

**GEN SAL4**  
**RAGI *Saccharomyces cerevisiae***

MILIK PERPUSTAKAAN IKIP PADANG	
DITERIMA TGL	21 - 9 - 96
SUMBER/HARGA	HD
KOLEKSI	KKI
NO INVENTARIS	533/HD/96 - 90/21
LOKASI	574.19 AZH 9.1



Oleh :

Dra. Minda Azhar, M.Si

JURUSAN PENDIDIKAN KIMIA  
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN PADANG  
1996

MILIK UPT PERPUSTAKAAN  
IKIP PADANG

*Niscaya Allah  
akan meninggikan orang-orang yang beriman diantaramu  
dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan  
beberapa derajat*

*(Al Mujaadalah Ayat 11)*

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'amin, atas rahmat dan hidayah-Nya, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penulisan buku dengan judul "*Gen SAL4 Ragi Saccharomyces cerevisiae*". Buku ini penulis buat, terdorong mengingat masih kurangnya buku-buku mengenai proses translasi pada sistem eukariot.

Penulis mengucapkan terimakasih pada Bapak Akhmaloka, Ph.D (Peneliti dan Dosen Kimia ITB Bandung) yang telah memberikan penjelasan tentang gen *SAL4* dan penelitian tentang gen *SAL4* yang sedang dilakukan pada saat ini. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan pada Bapak Drs. Usman Bakar, M.Ed.St dan Bapak Drs. Iswendi, M.S yang telah meluangkan waktu beliau untuk membaca buku ini dan memberi saran demi terwujudnya penulisan yang baik.

Harapan penulis, semoga buku ini bermanfaat terutama bagi mahasiswa dan peneliti yang ingin mendalami biokimia khususnya mengenai proses translasi pada sistem eukariot.

Padang, Mei 1996

Penulis,  
Minda Azhar

# DAFTAR ISI

	Halaman
Judul .....	i
Kata Pengantar .....	ii
Daftar Isi .....	iii
Daftar Tabel .....	v
Daftar Gambar .....	vi
Daftar Lampiran .....	vii
Daftar Singkatan .....	viii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
BAB II. RAGI <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
2.1. Struktur Sel <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
2.2. Siklus Hidup Sel Ragi .....	8
2.3. Genetik Sel Ragi <i>S. cerevisiae</i> .....	11
2.3.1. DNA Kromosom .....	11
2.3.2. DNA Mitokondria .....	15
2.3.3. Plasmid $2\mu$ .....	16
2.3.4. Plasmid Pembunuh .....	17
2.4. Transformasi pada <i>S. cerevisiae</i> .....	18
2.5. Mutasi pada <i>S. cerevisiae</i> .....	21
BAB III. PROSES TRANSLASI .....	25
3.1. Proses Translasi di Ragi .....	26
3.1.1. Tahap Inisiasi Translasi .....	27
3.1.2. Tahap Elongasi Translasi .....	29
3.1.2.1. Faktor Elongasi EF-1 .....	29
3.1.2.2. Faktor Elongasi EF-2 .....	30
3.1.2.3. Faktor Elongasi EF-3 .....	31

3.1.3. Tahap Terminasi Translasi .....	34
3.2. Pengendalian Tahap Translasi .....	37
3.2.1. Pengendalian Tahap Inisiasi Translasi .....	40
3.2.2. Pengendalian Tahap Elongasi Translasi .....	41
3.2.3. Pengendalian Tahap Terminasi Translasi ...	42
BAB IV. GEN SUPPRESSOR .....	44
4.1. Suppressor Nonsense di Ragi .....	45
4.2. Allosuppressor di Ragi .....	47
BAB V. GEN <i>SAL4</i> .....	49
5.1. Fenotip Mutan <i>Sal4</i> .....	51
5.2. Peranan Gen <i>SAL4</i> .....	53
5.3. Kloning Gen Mutan <i>sal4</i> .....	59
DAFTAR PUSTAKA .....	64
LAMPIRAN .....	68

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Panjang tiap kromosom DNA ragi .....	12
Tabel 2.2. Perbandingan sifat transformasi pada <i>S. cerevisiae</i> dengan metoda spheroplast dan metoda sel utuh .....	20
Tabel 3.1. Faktor-faktor protein yang terlibat pada proses translasi .....	39

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur sel <i>S. cerevisiae</i> .....	7
Gambar 2.2. Struktur permukaan sel ragi .....	8
Gambar 2.3. Siklus hidup sel <i>S. cerevisiae</i> .....	10
Gambar 2.4. Peta genetik <i>S. cerevisiae</i> .....	13
Gambar 2.5. Diagram kromosom sel ragi <i>S. cerevisia</i> .....	14
Gambar 2.6. Diagram telomer ragi .....	15
Gambar 2.7. Plasmid $2\mu$ <i>S. cerevisiae</i> .....	14
Gambar 2.8. Reaksi Guanin dan Timin dengan etil metana sulphonat .....	23
Gambar 3.1. Skema inisiasi translasi pada sel eukariot .....	27
Gambar 3.2. Skema siklus elongasi translasi pada eukariot .....	32
Gambar 3.3. Tahap terminasi translasi pada <i>E. coli</i> .....	36
Gambar 3.4. Model umum terminasi translasi pada eukariot .....	37
Gambar 3.5. Struktur promotor ragi .....	38
Gambar 5.1. Urutan nukleotida gen <i>SAL4</i> <i>S. cerevisiae</i> .....	50
Gambar 5.2. Model 1 : Sal4 sebagai <i>release factor</i> .....	55
Gambar 5.3. Model 2 : Sal4 sebagai <i>proofreading factor</i> .....	58
Gambar 5.4. Model 3 : Sal4 memediasi reaksi terminasi .....	59
Gambar 5.5. Ilustrasi metoda <i>allele rescue</i> .....	61
Gambar 5.6. Skema konstruksi plasmid pUKC-802 .....	62

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Daftar istilah .....	68
Lampiran 2. Kode genetik .....	70



## DAFTAR SINGKATAN

ARS	<i>autonomous replication sequence</i>
EF	<i>elongation factor</i>
EMS	etil metana sulfonat
IF	<i>initiation factor</i>
kb	kilo basa
kD	kilo Dalton
ORI	<i>original of replication</i>
pb	pasangan basa
RF	<i>release factor</i>
RRF	<i>ribosomal release factor</i>
SM	<i>synthetic minimal</i>
UAS	<i>upstream activating sequences</i>
URS	<i>upstream repressing sequences</i>
ORF	<i>open reading frame</i>

# BAB I

## PENDAHULUAN

Transfer informasi genetik yang terjadi pada semua sel hidup meliputi tiga tahap yaitu tahap replikasi, transkripsi dan translasi. Pada setiap tahap dapat terjadi kesalahan. Replikasi mempunyai tingkat kesalahan yang paling rendah yaitu antara  $10^{-8}$  -  $10^{-11}$ , transkripsi mempunyai tingkat kesalahan sekitar  $10^{-4}$  (Parker, 1989), sedangkan pada tahap translasi rata-rata kesalahannya  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  perkodon (Martinelli dan Sheikh, 1991). Dengan demikian kesalahan pada tahap translasi mempunyai frekuensi yang paling tinggi. Hal ini karena proses translasi merupakan suatu fenomena yang kompleks yang melibatkan interaksi protein-protein dan interaksi protein-RNA. Oleh sebab itu untuk dapat mengendalikan kesalahan pada tahap translasi diperlukan banyak informasi mengenai mekanisme dan faktor-faktor yang mempengaruhi ketepatan translasi.

Informasi mengenai tahap translasi pada sistem prokariot telah banyak diketahui dibandingkan pada sistem eukariot. Pada sistem prokariot mekanisme tahap translasi (inisiasi, elongasi dan terminasi) telah banyak dipelajari. Pada ragi dan sistem eukariot lain mekanisme inisiasi dan elongasi juga telah banyak diketahui, tetapi mekanisme

terminasi translasi masih belum sepenuhnya dimengerti (Tuite, 1989; Stansfield, *et.al.*, 1995). Komponen-komponen yang terlibat pada tahap terminasi translasi sebagian besar masih belum diselidiki, walaupun demikian telah ditemukan dua *release factor* yaitu Sal4p (eRF-1) dan Sal3p (eRF-3) yang terlibat pada proses terminasi translasi di sistem eukariot (Stansfield, *et.al.*,1995). Kedua *release factor* ini berinteraksi untuk membentuk suatu kompleks *release-factor* yang fungsional. Kenyataan ini berbeda dengan proses terminasi translasi yang diamati pada sistem prokariot yang mana aktivitas RF-1, RF-2 dapat berfungsi tanpa hadirnya RF-3, walaupun RF-3 prokariot dan eRF-3 eukariot sama mempunyai aktivitas GTPase. Berdasarkan hal ini Stansfield, *et.al.* (1995) mengusulkan bahwa gejala ini mungkin menunjukkan perbedaan antara mekanisme terminasi translasi pada sistem prokariot dan eukariot. Dengan demikian masih diperlukan bukti-bukti eksperimen lain pada tingkat molekuler untuk mempelajari mekanisme terminasi pada sistem eukariot.

Untuk mendapatkan informasi-informasi yang diperlukan dalam mempelajari proses translasi pada sel eukariot digunakan sel *Saccharomyces cerevisiae* sebagai model, karena proses translasi pada *S. cerevisiae* sangat mirip dengan proses translasi dalam sistem eukariot yang lebih tinggi (Linder dan Prat, 1990). Selain itu penggunaan

*S. cerevisiae* mempunyai beberapa keuntungan antara lain: *S. cerevisiae* sangat mudah tumbuh dibandingkan dengan sel eukariot lain dengan waktu penggandaan kurang dari dua jam di dalam media kaya (YPD) dan stabil dalam keadaan haploid maupun diploid.

Disamping keuntungan di atas *S. cerevisiae* mempunyai keuntungan lain yaitu *S. cerevisiae* telah menjadi organisme yang menarik sebagai sel inang untuk ekspresi protein-protein asing yang sebelumnya menggunakan sel *Escherichia coli*, dan yang tak kalah penting adalah pola genetik strain-strain ragi telah diketahui secara detail, misalnya peta genetik *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* telah banyak dipelajari. Dengan demikian *S. cerevisiae* merupakan organisme yang ideal untuk dijadikan model dalam mempelajari mekanisme translasi pada sistem eukariot.

Penelitian tentang pengendalian ketepatan translasi di ragi telah banyak dilakukan. Sampai saat ini telah ditemukan 11 gen di kromosom ragi yang diduga berperan dalam pengendalian ketepatan translasi, tetapi baru 2 gen yang berhasil dikarakterisasi yaitu gen *SUP1* dan *SUP2* (Tuite, *et.al.*, 1990). Gen *SUP1* terletak pada kromosom II sedangkan gen *SUP2* berada pada kromosom IV. Kedua gen ini mengkode faktor terminasi yang terlibat dalam proses translasi dan esensial untuk pertumbuhan sel ragi (Surguchov, 1988). Gen *SUP1* dan gen *SUP2* berada dalam bentuk kopi tunggal dalam genom haploid ragi. Kedua gen ini telah

diklon dan dikarakterisasi. Gen *SUP2/SUP35* telah ditentukan urutan nukleotidanya oleh Kushnirov, *et.al.* (1988), sedangkan gen *SUP1/SUP45* oleh Breining dan Piepersberg (1986). Gen *SUP1/SUP45* ternyata identik dengan gen *SAL4* yang juga telah diklon dan ditentukan urutan nukleotidanya (Akhmaloka, 1991). Perbedaannya hanya pada satu asam amino, yaitu Gln<sup>41</sup> di Sal4p sedangkan di Sup45p adalah Leu<sup>41</sup>.

Untuk mempelajari mekanisme terminasi translasi yang melibatkan protein Sal4 di ragi *S. cerevisiae* secara *in vivo* dilakukan mutasi strain-strain ragi dengan etil metana sulfonat (EMS). Crouzet (1988) telah melakukan mutasi pada strain BSC483/1a dan mendapatkan empat mutan *sal4*. Keempat mutan tersebut telah diklon dan ditentukan urutan nukleotidanya (Akhmaloka, 1991). Hasilnya menunjukkan bahwa keempat mutan *sal4* tersebut mengandung perubahan pasangan basa tunggal yang menghasilkan kodon terminasi *ochre* (TAA) dalam daerah pengkode *SAL4* yang menunjukkan allele tersebut adalah allele nonsense. Puspaningsih (1994) mendapatkan 2 mutan *sal4* yaitu *sal4-1* dan *sal4-13*. Kedua mutan ini memperlihatkan fenotipik tidak sensitif temperatur dan sensitif paromomycin pada kadar 0,6 mg/ml. Pada tulisan ini dibahas hal-hal yang berhubungan dengan gen *SAL4*.

## BAB II

### RAGI *Saccharomyces cerevisiae*

Pada awalnya ragi dikenal oleh ahli biologi sebagai organisme yang digunakan dalam pembuatan minuman dan roti. Tetapi sejak tahun 1930-an ketika analisis genetiknya dimulai, ragi dikenal sebagai mikro organisme eukariot ideal untuk studi biologi dan sekarang telah menjadi salah satu organisme yang paling penting dalam bioteknologi. Beberapa sifat yang membuat ragi cocok untuk studi biologi adalah mempunyai kecepatan tumbuh yang tinggi, mudah mengisolasi mutan. Selain itu sistem genetik ragi telah diketahui dengan baik dan paling penting adalah mudah melakukan transformasi ragi oleh DNA. Karena sifatnya yang tidak patogen, ragi menjadi mudah ditangani.

Ragi mempunyai banyak strain. Salah satu strain adalah *S. cerevisiae*. Strain *S. cerevisiae* tidak seperti mikroorganisme lainnya, dapat berada dalam bentuk haploid dan diploid yang stabil. Bentuk diploid merupakan bentuk normalnya. Sel diploid berbentuk ellips dengan ukuran lebih besar daripada sel dalam bentuk haploid yang berbentuk bundar. Ukuran diameter sel *S. cerevisiae* kira-kira 3  $\mu\text{m}$ . Lingkungan hidup yang diperlukan ragi adalah suasana sedikit asam (pH 4-5) dan temperatur 25<sup>o</sup> - 30<sup>o</sup> C. Pada bagian ini dijelaskan struktur sel

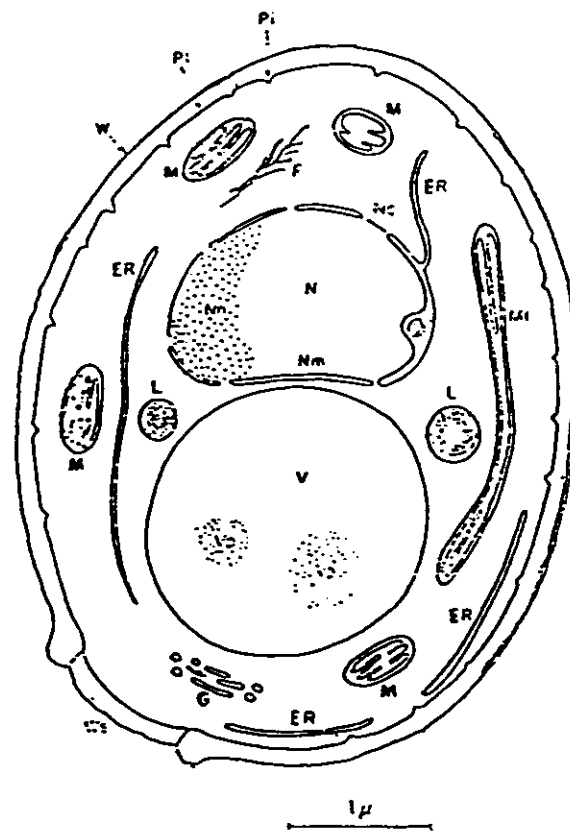
*S. cerevisiae*, siklus hidup, genetik sel ragi dan metoda transformasi pada *S. cerevisiae* serta mutasi pada *S. cerevisiae*.

## 2.1. Struktur sel *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* termasuk golongan sel eukariot. Umumnya sel eukariot lebih besar dan strukturnya jauh lebih kompleks dibandingkan dengan sel prokariot. Sel eukariot terdiri dari inti sel yang diselubungi oleh membran inti. Pada mikroskop elektron terlihat bahwa membran inti itu berlobang-lobang yang berfungsi sebagai jalan keluar masuknya makromolekul-makromolekul dan partikel-partikel lainnya seperti ribosom. Di luar inti yaitu di sitoplasma terdapat organel-organel seperti endoplasmik retikulum (ER), vakuola (V) dan mitokondria (M). Struktur sel ragi *S. cerevisiae* pada Gambar 2.1.

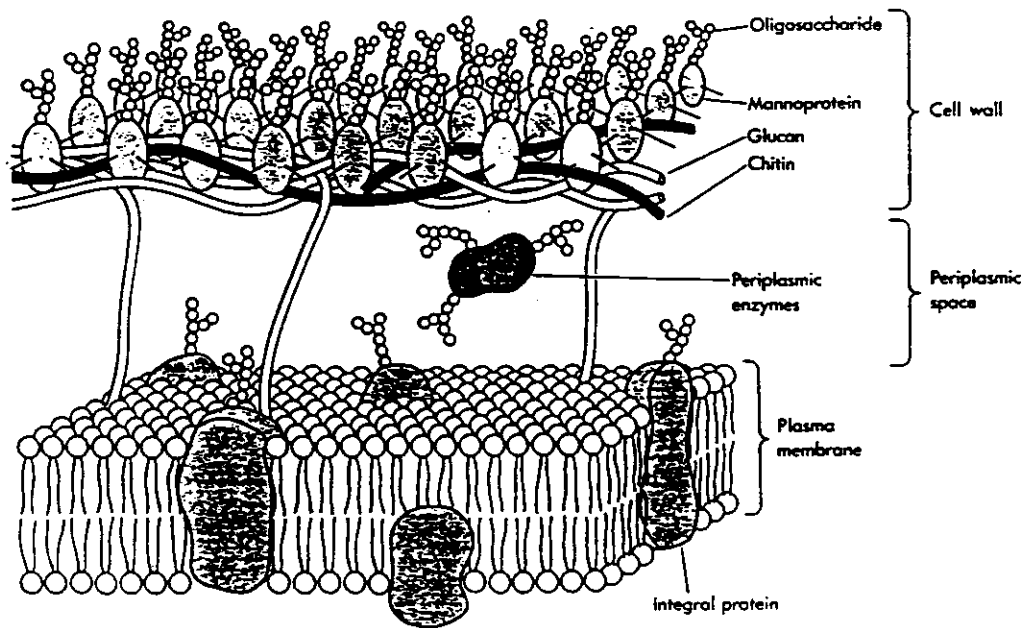
Ragi *S. cerevisiae* mempunyai dinding sel yang relatif kuat dan tebal. Dinding sel ragi yang masih muda relatif tidak terlalu kuat dibandingkan dengan dinding sel ragi yang sudah tua. Dinding sel ragi merupakan kompleks antara protein dan polisakarida. Protein pada dinding sel adalah kumpulan mannoprotein yang terdiri dari sejumlah besar gugus mannososa yang berikatan kovalen dengan gugus N-asetilglukosamin yang menempel pada gugus rantai samping serin dan treonin dari sejumlah rantai polipeptida dinding sel spesifik. Pada bagian sebelah dalam dari lapisan dinding sel ini terdapat membran plasma.

Ruang antara membran plasma dan dinding sel (lapisan mannoprotein) merupakan daerah periplasmik (Gambar 2.2). Pada daerah ini terdapat sejumlah enzim pendegradasi seperti *sucrose-hydrolyzing agent invertase*, *phosphate-releasing agent alkaline phosphatase*; polisakarida glukon (polimer dari D-glikopiranososa) yang menguatkan dinding sel dan kitin (polimer dari N-asetilglukosilamin).



Gambar 2.1. Struktur sel *S. cerevisiae*. ER = Endoplasmik retikulum, F = Filamen, V = Vakuola, M = Mitokondria, Nn = Inti dari inti sel, G = Golgi, W = dinding sel, L = lipid, N = inti, Nm = Membran inti.





Gambar 2.2. Struktur permukaan sel ragi. Struktur permukaan sel ragi terdiri dari tiga bagian yaitu dinding sel, ruang periplasmik dan membran plasma. (Diambil dari Watson, et.al., 1987).

## 2.2. Siklus Hidup Sel Ragi

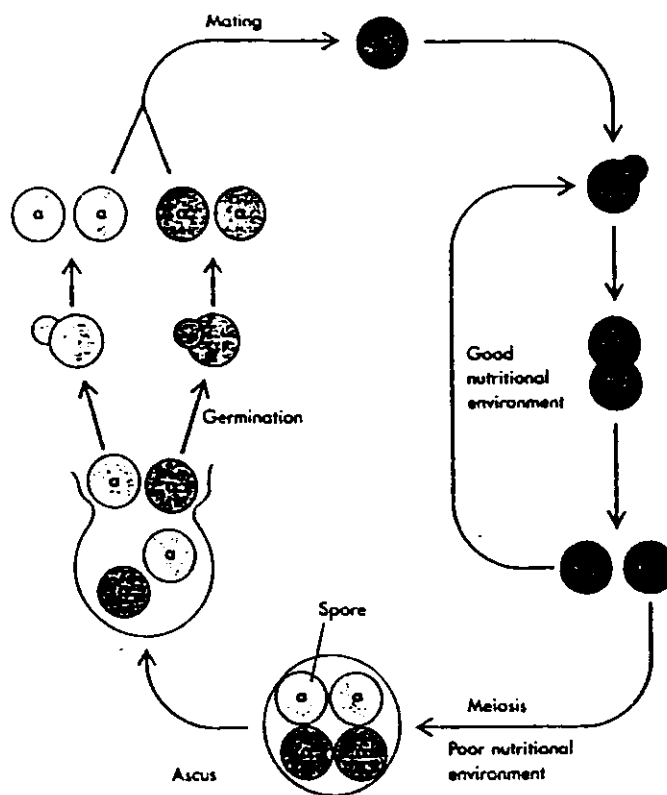
Ragi *S. cerevisiae* memperbanyak diri dengan cara vegetatif dan generatif. Pada kondisi yang optimal massa selnya akan meningkat dua kali lipat setiap 90 menit. Ragi *S. cerevisiae* dapat berada dalam bentuk sel diploid dan sel haploid. Sel diploid ragi *S. cerevisiae* dapat mengalami dua macam siklus pertumbuhan yaitu melalui siklus mitosis atau melalui siklus meiosis, sedangkan sel haploid dapat mengalami siklus mitosis. Jika kondisi nutrisinya baik, setiap sel haploid dan diploid akan melewati siklus

mitosis sebaliknya jika kondisi nutrisinya kurang baik sel diploid akan menempuh siklus meiosis.

Siklus mitosis ragi dapat dibagi dalam beberapa fase yaitu fase  $G_1$  yang berperan dalam inisiasi sintesa DNA kromosom, fase S berperan dalam replikasi DNA kromosom, fase  $G_2$  dan akhirnya mitosis yaitu terjadinya pembagian inti dan pembentukan sel turunan (Winnacker, 1987). Proses siklus mitosis diawali dengan pembentukan tunas tunggal (pembentukan sitoplasma asimetris) pada setiap sel. Pada proses ini komplemen penuh dari kromosom turunan bergerak selama mitosis. Tunas kemudian lepas menghasilkan sel turunan yang lebih kecil dan akhirnya akan meningkatkan ukurannya hingga sebesar sel inang, kemudian akan kembali tumbuh tunas baru.

Siklus meiosis terjadi pada saat sel kekurangan nutrisi. Pada proses ini sel diploid membentuk spora-spora dalam selnya, biasanya empat spora haploid dalam satu kantong *ascus* yang disebut *ascuspora*. Dua spora haploid dalam *ascus* itu mempunyai tipe mating "a" dan dua lagi "α". Selanjutnya spora ini akan membentuk sel haploid baru bila dinding *ascus*-nya pecah. Fusi sel "a" dan sel "α" akan menghasilkan sel diploid a/α yang akan tumbuh dan membelah mempertahankan bentuk diploid bila kondisi nutrisinya baik. Siklus hidup sel ragi *S. cerevisiae* dapat dilihat pada Gambar 2.3.

Sel  $\alpha$  ragi berbeda dengan sel a. Sel  $\alpha$  mengandung sejumlah "protein  $\alpha$  spesifik" yang tidak dihasilkan oleh sel a, sedangkan sel a mengandung sejumlah "protein a spesifik" yang tidak dihasilkan oleh sel  $\alpha$ . Dengan demikian "mating  $\alpha$ " dan "mating a" mengkode protein-protein yang mengaktivasi atau menginhibisi ekspresi dari gen yang tersebar di seluruh genom ragi.



Gambar 2.3. Siklus hidup sel *S. cerevisiae*. Bila kondisi nutrisi baik, sel diploid dan haploid ragi mengalami mitosis, sedangkan bila kekurangan nutrisi sel diploid  $a/\alpha$  mengalami meiosis. (Diambil dari Watson, et.al., 1987)

### 2.3. Genetik Sel Ragi *S. cerevisiae*

Di dalam inti sel haploid *S. cerevisiae* terdapat 16 kromosom yang masing-masing mengandung molekul DNA tunggal. Selain DNA kromosom unsur genetik yang lain adalah DNA mitokondria dan plasmid 2 $\mu$ . Beberapa strain ragi mengandung unsur ketiga yang disebut dengan plasmid pembunuh (*killer plasmid*). Dalam sel diploid *S. cerevisiae* DNA kromosom (DNA inti ragi) merupakan jumlah yang terbesar (85%) dari keseluruhan DNA ragi. DNA mitokondria kira-kira 10% sedangkan plasmid sekitar 5%.

#### 2.3.1. DNA Kromosom

DNA kromosom ragi merupakan partikel kompak dengan kurang lebih 6.500 gen. Setiap gen berukuran sekitar 2 kb dan beberapa intron. Total gen yang telah dipetakan sekitar 796 (Akhmaloka, 1993). Peta genetik ragi *S. cerevisiae* terdapat pada Gambar 2.4. Panjang total DNA kromosom ragi sekitar 14.000 kb. Angka ini setara dengan 4.600 cM (centiMorgan) dimana satu cM ekuivalen dengan kira-kira 3 kb. Nilai ini telah dibuktikan dengan analisis urutan dari klon DNA ragi yang meliputi daerah antara lokus LEU2 dan CD10 pada tangan kiri dari kromosom III ragi (Winnacker, 1987).

Panjang DNA tiap kromosom bervariasi. Ukuran terkecil adalah kromosom ke I dengan panjang 235 kb. Ukuran tiap kromosom disajikan

pada Tabel 2.1. Menurut Goffeau (1994) ke-16 kromosom ragi ini tidak akan menjadi misteri lagi diakhir tahun 1996 karena direncanakan keseluruhan urutan nukleotida ke-16 kromosom ragi telah diketahui diakhir tahun tersebut.

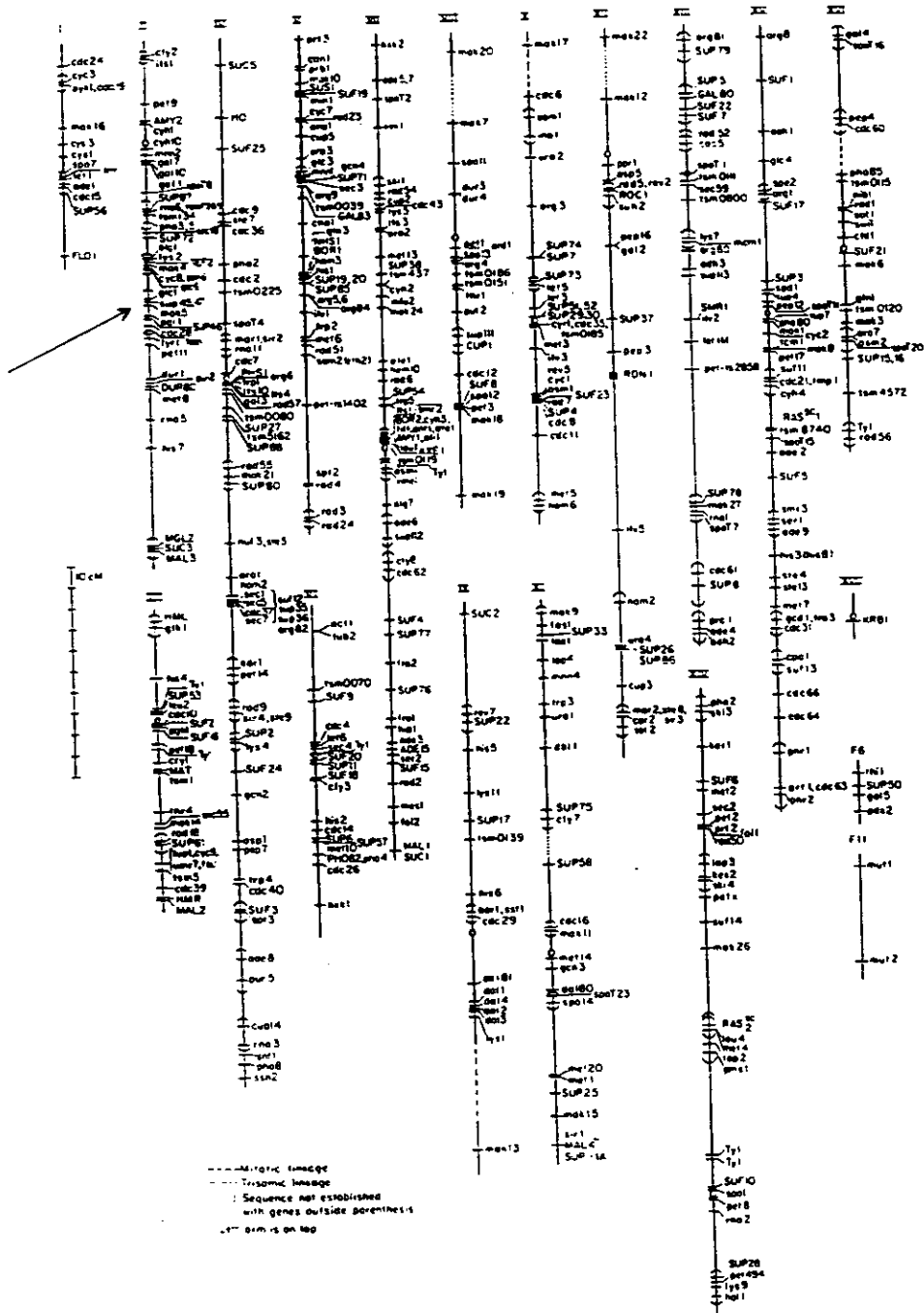
**Tabel. 2.1. Panjang tiap kromosom DNA ragi**

Kromosom	Panjang (kb)	Kromosom	Panjang (kb)
III	314	XI	666
VIII	550	I	235
V	550	IX	440
II	820	VI	270
X	720	XII	1.170
IV	1.640	XIV	810
XIII	910	VII	1.150
XV	1.150	XVI	1.042

Keterangan : kb adalah kilo basa  
(Diambil dari Goffeau, 1994)

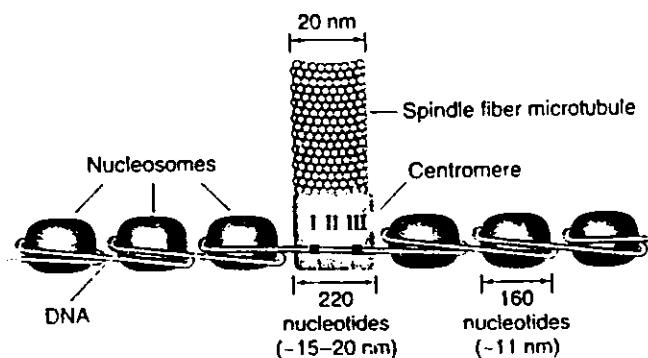
DNA ragi seperti DNA eukariot lainnya yang membentuk kompleks dengan 4 histon (H2A, H2B, H3 dan H4). Histon ini digunakan untuk membangun 146 pasang basa nukleosom pada kromatin. Nukleosom adalah subunit globular dari DNA kromosom yang membentuk kompleks dengan histon. Histon H1 tidak ditemui dalam sel ragi. Pada eukariot

tingkat tinggi H1 berperan penting dalam menyusun kromatin ke bentuk supercoil selama mitosis.



Gambar 2.4. Peta genetik *S. cerevisiae*. (Diambil dari Watson, et. al., 1987).

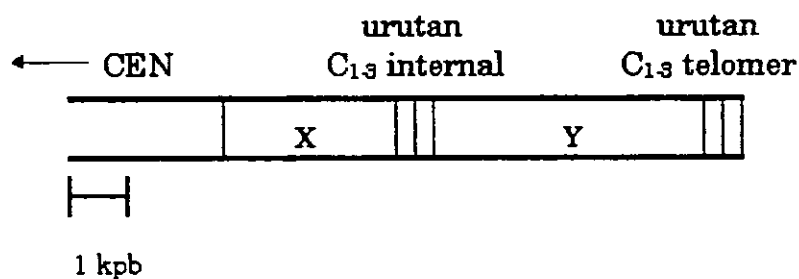
Setiap kromosom mengandung urutan DNA unik yang dinamakan centromer (CEN) yang berfungsi sebagai tempat mengikat mikrotubula spindel yang berdiameter sekitar 15 - 20 nm (Griffiths, *et. al.*, 1993). Dengan demikian daerah centromer (CEN) yang berukuran kira-kira 220 nukleotida tidak terikat pada histon tetapi terikat pada protein khusus yang dinamakan *kinetochore* (Watson, *et. al.*, 1987). Diagram kromosom *S. cerevisiae* disajikan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Diagram kromosom sel ragi *S. cerevisiae*. Kira-kira tiap 160 nukleotida DNA kromosom terikat pada histon membentuk nukleosom. Pada daerah centromer ( $\pm$  220 nukleotida) terikat protein *kinetochore* (Diambil dari Griffiths, *et. al.*, 1993).

Pada ujung semua kromosom ragi mempunyai struktur unik yang disebut telomer. Urutan nukleotida pada telomer tidak mengkode suatu RNA atau suatu protein, tetapi walaupun demikian telomer berfungsi sebagai salah satu unsur esensial untuk replikasi DNA kromosom

disamping sentromer (CEN) dan *origin of DNA replication* (ORI). Pada ujung telomer terdapat sekitar 100 nukleotida dalam bentuk 5'-C<sub>13</sub>A... yang diulang secara tak teratur dan terletak pada urutan X dan Y yang khusus (Gambar 2.6). Di dalam urutan ujung X dan Y yang khusus ini terdapat bagian internal tambahan yang mengandung elemen yang diulang. Semua telomer urutannya diulang dua kali. Pengulangan ini dimaksudkan untuk memelihara keutuhan dari molekul DNA ujung yang seringkali tidak terselesaikan pada mekanisme replikasi DNA secara konvensional.



**Gambar 2.6** Diagram telomer ragi. CEN adalah sentromer. X dan Y merupakan urutan khusus. Tidak semua telomer ragi mengandung elemen Y (Diambil dari Watson, *et.al.*, 1987).

### 2.3.2. DNA Mitokondria

Pada tahun 1950 ditemukan bahwa mitokondria mempunyai unsur genetik tersendiri. Penemuan ini ditunjukkan dengan pengamatan pada mutan ragi yang DNA mitokondrianya mengalami mutasi (mutasi *petite*).



Mutasi ini menyebabkan mitokondria kehilangan beberapa enzim-enzim esensial sehingga tidak mampu lagi melepaskan ATP. Akibatnya mutan tumbuh lebih lambat dan membentuk koloni yang lebih kecil pada permukaan agar. Peristiwa ini menjelaskan bahwa terdapat molekul genetik dalam mitokondria normal yang mengkode protein-protein yang hilang tersebut.

DNA mitokondria (mtDNA) berbentuk sirkuler dengan ukuran 70-76 kb dan berada dalam 50 kopi per sel diploid, jumlahnya sekitar 10% dari total DNA sel ragi. DNA mitokondria dan DNA inti mempunyai beberapa perbedaan, diantaranya adalah dalam DNA mitokondria tidak ditemukan aktivitas *proofreading* sehingga menyebabkan laju mutasi di mitokondria lebih tinggi dibandingkan dalam gen kromosom. Protein di dalam mitokondria disintesis dalam bagian mitokondria yang disebut mitoribosom. Perbedaan lain dalam sistem genetik mitokondria adalah bahwa kodon UGA tidak dibaca sebagai kodon terminasi melainkan dikode untuk asam amino triptofan dan kodon AUA ditranslasi sebagai metionin tidak isoleusin.

### 2.3.3. Plasmid 2 $\mu$

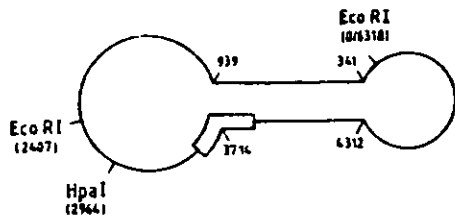
Plasmid 2 $\mu$  dikenal juga dengan *scp* plasmid (*S. cerevisiae* plasmid). dengan jumlah kopi 50-100 tiap sel haploid. Ukuran plasmid 2 $\mu$  adalah 6.318 pb yang fungsinya sampai sekarang belum diketahui dengan jelas.

Plasmid  $\Phi$  terdapat di luar inti sel yaitu di sitoplasma dan plasmid ini diduga bereplikasi di dalam inti sel. Replikasi DNA plasmid  $\Phi$  disempurnakan oleh enzim-enzim seluler yang sama dengan yang dipakai untuk mereplikasi kromosom linier ragi.

Plasmid  $\Phi$  dapat berada dalam bentuk A dan bentuk B (Gambar 2.7.A). Pada plasmid  $\Phi$  terdapat tiga *open reading frame* (ORF) untuk protein-protein yang besar, pada Gambar 2.7.B ditandai dengan huruf A, B dan C. Satu dari protein ini (A) terlibat dalam proses rekombinasi 2 spesies molekul yang berbeda dari plasmid ini. Jumlah kopi number yang tinggi diamati hanya jika ada produk gen yang dikode oleh daerah B dan C yang juga disebut sebagai *REP1* dan *REP2* (Winnacker, 1987).

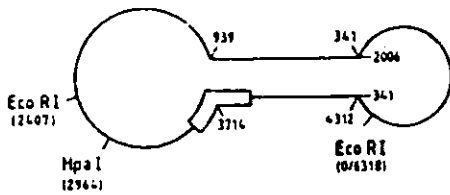
#### 2.3.4. Plasmid Pembunuh

Plasmid pembunuh merupakan molekul RNA rangkap ganda (dsRNA) yang diselimuti oleh protein yang mengandung kapsid dan berada dalam multikopi di sitoplasma. RNA yang mirip virus ini mengkode suatu protein toksin yang disekresikan melalui dinding sel dan mematikan sel ragi yang tidak memiliki partikel seperti virus ini. Toksin pembunuh bekerja dengan cara mengikatkan diri ke membran sel inang kemudian menginduksi pelepasan ATP dan  $K^+$  ke dalam medium sekitarnya.



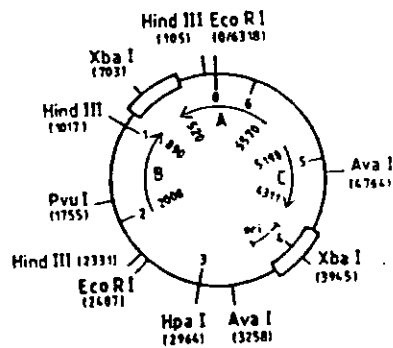
Form A

Eco RI A =  $6318 - 2407 = 3912$  bp  
 Eco RI B = 2407 bp



Form B

Eco RI A =  $2407 - 341 + 2006 = 4072$  bp  
 Eco RI B =  $4312 - 2407 + 341 = 2246$  bp



A

B

Gambar 2.7. Plamid  $2\mu$  *S. cerevisiae*. A adalah bentuk plasmid  $2\mu$  dan B adalah peta genetik plasmid  $2\mu$  bentuk A. (Diambil dari Winnacker, 1987).

## 2.4. Transformasi pada *S. cerevisiae*

DNA dapat dimasukkan ke dalam sel *S. cerevisiae* dengan menggunakan salah satu dari dua strategi dasar transformasi yaitu metoda spheroplast atau metoda sel utuh (*intact cell*).

### a. Metoda spheroplast

Metoda ini diperkenalkan pertamakali oleh Hinnen *et.al* dan Beggs pada tahun 1978 dengan transformasi *S. cerevisiae* menggunakan plasmid

yang membawa fragmen DNA. Prinsip kerja mereka adalah memindahkan dinding sel *S. cerevisiae* dengan menggunakan enzim *lytic* misalnya  $\beta$ -glukoronidase, helicase, lyticase atau zymolase sehingga mengakibatkan sel kehilangan dinding sel dan ragi berada dalam bentuk spheroplast. DNA kemudian dimasukkan ke dalam spheroplast yang berada dalam larutan isotonik (biasanya 1M sorbitol) dan mengandung polietilen glikol (PEG). Untuk menumbuhkan kembali dinding sel ragi, spheroplast ditanam pada media padat yang mengandung agar dengan konsentrasi yang lebih tinggi (biasanya 3%).

Metoda spheroplast dapat menghasilkan  $10^5$  transforman per mikrogram DNA yang ditambahkan. Angka ini menunjukkan efisiensi yang tinggi, tetapi walaupun demikian metoda ini mempunyai beberapa kelemahan antara lain tidak cocok untuk semua strain ragi dan prosedurnya relatif lebih kompleks.

#### **b. Metoda sel utuh (*intact cell*)**

Untuk mengatasi kelemahan metoda spheroplast, Ito *et.al* pada tahun 1983 memperkenalkan metoda *intact cell*. Pada prinsipnya metoda ini adalah membuat kompeten sel ragi dengan menggunakan salah satu dari sejumlah ion logam seperti:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ , dan  $\text{Na}^+$ , selanjutnya memasukkan DNA pada sel kompeten ini dan sel ditanam pada media padat. Metoda ini juga membutuhkan PEG untuk memudahkan masuknya DNA ke dalam sel ragi. Metoda ini merupakan metoda yang sederhana

dibandingkan dengan metoda spheroplast tetapi mempunyai efisiensi transformasi yang rendah. Walaupun demikian metoda ini terus dimodifikasi termasuk penemuan bahwa frekuensi transformasi dapat dipertinggi dengan menambahkan RNA atau DNA rantai tunggal yang berlebih. Disamping keserhanaannya dan menghindari metoda spheroplast yang panjang, metoda ini juga mempunyai keuntungan lain seperti yang dapat dilihat pada Tabel 2.2.

**Tabel 2.2. Perbandingan sifat transformasi pada *S. cerevisiae* dengan metoda spheroplast dan metoda sel utuh.**

Sifat/karakteristik	Metoda transformasi	
	Spheroplast	Sel utuh
Perlu spheroplast	ya	tidak
Efisiensi transformasi	sedang- tinggi ( $10^2$ - $10^6$ /μg DNA)	rendah - sedang ( $1$ - $10^3$ /μg DNA)
Strain yang cocok	sedikit	kebanyakan strain
DNA yang diperlukan	0,1 - 1,0 μg/ $10^8$ sel	5 - 10 μg/ $10^8$ sel
Fase pertumbuhan sel yang cocok untuk transformasi	log	log atau stasioner
Penyimpanan kompeten sel	jelek	baik
DNA vektor yang cocok	semua	hampir semua

(Diambil dari Tuite, 1992)

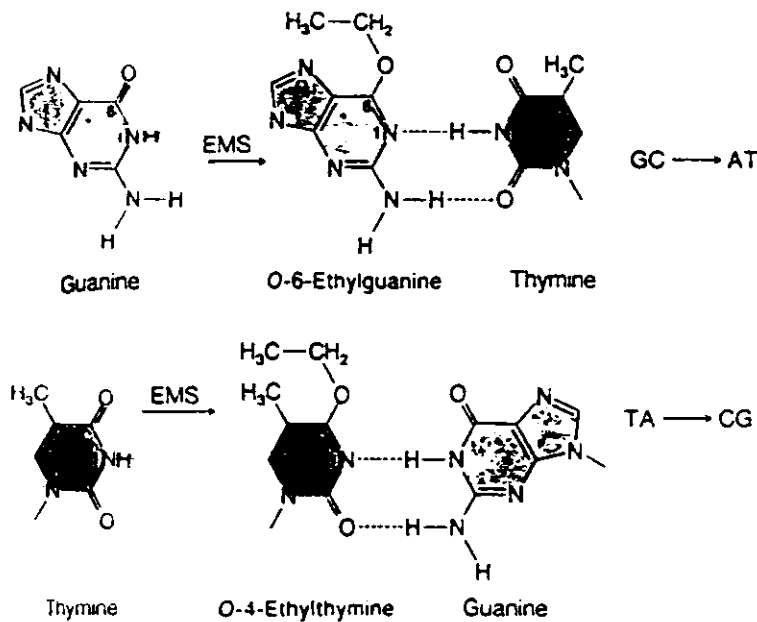
## 2.5. Mutasi pada *S. cerevisiae*

Untuk mempelajari fungsi suatu protein di dalam sel *S. cerevisiae* dapat dilakukan dengan memutasi sel *S. cerevisiae* dengan mutagen tertentu. Mutagen dapat berupa sinar ultra violet (UV) atau zat kimia. Mutagen kimia dibedakan dalam tiga kelompok yaitu : (1) Mutagen yang analog dengan basa nukleotida. Mutagen ini mempunyai kesamaan struktur dengan empat basa normal dari DNA sehingga dapat terinkorporasi ke dalam DNA selama replikasi, misalnya 5-bromourasil yang analog dengan Timin ; (2) Bahan kimia yang bereaksi dengan DNA untuk merubah pasangan basa-basa menjadi pasangan basa yang abnormal, misalnya asam nitrit, nitrosamin, nitrosoguanidin dan etil metana sulponat ; (3) Mutagen frameshift seperti proflavin yang menyebabkan pengurangan atau penambahan basa tunggal atau kadang-kadang beberapa basa. Mutagen frameshift merupakan molekul datar yang mengandung beberapa cincin polisiklis yang mengikat basa purin atau pirimidin DNA. Mutagen ini diduga mengikat basa-basa DNA dari rantai yang sedang tumbuh selama sintesis DNA.

Bahan kimia yang paling umum digunakan untuk memutasi sel ragi *S. cerevisiae* adalah etil metana sulponat (EMS). EMS mempunyai rumus molekul  $C_3H_8O_3S$ . Nama lain dari EMS adalah *Methane Sulphonic Acid*, *Ethylester*, *Ethyl Methane Sulphonic Acid* dan *Ethyl Mesylate*. EMS dikenal sebagai mutagen klasik disamping cahaya UV.

Gugus alkil dari EMS dapat berikatan dengan atom Oksigen yang berikatan hidrogen pada Guanin dan Timin. Aksi zat ini dengan basa-basa DNA dapat dijelaskan sebagai berikut : EMS bereaksi dengan Guanin dan Timin pada rantai DNA dengan cara alkilasi Guanin pada atom Oksigen pada posisi ke 6 menjadi O-6-Etilguanin dan alkilasi Timin pada atom Oksigen pada posisi ke 4 menjadi O-4-Etiltimin. Alkilasi Guanin menjadi O-6-Etilguanin dapat menyebabkan Guanin berpasangan dengan Timin yang seharusnya dengan Sitosin. Pada saat replikasi Timin akan berpasangan dengan Adenin akibatnya terjadi transisi dari GC  $\longrightarrow$  GT  $\longrightarrow$  AT. Alkilasi Timin menjadi O-4-Etiltimin mengakibatkan Timin akan berpasangan dengan Guanin yang seharusnya dengan Adenin. Pada saat replikasi Guanin akan berpasangan dengan Sitosin, akibatnya terjadi transisi dari TA  $\longrightarrow$  TG  $\longrightarrow$  CG. Kedua proses alkilasi ini dapat terjadi di sepanjang rantai DNA yang dimutasi dengan EMS, tetapi transisi GC menjadi AT lebih disukai (Griffith, *et.al.*, 1993). Reaksi Timin dan Guanin dengan EMS disajikan pada Gambar 2.8.

Proses alkilasi Guanin dapat pula terjadi pada posisi N (posisi ke 7) yang menyebabkan ikatan antara purin dan gula menjadi lemah sehingga purin dapat lepas dari nukleotida (depurinasi). Satu purin yang hilang tersebut dapat diganti oleh purin lain atau dilewati dalam proses transkripsi.



Gambar 2.8. Reaksi Guanin dan Timin dengan etil metana sulphonat (EMS). EMS bereaksi dengan Guanin membentuk O-6-Etilguanin dan dengan Timin menghasilkan O-4-Etiltimin. (Diambil dari Griffiths, *et al.*, 1993).

---

### Soal-soal

1. Jelaskan istilah :

- |              |                |                       |
|--------------|----------------|-----------------------|
| a. nukleosom | c. telomer     | e. mutagen frameshift |
| b. centromer | d. spheroplast |                       |

2. Mengapa ragi *S. cerevisiae* dianggap mikroorganisme yang ideal untuk mempelajari proses translasi pada sistem eukariot ?

3. Dinding sel *S. cerevisiae* relatif kuat dan tebal. Apakah komponen penyusun dinding sel itu ? Jelaskan !



4. Di bawah lapisan dinding sel *S. cerevisiae* terdapat ruang periplamik. Zat apakah yang terdapat dalam ruang periplasmik ini ?
5. *S. cerevisiae* dapat menjalani dua macam siklus pertumbuhan yaitu melalui siklus mitosis atau melalui siklus mieosis. Jelaskan kedua macam siklus ini ?
6. DNA mitokondria dan DNA inti sel ragi *S. cerevisiae* mempunyai beberapa perbedaan. Jelaskan perbedaannya.
7. Pada prinsipnya dikenal dua macam metoda transformasi pada sel *S. cerevisiae*. Jelaskan kedua metoda tersebut.
8. Zat kimia yang paling umum digunakan untuk memutasi sel ragi *S.cerevisiae* adalah etil metana sulponat (EMS). Bagaimana aksi zat ini pada DNA ?

## BAB III

### PROSES TRANSLASI

Pada sistem prokariot mekanisme tahap translasi (inisiasi, elongasi dan terminasi) telah banyak dipelajari. Pada ragi dan eukariot lain mekanisme terminasi (tahap akhir translasi) masih belum sepenuhnya dimengerti (Tuite, 1989; Stansfield, *et.al.*, 1995). Dengan demikian fenomena terminasi pada sistem eukariot masih tetap merupakan suatu teka-teki yang masih memerlukan informasi lebih lanjut. Walaupun demikian telah ditemukan informasi bahwa ada beberapa protein yang diduga berperan dalam proses terminasi translasi pada sistem eukariot. Protein itu adalah Sal4 dan Sal3, protein Sal4 dikenal sebagai eRF-1 dan Sal3 sebagai eRF-3. Pada tulisan ini difokuskan pada protein Sal4.

Informasi terakhir mengenai protein Sal4 (eRF-1) adalah Sal4 berinteraksi dengan Sal3 (eRF-3) untuk membentuk suatu kompleks *release-factor* yang fungsional, tetapi mekanisme molekular fungsi protein Sal4 belum banyak diketahui. Pada bagian ini dijelaskan ketiga tahap translasi di ragi *S. cerevisisae* yaitu tahap inisiasi, tahap elongasi dan tahap terminasi serta pengendalian setiap tahap.

### 3.1. Proses Translasi di Ragi

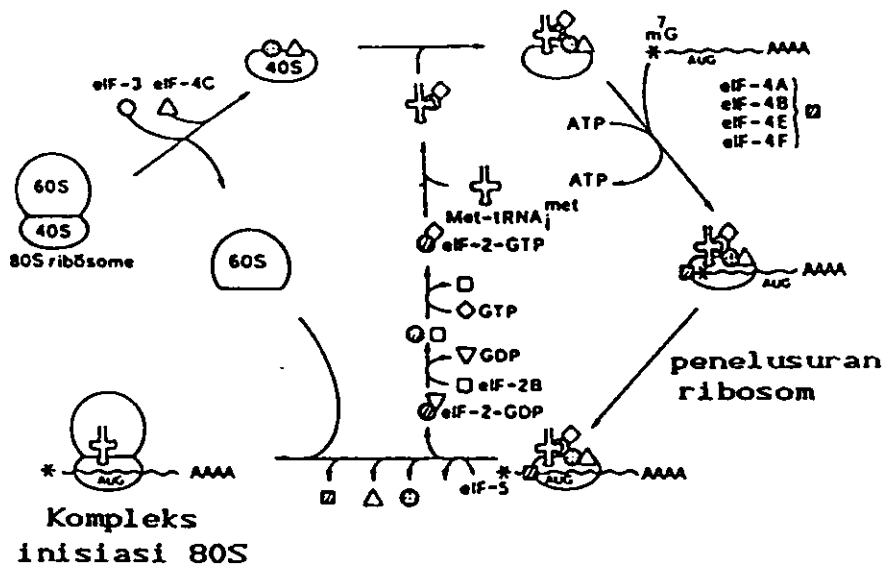
Sintesa protein adalah tahap akhir ekspresi informasi genetik yang dinamakan dengan tahap translasi. Pada tahap translasi informasi genetik dari mRNA diterjemahkan ke dalam rangkaian asam amino yang menyusun suatu polipeptida sebagai produk dari proses translasi. Proses translasi mRNA sitoplasma di ragi berlangsung pada ribosom 80S, terutama terjadi pada ribosom yang berikatan dengan membran, sedangkan ribosom yang bebas belum diketahui fungsinya.

Ribosom 80S merupakan tipe ribosom eukariot yang khas yang terdiri dari dua subunit yaitu 60S dan 40S dan mengandung 4 spesies RNA (25S; 18S; 5,8S dan 5S) dan kurang lebih 75 protein ribosom yang berbeda (Tuite, 1989). Protein yang terlibat pada proses translasi dapat dilihat pada Tabel 3.1. mRNA ragi seperti mRNA eukariot umumnya, jauh lebih stabil daripada mRNA prokariot dan mRNA ragi adalah *monocistronic* yaitu satu gen hanya mengkode pembentukan satu polipeptida. Sifat ini telah dibuktikan secara biokimia oleh Petersen dan McLaughlin pada tahun 1973 maupun secara genetik oleh Sherman dan Stewart pada 1975 (Tuite, 1989).

Proses translasi melibatkan tiga tahap yaitu tahap inisiasi, elongasi, dan terminasi. Dari ketiga tahap tersebut, proses inisiasi relatif merupakan langkah yang lambat sepanjang sintesa protein.

### 3.1.1. Tahap Inisiasi Translasi

Tahap inisiasi merupakan tahap awal pembentukan rantai polipeptida yang dimulai dengan terjadinya pengikatan ribosom subunit kecil (40S) pada mRNA dan selanjutnya berassosiasi dengan ribosom 60S. Pada tahap ini melibatkan paling kurang 10 protein spesifik untuk membentuk kompleks inisiasi yang mengandung mRNA, ribosom 80S dan met-tRNA<sup>Met</sup> melalui sejumlah kompleks senyawa antara. Tahapan proses yang terjadi pada inisiasi translasi disajikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Skema inisiasi translasi pada sel eukariot. Siklus dimulai dengan ribosom 80S dan berakhir dengan kompleks inisiasi 80S. 40S adalah subunit kecil ribosom; 60S adalah subunit besar ribosom; eIF adalah faktor inisiasi eukariot. m<sup>7</sup>G adalah struktur kepala mRNA. (Diambil dari Muller dan Trachsel, 1990).

Pada prinsipnya proses inisiasi terjadi melalui mekanisme pelacakan yaitu pergerakan kompleks ribosom 40S sepanjang mRNA dalam arah 5'----->3' sampai mencapai kodon pemula AUG. Proses yang terjadi melalui mekanisme pelacakan dapat dijelaskan sebagai berikut: ribosom 80S berdisosiasi menjadi subunit 40S dan 60S. Subunit 40S bergabung dengan faktor inisiasi eIF-3 dan eIF-4C. Faktor inisiasi eIF-2 kemudian membawa inisiator methionyl-tRNA ( $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ ) ke subunit 40S. Kompleks yang dihasilkan berikatan dengan mRNA pada bagian kepala. Ikatan yang terjadi dipengaruhi oleh adanya ATP, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E dan eIF-4F. Kompleks ribosom 40S ini selanjutnya bergerak menelusuri mRNA dengan arah 5' ----->3' hingga mencapai kodon inisiasi AUG. Pada saat kompleks ribosom 40S mencapai kodon AUG migrasi berhenti, kemudian subunit 60S bergabung dengan subunit 40S dengan aktivitas eIF-5, selanjutnya faktor-faktor inisiasi dilepaskan kembali dan GTP dihidrolisis (Muller dan Trachsel, 1990). Pada keadaan ini inisiator met-tRNA berlokasi di ribosom sisi P dan ribosom sisi A kosong.

Lima faktor inisiasi dari *S. cerevisiae* yang telah diisolasi dan gennya telah diklon adalah eIF-2 $\alpha$ , eIF-2 $\beta$ , eIF-4A, eIF-4D, eIF-4E dan subunit besar dari eIF-4F. Faktor inisiasi eIF-2 $\alpha$  dan eIF-2 $\beta$  adalah subunit dari eIF-2. Faktor inisiasi IF-4A dari *S. cerevisiae* dikode oleh dua gen yaitu *TIF1* dan *TIF2*. Urutan nukleotida ke dua gen ini berbeda tetapi

keduanya mengkode protein yang identik. Co- eIF-2A juga terlibat dalam pengikatan Met-tRNA<sup>Met</sup> ke ribosom 40S (Muller dan Trachsel, 1990).

### 3.1.2. Tahap Elongasi Translasi

Tahap elongasi translasi merupakan proses perpanjangan polipeptida yang melibatkan pembentukan ikatan peptida pertama sampai ikatan peptida yang terakhir. Pada tahap elongasi terjadi pergerakan ribosom sepanjang mRNA dalam arah 5'----->3' dan asam amino dimasukkan ke dalam rantai polipeptida yang sedang tumbuh. Proses ini merupakan proses yang relatif sangat cepat dalam sintesa protein. Proses elongasi yang terjadi pada prokariot sangat mirip dengan eukariot tingkat rendah maupun eukariot tingkat tinggi. Faktor protein yang dilibatkan pada tahap elongasi di ragi adalah EF-1, EF-2 dan EF-3 (Riis *et.al.*, 1990). EF-1 dan EF-2 fungsinya analog dengan faktor elongasi bakteri yaitu EF-Tu dan EF-G, sedangkan fungsi yang pasti dari EF-3 belum diketahui, tetapi diduga bahwa EF-3 memainkan peranan untuk mengoptimalkan sintesa protein (Belfield, *et.al.*, 1995).

#### 3.1.2.1. Faktor Elongasi EF-1

EF-1 merupakan suatu oligomer yaitu kumpulan beberapa molekul polipeptida yang terdiri dari EF-1 $\alpha$ , EF-1 $\beta$  dan EF-1 $\gamma$ . Ketiga subunit EF-1 ini dapat dipisahkan dengan cara kromatografi dan dibedakan tiga

polipeptida yang berbeda massa molekulnya (Hinnebusch dan Liebman, 1990). EF-1 adalah protein yang paling berlimpah dalam sel, fungsi utamanya adalah untuk memudahkan pengikatan yang benar antara aminoacyl-tRNA ke ribosom sisi A. Ini terjadi jika subunit  $\alpha$  dari EF-1 membentuk kompleks biner dengan GTP dan kemudian membentuk kompleks terner dengan aminoacyl-tRNA (Hinnebusch dan Liebman, 1990).

Subunit  $\alpha$  dari EF-1 ragi telah diisolasi dan dikarakteristik. Subunit ini merupakan rantai polipeptida tunggal dengan massa molekul kurang lebih 50 kD dan titik isoelektrik (pI) 8,9. EF-1 $\beta$  dan EF-1 $\gamma$  ragi mempunyai massa molekul masing-masing 33 kD dan 48 kD. EF-1 $\beta$  fungsinya menstimulasi reaksi pertukaran nukleotida untuk regenerasi kompleks biner EF-1, sedangkan EF-1 $\gamma$  fungsinya belum diketahui. EF-1 $\alpha$  merupakan protein penting untuk viabilitas sel dan telah ditemukan bahwa EF-1 $\alpha$  memperlihatkan efek keakuratan translasi. EF-1 $\alpha$  ragi dikode oleh gen *TEF1* dan *TEF2*.

### 3.1.2.2. Faktor Elongasi EF-2

EF-2 adalah polipeptida rantai tunggal dengan massa molekul antara 80.000-10.0000. EF-2 kadang-kadang dinamakan protein G yang fungsinya mengkatalisis translokasi peptida, termasuk mentransfer

peptidil-tRNA dari ribosom sisi A ke sisi P dan melepaskan tRNA yang bebas dari ribosom sisi P. EF-2 berikatan kuat dengan GTP dan GDP. Translokasi berhubungan dengan terjadinya hidrolisis pada GTP yang mengakibatkan terjadinya perubahan konformasi pada EF-2 yang diperlukan untuk pelepasan tRNA yang efisien.

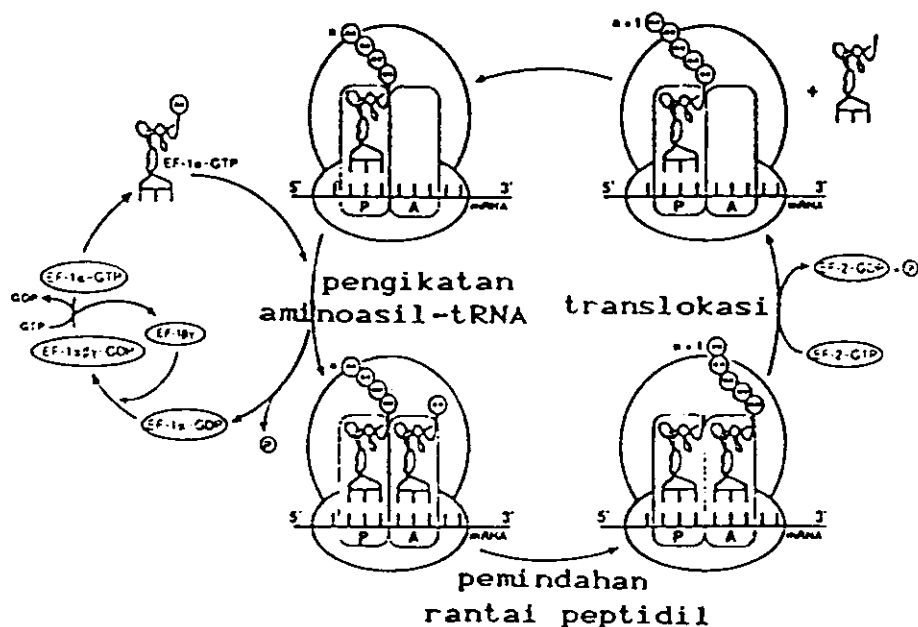
### 3.1.2.3. Faktor Elongasi EF-3

Kebanyakan sistem eukariot dapat mentranslasi dengan hadirnya hanya dua faktor elongasi, tetapi translasi pada ragi dan beberapa fungi lainnya membutuhkan faktor elongasi yang ke tiga yaitu EF-3. EF-3 merupakan rantai polipeptida tunggal dengan massa molekul 125.000 dan titik isoelektrik (pI) 5,9. EF-3 mempunyai aktivitas GTPase dan ATPase dan menstimulir pengikatan kompleks EF-1 $\alpha$ -GTP-aa-tRNA ke ribosom (Muller dan Trachsel, 1990). Menurut Belfield *et.al.* (1995) fungsi EF-3 diduga untuk mengoptimalkan sintesa protein dengan cara merubah konformasi dan aktivitas ribosom.

Proses elongasi secara umum dapat dijelaskan sebagai berikut: EF-1 $\alpha$  mengikat GTP dan aminoacyl-tRNA dan menuntun aminoacyl-tRNA ke ribosom sisi A, diikuti dengan pelepasan EF-1 $\alpha$ -GDP dari ribosom. EF-1 $\beta$  memudahkan pertukaran GTP ke GDP. Setelah ikatan peptida terbentuk, EF-2 mentranslokasi mRNA satu kodon ke arah 3'



untuk memungkinkan ribosom menerima sebuah aminoacyl-tRNA yang baru. Siklus yang terjadi pada tahap elongasi translasi dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Skema siklus elongasi translasi pada eukariot. EF adalah faktor elongasi; A adalah ribosom sisi A dan P adalah ribosom sisi P. (Diambil dari Riis, *et al.*, 1990).

Proses di atas sebenarnya dapat dibagi beberapa tahap yaitu: pengikatan aminoacyl-tRNA ke ribosom, pembentukan ikatan peptida dan translokasi.

### 1. Pengikatan aminoacyl-tRNA ke ribosom

Pengikatan aminoacyl-tRNA ke ribosom dimediasi oleh protein EF-1 $\alpha$  yang fungsinya analog dengan EF-Tu yang ditemukan pada *E.coli*. EF-1 $\alpha$  membentuk kompleks biner dengan GTP, kemudian

membentuk kompleks terner dengan aminoacyl-tRNA. Kompleks terner ini selanjutnya berpasangan dengan kodon aminoacyl-tRNA pada ribosom sisi A. Pengikatan aminoacyl-tRNA ke ribosom dimediasi oleh EF-1 $\alpha$  (Gambar 3.2).

## **2. Pembentukan ikatan peptida**

Pembentukan ikatan peptida dikatalisis oleh peptidyl transferase ribosom. Peptidil transferase adalah sistem enzim kompleks yang terletak pada ribosom subunit besar (60S) ragi. Enzim ini tidak membutuhkan protein eksternal untuk memindahkan gugus peptida dari peptidil-tRNA yang terikat pada ribosom sisi P ke gugus  $\alpha$ -amino dari aminoacyl-tRNA yang terikat pada ribosom sisi A.

## **3. Translokasi**

Translokasi merupakan pergerakan ribosom ke satu kodon berikutnya dalam arah 5'----->3', sebagai akibatnya peptidil-tRNA yang pada mulanya berada pada ribosom sisi A, sekarang berada pada ribosom sisi P. Ribosom sisi A siap untuk menerima aminoacyl-tRNA kembali. Proses ini disertai dengan hidrolisis GTP menjadi GDP dan Pi dan dikatalisis oleh EF-2. Proses translokasi disertai dengan pelepasan tRNA yang bebas asam amino dari ribosom sisi P.

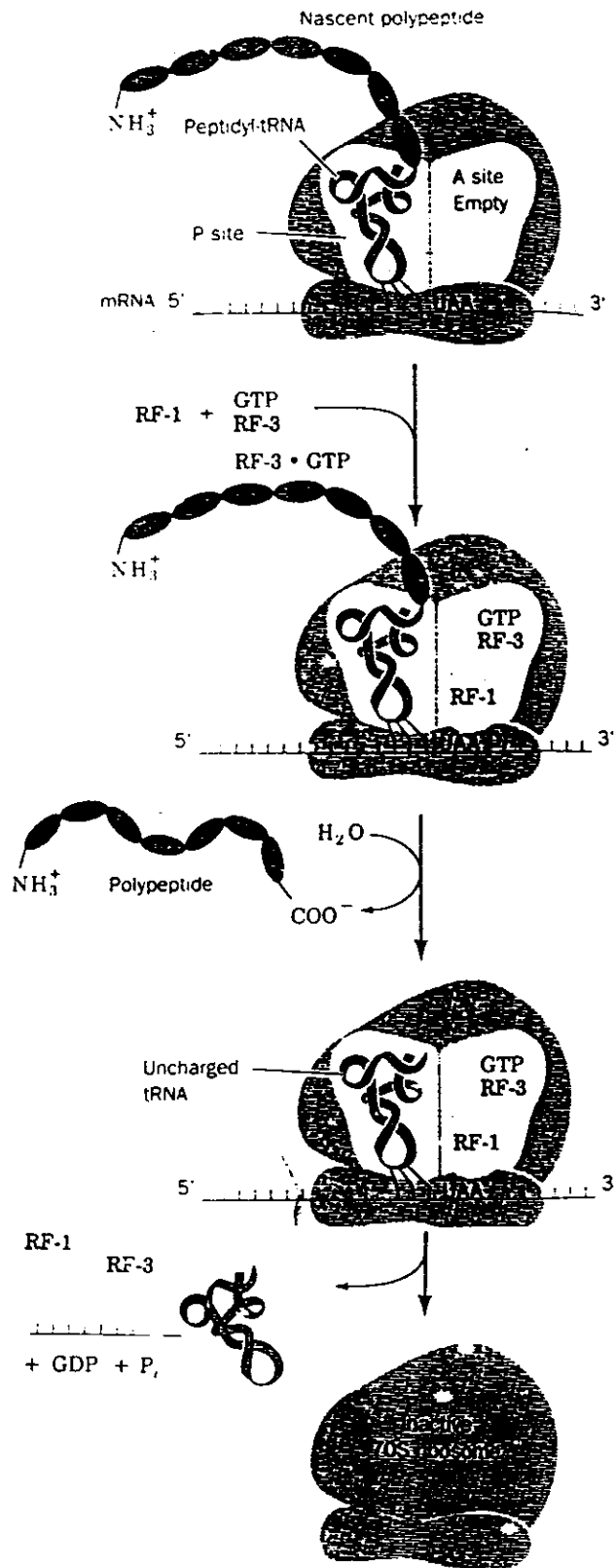
### 3.1.3. Tahap Terminasi Translasi

Terminasi translasi adalah langkah terakhir dari translasi mRNA dan merupakan tahap yang lebih lambat dibanding dengan waktu yang diperlukan untuk menambahkan satu asam amino dalam rantai polipeptida yang sedang tumbuh. Langkah terminasi dapat didefinisikan sebagai proses aktif pada ribosom untuk melepaskan rantai polipeptida yang telah disintesa dari ribosom. Proses ini terjadi jika ribosom bertemu dengan salah satu kodon terminasi atau kodon nonsense (*ochre* UAA, *amber* UAG, *opal* UGA) dengan peptidil- tRNA pada ribosom sisi P. Ketiga kodon di atas adalah tanda terminasi dari translasi mRNA. Tidak seperti kodon sense yang dikenali oleh tRNA spesifik melalui interaksi RNA-RNA, kodon terminasi dikenali oleh protein yang diistilahkan dengan *release factor* (RF). *Release factor* pada prokariot diduga berikatan langsung dengan kodon terminasi pada ribosom sisi A. Proses pengikatan *release factor* pada kodon terminasi prokariot memerlukan ujung 3' dari 16S rRNA yang merupakan komponen RNA dari ribosom (Craigen, *et.al.*, 1990).

*Release factor* pada *E. coli* ada tiga yaitu RF-1, RF-2 dan RF-3. RF-1 mengenali kodon UAA dan UAG, sedangkan RF-2 mengenali kodon UAA dan UGA. RF-3 tidak mempunyai aktivitas pelepasan polipeptida tetapi hanya menstimulir aktivitas RF-1 dan RF-2 dengan bantuan GTP. RF-1

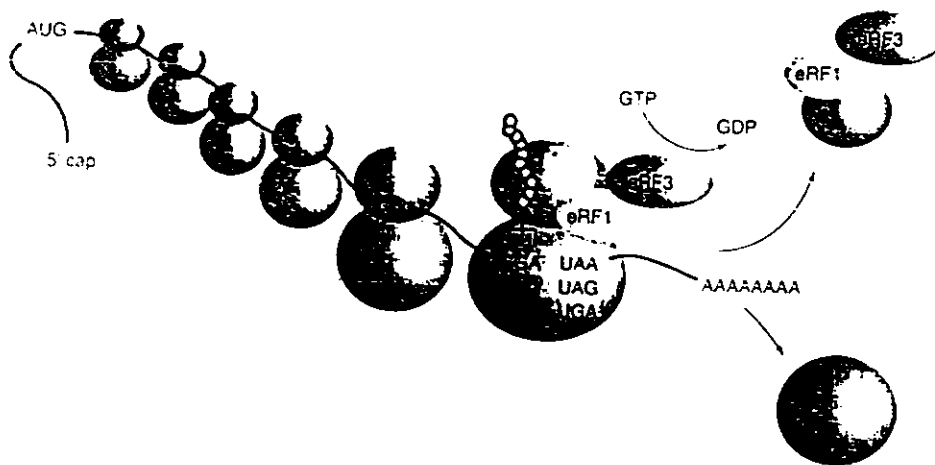
dan RF-2 dapat berfungsi tanpa hadirnya RF-3. Peranan ketiga *release factor* pada proses terminasi translasi pada prokariot (*E. coli*) dapat dijelaskan sebagai berikut: *release factor* (RF-1 atau RF-2) berikatan pada kodon terminasi dan RF-3 berikatan dengan GTP untuk menstimulasi pengikatan RF-1 atau RF-2. Akibatnya peptidil transferase ribosom memindahkan gugus peptidil dari peptidil-tRNA ribosom ke luar dari ribosom daripada ke aminoacyl-tRNA, selanjutnya tRNA yang tidak mengemban peptida lepas dari ribosom dan *release factor* keluar dari ribosom bersamaan dengan hidrolisis GTP menjadi GDP dan Pi. Ribosom yang tidak aktif ini, berdisosiasi menjadi dua subunit 30S dan 50S dengan aktivitas *ribosomal release factor* (RRF) dan kedua subunit terpisah dari mRNA (Gambar 3.3).

Pada sistem eukariot sampai saat ini ditemukan dua *release factor* yaitu eRF-1 (Sal4) dan eRF-3 (Sal3) yang terlibat pada proses terminasi translasi. eRF-1 mengenali ke tiga kodon terminasi yang berinteraksi dengan eRF-3 untuk membentuk suatu kompleks *release-factor* yang fungsional. eRF-1 tidak berfungsi tanpa adanya eRF-3 (Stansfield, *et.al.*, 1995). Secara sederhana proses terminasi translasi pada eukariot dapat dijelaskan sebagai berikut: kompleks *release-factor* eRF-1 dan eRF-3 berikatan pada kodon terminasi dan diikuti oleh hidrolisis GTP menyebabkan pelepasan polipeptida dari peptidil-tRNA pada ribosom sisi P



**Gambar 3.3.** Tahap terminasi translasi pada *E. coli*. RF-3 berikatan dengan GTP menstimulir pengikatan RF-1 pada kodon terminasi (UAA atau UAG). Akibat pengikatan *release factor* ini polipeptida lepas dari peptidil-tRNA. (Diambil dari Voet dan Voet, 1990).

(Stansfield, *et.al.*, 1995). Informasi yang lebih rinci mengenai mekanisme terminasi translasi pada sistem eukariot sampai saat ini masih belum ditemukan, walaupun demikian Stansfield, *et.al.* (1995) telah mengajukan suatu model proses terminasi translasi pada sistem eukariot seperti disajikan pada Gambar 3.4.

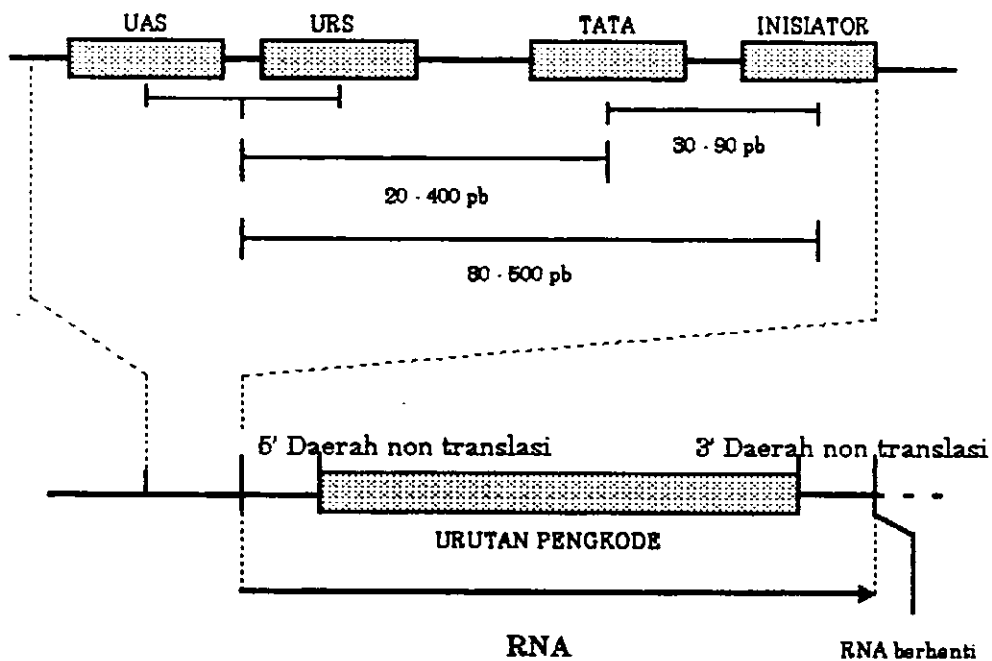


Gambar 3.4. Model umum terminasi translasi pada eukariot. Kompleks *release-factor* eRF-1 dan eRF-3 berikatan pada kodon terminasi, diikuti hidrolisis GTP yang menyebabkan pelepasan polipeptida dari peptidil-tRNA yang berlokasi pada ribosom sisi P, kemudian komponen-komponen kompleks terminasi translasi berdisosiasi. (Diambil dari Stansfield, *et.al.*, 1995).

### 3.2. Pengendalian Tahap Translasi

Eksresi protein di ragi dapat dikendalikan baik pada tahap transkripsi maupun pada tahap translasi. Pengendalian pada tahap transkripsi melibatkan dua unsur pengendali yaitu daerah *Upstream Activating Sequences* (UAS) dan daerah *Upstream Repressing Sequences*

(URS) (Watson, *et.al.*, 1987). Kedua unsur pengendali ini terdapat pada daerah promotor ragi. UAS merupakan kontrol positif yang dapat meningkatkan laju transkripsi sedangkan URS merupakan kontrol negatif yang dapat menurunkan laju transkripsi. Pada daerah promotor ragi, selain daerah UAS dan URS juga terdapat daerah TATA yang diduga peranannya mirip dengan daerah TATA pada *E. coli* yaitu bagian heliks ganda DNA yang membuka menjadi untai tunggal dan daerah inisiator meliputi sisi permulaan dimana transkripsi yang tepat dimulai. Gambar 3.5. menunjukkan struktur promotor ragi.



Gambar 3.5. Struktur promotor ragi. UAS singkatan dari *upstream activating sequence*, URS singkatan dari *upstream repressing sequence*. (Diambil dari Watsson *et.al.*, 1987).

**Tabel 3.1. Faktor-faktor protein yang terlibat pada proses translasi**

Prokariot			Eukariot		
Faktor	Fungsi	Ref.	Faktor	Fungsi	Ref.
Faktor inisiasi IF-1 IF-2 IF-3	membantu pengikatan IF-3 pada subunit 30S mengikat inisiator tRNA dan GTP  melepaskan subunit 30S dari ribosom tidak aktif dan membantu pengikatan mRNA	1	Faktor inisiasi eIF-3 eIF-4C eIF-2  eIF-4A, eIF4B EIF-4E dan eIF-4F  eIF-5	mengikat subunit 40S mengikat subunit 40S membawa inisiator met-tRNA <sup>Met</sup> ke subunit 40S membantu proses pengikatan kompleks 40S dengan mRNA pada bagian kepala  menggabungkan subunit 60S dan 40S yang membawa kompleks inisiator	2
Faktor elongasi EF-Tu EF-Ts EF-G	mengikat aminoacyl-tRNA dan GTP  memindahkan GDP dari EF-Tu  mengkatalis translokasi oleh pengikatan GTP ke ribosom	1	Faktor elongasi EF-1  EF-2  EF-3	memudahkan pengikatan yang benar antara aminoacyl-tRNA ke ribosom sisi A dengan bantuan GTP mengkatalis translokasi peptida dan menstransfer peptidil-tRNA dari ribosom sisi A ke sisi P dan melepaskan tRNA yang bebas asam amino dari sisi P barangkali untuk mengoptimalkan keakuratan sintesa protein	3  5
Release faktor RF-1 RF-2 RF-3	mengenal kodon terminasi UAA dan UAG mengenal kodon terminasi UAA dan UGA mengikat GTP dan menstimulir pengikatan RF-1 dan RF-2	1	Release faktor eRF-1(Sal4)  eRF-3(Sal3)	mengenal ketiga kodon terminasi berinteraksi dengan Sal4 untuk membentuk kompleks <i>release-factor</i> fungsional	4

Keterangan : (1) Voet dan Voet, 1990, (2) Muller dan Trachsels, 1990, (3) Riss, *et al.*, 1990, (4) Stansfield, *et al.*, 1995, (5) Belfield, *et al.*, 1995.



Pengendalian pada tahap translasi terjadi baik pada tahap inisiasi, elongasi maupun terminasi dari serangkaian proses sintesa protein. Beberapa faktor telah diketahui mempengaruhi efisiensi translasi dari mRNA, diantaranya struktur sekunder mRNA, struktur daerah kepala 5' (hulu dari kodon AUG), urutan RNA yang mengapit kodon inisiasi dan penambahan poli A pada akhir ujung 3' (Muller dan Trachsel, 1990). Kontrol keakuratan translasi secara *in vivo* tidak hanya dipengaruhi oleh mRNA saja tetapi oleh keseluruhan kompleks ribonukleo protein yang terdiri dari ribosom, faktor-faktor terlarut, protein-protein yang berikatan dengan ribosom bersama-sama mengatur sintesa protein.

### 3.2.1. Pengendalian Tahap Inisiasi Translasi

Pengendalian pada tahap translasi dipengaruhi oleh faktor-faktor yang berhubungan dengan seleksi kodon pemula AUG, karena pada ragi umumnya dikenal kodon ini. Faktor-faktor tersebut antara lain eIF-2, perubahan antikodon pada inisiator tRNA. Pengamatan yang dilakukan oleh Donahue dan koleganya (1988) menunjukkan bahwa perubahan antikodon pada inisiator tRNA dari 3'UAC5' ke 3'UCC5' menyebabkan inisiasi translasi terjadi pada kodon AGG dan tidak pada kodon lainnya. Dengan demikian komplementasi antara AUG pada mRNA dan antikodon pada inisiator tRNA adalah kriteria yang penting dalam seleksi kodon pemula, demikian juga dengan EF-2. Mutasi pada eIF-2 $\alpha$  dan eIF-2 $\beta$

memungkinkan inisiasi terjadi pada kodon UUG (Muller dan Trachsel, 1990).

Beberapa daerah struktural dari mRNA juga mempengaruhi kecepatan translasi pada tahap inisiasi, misalnya sifat nukleotida pada posisi -3 (A pada kodon AUG adalah +1). Suatu purin (lebih disukai Adenin) pada posisi ini mengakibatkan peningkatan laju inisiasi lebih tinggi daripada pirimidin (Raue *et.al.*, 1990). Sebuah A (Adenin) pada posisi -3 menstimulasi inisiasi 2-3 kali dibandingkan dengan U (Muller dan Trachsel, 1990). Disamping hal di atas, penggantian purin oleh pirimidin juga diamati pada posisi -3 dan ternyata mempunyai pengaruh yang berbeda untuk sel yang berbeda, misalnya diamati pada sel ragi dan sel hewan. Pada sel hewan penggantian purin pada posisi -3 oleh pirimidin menunjukkan pengaruh yang besar dibandingkan pada sel ragi (Raue, *et. al.*, 1990). Perubahan nukleotida pada posisi lain mempunyai pengaruh yang lebih kecil.

### **3.2.2. Pengendalian Tahap Elongasi Translasi**

Efisiensi translasi juga dipengaruhi pada tingkat elongasi. Faktor-faktor yang berperan pada tahap ini adalah adanya elemen-elemen dari struktur sekunder di dalam daerah pengkodean mRNA dan kodon bias yaitu penggunaan kodon alternatif untuk asam amino yang sama (Raue, *et.al.*, 1990). Struktur sekunder dapat menurunkan efisiensi translasi

dengan cara memperlambat proses elongasi. Namun demikian struktur tusuk konde dapat pula memediasi efisiensi translasi, bila berada di daerah 3' dari kodon AUG atau berada di sekeliling kodon AUG dimana AUG berada dalam *loop*.

Peranan kodon bias di ragi dalam pengendalian laju translasi belum dapat dibuktikan dengan jelas. Beitian menunjukkan adanya pengaruh kodon bias terhadap laju translasi. Eksperimen untuk menguji pengaruh kodon bias pada efisiensi translasi agak sulit dilakukan karena eksperimen tersebut memerlukan perubahan di dalam mRNA yang juga mempengaruhi kestabilan dan struktur sekunder mRNA.

### 3.2.3. Pengendalian Tahap Terminasi Translasi

Pengendalian pada tahap terminasi melibatkan suppressor tRNA alami. Hal ini telah dideteksi pada tanaman maupun hewan. Pada ekspresi gen yang berhubungan dengan virus tRNA suppressor diduga berperan dalam regulasi ekspresi gen dengan cara menekan secara parsial kodon terminasi, akibatnya dihasilkan dua protein yang berbeda panjangnya tetapi mempunyai daerah urutan N-terminal yang identik

---

#### Soal-soal

1. Jelaskan istilah :

- |                       |                        |                    |
|-----------------------|------------------------|--------------------|
| a. translasi          | c. elongasi translasi  | e. daerah TATA     |
| b. inisiasi translasi | d. terminasi translasi | f. daerah UAS, URS |

2. Protein-protein apa saja yang terlibat pada tahap inisiasi, elongasi dan terminasi translasi di sistem prokariot dan sistem eukariot ? Jelaskan fungsi setiap protein itu !
3. Proses translasi di ragi *S. cerevisiae* melibatkan tiga tahap yaitu tahap inisiasi, tahap elongasi dan tahap terminasi translasi. Jelaskan tiap tahap proses translasi tersebut !
4. Pengendalian proses translasi di ragi *S. cerevisiae* terjadi baik pada tahap inisiasi, elongasi maupun pada tahap terminasi translasi. Jelaskan pengendalian setiap tahap proses translasi itu !
5. Ekspresi protein di ragi dapat dikendalikan baik pada tahap transkripsi maupun pada tahap translasi. Jelaskan pengendalian pada tahap transkripsi !

## BAB IV

### GEN SUPPRESSOR

Gen yang meniadakan mutasi pada gen lain disebut gen suppressor. Sebagian besar gen suppressor merupakan mutan-mutan tRNA yang mempunyai antikodon yang komplemen dengan kodon termutasi sehingga dapat membawa asam amino secara normal.

Secara umum suatu suppressor dapat dibagi dalam tiga kelompok berdasarkan efek mutasi yang dapat dihilangkannya yaitu suppressor missense, suppressor nonsense dan suppressor frameshift. Suppressor missense dapat menghilangkan efek mutasi missense yaitu mutasi yang diakibatkan oleh substitusi pasangan basa dan menyebabkan perubahan ke kodon sense yang lain. Suppressor missense merupakan suppressor tRNA yang antikodonna termutasi sehingga mengenali kodon termutasi (kodon missense). Hal ini dapat diamati pada gen triptopan sintetase A yang mengalami mutasi dimana glisin digantikan oleh arginin sebagai akibatnya dihasilkan enzim yang tidak aktif, tetapi dengan adanya suppressor missense menyebabkan pemasukan glisin pada sisi mutasi arginin dan enzim dapat aktif kembali.

Suppressor frameshift dapat menghilangkan efek mutasi frameshift yaitu mutasi yang disebabkan oleh pengurangan atau penambahan satu

nukleotida. Suppressor tRNA yang dapat menghilangkan mutasi frame-shift misalnya glisin-tRNA yang membawa sebuah basa tambahan dalam antikodonya yang mana urutan CCC digantikan oleh CCCC. Urutan basa tambahan ini tidak hanya memungkinkan glisin-tRNA untuk berpasangan dengan empat basa pada kodon mRNA sekaligus tetapi juga mengakibatkan translokasi empat nukleotida pada mRNA dari ribosom sisi A ke sisi P. Dengan demikian rangka bacaan diperbaiki kembali ke posisi yang benar. Suppressor frameshift tRNA juga dapat bertindak pada mutasi penghapusan satu basa dengan cara membaca hanya dua basa.

Suppressor nonsense dapat menghilangkan efek mutasi nonsense dengan adanya suatu suppressor tRNA yang mengenali kodon nonsense (UAA,UAG,UGA) sebagai kodon sense dan mengkode asam amino, sehingga memungkinkan terjadinya translasi normal kembali, tetapi hal ini sangat tergantung pada kesanggupan suppressor tRNA untuk berkompetisi dengan *release factor* pada ribosom sisi A.

#### 4.1. Suppressor Nonsense di Ragi

Suppressor nonsense di ragi *S. cerevisiae* digolongkan atas dua kelas utama yaitu suppressor omnipotent dan suppressor tRNA. Suppressor omnipotent diistilahkan juga dengan *non-tRNA-mediated*, suppressor

kodon-non spesifik, sedangkan suppressor tRNA diistilahkan juga dengan *suppressor tRNA-mediated* atau supressor kodon spesifik.

Suppressor tRNA secara spesifik dapat menekan satu kodon terminasi. Suppressor ini umumnya berasal dari mutasi pada antikodon tRNA normalnya. Pada ragi misalnya tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> dan tRNA<sup>Leu</sup>. Suppressor tRNA<sup>Ser</sup> pada ragi disebut juga dengan *ochre suppressor* (*SUQ5*) yang dinamakan juga *SUP16*. Suppressor ini pada mulanya diisolasi oleh Cox (1965). Analisa urutan DNA menunjukkan bahwa pada *SUQ5* telah terjadi perubahan nukleotida pada antikodonna, yaitu terjadi perubahan 3'AGU5' menjadi 3'AUU5'.

Suppressor omnipotent dapat menekan lebih dari satu kodon terminasi. Sampai saat ini telah diidentifikasi 11 lokus gen suppressor omnipotent di ragi, meskipun hanya baru dua yang produk gennya telah dikarakteristik yaitu gen *SUP45* dan gen *SUP35*. Mutasi pada kedua lokus gen ini menunjukkan kehilangan keakuratan translasi (Tuite, *et.al.*, 1990). Fenotip suppressor omnipotent dapat dibagi menjadi dua yaitu fenotip suppressor dominan dan fenotip suppressor resesif. Suppressor omnipotent resesif memperlihatkan fenotip allele spesifik misalnya kebanyakan allele ini menyebabkan pertumbuhan yang lambat, temperatur sensitif dan kemampuan berspora yang rendah. Beberapa allele hipersensitif dengan antibiotik paromomycin dan hygromycin. Gen *SUP45* dan gen *SUP35*

menunjukkan fenotip omnipotent resesif. Gen *SUP45* dinamakan juga *SUP1*, *SUP47*, *SUPQ*, dan *SALA* sedangkan *SUP35* disebut juga *SUP2*, *SUP39*, *SUPP*, *SUP12* dan *SAL3*.

#### 4.2. Allosuppressor di Ragi

Mutan-mutan yang mampu meningkatkan aktivitas tRNA suppressor seperti tRNA- *SUQ5* disebut mutan allosuppressor dan ditandai dengan simbol *sal*. Sampai saat ini telah dikenal enam allosuppressor yaitu *sal1*, *sal2*, *sal3*, *sal4*, *sal5* dan *sal6*, tetapi baru *sal3* dan *sal4* yang banyak dipelajari sedangkan *sal2*, *sal1*, *sal5* dan *sal6* masih tetap belum terdefinisikan.

Studi mekanisme allosuppressor untuk gen *SALA* telah dipelajari dengan cara mengisolasi dan menentukan urutan nukleotida empat allele *sal4*. Hasilnya menunjukkan bahwa keempat allele *sal4* mengandung perubahan basa tunggal yang membentuk suatu *ochre* (TAA) kodon terminasi dalam gen *sal4* dimana semua allele adalah nonsense. Dari hasil penelitian ini disarankan bahwa fenotipik allosuppressor timbul sebagai hasil mutasi nonsense pada gen *SALA* (Akhmaloka, 1991).



---

### Soal-soal

1. Untuk setiap istilah di bawah ini, berikan penjelasannya.
  - a. gen suppressor
  - b. suppressor missense
  - c. suppressor nonsense
  - d. suppressor frameshift
  - e. suppressor omnipotent
  - f. allosuppressor
2. Sebutkan fenotipik suppressor omnipotent resesif pada *S. cerevisiae*.  
Gen apa yang menunjukkan fenotipik suppressor resesif pada ragi *S. cerevisiae* ?
3. Suppressor nonsense di ragi *S. cerevisiae* digolongkan atas dua kelas utama. Jelaskan kedua kelas ini.

## BAB V

### GEN *SAL4*

Gen *SAL4* dinamakan juga *SUP45*, *SUP47*, *SUP1* dan *SUPQ*. Gen *SUP45* berada dalam kromosom II di ragi *S. cerevisiae*. Gen ini berada dalam bentuk kopi tunggal dalam genom haploid ragi dan esensial untuk viabilitas sel. Gen *SUP45* telah diklon dan telah ditentukan urutan nukleotidanya (Breining dan Piepersberg, 1986). Tidak seperti kebanyakan gen-gen yang mengkode protein ribosom, gen *SUP45* tidak mempunyai intron dan mengkode protein dengan berat molekul 49 kD, lebih besar dari protein ribosom ragi yang dikenal. Daerah pengkode gen *SUP45* terdiri dari 437 asam amino. Dari komposisi asam aminonya, ternyata protein Sup45 bersifat lebih asam, tidak seperti kebanyakan protein ribosom yang dikenal (Breining dan Piepersberg, 1986). Gen *SUP45* diekspresi pada kecepatan yang rendah.

Gen *SAL4* telah diisolasi dan juga telah ditentukan urutan nukleotidanya (Akhmaloka, 1991). Berdasarkan urutan basa dan peta restriksinya ternyata gen ini identik dengan gen *SUP1* (*SUP45*) yang telah diisolasi dan ditentukan urutan nukleotidanya oleh Breining dan Piepersberg (1986). Perbedaan hanya pada satu asam amino yaitu Gln<sup>41</sup>

pada Sal4p sedangkan pada Sup45p adalah Leu<sup>41</sup>. Urutan nukleotida gen *SAL4* dapat dilihat pada Gambar 5.1.

```

1
ATG GAT AAC GAG GTT GAA AAA AAT ATT CAG ATC TGG AAG GTC
AAG AAG TTG GTC CAA TCT TTA GAA AAA GCT AGA GCT

27
AAT GGT ACT TCT ATG ATT TCC TTA GTT ATT CCT CCT AAG GGT
CTA ATT CCA CTG TAC CAA AAA ATG TTA ACA GAT GAA

53
TAT GGT ACT GCC TCG AAT ATT AAA TCT AGG GTT AAT CGT CTT
TCC GTT TTA TCT GGT ATC ACT TCC ACC CAA CAA AAG

79
TTG AAG CTA TAT AAT ACT TTG CCC AAG AAC GGT TTA GTT TTA
TAT TGT GGT GAT ATC ATC ACT GAA GAT GGT AAA GAA

105
AAA AAG GTC ACT TTT GAT ATC GAA CCT TAC AAA CCT ATC AAC
ACA TCC TTA TAT TTG TGT GAT AAC AAA TTT CAT ACA

131
GAA GTT CTT TCG GAA TTG CTT CAA GCT GAT GAC AAG TTC GGT
TTT ATA GTC ATG GAC CGT CAA GGT ACT TTG TTT GGT

157
TCT GTG TCC GGT AAT ACG AGA ACT GTT TTA CAT AAA TTT ACT
GTC GAT CTG CCA AAA AAG CAT GGT AGA GGT GGT CAA

183
TCT GCG CTT CGT TTT GCT CGT TTA AGA GAA GAA AAA AGA CAT
AAT TAT GTG AGA AAG GTC GCC GAA GTT GCT GTT CAA

209
AAT TTT ATT ACT AAT GAC AAA GTC AAT GTT AAG GGT TTA ATT
TTA GCT GGT TCT GCT GAC TTT AAG ACC GAT TTG GCT

235
AAA TCT GAA TTA TTC GAT CCA AGA CTA GCA TGT AAG GTT ATT
TCC ATC GTG GAT GTT TCT TAT GGT GGT GAA AAC GGT

261
TTC AAC CAG GCT ATC GAA TTT TCT GCC GAA GCG TTG GCC AAT
GTC AAG TAT GTT CAA GAA AAG AAA TTA TTG GAG GCA

287
TAT TTT GAC GAA ATT TCC CAG GAC ACT GGT AAA TTC TGT TAT
GGT ATA GAT GAT ACT TTA AAG GCA TTG GAT TTA GGT

313
GCA GTC GAA AAA TTA ATT GTT TTC GAA AAT TTG GAA ACT ATC
AGA TAT ACA TTT AAA GAT GCC GAG GAT AAT GAG CTT

339
ATA AAA TTC GCT GAA CCA GAA GCC AAG GAC AAG TCG TTT GCT
ATT GAC AAA GCT ACC GGC CAA GAA ATG GAC GTT GTC

365
TCC GAA GAA CCT TTA ATT GAA TGG CTA GCA GCT AAC TAC AAA
AAC TTC GGT GCT ACC TTG GAA TTC ATC ACA GAC AAA

391
TCT TCA GAA GGT GCC CAA TTT GTC ACA GGT TTT GGT GGT ATT
GGT GCC ATG CTG CGT TAC AAA GTT AAT TTT GAA CAA

417
CTA GTT GAT GAA TCT GAG GAT GAA TAT TAT GAC GAA GAT GAA GGA TCC GAC TAT GAT TTC ATT TAA
437

```

**Gambar 5.1.** Urutan nukleotida gen *SAL4 S. cerevisiae*. Kodon inisiasi gen *SAL4* adalah AUG dan kodon terminasi UAA. Angka menunjukkan nomor urut kodon. (Diambil dari Breining dan Piepersberg, 1986).

### 5.1. Fenotip Mutan *sal4*

Untuk mempelajari fenomena gen *SAL4* dapat melalui mutasi pada gen tersebut. Perubahan urutan nukleotida akibat mutasi pada gen *SAL4* menghasilkan mutan *sal4*. Mutan *sal4* memperlihatkan fenotip allosuppressor karena mutan ini mampu meningkatkan aktivitas suppressor tRNA misalnya *SUQ5*. Disamping itu mutan-mutan *sal4* mempunyai fenotip antara lain: kemampuan berspora yang rendah, hipersensitif dengan antibiotik seperti paromomycin dan hygromycin B, sulit tumbuh dan sensitif temperatur.

Fenotip allosuppressor diidentifikasi berdasarkan perubahan warna koloni ragi pada media YPD. Misalnya ragi *S. cerevisiae* strain BSC483/1a *wild type* yang berwarna merah pada media YPD akan berwarna putih bila terjadi mutasi pada gen allosuppressor. Warna merah ragi *S. cerevisiae* strain BSC483/1a pada media YPD disebabkan kerusakan pada biosintesa adenin yaitu pada gen *ADE2*. Kerusakan pada gen ini mengakibatkan enzim yang dikode oleh gen tersebut tidak dapat dihasilkan, akibatnya senyawa antara pembentukan adenin, 5-aminoimidazole ribonukleotida terakumulasi, sehingga senyawa tersebut dikonversikan menjadi metabolit sekunder lain yaitu aminoimidazole ribotide yang berwarna merah oleh aktivitas enzim lain. Warna putih pada mutan allosuppressor terjadi karena jalur sintesa adenin telah pulih kembali akibat mutan *sal4* dapat menekan mutasi pada gen *ade2-1* dalam

latar belakang genetik *SUQ5*. Ini menandakan bahwa aktivitas suppressor meningkat akibat mutasi pada gen *SAL4*.

Mekanisme allosuppressor di ragi khususnya gen *SAL4* telah dipelajari melalui beberapa allele *sal4*. Dari empat *non-conditional lethal* ternyata keempatnya mengandung perubahan pasangan basa tunggal yang menghasilkan kodon terminasi *ochre* (TAA) dalam daerah pengkode *SAL4*, dan menunjukkan allele tersebut adalah allele nonsense. Dari hasil pengamatan ini disarankan bahwa fenotip allosuppressor timbul sebagai akibat penurunan jumlah dari protein Sal4 yang merupakan hasil mutasi nonsense pada gen *SAL4* (Akhmaloka, 1991). Oleh karena gen *SAL4*/*SUP45* penting untuk kehidupan ragi, maka mutan allele ini hanya akan hidup dengan adanya *SUQ5*-tRNA suppressor.

Untuk menguji efisiensi allosuppressor dari mutan-mutan *sal4* dapat diamati secara kuantitatif melalui analisa aktivitas enzim  $\beta$ -galaktosidase. Enzim  $\beta$ -galaktosidase yang dihasilkan adalah hasil ekspresi gen fusi antara *PGK1* ragi dengan ujung-N gen *LacZ* melalui suatu oligonukleotida sintetik yang mengandung kodon terminasi untuk mengoreksi pembacaan fusi gen (Firoozan, *et.al.*, 1991). Plasmid yang membawa gen fusi ini dimasukkan ke dalam sel mutan *sal4*. Bila kodon terminasi dibaca dan suatu asam amino dimasukkan maka enzim  $\beta$ -galaktosidase fungsional akan disintesis. Analisa  $\beta$ -galaktosidase dimaksudkan untuk mengetahui sifat mutan *sal4* sebagai suppressor

omnipotent yang mampu menekan kodon nonsense UAA, UAG dan UGA. Bila mutan *sal4* yang telah diisolasi mampu memberikan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase, hal ini menyarankan bahwa mutan-mutan tersebut bersifat sebagai suppressor omnipotent yang mampu menekan mutasi nonsense sehingga proses translasi dapat mengekspresikan enzim  $\beta$ -galaktosidase. Jika enzim  $\beta$ -galaktosidase yang dihasilkan tinggi, ini berarti konsentrasi protein Sal4 turun akibatnya *SUQ5* lebih dapat lagi menekan mutasi nonsense pada gen  $\beta$ -galaktosidase.

## 5.2. Peranan Gen *SAL4*

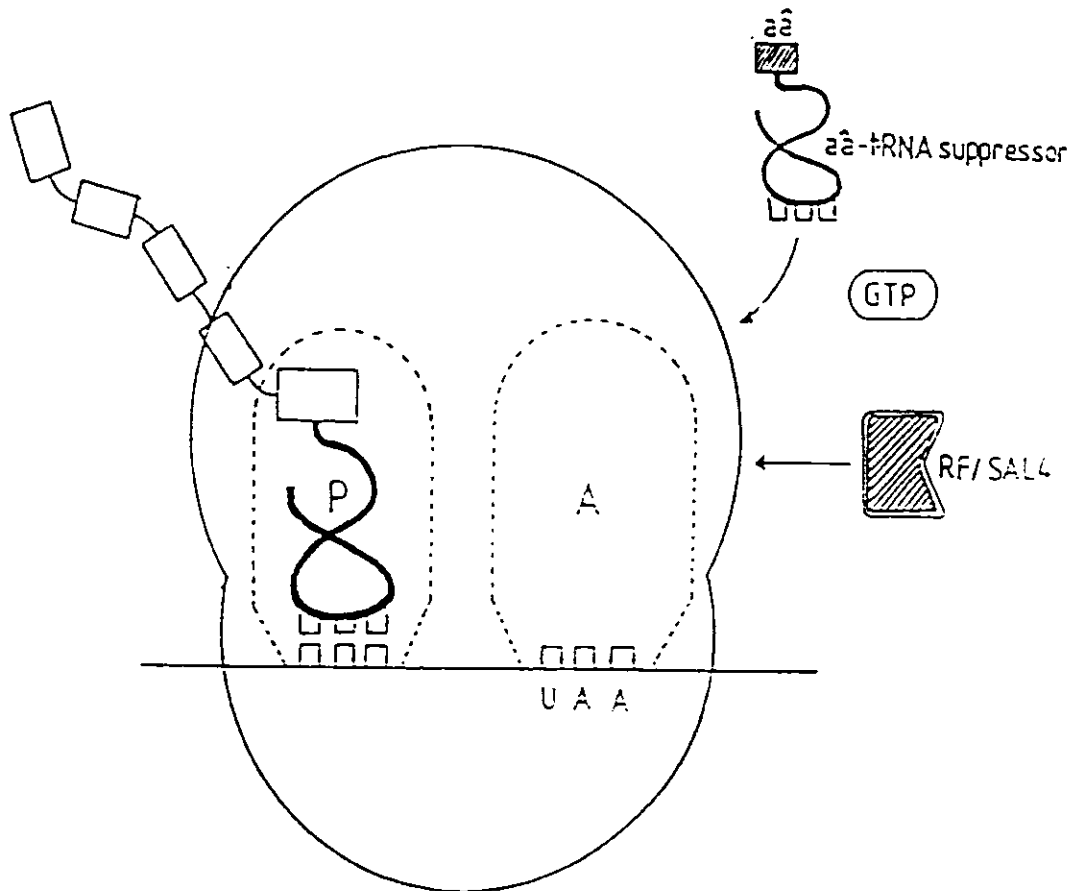
Gen *SAL4* pada *S. cerevisiae* diduga berfungsi dalam pengendalian ketepatan terminasi translasi (Tuite *et.al.*, 1994). Gen *SAL4* (*SUP45*) mungkin mengkode protein yang merupakan komponen dari subunit ribosom (40S) atau mungkin mengkode enzim yang memodifikasi subunit (Hinnebusch, Liebman, 1990; Eustice *et.al.*, 1986) tetapi ditemukan bahwa produk gen *SAL4* (*SUP45*) bukanlah protein ribosom (Hinnebusch dan Liebman, 1990). Tuite *et.al.* (1990) menemukan bahwa protein Sal4 terikat kuat dengan ribosom karena protein Sal4 tidak dapat dideteksi dalam fraksi supernatan dan hanya dipindahkan sebagian kecil saja dari ribosom dengan pencucian KCl 0,5M.

Akhmaloka (1991) mengusulkan tiga model yang menjelaskan peranan protein Sal4 dalam proses translasi yaitu Sal4p sebagai *release factor*, *proofreading factor* dan memediasi reaksi terminasi.

#### **Model 1: Sal4 sebagai *release factor***

Pada tahap terminasi translasi di *E. coli* dan di eukariot diperlukan *release factor* untuk melepaskan polipeptida yang telah disintesa dari ribosom sisi P. Pada kodon terminasi (di ribosom sisi A) diduga terjadi kompetisi antara *release factor* dengan suppressor tRNA dalam menghentikan kodon terminasi. Fenotip allosuppressor dapat muncul dengan cara menggantikan salah satu kompetisi yaitu dengan cara merusak fungsi *release factor* atau dengan cara mereduksi tingkat selular dari *release factor*.

Dari pengamatan 4 buah mutan *sal4* yang tidak sensitif temperatur (*sal4-18*, *sal4-22*, *sal4-28* dan *sal4-42*) telah ditunjukkan adanya penurunan jumlah protein Sal4 tetapi protein Sal4 tidak menurunkan efisiensi dari *ochre* suppressor. Gejala ini adalah suatu harapan jika Sal4 adalah suatu *release factor* (Akhmaloka, 1991). Berdasarkan studi homologi protein memperlihatkan bahwa protein Sal4 sangat mirip dengan kelompok protein *release factor* dan diusulkan Sal4p adalah termasuk kelompok protein yang dikenal sebagai eRF-1 (Frolova, *et.al.*, 1994). Model Sal4 sebagai *release factor* disajikan pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2. Model 1 : Sal4 sebagai *release factor*. (Diambil dari Akhmaloka, 1991).

### Model 2 : Sal4 sebagai *proofreading factor*

Gen *SAL4* mungkin mengkode suatu protein yang membentuk bagian sisi aktif yang terlibat dalam mekanisme *proofreading*. Rusaknya *proofreading* di *E. coli* dapat disebabkan oleh protein ribosom atau mutan EF-Tu. Pada *E. coli* ketepatan interaksi kodon-antikodon didasarkan pada pengikatan dari aminoacyl-tRNA ke ribosom sisi A yang dilakukan melalui mekanisme *GTP-dependent ribosomal proofreading*.



Fungsi Sal4p diduga mirip seperti EF-Tu di *E. coli* dalam mengoreksi kebenaran interaksi kodon-antikodon pada ribosom sisi A yang terjadi karena pengikatan aminoacyl-tRNA ke ribosom yang dimediasi oleh protein EF-1 $\alpha$ . EF-1 $\alpha$  analog dengan EF-Tu yang ditemukan di *E. coli* (Riis, *et.al.*, 1990). Data lain menunjukkan bahwa Sal4p hadir dalam jumlah yang sedikit dalam sel yaitu kurang lebih satu molekul Sal4p untuk setiap 10-20 ribosom (Tuite *et.al.*, 1994). Perbandingan ini tidak konsisten dengan yang dibutuhkan untuk proses elongasi. Sebaliknya EF-1 ditemukan dalam jumlah yang melimpah di dalam sel (Hinnebusch dan Liebman, 1990). Model Sal4 sebagai *proofreading factor* dapat dilihat pada Gambar 5.3.

### **Model 3 : Sal4 memediasi reaksi terminasi**

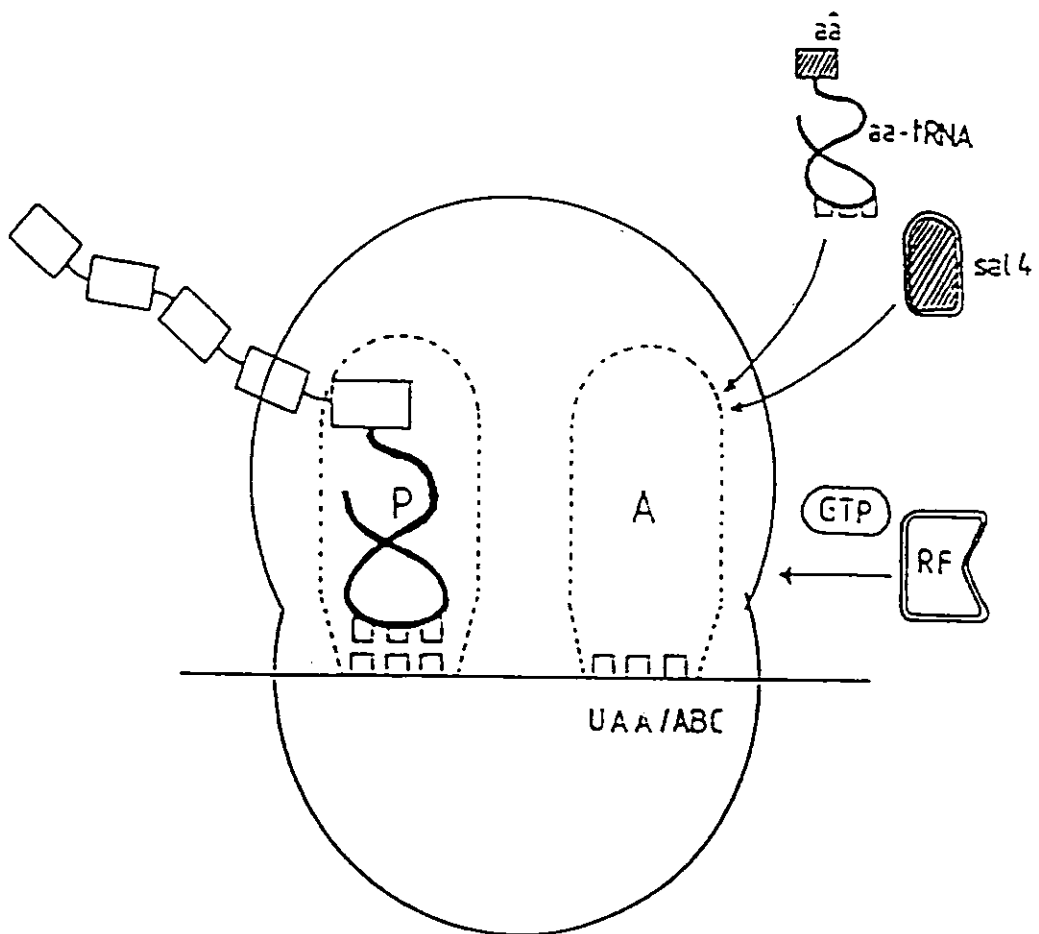
Pada sistem prokariot (*E. coli*) diperlukan tiga protein yang berfungsi sebagai *release factor* yaitu RF-1, RF-2 dan RF-3. RF-1 mengenali kodon UAA dan UAG, RF-2 mengenali kodon UAA dan UAG. RF-3 berperan untuk memudahkan pengikatan RF-1 dan RF-2 ke ribosom yang aktivitasnya memerlukan GTP. Pada eukariot (ragi) telah ditemukan dua *release factor* yaitu eRF-1 dan eRF-3 (Stansfield, *et.al.*, 1995). Aktivitas protein eRF-1 dan eRF-3 juga memerlukan GTP untuk menjalankan fungsinya. Bila Sal4p adalah suatu protein RF-3 ragi, maka diharapkan Sal4p mempunyai aktivitas *ribosomal-dependent GTPase*

seperti yang ditemukan pada RF-3 *E. coli*. Ini berarti Sal4p diharapkan mempunyai sisi pengikatan GTP, tetapi sisi pengikat GTP ini justru dipunyai oleh protein Sup35 yang juga terbukti berperan dalam memelihara ketepatan translasi (Tuite dan Stansfield, 1994).

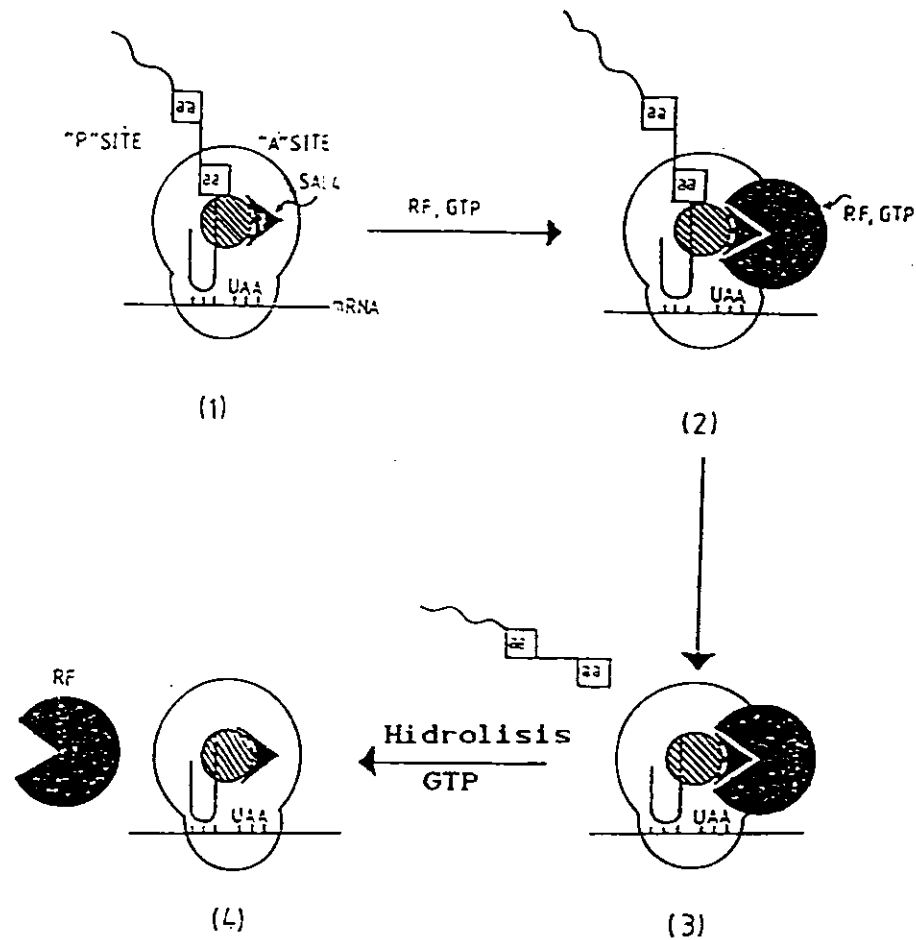
Model ke tiga ini dapat menjelaskan mengapa rendahnya kandungan protein Sal4 menyebabkan fenotip allosuppressor. Peristiwa ini akan menurunkan afinitas pengikatan *release factor* ke kodon terminasi pada ribosom sisi A, sehingga lebih memungkinkan tRNA suppressor untuk berkompetisi dengan *release factor* pada kodon tersebut. Tingginya jumlah Sal4p diduga tidak akan mempengaruhi kompetisi antara tRNA suppressor dan *release factor*, karena Sal4 tidak akan terlibat secara langsung dalam kompetisi dengan tRNA suppressor tetapi hanya memediasi pengikatan *release factor* ke ribosom (Akhmaloka, 1991). Model Sal4 memediasi reaksi terminasi dapat dilihat pada Gambar 5.4.

Dari ketiga model di atas dapat disimpulkan bahwa Sup45p/Sal4p adalah *release factor* tetapi fungsinya tidak analog dengan RF-3 pada *E. coli* karena pada Sup45p/Sal4p tidak ditemui sisi pengikat GTP seperti yang ditemui pada RF-3 *E. coli*. Sisi pengikat GTP justru ditemui pada Sal3p (Tuite dan Stansfield, 1994). Sal4p sebagai *release factor* diusulkan oleh Frolova *et.al.* (1994) berdasarkan studi homologi protein bahwa Sal4p sangat mirip dengan kelompok *release factor*. Informasi terakhir yang ditemui adalah Sal4p dan Sal3p merupakan *release factor*, Sal4p adalah

eRF-1 dan Sal3p adalah eRF-3 (Stansfield, *et.al.*, 1995). Keduanya berinteraksi untuk membentuk suatu kompleks *release factor* yang fungsional.



Gambar 5.3. Model 2: Sal4 sebagai *proofreading factor*. (Diambil dari Akhmaloka, 1991).



Gambar 5.4. Model 3 : Sal4 memediasi reaksi terminasi. (Diambil dari Akhmaloka, 1991).

### 5.3. Kloning Gen Mutan *sal4*

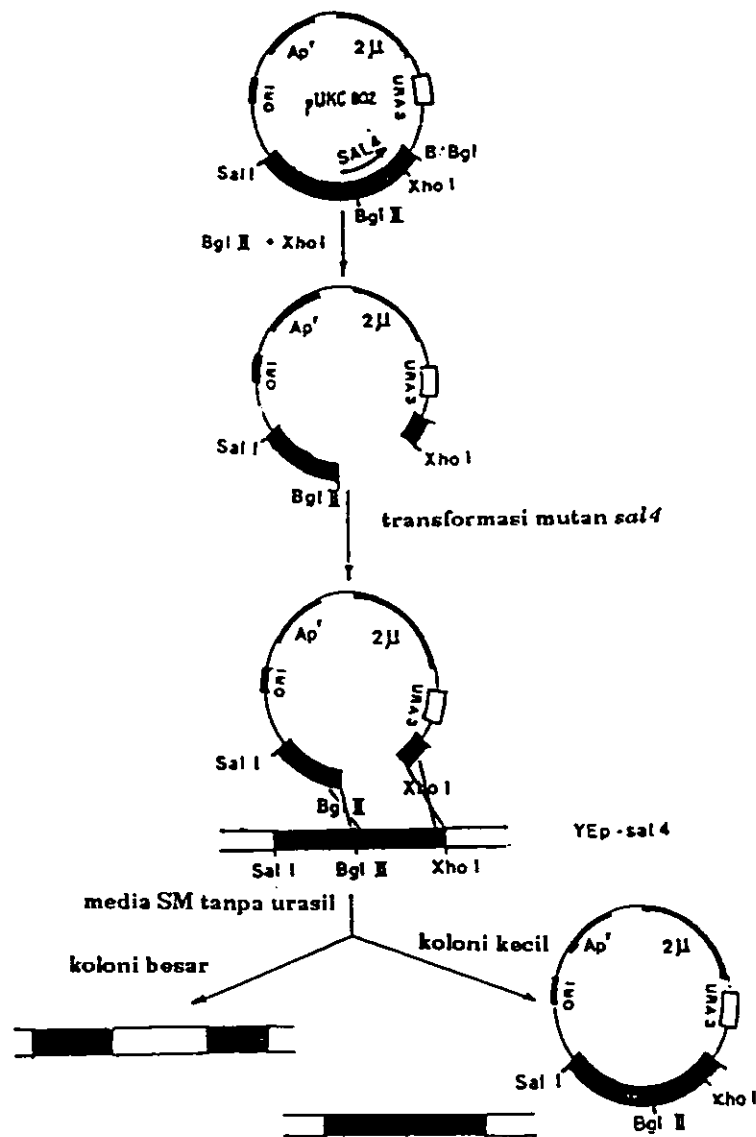
Untuk mengklon gen mutan *sal4* ragi dapat digunakan metoda *allele rescue*. Metoda ini berdasarkan rekombinasi homolog antara DNA plasmid yang dimasukkan pada sel ragi dengan DNA kromosom ragi. DNA plasmid yang dimasukkan dapat berupa *gapped plasmid* yang membawa sebagian gen tipe alami atau plasmid yang membawa

keseluruhan gen tipe alami dari gen yang akan diklon. Di dalam inti sel ragi gen mutan ragi dapat menutup kembali *gapped plasmid* dengan menggunakan DNA kromosom ragi sebagai templat.

Orr-Weaver dan Szostak menemukan bahwa dengan hadirnya segmen *autonomous replication sequence* (ARS) pada plasmid maka ada dua kemungkinan yang terjadi pada inti sel ragi, yaitu: (1) *gapped plasmid* ditutup kembali dengan menggunakan urutan DNA kromosom ragi sebagai templat dan akibatnya gen mutan dapat diisolasi, (2) terjadi integrasi dengan DNA kromosom setelah plasmid tersebut utuh kembali (Rothstein, 1991). Jika plasmid yang digunakan plasmid pUKC-802, kedua kemungkinan di atas dapat terjadi karena pUKC-802 mempunyai segmen ARS. Gambar 5.5 disajikan metoda *allele rescue*.

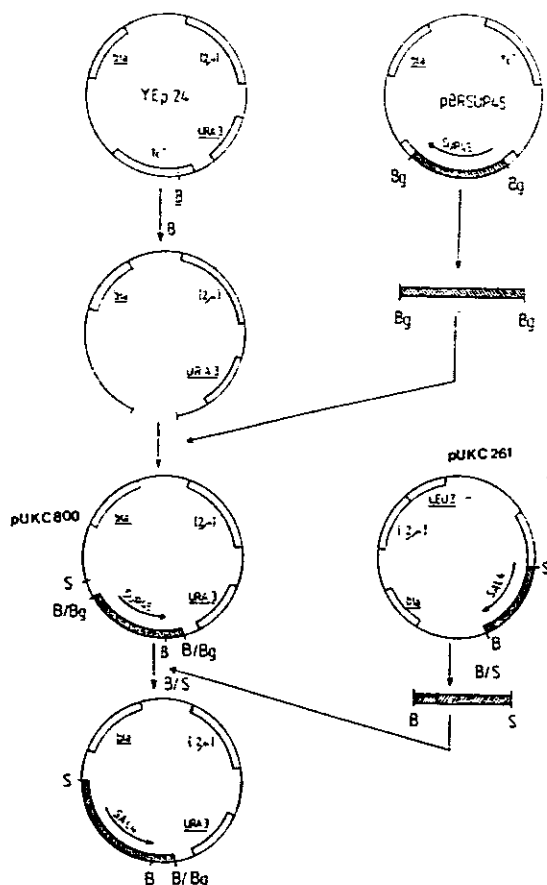
Plasmid pUKC-802 diturunkan dari plasmid Yep-24 yang membawa 2.240 pb fragmen plasmid  $2\mu$  dan mengandung *autonomously replicating sequence* (ARS) untuk ragi serta membawa fragmen *original of replication* (ORI) untuk *E. coli* (Tuite, 1992). Dengan demikian plasmid pUKC-802 dapat bereplikasi di dalam sel ragi maupun di dalam sel *E. coli* dan berada sebagai plasmid multikopi di kedua organisme tersebut. Oleh sebab itu plasmid pUKC-802 disebut juga *shuttle vector* untuk *E. coli* dan ragi. Disamping fragmen-fragmen di atas plasmid pUKC-802 juga mengandung gen *URA3* dan gen *bla*. Gen *URA3* digunakan untuk seleksi di ragi

sedangkan gen *bla* untuk seleksi di sel *E. coli*. Disamping itu, plasmid ini membawa urutan pengkode gen *SALA* serta urutan daerah promotornya.



Gambar 5.5. Ilustrasi metoda *allele rescue*. *Gapped plasmid* yang berasal dari plasmid pUKC-802 dipotong dengan enzim restriksi *BglII* dan *XhoI*, kemudian ditransfer ke dalam mutan *sal4*. Transforman yang diamati berupa koloni yang berukuran relatif besar dan kecil pada media *synthetic minimal* (SM) tanpa urasil. (Diambil dari Akhmaloka, 1991).

Plasmid pUKC-802 dirancang dengan memasukkan 2,2 kb fragmen dari pBRSUP45 yang membawa urutan pengkodean ujung karboksil dari protein Sup45 (Sal4) ke dalam sisi *Bam*HI dari YE<sub>p</sub>-24. Fragmen *Bam*HI-*Sal*I sebanyak 1,5 kb dari plasmid yang dihasilkan kemudian ditukar dengan 3,2 kb fragmen *Bam*HI-*Sal*I dari pUKC-261 yang membawa promotor dan urutan ujung-N dari gen *SAL4*. Konstruksi dari plasmid pUKC-802 disajikan pada Gambar 5.6.



Gambar 5.6. Skema konstruksi plasmid pUKC-802. Plasmid pUKC-802 diturunkan dari plasmid YE<sub>p</sub>-24 yang dimasukkan sebagian fragmen *SUP45* dari pBRSUP45 dan sebagian fragmen *SAL4* dari plasmid pUKC-261.

---

### Soal-soal

1. Jelaskan tentang gen *SUP45* dan bagaimana sifat produk gen *SUP45* tersebut ?
2. Apakah perbedaan antara gen *SUP45* dengan gen *SAL4* ?
3. Perhatikan urutan nukleotida gen *SAL4* (Gambar 5.1). Dari urutan nukleotida gen tersebut, tersusun dari berapa residu asam aminokah protein Sal4 ? Tuliskan struktur primer protein Sal4 (cukup hanya 25 kodon mulai dari arah 5' -----> 3') !
4. Bagaimana cara kita mengetahui bahwa mutan *sal4 S. cerevisiae* bersifat suppressor omnipotent ?
5. Akhmaloka pada tahun 1991 mengusulkan tiga model peranan protein Sal4. Jelaskan peranan ketiga model tersebut !
6. Untuk mengklon gen mutan *sal4* dapat digunakan metoda *allele rescue*. Jelaskan prinsip metoda ini !
7. Mengapa plasmid pUKC-802 dikatakan *shuttle vector* untuk *E. coli* dan ragi ?



## DAFTAR PUSTAKA

- Akhmaloka. (1991). "A Molecular Genetic Analysis of The Allosuppressor Gene *SALA* in *Saccharomyces cerevisiae*," Tesis Ph.D, University of Kent, Canterbury, U.K.
- Akhmaloka. (1993). **Petunjuk Praktikum Teknik-teknik Manipulasi Genetik pada *Saccharomyces cerevisiae***. ITB Bandung: PAU - Bidang Bioteknologi. pp. 4-5.
- Belfield, G.P.; Ross-Smith, N.J. and Tuite, M.F. (1995). " Translation Elongation Factor-3 (EF-3): An Evolving Eukaryotic Ribosomal Protein?," **Journal of Molecular Evolution**. vol.41. pp.376-387.
- Breining, P. and Piepersberg, W. (1986). "Yeast omnipotent suppressor *SUP1* (*SUP45*): nucleotide sequence of the wildtype and a mutant gene," **Nucleic Acid Research**. vol.14. no.13. pp.5187-5196.
- Craigien, W.J.; Lee, C.C. and Caskey, C.T. (1990). "Recent advances in peptide chain termination," **Molecular Microbiology**. vol.4 no.6 pp.861- 864.
- Eustice, D.C.; Wakem, L.P; Wilhelm, J. M and Sherman, F. (1986). "Altered 40S Ribosomal Subunits in Omnipotent Suppressors of Yeast," **Molecular Biology**. vol.188. pp.207-214.
- Firoozan, M; Grant, C.M.; Duarte, J.A.B. and Tuite, M.F. (1991). "Quantitation of Readthrough of Termination Codons in Yeast using a Novel Gene Fusion Assay," **Yeast** vol.7. pp.173-183.
- Frolova, L.; Goff, X.L; Rasmussen, H.H.; Cheperegin, S.; Drugeon, G.; Kress, M.; Arman, I.; Haenni, Anne-Lise; Celis, J.E.; Philippe, M.; Justesen, J. and Kisselev, L. (1994). "A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor," **Nature** vol.372. pp.701-703.
- Goffeau, Andre'.(1994). "Gene in search of function", **Nature** vol. 369. pp 101.

- Griffiths, A.J.F.; Miller, J.H.; Suzuki, D.T.; Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M. (1993). **An Introduction to Genetic Analysis**. 5 ed. New York: W.H. Freeman and Company. pp.541-543.
- Himmelfarb, H.J.; Maicas, E. and Friesen, J.D. (1985). "Isolation of the *SUP45* Omnipotent Gene of *Saccharomyces cerevisiae* and Characterization of Its Gene Product," **Molecular and Cellular Biology**. vol.5 no.4. p.816.
- Hinnebusch, A.G., and Liebman, S.W. (1990). "Protein Synthesis and Translational Control in *Saccharomyces cerevisiae*," **Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. p 38.
- Kushnirov, V.V.; Ter-Avanesyan, M.D.; Telckov, M.V.; Surguchov, A.P.; Smirnov, V.N. and Inge-Vechtomov, S.G. (1988). "Nucleotide sequence of the *SUP2 (SUP35)* gene of *Saccharomyces cerevisiae*," **Gene** vol.66. pp.45-53.
- Linder, P., and Prat, A. (1990). "Baker's Yeast, the New Work Horse in Protein Synthesis Studies: Analyzing Eukaryotic Translation Initiation," **BioEssays** vol.12. no.11. pp.519-526.
- Martinelli, S.D., and Sheikh, A. (1991). "Hygromycin- and paromomycin-resistant mutants of *Aspergillus nidulans* alter translational fidelity," **Current Genetics** 20. pp.211-218.
- Muller, P.P., and Trachsel, H.(1990). "Translation and regulation of translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," **Eur J Biochem**. vol. 191. pp.257-261.
- Old, R.W., and Primrose, S.B.(1989). **Principles of Gene Manipulation**. 4<sup>th</sup> edition. London : Blackwell Scientific Publication.
- Parker, J. (1989). "Errors and Alternative in Reading the Universal Genetic Code," **Microbiological Reviews** vol.53. p.273.
- Raue, H.A.; Heuvel, J.J van den and Planta, R.J. (1990). "Yeast mRNA Structure and Translational Efficiency," **Post-Transcriptional Control of Gene Expression** Edited John E.G and Mick F Tuite. New York; Springer-Verlag Bellin Heidelberg. pp.237-242.

- Riis, B.; Rattan, S.I.S.; Clark, B.F.C. and Merrick, W.C.(1990). "Eukaryotic protein elongation factors," *TIBS* vol.15. pp.421-425.
- Rothstein, R. (1991). "Targeting, Disruption, Replacement, and Allele Rescue: Integrative DNA Transformation in Yeast," *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* Edit: Christine Guthrie and Gerald R. Fink. pp.298-301.
- Stansfield, I.; Jones, K.M. and Tuite, M.F. (1995). "The end in sight : terminating translation in eukaryotes," *TIBS* 20 pp.489-491.
- Stansfield, I.; Jones, K.M.; Kushnirov, V.; Dagkesamanskaya, A.; Poznyakovski, A.I.; Paushkin, S.V; Nierras, C.R.; Cox, B.S.; Ter-Avanesyan, M.D and Tuite, M.F. (1995). "The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*," *The EMBO Journal* vol.14. no.17. pp. 4365-4373.
- Surghuchov, A.P. (1988). "Omnipotent nonsense suppressors: new clues to an old puzzle," *TIBS* 13. pp.120-123.
- Surghuchov, A.P.(1988). "Protein controlling translational fidelity," *Life Science Adv* 7. pp.217-221.
- Tuite, M.F.; Akhmaloka; Firoozan, M.; Duarte, J.A.B. and Grant, C.M. (1990). "Control of Translational Accuracy in Yeast: The Role of The Sal4 (Sup45) Protein," *Post-Transcriptional Control of Gene Expression* Edited John E.G. McCarthy and Mick F. Tuite. New York: Springer-Verlag Bellin Heidelberg. pp.611-622.
- Tuite, M.F. (1989). *Protein Synthesis*. Canterbury: Biological Laboratory University of Kent. pp.162-167.
- Tuite, M.F.; Stansfield, I.; Eurwilaichter and Akhmaloka.(1994). "Novel ribosom-associated translation factors are required to maintain the fidelity of translation," *Yeast*. pp.1-18.
- Tuite, M.F. and Stansfield, I. (1994). "Knowing when to stop," *Nature* vol.372. pp. 614-614.
- Voet, D.; Voet, J.G.; (1990). *Biochemistry*. New York : John Wiley & Son, pp. 925-929.

**Watson, J.D.; Hopkins, N.H.; Robert, J.W.; Steitz, J.A. and Weiner, A.M. (1987). Molecular Biology of The Gene. 4<sup>th</sup> Ed., California: The Benjamin /Cummings Publishing Company, pp.571-573.**

**Winnacker, Ernest-L. (1987). From Genes to Clones Introduction to Gene Technology. Germany : VCH. pp. 190-192.**

## Lampiran 1. Daftar istilah

**Allele** : Satu dari dua atau lebih bentuk alternatif dari gen.

**Antikodon** : Triplet nukleotida pada sebuah molekul tRNA yang komplemen dengan sebuah kodon pada molekul mRNA.

**Bioteknologi** : Penggunaan organisme hidup (tidak selalu mikroba) di dalam industri.

**CentiMorgan** : Satuan yang digunakan untuk menggambarkan jarak antara dua gen pada sebuah kromosom.

**Diploid** : Sebuah sel yang mengandung dua kopi dari tiap kromosom.

**Eukariot** : Organisme yang selnya dicirikan oleh adanya membran mengelilingi inti sel.

**Fenotip** : Sesuatu yang dapat diamati dari suatu sel atau organisme.

**Gen** : Segmen DNA yang mengandung informasi biologi yang mengkode sebuah RNA dan / atau molekul polipeptida.

**Haploid** : Sebuah sel yang mengandung kopi tunggal dari tiap kromosom.

**Histon** : Protein yang membangun nukleosom dan mempunyai peranan yang fundamental dalam struktur kromosom.

**Intron** : Segmen DNA yang tidak mengandung informasi biologi.

**In vivo**: Percobaan pada sel-sel hidup yang utuh, jaringan atau organisme.

**Kodon bias** : Kodon alternatif untuk asam amino yang sama.

**Kromatin** : Serat-serat nukleoprotein (nukleosom) yang bentuknya menyerupai manik-manik.

**Kromosom** : Molekul DNA tunggal yang utuh yang berbentuk heliks ganda.

**Meiosis** : Sederetan peristiwa yang mana sel diploid diubah ke sel haploid.

**Mitosis** : Sederetan peristiwa yang mengakibatkan pembelahan sel tunggal (diploid atau haploid) menjadi dua sel anak.

**Mutasi** : Perubahan urutan nukleotida dari molekul DNA.

**Nukleosom** : Subunit globular dari DNA kromosom yang membentuk kompleks dengan protein histon dan merupakan unit pengulang dari kromatin.

**Plasmid** : DNA yang umumnya berbentuk sirkular dan replikasinya tidak tergantung pada kromosom sel inang dan sering ditemui di dalam bakteri dan beberapa tipe sel lainnya.

***Release factor*** : Protein yang mengenali kodon terminasi.

**Replikasi** : Sintesa dua rantai DNA yang mempunyai urutan nukleotida serupa dengan DNA induknya.

**Telomer** : Urutan nukleotida pada ujung dari sebuah kromosom yang tidak mengkode suatu RNA atau suatu protein.

**Transkripsi** : Sintesa RNA dengan menggunakan cetakan DNA.

**Translasi** : Sintesa polipeptida yang urutan asam aminonya ditentukan oleh urutan nukleotida pada mRNA .

Lampiran 2 : Kode genetik (Diambil dari Griffiths *et. al.*, 1993)

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U
		UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U
		AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C
		AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A
		AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U
		GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C
		GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A
		GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G