

DISERTASI

PENGARUH RADIASI CAHAYA LASER HELIUM-NEON PADA FRAGMENT DNA 1784 pb IN VITRO

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

Dic

M 05/04

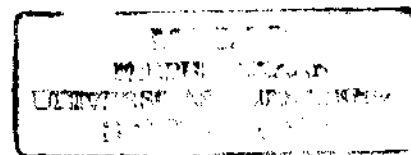
Dja

P



OLEH :

DJAJADI



**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

**PENGARUH RADIASI CAHAYA LASER HELIUM-NEON
PADA FRAGMENT DNA 1784 pb IN VITRO**

**(The Influence of Laser Helium-Neon on Fragment DNA 1784
Pairs of Base In Vitro)**

**Disertasi
Untuk Memperoleh Gelar Doktor
Pada Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Program Pascasarjana
Universitas Airlangga
Dan Telah Dipertahankan Dihadapan Panitia Ujian
Doktor Terbuka**

**Pada hari : Kamis
Tanggal : 19 Februari 2004
Pukul : 10.00 WIB**



**Oleh :
Djajadi
NIM. 099712478 D**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

Lembar Pengesahan
Disertasi ini telah disetujui
Tanggal 4 Maret 2004

Oleh

Promotor



Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr.

NIP. 130162016

Ko Promotor I



Prof. Dr. H. Kuntoro, dr. MPH

NIP. 130531767

Ko Promotor II



Dr. Masbah R.T. Siregar

NIP. 320001662

Telah diuji pada ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Tanggal 15 Juli 2003

Panitia Penguji Disertasi :

Ketua : Prof. Dr. H. Fasich, Apt.,

Anggota : 1. Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr.

2. Prof. Dr. H. Kuntoro, dr., MPH,MP

3. Dr. Masbah R.T. Siregar

4. Prof.H. Soegimin W.W.

5. Prof.IGB. Amitaba, drh.

6. Prof.Dr.H. Redjani, Drs.

7. Prof.Dr. Indrayana, dr. NS, Sp.F



Ditetapkan dengan surat Keputusan

Rektor Universitas Airlangga

Nomor : 5743/ JO3 /PP / 2003

Tanggal : 23 Juli 2003



"Kebenaran berasal dari Tuhan-mu
(Al Qur'an Surat Al Baqarah ayat 147)

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas anugerah kekuatan, kemampuan, petunjuk, dan taufik-Nya sehingga penulisan disertasi ini, telah penulis selesaikan.

Pada kesempatan ini juga penulis sampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih atas peranannya yang khusus kepada Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr sebagai promotor, Prof. Dr. H. Kuntoro, dr. MPH, sebagai Ko Promotor I, dan Dr. Masbah R.T. Siregar sebagai Ko Promotor II karena dengan beliaulah penulis dapat menyelesaikan penelitian penulis.

Kepada Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. H. Puruhito, dr, Sp.BTKV dan mantan Rektor Universitas Airlangga Prof. H. Soedarto, dr, DTM & H atas persetujuan usulan penulis untuk tugas belajar pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Kepada Direktur Program Pascasarjana Unair Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr dan mantan Direktur Program Pascasarjana Unair Prof.Dr. Soediyono,dr, Sp.THT penulis ucapkan terima kasih atas penerimaan penulis untuk belajar di Program Pascasarjana Unair.

Kepada Prof.Dr.GN Astika, KPS Program doktor MIPA, penulis ucapkan terima kasih atas persetujuan kepada penulis untuk dapat ujian akhir disertasi.

Kepada Prof. Dr.H. Fasich, Apt, Prof.H.Soegimin WW, Prof. Ir. H. Achmad Baktir, M.App.Sc, Prof. Dr. H. Redjani, Prof.IGB Amitaba,drh dan Prof.Dr. Indrayana, dr.NS.,Sp.F (alm.) penulis mengucapkan terima kasih atas saran dan petunjuk dalam penyusunan disertasi.

Kepada Dekan FMIPA Unair Latief Burhan, Drs., MS, Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unair Tjitjik Sri Tjahjandari, Dra., Ph.D dan Ketua Jurusan Fisika FMIPA Unair Pujiyanto, Drs., MS penulis ucapkan terima kasih atas ijin yang diberikan penulis untuk menggunakan alat dan bahan untuk keperluan penelitian penulis.

Kepada Prof.Dr. Indrayana, dr.NS.,Sp.F, (alm.) penulis mengucapkan terima kasih atas ijin yang diberikan kepada penulis untuk memanfaatkan fasilitas peralatan dan bahan di TDRC Kampus C Unair serta masukan yang telah disampaikan kepada penulis.

Kepada Koordinator DNA Sequencing Services Yayasan Genneka Eijkman Institute for Molecular Biology Jakarta Dr. Helena Suryadi, penulis ucapkan terima kasih atas pertolongan pemanfaatan alat pelacak urutan basa DNA.

Kepada teman-teman di FMIPA Unair dan Pascasarjana Unair penulis ucapkan terima kasih atas sumbangan pikiran dan tenaga untuk penelitian penulis.

Penulis menyadari bahwa tulisan disertasi ini kurang sempurna, maka penulis akan menerima kritik dan saran para pembaca sekalian.

Yang terakhir penulis mengucapkan terima kasih kepada anak dan istri tercinta atas dorongan moril dan materiil sehingga penulis dapat berhasil menyelesaikan disertasi ini.

RINGKASAN

PENGARUH RADIASI CAHAYA LASER HELIUM-NEON (He-Ne)
PADA FRAGMENT DNA 1784 pb IN VITRO

Djajadi

Laser adalah singkatan dari *light amplification by stimulated emission of radiation*. Laser He-Ne mempunyai keluaran berkas cahaya sejajar, monokromatis, dan sefase (koheren) yang dapat dilihat serta panjang gelombang elektromagnetiknya adalah 632,8 nm. Gelombang elektromagnetik merambat dengan membawa paket-paket energi berupa foton.

Cahaya laser He-Ne dapat dimanfaatkan untuk membuat gambar holografis dan gambar tersebut dapat dilihat secara 3 dimensi. Gambar holografis dimanfaatkan untuk mempermudah pembedahan di rumah sakit karena bagian tubuh yang akan dioperasi dapat dilihat secara 3 dimensi.

Sewaktu perekaman gambar holografis perlu pemaparan cahaya laser He-Ne pada tubuh sehingga terjadi interaksi foton cahaya laser He-Ne dan jaringan tubuh. Jaringan tubuh terdiri dari sel-sel dan dalam sel terdapat materi yang tergolong penting bernama DNA (*deoxyribonucleic acid*).

DNA berbentuk untai ganda yang merupakan *double helix*. Gugus gula *deoxyribose* dan gugus *phosphate* membentuk bagian luar DNA sedangkan bagian dalam DNA adalah pasangan basa *adenine-thymine* atau *cytosine-guanine*.

Untuk mengetahui apakah semata-mata DNA terusik oleh cahaya laser He-Ne maka perlu penelitian dengan DNA *in vitro* yaitu DNA diluar sel didalam larutan TE. TE adalah suatu *buffer* yang terdiri atas larutan 0,384 g *tris-maze base* dan 0,0093 g EDTA dalam 260 ml aquades sedangkan EDTA adalah *ethylene diamine tetraacetic acid*.

Isolasi DNA dilakukan dan *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc 64. Hasil isolasi DNA digunakan sebagai cetakan / templat untuk penggandaan dengan alat PCR (*polymerase chain reaction*) yang pemicunya primer P₁ dan P₂ tertentu sehingga hasil PCR adalah fragmen DNA 1784 pb (pasang basa).

Fragmen DNA 1784 pb dalam larutan TE sebagian dipapar dengan cahaya laser He-Ne dengan energi pemaparan tertentu.

Fragmen DNA 1784 pb yang terpapar dan yang tidak terpapar oleh cahaya laser He-Ne dilakukan uji dengan alat elektroforesis. Hasil eksperimen menunjukkan bahwa pemaparan dengan cahaya laser He-Ne tidak memutus fragmen DNA 1784 pb yang sesuai dengan perhitungan secara teoritis bahwa energi foton laser He-Ne tidak mampu memutus untai DNA.

Fragmen DNA 1784 pb yang terpapar dan yang tidak terpapar oleh cahaya laser He-Ne dilacak urutan basanya (*sequencing*). Urutan basa fragmen DNA 1784 pb yang terpapar dan tidak terpapar cahaya laser He-Ne dibandingkan. Kemudian a). probabilitas basa yang berubah dihitung secara statistis dengan pendekatan distribusi Poisson, b). proporsi basa yang berubah pada pengamatan eksperimen dihitung, c). andaikan seluruh foton yang memapar memutus basa, maka proporsi basa yang berubah dapat ditentukan, d). kalau memperhatikan data sekunder maka ada mutasi genetik karena perubahan struktur molekuler materi genetik disebabkan

oleh sinar kosmik, dan e). hasil perhitungan teoritis menunjukkan energi foton laser He-Ne tidak mampu memutus basa. oleh sebab itu berdasarkan *a, b, c, d,* dan *e* tersebut dapat dibahas bahwa cahaya laser He-Ne tidak mampu memutus gugus basa pada fragmen DNA 1784 pb.

Jadi hasil penelitian dapat menunjukkan bahwa cahaya laser He-Ne tidak mampu mengusik fragmen DNA 1784 ph.

Kata kunci : Fragmen DNA, Laser He-Ne, Holografis, Elektroforesis, dan *Sequencing*



SUMMARY

**THE EFFECTS OF HELIUM-NEON (He-Ne) LASER
ON DNA 1784 pb IN VITRO FRAGMENTS**

Djajadi

Laser is short for *light amplification by stimulated emission of radiation*. He-Ne laser produces visible, monochromatic and coherent parallel beams of light, with electromagnetic wave lengths of 632,8 nm. The electromagnetic waves are extended in range by carrying packages of photon energy.

He-Ne laser beams are utilized to generate holographs showing a three-dimensional image of an object. The holographical image is utilized to simplify surgery in a hospital operating room since the part of the body that is going to be operated can be seen three-dimensionally.

The He-Ne laser beams should be exposed on the body during the holographical scanning and so produce interaction between photons of the He-Ne laser beams and body tissues. A body tissue consists of cells and in these cells there is somewhat an important substance called DNA (*deoxyribonucleic acid*).

A deoxyribonucleic acid is in the form of a twisted double strand or double helix. The deoxyribose sugar nucleotide and phosphate group form the outer part of a DNA. The inner part of a DNA consists of complementary bases, that is, nucleotide containing adenine which are paired with nucleotide containing thymine and nucleotide containing cytosine which are paired with nucleotide containing guanine.

A research on DNA in vitro, that is, DNAs outside the cells in TE solution was conducted to find out whether the He-Ne laser beams merely perturbed the DNAs. TE is a buffer comprising 0,384 g of trismaze base and 0,0093 g of EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid) solution in 260 ml aquades.

Isolating DNA from *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc 64 was conducted. The results of the DNA isolation were used as duplicating templates with PCR (polymerase chain reaction) equipment triggering specific P₁ and P₂ primers. in order that the PCR results were DNA 1784 fragments of pairing bases (pb).

A test using an electrophoresis apparatus was carried out to examine the exposed and non exposed DNA 1784 pb fragments generated by the He-Ne laser beams. The results of the experiment showed that the He-Ne laser beam exposure did not cut the DNA 1784 pb fragments. This was appropriate with the theoretical estimation that photon energy of He-Ne laser is incapable of cutting the DNA 1784 pb fragments.

The sequencing bases of the exposed and non exposed DNA 1784 pb fragments generated by the He-Ne laser beams were traced and compared. Afterward, a) the probability of the modified bases was estimated statistically by using Poisson's distribution approach, b) the proportion of the modified bases during the experiment study was estimated, c) if the entire exposed photons cut the bases, then, the proportion of the modified bases could be estimated, d) the secondary data showed that there was a genetic mutation; since changes of molecular structure of genetic substance were generated by cosmic rays, e) the results of theoretical estimation showed that the photon energy of He-Ne laser was incapable of cutting the bases. Therefore, based on a, b, c, d, and e, it could be argued that He-Ne laser was incapable of cutting the bases of DNA 1784 pb fragments.

Hence, the results of the research showed that He-Ne laser beams could not perturbed DNA 1784 pb fragments.

Key words: DNA fragments, He-Ne laser, Holographical, Electrophoresis, and Sequencing.

ABSTRACT

Title : The Influence of Laser Helium-Neon on Fragment DNA 1784 Pairs of Base in Vitro

Djajadi

This research observed the influence of laser helium-neon (He-Ne) radiation on fragment deoxyribonucleic acid (DNA) 1784 pairs of base. Fragment DNA in solution TE. TE stands for tris EDTA. Buffer TE consists of 0,384 g tris base and 0,0093 g EDTA in 260 ml aquades and EDTA was ethylene diamine tetraacetic acid. The probability of influence lies on the cutting of fragment DNA and the change of order of base fragment DNA.

The research was conducted in five steps respectively the isolation of DNA from *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64 to find the followings template for amplification DNA 1784 pairs of base, the amplification of fragment DNA 1784 pairs of base from gene glucoamylase of *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64 by using instrument Polymerase Chain Reaction (PCR) Thermal Analyzer Bio-rad USA and the amplification was conducted through predenaturation on 95°C for 5 minutes and then continued with denaturation on 95°C for 1 minute; annealing on 55°C for 1 minute; extention on 72°C for 2 minutes with the number of cycle 30 times with the addition of extention on 72°C for 5 minutes; radiation He-Ne on fragment DNA 1784 pairs of base with the intensity radiation 0,9 joule/m² which was the optimum intensity on holographic film with the trade mark Kodak Spectroscopic Plate Type 649-F; 2% agarose to detect the separation fragment DNA. sequencing DNA by using Sanger method and its instrument was ABI PRISM 377 Sequencer with reagent "Bigdye Terminator" V2.0 to observe the structure of order of pairs of base fragment DNA. The conclusion of the experiment result involved statistical method. that is, Poisson distribution estimation.

The laboratory experimental research showed primary data that all tapes of fragment DNA on the electrophoresis photo gel agarose 2% existed on the horizontal line and the probability of mutation of pairs base fragment DNA was caused by cosmic rays. The secondary data was about 2% of genetic mutation was caused banyak the change of molecule structure of genetic material caused by cosmic ray.

The result of experiment showed that there was no influence of laser radiation He-Ne on the fragment DNA 1784 pairs of base in vitro.

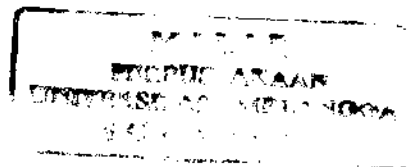
Key word : fragment DNA, Laser He-Ne, Holographic, Electrophoresis, and Sequencing.

DAFTAR ISI

	<i>halaman</i>
Daftar Isi	xi.
Daftar Tabel	xiv.
Daftar Gambar	xv.
Daftar Lampiran	xviii.
Daftar Arti Lambang Huruf, Singkatan, dan Istilah	xix.
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kuantisasi Energi	5
2.2 Laser Helium-Neon (He-Ne).....	10
2.3 Elektroforesis Gel Agarosa	19
2.4 Holografi Laser	24
2.5 <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (DNA)	27
2.5.1 Replikasi diri DNA	34
2.5.2 <i>Rebonucleic acid</i> (RNA)	37
2.5.3 Sintesis protein	40
2.5.4 Kode genetik	41
2.5.5 Mutasi dan penyakit genetik	42
2.6 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> dan Analisis Urutan Basa DNA.....	43
2.7 Kaitan Cahaya Laser dengan Bidang Kehayatan	52
2.7.1 Cahaya laser ultraviolet (UV)	52
2.7.2 Cahaya laser helium-neon (He-Ne)	54
2.7.3 Cahaya laser yttrium aluminium garnet (YAG).....	57
2.7.4 Cahaya laser CO ₂	58

	<i>halaman</i>
2.8. DNA pada Kajian Biofisika Radiasi Gelombang elektromagnetik (Gelombang e.m.)	59
2.9 Urutan Nukleotida Gen <i>GLU1 Endomycopsis fibuligera</i> dan target fragmen DNA 1784 pb	61
2.10 Fotokopi Gambar Holografis pada Operasi Tulang Belakang	65
2.11 Sinar Kosmik	66
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	67
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	67
3.2 Hipotesis	68
BAB IV METODE PENELITIAN	69
4.1 Rancangan Penelitian	69
4.2 Variabel Penelitian	70
4.3 Bahan Penelitian	71
4.4 Instrumen Penelitian	71
4.4.1 Penggandaan fragmen DNA 1784 pb menggunakan instrumen PCR.	71
4.4.2 Pelacakan urutan basa fragmen DNA 1784 pb menggunakan instrumen teknik sequencing.....	71
4.4.3 Instrumen untuk perlakuan fragmen DNA 1784 pb dilakukan dengan laser He-Ne ditambah seperangkat lensa-lensa optik yang diperlukan.....	72
4.4.4 Instrumen untuk pengamatan putus dan tidaknya fragmen DNA 1784 pb dengan alat elektroforesis	75
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	75
4.6 Prosedur Pengambilan Data	75
4.6.1 Prosedur pengambilan data konsentrasi dan kemurnian hasil isolasi	78
4.6.2 Prosedur pengamatan data hasil penggandaan fragmen DNA dengan alat elektroforesis gel.....	78
4.6.3 Prosedur pengambilan data hasil penggandaan fragmen DNA 1784 pb	79

	<i>halaman</i>
4.6.4 Prosedur pengambilan data putus dan tidaknya fragmen DNA 1784 pb karena penyinaran cahaya laser He-Ne berintensitas sama saat perekaman gambar holografik pada bidang khayatan	84
4.6.5 Prosedur pengambilan data hasil sequencing fragmen DNA 1784 pb sebelum mendapat perlakuan dan setelah perlakuan pada penelitian pendahuluan dan penelitian	85
4.7 Cara Analisis Data	85
4.8 Kerangka Operasional Penelitian	87
BAB V HASIL PENELITIAN	89
5.1 Data Penelitian	89
5.2 Analisis dan Hasil Penelitian	105
BAB VI PEMBAHASAN	107
6.1 Untai Fragmen DNA In Vitro Tidak Putus	107
6.2 Pemaparan Cahaya Laser He-Ne Tidak Mengubah Urutan Basa Fragmen DNA In Vitro	110
BAB VII SIMPULAN DAN SARAN	116
7.1 Simpulan	116
7.2 Saran	116
DAFTAR PUSTAKA	118



DAFTAR TABEL

	<i>halaman</i>
Tabel 2.1 Parameter laser untuk beberapa laser yang lazim	17
Tabel 2.2 Reagen untuk Maxam dan Gilbert pengurutan basa DNA	45
Tabel 5.1 Jumlah basa (n_1) dan jumlah basa yang berubah (x_1) pada penelitian pendahuluan	104
Tabel 5.2 Jumlah basa (n_2) dan jumlah basa yang berubah (x_2) pada penelitian	105
Tabel 5.3 Perhitungan probabilitas rata-rata dengan pendekatan distribusi Poisson	106
Tabel 6.1 Konfigurasi elektron kulit paling luar C, H, N, dan O	112



DAFTAR GAMBAR

	<i>halama</i>
Gambar 2.1	Distribusi kemungkinan sebuah elektron dalam sebuah atom 1
Gambar 2.2	Skema tingkat energi laser tiga tingkat 1
Gambar 2.3	Bagan laser helium-neon (He-Ne) yang pertama kali dibuat 1
Gambar 2.4	Siklus energi empat langkah terkait proses lasing laser He-Ne 1
Gambar 2.5	Skema alat elektroforesis gel 2
Gambar 2.6	Bagan pembentukan hologram secara umum , dengan catatan (1) adalah pemantul cahaya laser sebagai sumber referensi dan (2) adalah benda yang akan diambil gambar tiga dimensinya 20
Gambar 2.7	Illuminasi hologram dengan cahaya laser He-Ne referensi. Bayangan maya tiga dimensi objek dapat dilihat..... 27
Gambar 2.8	<i>Double helix</i> DNA, yang dilaporkan oleh Watson & Crick dalam NATURE magazine tanggal 2 April 1953 28
Gambar 2.9	Struktur kimia sebagian untai DNA 29
Gambar 2.10	Sebagian molekul DNA yang menunjukkan hubungan pasangan basa komplementer dan gambar tersebut merupakan gambar bagan 30
Gambar 2.11	Gambar elektronegativitas beberapa elemen 31
Gambar 2.12	<i>Double helix</i> DNA yang disertai ukuran dimensinya..... 33
Gambar 2.13	Gambar sistematis formasi polimer komplemen pada <i>template</i> 35
Gambar 2.14	Diagram skematis replikasi DNA 36
Gambar 2.15	Sintesis transkripsi RNA pada <i>template</i> DNA 37
Gambar 2.16	Heliks ganda DNA sebagian terpisah (a). RNA terbentuk pada bagian DNA yang terpisah (b), dan selanjutnya RNA melepaskan diri (c) 38
Gambar 2.17	<i>Oligonucleotides</i> berpasangan basa sesuai dengan aturan pasangan basa Watson-Crick dengan untai DNA templatnya yang sesuai. Ujung 3' <i>oligonucleotides</i> akan diperpanjang oleh <i>polymerase</i> DNA 44
Gambar 2.18	Perpanjangan primer oleh DNA <i>polymerase</i> . Primer menempel pada urutan komplementer, pada untai templat dan DNA <i>polymerase</i> menggunakan urutan templat untuk memperpanjang primer dengan menggabungkan <i>deoxynucleotides</i> yang benar (dNTP) 44
Gambar 2.19	Pemotongan kimiawi DNA hipotesis pada residu G. Suatu set terkumpul fragmen DNA yang diberi tanda ujungnya dihasilkan karena reaksi terbatas DNA yang ujungnya bertanda dengan reagen khusus G. Fragmen lain juga dihasilkan, tetapi hanya fragmen yang ujungnya tidak memiliki tanda 46
Gambar 2.20	Perbesaran <i>autoradiography</i> Maxam dan Gilbert 48
Gambar 2.21	<i>Dideoxynucleoside triphosphates</i> berlaku sebagai terminator rantai sebab <i>dideoxynucleoside triphosphates</i> tersebut kehilangan gugus OH 3'. Pemberian nomor atom karbon pentosa ditunjukkan pada gambar. Atom fosfor α , β , dan γ juga diberitahukan 49

Gambar 2.22	Pengurutan DNA dengan <i>dideoxynucleoside triphosphate</i> sebagai terminator rantai. Dalam gambar tersebut tanda bintang menunjukkan adanya I^{232} dan awalan 'd' menunjukkan adanya suatu <i>dideoxynucleoside</i> . Pada bagian atas gambar DNA yang di urutkan biasanya dimasukkan dalam kotak. Perhatikan bahwa kalau primernya tidak ditandai suatu radioisotop pita yang paling kecil urutan CGTAAGGdC tidak akan di deteksi oleh <i>autoradiography</i> karena tidak ada basa yang diberi tanda tergabung.....	51
Gambar 2.23	<i>Autoradiograph</i> gel perurutan basa DNA yang diperoleh dengan metode perurutan basa DNA terminator rantai.....	52
Gambar 2.24	Bagan kerusakan DNA <i>thymine dimer</i>	53
Gambar 2.25	Urutan nukleotida gen <i>GLU1 Saccharomycopsis fibuligera</i> HUT 7212	62
Gambar 2.26	Fotokopi gambar holografis tulang belakang	64
Gambar 4.1	Bagan perangkat alat untuk perlakuan penyinaran gelombang elektromagnetik laser He-Ne pada fragmen DNA	70
Gambar 4.2	Foto alat metrologic fotometer	71
Gambar 4.3	Foto alat elektroforesis	77
Gambar 4.4	Foto alat perekam gambar hasil elektroforesis.....	80
Gambar 4.5	Foto alat PCR	81
Gambar 4.6	Data DNA <i>marker</i> yang berasal dari New England Biolabs Inc	82
Gambar 4.7	Ujung kanan lembar data berkode 15.DNA-B-P ₁ dan 13.DNA-A-P ₁	94
Gambar 5.1	Foto hasil elektroforesis gel agarosa 2% yang menunjukkan dua baris pita. Baris teratas terlihat 6 pita yang menyatakan sumur gel. Baris pita yang di bawah terdiri dari dua pita yang menyatakan hasil PCR fragmen DNA dari isolasi DNA <i>Endomycopsis fibuligera</i> ITB.R.cc.64 (pita kiri), dan hasil PCR fragmen DNA kontrol positif plasmid pSf <i>GLU1</i> (pita kanan)	99
Gambar 5.2	Foto hasil elektroforesis fragmen DNA hasil penggandaan PCR dibandingkan dengan DNA <i>marker</i> Pada foto tersebut terdapat sepuluh pita yang berada pada satu jalur ke bawah yang merupakan pita 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1½, 1, dan ½ kilobasa yang merupakan DNA <i>marker</i> . Sebelah kanan antara pita 2,0 dan 1,5 kilobasa pada DNA <i>marker</i> terdapat satu pita yaitu fragmen hasil penggandaan DNA.....	101
Gambar 5.3	Foto hasil elektroforesis yang menunjukkan dua baris pita-pita. Baris yang paling atas menunjukkan enam pita yang merupakan sumur gel sedangkan baris di bawahnya menunjukkan empat pita yang merupakan hasil elektroforesis pita fragmen DNA setelah mendapat perlakuan dan sebelum mendapat perlakuan pada penelitian pendahuluan (pita kesatu dan kedua dari kiri) dan hasil elektroforesis pita fragmen DNA setelah mendapat perlakuan dan sebelum mendapat perlakuan pada penelitian (pita kelima dan keempat dari kiri, jika antara pita kedua dan ketiga yang kosong	

	diberi nomor ketiga).	102
Gambar 6.1	Struktur kimia sebagian untai DNA	108
Gambar 6.2	Sebagian molekul DNA yang menunjukkan hubungan basa komplementer dan gambar tersebut merupakan bagan	111



DAFTAR LAMPIRAN

	<i>halaman</i>
Lampiran 1 Eksitasi molekul fragmen DNA 1784 pb karena pemaparan foton laser He-Ne	125
Lampiran 2 Data DNA marker berasal dari New England Biolabs Inc.	127
Lampiran 3 Jumlah seluruh pasang basa yang terpapar	128



DAFTAR ARTI LAMBANG HURUF, SINGKATAN, DAN ISTILAH

	<i>halaman</i>
He-Ne : Helium – Neon	1
Laser : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation ..	1
DNA : Deoxyribonucleic acid	2
pb : Pasang basa	3
In vitro : 1. Di dalam lingkungan buatan	3
arti lain	
2. Di dalam gelas. dapat diamati di dalam tabung reaksi	
TAE : Tris – acetate – EDTA	23
PCR : Polymerase chain reaction	70
SDS : Sodium dedosil sulfat	76
SSC : Salin sodium citrat	76
TE : Tris EDTA yaitu suatu buffer yang terdiri dari larutan 0,384 g tris base dan 0,0093 g EDTA dalam 260 m aquades	77
EDTA : Ethylene diamine tetra acetic acid	77
pSF : Plasmid Saccaromycopsis fibuligera	80

BAB I

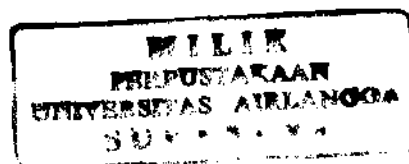
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Cahaya laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) helium-neon (He-Ne) yang panjang gelombangnya (λ) 632,8 nm dapat dimanfaatkan untuk pembuatan gambar holografis dan gambar tersebut mampu menambah kemudahan pembedahan di rumah sakit. Energi foton cahaya laser berbanding terbalik dengan λ nya. Alberstone et al.(1998) berhasil merekam gambar holografis tulang belakang manusia yang diperkirakan perlu dioperasi sehingga dengan adanya gambar holografis tersebut tulang belakang tervisualisasi tiga dimensi. Pada perekaman gambar holografis tersebut digunakan cahaya laser He-Ne yang memapar jaringan-jaringan daerah tulang belakang dengan energi pemaparan 0.9 joule/m^2 . jika menggunakan emulsi fotografis tipe tertentu maka gambar holografis terekam secara maksimal (Kallard, 1977).

Suatu jaringan tubuh adalah kumpulan sel yang memiliki bentuk, susunan, dan fungsi yang sama. Sel mempunyai organel sel antara lain adalah plasmalemma, retikulum endoplasma, lisosom, alat Golgi, mitokondria yang berfungsi antara lain menghasilkan energi *adenosine triphosphate* (ATP), sentriol, mikrotubul, mikrofilamen, peroksisom, dan inti yang komponen utamanya adalah kromatin yang mengandung DNA (*deoxyribonucleic acid*) (Yatim, 1996).

Beberapa peneliti meneliti interaksi cahaya laser He-Ne dengan organel sel atau komponen organel sel. Peneliti tersebut antara lain sebagai berikut. Karu et al.(1995) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa satu lapis HeLa diradiasi



dengan cahaya laser He-Ne yang panjang gelombang dan intensitasnya masing-masing adalah 632,8 nm dan 10 watt/m² selama 10 sekon. Pemaparan radiasi tersebut mempengaruhi peningkatan *adenosine triphosphate* (ATP) pada tingkat seluler. Hasil penelitian Michael et al.(1993) menyatakan bahwa sel saraf immatur (*neuroblastoma cell line*) manusia yang teradiasi cahaya laser He-Ne dengan panjang gelombang 632,8 nm menambah sintesis DNA pada sel tersebut. Batanouny et al.(2001) melaporkan hasil penelitiannya bahwa cahaya laser He-Ne dapat memberi efek perbaikan DNA. Rindge et al.(2002) telah meneliti bahwa cahaya laser He-Ne yang panjang gelombangnya 632,8 nm dapat mempercepat sintesis DNA.

Hill et al.(1993) menyatakan bahwa pada DNA terdapat *nucleotide* yang terkait dengan *nucleotide* berikutnya sehingga merupakan untaian panjang. Dengan rumus energi potensial elektrostatik (Titler, 1991), antara *nucleotide* dengan *nucleotide* berikutnya secara teoritis dapat dihitung berapa nilai energi ikat yang merupakan energi potensial elektrostatik. Energi tersebut = $- 0.4248 \times 10^{-17}$ joule (Whitten et al. (1996) dan Titler (1991)).

Selain itu pada DNA ada energi ikat gugus-gugus basa dengan gugus gula *deoxyribose* dan gugus basa pasangannya. Secara teori dapat dihitung energi ikat gugus basa *adenine* (E_A), *cytosine* (E_C), *guanine* (E_G), dan *thymine* (E_T) yaitu $E_A = E_T = - 0.283 \times 10^{-17}$ joule dan $E_C = E_G = - 0,285 \times 10^{-17}$ joule. Hal ini menyebabkan urutan basa tidak berubah (Whitten et al.(1996) dan Titler (1991)).

Berdasarkan urutan nukleotida gen *GLU1 Sccharomycopsis fibuligera* HUT 7212 (Itoh et al. 1987) dan dengan program Genmon version 4.10 dan Primer

Detektif 1.0 dapat ditetapkan primer P₁ dan primer P₂ untuk pemicu penggandaan fragmen DNA 1784 pasang basa (pb) pada lokus gen glukamilase yang berasal dari isolasi DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc 64 (Hadi S, 2001) dengan alat *polymerase chain reaction* (Mc. Pherson et al, 2000).

Berdasarkan penjelasan tersebut di atas maka perlu kiranya diteliti sejauh mana fragmen DNA 1784 pb yang semata-mata hanya terpengaruh oleh cahaya laser He-Ne mengalami putus dan mengalami perubahan urutan basa DNA. Agar hanya terpengaruh oleh radiasi laser He-Ne maka fragmen DNA yang mendapat perlakuan adalah fragmen DNA in vitro yaitu fragmen DNA dalam larutan TE (tris EDTA).

Hasil penelitian ini dapat diharapkan berguna untuk penelitian lebih lanjut.

1.2. Perumusan Masalah

Fragmen DNA 1784 pb secara in vitro diradiasi cahaya laser He-Ne dengan pemaparan 0.9 joule/m² :

1. apakah terjadi pemutusan fragmen DNA tersebut?
2. apakah terjadi perubahan urutan basa fragmen DNA tersebut?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian adalah untuk mendapatkan informasi terjadinya perubahan DNA in vitro yang mendapat pengaruh cahaya laser He-Ne.

Tujuan khusus penelitian adalah :

1. meneliti terjadinya pemutusan fragmen DNA 1784 pb in vitro (dalam larutan TE) setelah mendapat pemaparan cahaya laser He-Ne yang energi berkas cahayanya memapar sebesar $0,9 \text{ joule/m}^2$.
2. meneliti terjadinya perubahan urutan basa fragmen DNA 1784 pb in vitro (dalam larutan TE) karena mendapat radiasi cahaya laser He-Ne yang energi berkas cahayanya memapar $0,9 \text{ joule/m}^2$.

1.4. Manfaat Penelitian

Jika hasil penelitian menunjukkan bahwa fragmen DNA 1784 pb in vitro yang mendapat perlakuan penyinaran laser He-Ne yang energi berkas cahayanya memapar $0,9 \text{ joule/m}^2$. **tidak mengalami kelainan** maka :

1. hasil penelitian bermanfaat bahwa penyinaran cahaya laser He-Ne dapat untuk pertimbangan pembuatan gambar tiga dimensi holografis.
2. hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk penelitian lebih lanjut.

Jika hasil penelitian menunjukkan bahwa fragmen DNA 1784 pb in vitro yang mendapat radiasi laser He-Ne yang energi berkas cahayanya memapar $0,9 \text{ joule/m}^2$ **mengalami kelainan** maka :

1. perlu pertimbangan penelitian lebih lanjut tentang holografik dengan foton laser yang energi fotonnya lebih kecil daripada foton laser He-Ne.
2. hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk penelitian lebih lanjut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kuantisasi Energi

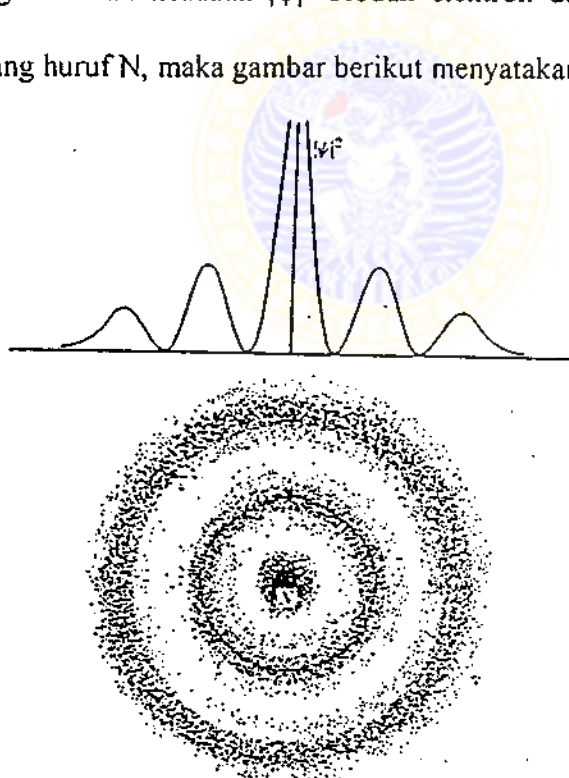
Alonso et al.(1975) menjelaskan bahwa pada tahun 1942 Louis de Broglie mengusulkan adanya hubungan antara panjang gelombang (λ) partikel yang bergerak dengan momentumnya (p) dan konstante Planck (h) yaitu:

$$\lambda = \frac{h}{p}$$

dan λ tersebut dinamakan panjang gelombang de Broglie. Eksperimen difraksi elektron yang lewat film kristal membuktikan adanya panjang gelombang de Broglie.

Untuk menjawab pertanyaan apakah elektron yang mengelilingi inti atom dengan lintasan berbentuk elips atau bukan dibutuhkan konsep medan materi dan perlu bantuan pengetahuan gelombang berdiri. Pada gelombang berdiri, amplitudo gelombang adalah bernilai tertentu pada setiap titik di ruangan. Hal yang sama terjadi pada elektron dalam atom. Medan materi dapat dinyatakan dalam istilah gelombang berdiri yang terlokalisasi dalam suatu daerah dengan amplitudo yang bervariasi dari satu titik ke titik yang lain dalam daerah tertentu dan amplitudo tersebut bernilai nol di luar daerah tertentu tersebut. Andaikan amplitudo medan materi tersebut dinyatakan dengan $\psi(x)$. Amplitudo

$\psi(x)$ ini sering disebut fungsi gelombang. Intensitas gelombang materi dinyatakan dengan $|\psi(x)|^2$. Suatu daerah yang lebih mungkin partikel berada di situ dinyatakan $|\psi(x)|^2$ lebih besar. Agar lebih dinyatakan secara kuantitatif maka perlu pernyataan: Kemungkinan mendapatkan partikel yang dinyatakan oleh fungsi gelombang $\psi(x)$ dalam selang dx sekitar titik x adalah $|\psi(x)|^2 dx$. Kemungkinan per satuan panjang untuk mendapatkan partikel di x adalah $|\psi(x)|^2$. Untuk titik yang berada dalam ruang dengan koordinat (x,y,z) maka kemungkinan per satuan volume untuk mendapatkan partikel di (x,y,z) adalah $|\psi(x,y,z)|^2$. Andaikan kita ingin menggambarkan keadaan $|\psi|^2$ sebuah elektron dalam atom yang intinya diberi lambang huruf N, maka gambar berikut menyatakan ψ tersebut.



Gambar 2.1 Distribusi kemungkinan sebuah elektron dalam sebuah atom (Alonso et al., 1975).

Fungsi gelombang $\psi(x)$ tergantung pada keadaan dinamis partikel, yaitu

$$E = p^2/2m + E_p(x).$$

Dengan ketentuan E , p , m dan E_p berturut-turut adalah energi total, momentum, massa, dan energi potensial partikel. Kaidah untuk mendapatkan $\psi(x)$ dinyatakan dalam bentuk persamaan diferensial yang disebut persamaan Schrodinger yang di formulasikan dalam tahun 1926 oleh Erwin Schrodinger. Jika $\hbar = h/2\pi$ maka persamaan tersebut (untuk masalah satu dimensi) adalah

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} + E_p(x) \psi = E\psi$$

Persamaan Schrodinger merupakan dasar mekanika kuantum. Untuk partikel dalam ruangan, persamaan Schrodinger adalah

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \left[\frac{\partial^2\psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\psi}{\partial z^2} \right] + E_p(x, y, z) \psi = E\psi$$

Andaikan sebuah partikel yang massanya m dibatasi ruang geraknya dalam daerah satu dimensi antara $0 \leq x \leq L$. Pada $x = 0$ dan $x = L$ terdapat penghalang sehingga partikel tidak dapat berada pada $x < 0$ dan $x > L$, sehingga fungsi energi potensial di $x < 0$ dan $x > L$ dapat dinyatakan $E_p(x) = \infty$. Bila dibandingkan dengan nilai $E_p(x) = \infty$, fungsi energi potensial pada daerah $0 < x < L$ adalah bernilai nol. Sistem satu dimensi ini membantu sebagai model yang berguna untuk elektron makro-molekul berantai panjang seperti molekul *dye* dan molekul DNA (*deoxybonucleic acid*). Persamaan Schrodinger yang memenuhi ketentuan molekul berantai panjang adalah

$$\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} = E\psi$$

atau

$$-\frac{d^2\psi}{dx^2} = -k^2\psi, \text{ kalau } k^2 = 2mE/\hbar^2$$

dan $\psi(x)$ yang memenuhi persamaan Schrodinger tersebut adalah

$$\psi(x) = A \sin(kx) + B \cos(kx)$$

karena ditemukannya elektron di $x = 0$ dan $x = L$ adalah berkemungkinan nol

maka $|\psi(x)|^2 = 0$ sehingga di $x = 0$ dan $x = L$ nilai $\psi(x) = 0$

Pada $x = 0$

$$\psi(0) = A \sin(k \cdot 0) + B \cos(k \cdot 0) = 0$$

$$0 = 0 + B(1) \rightarrow B = 0$$

sehingga

$$\psi(x) = A \sin(kx)$$

Pada $x = L$

$$\psi(L) = A \sin(kL) = 0$$

dan nilai kL yang mungkin adalah $kL = n\pi$

$$\text{atau } k_n = \frac{n\pi}{L} \quad (n = 1, 2, 3, \dots)$$

karena $k^2 = 2mE/\hbar^2$ maka $E = \frac{k^2\hbar^2}{2m}$ atau

$$E_n = \frac{\hbar^2\pi^2}{2mL^2} n^2$$

dan energi E_n tersebut adalah terkuantisasi (Keller, 1993).

Beberapa molekul organik mempunyai untai sejumlah atom karbon. Molekul organik tersebut di antaranya adalah *dye*. Zat kimia *dye* adalah zat pewarna sintesis atau alamiah yang digunakan dalam larutan untuk mewarnai materi (Grant, 1987). Rumus kimianya adalah $C_{17}H_{10}O$ dan berat molekulnya adalah 230,27 dan panjang molekul adalah 0,94 nm (Howard, 1992). Sebuah elektron yang berpartisipasi dalam ikatan atom-atom dalam untai *dye* bertindak sebagai sebuah molekul dalam sebuah kotak. Dalam model salah satu molekul *dye*, sebuah elektron terkurung dalam untai satu dimensi yang panjangnya 0,94 nm. Tingkat energi elektron adalah

$$E_n = \frac{\hbar^2 \pi^2}{2mL^2} n^2$$

karena $\hbar = (1,05 \times 10^{-34}) \text{ J}\cdot\text{s}$

$$\pi = 3,14$$

$$m = 9,11 \times 10^{-31} \text{ kg}$$

$$L = 0,94 \times 10^{-9} \text{ m}$$

$$n = 1,2,3,4\dots$$

maka

$$E_n = (0,688 \times 10^{-19} \text{ J}) n^2 = (0,43 \text{ eV}) n^2$$

Jadi tingkat energi elektron untuk $n = 1,2,3,4\dots$ adalah $E_1 = 0,43 \text{ eV}$, $E_2 = 1,7 \text{ eV}$, $E_3 = 3,8 \text{ eV}$, $E_4 = 6,8 \text{ eV}$... jika elektron dari keadaan $n = 4$ pindah ke $n = 3$, foton yang dipancarkan mempunyai energi $h\nu = E_4 - E_3 = 3,0 \text{ eV}$ dengan frekuensi gelombang elektromagnetik $\nu = 3,0 \text{ eV} / h = 7,2 \times 10^{14} \text{ Hz}$ dan panjang

gelombang $\lambda = c / \nu = 410 \text{ nm}$ yang merupakan gelombang elektromagnetik ultraviolet yang merupakan salah satu keluaran laser dye (Keller, 1993).

2.2 Laser Helium-Neon (He-Ne)

Andaikan N_1 buah atom masing-masing memiliki energi E_1 dan N_2 buah atom masing-masing memiliki energi E_2 . Foton yang terkait dengan transisi dua tingkat energi tersebut mempunyai energi $h\nu = E_2 - E_1$ dengan catatan h dan ν masing-masing adalah konstante Planck dan frekuensi foton, sedangkan $E_2 > E_1$. Atom pada tingkat energi E_2 dapat menjadi bertingkat E_1 secara spontan. Umpama A_{21} adalah kemungkinan tiap satuan waktu untuk bertransisi emisi spontan. Jika radiasi frekuensi ν berada dalam sistem dan energi tiap satuan volume adalah $E(\nu)$, maka terjadilah transisi absorpsi dari E_1 ke E_2 . Secara alamiah dapat diasumsikan bahwa jumlah transisi demikian itu tiap satuan waktu berbanding lurus dengan energi tiap satuan volume $E(\nu)$; yaitu kemungkinan transisi absorpsi terstimulasi tiap satuan waktu adalah $B_{12}E(\nu)$, dengan ketentuan B_{12} adalah kemungkinan transisi tiap satuan waktu dan satuan intensitas radiasi. Tetapi radiasi, yang disebabkan interaksinya dengan atom tereksitasi pada tingkat energi E_2 , juga menghasilkan transisi emisi dari E_2 ke E_1 dengan kemungkinan transisi emisi terstimulasi tiap satuan waktu $B_{21}E(\nu)$. Oleh sebab itu kemungkinan emisi total dari tingkat energi E_2 ke E_1 adalah $A_{21} + B_{21}E(\nu)$. Jika terdapat N_2 buah atom pada tingkat energi E_2 , jumlah atom yang meloncat tiap satuan waktu dari E_2 ke E_1 adalah $[A_{21} + B_{21}E(\nu)]N_2$. Pada saat yang sama, jumlah atom yang meloncat dari E_1 ke E_2 tiap satuan waktu adalah $B_{12} E(\nu) N_1$. Oleh sebab itu perubahan

atom neto pada tingkat energi E_2 tiap satuan waktu sama dengan laju penerimaan karena absorpsi dikurangi laju kehilangan karena emisi atau

$dN_2/dt = B_{12} E(\nu) N_1 - [A_{21} + B_{21}E(\nu)]N_2$. Bila keseimbangan terjadi antara atom dan radiasi, maka $dN_2/dt = 0$, atau

$$B_{12} E(\nu)N_1 = [A_{21} + B_{21}E(\nu)]N_2$$

sehingga jumlah transisi absorpsi dan emisi tiap satuan waktu antara dua tingkat energi adalah sama. Jika atom-atom dalam keadaan keseimbangan termal dan tunduk statistika Maxwell-Boltzmann maka

$$N_1/N_2 = e^{(E_2 - E_1)/kT} = e^{h\nu/kT}$$

sehingga

$$B_{12} E(\nu) e^{h\nu/kT} = A_{21} + B_{21}E(\nu)$$

atau

$$E(\nu) = \frac{A_{21}/B_{12}}{e^{h\nu/kT} - B_{21}/B_{12}}$$

dan persamaan ini bila dibandingkan dengan

$$E(\nu) = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \frac{1}{e^{h\nu/kT} - 1} \quad (\text{persamaan radiasi Planck yang terkenal})$$

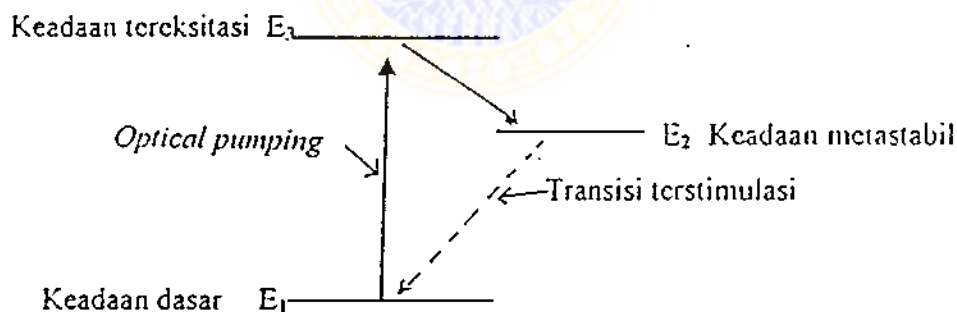
maka

$$\frac{A_{21}}{B_{12}} = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \quad \text{dan} \quad \frac{B_{21}}{B_{12}} = 1$$

Dengan $B_{12} = B_{21}$, kita mendapatkan nisbah antara kemungkinan emisi spontan A_{21} dan kemungkinan emisi terstimulasi $B_{21} E(\nu)$ bila materi dalam keadaan seimbang dengan radiasi sebagai berikut

tingkat E_1 dengan memancarkan emisi radiasi terstimulasi, maka atom-atom pada tingkat energi E_2 makin lama makin berkurang jumlahnya. Agar terjadi penguatan yang tetap, maka perlu usaha agar terjadi loncatan atom dari tingkat energi yang rendah ke tingkat energi yang tinggi (E_2). Perangkat yang mengusahakan hal tersebut bernama maser atau laser. Maser adalah singkatan *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radition* sedangkan laser adalah singkatan dari *Light Amplification by Stimulated Emission of Radition*.

Salah satu usaha untuk mendapatkan $N_2 > N_1$ adalah dengan metode *optical pumping*. Karena sistem kembali ke keadaan dasarnya, maka beberapa atom yang tereksitasi turun ke tingkat energi yang *metastable* dan pada keadaan *metastable* atom atau molekul mudah berpopulasi relatif tinggi dibandingkan dengan bila pada keadaan tingkat energi yang lebih rendah (lihat gambar berikut)



Gambar 2.2 Skema tingkat energi laser tiga tingkat (Alonso et. al., 1975)

Bila beberapa sumber meradiasi sefase (koheren) dan dengan frekuensi tunggal, amplitudo resultan adalah jumlah amplitudo sumbu sumber tadi. Bila semua sumber adalah sama, maka didapat

Resultan amplitudo koheren = $N \times$ amplitudo sumber,
 dengan catatan N adalah jumlah sumber. Karena intensitas sumber berbanding
 lurus dengan kuadrat amplitudo, maka

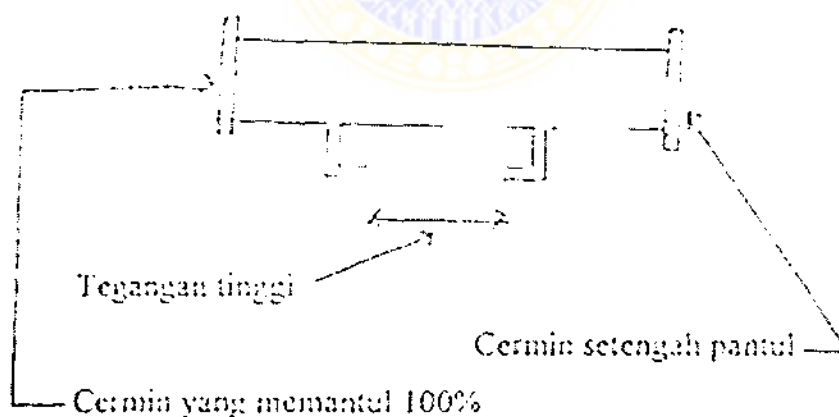
$$\text{Resultan intensitas koheren} = N^2 \times \text{intensitas sumber}$$

Bila jumlah sumber besar, maka intensitas radiasi terstimulasi sangat kuat. Di lain
 pihak, jika sumber-sumber meradiasi tidak koheren, maka

$$\text{Resultan intensitas tidak koheren} = N \times \text{intensitas sumber}$$

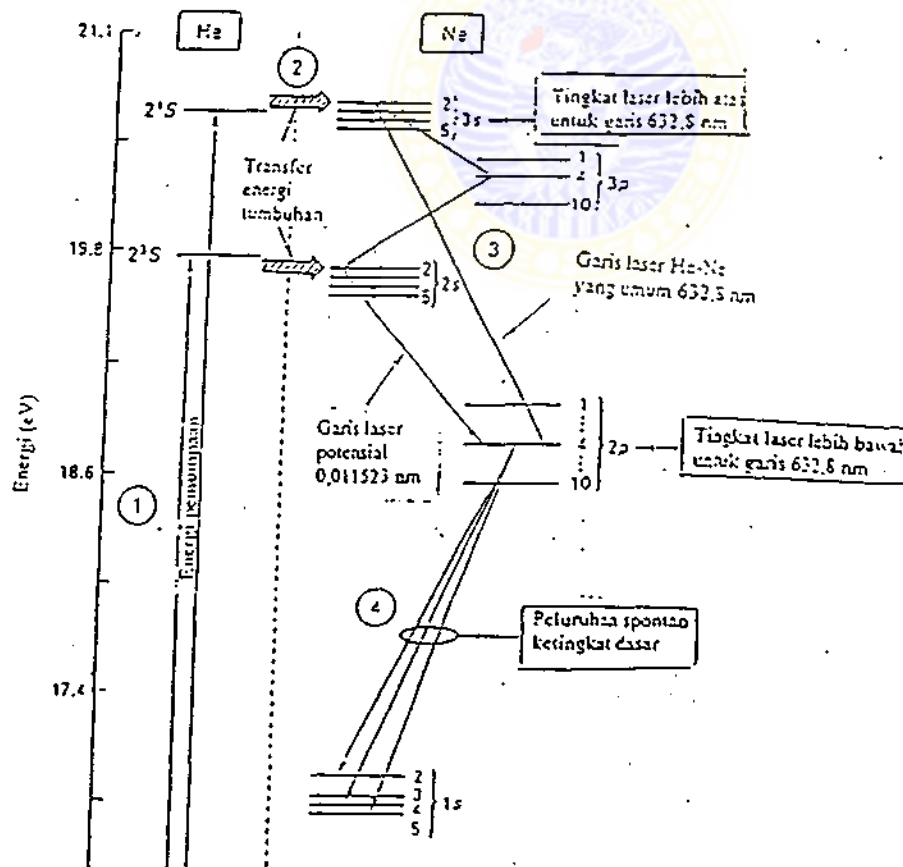
Oleh sebab itu radiasi koheren (sefase) dan monokromatis dan terstimulasi adalah
 sangat tinggi intensitasnya dibandingkan dengan radiasi tidak koheren dan
 spontan.

Bentuk laser helium-neon (He-Ne) yang pertama kali dibuat ditunjukkan
 pada gambar berikut, yang terdiri



Gambar 2.3. Bagan laser helium-neon (He-Ne) yang pertama kali
 dibuat (Alonso et al., 1975)

Tabung kaca yang panjangnya 1 meter yang berisi gas helium bertekanan parsial 1 mm Hg dan gas neon bertekanan parsial hampir 0,1 mmHg serta salah satu ujung tabung diberi cermin setengah pantul sedangkan ujung yang lain diberi cermin yang dapat memantulkan 100%. Permukaan kedua cermin berhadapan-hadapan, sejajar, dan tegak lurus sumbu tabung. Pemompaan optis (*optical pumping*) adalah penyinaran cahaya kasat mata pada atom He dan Ne. Pada pemompaan optis, atom He tereksitasi ke tingkat setinggi tingkat energi *metastable* Ne dan jika menumbuk atom Ne maka energi eksitasi He diserahkan ke atom Ne. Atom Ne yang tereksitasi di E_2 turun ke tingkat yang lebih rendah E_1 dengan memancarkan foton dengan panjang gelombang 632,8 (lihat gambar berikut).



Gambar 2.4 Siklus energi empat langkah yang terkait dengan *lasing* laser He-Ne (Frank et al., 1994)

Foton yang terstimulasi bergerak tidak sejajar sumbu tabung akan ke luar tabung, sedangkan yang sejajar tabung sebagian ke luar melewati cermin setengah pantul dan yang lain bolak-balik dalam tabung sambil menstimulasi foton. Hasilnya adalah berkas gelombang elektromagnetik laser He-Ne yang ke luar laser yang bersifat sejajar, monokromatik (632,8 nm) dan sefase (koheren).

Dengan sifat cahaya laser yang sefase tersebut, maka cahaya laser mempunyai keunggulan yang lain dibandingkan dengan cahaya biasa. yaitu dapat difokuskan sampai diameter berkas berorder panjang gelombangnya. sehingga jika cahaya laser tersebut berintensitas tinggi maka dapat dimanfaatkan untuk pemotongan bagian tubuh yang diperlukan dan jika intensitas rendah maka dapat dimanfaatkan untuk pembuatan gambar holografis mikroorganisme.

Medium yang mengamplifikasi atau medium laser adalah bagian penting alat laser. Kebanyakan laser dinamakan sesuai tipe medium laser yang digunakan, seperti helium-neon (He-Ne), karbon dioksida (CO_2), dan neodmium : yttrium aluminium garnet (Nd : YAG). Medium laser, yang mungkin berupa gas, cairan atau padat, menentukan panjang gelombang radiasi laser. Rentang panjang gelombang laser yang ada merentang dari ultra ungu sampai daerah inframerah. Medium laser yang sering digunakan dan radiasi yang terkait dengan medium itu tertera pada tabel berikut.

Tabel 2.1 Parameter laser untuk beberapa laser yang lazim.

Tipe	Panjang gelombang	Daya/energi
Helium-Neon (gas)	632,8 nm	0,1-50 mW
Ruby (padat)	694,3 nm	0,03 –100 J (tiap pulsa)
Karbon dioksida (gas)	10,6 μ m 337 nm	3-100 W 1-300 mW (tiap pulsa)
Nd : YAG (padat)	488 nm atau 514,5 nm	5 mW – 20 W
Dye (cairan)	400-900 nm (<i>tunable</i>)	20 – 800 mW
Argon flourida (<i>eximer</i>)	193 nm	di atas 10 W (rata-rata pulsa)
Hidrogen (kimia)	2,6 – 3 μ m	0,01 –150 Wcw atau 2 – 600 mJ tiap pulsa
Galium arsenide (diode semikonduktor)	780 – 900 nm	1 – 40 mW cw atau rata-rata per pulsa

Sumber : Frank et al. (1994)

Selain elemen pemompaan dan medium laser, elemen dasar ketiga laser adalah resonator yang mengarahkan foton bolak-balik lewat medium laser. Bentuk yang paling dasar resonator terdiri dari sepasang cermin datar atau lengkung yang secara cermat diarahkan sepanjang sumbu optis sistem laser. Salah satu cermin dipilih dengan reflektivitas sedapat mungkin 100%. Cermin yang lain diambil yang reflektivitasnya kurang dari 100% untuk memungkinkan sebagian berkas cahaya yang direfleksi lolos ke luar laser dan menjadi berkas keluaran gelombang elektromagnetik laser (Alonso et al., 1975).

Pada sistem laser He-Ne, helium tidak berperan dalam proses pancaran cahaya (*lasing*) tetapi helium digunakan untuk menyampaikan energi lucutan listrik ke neon dengan cara bertumbukan dengan atom neon. Hal tersebut dinamakan pemompaan dan menyebabkan neon menjadi tereksitasi yang menghasilkan inversi populasi yaitu adanya lebih banyak atom dalam tingkat berenergi lebih tinggi daripada atom dalam pada tingkat energi dasarnya. Gas helium dan neon dalam sistem laser He-Ne bertekanan 2-5 mmHg dan perbandingan jumlah atom helium dan neon adalah antara 7 : 1 dan 10 : 1.

Jika laser He-Ne kekurangan helium, umpamanya karena adanya helium berdifusi lewat kaca tabung, maka tidak terjadi *lasing*, karena efisien pemompaan terlalu rendah.

Keluaran laser He-Ne tergantung pada transisi tingkat energi gas neon dan keluaran yang paling kuat intensitasnya adalah pada garis pita panjang gelombang 632.8 nm, yaitu transisi dari tingkat energi $3s^2$ ke $2p^4$. Transisi ini dipicu dan menyebabkan emisi stimulasi. Jika transisi tersebut terjadi secara spontan, maka terjadilah pancaran foton yang arahnya 2 kemungkinan, kemungkinan pertama adalah tidak sejajar dengan sumbu sistem laser dan kedua adalah berarah sejajar sumbu sistem. Foton yang tidak sejajar sumbu akan keluar sistem laser dan menghilang, dan yang sejajar sumbu laser akan bolak-balik terpantul cermin 100% memantul dan cermin yang 50% memantul. Foton yang bolak-balik inilah yang memicu terjadinya emisi stimulasi dan menembus cermin yang 50% memantul serta merupakan keluaran berkas cahaya laser He-Ne yang sejajar dan koheren (sefase) dan monokromatis. Laser He-Ne dirakit dengan membubuhkan

jendela Brewster sehingga keluaran laser adalah terpolarisasi linier. Daya keluaran laser He-Ne yang 10 mW berdiameter 0,65 mm dengan divergensi 1,24 mrad, perlu catudaya 10 kV/6,5 mA dan diameter tabung 37 mm serta panjang tabung 440 mm. Panjang koherensi 30 cm.

Warna berkas keluaran laser adalah merah dan merupakan berkas cahaya yang intensitasnya kontinu. Penampang melintang keluaran laser He-Ne adalah lingkaran dan hampir berbentuk Gaussian TEM₀₀ yang hampir sempurna.

Umur laser He-Ne sekitar 20.000 jam.

Jadi pada dasarnya tumbukan atom helium menyebabkan atom neon naik dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi yaitu 3s dan neon dari tingkat energi 3s turun ke tingkat energi 2p karena adanya transisi *lasing* (karena dipicu) atau turun karena spontan, kemudian atom neon turun dengan cepat ke tingkat energi dasarnya.

Laser He-Ne 10 mW menimbulkan resiko pada mata karena cahaya laser He-Ne 10 mW dapat masuk menembus pupil mata sampai kedalaman 7 mm.

2.3 Elektroforesis Gel Agarosa

Pomeranz, et al. (1994) menjelaskan bahwa elektroforesis gel telah menyakinkan sebagai metode yang teliti untuk menganalisis fragmen DNA.

Elektroforesis gel adalah suatu metode yang memisahkan makromolekul baik *nucleic acids* maupun protein berdasarkan ukuran, muatan listrik, dan sifat fisis yang lain.

Gel adalah *colloid* dalam padatan. Istilah *electrophoresis* menyatakan perpindahan tempat partikel bermuatan listrik di bawah pengaruh medan listrik. *Electro* menunjukkan energi listrik. *Phoresis*, dari kata kerja bahasa Yunani *phoros*, berarti "membawa lewat". Jadi elektroforesis gel menunjukkan teknik agar molekul dipaksa lewat penyangga gel, oleh pengaruh medan listrik. Beda potensial listrik pada elektrode yang ada di kedua ujung gel menghasilkan gaya dorong.

Gel yang digunakan dalam membedakan ukuran *nucleic acid* adalah kisi *agarose* atau *polyacrylamide*. Kisi tersebut mempunyai saluran yang berdimensi sama dengan dimensi molekul.

Banyak molekul biologis yang penting seperti asam amino, *peptide*, protein, *nucleotides*, dan *nucleic acid*, berkemampuan untuk berpindah dalam keadaan terionisasi. Oleh sebab itu pada pH tertentu molekul biologis tersebut, berada dalam larutan sebagai molekul yang bermuatan listrik apakah sebagai kation (+) atau anion (-). Partikel akan berpindah ke katode atau anode bergantung pada jenis netto muatan listrik pada partikel tersebut.

Bila medan listrik diterapkan pada gel maka gel bertindak sebagai ayakan (saringan) molekul. Jadi untai yang lebih pendek bergerak lebih cepat daripada untai yang lebih panjang.

DNA untai ganda dapat tervisualisasi dengan penambahan *ethidium bromide*. Bila *ethidium bromide* terikat pada DNA maka *ethidium bromide* berfluoresensi berwarna jingga jika teradiasi oleh UV.

Persiapan dan pengelolaan *gel DNA agarose* baku adalah sebagai berikut.

Bahan yang dibutuhkan adalah *buffer* elektroforesis, umumnya adalah *Tris-acetate-EDTA (TAE)* atau *Tris-borate-EDTA (TBE)*, *loading buffer* yang terdiri dari suatu yang bermassa jenis tertentu (umpama *glycerol*) agar sampel "jatuh" pada sumur sampel, dan satu atau dua pelacak dye (*tracking dyes*) yang berpindah dalam gel serta mampu memantau seberapa jauh elektroforesis telah berlangsung, serta *ethidium bromide* yaitu suatu dye berfluoresensi yang digunakan untuk memberi tanda *nucleic acids*.

Alat yang dibutuhkan adalah bilik (*chamber*) elektroforesis, catu daya, *transilluminator (ultraviolet lightbox)*, sisir sampel yang sekitarnya nanti dituangi agarosa yang telah lebur (*molten agarose*) agar terbentuk sumur sampel pada gel, dan talam untuk pengecoran gel yang dapat diatur dimensinya dan terbuat dari plastik transparan UV.

Setelah semua alat dan bahan telah tersedia, maka dilakukan proses elektroforesis gel agarosa DNA sebagai berikut.

Mula-mula bubuk agarosa dicampur dengan *buffer* elektroforesis yang konsentrasinya sesuai keperluan, kemudian dipanaskan sehingga campuran tersebut meleleh seluruhnya. Umumnya *ethidium bromide* (konsentrasi akhir 0,5 µg/ml) ditambahkan pada gel untuk memberi fasilitas tervisualisasi DNA setelah elektroforesis. Setelah larutan menjadi dingin sekitar 60°C, larutan tersebut dituangkan ke dalam talam yang ada sisir sampel dan dibiarkan memadat pada suhu kamar.

Setelah gel memadat, sisir tersebut dicabut. Gel yang masih dalam talam plastik dimasukkan pada posisi horisontal ke dalam bilik elektroforesis dan

diusahakan gel persis terendam oleh *buffer*. Sampel yang terdiri dari fragmen DNA yang dicampur *loading buffer* kemudian diambil dengan mikropipet untuk dimasukkan ke dalam sumur sampel. Kemudian catu daya diaktifkan. Untuk meyakinkan catu daya bekerja sebagaimana mestinya maka perlu mengamati apakah sekitar elektrode timbul gelembung atau tidak. DNA akan berpindah ke arah anode, yang biasanya diberi tanda warna merah. Jarak perpindahan fragmen DNA dalam gel dapat diperkirakan oleh perpindahan pemantau dye pelacak yang divisualisasi. *Bromophenol blue dye* atau *xylene cyanol dye* berpindah melewati gel agarosa masing-masing sama lajunya dengan fragmen DNA antara 300 pb dan 4000 pb.

Bila perpindahan cukup terjadi, fragmen DNA divisualisasikan oleh pewarnaan dengan *ethidium bromide*. Untuk memvisualisasi DNA, gel ditempatkan pada *ultraviolet transilluminator*. Perlu diperhatikan bahwa DNA berdifusi ke dalam gel bila waktu cukup lama, dan oleh sebab itu sebaiknya pengambilan gambar foto secepat mungkin setelah penghentian proses elektroforesis.

Fragmen DNA linier berpindah lewat gel agarosa dengan mobilitas yang berbanding terbalik dengan logaritma berat molekulnya.

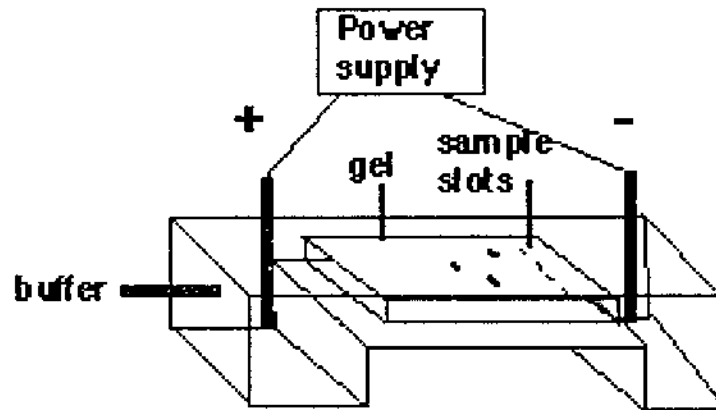
DNA yang berbentuk lingkaran berpindah dalam agarosa jelas berbeda jika dibandingkan dengan DNA linier meskipun massanya sama. Plasmid yang tidak terpotong akan terlihat berpindah lebih cepat daripada plasmik yang sama tetapi linier.

Konsentrasi agarosa yang lebih tinggi memfasilitasi pemisahan DNA yang pendek, sedangkan konsentrasi agarosa yang rendah memungkinkan resolusi DNA yang lebih panjang.

Agar terjadi resolusi fragmen DNA yang lebih besar daripada 2 kpb perlu medan listrik tidak lebih daripada 5 volt/cm dalam gel (ukuran cm adalah ukuran yang diukur antara 2 elektroda, bukan panjang gel).

Beberapa *buffer* elektroforesis yang berbeda disarankan untuk elektroforesis DNA. Penggunaan yang sangat umum untuk DNA dupleks adalah TAE (Tris-acetate-EDTA) atau TBE (Tris-borate-EDTA). Fragmen DNA akan berpindah dengan suatu laju yang berbeda dalam kedua *buffer* tersebut disebabkan oleh perbedaan kekuatan ionik. *Buffer* tidak hanya memantapkan pH tetapi juga menjadikan ion membantu konduktivitas. Bila *buffer* lupa diganti dengan air maka tidak terjadi perpindahan DNA dalam gel. Sebaliknya bila menggunakan *buffer* yang berlebihan maka kalor (*heat*) akan muncul dalam gel dan gel menjadi meleleh.

Ethidium bromide adalah dye berfluoresensi yang menyisip antara basa-basa pada *nucleic acids* dan menyebabkan deteksi fragmen DNA dalam gel yang sangat diperlukan agar terjadi. Pengikatan *ethidium bromide* pada DNA menyebabkan perubahan massa dan kekakuan, dan oleh sebab itu mobilitasnya berubah.



Gambar 2.5 Skema alat elektroforesis gel
(<http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW4/MG422.html>, 2000)

2.4 Holografi Laser

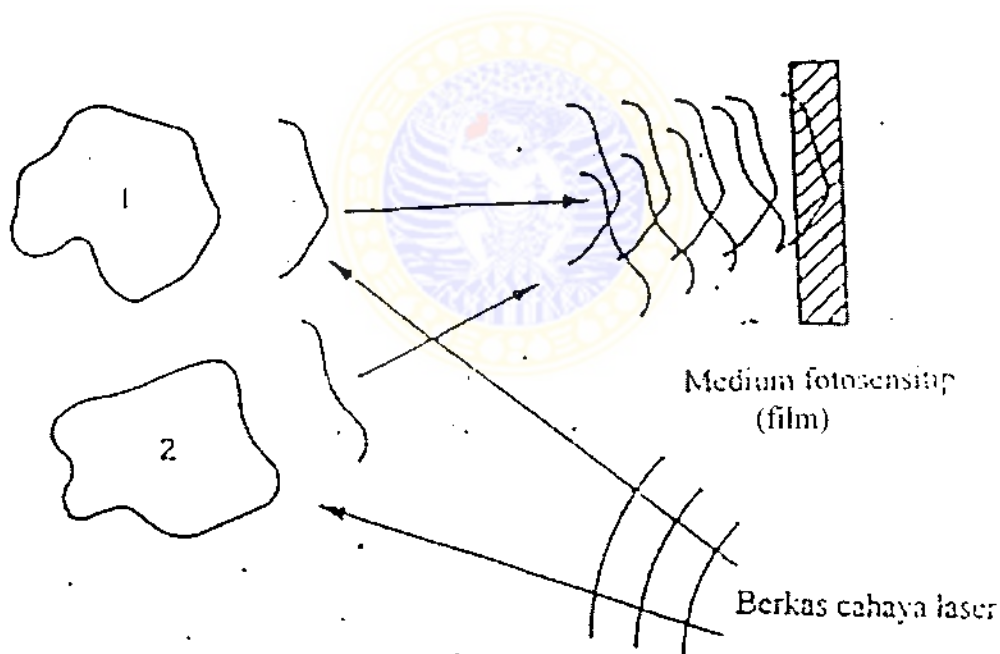
Rekonstruksi gelombangmuka (*wavefront*) yang dinamakan holografi adalah suatu rekayasa untuk mendapatkan kembali bentuk objeknya yang telah terekam pola difraksi yang tidak terfokus dari objek sebenarnya. Sekarang holografi dikenal baik sebagai cara yang praktis untuk menyimpan gelombangmuka dalam rekaman dan dari rekaman tersebut nantinya dapat direkonstruksi kembali. Rekaman yang dibentuk dalam materi fotosensitif disebut hologram. Pelat fotografis dan gelombang elektromagnetik referensi koheren dibutuhkan untuk membentuk rekaman cahaya yang tidak terfokuskan yang dihamburkan dari objek yang diiluminasi gelombang elektromagnetik laser. Pola difraksi adalah superposisi gelombang elektromagnetik laser dari beberapa objek. Bila permukaan pola, dipapari gelombang elektromagnetik laser yang sesuai, *didevelop*, dan diiluminasi, bayangan tiga dimensi objek terbentuk dalam ruang. Jadi holografi

adalah metode interferensi perekaman gelombang elektromagnetik cahaya yang didifraksi oleh subjek yang diiluminasi dengan gelombang elektromagnetik cahaya koheren. Gelombang yang didifraksi disebabkan oleh interferensi dengan gelombang referensi. Bila gelombang adalah koheren, fase relatif antara gelombang objek dan referensi tetap konstan dalam waktu tertentu yang menghasilkan efek yang dapat diamati pada distribusi intensitas maka pola interferensi terbentuk. Perekaman fotografis pola ini, yang dinamakan hologram, memuat informasi yang cukup tentang fase maupun amplitudo gelombang elektromagnetik terdifraksi untuk memungkinkan rekonstruksinya. Bila hologram diiluminasi dengan gelombang referensi maka terbentuklah rekonstruksi gelombang muka (*wavefront*).

Metode holografi dapat menggunakan beberapa gelombang yaitu gelombang elektron, sinar X, gelombang cahaya, makrogelombang, gelombang seismik, dan akustik, asalkan gelombang adalah cukup koheren untuk membentuk pola interferensi yang dibutuhkan. Tetapi holografi yang menggunakan daerah optis spektrum gelombang elektromagnetik, rupa-rupanya jenis holografi yang terbaik. Dengan menggunakan laser, holografi laser berkembang sangat pesat biarpun dengan gelombang yang lebih pendek dihadapkan oleh kebutuhan sumber koherensi.

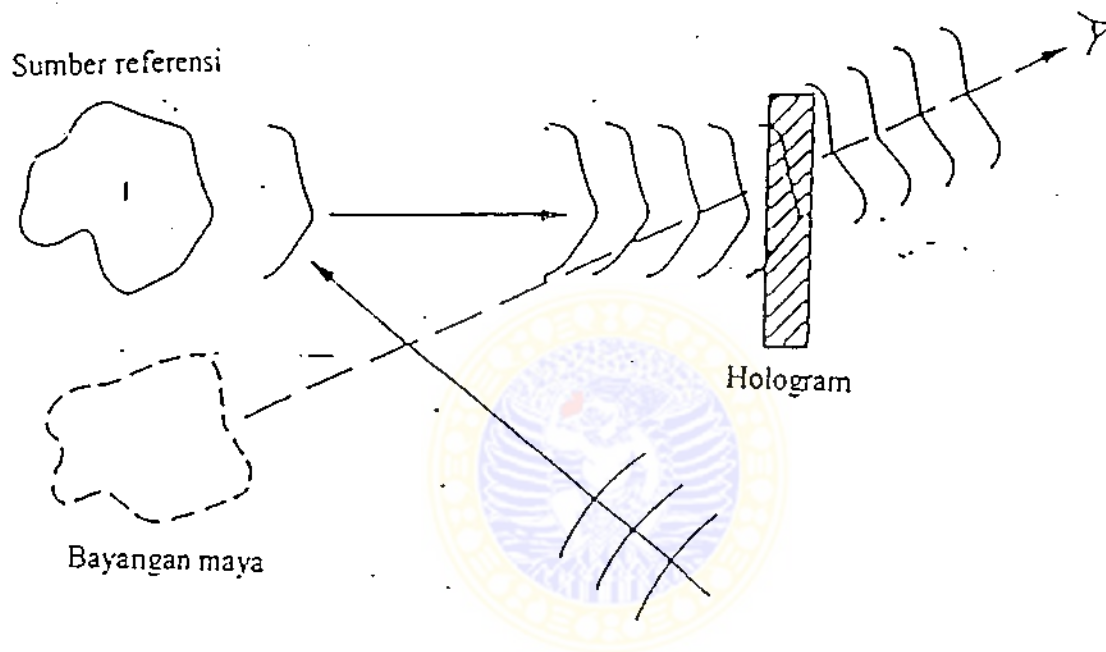
Hologram holografi laser He-Ne adalah pola interferensi gelombang cahaya laser He-Ne yang terekam pada film fotografis yang dapat menghasilkan bayangan tiga dimensi bila diiluminasi sesuai dengan ketentuan.

Cara membuat hologram sebagai berikut. Seberkas cahaya laser He-Ne dibagi dua. Berkas yang satu dijatuhkan ke pemantul yang memantulkan cahaya laser He-Ne sebagai sumber cahaya laser He-Ne referensi, sedangkan berkas yang lain dijatuhkan ke benda yang akan diambil gambar tiga dimensinya. Cahaya laser He-Ne referensi dan pantulan dari benda berinteraksi dan membentuk pola interferensi di film dan inilah yang disebut sebagai hologram. Cahaya laser He-Ne dibutuhkan karena cahaya laser adalah monokromatis dan sefase (koheren). Bagan berikut membantu menjelaskan pembentukan hologram.



Gambar 2.6 Bagan pembentukan hologram secara umum (Collier et al., 1971). dengan catatan (1) adalah pemantul cahaya laser sebagai sumber referensi dan (2) adalah benda yang akan diambil gambar tiga dimensinya.

Berikut ini adalah penjelasan bagaimana hologram diamati agar dapat terlihat gambar tiga dimensi. Bila hologram diiluminasi dengan cahaya laser He-Ne searah cahaya laser He-Ne referensi awal, maka bayangan tiga dimensi benda terlihat sebagaimana aslinya. Bagan berikut membantu menjelaskan bagaimana mengamati gambar tiga dimensi dari hologram.



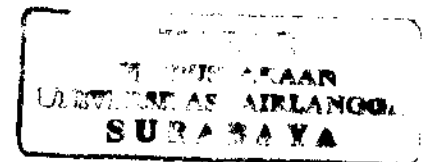
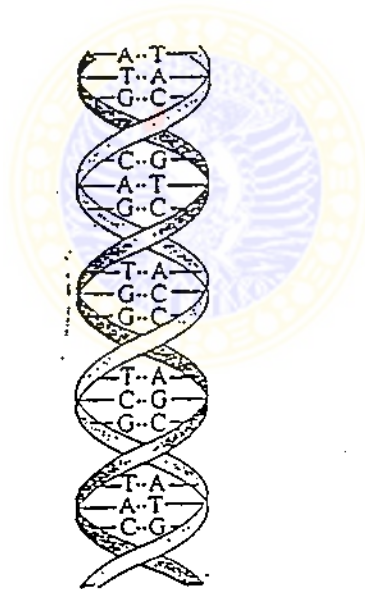
Gambar 2.7 Iluminasi hologram dengan cahaya laser He-Ne referensi. Bayangan maya tiga dimensi objek dapat dilihat (Collier et al., 1971)

2.5 Deoxyribonucleic Acid (DNA)

DNA terdapat dalam sel yaitu dalam inti sel dan mitokondria. Protein dan DNA membentuk serat (*fiber*) yang merupakan struktur kompleks yang disebut *chromosome*. Di dalam DNA terdapat materi genetik yang dapat ditransmisikan dari induk (orang tua) sel ke turunannya.

DNA terdiri dari basa *purine* yaitu *adenine* (A) dan *guanine* (G), basa *pyrimidine* yaitu *cytosine* (C) dan *thymine* (T), gula *pentose* (2-*deoxyribose*), serta asam *phosponic*.

Dengan menggunakan data penelitian sinar X dan melibatkan disiplin ilmu kimia, fisika, serta matematika yang sangat rumit, Watson et al. (1953) melaporkan dalam *NATURE* magazine tanggal 2 April 1953 bahwa DNA berbentuk untai ganda yang merupakan *double helix*, seperti tersaji dalam gambar berikut.

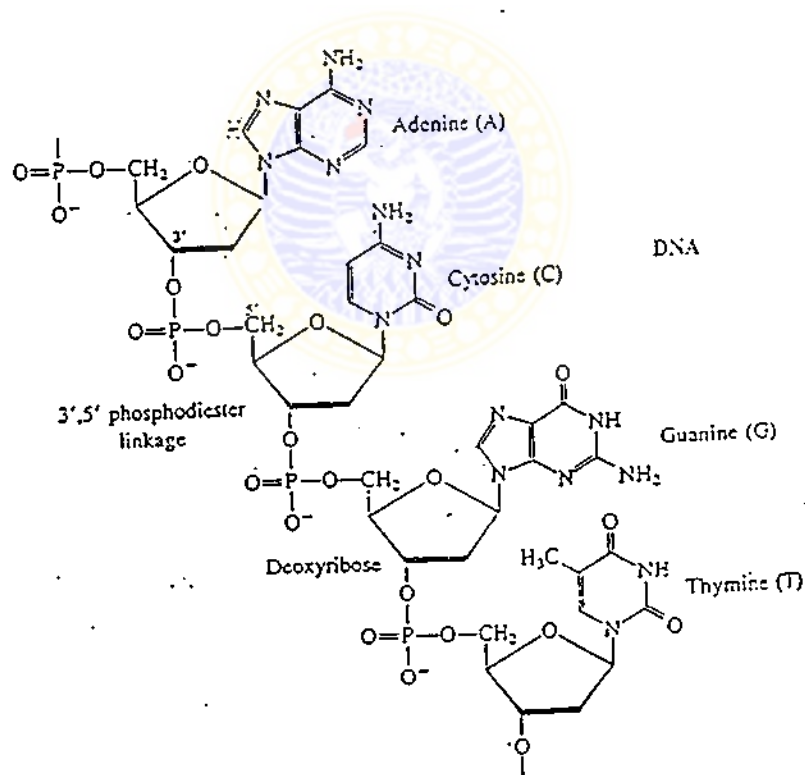


Gambar 2.8 *Double helix* DNA, yang dilaporkan oleh Watson & Crick dalam *NATURE* magazine tanggal 2 April 1953 (Hill et al., 1993)

Kelompok gula dan *phosphate* (tulang punggung DNA) membentuk bagian luar struktur DNA, seperti tangga spiral. Basa *purine* dan *pyrimidine* merupakan bagian dalam struktur DNA dengan *guanine* dan *adenine* masing-

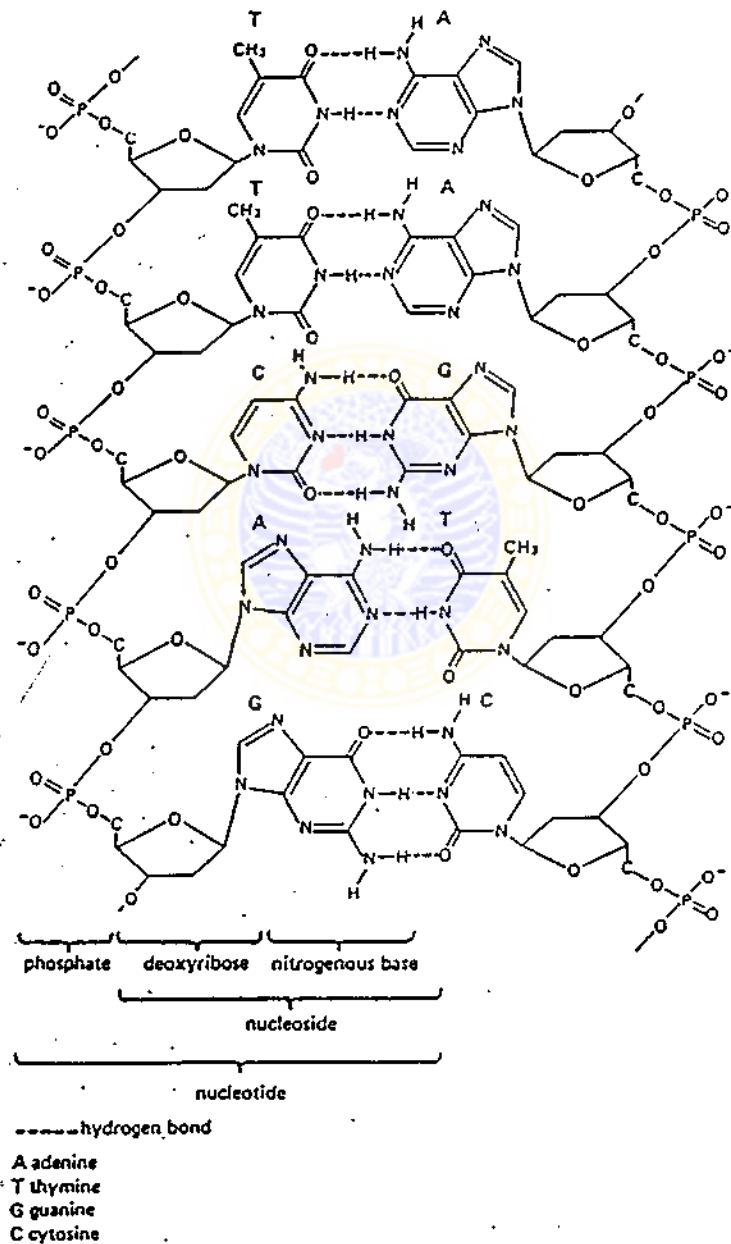
masing selalu berpasangan dengan *cytosine* dan *thymine*. Jadi basa *purine* selalu berpasangan dengan basa *pyrimidine*.

Hubungan *adenine*, *cytosine*, *guanine*, *thymine*, asam *phosphonic* dengan gula *deoxyribose* tersaji dalam gambar berikut (Hill et al., 1993) yang juga menyajikan bahwa DNA dalam larutan merupakan ion negatif karena DNA adalah asam nukleat.



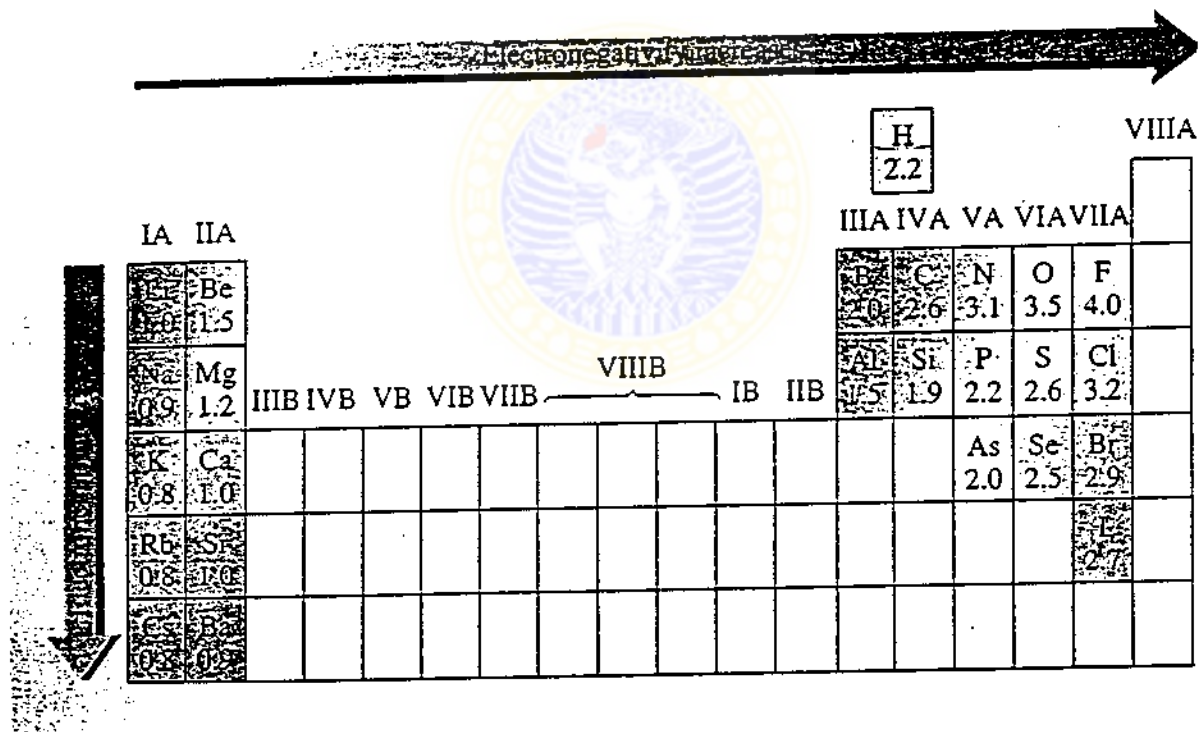
Gambar 2.9 Struktur kimia sebagian untai DNA (Hill et al., 1993)

Martin et al.(1985) menyatakan bahwa hubungan basa *purine* dan basa *pyrimidine* adalah merupakan ikatan hidrogen seperti dijelaskan pada gambar berikut.



Gambar 2.10 Sebagian molekul DNA yang menunjukkan hubungan pasangan basa komplementer dan gambar tersebut merupakan gambar bagan (Martin et al., 1985)

Hill et al.(1993) menjelaskan adanya ikatan atom-atom dalam molekul. Jika mengkaji elektronegativitas atom dalam molekul berarti kita menelaah kecondongan atom itu untuk menarik elektron yang dipunyai bersama dengan atom lain yang sama-sama dalam suatu molekul agar elektron atom temannya mendekat ke inti atom tersebut. Jika diperhatikan gambar berikut maka atom sebelah kanan atau sebelah atas menjadi lebih bermuatan negatif dengan menarik elektron atom sebelah kiri atau sebelah bawahnya, dengan ketentuan kedua atom tersebut dalam satu molekul.



Gambar 2.11 Gambar elektronegativitas beberapa elemen (Hill et al., 1993)

Oleh sebab itu, atom yang lebih bersifat elektronegativitas akan makin condong menarik elektron dari atom yang kurang bersifat elektronegativitas. Dua atom dalam molekul, yang satu menarik elektron berarti bersifat bermuatan

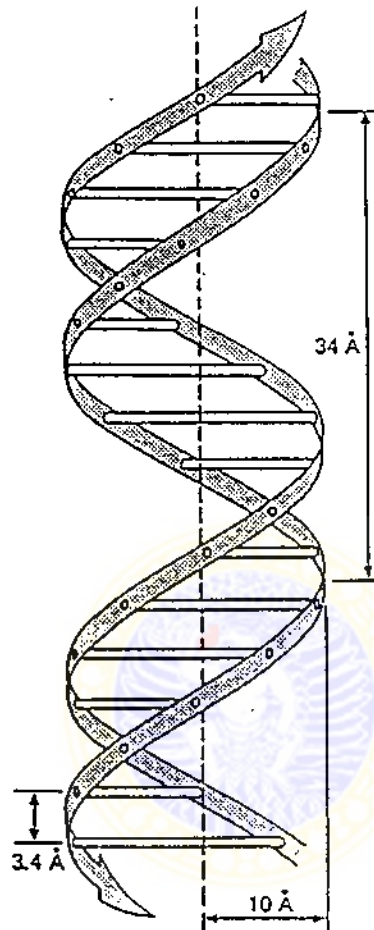
negatif dan yang lain yang ditarik elektronnya berarti bersifat bermuatan listrik positif. maka kedua atom tersebut tarik-menarik dengan gaya elektrostatik sehingga kedua atom tersebut terikat dengan suatu ikatan.

Whitten et al.(1996) menjelaskan sebagai berikut. Jika dua atom dalam molekul mempunyai perbedaan elektronegativitas besar maka ikatan kedua atom tersebut merupakan ikatan ionis, tetapi ikatan kedua atom tersebut dinamakan ikatan kovalen jika perbedaan elektronegativitas nol atau kecil.

Kroschwitz et al.(1990) memaparkan bahwa pemindahan elektron dari atom *metal* ke atom *nonmetal* dalam molekul menyebabkan adanya ikatan ionis kedua atom tersebut. sedangkan penggunaan bersama elektron antara atom-atom *nonmetal* dalam molekul menyebabkan adanya ikatan kovalen.

Whitten et al.(1996) juga menjelaskan bahwa dua atom *nonmetal* yang sama dalam molekul menyebabkan ikatan kovalen *nonpolar*, sedangkan dua atom *nonmetal* yang tidak sama dalam molekul menimbulkan ikatan kovalen polar. Pada ikatan kovalen polar, atom yang lebih menggunakan elektron bersama diberi tanda δ^- dan atom yang lain diberi tanda δ^+ . Ikatan hidrogen bukanlah ikatan kimia yang sebenarnya secara formal tetapi ikatan hidrogen adalah sebagai hasil gaya tarik antara atom δ^+ suatu molekul dalam hal ini adalah atom H. dan atom δ^- dari molekul yang lain.

Martin (1985) juga menjelaskan ukuran *double helix* DNA sebagai tersaji pada gambar berikut



Gambar 2.12 *Double helix* DNA yang disertai ukuran dimensinya (Martin et al., 1985)

Gelombang elektromagnetik bersifat dualistis, yaitu bila merambat merupakan gelombang dan bila berinteraksi dengan materi bersifat partikel (Sears, 1976).

Radiasi gelombang elektromagnetik merupakan aliran foton dan tiap foton mengandung energi sebesar hf dengan catatan h adalah konstanta Planck ($h =$

$6,6256 \times 10^{-34} \text{J/s}$) dan f adalah frekuensi gelombang elektromagnetik (Hewitt, 1993).

Hill (1993) menjelaskan bahwa DNA (*deoxyribonucleic acid*) adalah molekul yang bermuatan listrik negatif, karena DNA adalah asam nukleat.

Bila gelombang elektromagnetik berinteraksi dengan molekul (partikel) yang bermuatan listrik maka penyerahan energi dari gelombang elektromagnetik ke partikel tersebut berupa energi foton (Alonso, 1975).

2.5.1 Replikasi diri DNA

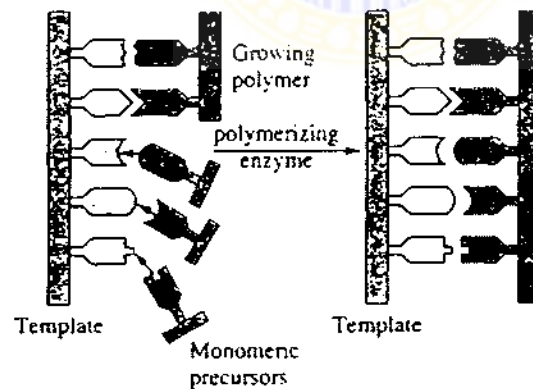
Dasar fisis turun temurun telah dikenal sejak lama. Organisme bertingkatan tinggi memproduksi turunannya secara seksual. Sel sperma dari pejantan dan sel telur dari induk yang sama spesiesnya bersatu. Telur yang telah difertilisasi harus mengandung semua informasi yang dibutuhkan untuk membuat semua berbagai sel, jaringan, dan organ yang diperlukan individu baru. Bagi manusia, sel tunggal tersebut harus mengandung informasi untuk pembuatan kaki, liver, paru, jantung, kepala, rambut, tangan dan sebagainya serta semua instruksi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan individu. Agar spesies tetap bertahan ada, informasi harus ada dalam sel benih apakah sel sperma atau sel telur, untuk produksi individu baru.

Materi dasar turun-temurun didapat dalam inti semua sel, terkonsentrasi dalam *chromosome*. Jumlah *chromosome* dari spesies yang satu dengan yang lain berbeda. Sel badan manusia mempunyai 46 *chromosome*. Satuan dasar sifat turun-temurun disebut *gene* (gen) dan *genes* sambung menyambung secara linier pada

chromosome. Selama pembelahan sel, tiap *chromosome* menghasilkan duplikasi dirinya. Sel sperma dan sel telur hanya mengandung setengah *chromosome* sel badan. Jadi dalam reproduksi seksual, seluruh komplemen *chromosome* didapat hanya bila sel telur dan sperma menggabung; individu baru menerima setengah materi turun-temurun dari tiap orang tuanya.

Apakah *gene* itu? Terbuat dari apakah *gene* itu? Materi *gene* tidak lain hanyalah bagian rantai DNA. Transmisi informasi genetis melibatkan replikasi diri (kopi atau duplikasi) untai DNA.

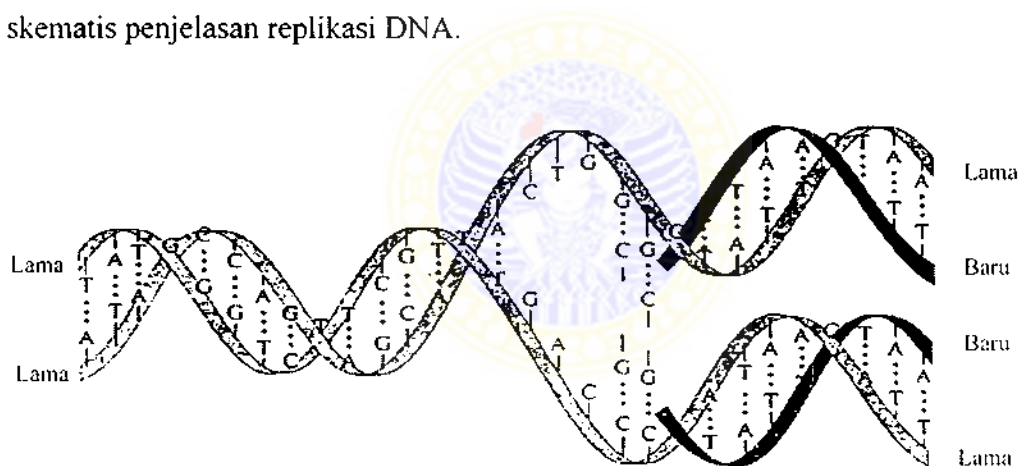
Heliks ganda DNA Watson-Crick menyediakan model untuk replikasi genetis. Bila dua untai heliks ganda dipisahkan dan ikatan hidrogen yang mengikat pasangan basa bersama-sama putus, maka tiap untai akan bertindak sebagai *template* atau pola, dan mengarahkan sintesis untai DNA baru (lihat Gambar 2.13).



Gambar 2.13. Gambar sistematis formasi polimer komplemen pada *template* (Hill et al., 1993).

Dalam fluida sel yang mengelilingi DNA terdapat semua komponen *nucleotide* yang dibutuhkan. Perlu dijelaskan sekali lagi bahwa *adenine* hanya dapat berpasangan dengan *thymine* dan *guanine* hanya dengan *cytosine*. Tiap untai yang telah dipisahkan bertindak sebagai *template* untuk pembentukan untai komplemen yang baru.

Sebagaimana *nucleotide-nucleotide* menjadi bersatu, *nucleotide* jadi bereaksi satu dengan yang lain untuk membentuk *sugar phosphate backbone* untai baru. Dengan cara ini, tiap untai molekul DNA yang semula membentuk duplikat partner semulanya. Apapun informasi disandikan dalam heliks ganda DNA yang semula, sekarang terdapat dalam tiap duplikatnya. Bila sel membelah, tiap sel anak mendapat salah satu molekul DNA dan semua informasi yang diperoleh dari sel induk. Gambar 2.14 adalah diagram skematis penjelasan replikasi DNA.



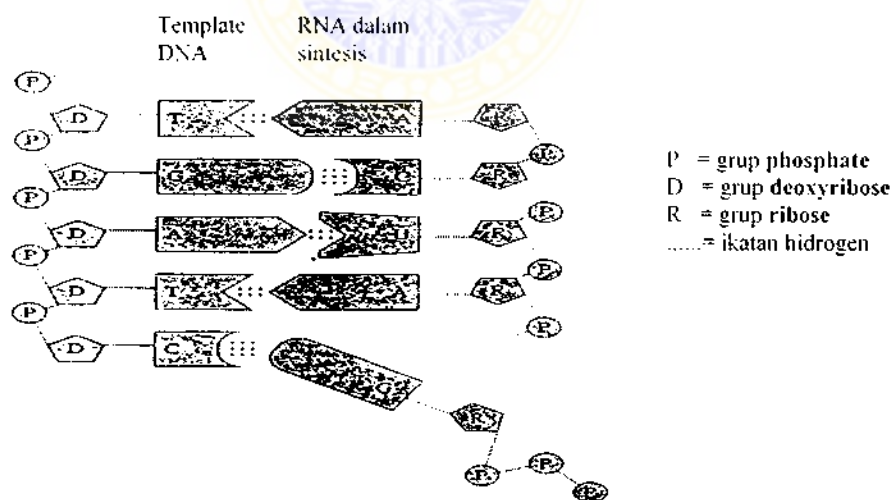
Gambar 2.14 Diagram skematis replikasi DNA (Hill et al., 1993).

Diagram 2.14 menjelaskan replikasi yang diasumsikan terjadi karena pemisahan heliks ganda. *Nucleotide* terletak di posisi yang semestinya karena adanya *enzyme* yang disebut *DNA polymerase* dan jembatan *phosphate* terbentuk, sehingga terjadilah kembali konfigurasi heliks ganda semula. Tiap heliks ganda baru terdiri sebuah untai

lama dan sebuah untai baru, suatu proses yang dikenal sebagai replikasi semikonservatif.

2.5.2 Ribonucleic acid (RNA)

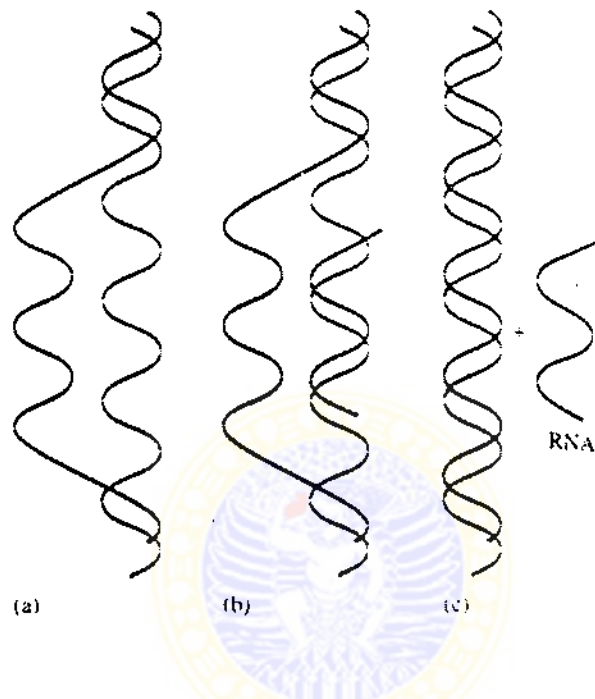
Molekul RNA terdiri untai tunggal atau *nucleic*. Semua seluler RNA terbentuk dari bagian molekul DNA dengan mekanisme seperti replikasi DNA. Untuk memulai biosintesis RNA, dua untai molekul DNA mulai terurai. Hal ini terjadi pada sisi yang khusus yang disebut *promoter*, pada *template* DNA. *Nucleotide* tertarik ke bagian molekul DNA yang untainya terurai sesuai kaidah pasangan basa DNA. *Thymine*, *cytosine*, *guanine* dan *adenine* dalam DNA berturut-turut berpasangan dengan *adenine*, *guanine*, *cytosine* dan *uracil* dalam RNA. Sebab RNA adalah kopi komplemen informasi yang terdapat dalam DNA, proses biosintesis RNA disebut sebagai transkripsi. Gambar 2.15 menjelaskan sintesis transkripsi RNA pada *template* DNA.



Gambar 2.15 Sintesis transkripsi RNA pada *template* DNA (Hill et al., 1993).

Satu untai heliks ganda DNA digunakan sebagai sebuah *template* untuk tempat basa RNA. Begitu *nucleotide* ada pada posisi semestinya, tulang punggung *phosphate*

terbentuk, sehingga menghasilkan untai RNA. *Nucleotide* terikat karena adanya enzim *polymerase* RNA. Gambar 2.16 menjelaskan urutan proses dari heliks ganda DNA terpisah sebagian, RNA terbentuk di bagian DNA yang terpisah, dan akhirnya RNA melepaskan diri.



Gambar 2.16 Heliks ganda DNA sebagian terpisah (a). RNA terbentuk pada bagian DNA yang terpisah (b), dan selanjutnya RNA melepaskan diri (c) (Hill et al., 1993).


Transkripsi berbeda dari replikasi DNA dalam beberapa hal. Selama transkripsi, pada bagian DNA tertentu hanya satu untai DNA membantu sebagai *template* dan dikopi, tetapi pada bagian DNA yang lain untai yang lain membantu sebagai *template* untuk biosintesis molekul RNA yang berbeda. Jadi molekul RNA jauh lebih pendek daripada molekul DNA. Segera setelah transkripsi sempurna, RNA terlepas dan heliks DNA terbentuk kembali.

Tiga tipe dasar RNA adalah messenger RNA (mRNA), *transfer* RNA (tRNA), dan *ribosomal* RNA (rRNA).

Messenger RNA (mRNA) terbentuk beberapa % jumlah total RNA dalam sel. Molekul mRNA berada selama waktu yang relatif singkat. Laju degradasi mRNA berbeda dari satu *spesies* dan *spesies* yang lain dan juga dari tipe sel yang satu dan yang lain. Dalam bakteri, setengah total mRNA terdegradasi tiap 2 menit, sedangkan dalam hati tikus waktu paroh adalah beberapa hari. Setelah transkripsi, mRNA ke *cytoplasm* dengan membawa pesan genetis dari DNA ke *ribosome* yang merupakan lokasi sintesis protein.

Ribosomal RNA (rRNA) terbentuk 80% total komplemen RNA selular. *Ribosome* adalah struktur selular yang bertindak sebagai tempat untuk sintesis protein. Komposisi *ribosome* adalah sekitar 65% rRNA dan 35% protein.

Transfer RNA (tRNA) adalah adalah asam nukleik yang molekulnya relatif rendah dibandingkan dengan RNA yang lain. Dengan bantuan enzim khusus, tRNA mengikat asam amino khusus dan membawanya ke lokasi sintesis protein pada kode genetis yang tepat. Tiap 20 asam amino yang didapat dalam protein mempunyai sedikitnya satu tRNA yang sesuai. Adanya beberapa tRNA untuk asam amino yang sama diistilahkan *multiplicity*.

Molekul tRNA mempunyai struktur seperti daun semanggi. Salah satu loop terdapat sebuah deret tiga basa unik yang berbeda dengan basa pada tRNA – *Triplet* ini dinamakan *anticodon*. Asam amino khusus menjadi tertambat pada ujung lain tRNA. Dalam pembahasan sintesis *polypeptide*, gambar  digunakan untuk menyatakan molekul tRNA.

2.5.3 Sintesis protein

Gene adalah segmen sebuah molekul DNA yang mengkode untuk biosintesis satu rantai *polypeptide* yang lengkap. (Bila sebuah protein tertentu mengandung dua atau lebih rantai *polypeptide*, tiap rantai dikodekan oleh *gene* yang berbeda). Tiap *gene* dalam segmen DNA mengandung sekitar 1000-2000 *nucleotide*. Sebuah sel manusia mengandung sekitar 100.000 *gene*.

Berdasarkan kenyataan bahwa DNA membawa pesan, masih ada masalah bagaimana pesan tersebut dibaca. Bagaimana deretan basa tertentu sepanjang rantai DNA diterjemahkan ke dalam organisme yang rumit? Jawabannya adalah bahwa DNA mengarahkan sintesis protein. Protein bermanfaat sebagai materi pembangun dan yang paling penting adalah bermanfaat sebagai enzim.

Jika deretan basa sepanjang untai DNA menentukan deret asam amino sepanjang rantai *polypeptide*, maka informasi yang terdapat dalam DNA harus dipindahkan dari inti ke posisi sintesis protein. Hal ini telah dilaksanakan oleh interaksi seluruh asam *nucleic* dengan lebih 100 enzim yang berbeda. Telah dipaparkan bahwa mRNA dibuat dari *template* DNA dan tentunya mRNA mengandung deretan basa yang berkomplemen DNA tersebut. Begitu mRNA terbentuk, mRNA diangkut menembus membran inti ke dalam sitoplasma (dan tentunya ke *ribosome*), dengan membawa instruksi genetik. **Tiap kelompok (grup) tiga basa sepanjang untai mRNA sekarang menentukan asam amino yang khas, dan deret grup triplet ini mendikte deret asam amino dalam protein.** Karena sandi melibatkan tiga basa tiap satuan terkodekan, maka hal ini disebut sebagai kode triplet. Satuan kode ini dinamakan *codon*.

Proses yang melibatkan transfer informasi yang dikodekan dalam mRNA ke struktur molekul protein dasar sering disebut **translasi**.

Sebelum asam amino dapat digabungkan ke rantai *polypeptide*, asam amino harus pertama kali diaktifkan. Keaktifan terjadi sebelum asam amino bereaksi dengan molekul pembawa tRNA. Proses yang sangat penting ini membutuhkan enzim aktivasi tertentu dan partisipasi molekul ATP. **Enzim (aminoacyl tRNA synthetases) maupun tRNA keduanya sangat spesifik untuk asam amino khusus.** Tingkat spesifikasi yang tinggi enzim *synthetase* adalah sangat penting untuk penggabungan asam amino pada protein. Setelah molekul asam amino telah diaktifkan dan telah menjalani reaksi dengan pembawa tRNA, sintesis protein dapat berlangsung.

2.5.4 Kode genetik

Deret basa pada mRNA mengarahkan deret asam amino yang tepat untuk tiap protein. *Codon* (satuan yang mengkode untuk asam amino khusus) terdiri sekelompok tiga *nucleotide* yang berdekatan pada mRNA. Terdapat 64 kemungkinan *triplet codons*. Berikut adalah persesuaian *codon* dan asam amino.

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

Sifat kode genetik antara lain sebagai berikut :

1. Pada dasarnya kode adalah bersifat semesta. Binatang, tumbuhan, dan sel bakteri menggunakan *codon* yang sama untuk menetapkan tiap asam amino. (Sedikit pengecualian telah ditemukan).
2. Kode adalah tergenerasi secara keseluruhan, kecuali dua kasus (*methionine* dan *tryptophan*), lebih dari satu *code* triplet untuk asam amino tertentu.

2.5.5 Mutasi dan penyakit genetik

DNA mengarahkan sintesis protein melalui perantara mRNA dan deretan basa dalam DNA adalah penting dan menentukan deretan asam amino yang cocok dalam protein. Deretan basa dalam DNA mungkin diubah baik secara spontan atau oleh paparan kalor, radiasi, atau bahan kimia tertentu. Perubahan deretan (urutan) basa dalam molekul DNA diberi istilah mutasi. Tipe mutasi yang paling umum adalah substitusi (basa yang lain disubstitusikan), sisipan (penambahan basa baru), dan *deletion* (kehilangan basa).

Banyak mutasi diabadikan oleh replikasi. Hal ini mungkin sebagai mutasi *gene* untuk tujuan kebaikan (seperti untuk evolusi lebih lanjut lewat seleksi alam), tetapi kebanyakan mutasi adalah merugikan. Jika titik mutasi terjadi di tempat yang penting maka protein yang tidak sempurna akan terbentuk dan akan menghambat aktivasi biologis dan mungkin menghasilkan kematian sel. Dalam hal ini deretan (urutan) basa DNA akan hilang dan tidak akan dikopi oleh sel anak. Mutasi yang tidak mematikan sering menyebabkan penyakit turun-temurun. Penyakit tersebut dinamakan penyakit genetik (Hill et al., 1993).

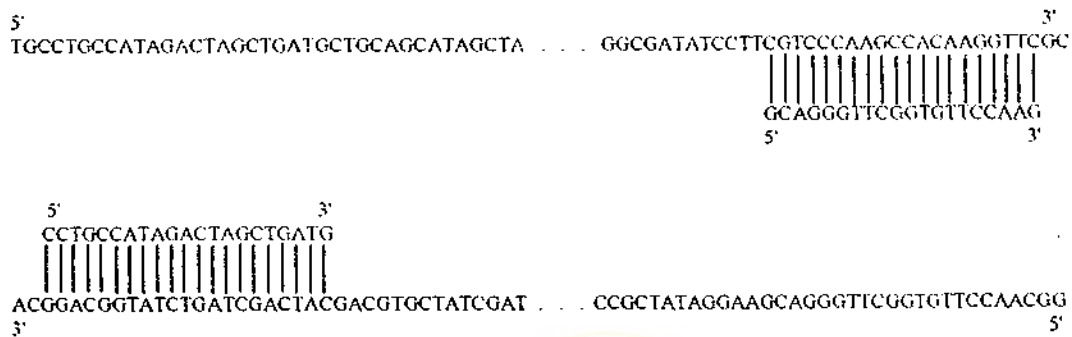
2.6 *Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Analisis Urutan DNA*

Polymerase Chain Reaction (PCR)

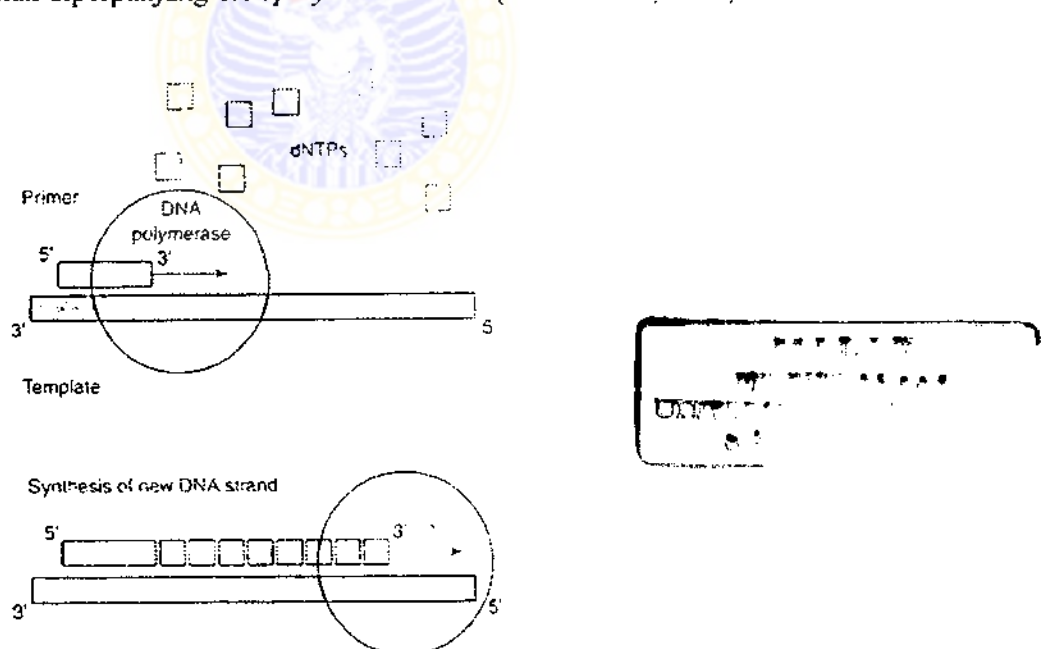
Mc. Pherson et al. (2000) menjelaskan bahwa PCR menggunakan komponen-komponen mesin pengganda yang kompleks untuk amplifikasi fragmen DNA dalam *test tube*. Dalam sistem *buffer* yang sederhana, daerah molekul DNA templat ditiru (*copied*) oleh suatu *polymerase* DNA yang menggunakan *deoxynucleotides* sebagai *building blocks* untai yang baru (*new strands*). *Sequence specific oligonucleotides primers* yang mengikat templat yang sesuai kaidah pasangan basa (Gambar 2.17) mendefinisikan daerah templat untuk ditiru. Untai (*strands*) templat dipisah oleh kalor (*heat*), yang menyebabkan ikatan hidrogen antara pasangan basa untai DNA putus, suatu proses yang dikenal sebagai *denaturation*. Primer *oligonucleotides* kemudian mendapatkan urutan komplementernya pada templat dan *polymerase* DNA kemudian mulai menambahkan *deoxynucleotides* pada *3'-OH group* primer, yang menghasilkan molekul dupleks baru (Gambar 2.17). Pada tahap berikutnya, molekul *double stranded* baru tersebut didenaturasi lagi dan tiap untai tunggal (baik templat awal maupun untai yang baru disintese) bertindak sebagai templat sintesis DNA lebih lanjut. Jumlah untai urutan *target* akan dilipatkan tiap siklus PCR (lihat Gambar 2.18).

PCR mengandalkan pada penggunaan suhu yang berbeda untuk tiga tahap reaksi yaitu : *denaturation*, *annealing*, dan *extension*. Suhu yang tinggi (95°C) digunakan untuk memisahkan untai templat DNA, peristiwa itu dinamakan *denaturation*. Suhu kemudian diturunkan (pada suhu tergantung macam primer, umpama untuk primer tertentu 55°C) untuk memberi kesempatan primer agar

berpasangan basa pada urutan komplementernya pada untai templat, peristiwa itu dinamakan *annealing*. Kemudian suhu dinaikkan 72⁰C untuk proses *extension*. Ketiga tahap tersebut diulang untuk keperluan amplifikasi, umpama sampai 30 siklus. Akhirnya suhu diturunkan menjadi 4⁰C.



Gambar 2.17. *Oligonucleotides* berpasangan basa sesuai dengan aturan pasangan basa Watson-Crick dengan untai DNA templatnya yang sesuai. Ujung 3' *oligonucleotides* akan diperpanjang oleh *polymerase* DNA (Mc Pherson, 2000)



Gambar 2.18. Perpanjangan primer oleh DNA *polymerase*. Primer menempel pada urutan komplementer, pada untai templat dan DNA *polymerase* menggunakan urutan templat untuk memperpanjang primer dengan menggabungkan *deoxynucleotides* yang benar (dNTP) (Mc Pherson, 2000).

Analisis urutan basa DNA

Old et al. (1989) menjelaskan bahwa pengurutan basa DNA adalah kemampuan dasar memanipulasi gen secara modern. Ada 2 metode pengurutan basa DNA yaitu Maxam-Gilbert dan Sanger-Coulson.

Metode pengurutan basa DNA oleh Maxam dan Gilbert.

Metode analisis urutan basa DNA Maxam dan Gilbert menggunakan reagen (*reagent*) untuk menyebabkan pemutusan basa khusus DNA. Sekarang untuk analisis skala besar, metode tersebut kurang diminati lagi dibandingkan dengan metode enzimatik "*dideoxy*". Meskipun metode Maxam dan Gilbert masih menerapkan prinsip elektroforesis gel *polyacrylamide* sebagai penentuan urutan basa.

Pada metode Maxam dan Gilbert (Maxam et al.,1977), titik awal adalah suatu fragmen restriksi DNA tertentu. Untai DNA yang ditentukan urutan basanya harus diberi tanda radioaktif pada salah satu ujungnya dengan gugus (*group*) fosfat P^{32} . Pemutusan basa khusus tergantung hal berikut : Reagen kimiawi spesifik/khusus akan mengubah satu atau dua basa dalam DNA.

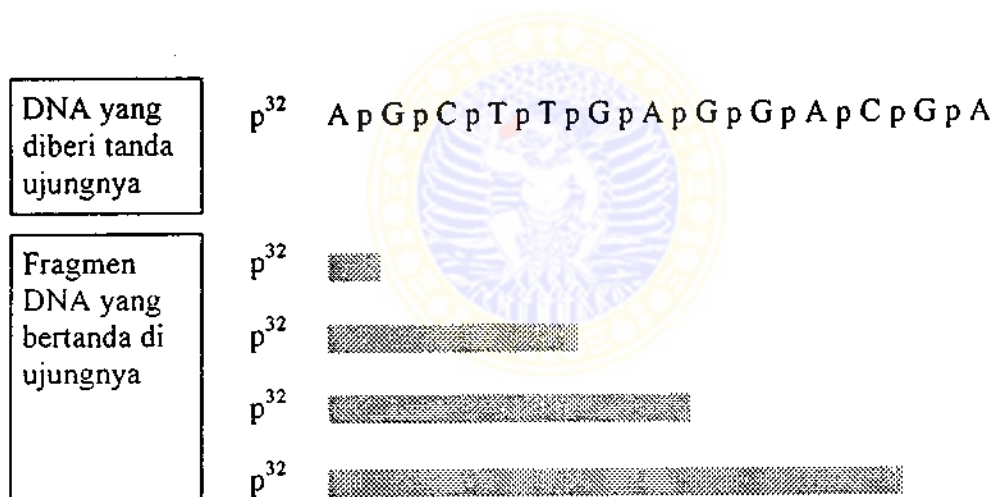
Tabel 2.2 Reagen untuk Maxam dan Gilbert pengurutan basa DNA

No	Kekhususan basa	Reaksi basa	Penghilangan basa yang diubah	Pemutusan untai
1	G	Dimetilfosfat asam	Piperidin	Piperidin
2	G+A	Asam	Depurinase yang dikatalis asam	Piperidin
3	T+C	Hidrazin	Piperidin	Piperidin
4	C	Hidrazin + NaCl	Piperidin	Piperidin
5	A + C	NaOH	Piperidin	Piperidin

Sumber : Old et al.(1989)

Kemudian basa yang telah berubah dapat dipindahkan dari kerangka gula - fosfat DNA.

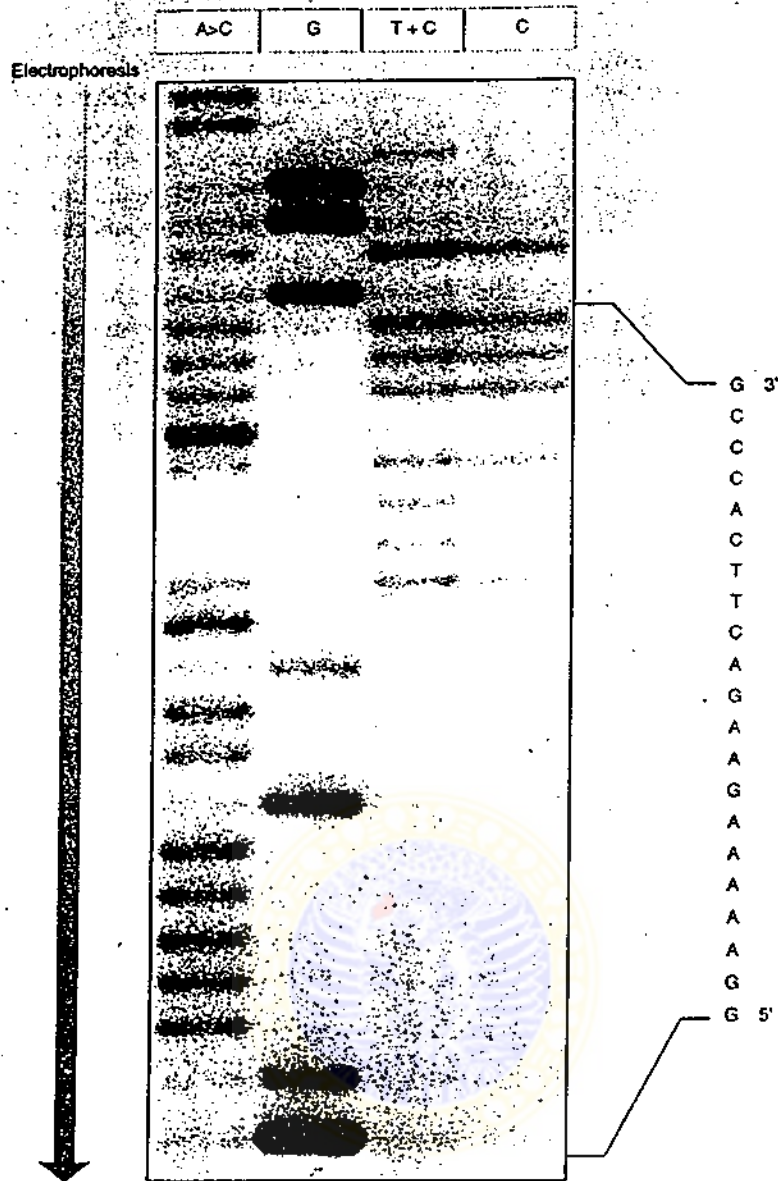
Untai DNA diputus dengan piperidin di residu gula yang kehilangan basa. Pemutusan tersebut tergantung pada tahap sebelumnya. Apabila tiap reagen basa khusus digunakan dalam reaksi terbatas dengan DNA yang ujungnya diberi tanda, akan dihasilkan beberapa fragmen DNA yang panjangnya berbeda-beda. Hal yang perlu digarisbawahi bahwa reaksi basa khusus dengan sengaja dibatasi agar memberikan satu atau beberapa potongan per molekul. Hal ini disajikan pada gambar berikut dengan beberapa fragmen terkumpul yang dihasilkan oleh reaksi spesifik G diberikan sebagai contoh.



Gambar 2.19 Pemotongan kimiawi DNA hipotesis pada residu G. Suatu set terkumpul fragmen DNA yang diberi tanda ujungnya dihasilkan karena reaksi terbatas DNA yang ujungnya bertanda dengan reagen khusus G. Fragmen lain juga dihasilkan, tetapi hanya fragmen yang ujungnya tidak memiliki tanda (Old et al., 1989).

Beberapa fragmen dihasilkan secara terpisah oleh pereaksi DNA dengan tiap reagen (Tabel 2.2). Keseluruhan lima reaksi (Tabel 2.2) mungkin dilaksanakan; reaksi kelima memberi informasi tambahan, yaitu semata-mata untuk menegaskan. Reaksi pengurutan tersebut dianalisis dengan menjalankan empat atau lima sampel pada gel pengurutan.

Gel pengurutan DNA adalah gel beresolusi tinggi yang dirancang untuk memisahkan fragmen untai tunggal DNA berdasarkan acuan panjangnya. Secara rutin gel semacam tersebut mengandung 6 – 20 % *polyacrylamide* dan 7 M urea. Urea tersebut bertindak sebagai pendenaturasi (*denaturant*) yang fungsinya adalah meminimalkan jumlah struktur sekunder DNA yang berpengaruh pada mobilitas elektroforesis. Gel ini diberi gaya listrik untuk memberi kalor (*heat*) sehingga suhunya mencapai 70⁰ C. hal ini juga untuk meminimalkan jumlah struktur sekunder DNA. Pita DNA yang telah diberi tanda yang diperoleh setelah elektroforesis semacam tersebut dapat ditampakkan oleh "*autoradiography*" pada lembar lebar film sinar X. Kemudian urutan basa DNA langsung dari tangga urutan dalam jejak basa khusus yang terletak bersebelahan (Gambar 2.20).

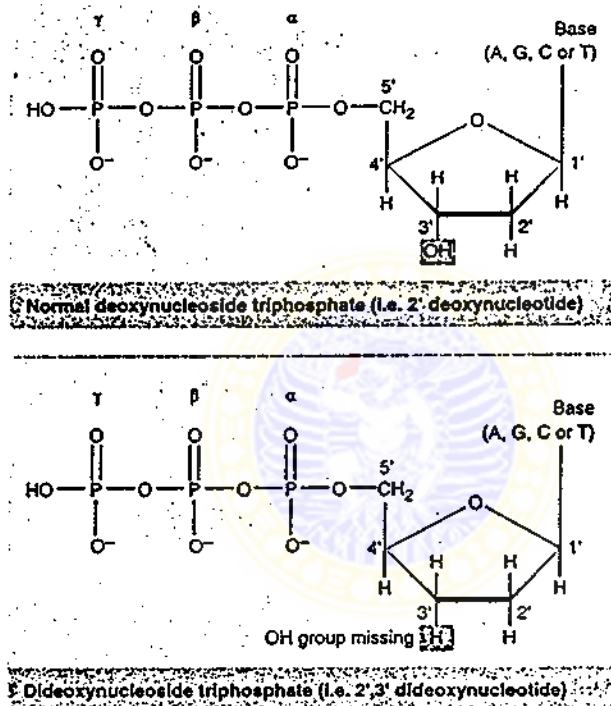


Gambar 2.20 Perbesaran *autoradiography* Maxam dan Gilbert (Old et al., 1989)

Pengurutan basa DNA metode terminator rantai atau metode dideoksi atau metode Sanger dan Coulson.

Bila pengurutan basa DNA berskala besar maka metode Sanger lebih diminati daripada metode Maxam dan Gilbert. Pengurutan dengan metode Sanger digunakan bersama-sama pengklonan DNA ke dalam *M₁₃ phage vektor* untuk memproduksi untai tunggal DNA.

Agar dapat menyadari keanggunan teknologi kombinasi maka perlulah memahami prosedur pengurutan DNA terminator rantai. Metode tersebut mengambil manfaat dari dua sifat *DNA polymerase*. Yang pertama adalah kemampuannya mensintesis dengan benar salinan komplementer template DNA untai tunggal. Yang kedua adalah kemampuannya untuk menggunakan 2',3' - *dideoxynucleoside triphosphates* sebagai substrat (Gambar 2.21).

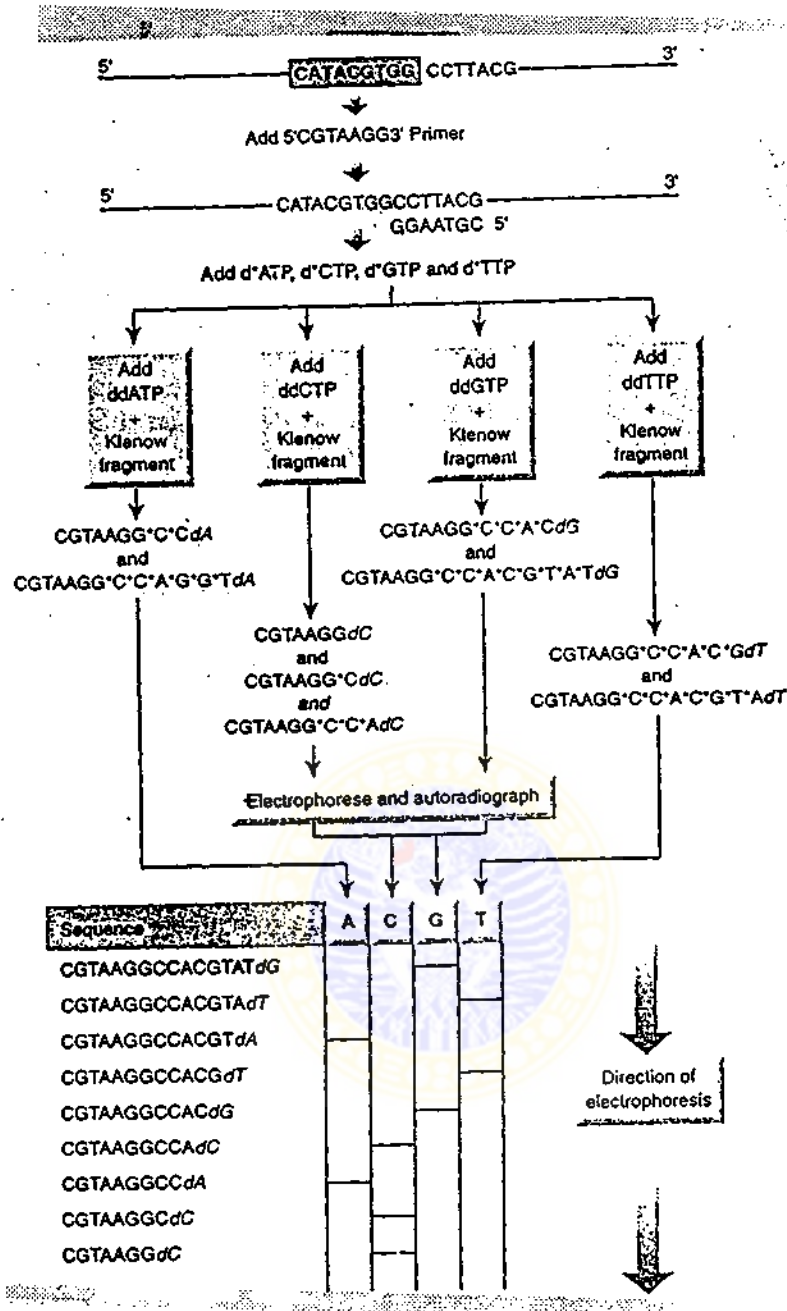


Gambar 2.21 *Dideoxynucleoside triphosphates* berlaku sebagai terminator rantai sebab *dideoxynucleoside triphosphates* tersebut kehilangan gugus OH 3'. Pemberian nomor atom karbon pentosa ditunjukkan pada gambar. Atom fosfor α , β , dan γ juga diberitahukan (Old et al., 1989).

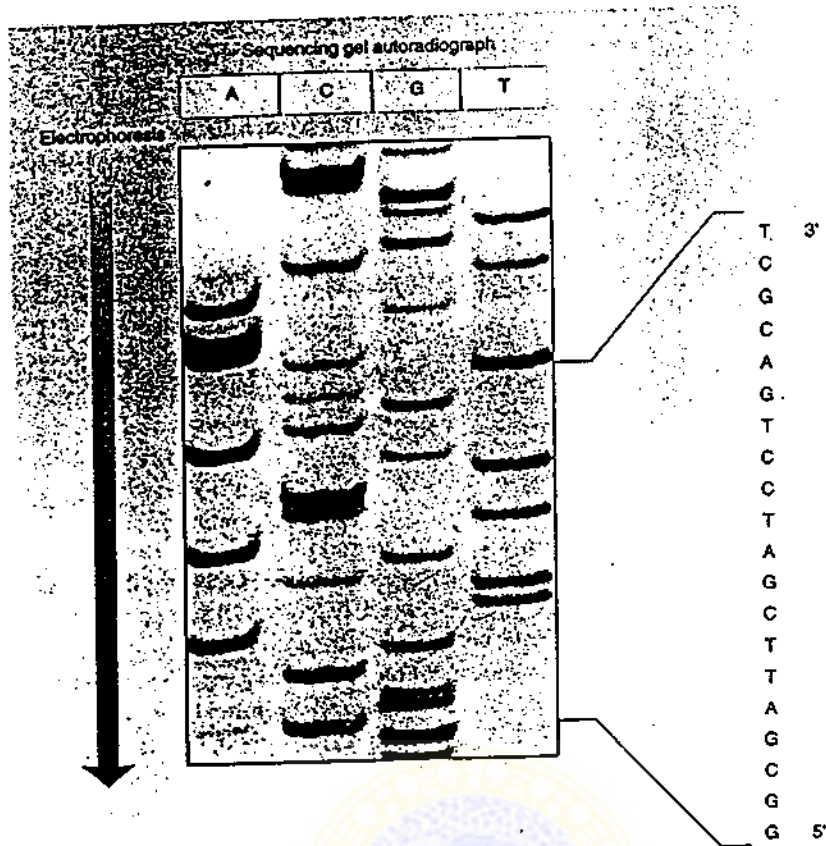
Sewaktu analog (2',3' dideoksinukleotida) digabungkan pada titik tumbuh rantai DNA, ujung 3' kehilangan gugus hidroksil dan tidak lagi substrat untuk perpanjangan rantai; jadi rantai DNA yang sedang tumbuh diakhiri pertumbuhannya.

Pada penerapannya, fragmen Klenow *DNA polymerase I* (yang kehilangan aktivitas 5' – 3' *exonuclease* dari enzim yang utuh), digunakan untuk mensintesis kopi komplementer urutan sasaran (*target*) untai tunggal. Permulaan sintesis DNA membutuhkan primer dan umumnya primer tersebut adalah *oligonucleotide*. Yang disintesis secara kimiawi yang tergabung didekatnya.

Sintesis DNA dilakukan dalam keberadaan empat *deoxynucleoside triphosphate*, salah satu atau lebih di antaranya ditandai dengan p^{32} dan di dalam keempat campurannya diinkubasi secara terpisah dan mengandung konsentrasi rendah dari masing-masing *dideoxynucleoside triphosphate*. Oleh sebab itu dalam tiap reaksi terdapat populasi molekul DNA yang sebagian tersintesis radioaktif masing-masing mempunyai ujung 5' yang sama, tetapi masing-masing panjangnya berbeda sampai ke ujung 3' basa khusus. Setelah periode inkubasi yang sesuai DNA dalam tiap campuran didenaturasi (terpisah menjadi dua untai tunggal), dielektroforesis sebelah menyebel, dan pita radioaktif DNA beruntai tunggal di deteksi dengan *autoradiography*. Kemudian urutan basa dibaca langsung *autoradiograph* seperti yang tersaji pada Gambar 2.22 dan Gambar 2.23 pada halaman berikut ini.



Gambar 2.22 Pengurutan DNA dengan *dideoxynucleoside triphosphate* sebagai terminator rantai. Dalam gambar tersebut tanda bintang menunjukkan adanya ^{125}I dan awalan 'd' menunjukkan adanya suatu *dideoxynucleoside*. Pada bagian atas gambar DNA yang di urutkan urutan basanya dimasukkan dalam kotak. Perhatikan bahwa kalau primernya tidak ditandai suatu radioisotop pita yang paling kecil urutan CGTAAGGdC tidak akan di deteksi oleh *autoradiography* karena tidak ada basa yang diberi tanda tergabung (Old et al., 1989).



Gambar 2.23 Autoradiograph gel perurutan basa DNA yang diperoleh dengan metode perurutan basa DNA terminator rantai (Old et al., 1989).

2.7 Kaitan Cahaya Laser Dengan Bidang Kehayatan

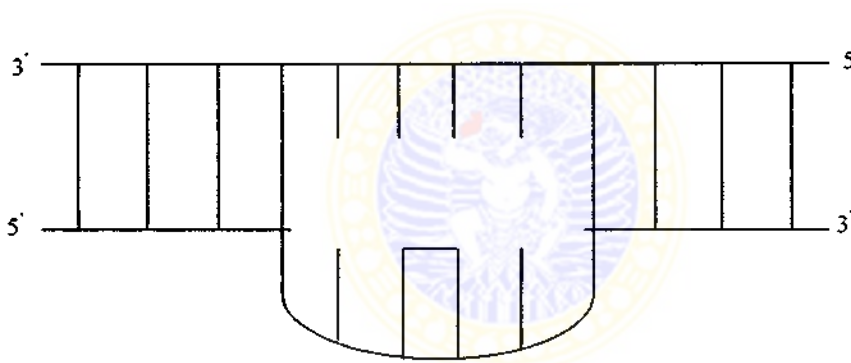
2.7.1 Cahaya laser ultraviolet (UV)

Pemaparan gelombang elektromagnetik laser yang panjang gelombang 308 nm dapat merusak sel manusia in vitro (Schomaker, 1997).

Gelombang elektromagnetik yang panjang gelombangnya 254 nm dapat merusak DNA dalam inti sel manusia dan kerusakan tersebut dapat pulih kembali (Nakagawa, 1998).

Nakagawa (1998) menyebutkan dalam hasil penelitiannya bahwa dua bentuk utama kerusakan DNA yang dikarenakan mendapat reaksi gelombang elektromagnetik ultraviolet yang panjang gelombangnya 254 nm adalah *cyclobutane pyrimidine dimer* (CPD) dan (6-4) photoproduct (6-4 PP). Kedua kerusakan tersebut dipulihkan kembali dalam sel manusia yang normal oleh pemulihan pemotongan *nucleotide* (*nucleotide excision repair*).

Hill et al. (1993) menjelaskan suatu kerusakan DNA karena paparan cahaya UV sebagai berikut. Kerusakan DNA karena paparan cahaya UV dinamakan *thymine dimer* (lihat gambar berikut).



Gambar 2.24 Bagan kerusakan DNA *thymine dimer* (Hill et al., 1993).

Jadi cahaya UV yang memapar pada DNA menyebabkan kerusakan dimerisasi, yaitu dua basa *thymine* yang berdekatan pada untai DNA menjadi berhubungan secara kovalen. *Dimer* tersebut dapat diputus secara enzimatik dan untai DNA dapat pulih kembali.

2.7.2 Cahaya laser helium-neon (He-Ne)

Ocana-Quero et al. (1997) menjelaskan dalam penelitiannya antara lain bahwa radiasi laser helium-neon (He-Ne) pada reaksi akrosoma (*acrome reaction*) dalam sel *spermatozoa* sapi jantan menimbulkan pengaruh biologis. Pengaruh tersebut adalah meningkatnya persentase sel sperma untuk reaksi akrosoma dengan meningkatnya intensitas radiasi dari 2 sampai 16 joule/cm² in vitro.

Tiflova et al. (1997) dalam laporan penelitiannya menjelaskan bahwa pengaruh radiasi laser He-Ne yang panjang gelombang dan pemaparannya masing-masing adalah 632,8 nm dan 5-20 joule/m² pada campuran sel bakteri E-coli dan DNA plasmid telah dipelajari. Hasilnya adalah terjadi penambahan efisiensi transformasi 2,5-3,0 kali dibandingkan dengan perlakuan yang biasa dilakukan dengan energi kalor.

Vacca et al. (1997) menjelaskan dalam laporan penelitiannya antara lain bahwa *hepatocytes* (sel hati) yang diisolasi diradiasi dengan cahaya laser He-Ne yang pemaparannya 0,24 joule/cm². Hasilnya adalah terjadi perubahan konsentrasi Ca²⁺ bebas *cytocolic* (medium cair sitoplasma tanpa organel dan komponen membran) dan penambahan potensial membran sel.

Mantiefel et al. (1997) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa struktur *mitochondria* dikaji setelah pemaparan *lymphocytes* (sel darah putih) dengan laser He-Ne yang panjang gelombang dan pemaparannya masing-masing 632,8 nm dan 56 joule/m². Sayatan sangat tipis *lymphocytes* dipelajari dengan bantuan mikroskop elektron setelah pemaparan radiasi selama 1 jam. Hasilnya adalah jumlah *profile mitochondria* pada sel tidak mengalami perubahan luas total permukaannya.

Morales et al. (1995) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa biakan lapisan tunggal sel-sel jaringan kelenjar yang tumbuh ganas pada usus besar manusia diradiasi cahaya laser He-Ne kontinu yang panjang gelombang dan dayanya masing-masing 632,8 nm dan 12,6 milijoule/s. Radiasi tersebut tidak mempengaruhi fase siklus sel jaringan kelenjar pertumbuhan baru yang ganas pada usus besar manusia.

Karu et al.(1995) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa satu lapis HeLa diradiasi dengan cahaya laser He-Ne yang panjang gelombang dan intensitasnya masing-masing adalah 632,8 nm dan 10 watt/m² selama 10 sekon. Pemaparan radiasi tersebut mempengaruhi peningkatan *adenosine triphosphate* (ATP) pada tingkat seluler.

Koutna et al. (2003) menjelaskan dalam penelitiannya antara lain bahwa efek radiasi cahaya laser daya rendah pada aktivitas proliferasi sel HeLa telah dikaji. Sel dibagi 3 kelompok. Kelompok pertama sebagai kelompok sel kontrol, kelompok kedua sebagai kelompok sel yang terpapar dengan cahaya laser daya rendah kontinu yang panjang gelombangnya 830 nm, dan kelompok ketiga adalah kelompok sel yang disinari cahaya laser daya rendah berbentuk pulsa (5000 Hz) yang pemaparannya antara 2 sampai 99 joule/cm². Dengan membandingkan kelompok pertama, kedua, dan ketiga maka dapat diketahui bahwa kelompok kedua dan ketiga menunjukkan penambahan aktivitas proliferasi yang berarti dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan kelompok ketiga menunjukkan aktivitas proliferasi lebih tinggi dibandingkan kelompok kedua. Hal ini berarti cahaya laser daya rendah merangsang proliferasi sel HeLa.

Irradiasi spermatozoa tikus *in vitro* dengan gelombang elektromagnetik helium – neon (He-Ne) menyebabkan penambahan potensial fertilasi (*fertilization potensial*) sel tersebut (Cohen, 1998).

Wollman (1998) meneliti dampak irradiasi gelombang elektromagnetik helium-neon (He-Ne) pada pertumbuhan sel dengan mengambil sedikit bagian tubuh selaput otak tikus besar (*rat*) dan menempatkannya dalam suatu media agar terjadi pertumbuhan (*microexplants*) serta hasil penelitiannya menunjukkan bahwa irradiasi tersebut pada daerah saraf yang terluka (*injured nerve*) mempengaruhi pertumbuhan proses tonjolan suatu neuron (*neurite*), dengan demikian memperbaiki penyembuhan jaringan saraf.

Efek gelombang elektromagnetik laser pada DNA dalam sel (*cellular*) belum banyak dikenal (Ocana-Quero, 1997).

Koval et al. (2001) menjelaskan hasil penelitian mereka di antaranya bahwa sintesis konjugasi *metallophthalocyanine-oligonucleotide* menyebabkan pekanya DNA yang khas terhadap cahaya laser He-Ne yang panjang gelombangnya 632,8 nm.

Michael et al. (1993) menulis dalam laporan penelitian mereka antara lain bahwa sel saraf imatur (*neuroblastoma cell line*) manusia yang teradiasi cahaya laser He-Ne dengan panjang gelombang 632,8 nm menambah sintesis DNA.

Rindge (2002) telah meneliti antara lain bahwa foton cahaya kasat mata (seperti cahaya He-Ne yang panjang gelombangnya 632,8 nm), cahaya merah, atau inframerah cukup ramah untuk diterima tanpa kerusakan sel dan jaringan. Cahaya laser He-Ne tersebut berperan menambah produksi ATP (*adenosin trifosfat*),

menambah respirasi dan metabolisme sel, merangsang aktivitas *mitochondrial*, mempercepat sintesis DNA, RNA, dan protein.

Grego et al. (1989) menyajikan laporan penelitian mereka di antaranya bahwa radiasi cahaya laser daya rendah (yaitu cahaya laser He-Ne) menambah beberapa aktivitas *intercellular*, termasuk sintesis protein, transkripsi DNA, metabolisme *mitochondrial*. Pada cahaya laser He-Ne mampu mengurangi rasa sakit, memperbaiki proses integritas pada jaringan yang cidera karena luka badan yang disebabkan oleh alat fisik, serta menambah regenerasi yang berkaitan dengan neuron (*neuronal regeneration*).

Batanouny et al. (2001), menjelaskan sebagian laporan penelitian mereka bahwa radiasi cahaya laser He-Ne mampu memberi efek *biostimulatory* pada proses integritas pada jaringan yang cidera parah karena luka badan yang disebabkan oleh alat fisik, menyebabkan kemampuan memperlambat kemerosotan mutunya karena oksidasi, merangsang sintesis DNA, RNA dan protein dalam sistem sel, serta dapat menimbulkan perbaikan DNA.

2.7.3 Cahaya laser yttrium aluminium garnet (YAG)

Gelombang elektromagnetik laser erbium YAG adalah pemotong jaringan dengan kerusakan termal yang minimal (Hughes, 1998)

Untuk diskontinuitas jaringan patologik (*lesions*) pada daerah yang sulit yang tidak dapat dijangkau oleh penggunaan aspirasi gas atau cairan dengan cara mekanik, teknik pembuangan dengan cara pemotongan kulit oleh berkas gelombang

elektromagnetik erbium YAG merupakan cara yang betul-betul menguntungkan (Kaufmann, 1998).

Gutknecht (1998) melaporkan dalam penelitiannya bahwa Nd : YAG laser dapat mengeliminasi tepat satu *monolayer*. Sel-sel yang ditutup oleh lapisan lain tidak dieliminasi.

Perez (1998) melaporkan dalam hasil penelitiannya bahwa laser Er : YAG memainkan peranan penting pada penyembuhan *superficial and mid-depth rhytides*.

2.7.4 Cahaya laser CO₂

Stocker (1998) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa pemakaian laser dalam bidang kedokteran tumbuh pesat dalam beberapa tahun sebelum 1998. Analisis kimia hasil peruraian zat organik karena pengaruh suhu (*pyrolysis*) akibat radiasi gelombang elektromagnetik laser CO₂ menunjukkan bahwa sistem koloid dalam fase kontinu gas yang ditimbulkan oleh dikomposisi (*decomposition*) jaringan dapat berbahaya bagi kesehatan hasil *pyrolysis* karena radiasi gelombang elektromagnetik laser CO₂ yang berasal dari jaringan babi menyebabkan *genotoxic* yang sangat potensial seperti dampak perubahan mutasi genetik (*mutagenic*) dan oleh sebab itu hasil *pyrolysis* tersebut dapat berpotensi membahayakan kesehatan manusia.

Berkas gelombang elektromagnetik laser CO₂ pulsa dapat digunakan untuk mengganti kulit yang keriput atau kulit yang rusak dengan jalan pergantian permukaan kulit yang baru karena radiasi dari laser CO₂ tersebut mempunyai resiko tanda yang tersisa dari penyembuhan (*scarring*) seminimal mungkin (Humphrey, 1998).

Daerah organ yang dibuang sebagian jaringannya dengan cara pemotongan memakai berkas gelombang elektromagnetik laser CO₂ hampir tidak berdarah. Setelah waktu yang lama, tanda yang tersisa pada berkas potongan organ karena pemotongan gelombang elektromagnetik laser CO₂ tidak ada bedanya dibandingkan kalau dipotong dengan pisau biasa (Gatter, 1998).

Perlakuan (*treatment*) gelombang elektromagnetik laser inframerah pada suatu jaringan menghasilkan pengaruh efek pada jaringan sekitarnya yang tidak mendapat perlakuan. Pengaruh efek tersebut berupa cara reproduksi sel (*cell proliferation*) (Kolesnikova, 1998).

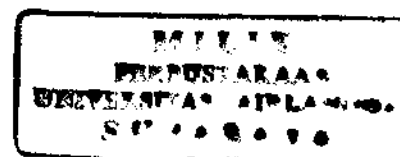
2.8 DNA pada Kajian Biofisika Radiasi Gelombang Elektromagnetik

(Gelombang e.m.)

Alpen (1990) menjelaskan tentang DNA pada kajian biofisika radiasi gelombang elektromagnetik (gelombang e.m.) di antaranya sebagai berikut.

Jaringan makhluk hidup yang terpapar radiasi gelombang e.m. dan jaringan tersebut menyerap energi radiasi maka dapat terjadi efek fotolistrik, hamburan Compton, atau produksi pasangan (*pair production*).

Efek fotolistrik terjadi jika foton radiasi berinteraksi dengan elektron orbital atom yang terpapar radiasi dan elektron tersebut terpental dari orbitalnya yang ada di kulit K, L, atau M atom. Elektron yang terpental dinamakan fotoelektron. Tempat yang kosong karena elektronnya terpental dari orbitnya, katakan orbit a diisi oleh elektron dari orbit yang lebih luar, katakan orbit b.



Pergeseran elektron dari b ke a menghasilkan emisi foton gelombang elektromagnetik yang energinya merupakan selisih energi ikat elektron pada orbit b dan energi ikat elektron pada orbit a. Energi foton ($h\nu$) yang berinteraksi dengan elektron di kulit a tersebut harus sama atau lebih besar daripada energi ikat elektron di kulit a, umpama energi ikat di kulit a tersebut adalah EI. Energi kinetis fotoelektron adalah ($h\nu-EI$). Nilai energi ikat elektron di kulit atom elemen jaringan lunak sekitar 500 eV.

Jika foton berinteraksi dengan elektron bebas pada jaringan lunak makhluk hidup dengan energi foton terletak antara 100 eV dan 10 MeV maka terjadilah hamburan Compton. Pada hamburan Compton, foton pemapar akan dihambur dan elektron bebas terpental dengan energi kinetis tertentu. Jika energi kinetis foton pemapar 5,11 keV maka pada hamburan Compton terjadilah transfer energi ke medium jaringan sebesar 2 %, sedangkan jika energi foton pemapar 5,11 MeV terjadilah transfer energi sebesar 95 %.

Jika foton yang berenergi lebih besar 1,022 MeV memapar jaringan makhluk hidup, maka terjadilah produksi pasangan dengan mekanisme sebagai berikut. Foton yang melewati daerah dekat inti mengalami efek medan yang kuat dari inti dan foton berubah menjadi pasangan elektron dan positron yang kedua massanya ekuivalen dengan energi 1,022 MeV.

Jika gelombang e.m. yang energi fotonnya rendah memapar materi dengan nomor atom Z tinggi, hamburan energi dinamakan hamburan Rayleigh dan peristiwa hamburan Rayleigh tidak meninggalkan energi di materi penghambur.

Fotoelektron, pantalan elektron dari hamburan Compton, dan hasil produksi pasangan merupakan partikel bermuatan sebagai hasil proses hamburan pertama. Partikel bermuatan yang bergerak dalam medium jaringan makhluk hidup tersebut akan mengalami ionisasi. Elektron yang berenergi 6 sampai 1×10^2 eV akan menimbulkan 2 sampai 5 ionisasi molekul air. Elektron hasil proses hamburan pertama merupakan faktor utama terjadinya penyerapan energi sistem molekul sel hidup pada saat proses terjadinya radiasi gelombang e.m. pada sistem molekul sel hidup.

Foton yang memapar jaringan makhluk hidup dapat membuat elektron dari orbit atom yang energi ikatnya paling rendah yaitu a ke orbit yang energi ikatnya lebih tinggi yaitu b dengan syarat energi foton $h\nu$ sama dengan $(b-a)$. Peristiwa tersebut dinamakan eksitasi.

Radiasi yang menyebabkan materi terionisasi dinamakan radiasi pengion.

Molekul yang terionisasi dan tereksitasi sangat tidak stabil, karena konfigurasi elektronik atom yang normal segera terbentuk kembali.

2.9 Urutan Nukleotida Gen *GLU1 Saccharomycopsis Fibuligera HUT 7212*, Target Fragment DNA 1784, Taksonomi *Endomycopsis Fibuligera*, dan Sinonim *Endomycopsis Fibuligera*.

Satuan kelompok kecil yang terdiri dari gula *deoxyribose*, asam fosfat, dan salah satu basa dari basa *adenine*, *cytosine*, *guanine*, atau *thymine* pada DNA disebut *nucleotide*.

Penggandaan target DNA lokus gen glukoamilase dengan alat PCR memerlukan primer P₁ dan P₂. Pada penelitian ini digunakan P₁ = 5' GCG AGG TTC TCT TGG TTT GG3' dan P₂ = 5' GCT TGC ATG TTC TCC ACA AAG G 3' yang diperoleh dari Lab. Biokimia – Organik Jurusan Kimia FMIPA Unair dan urutan basa P₁ dan P₂ ditetapkan berdasar program Genmon version 4.10 dan Primer Detective 1.0 yang dipesan ke Genset Singapore Biotech Pte serta mengacu pada urutan nuklotida gen *GLU1 Saccharomycopsis Fibuligera* HUT 7212 (Gambar 2.25)

Jika diperhatikan primer P₁ = 5' GCG AGG TTC TCT TGG TTT GG 3' dan primer P₂ = 5' GCT TGC ATG TTC TCC ACA AAG G 3' serta urutan *nucleotide* gen *GLU1 Endomycopsis fibuligera* pada Gambar 2.25 maka diketahui ujung P₁ akan menempel pada daerah DNA target di posisi -178 sedangkan ujung P₂ menempel pada daerah target di posisi +49 dan ketika dilacak DNA target adalah 1784 pb (Hadi S, 2001).

Penggandaan target DNA lokus gen glukoamilase (fragmen DNA 1784 Pb) dilaksanakan dan gen tersebut berasal dari isolasi DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB R.ce.64. *Endomycopsis fibuligera* ITB R.ce.64 yang diperoleh dari Lab. Mikrobiologi Kimia Teknik ITB.

Sebagai kontrol positif sewaktu memeriksa hasil penggandaan fragmen DNA 1784 Pb digunakan DNA plasmid *Saccharomycopsys fibuligera* GLU1 HUT 7212 yang diperoleh dari Lab Biokimia – Organik Jurusan Kimia FMIPA Unair yang berasal dari Dr. Ichiro Yamashita – Departemen of Fermentation Technology Faculty of Engineering, Hiroshima University (Hadi S, 2001).

Menurut Tjitrosoepomo (1986), kedudukan *Endomycopsis fibuligera* dalam taksonomi adalah sebagai berikut :

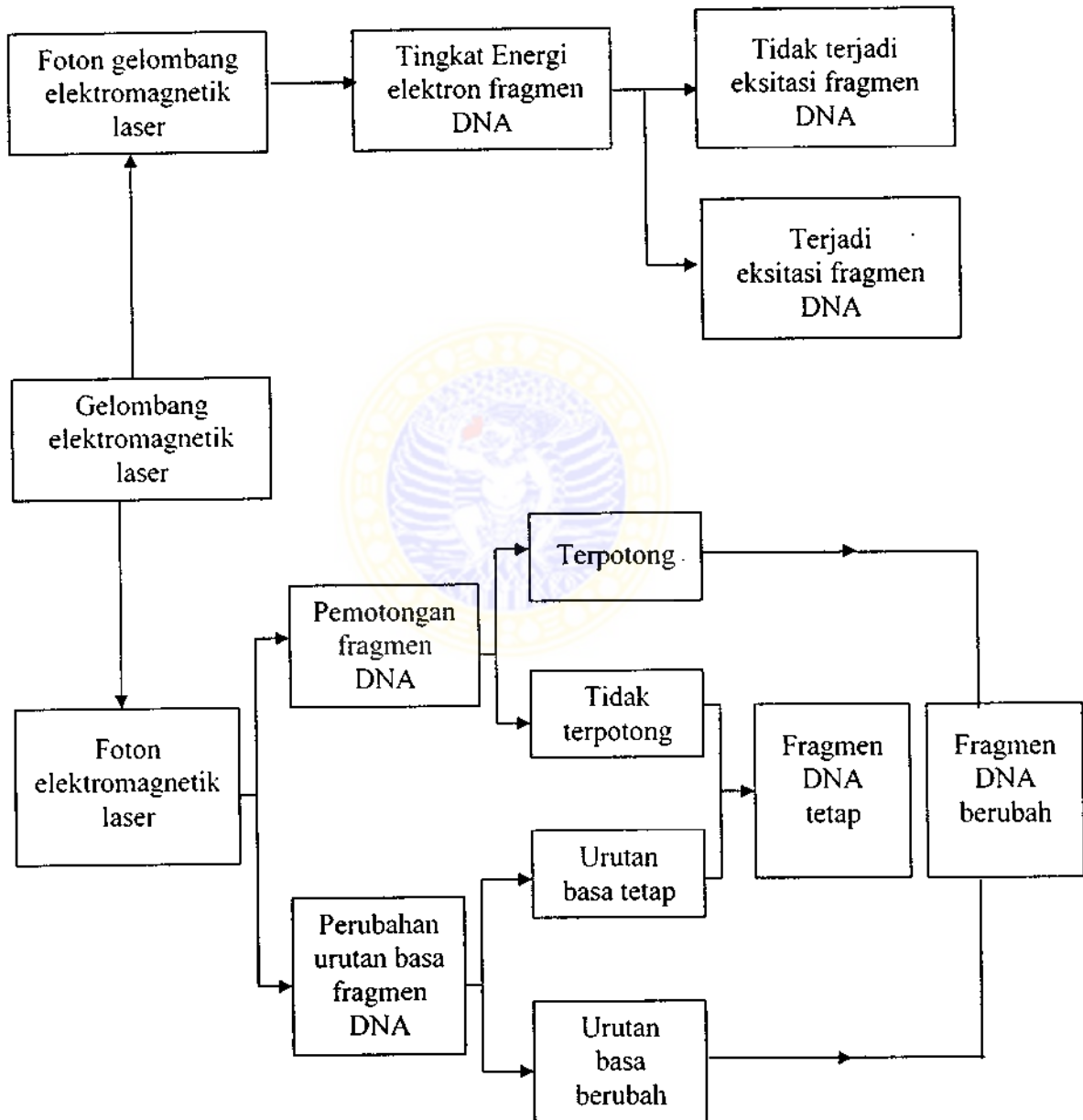
Devisi : Thallophyta
Sub Devisi : Ascomycotina
Classis : Hemiascomycetes
Ordo : Endomycetales
Family : Saccharomycetaceae
Sub Family : Saccharomycetaceae
Genus : Endomycopsis
Species : Endomycopsis fibuligera

Endomycopsis fibuligera sinonim dengan *Saccharomycopsis fibuligera* (Kreger van Rij, 1989).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian



Catatan : Fragmen DNA yang dimaksud adalah fragmen DNA 1784 pb in vitro.

Pemotongan fragmen DNA adalah putusnya kaitan *nucleotide* dengan *nucleotide* berikutnya pada untai fragmen DNA.

Urutan basa berubah terjadi bila pemutusan gugus basa dengan gugus *deoxyribose* dan gugus basa pasangannya.

3.2. Hipotesis

Tidak ada pengaruh radiasi gelombang elektromagnetik laser He-Ne dengan intensitas sama pada saat perekaman gambar tiga dimensi holografis terhadap fragmen DNA 1784 pb in vitro, yaitu untai fragmen DNA tidak putus dan urutan basa fragmen DNA tidak berubah.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen laboratoris.

4.2 Variabel Penelitian

Variabel bebas adalah nilai pemaparan energi per satuan luas dari cahaya laser He-Ne.

Variabel tergantung adalah (a) jumlah fragmen DNA 1784 pb yang terpotong
(b) jumlah basa pada fragmen DNA 1784 pb yang mengalami perubahan karena mendapatkan perlakuan penyinaran gelombang elektromagnetik laser He-Ne.

Variabel kendali adalah suhu, kelembaban, dan tekanan udara ruangan.

Adapun energi cahaya laser He-Ne adalah berasal dari foton cahaya laser He-Ne. Jadi pemaparan energi per satuan luas cahaya laser He-Ne adalah banyaknya foton cahaya laser He-Ne yang memapar per satuan luas. Pemaparan energi cahaya laser He-Ne dapat diberi satuan joule/m^2 .

Banyaknya pasang-basa yang diamati diberi lambang n .

4.3 Bahan Penelitian

Bahan penelitian proses PCR adalah, untuk 50 μl bahan yang diperlukan adalah :

Templat DNA	2 μl (500 ng/ μl)
Buffer PCR 10 x (MgCl_2)	5 μl (0,1 mM)
dNTP 25 mM	4 μl (100 mM)
Primer P ₁	5 μl (10 pmol)
Primer P ₂	5 μl (10 pmol)
<i>Taq</i> DNA polimerase	2,5 U/ μl
MgCl_2	3 μl (25 mM)
Aqua bidestilata	x μl
Jumlah	50 μl

Buffer PCR, *Taq* DNA polimerase dan MgCl_2 berturut-turut bertugas menjaga agar nilai pH tetap, mengkatalis polimerisasi dan untuk mengoptimalkan enzim mengkatalis reaksi polimerisasi. Primer P₁ dan P₂ diperoleh dari Laboratorium Kimia Organik - Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unair yang penetapan urutan dan jumlah basanya menggunakan program Genmon version 4.1 dan Primer Detective Version 1.0 yang dipesan ke GENSET Singapore Biotech Pte Ltd. Selain itu digunakan DNA plasmid GLU1 *Saccharomycopsis fibuligera* HUT 7212 yang diperoleh dari Laboratorium Kimia Organik - Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unair yang berasal dari Dr. Ichiro Yamashita Department of Fermentation Technology Faculty of Engineering Hiroshima University (Hadi S, 2001).

Bahan untuk isolasi DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 adalah sukrosa-tauge yaitu sukrosa 6%, ekstrak tauge 10% dan agar 2%, larutan SSC (salin sodium citrat) yaitu NaCl 0,15 M dan Na₃-sitrat 0,015 M, larutan saline-EDTA-SDS (NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 M, SDS 2%, pH 8,0), SDS adalah sodium dedosil sulfat, kloroform : isoamil alkohol (24:1), *RNAse* 100 µg/ml, etanol, dan buffer TE.

Bahan penelitian proses *sequencing* DNA metode Sanger dengan *reagent* "Bigdye Terminator" V2.0.

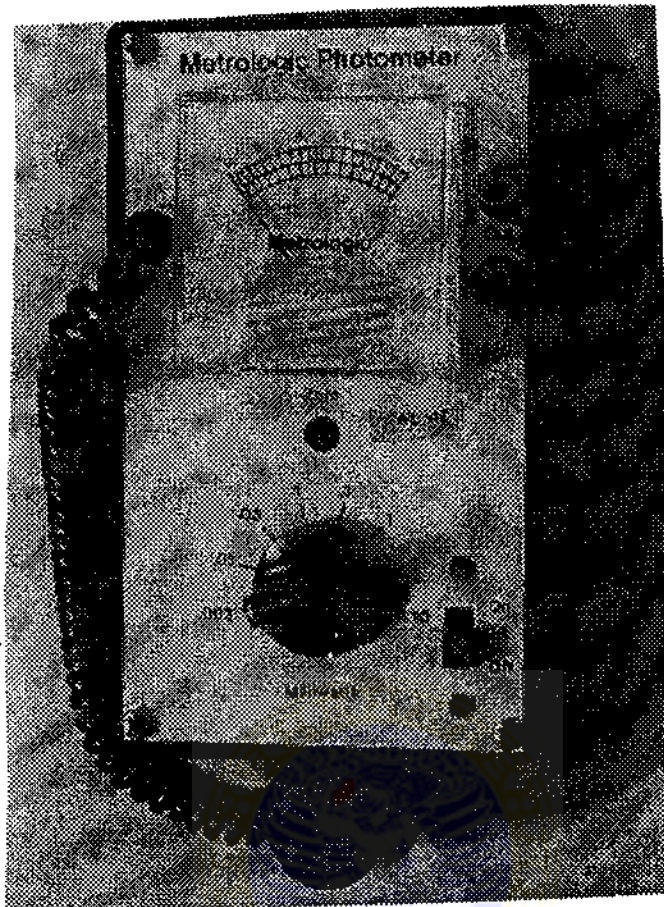
4.4 Instrumen Penelitian

4.4.1 Instrumen untuk penggandaan fragmen DNA 1784 pb menggunakan instrumen PCR.

Penggandaan DNA 1784 pasang basa (pb) dilakukan dengan alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *Thermal Analyzer* Bio-rad, USA. Penggandaan dilakukan sebanyak 30 siklus.

4.4.2 Instrumen untuk pelacakan urutan basa fragmen DNA 1784 pb menggunakan instrumen teknik *sequencing*.

Instrumen tersebut adalah ABI PRISM 377 *sequencer* dengan metode Sanger dan menggunakan *reagent* "Bigdye Terminator" V 2.0 .



Gambar 4.2 Foto alat metrologic fotometer.

Planck yaitu $6,6256 \times 10^{-34}$ Js dan f adalah frekuensi cahaya laser He-Ne yaitu $(3 \times 10^8 / 632,8 \times 10^{-9})$ Hz. Jadi $E_f = hf = 0,03 \times 10^{-17}$ J.

Untuk mengetahui energi cahaya laser He-Ne datang di E sebesar $0,9 \text{ J/m}^2$, maka perlu memasang lubang sensor alat fotometer di E dengan mengatur tombol pada posisi $0,003 \text{ mW}$. Atenuator diatur sedemikian rupa sehingga jarum skala menunjuk angka 10. Jika pemaparan berlangsung 10 sekon berarti gelombang elektromagnetik yang datang di E adalah $0,9 \text{ J/m}^2$. Hal ini dijelaskan sebagai berikut.

Lubang sensor fotometer berdiameter $2,5 \text{ mm}$; jadi luas lubang adalah $32,185 \text{ mm}^2$.



$$\begin{aligned}
 \text{Nilai } 0,9 \text{ J/m}^2 &= 0,9 \text{ J} / 10^6 \text{ mm}^2 = 0,9 \times 10^{-6} \text{ J/mm}^2 \\
 &= 0,9 \times 10^{-6} \times 32,185 \text{ J} / 32,185 \text{ mm}^2 \\
 &= 0,9 \times 10^{-6} \times 32,185 \text{ J} / (\text{luas lubang sensor}) \\
 &= 0,0289665 \times 10^{-3} \text{ mJ} / (\text{luas lubang sensor}) \\
 &\approx 0,03 \text{ mJ} / (\text{luas lubang sensor})
 \end{aligned}$$

Kalau tombol diatur di posisi 0,003 mW (0,003 mJ/s) dan attenuator diatur sehingga jarum skala menunjuk angka 10 dan pemaparan berlangsung 10 sekon berarti energi gelombang elektromagnetik yang datang di E sejumlah $0,9 \text{ J/m}^2$.

Pengamatan perlakuan pada tanggal 25 September 2002 dengan data cuaca adalah tekanan udara 752,6 mm Hg, kelembaban 36%, dan suhu udara 28°C .

Fragmen DNA dalam larutan TE.

Tempat fragmen DNA sewaktu mendapat perlakuan mempunyai volume yang tebal, panjang, dan tingginya berturut-turut adalah 0,94 mm, 11,30 mm, dan tinggi 12,00 mm. Fragmen DNA yang terlarut dalam TE bervolume 100 μl . Dalam tempat fragmen DNA, volume tersebut berukuran panjang, tinggi, dan tebal berturut-turut adalah 11,30 mm, 9,4 mm, dan 0,94 mm. Jadi luas volume yang terpapar gelombang elektromagnetik laser He-Ne adalah $11,30 \times 9,4 \text{ mm}^2 = 106,22 \text{ mm}^2$. Karena tiap m^2 di posisi E (lihat bagan) mendapat energi 0,9 J, maka luas $106,22 \text{ mm}^2 (= 106,22 \times 10^{-6} \text{ m}^2)$ mendapat energi $0,9 \times 106,22 \times 10^{-6} \text{ J} = 955,98 \times 10^{-6} \text{ J}$. Karena energi foton laser He-Ne = $0,03 \times 10^{-17} \text{ J}$, maka luas $106,22 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ mendapat foton sebanyak $(955,28 \times 10^{-6}) / (0,03 \times 10^{-17}) = 3,1842 \times 10^{15}$ buah foton. Tempat fragmen DNA tersebut dari bahan kaca yang tebalnya 0,94 mm.

4.4.4 Instrumen untuk pengamatan putus dan tidaknya fragmen DNA 1784 pb dengan alat elektroforesis.

Elektroforesis yang digunakan adalah elektroforesis gel agarosa. Agarosa ditambah dengan buffer TAE dipanaskan kemudian didinginkan untuk dicetak menjadi gel agarosa. Agarosa didapat dari perusahaan Promega dengan data : *Agarosa Analytical Grade*.

Buffer TAE yang pH-nya 8 dibuat dengan larutan *tris* base 12,5 gram, EDTA 9,306 gram, asam asetat glasial (yang kandungan airnya sedikit) sejumlah 2,85 ml ke dalam 25 ml aquades, kemudian pH diatur dengan penambahan HCl atau NaOH, setelah mencapai pH 8 larutan tersebut ditambah dengan air sampai volume 50 ml dalam labu ukur, kemudian disterilkan dalam *autoclave*.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian di Lembaga Eijkman Jakarta dan Kampus C Unair yaitu FMIPA Unair Jurusan Kimia dan Fisika serta TDRS. Urutan waktu (kronologi) penelitian adalah di Kampus C Unair kemudian di Lembaga Eijkman Jakarta.

Eksperimen dilakukan dua (2) kali, karena uji statistis yang digunakan adalah uji statistis dengan pendekatan Poisson dan uji statistis tersebut memerlukan penelitian pendahuluan dan penelitian.

4.6 Prosedur Pengambilan Data

Pertama kali dilakukan adalah isolasi DNA. Isolasi DNA dari *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64

Endomycopsis fibuligera ITB R.cc.64 diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Kimia Teknik ITB. Peremajaan biakan *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64 dikerjakan dengan cara memindahkan biakan lama ke medium padat sukrosa-tauge yaitu sukrosa 6%, ekstrak tauge 10% dan agar 2%. Medium padat tersebut ditempatkan dalam tabung yang posisinya miring. Biakan ditaruh pada suatu tempat (diinkubasi) dengan suhu 30°C selama dua hari. Biakan *Endomycopsis fibuligera* yang terdapat dalam medium padat tersebut diambil sedikit (diinokulasi) dengan logam berbentuk silinder (ose) kemudian dimasukkan ke dalam 20 ml medium cair yaitu sukrosa 6% dan ekstrak tauge 10% , kemudian dikocok dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 30°C selama 16 jam. Hasil inokulasi (inokulum) sebanyak 5%nya dipindahkan ke dalam medium cair satu liter dikocok selama 16 jam pada suhu 30°C dan kecepatan 200 rpm untuk digunakan dalam isolasi DNA dari *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64 tersebut.

Dengan sentrifugasi pada suhu 20°C dan kecepatan 10.000 rpm hasil kocokan terakhir tersebut dapat dipanen selnya. Endapan (pelet) sel sebagai hasil panen tersebut dicuci dua kali dengan larutan SSC (salin sodium citrat) yaitu NaCl 0,15 M dan Na₃-sitrat 0.015 M kemudian dicuci satu kali dengan larutan saline-EDTA-SDS (NaCl 0.15 M, EDTA 0,1 M, SDS 2%, pH 8,0). SDS adalah sodium dedosil sulfat dan akhirnya dibekukan dalam freezer pada suhu -20°C dan pada saat berikutnya dicairkan pada suhu kamar. Sejumlah volume sel disuspensi dengan sejumlah volume yang sama dengan larutan saline-EDTA-SDS dan dihomogenisasi selama 2 menit. Hasil homogenisasi yang dinamakan homogenat

diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam dan ditambah larutan NaClO₄ sampai konsentrasi akhir 1 M, kemudian diinkubasi lagi selama 10 menit pada suhu 60°C. Untuk mengekstraksi DNA dari homogenat maka perlu mencampur homogenat dengan kloroform : isoamil alkohol (24:1) yang volumenya sama dengan homogenat. Campuran tersebut dikocok dengan tangan selama 30 menit. Hasilnya berupa tiga lapisan cairan, yaitu lapisan paling bawah, tengah dan paling atas berturut-turut adalah kloroform dan isoamil, protein dan DNA dalam air yang disebut supernatan. Supernatan diperlakukan sekali lagi dengan kloroform dan isoamil alkohol. Setelah yakin bahwa protein telah tidak ada pada supernatan, maka DNA diendapkan dengan menambah dua kali volume etanol dingin. Pelet DNA yang diperoleh disuspensikan dalam larutan SSC dan ke dalam larutan tersebut ditambah NaCl sampai berkonsentrasi 1 M, kemudian ditambah *RNAse* 100 µg/ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kontaminan protein dihilangkan dengan ekstraksi kloroform dan isoamil alkohol 3 sampai 4 kali dan DNA diendapkan dengan menambah 2 kali volume etanol dingin. Pelet DNA dilarutkan dalam bufer TE yang nantinya pada keperluan penggandaan fragmen DNA dengan alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dinamakan cetakan/templat (*template*) DNA. Buffer TE adalah larutan 0,384 g tris *base* dan 0,0093 g EDTA dalam 260 ml aquades. EDTA adalah *ethylene diamine tetraacetic acid* (*Edetic Acid*).

Dengan alat UV-1201 Shimadzu hasil isolasi diukur konsentrasi dan kemurniannya.

4.6.1 Prosedur pengambilan data konsentrasi dan kemurnian hasil isolasi

Shahib (1990), menjelaskan untuk mengetahui kadar DNA, yaitu berapa ng/ μ l molekul DNA dalam larutan digunakan spektrometer. Sinar UV yang diabsorpsi oleh molekul DNA dalam larutan berbanding lurus dengan jumlah molekul DNA dalam larutan tersebut. Pada absorpsi (A) dengan λ 260 nm = 1.0 sesuai dengan 50 ng *double helix* molekul DNA.

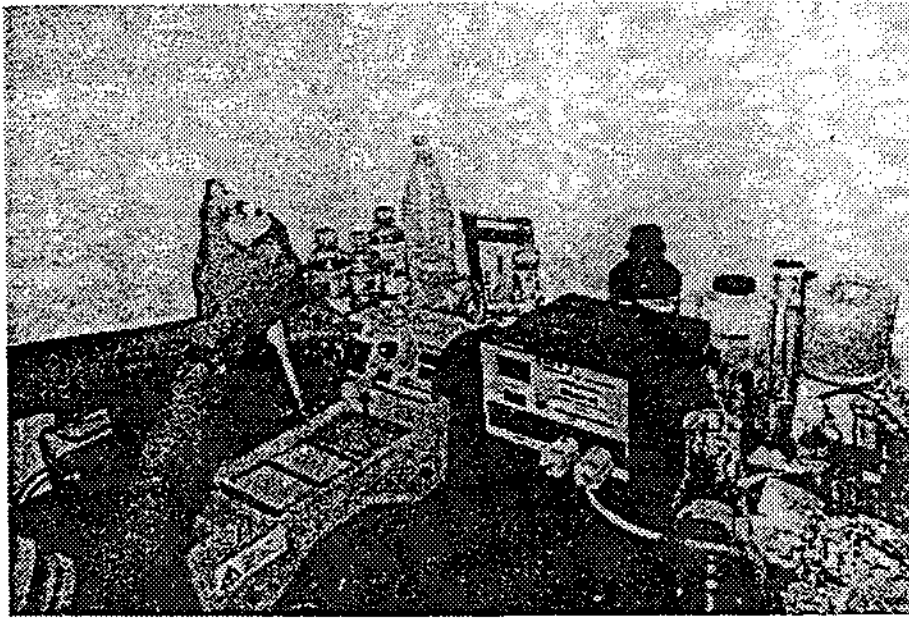
Di samping itu sinar UV dapat juga dipakai untuk mengecek kemurnian larutan DNA dengan rumus,

$$\text{kemurnian} = \frac{A_{\lambda 260 \text{ nm}}}{A_{\lambda 280 \text{ nm}}}$$

Hasil isolasi 2 μ l DNA diencerkan menjadi 702 μ l dan pada penyinaran UV didapat $A_{\lambda 260 \text{ nm}} = 0,196$ dan $A_{\lambda 280 \text{ nm}} = 0,151$. Jadi konsentrasi isolasi adalah = $0,196 \times 50 \times 702/2 = 3440$ ng/ μ l dan kemurnian = $0,196/0,151 = 1,3$.

4.6.2 Prosedur pengamatan data hasil penggandaan fragmen DNA dengan alat elektroforesis gel

Alat yang digunakan prosedur pengamatan penggandaan fragmen DNA adalah elektroforesis gel agarosa 2%. Gambar foto alat elektroforesis tersebut adalah sebagai berikut.



Gambar 4.3 Foto peralatan elektroforesis

4.6.3 Prosedur pengambilan data hasil penggandaan fragmen DNA 1784 pb

Penggandaan DNA 1784 pasang basa (pb) dilakukan dengan alat *Polymerase Chain Reaction (PCR) Thermal Analyzer Bio-rad, USA*. Untuk 50 μl , bahan yang diperlukan adalah :

Templat DNA	2 μl (500 ng/ μl)
Buffer PCR 10 x (MgCl_2)	5 μl (0,1 mM)
dNTP 25 mM	4 μl (100 mM)
Primer P ₁	5 μl (10 pmol)
Primer P ₂	5 μl (10 pmol)
<i>Taq</i> DNA polimerase	2,5 U/ μl
MgCl_2	3 μl (25 mM)
Aqua bidestilata	x μl
Jumlah	50 μl

Taq DNA polimerase tersebut yang digunakan pada proses PCR dapat menggandakan fragmen DNA < 5 kilo pasang basa. Informasi tersebut didapat dari *Certificate of Analysis* dari *Amersam Pharmacia Biotech* dan jurnal *Focus Life Technologies* volume 22 number 1 2000 p2. Jadi dengan *taq* tersebut PCR mampu menggandakan fragmen DNA 1784 pb.

Sebelum penggandaan (amplifikasi) templat *Endomycopsis fibuligera* ITB R cc 64 yang dilakukan 30 siklus, predenaturasi dilakukan dahulu pada suhu 95°C selama 5 menit. Setelah predenaturasi, penggandaan (amplifikasi) dilakukan 30 siklus dan tiap siklus terdiri dari 3 tahap yaitu denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit, dan ekstensi (perpanjangan) pada suhu 72°C selama 2 menit. Akhirnya ditambah ekstensi (perpanjangan) pada suhu 72°C selama 5 menit.

Untuk memeriksa apakah hasil penggandaan templat *Endomycopsis fibuligera* ITB R cc 64 tersebut adalah fragmen DNA 1784 pb maka dilakukan penggandaan fragmen DNA dari kontrol positif DNA plasmid pSf (*plasmid Saccharomycopsis fibuligera*) GLU1 HUT 7212 dengan cara seperti penggandaan fragmen DNA dari templat *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64. Hasil penggandaan DNA dari templat *Endomycopsis fibuligera* ITB R cc 64 diambil 10 µl dan dicampur dengan 4 µl *loading buffer* kemudian dimasukkan ke sumur yang kedua dari kiri pada gel agarosa 2% dan 10 µl hasil penggandaan fragmen DNA dari kontrol positif DNA plasmid pSf GLU1 HUT 7212 dicampur 4 µl *loading buffer* kemudian dimasukkan ke sumur ketiga dari kiri pada gel agarosa 2% yang sama untuk proses elektroforesis.

Gambar 5.1 pada Bab V melaporkan hasil elektroforesis gel agarosa 2%, hasil PCR fragmen DNA dari isolasi DNA *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64, dan hasil PCR fragmen DNA kontrol positif plasmid pSf GLU1.

Cetakan gel agarosa berbentuk empat persegi panjang. Kedua elektrode pada empat persegi panjang tersebut diberi beda potensial 86 volt sehingga ada medan listrik yang berarah menuju sumur-sumur pada gel agarosa. Setelah beberapa saat beda potensial tersebut dihilangkan. Foto hasil elektroforesis disajikan pada Gambar 5.1 pada Bab V.

Alat pengambilan foto hasil elektroforesis disajikan pada Gambar 4.4 berikut.



Gambar 4.4. Foto alat perekam gambar hasil elektroforesis

4.6.4 Prosedur pengambilan data putus dan tidaknya fragmen DNA 1784 pb karena penyinaran cahaya laser He-Ne berintensitas sama saat perekaman gambar holografik pada bidang khayatan

Pertama kali 100 μl hasil penggandaan fragmen DNA 1784 pb ditempatkan pada volume yang tebal, panjang, dan tingginya berturut-turut adalah $(0,94 \pm 0,05 \%) \text{mm}$, $(11,30 \pm 0,042 \%) \text{mm}$, dan $(12,00 \pm 0,44 \%) \text{mm}$. Fragmen DNA yang terlarut dalam TE bervolume 100 μl . Dalam tempat fragmen DNA, volume tersebut berukuran panjang, tinggi, dan tebal berturut-turut adalah $(11,30 \pm 0,42 \%) \text{mm}$, $(9,4 \pm 0,05 \%) \text{mm}$, dan $(0,94 \pm 0,06 \%) \text{mm}$. Jadi luas volume yang terpapar cahaya laser He-Ne adalah $(106,22 \pm 0,43 \%) \text{mm}^2$. Karena tiap m^2 di posisi E (lihat bagan pada Gambar 4.1) mendapat energi 0,9 J, maka luas tersebut mendapat energi $(955,98 \times 10^{-6} \pm 0,43 \%) \text{J}$. Karena energi foton laser He-Ne = $0,03 \times 10^{-17} \text{ J}$, maka luas tersebut mendapat foton sebanyak $((955,28 \times 10^{-6}) / (0,03 \times 10^{-17})) \pm 0,43 \% = (3,1842 \times 10^{15} \pm 0,43\%)$ buah foton. Tempat fragmen DNA tersebut dari bahan kaca yang tebalnya $(0,94 \pm 0,06 \%) \text{mm}$.

Sumur yang kesatu pada gel agarosa 2% diisi 10 μl fragmen DNA 1784 pb yang telah dipapar cahaya laser He-Ne tersebut dicampur dengan 4 μl *loading buffer*. Sumur yang kedua pada gel agarosa 2% diisi 10 μl fragmen DNA 1784 pb yang tidak dipapar cahaya laser He-Ne tersebut dicampur dengan 4 μl *loading buffer*. Sumur yang keempat pada gel agarosa 2% diisi 10 μl fragmen DNA 1784 pb yang tidak dipapar cahaya laser He-Ne tersebut dicampur dengan 4 μl *loading buffer*. Sumur yang kelima pada gel agarosa 2% diisi 10 μl fragmen

DNA 1784 pb yang telah dipapar cahaya laser He-Ne tersebut dicampur dengan 4 μ l *loading buffer*.

Gel agarosa tersebut kemudian dilakukan proses elektroforesis dan hasilnya adalah pada Gambar 5.3 pada Bab V.

4.6.5 Prosedur pengambilan data hasil sequencing fragmen DNA 1784 pb sebelum mendapat perlakuan dan setelah perlakuan pada penelitian pendahuluan dan penelitian

Pengambilan data *sequencing* fragmen DNA 1784 pb yang belum dan telah terpapar cahaya laser He-Ne adalah dengan alat ABI Prism 377 sequencer dengan menggunakan *reagent* "Bigdye Terminator" V 2.0 dengan metode Sanger, yang dikerjakan oleh DNA Sequencing Services Yayasan Genneka Eijkman Institute For Molecular Biology Jakarta.

4.7 Cara Analisis Data

Karena jumlah n fragmen DNA 1784 pb yang diradiasi adalah besar ($n \gg$) atau jumlah basa yang diamati adalah besar dan jika x adalah jumlah fragmen DNA 1784 pb yang mengalami kelainan yaitu terpotong atau jumlah basa yang mengalami perubahan maka proporsi yang mengalami kelainan adalah $p = x/n$.

Jika $p \ll 1$ atau hampir sama dengan satu maka uji statistik yang digunakan adalah pendekatan distribusi Poisson, tetapi jika p bernilai sekitar 0,5 maka uji statistik yang digunakan adalah pendekatan distribusi Binomial (Brown, 1986).

Uji statistik dengan pendekatan distribusi Poisson dimungkinkan karena hal-hal berikut:

1. Variabel adalah variabel acak diskrit.
2. Hanya ada dua kategori yang timbul pada fragmen DNA 1784 pb setelah pemaparan radiasi, yaitu kategori yang mengalami kelainan yaitu fragmen DNA 1784 pb terpotong atau basa yang diganti dan yang tidak mengalami kelainan yaitu fragmen DNA tidak terpotong atau basa tetap.
3. Timbulnya kejadian pada fragmen DNA 1784 pb yang satu dengan lainnya adalah independen.

Probabilitas x buah fragmen DNA 1784 pb yang mengalami kelainan adalah :

$$P(x_2, n_2 p_1) = \frac{(n_2 p_1)^{x_2} e^{-n_2 p_1}}{x_2!},$$

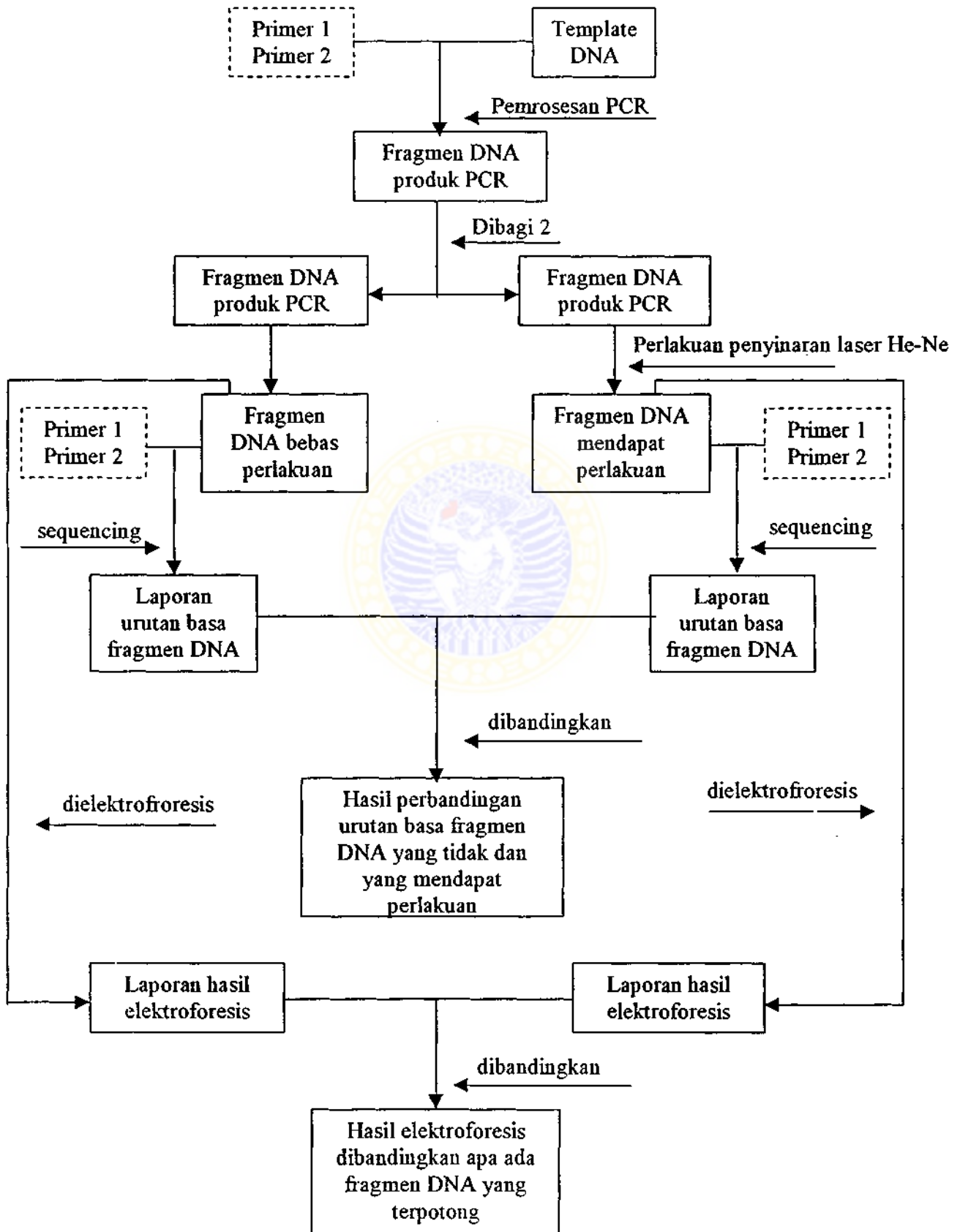
dengan ketentuan bahwa $e = 2,71828$, serta n_1 , x_1 , dan p_1/n_1 berturut-turut adalah jumlah yang diamati, jumlah yang mengalami kelainan, dan proporsi yang mengalami kerusakan pada penelitian pendahuluan, sedangkan n_2 dan x_2 masing-masing adalah jumlah yang diamati dan jumlah yang mengalami kelainan pada penelitian.

Nilai n_1 , x_1 , dan p_1 diambil dari

- a. Literatur atau,
- b. penelitian yang telah dikerjakan dan serupa dengan penelitian ini atau,
- c. penelitian pendahuluan.

Dalam penelitian ini yang dikerjakan adalah c, yaitu penelitian pendahuluan.

4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Penjelasan kerangka operasional penelitian

Primer 1 dan 2 adalah berurutan basa sebagai berikut.

P1 = 5' GCG AGG TTC TCT TGG TTT GG 3'

P2 = 5' GCT TGC ATG TTC TCC ACA AAG G 3'

Template DNA kromosom diisolir dari Endomycopsis fibuligera.

Produk PCR adalah fragmen DNA 1784 pb.



BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Data Penelitian

Gambar 5.1 berikut ini adalah foto hasil elektroforesis gel agarosa 2% yang menunjukkan dua pita. Baris teratas terlihat 6 pita yang menyatakan sumur gel. Baris pita yang paling bawah terdiri dari dua pita yang menyatakan hasil PCR fragmen DNA dari isolasi DNA *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 (pita kiri), dan hasil PCR fragmen DNA kontrol positif plasmid pSf GLU1 HUT 7212 (pita kanan).

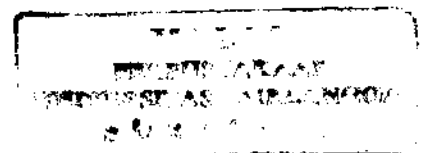
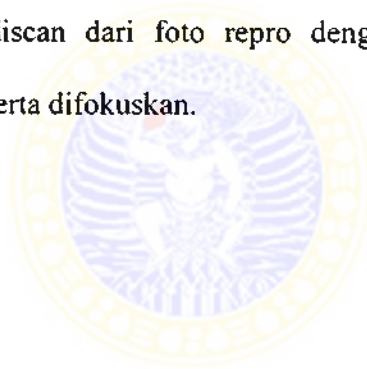


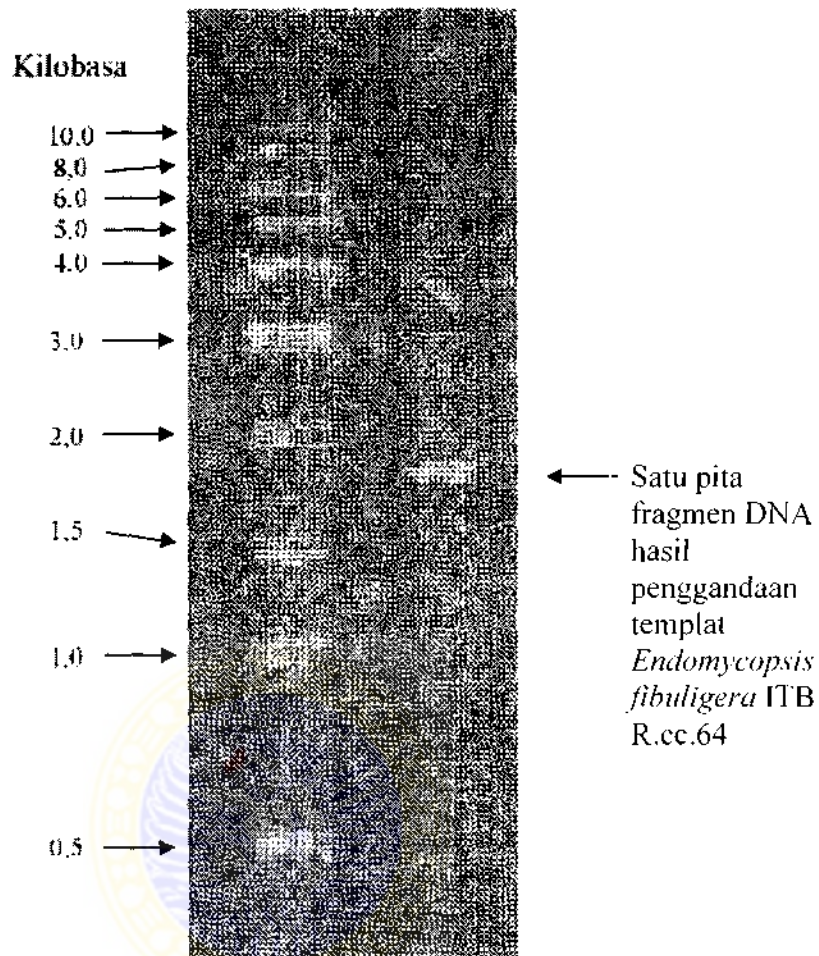
Gambar 5.1 Foto hasil elektroforesis gel agarosa 2% yang menunjukkan dua baris mendatar. Baris teratas terlihat 6 sumur gel. Baris pita yang di bawah terdiri dari dua pita yang menyatakan hasil PCR fragmen DNA dari isolasi DNA *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 (pita kiri), dan hasil PCR fragmen DNA kontrol positif plasmid pSf GLU1 7212 (pita kanan).

Tampak pada foto bahwa hasil PCR fragmen DNA dari isolasi DNA *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 adalah satu pita dan hasil PCR fragmen DNA kontrol positif satu pita juga serta keduanya terletak satu garis mendatar.

Untuk mengetahui berapa kira-kira besar fragmen DNA hasil PCR digunakan DNA marker yang diperoleh dari TDRC Kampus C Unair. Adapun DNA marker tersebut berasal dari New England BioLabs Inc. dengan data yang disajikan pada lampiran 2.

Gambar 5.2 berikut adalah foto hasil elektroforesis fragmen DNA hasil penggandaan PCR dibandingkan dengan DNA *marker* yang merupakan hasil fotoelektroforesis setelah discan dari foto repro dengan program photoshop resolusi 600 dan diperjelas serta difokuskan.

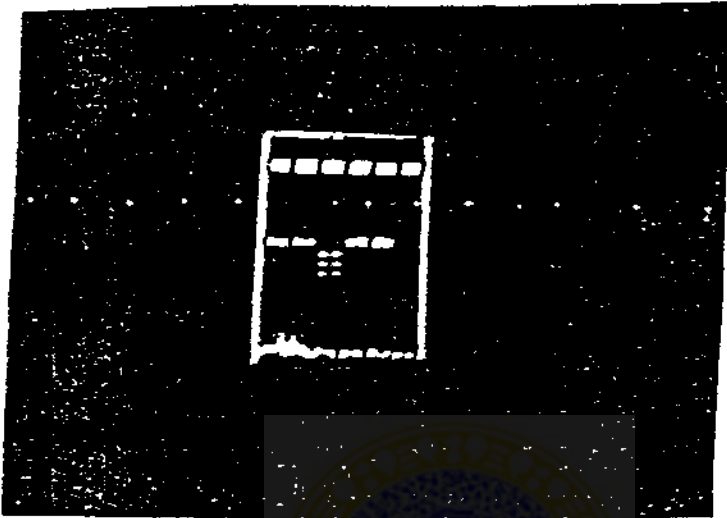




Gambar 5.2 Foto hasil elektroforesis fragmen DNA hasil penggandaan PCR dibandingkan dengan DNA *marker*. Pada foto tersebut terdapat sepuluh pita yang berada pada satu jalur ke bawah yang merupakan pita 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1½, 1, dan ½ kilobasa yang merupakan DNA *marker*. Sebelah kanan antara pita 2,0 dan 1,5 kilobasa pada DNA *marker* terdapat satu pita yaitu pita hasil PCR fragmen DNA dari DNA *endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64..

Gambar 5.3 berikut (jika diperhatikan baris pita-pita mendatar yang terdiri dari empat pita dan dari kiri diberi nomer 1, 2, 4, dan 5) adalah hasil elektroforesis pita fragmen DNA setelah mendapat penyinaran cahaya laser He-Ne dan tidak mendapat penyinaran cahaya laser He-Ne pada penelitian pendahuluan (pita kesatu dan kedua dari kiri) dan hasil elektroforesis pita fragmen DNA setelah

mendapat penyinaran cahaya laser He-Ne dan tidak mendapat penyinaran cahaya laser He-Ne pada pada penelitian (pita kelima dan keempat dari kiri).



Gambar 5.3 Foto hasil elektroforesis yang menunjukkan dua baris mendatar. Baris yang paling atas menunjukkan enam sumur gel sedangkan baris di bawahnya menunjukkan empat pita yang merupakan hasil elektroforesis pita fragmen DNA setelah dan tidak mendapat penyinaran cahaya laser He-Ne pada penelitian pendahuluan (pita kesatu dan kedua dari kiri) dan hasil elektroforesis pita fragmen DNA setelah dan tidak mendapat penyinaran cahaya laser He-Ne pada penelitian (pita kelima dan keempat dari kiri, jika antara pita kedua dan ketiga yang kosong diberi nomor ketiga).

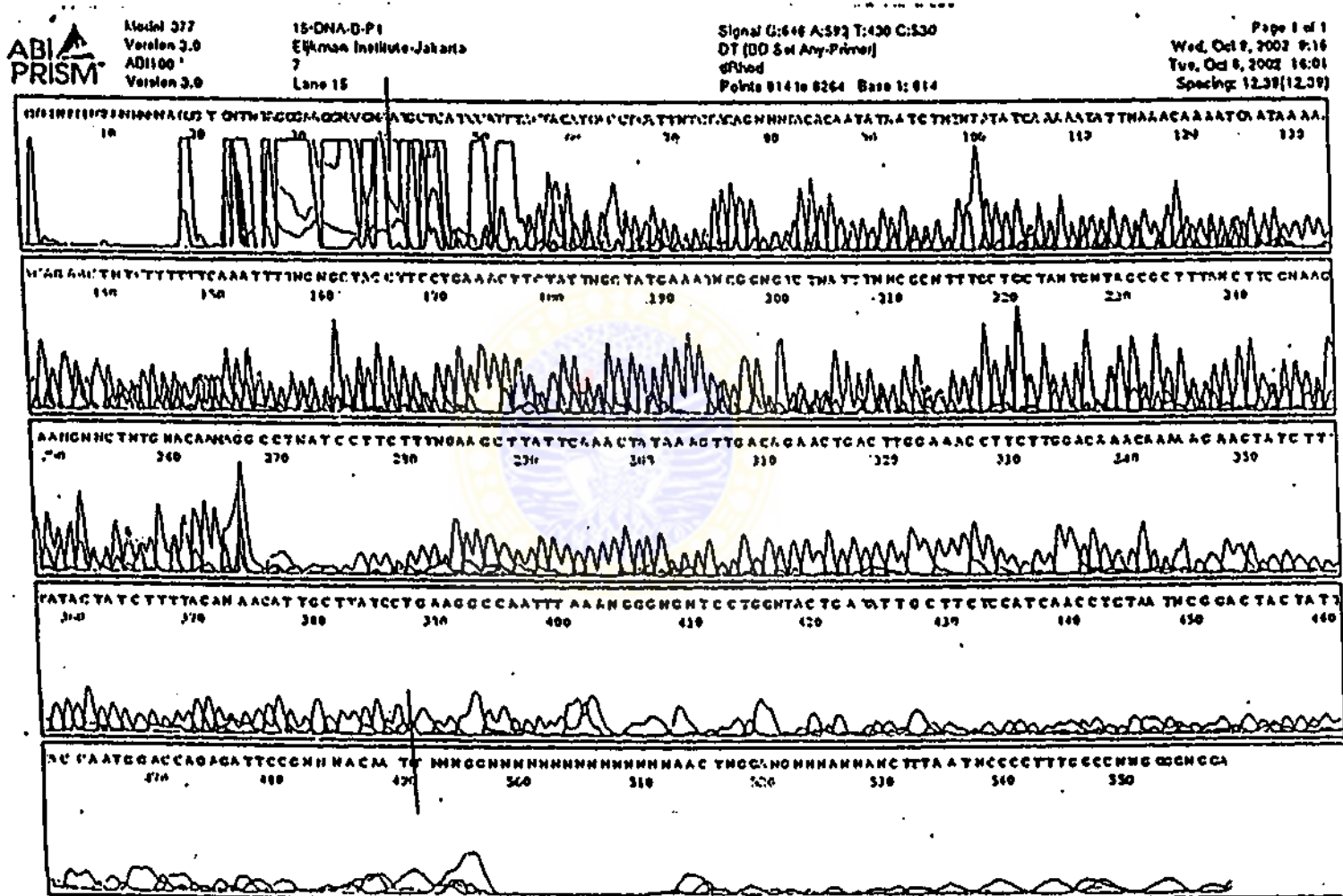
Foto hasil elektroforesis pada Gambar 5.3 tersebut dapat dijelaskan sebagai berikut.

Jika empat pita yang terletak di tengah-tengah foto, dari kiri ke kanan, diberi nomor 1, 2, 4, dan 5 maka

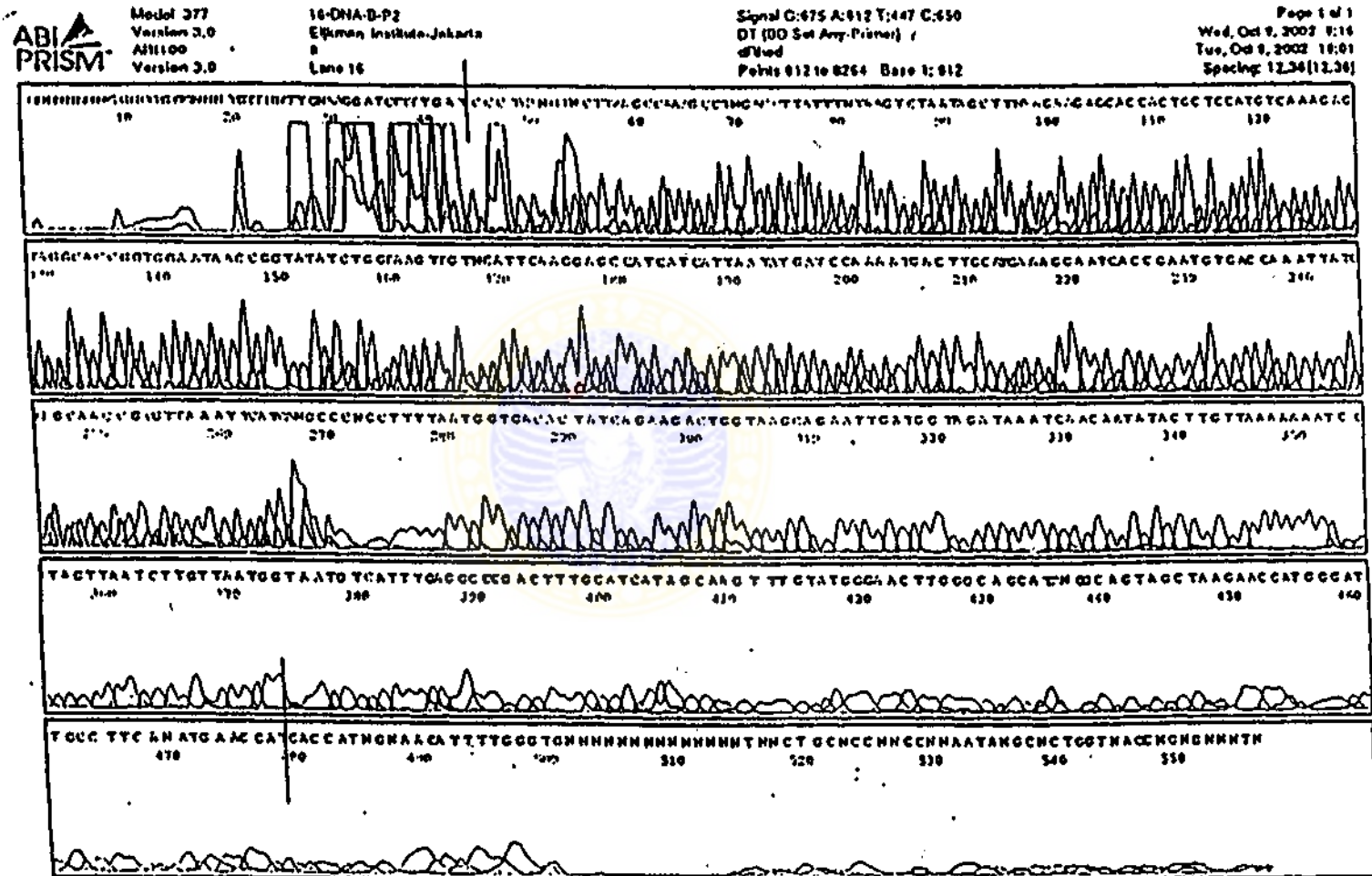
- a. pita 1 dan 2 adalah pita hasil elektroforesis fragmen DNA pada **penelitian pendahuluan**
- b. pita 4 dan 5 adalah pita hasil elektroforesis fragmen DNA pada **penelitian**
- c. pita 1 dan 5 adalah pita hasil elektroforesis fragmen DNA **setelah mendapat perlakuan** (penyinaran cahaya laser He-Ne)
- d. pita 2 dan 4 adalah pita hasil elektroforesis fragmen DNA **tidak mendapat penyinaran cahaya laser He-Ne**
- e. pita 1, 2, 4, dan 5 terletak pada satu garis lurus
- f. di bawah pita 1 dan 5 tidak ada pita lain

Data *sequencing* yang prosedurnya disajikan di anak subbab 4.6.5 tertera pada halaman 94 sampai dengan halaman 101.

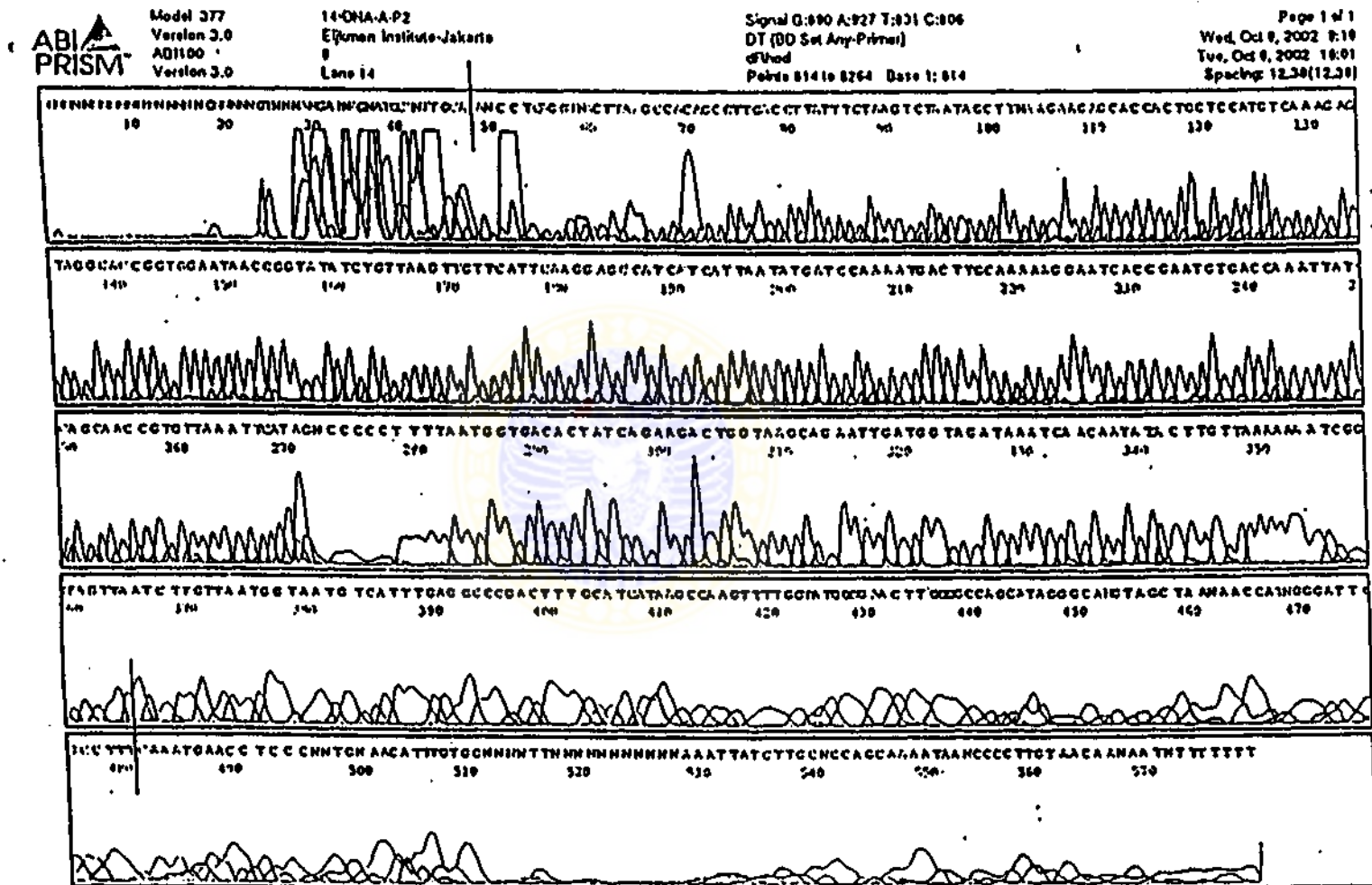
Laporan urutan basa dengan pemacu primer P₁ pada fragmen DNA yang telah diberi perlakuan saat penelitian pendahuluan (sekitar 500 buah basa)



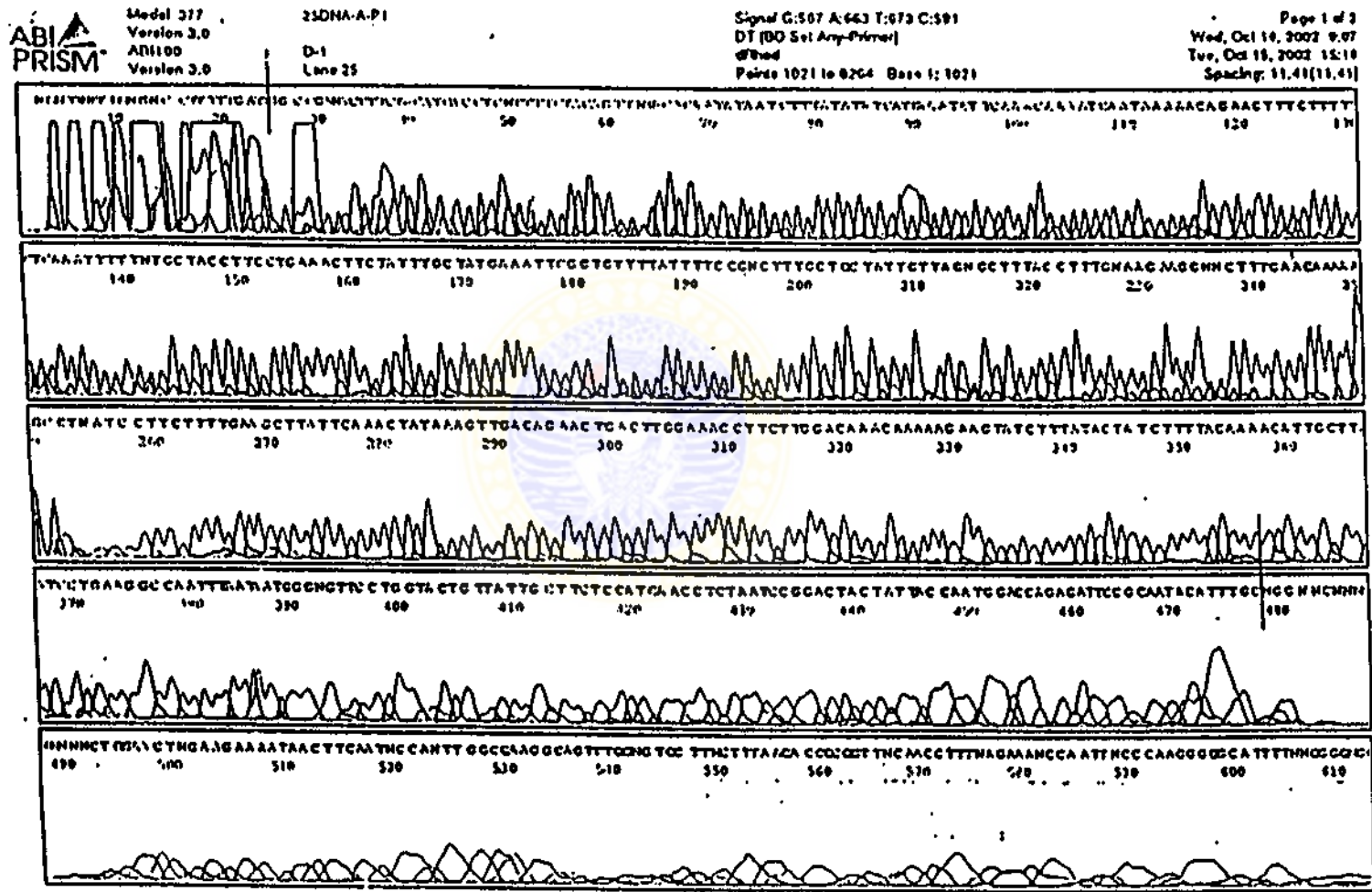
Laporan urutan basa dengan pemacu primer P₂ pada fragmen DNA yang tidak diberi perlakuan saat penelitian pendahuluan (sekitar 500 buah basa)



Laporan urutan basa dengan pemacu primer P₂ pada fragmen DNA yang telah diberi perlakuan saat penelitian pendahuluan (sekitar 500 buah basa)



Laporan urutan basa dengan pemacu primer P₁ pada fragmen DNA yang telah diberi perlakuan saat penelitian (sekitar 500 buah basa)



Pada halaman 94 disajikan hasil sequencing urutan basa dengan pemicu primer P_1 pada fragmen DNA yang belum diberi perlakuan saat penelitian pendahuluan (sekitar 500 buah basa), yang diberi kode 13-DNA-A- P_1 .

Pada halaman 95 disajikan hasil sequencing urutan basa dengan pemicu primer P_1 pada fragmen DNA yang telah diberi perlakuan saat penelitian pendahuluan (sekitar 500 buah basa), yang diberi kode 15-DNA-B- P_1 .

Pada halaman 96 disajikan hasil sequencing urutan basa dengan pemicu primer P_2 pada fragmen DNA yang belum diberi perlakuan saat penelitian pendahuluan (sekitar 500 buah basa), yang diberi kode 16-DNA-B- P_2 .

Pada halaman 97 disajikan hasil sequencing urutan basa dengan pemicu primer P_2 pada fragmen DNA yang telah diberi perlakuan saat penelitian pendahuluan (sekitar 500 buah basa), yang diberi kode 14-DNA-A- P_2 .

Pada halaman 98 disajikan hasil sequencing urutan basa dengan pemicu primer P_1 pada fragmen DNA yang belum diberi perlakuan saat penelitian (sekitar 500 buah basa), yang diberi kode 27-DNA-B- P_1 .

Pada halaman 99 disajikan hasil sequencing urutan basa dengan pemicu primer P_1 pada fragmen DNA yang telah diberi perlakuan saat penelitian (sekitar 500 buah basa), yang diberi kode 25-DNA-A- P_1 .

Pada halaman 100 disajikan hasil sequencing urutan basa dengan pemicu primer P_2 pada fragmen DNA yang belum diberi perlakuan saat penelitian (sekitar 500 buah basa), yang diberi kode 28-DNA-B- P_2 .

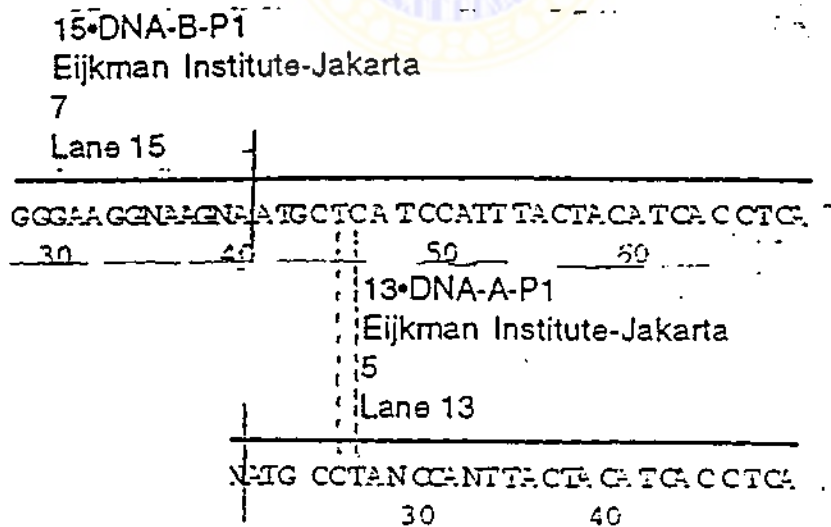
Pada halaman 101 disajikan hasil sequencing urutan basa dengan pemicu primer P_2 pada fragmen DNA yang telah diberi perlakuan saat penelitian (sekitar 500 buah basa), yang diberi kode 26-DNA-A- P_2 .

Primer P_1 dan P_2 masing-masing memantau urutan basa dari ujung kiri dan dari ujung kanan fragmen DNA 1784 pb.

Setelah diteliti data halaman 94 sampai dengan 101 maka data-data tersebut menghasilkan data yang tertera pada Tabel 5.1 dan 5.2 di halaman 104 dan 105.

Data penelitian pendahuluan menyatakan bahwa dari 800 basa, tiap basa (A, C, G atau T) yang jumlahnya n_i dan perubahannya x_i tercatat pada Tabel 5.1 berikut.

Cara menetapkan besarnya n_i dan x_i telah dijelaskan di Gambar 5.4 berikut



Gambar 5.4. Ujung kanan lembar data berkode 15.DNA-B- P_1 dan 13.DNA-A- P_1 .

Dari Gambar 5.4 dapat diketahui bahwa basa C yang terletak urutan basa kelima dari kiri berubah jadi T dan basa T terletak pada urutan basa keenam dari kiri berubah jadi C. Alat *sequencing* memberi tahu bahwa lambang N tidak jelas apakah menyatakan basa A, C, G, atau T.

Tabel 5.1 Jumlah basa (n_1) dan jumlah basa yang berubah (x_1) pada penelitian pendahuluan

basa	n_1 (jumlah basa)	x_1 (jumlah basa yang berubah)
A	265	8
C	165	8
G	134	5
T	<u>236</u>	7
	800	

Data pada penelitian menyatakan bahwa dari 800 basa, tiap basa (A, C, G, atau T) yang jumlahnya n_2 dan perubahannya x_2 tercatat pada Tabel 5.2 berikut.

Cara menetapkan besarnya n_2 dan x_2 pada Tabel 5.2 seperti cara penetapan besarnya n_1 dan x_1 pada Tabel 5.1 yang telah dijelaskan.

Tabel 5.2 Jumlah basa (n_2) dan jumlah basa yang berubah (x_2) pada penelitian.

Basa	n_2 (jumlah basa)	x_2 (jumlah basa yang berubah)
A	262	9
C	158	8
G	127	9
T	<u>253</u>	7
	800	

5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

Karena dari data hasil elektroforesis pada subbab 5.1 pada gambar 5.1 menunjukkan bahwa PCR fragmen DNA dari isolasi DNA *Endomycolopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 adalah satu pita dan hasil PCR fragmen DNA kontrol positif satu pita juga serta keduanya terletak satu garis mendatar, hal ini menandakan ukuran fragmen DNA keduanya sama. Dan Gambar 5.2 menunjukkan fragmen DNA hasil penggandaan templat *Endomycolopsis fibuligera* ITB R.cc.64 sekitar 1784 pb serta pada Gambar 5.3 pada halaman 102 ternyata tidak ada pita di bawah pita 1 dan 5, maka hasil penelitian menyatakan bahwa fragmen DNA 1784 pb in vitro tidak putus yaitu tetap merupakan fragmen DNA 1784 setelah mendapat penyinaran gelombang elektromagnetik laser He-Ne dengan energi pemaparan $0,9 \text{ joule/m}^2$.

Dari data *sequencing* yang tersaji pada subbab 5.1 (Tabel 5.1 pada halaman 104 dan Tabel 5.2 pada halaman 105) tersebut, dengan pendekatan distribusi Poisson dapat dihitung probabilitas perubahan basa sebagai berikut

Tabel 5.3 Perhitungan probabilitas rata-rata dengan pendekatan distribusi Poisson.

Basa	Penelitian Pendahuluan			Penelitian		$n_2 p_1$	$(n_2 p_1)^{x_2}$	$e^{-n_2 p_1}$	$\frac{1}{x_2!}$	$P(x_2; n_2 p_1) = \frac{(n_2 p_1)^{x_2} e^{-n_2 p_1}}{x_2!}$
	n_1 (jml basa)	x_1 (jml basa yg berubah)	$p_1 = \frac{x_1}{n_1}$ proporsi	n_2 (jml basa)	x_2 (jml basa yg berubah)					
A	265	8	0,03012	262	9	7,982	118763691,80	$3,737213843 \times 10^{-4}$	$2,755731922 \times 10^{-6}$	0,122
C	165	8	0,04848	158	8	7,660	11853051,11	$4,713074108 \times 10^{-4}$	$2,48015873 \times 10^{-5}$	0,139
G	134	5	0,03704	127	9	4,704	1127731,776	$9,58968659 \times 10^{-3}$	$2,755731922 \times 10^{-6}$	0,023
T	236	7	0,02966	253	7	7,504	1339830,246	$5,08764515 \times 10^{-4}$	$1,984126984 \times 10^{-4}$	0,135

$$\bar{P} = 0,105$$

Proporsi rata-rata perubahan basa pada penelitian pendahuluan $p_1 = 0,036325$, sedangkan proporsi rata-rata perubahan basa pada penelitian $p_2 = 0,045879545$.

BAB VI

PEMBAHASAN

Pembahasan berikut ini antara lain mengkaitkan kajian secara teoritis dampak pemaparan radiasi gelombang elektromagnetik laser He-Ne pada fragmen DNA 1784 pb in vitro dan hasil penelitian eksperimental. Hasil bahasan secara teoritis tersebut digunakan untuk mengklarifikasi hasil penelitian eksperimental laboratoris yang telah disajikan pada Bab V, yaitu fragmen DNA 1784 pb in vitro tidak putus (pada halaman 105 pada Subbab 5.2) dan pada penyinaran cahaya laser helium-neon tidak menyebabkan perubahan urutan basa fragmen DNA tersebut akan disajikan penjelasan pembahasan sebagai berikut.

6.1 Untai Fragmen DNA In Vitro Tidak Putus

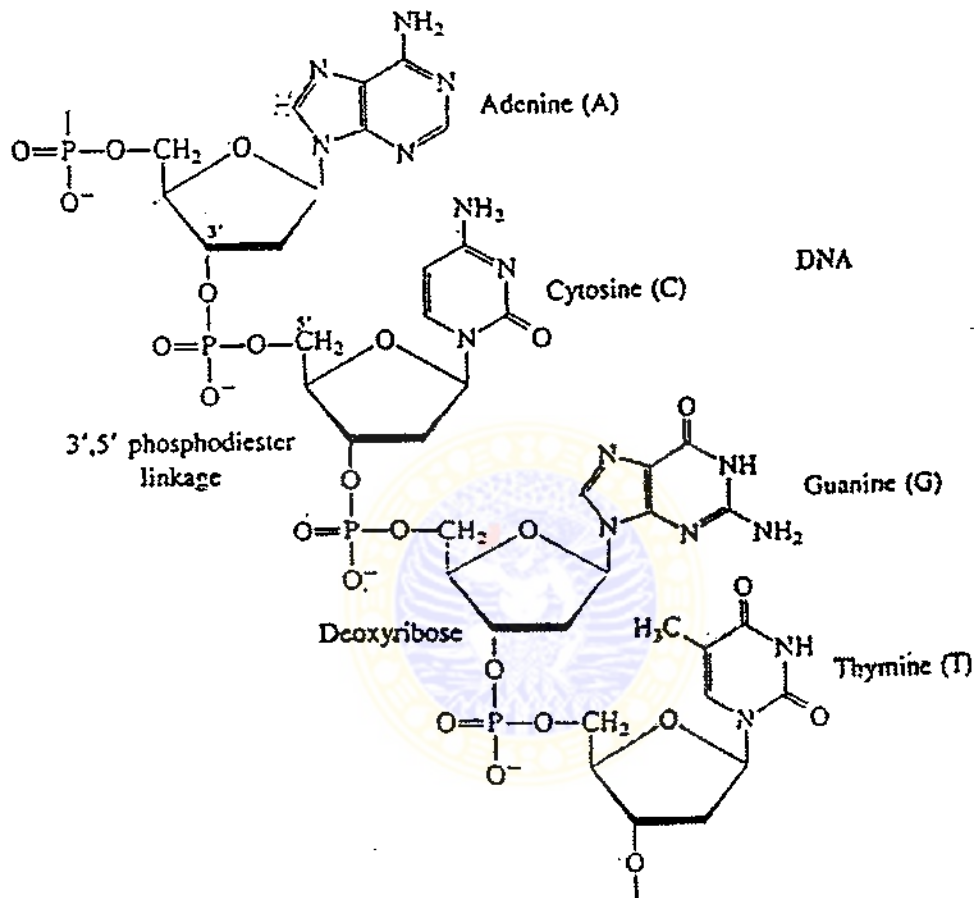
Keluaran foton laser He-Ne adalah disebabkan transisi tingkat energi elektron neon (Ne) $3s^2$ ke $2p^4$ yang panjang gelombangnya 632,8 nm.

Foton laser He-Ne mempunyai energi $E_f = 0,031 \times 10^{-17}$ joule (J) dengan perhitungan sebagai berikut.

Energi foton gelombang elektromagnetik laser He-Ne adalah $E_f = hf$, dengan catatan h adalah konstante Planck yaitu $6,6256 \times 10^{-34}$ Js dan f adalah frekuensi gelombang elektromagnetik laser He-Ne yaitu $(3 \times 10^8 / 632,8 \times 10^{-9})$ Hz. Jadi $E = hf = 0,03 \times 10^{-17}$ J.

Nucleotide (basa A, C, G, atau T dan *deoxyribose* serta *phosphate*) berkaitan dengan *nucleotide* berikutnya terikat karena energi potensial elektrostatik antara atom O di gugus *phosphate* pada *nucleotide* dan atom C di gugus gula

deoxyribose nucleotide berikutnya. Hal ini disajikan pada Gambar 6.1 berikut atau Gambar 6.2 pada halaman 108 atau halaman 111.



Gambar 6.1 Struktur kimia sebagian untai DNA (Hill et al., 1993)

Whitten et al.(1996) menjelaskan bahwa elektronegativitas menurut skala Pauli untuk atom C, O, dan P berturut-turut adalah 2,5 , 3,0 , dan 2,1. Karena ada pemilikan elektron bersama-sama antara atom O dan atom C serta karena elektronegativitas atom O lebih besar daripada atom C maka atom O lebih

condong mendapat kontribusi 1 elektron dari C dan atom C condong kekurangan 1 elektron. Atom O yang telah dibahas tadi dengan atom P yang sama-sama dalam *phosphate* berpemilikan elektron bersama dan karena atom O menurut skala Pauli berelektronegativitas lebih besar daripada atom P maka atom O tersebut condong mendapat kontribusi lebih 1 elektron dari atom P. Oleh sebab itu atom O condong berkelebihan 2 elektron dan atom C condong kekurangan 1 elektron. Whitten et al.(1996) menjelaskan bahwa jarak atom O dan C adalah $2,17 \times 10^{-10}$ m. *Nucleotide* pasangan basa A dan T maupun C dan G mempunyai energi potensial elektrostatik (Titler, 1991) sebesar

$$E_n = -\frac{2 \times 9 \times 10^9 \times 2 \times 1,6 \times 10^{-19} \times 1,6 \times 10^{-19}}{2,17 \times 10^{-10}} = -0,4248 \times 10^{-17} \text{ joule}$$

Karena $E_f < |E_n|$ maka energi foton E_f gelombang elektromagnetik laser He-Ne secara teoritis tidak mampu memutuskan fragmen DNA 1784 pb in vitro jika dilakukan penyinaran gelombang elektromagnetik laser He-Ne dengan energi pemaparan $0,9 \text{ joule} / \text{m}^2$.

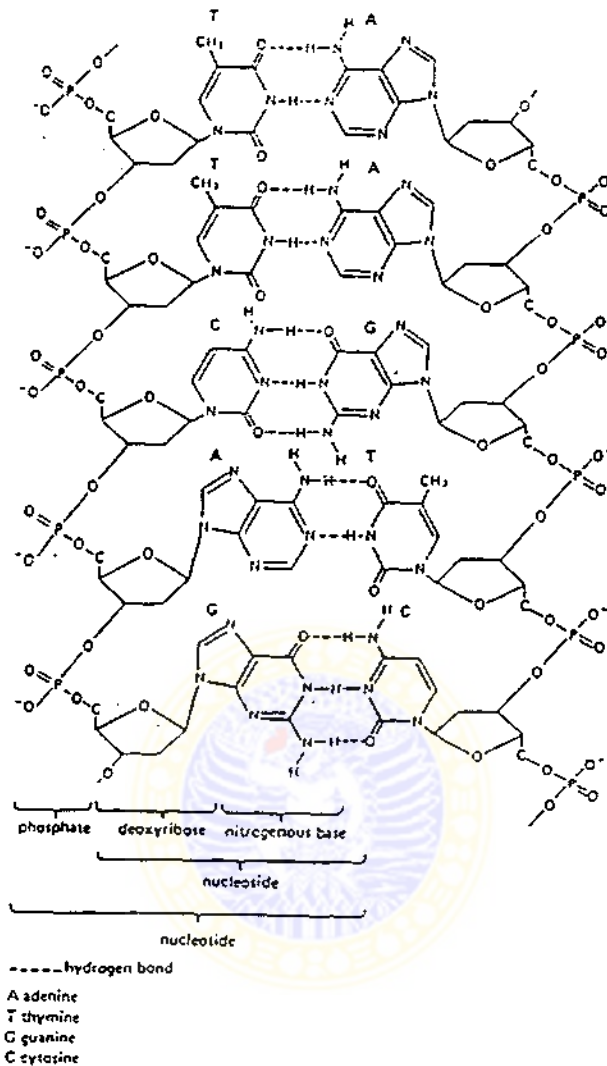
Hasil eksperimen (pada Subbab 5.1) menjelaskan sebagai berikut.

Hasil eksperimen tersebut menyatakan bahwa pita fragmen DNA 1784 pb pada **penelitian pendahuluan** dan **penelitian** berada pada satu garis. Karena pada elektroforesis digunakan beda potensial yang tetap yaitu 86 volt maka pada alat elektroforesis terdapat medan listrik yang tetap dan sama, sehingga gaya elektrostatis F pada semua fragmen DNA di pita 1,2,4, dan 5 adalah sama yaitu $F = ma$ (m adalah massa fragmen DNA dan a adalah percepatan fragmen DNA bergerak). Karena pada selang waktu tertentu jarak posisi semua pita dari sumurnya sama, sedang selama fragmen DNA bergerak mengalami hambatan yang sama, maka massa fragmen DNA pita 1,2,4, dan 5 adalah sama. Hal ini berarti fragmen DNA pada pita 1 dan 5 tidak mengalami pemutusan sehingga **secara penelitian eksperimental laboratoris fragmen DNA tidak mengalami pemutusan jika terpapar foton laser He-Ne.**

6.2 Pemaparan Cahaya Laser He-Ne Tidak Mengubah Urutan Basa

Fragmen DNA In Vitro.

Jika diperhatikan hubungan basa A-T dan basa C-G pada Gambar 6.2 berikut, maka basa A-T terkait dengan 2 ikatan hidrogen dan basa C-G terkait dengan 3 ikatan hidrogen.



Gambar 6.2 Sebagian molekul DNA yang menunjukkan hubungan pasangan basa komplementer dan gambar tersebut merupakan gambar bagan (Martin et al.,1985)

Whitten et al.(1996) menjelaskan bahwa energi ikat ikatan hidrogen adalah antara nilai -0.0017×10^{-17} joule dan -0.0024×10^{-17} joule serta dalam pembahasan ini diasumsikan nilai energi ikat ikatan hidrogen adalah di antara dua nilai tersebut yaitu $E_h = -0.002 \times 10^{-17}$ joule. Energi ikat tersebut merupakan energi potensial elektrostatik .

Basa A,C,G. dan T masing-masing terikat dengan gula *deoxyribose* dengan energi potensial elektrostatik yaitu energi potensial elektrostatik antara atom N yang ada di basa dan atom C yang ada di gula *deoxyribose*.

Whitten et al.(1996) juga menjelaskan bahwa elektronegativitas menurut skala Pauli untuk atom C, H, N, dan O berturut-turut adalah 2,5 , 2,1 , 3,0 , dan 3,5. Sedangkan atom C, H, N, dan O masing-masing mempunyai konfigurasi elektron pada kulit atom yang paling luar adalah sebagai berikut.

Tabel 6.1 Konfigurasi elektron kulit paling luar C, H, N, dan O

Atom	Konfigurasi elektron kulit paling luar
C	$s^2 p^2$
H	s^1
N	$s^2 p^3$
O	$2s^2 2p^4$
P	$3s^2 3p^3$

Sumber : Whitten et al.(1996)

Jadi dalam hal pemilikan elektron bersama, atom N pada basa A, C, G, atau T mendapat kontribusi tiga elektron dari atom C di sekelilingnya, dan oleh sebab itu atom N dapat dikatakan bermuatan listrik negatif sebesar muatan listrik 3 elektron. Tiap elektron bermuatan -1.6×10^{-19} coulomb. Sedangkan atom C yang ada di gula *deoxyribose* dan terikat dengan atom N di basa A, C, G, atau T condong berpemilikan bersama dengan satu elektron di N seperti disebutkan tadi dan condong berpemilikan bersama dengan atom O sebelahnyanya yang sama-sama dalam *deoxyribose*, tetapi atom C tersebut berpemilikan bersama 1 elektron dengan atom H yang disebelahnya serta berpemilikan bersama 1 elektron dengan

atom C di sebelahnya yang sama-sama dalam *deoxyribose*. Mengingat gejala elektronegativitas skala Pauli, maka atom C tersebut condong bermuatan positif senilai harga mutlak muatan 1 elektron yaitu $1,6 \times 10^{-19}$ coulomb.

Whitten et al.(1996) menjelaskan bahwa jari-jari atom C dan jari-jari ion N masing-masing adalah 0,77 angstrom dan 1,71 angstrom. Jadi dapat diasumsikan bahwa jarak atom C dan N pada ikatan kovalen basa dan gula *deoxyribose* adalah $(0,77 + 1,71)$ angstrom = $2,48 \times 10^{-10}$ m.

Energi ikat basa A, C, G, atau T dengan gula *deoxyribose* adalah merupakan energi potensial elektrostatik (Titler, 1991) yaitu $E_k = -9 \times 10^9 \times 1,6 \times 10^{-19} \times 3 \times 1,6 \times 10^{-19} / (2,48 \times 10^{-10})$ joule = $-0,279 \times 10^{-17}$ joule.

Dengan memperhatikan energi ikat hidrogen dengan basa pasangannya dan energi potensial elektrostatik A atau T dan gula *deoxyribose* maka

$$\begin{aligned} \text{energi ikat basa A} &= \text{energi ikat basa T} = E_k + 2 E_h \\ &= (-0,279 - 2 \times 0,002) \times 10^{-17} \text{ joule} \\ &= -0,283 \times 10^{-17} \text{ joule} \end{aligned}$$

Dengan memperhatikan energi ikat hidrogen dengan basa pasangannya dan energi potensial elektrostatik antara C atau D dan gula *deoxyribose* maka

$$\begin{aligned} \text{energi ikat basa C} &= \text{energi ikat basa G} = E_k + 3 E_h \\ &= -0,285 \times 10^{-17} \text{ joule} \end{aligned}$$

Karena energi foton laser He-Ne yaitu $E_f = 0,03 \times 10^{-17}$ joule < harga mutlak energi potensial elektrostatik (harga mutlak energi ikat) basa A, C, G, atau T maka foton laser He-Ne tidak dapat memutuskan ikatan basa. Jadi secara teoritis fragmen DNA *in vitro* tidak mengalami perubahan urutan basa saat mendapat perlakuan

penyinaran gelombang elektromagnetik laser He-Ne dengan energi pemaparan 0,9 joule / m².

Dari hasil penelitian eksperimental laboratoris (yang telah dijelaskan di Subbab 5.2 pada halaman 106) menyatakan bahwa probabilitas rata-rata perubahan basa fragmen DNA adalah $\bar{P} \ll 1$, yaitu bernilai 0,105. Dengan proporsi perubahan rata-rata penelitian pendahuluan dan penelitian masing-masing bernilai 0,03633 dan 0,04588. Jumlah foton yang memapar adalah $3,1842 \times 10^{15}$ buah foton (anak subbab 4.6.4) dan jumlah basa yang terpapar dalam penelitian adalah $19,2765 \times 10^{15}$ (lampiran 3). Andaikan foton laser He-Ne mampu memutus basa maka proporsi perubahan basa adalah $\frac{3,1842 \times 10^{15}}{19,2774 \times 10^{15}} = 0,16518$, yang nilainya jauh lebih besar daripada nilai 0,03633 atau 0,04588.

Oleh sebab itu penyinaran gelombang elektromagnetik laser He-Ne **tidak menyebabkan perubahan** basa pada fragmen DNA 1784 pb in vitro. Perubahan yang sedikit ini karena pengaruh lingkungan.

Kemungkinan lingkungan yang mempengaruhi adalah zat kimia dalam larutan, suhu, tekanan udara, kelembaban, dan sinar kosmik. Zat kimia dalam larutan sudah diusahakan tidak ada kecuali zat pelarut TE. Kelembaban juga tidak mempengaruhi sebab fragmen DNA dalam larutan TE. Suhu dan tekanan udara juga tidak mungkin karena bila mempengaruhi, semua basa akan terpengaruh. Satu-satunya kemungkinan yang mempengaruhi adalah sinar kosmik karena sinar kosmik yang datangnya dari luar angkasa dengan energi yang tinggi secara acak

mempengaruhi lingkungan (subbab 2.11 pada halaman 66). Pada subbab 2.11 dijelaskan bahwa pakar biologi telah menafsir bahwa sekitar dua persen mutasi genetik karena perubahan struktur molekuler materi genetik disebabkan oleh sinar kosmik.

Sinar kosmik terutama terdiri dari proton berasal dari benda langit yaitu supernova yang merupakan bintang yang meledak (Cowen, 2002). Energi sinar kosmik sampai bernilai 1.000.000.000.000.000 eV ($1 \text{ eV} = 1,6 \times 10^{-19}$ joule. Di galaksi Bimasakti tempat bintang matahari berada jumlah bintang memiliki tidak kurang dari 100.000.000.000 bintang, belum lagi di galaksi lain seperti Andromeda, Magellanic dan sebagainya (Kaligis, et.al., 19..).

Jadi perubahan urutan basa fragmen DNA 1784 pb in vitro hasil penelitian eksperimental laboratoris antara lain dapat dikatakan disebabkan oleh sinar kosmik bukan karena penyinaran cahaya laser He-Ne dengan energi pemaparan $0,9 \text{ joule} / \text{m}^2$.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

Penyinaran gelombang elektromagnetik laser He-Ne yang energi pemaparannya sama saat perekaman gambar holografis yaitu $0,9 \text{ joule /m}^2$ pada fragmen DNA 1784 pb *in vitro* tidak menyebabkan putusny untai fragmen DNA tersebut dan tidak mengubah urutan basa fragmen DNA tersebut dapat menjadi pertimbangan untuk penelitian lebih lanjut.

Masalah terputus dan tidaknya untai fragmen DNA hanya terkait dengan energi foton laser He-Ne dan tentunya dengan energi ikat *nucleotide* pada fragmen DNA, bukan terkait dengan jumlah *nucleotide* fragmen DNA. Hal tersebut juga menyangkut terputusnya ikatan basa DNA dengan gula *deoxyribose* karena adanya energi potensial elektrostatis dan ikatan hidrogen dengan pasangan basanya. Jadi penelitian ini telah menjawab selain tujuan khusus penelitian juga menjawab tujuan umum penelitian yaitu untuk penelitian lebih lanjut dapat sebagai pertimbangan bahwa penyinaran gelombang elektromagnetik laser He-Ne tidak berpengaruh pada DNA berapapun jumlah pasang-basanya, *in vitro*. Hal ini telah diklarifikasi dengan teori pada pembahasan pada Bab VI.

7.2 Saran

Karena hasil pemikiran penelitian atas keterbatasan penelitian yang dilakukan maka saran yang seyogyanya disampaikan adalah perlu adanya penelitian lanjutan

tentang perlakuan *in vitro*, yaitu antara lain penyinaran gelombang elektromagnetik laser He-Ne dengan metode yang sama dengan metode penelitian ini terhadap fragmen DNA 1784 pb *in vitro*, dalam lingkungan yang bebas dari pengaruh sinar kosmik.

Dengan saran tersebut penulis berharap agar hasil penelitian ini dapat untuk pertimbangan penelitian lebih lanjut perihal penyinaran gelombang elektromagnetik laser He-Ne pada bidang kehayatan.



DAFTAR PUSTAKA

Alberstone CD, Benzel EC, 1998. **Holographic imaging in spine surgery.** Medscape Orthopaedics & Sport Medicine 2(2).

Alonso M, Edward JF, 1975. **Fundamental university physics III quantum and statistical physics.** New York : Edison Wesley, pp 19, 33, 53-65, 434-439, 531-536.

Alpen EL, 1990. **Radiation Biophysics.** New Jersey : Prentice Hall, PP 48-341.

Arecchi FT, Dubois EOS, 1972. **Laser handbook.** New York : North-Holland Publishing Company, p 1490.

Aronoff BLMD, 1983. **Laser in general surgery.** Word J Surg 6 : 681-683.

Batanouny E, Mohamed, Korraa, Soheir, 2001. **Investigation of the repair outcome in lymphocytes exposed to ionizing radiation and helium-neon laser irradiation respectively.** Paper, Cairo, Egypt : Cairo University / Institute for Laser Enhanced Science.

Batti M, Mac Robert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M, 1998 Sep. **A study of the uptake of toluidine blue O by Porphyromonas gingivalis and the mechanism of lethal photosensitization.** Photochem-Photobiol 68(3) : 370-6.

Bocker W, Bauch T, Muller WU, Streffer C, 1997 Okt. **Image analysis of comet assay measurement.** Int-J-Radiat-Biol 72(4) : 449-60.

Botchway SW, Stevens DL, Hill MA, Jenner TJ, O'Neill P, 1997 Okt. **Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in chinese V79-4 cells irradiated with characteristic aluminium K and copper L ultrasoft X rays.** Radiat-Res 148(4) : 317-24.

Boyer K, Solem JC, Longworth VW, Borisov AB, Rhodes CK, 1996. **Biomedical three dimensional holographic microsurgery at visible wavelength.** Nat Med 2(8) : 939 - 41.

Brown, Hollander, 1986. **Statistics for biomedical sciences.** New York : John Willey & Sons, Inc.

Cary DA, Edward CB, Frederick WR, 1998. **Holographic imaging in spine surgery.** Medscape Orthopaedics & Sports Medicine 2(2).

Cohen N, Lubart R, Rubinstein S, Breitbart H, 1998. **Light irradiation of mouse spermatozoa : stimulation of in vitro fertilization and calcium signals.** Photochem-Photobiol 63(3) : 407 - 13.

Collier RJ, Burckhardt CB, Lin LH, 1971. **Optical holography**. New York : Academic Press, pp 13-25.

Cowen, R., 2002, April, **Tracking the origin of cosmic rays**, Science News Online : 1 – 3.

Deiwick M, Glasmacher B, Zarubin AM, Riul H, Geiger A, Von Bally G, Stargardt A, Rau G, Scheld HH, 1996. **Quality control of bioprosthetic heart valves by means of holographic interferometry**. J Heart Valve Dis 5(4) : 441-7, 439-40.

Erlich HA, 1992. **PCR technology, principle and application for DNA**. New York : W.H. Freeman and Company, pp 23-30.

Frank L, Pedrotti SJ, Leno SP, 1994. **Introduction to optics**. New Jersey : Printice Hall, PP 435-453.

Glatter RD, Goldberg JS, Schomacker KT, Compton CC, Flotte TJ, Bua DP, Greaves KW, Nishioka NS, Sheridan RL, 1998 Aug. **Carbon dioxide laser ablation with immediate autografting in a full - thickness porcine burn modul**. Ann - Surg 228(2) : 257 - 65.

Grant R, Grant C, 1987. **Chemical dictionary**. Toronto : Mc Graw Hill, p 197.

Greco M, Guida G, Perlino E, Marra E, Quagliariello E, 1989. **Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser**. Biochem Biophys Res Commun, 163 (3) : 1428 - 34.

Gutknecht N, Kanehl S, Moritz A, Mittermayer C, Lampert F, 1998. **Effects of Nd : YAG laser irradiation on monolayer cell cultures**. Laser-Surg-Med 22(1): 30-6.

Hackett PB, Fuchs JA, Messing JW, 1988. **An introduction to recombinant DNA techniques**. Tokyo : The Binyamin/Cummings Publishing Company, Inc., pp 62-64.

Hadi S, 2001. **Penggandaan gen glukamilase (GLU1)**. Thesis. Surabaya : Program Pascasarjana, p 4.

Hewitt PG, 1993. **Conceptual physics**. Seventh edition, New York : Harper Collins College Publishers.

Hill JW, Feigi DM, Baum SJ, 1993. **Chemistry and life**. Fourth edition, New Jersey : Printice Hall, pp 92-93, 613.

Howard PH, Neal M, 1992. **Dictionary of chemical names and synonyms**. Michigan : Levis Publishers, p I-133.

Hughes PS, Hughes AP, 1998. **Absence of human papillomavirus DNA in the plume of erbium : YAG laser treated warts.** J-Am-Acad-Dermatol 38(3) : 426-8.

Humphrey TR, Malhotra R, Schraft MJ, Marcus SM, Starkus L, Calegori K, 1998 Oct. **Treatment of superficial basal cell carcinoma in situ with a high energy pulsed carbon dioxide laser.** Arch-Dermatol 134(10) : 1247-52.

Itoh, T, Yamashita I, Fukui S, 1987. **Nucleotide sequence of the glucoamylase gene *GLUI* in the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*.** J. of Bacteriology 169(9) : 4171-4176.

Ivan R, Jonathan B, David M, 1998. **Immunology.** England : Mosby, p 28.2.

Jones ER, Childers RL, 1993. **Contemporary college physics.** Singapore : Addison-Wesley, pp 833, 901.

Kallard T, 1977. **Exploring laser light.** New York : Optonic Press, p 3 pp 221-232.

Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G, 1995 Mar. **Irradiation with He-Ne laser in cell cultivated in vitro.** J. Photochem-Photobiol-B. 27(3) : 219-23.

Koutna M, Janisch R, Veselska R, 2003 June. **Effects of low power laser irradiation on cell proliferation.** Scripta Medica (BRNO) - 76 (3) : 163-172.

Keller FJ, Gettys WE, Skove MJ, 1993. **Physics, classical and modern.** New York : Mc Graw Hill, Inc., pp 1006-1010.

Kolesnikova AI, Kubasova T, Konoplaynnikov AG, Koteles GJ, 1998. **Cellular alteration upon IR-laser (890 nm) exposures, in vivo.** Pathol-Oncol-Res 4(1) : 22-6.

Katz Dm, Blatcher S, Shelton JC, 1998. **Quantification of holographic fringe data : comparison of intact and implanted femurs.** Med Eng Phys 20(22) : 114-23.

Kaufmann R, Greiner D, Kippenberger S, Bernd A, 1998 Mar. **Grafting of in vitro cultured melanocytes onto laser - ablated lesions in vitiligo.** Acta-Derm-Venereol 78(2) : 136-8.

Koval VV, Chernonosov AA, Abramosa TV, Ivanova TM, Fedorova OS, Derkacheva VM, Lukyanets EA, 2001. **Photosensitized and catalytic oxidation of DNA by metallophthalocyanine-oligonucleotide conjugates.** Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 20 (4-7), pp 1259-1262.

Ko K, 1998. **Superimposed holographic image guided neurosurgery.** J Neurosurg 88(4) : 777-81.

Kroschwitz JI, Winokur M, 1990. **Chemistry, general, organic, biological, second edition.** Toronto : Mc. Grow - Hill Publishing Company, pp 134-135.

Ko'tsova EV, Sodova AI, 1970. **Examination of Enzymes of the amylolytic complex of Endomycopsis sp.** Prikl. Biochim, Microbial. Pp. 48-50.

Malyapa RS, Ahern EW, Bi C, Straube WL, La Regina M, Richard WF, Roti-Roti JL, 1998 Jun. **DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia.** Radiat-Res 149(6) : 637-45.

Manteifel V, Bakeeva L, Karu T, 1997. **Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser.** J Photochem Photobiol B 38(1) : 25-30.

Martin EA, 1985. **Dictionary of life science.** London : Mac Millan Press, pp 109-110.

Mc Cann J, Dietrich F, Rafferty C, 1998 Aug. **The genotoxic potential of electric and magnetic fields : an update.** Mutat-Res 411(1) : 45-86.

Mc Pherson MJ, Moller SG, 2000. **PCR.** Canada. Springer - Verslag, p.1.

Michael R, Gump F, Wu WH, 1993. **Helium-neon laser irradiation enhances DNA synthesis in a human neuroblastoma cell line.** SPIE Proceeding Vol. 1883, pp 115-123.

Minami S, 1980. **Fundamentals of spectrometry. Lecture at Graduated School of Optoelectronics and Laser Application, Universitas Indonesia, Jakarta :** Univ.Indonesia.

Morales JA, Ruiz-Gomez MJ, Gylil-Carmona L, Souviron A, Martinez-Morillo M. 1995 Mar. **He-Ne laser has no effects on cell cycle phases of human colon adenocarcinoma cells.** Rev-Esp-Fisiol 51(1) : 43-7.

Nakagawa A, Kobayashi N, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, Ikegana M, Mori T, 1998 Feb. **Three dimensional visualization of ultraviolet induced DNA damage and its repair in human cell nuclei.** J-Invest-Dermatol 119(2) : 143-8.

Ocana-Quero JM, Gomez-Villamandos R, Moreno-Millan M, Santisteban-Valenzuela J, 1997 Jun. **Sister chromatid exchange induction in sheep peripheral blood mononuclear cells by helium-neon laser radiation.** Mutat-Res 377(1) : 69-75.

Ocana-Quero JM, Gomez-Villamandos. R, Moreno-Millan M, Santisteban-Valenzuela JM, 1997 Oct. **Biological effects of helium-neon (He-Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cell.** J. Photochem-Photobiol-B 40(3) : 294-8

Old RW, Primrose SB, 1989. **Principle of gene manipulation**. Melbourne : Blackwell Scientific Publications, pp.167 - 173.

Perez MI, Bank DE, Silvers D, 1998 Jun. **Skin resurfacing of the face with the Erbium : YAG**. *Dermatol-Surg* 24(6) : 653-8.

Petit-Frere C, Clingen PH, Grewe M, Krutmann J, Roza L, Arlet CF, Green MH, 1998 Sep. **Induction of interleukin -6 production by ultraviolet radiation in normal human edidermal keratinocytes and in human keratinocyte cell line is mediafed by DNA damage**. *J-Invest-Dermatol* 111(3) : 354-9.

Piva R, Lambertini F, Penolazzi L, Facciola MC, Lodi A, Aguiari G, Nastruzzi C, del Senno L, 1998 Sep. **In vitro stability of polymerase chain reaction generated DNA fragments in serum and cell extracts**. *Biochem-Pharmacol* 56(6) : 703-8.

Pomeranz Y, Meloan CE, 1994. **Food analysis, third edition**. London : Chapman & Hall, pp 208-222.

Puruhito, 1996. **Pengembangan bedah hewan percobaan dalam menunjang aplikasi klinik, Muktamar Ahli Bedah Indonesia XII**. Surabaya : Lab / UPF Ilmu Bedah Unair.

Puspaningsih NNT, 1997. **Pembentukan sel ragi**. Laporan Penelitian. Surabaya : Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, p 8.

Reddy VN, Giblin FJ, Lin Lr, Chakrapani B, 1998 Feb. **The effect of aqueous humor ascorbate on ultraviolet-B-induced DNA damage in lens epithelium**. *Invest-Ophthamol-Vis-Sci* 39(2) : 344-50.

Reitz JR, Milford FJ, Christy RW, 1993. **Foundations of electromagnetic theory, fourth edition**. Tokyo : Addison-Wesley Publishing Company, pp 390-395, 423-426.

Repacholi MH, 1998. **Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields : health effects and research needs**. *Bioelectromagnetics* 19(1) : 1-19.

Rindge D, 2002 August. **Laser acupuncture**. *Acupuncture Today*, Part Two : There Be Light.

Russmann C, Stollhof J, Weiss C, Beigang R, Beato M, 1998 Sep. **Two wavelength femtosecond laser induced DNA-protein crosslinking**. *Nucleic-Acids-Res* 26(17) : 3967-70.

Schomacker KT, Walsh A, Gregory KW, Kochevar IE, 1997. **Cell damage induced by Angiovisit-370 and 308 nm excimer laser radiation**. *Lasers-Surg-Med* 20(2) : 111-8.

Sears FW, Mark WZ, Hugh DY, 1976. **University physics**. Fifth edition, Tokyo : Addison Wesley Publishing Company, p 640.

Shahib MN, 1990. **Dasar-dasar rekombinasi DNA**. Bandung : Pusat Antar Universitas Bioteknologi ITB, p 82.

Siles BA, Nackerdien ZE, Collier GB, 1997 May. **Analysis of DNA fragmentation using dynamic size-sieving polimer solution**. J-Chromatogr-A 319-29.

Simko M, Kriehuber R, Lange S, 1998 Okt. **Micronucleus formation in human amnion cells after exposure to 50 Hz MF applied horizontally and vertically**. Mutat-Res 418(2-3) : 101-11.

Soeparmo HA, 1998. **Biologi masa kini**. Diktat kuliah pasca sarjana. Surabaya : Pascasarjana Unair.

Stocker B, Meier T, Flidner TM, Plappert U, 1998 Jan. **Laser pyrolysis products : sampling procedures, cytotoxic and genotoxic effect**. Mutat-Res 412(2) : 145-54.

Tiflova OA, Leonov PG, Karbysheva EA, Shakhnabatian IG, 1997 Sept-Oct. **Effects of He-Ne laser irradiation on plasmid transformation of Escherichia coli bacteria**. Mikrobiologiya, 66(5) : 640-3

Titler TA, 1991. **Physics for scientist and engineer**. New York : Worth Publisher.

Tzung TY, Runger TM, 1998 Jun. **Assessment of DNA damage induced by broadband and narrowband UV-B in cultured lymphoblasts and keratinocyte using the comet assay**. Photochem-Photobiol-B 67(6) : 647-50.

Vacca RA, Moro L, Petragallo VA, Greco M, Fontana F, Pssarella S, 1997 Dec. **The irradiation of hepatocytes with He-Ne laser cause increase of cytosolic free calsium concentration and an increase of cell membrane potential, correlated with it, both increases taking place in oscillatory manner**. Biochem-Mol-Biol-Int. 43(5) : 1005-14

Vink AA, Shreedhar V, Roza L, Krutmann L, Kripke ML, 1998 Jul. **Cellular target of ultraviolet-B-induced DNA damage resulting in local suppression of contact hypersensitivity**. J-Photochem-Photobiol-B 44(2) : 107-11.

Watson JD, Crick F, 1953 April. **A structure for deoxyribose nucleic acids**. Nature magazine.

Weissbluth M, 1978. **Atoms and molecules**. Tokyo : Academic Press, Inc, p 631.



Whitten KW, Davis RE, Peck ML, 1996. **General chemistry with qualitative analysis, fifth edition.** Tokyo : Saunders college publishing, pp 210-218, 244-246, 444-445, 503.

Wollman Y, Rochkind S, 1998 Jul. **In vitro cellular processes sprouting in cortex microexplants of adult rat brains induced by low power laser irradiation.** Neurol-Res 20(5) : 470-2.

Yasui A, Mc Cready SJ, 1998 Apr. **Alternative repair pathway for UV induced DNA damage.** Bioessays 20(4) : 291-7.

Yatim W, 1996. **Biology modern, biology sel.** Bandung : Penerbit "Tarsito".

Yusel YH, Gupta N, Kalichman MW, Mizisin AP, Hare W, de Souza Lima M, Zangwill L, Weinreb RN, 1998 Apr. **Relationship of optic disc topography to optic nerve fiber number in glaucoma.** Arch-Ophthalmol 116(4) : 493 - 7.



Lampiran 1 Eksitasi molekul fragmen DNA 1784 pb karena pemaparan foton laser He-Ne

Molekul DNA (deoxyribonucleid acid), seperti halnya molekul dye (di subbab 2.1 pada halaman 9) merupakan molekul organik yang berantai sejumlah molekul karbon. Menghitung panjang fragmen DNA 1784 pb (pasang basa) adalah sebagai berikut. Martin et al.(1985) menjelaskan bahwa antara pasangan basa dengan pasangan basa lainnya yang berdekatan berjarak 3,4 Å. Oleh sebab itu fragmen DNA 1784 pb panjangnya adalah $L = (1784 - 1) \times 3,4 \text{ Å} = 0,60622 \times 10^{-6} \text{ m}$. Tingkat energi elektron dalam DNA adalah :

$$E_n = \frac{\hbar^2 \pi^2}{2mL^2} n^2$$

dengan L adalah $0,60622 \times 10^{-6} \text{ m}$, $\hbar = 1,05 \times 10^{-34} \text{ Js}$, $m = 9,11 \times 10^{-31} \text{ kg}$, $\pi = 3,14$

jadi :

$$E_n = \{(1,623412932 \times 10^{-25} \text{ J})\} n^2 \quad \text{untuk } n = 1, 2, 3, \dots$$

atau

$$E_n = (1,014633412932 \times 10^{-6} n^2) \text{ eV}$$

Oleh sebab itu untuk fragmen DNA 1784 pb dengan urutan basa tertentu tersebut mempunyai tingkatan energi elektron (dengan memasukkan $n = 1, 2, 3, \dots$) adalah

$$E_1 = 1,623412932 \times 10^{-25} \text{ J}$$

$$E_2 = 6,493651728 \times 10^{-25} \text{ J}$$

$$E_3 = 14,610716388 \times 10^{-25} \text{ J} \dots \dots \dots \text{ dan seterusnya}$$

Lampiran 1 (lanjutan)

Andaikan terjadi eksitasi molekul fragmen DNA tersebut karena terpapar foton laser He-Ne sehingga elektron di tingkat energi paling dasar tereksitasi ke tingkat energi n , maka

$$0,03 \times 10^{-17} \text{ J} = (n^2 - 1) \times 0,167 \times 10^{-25} \text{ J}$$

$$n = 16722,4615$$

karena n bukan merupakan bilangan bulat positif maka ketika pemaparan foton laser He-Ne pada fragmen DNA 1784 pb tidak terjadi peristiwa eksitasi pada molekul fragmen DNA tersebut.

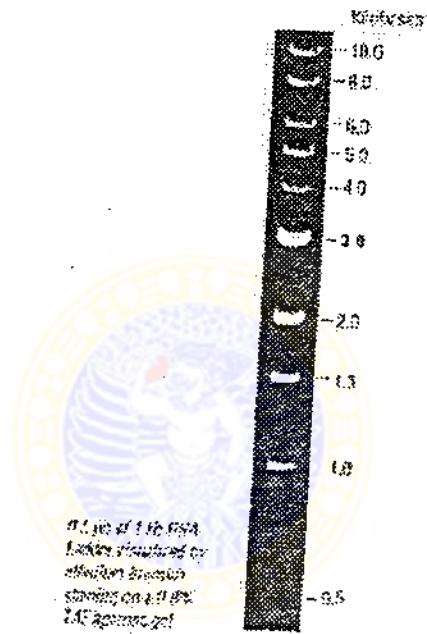


Lampiran 2

Data DNA marker berasal dari New England BioLabs Inc.

1 kb DNA Ladder

#N3232S 100 µg \$55
#N3232L 500 µg \$220



Lampiran 3 Jumlah seluruh pasang basa yang terpapar

Bila diperhatikan Gambar 2.9 atau 2.10 maka *nucleotide* mengandung atom-atom P, O, C, H dan N. *Nucleotide* yang berisi basa *thymine* (T) dan *nucleotide* yang berisi basa *adenine* (A) mengandung atom-atom yang seluruh berat atomnya 603, sedangkan *nucleotide* yang berisi basa *cytosine* (C) dan *nucleotide* yang berisi basa *guanine* (G) mengandung atom-atom yang seluruh berat atomnya 660.

Penggandaan target DNA lokus gen glukamilase dengan alat PCR (fragmen DNA 1784 pb) mengacu pada urutan *nucleotide* gen *GLU1 Saccharomycopsis fibuligera* HUT 7212 (Gambar 2.25). Berdasarkan hal tersebut maka fragmen DNA 178 pb mengandung pasangan basa A - T sejumlah 1109 buah dan mengandung pasangan basa C - G sejumlah 675 buah.

Fragmen DNA 1784 pb tersebut mempunyai atom-atom yang seluruh berat atomnya

$$603 \times 1109 + 660 \times 675 = 1114227$$

Bila diperhatikan tulisan pada anak Subbab 4.6.4 maka seluruh fragmen DNA 1784 pb yang terpapar cahaya laser He-Ne bervolume 100 μl dengan 200 ng/ μl . Jadi seluruh fragmen DNA 1784 pb yang terpapar adalah 20.000 ng = 2×10^{-5} g dan jumlah fragmen tersebut adalah

$$\frac{2 \times 10^{-5}}{1114227} \times 6,02 \times 10^{23} = 10,80569758 \times 10^{12}$$

Tiap fragmen DNA yang terpapar terdiri dari 1784 pb (pasang basa), jadi seluruh fragmen DNA tersebut mengandung pasangan basa sebanyak

$$10,80569758 \times 10^{12} \times 1784 = 19,27736448 \times 10^{15} \text{ pasang basa}$$

