekombinan maupun koleksi klon fage yang mengandung DNA rekombinan.

Di dalam pustaka genom ini, setiap plasmid rekombinan atau setiap DNA fage rekombinan membawa salah satu potongan atau fragmen DNA genom yang dipelajari. Setiap klon bakteri membawa satu plasmid rekombinan sedangkan setiap klon fage membawa satu DNA fage rekombinan. Kumpulan klon-klon bakteri yang membawa plasmid rekombinan ini dinamakan Pustaka Plasmid, sedangkan kumpulan fage rekombinan dinamakan Pustaka Fage. Jadi Pustaka Genom dapat berupa Pustaka Plasmid dan/atau Pustaka Fage.

Enzim traskripsi balik digunakan untuk membuat DNA berdasarkan RNA. Tidak lama setelah penemuan enzim restriksi, Howard Temin dan David Baltimore secara terpisah pada tahun 1970 menemukan enzim transkripsi-balik (*reverse-transcriptase*) yang digunakan oleh retrovirus untuk membuat *copy* DNA berdasarkan RNA-nya. Enzim transkripsi-balik ini kemudian digunakan untuk mengkonstruksi *copy* DNA yang disebut cDNA (*complementary* DNA) dengan menggunakan RNA sebagai cetaknya. Dengan demikian gen atau bagian dari gen dapat disintesis berdasarkan mRNA. Proses sintesis DNA dengan cara ini merupakan kebalikan dari pada proses transkripsi. Oleh karena itu dinamakan transkripsi balik.

Saat ini, enzim transkriptase-balik sudah diproduksi secara komersial. Ketersediaan enzim transkriptase-balik ini telah memberikan kemudahan bagi para peneliti untuk mempelajari gen yang bertanggung-jawab terhadap sifat-sifat tertentu. Tanpa enzim transkriptase-balik, pekerjaan mencari gen umumnya dimulai dari mengisolasi DNA total genom, kemudian memotong-motongnya menjadi ratusan ribu potongan yang kemudian diteruskan dengan mempelajari setiap potongan. Cara ini tentu saja membutuhkan lebih banyak tenaga dan memakan waktu yang lebih lama. Dengan ketersediaan enzim transkriptase-balik, pekerjaan mencari gen tidak lagi harus dimulai dengan mengisolasi DNA genom total tetapi dimulai dengan mengisolasi mRNA.

Tahapan utama dalam pembuatan DNA menggunakan transkriptase balik ini adalah sebagai berikut:

- 1) DNA gen eukariot terdiri atas *intron* dan *exon*, pada waktu transkripsi semua bagian tersebut diterjemahkan oleh enzim transkriptase menjadi RNA.
- 2) Dalam proses pasca-transkripsi, *intron* dibuang sehingga mRNA tidak lagi mengandung intron.
- 3) Bila kita berhasil mengisolasi mRNA dari sel, maka kita dapat membuat DNA gen yaitu dengan menambahkan enzim transkriptase-balik.
- 4) Enzim transkriptase-balik mensintesis DNA dengan menggunakan mRNA tersebut sebagai cetaknya. Hasilnya berupa DNA utas tunggal.
- 5) Setelah dihasilkan DNA utas tunggal, DNA polimerase akan mensintesis utas DNA pasangannya sehingga dihasilkan gen yang berupa DNA utas ganda. DNA gen hasil dari transkripsi balik ini tidak mengandung intron.

Pelacak DNA / RNA digunakan untuk mendeteksi gen atau fragmen DNA yang diinginkan atau untuk mendeteksi klon yang benar. Edwin M Southern, pada tahun 1975, telah mempublikasikan prosedur untuk mendeteksi fragmen DNA yang spesifik. Prosedur ini dikenal dengan nama teknik *Southern Blotting*. Pelacak atau probe yang digunakan untuk mengidentifikasi fragmen DNA yang spesifik tersebut merupakan asam nukleat pendek, berutas tunggal (RNA atau DNA berutas tunggal) dan diberi label radioaktif atau non radioaktif.

Bila dicampurkan dengan fragmen-fragmen DNA, rangkaian basa yang ada pada probe tersebut akan berpasangan dengan rangkaian basa komplementer yang ada pada fragmen DNA. Dengan kata lain bahwa fragmen DNA yang akan tertempeli *probe* adalah fragmen DNA yang mengandung urutan basa yang komplementer dengan urutan basa pada *probe*.

Dengan teknik ini, gen tertentu dapat diisolasi dari campuran fragmen DNA yang kompleks. Langkah awalnya adalah memisahkan fragmen-fragmen DNA dengan cara elektroforesis pada gel agarosa. Fragmen DNA yang telah terpisah di dalam gel agarose, selanjutnya didenaturasi (dibuat menjadi utas tunggal).

Fragmen-fragmen DNA tersebut kemudian ditransfer pada filter nitroselulosa atau membran nilon sehingga setiap fragmen DNA menempel kuat pada membran dan posisinya yang sama dengan posisi pada gel agarosa. Kemudian membran atau filter direndam dalam cairan yang mengandung *probe*. Bila *probe*-nya adalah *probe* radioaktif, filter selanjutnya ditempelkan atau diekspose pada lembaran film X-ray untuk mengetahui posisi fragmen yang tertempeli *probe* pada filter atau membran. *Probe* non-radioaktif juga telah cukup lama dikembangkan. *Probe* dapat dikaitkan dengan enzim, misalnya peroksidase sehingga menjadi *probe*-enzim. Deteksinya dapat dilakukan dengan menggunakan substrat chemiluminescent yang signalnya ditangkap oleh lembaran film x-ray. *Probe* juga dapat dikaitkan dengan vitamin misalnya biotin, sedangkan deteksinya menggunakan enzim misalnya alkaline phosphatase. Signalnya akan nampak langsung pada filter atau membran berupa pita-pita yang berwarna biru/ungu bila pita-pita tersebut merupakan fragmen DNA yang berikatan dengan *probe*.

Dengan prinsip yang sama yaitu perpasangan basa-basa *probe* dengan basa-basa DNA target yang komplementer, *probe* asam nukleat ini juga dapat digunakan untuk mendeteksi klon yang benar. Klon DNA (gen atau fragmen DNA) dapat dibuat melalui pembuatan plasmid rekombinan di dalam tabung reaksi (mencampurkan plasmid asal dan fragmen DNA). Kemungkinan yang dapat ditemui di dalam tabung reaksi tersebut adalah plasmid tanpa mengandung fragmen DNA (plasmid asal) dan plasmid rekombinan (plasmid yang mengandung fragmen DNA).

Tahap berikutnya adalah memasukkan plasmid ke dalam sel bakteri dengan cara mencampurkan campuran plasmid tersebut dengan bakteri inangnya. Kemungkinan yang dapat terjadi dalam hal ini adalah: ada sel bakteri yang tidak berisi plasmid, ada sel yang berisi plasmid asal, dan ada sel yang berisi plasmid rekombinan. Teknik *Southern Blotting* tersebut di atas dapat digunakan untuk mendeteksi klon yang benar (klon bakteri yang mengandung plasmid rekombinan), yaitu dengan menggunakan *probe* yang spesifik untuk fragmen DNA yang diklonkan (urutan basanya komplemen dengan urutan basa pada fragmen yang diklonkan).

Berdasarkan mekanisme bakteri, perangkat bakteri, dan beberapa teknik di atas, DNA rekombinan dapat dibuat paling tidak melalui tiga pendekatan, yaitu:

- 1) Mengestraksi DNA total suatu organisme, memotong DNA total menjadi fragmen-fragmen, memilih fragmen yang dikehendaki, mengklonkan fragmen yang telah terpilih.
- 2) Mengestraksi DNA total suatu organisme, memotong DNA total menjadi fragmen-fragmen, mengklonkan semua fragmen DNA pada vektor yang sesuai, menguji setiap klon untuk mendapatkan gen yang diinginkan.
- 3) Sintesis gen atau fragmen DNA yang diinginkan secara langsung dan mengklonkan gen atau fragmen DNA hasil sintesis.