

# MAKALAH BIOKIMIA II

## DNA REKOMBINAN DALAM BIDANG KESEHATAN (PEMBUATAN INSULIN)



Disusun Oleh:

KELOMPOK 13

Riza Gustia	(A1C109020)
Ica Hardiyanti	(A1C109021)
Slamat	(A1C109019)

Dosen Pengampu : *Dra. M. Dwi Wiwik Ernawati, M.Kes*

PENDIDIKAN KIMIA  
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN  
UNIVERSITAS JAMBI

2012

## **BAB II**

### **PEMBAHASAN**

#### **A. Diabetes Mellitus**

Penyakit diabetes mellitus (DM)-yang dikenal masyarakat sebagai penyakit gula atau kencing manis, terjadi pada seseorang yang mengalami peningkatan kadar gula (glukosa) dalam darah akibat kekurangan insulin atau reseptor insulin tidak berfungsi baik.

Diabetes yang timbul akibat kekurangan insulin disebut DM tipe 1 atau Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM). Sedang diabetes karena insulin tidak berfungsi dengan baik disebut DM tipe 2 atau Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM).

Insulin adalah hormon yang diproduksi sel beta di pankreas, sebuah kelenjar yang terletak di belakang lambung, yang berfungsi mengatur metabolisme glukosa menjadi energi serta mengubah kelebihan glukosa menjadi glikogen yang disimpan di dalam hati dan otot.

Tidak keluarnya insulin dari kelenjar pankreas penderita DM tipe 1 bisa disebabkan oleh reaksi autoimun berupa serangan antibodi terhadap sel beta pankreas.

Pada penderita DM tipe 2, insulin yang ada tidak bekerja dengan baik karena reseptor insulin pada sel berkurang atau berubah struktur sehingga hanya sedikit glukosa yang berhasil masuk sel.

Akibatnya, sel mengalami kekurangan glukosa, di sisi lain glukosa menumpuk dalam darah. Kondisi ini dalam jangka panjang akan merusak pembuluh darah dan menimbulkan berbagai komplikasi. Bagi penderita Diabetes Mellitus yang sudah bertahun-tahun minum obat modern seringkali mengalami efek yang negatif untuk organ tubuh lain.

#### **Gejala Penderita Diabetes Mellitus**

Tiga gejala klasik yang dialami penderita diabetes. Yaitu:

- banyak minum,
- banyak kencing,
- berat badan turun.

Pada awalnya, kadang-kadang berat badan penderita diabetes naik. Penyebabnya, kadar gula tinggi dalam tubuh. Maka perlu waspada apabila keinginan minum kita terlalu berlebihan dan juga merasa ingin makan terus. Berat badan yang pada awalnya terus melejit naik lalu tiba-tiba turun terus tanpa diet. Tetangga saya ibu Ida juga tak pernah menyadari kalau menderita diabet ketika badannya yang gemuk tiba-tiba terus menyusut tanpa

dikehendaki. Gejala lain, adalah gangguan saraf tepi berupa kesemutan terutama di malam hari, gangguan penglihatan, gatal di daerah kemaluan atau lipatan kulit, bisul atau luka yang lama sembuh, gangguan ereksi pada pria dan keputihan pada perempuan.

### **Gejala:**

Pada tahap awal gejala umumnya ringan sehingga tidak dirasakan, baru diketahui sesudah adanya pemeriksaan laboratorium.

Pada tahap lanjut gejala yang muncul antara lain :

- Rasa haus
- Banyak kencing
- Berat badan turun
- Rasa lapar
- Badan lemas
- Rasa gatal
- Kesemutan
- Mata kabur
- Kulit Kering
- Gairah sex lemah

### **Komplikasi:**

- Penglihatan kabur
- Penyakit jantung
- Penyakit ginjal
- Gangguan kulit dan syaraf
- Pembusukan
- Gairah sex menurun

Jika tidak tepat ditangani, dalam jangka panjang penyakit diabetes bisa menimbulkan berbagai komplikasi. Maka bagi penderita diabet jangan sampai lengah untuk selalu mengukur kadar gula darahnya, baik ke laboratorium atau gunakan alat sendiri. Bila tidak waspada maka bisa berakibat pada gangguan pembuluh darah, antara lain :

- gangguan pembuluh darah otak (stroke),
- pembuluh darah mata (gangguan penglihatan),

- pembuluh darah jantung (penyakit jantung koroner),
- pembuluh darah ginjal (gagal ginjal), serta
- pembuluh darah kaki (luka yang sukar sembuh/gangren).

Penderita juga rentan infeksi, mudah terkena infeksi paru, gigi, dan gusi serta saluran kemih.

## B. Sejarah Insulin



*Bakteri Gram negatif, Escherichia coli, penghuni alami saluran pencernaan manusia*

Insulin pertama kali di ekstraksi dari jaringan pankreas anjing pada tahun 1921 oleh para ahli fisiologi asal Kanada Sir Frederick Grant Banting dan Charles Hebert Best serta ahli fisiologi asal Inggris John James Richard Macleod. Seorang ahli biokimia James Bertram Collip kemudian memproduksi dengan tingkat kemurnian yang cukup baik untuk digunakan sebagai obat pada manusia. Pada tahun 1965 insulin manusia telah berhasil disintesis secara kimia. Insulin merupakan protein manusia pertama yang disintesis secara kimia. Secara tradisional, insulin untuk pengobatan pada manusia diisolasi dari pankreas sapi atau babi. Walaupun insulin hewan secara umum cukup memuaskan tetapi untuk penggunaan pada manusia dapat menimbulkan dua masalah. Pertama, adanya perbedaan kecil dalam asam amino penyusunnya yang dapat menimbulkan efek samping berupa alergi pada beberapa penderita. Kedua, prosedur pemurnian sulit dan cemaran berbahaya asal hewan tidak selalu dapat dihilangkan secara sempurna. Pada tahun 1981 telah terjadi perbaikan secara berarti cara produksi insulin melalui rekayasa genetika. Insulin yang diperoleh dengan cara ini mempunyai struktur mirip dengan insulin manusia. Melalui teknologi DNA rekombinan, insulin diproduksi menggunakan sel mikroba yang tidak patogen. Karena kedua hal tersebut di atas, insulin hasil rekayasa genetika ini mempunyai efek samping yang relatif sangat

rendah dibandingkan dengan insulin yang diperoleh dari ekstrak pankreas hewan, tidak menimbulkan efek alergi serta tidak mengandung kontaminan berbahaya.

*Perbedaan susunan asam amino pada insulin manusia, babi, dan sapi.*

Spesies	A8	A10	B28	B29	B30
Manusia	Thr	Ile	Pro	Lys	Thr
Babi	Thr	Ile	Pro	Lys	Ala
Sapi	Ala	Val	Pro	Lys	Ala

Insulin manusia dan insulin babi hanya beda 1 asam amino yaitu pada B30, sedangkan insulin manusia dan insulin sapi beda 3 asam amino yaitu pada A8, A10, B30, sehingga pemakaian insulin babi kurang imunogenik dibandingkan insulin sapi. Tapi masalahnya, 1 babi yang diekstraksi insulinnya hanya cukup untuk 1 orang selama 3 hari padahal saat ini ada ± 60 juta orang di dunia yang menderita diabetes tergantung insulin dan meningkat 5-6 % pertahunnya. Maka dari itu sekarang banyak dikembangkan teknologi rekombinan untuk mendapatkan insulin.

Faktor-faktor ini menyebabkan peneliti mempertimbangkan untuk membuat Humulin dengan memasukkan gen insulin ke dalam vektor yang cocok, yaitu sel bakteri E. coli, untuk memproduksi insulin yang secara kimia identik dan dapat secara alami diproduksi. Hal ini telah dicapai dengan menggunakan teknologi DNA rekombinan

Gen insulin manusia dari pulau Langerhans diambil, kemudian disambungkan ke dalam plasmid bakteri, membentuk kimera (DNA rekombinasi). Kimera itu dimasukkan ke dalam sel target E.coli. bakteri E.coli ini dikultur, untuk dikembangkan.

Karakteristik bakteri yang menjadi organisme pilihan untuk memproduksi insulin memiliki keunggulan-keunggulan sebagai berikut:

- ❖ Memiliki rentang umur pendek
- ❖ Jumlah generasi yang banyak
- ❖ Susunan genetik bakteri yang lebih mudah dimodifikasi
- ❖ Lingkungan luar bakteri dapat dengan mudah dimodifikasi untuk mempengaruhi ekspresi gen.
- ❖ Menghasilkan produk, hampir mendekati yang kita inginkan (menyerupai insulin yang dihasilkan sel β-pankreas)

❖ Lebih ekonomis

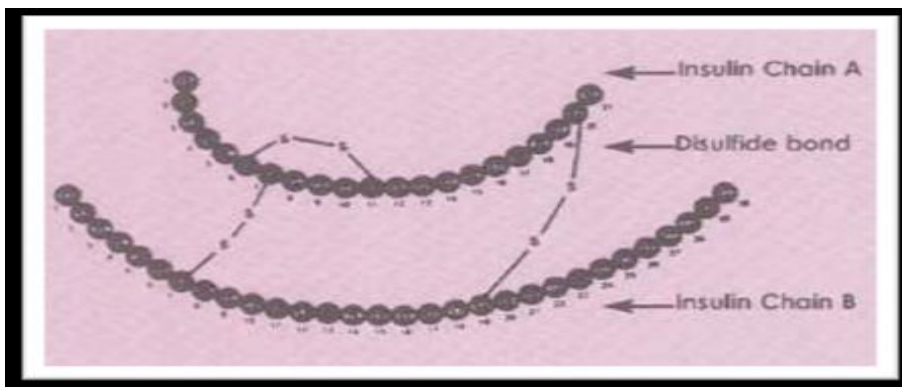
Pada proses penyisipan gen diperlukan tiga faktor utama yaitu:

1. Vektor, yaitu pembawa gen asing yang akan disisikan, biasanya berupa plasmid, yaitu lingkaran kecil DNA yang terdapat pada bakteri. Plasmid diambil dari bakteri dan disisipi dengan gen asing.
2. Bakteri, berperan dalam memperbanyak plasmid. Plasmid di dalam tubuh bakteri akan mengalami replikasi atau memperbanyak diri, makin banyak plasmid yang direplikasi makin banyak pula gen asing yang dicopy sehingga terjadi cloning gen.
3. Enzim, berperan untuk memotong dan menyambung plasmid. Enzim ini disebut enzim endonuklease restriksi, enzim endonuklease restriksi yaitu enzim endonuklease yang dapat memotong DNA pada posisi dengan urutan basa nitrogen tertentu.

### C. Struktur Insulin

Secara kimia, insulin adalah protein kecil sederhana yang terdiri dari 51 asam amino, 30 di antaranya merupakan satu rantai polipeptida, dan 21 lainnya yang membentuk rantai kedua. Kedua rantai dihubungkan oleh ikatan disulfida.

Kode genetik untuk insulin ditemukan dalam DNA di bagian atas lengan pendek dari kromosom kesebelas yang berisi 153 basa nitrogen (63 dalam rantai A dan 90 dalam rantai B). DNA yang membentuk kromosom, terdiri dari dua heliks terjalin yang dibentuk dari rantai nukleotida, masing-masing terdiri dari gula deoksiribosa, fosfat dan nitrogen. Ada empat basa nitrogen yang berbeda yaitu adenin, timin, sitosin dan guanin. Sintesis protein tertentu seperti insulin ditentukan oleh urutan dasar tersebut yang diulang.



Insulin adalah suatu hormon polipeptida yang diproduksi dalam sel-sel  $\beta$  kelenjar Langerhaens pankreas. Insulin berperan penting dalam regulasi kadar gula darah (kadar gula darah dijaga 3,5-8,0 mmol/liter). Hormon insulin yang diproduksi oleh tubuh kita dikenal sebagai sebutan insulin endogen. Namun, ketika kelenjar pankreas mengalami gangguan

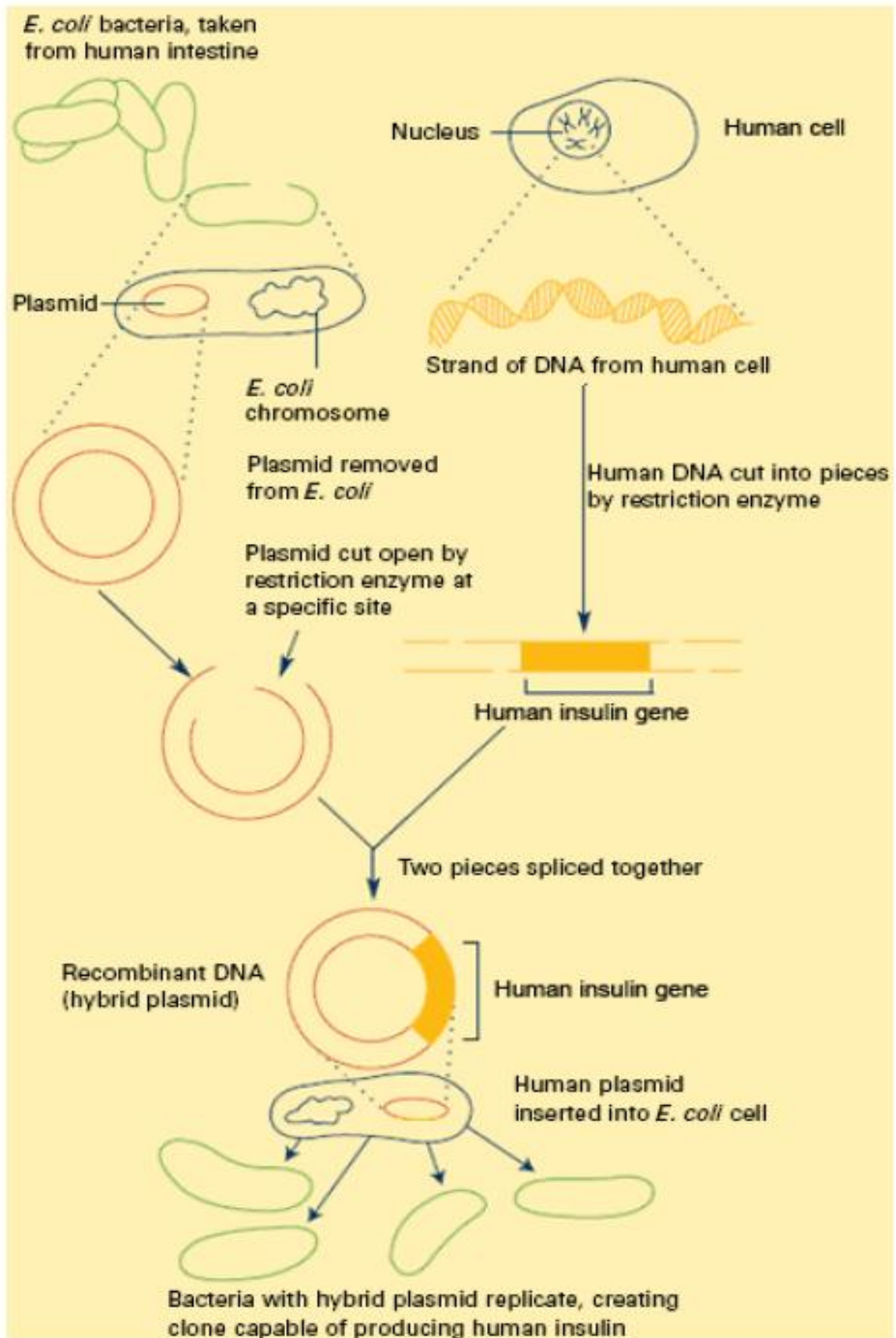
sekresi guna memproduksi hormon insulin, disaat inilah tubuh membutuhkan hormon insulin dari luar tubuh, dapat berupa obat buatan manusia yang dikenal sebagai sebutan insulin eksogen. Kekurangan insulin dapat menyebabkan penyakit seperti diabetes melitus tergantung insulin (diabetes tipe 1). Insulin terdiri dari 51 asam amino. Molekul insulin disusun oleh 2 rantai polipeptida A dan B yang dihubungkan dengan ikatan disulfida. Rantai A terdiri dari 21 asam amino dan rantai B terdiri dari 30 asam amino.

#### **D. Proses Pembuatan Insulin**

Proses pembuatan insulin dengan teknik DNA rekombinan adalah sebagai berikut:

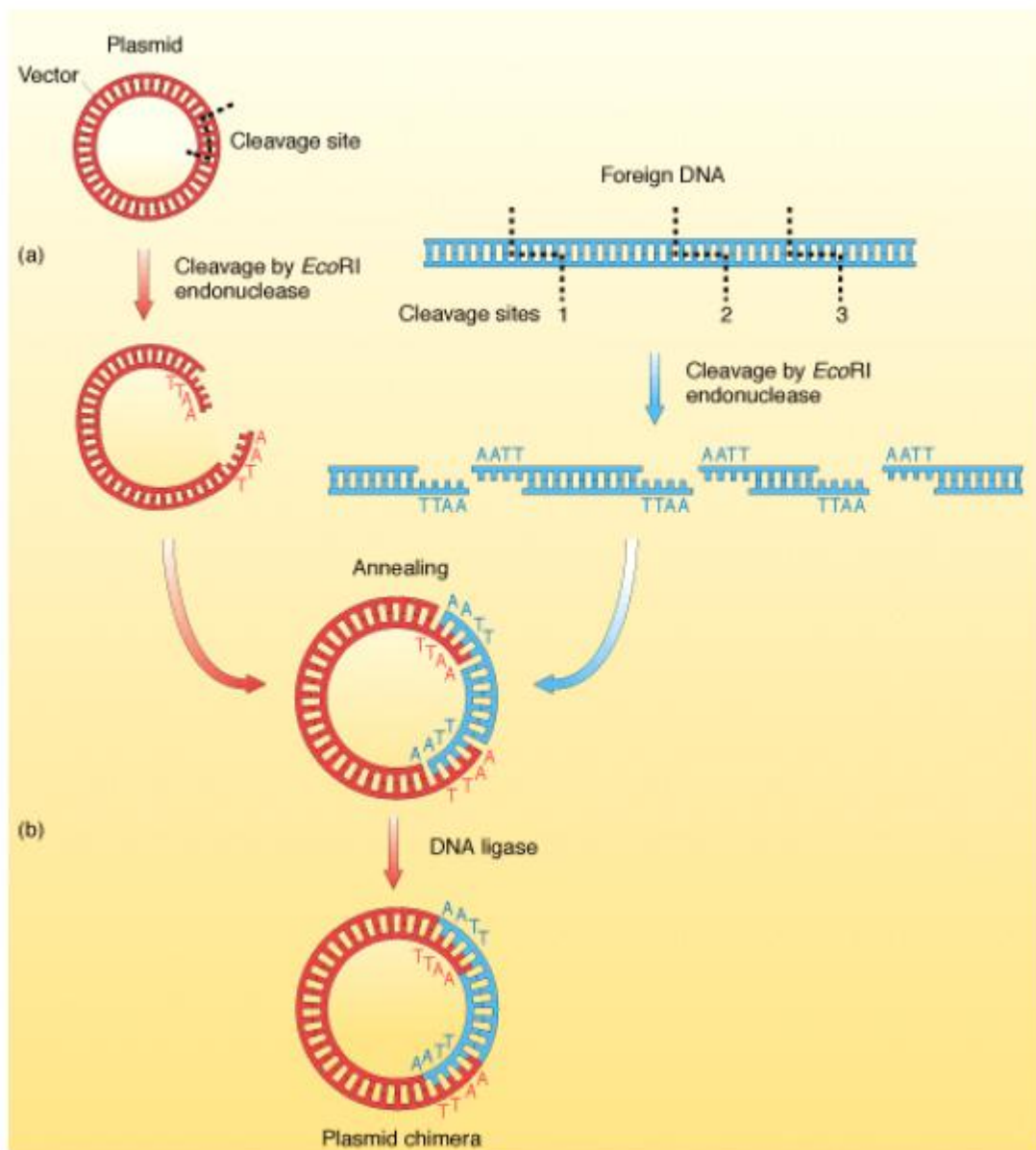
- 1) Mengidentifikasi dan mengisolasi gen penghasil insulin dari sel pancreas manusia:
  - a) Mula-mula mRNA yang telah disalin dari gen penghasil insulin diekstrak dari sel pancreas. Kemudian enzim transcriptase ditambahkan pada mRNA bersamaan dengan nukleotida penyusun DNA.
  - b) Enzim ini menggunakan mRNA sebagai cetakan untuk membentuk DNA berantai tunggal.
  - c) DNA ini kemudian dilepaskan dari mRNA.
  - d) Enzim DNA polimerase digunakan untuk melengkapi DNA rantai tunggal menjadi rantai ganda, disebut DNA komplementer (c- DNA), yang merupakan gen penghasil insulin.
- 2) Melepaskan salinan gen penghasil insulin tersebut dengan cara memotong kromosom secara khusus menggunakan enzim restriksi.
- 3) Mengekstrak plasmid dari sel bakteri, kemudian membuka plasmid dari sel bakteri dengan menggunakan enzim restriksi lain. Sementara itu, di dalam serangkaian tabung reaksi atau cawan petri, gen penghasil insulin manusia (dalam bentuk c- DNA disiapkan untuk dipasangkan pada plasmid yang terbuka tersebut.
- 4) Memasang gen penghasil insulin kedalam cincin plasmid. Mula-mula ikatan yang terjadi masih lemah, kemudian enzim DNA ligase memperkuat ikatan ini sehingga dihasilkan molekul DNA rekombinan/plasmid rekombinan yang bagus.
- 5) Memasukkan plasmid rekombinan kedalam bakteri E.coli. Di dalam sel bakteri ini plasmid mengadakan replikasi
- 6) Mengkultur bakteri E.coli yang akan berkembang biak dengan cepat menghasilkan klon-klon bakteri yang mengandung plasmid rekombinan penghasil insulin. Melalui rekayasa genetika dapat dihasilkan E.coli yang merupakan penghasil insulin dalam jumlah banyak dan dalam waktu yang singkat.



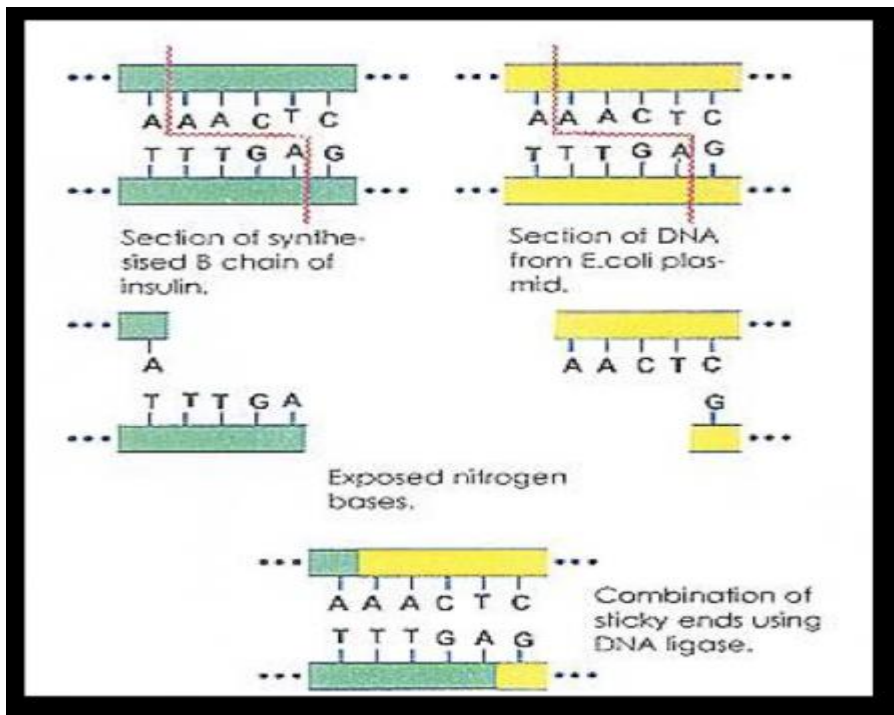




*Escherichia coli* (*E. coli*), penghuni saluran pencernaan manusia, adalah ‘pabrik’ yang digunakan dalam rekayasa genetika insulin. Ketika bakteri bereproduksi, gen insulin direplikasi bersama dengan plasmid. *E. coli* seketika memproduksi enzim yang dengan cepat mendegradasi protein asing seperti insulin. Hal tersebut dapat dicegah dengan cara menggunakan *E. coli* strain mutan yang sedikit mengandung enzim ini. Pada *E. coli*,  $\beta$ -galaktosidase adalah enzim yang mengontrol transkripsi gen. Untuk membuat bakteri memproduksi insulin, gen insulin perlu terikat pada enzim ini.



Enzim restriksi secara alami diproduksi oleh bakteri. Enzim restriksi bertindak seperti pisau bedah biologi, hanya mengenali rangkaian nukleotida tertentu, misal salah satunya rangkaian kode untuk insulin. Hal tersebut memungkinkan peneliti untuk memutuskan pasangan basa nitrogen tertentu dan menghapus bagian DNA yang berisi kode genetik dari kromosom sebuah organisme sehingga dapat memproduksi insulin. Sedangkan DNA ligase adalah suatu enzim yang berfungsi sebagai perekat genetik dan pengelas ujung nukleotida.

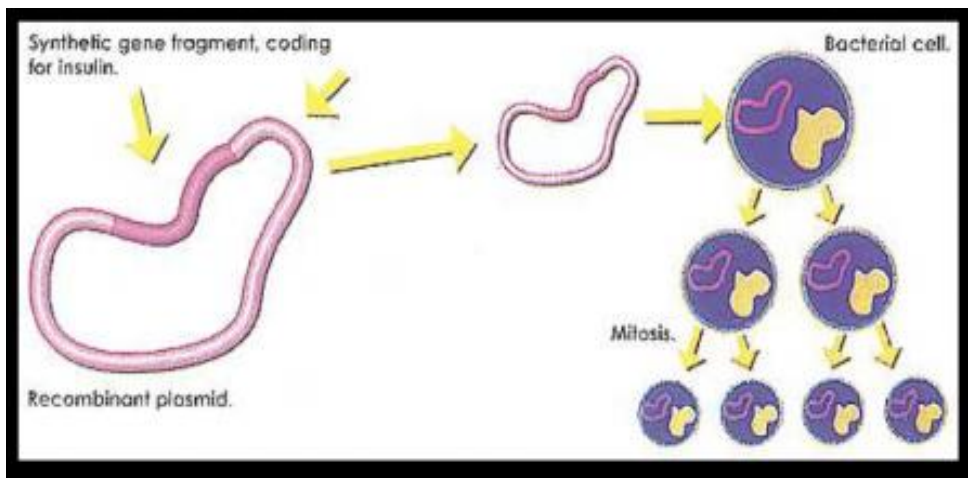


Langkah pertama pembuatan humulin adalah mensintesis rantai DNA yang membawa sekuens nukleotida spesifik yang sesuai karakteristik rantai polipeptida A dan B dari insulin. Urutan DNA yang diperlukan dapat ditentukan karena komposisi asam amino dari kedua rantai telah dipetakan. Enam puluh tiga nukleotida yang diperlukan untuk mensintesis rantai A dan sembilan puluh untuk rantai B, ditambah kodon pada akhir setiap rantai yang menandakan pengakhiran sintesis protein.

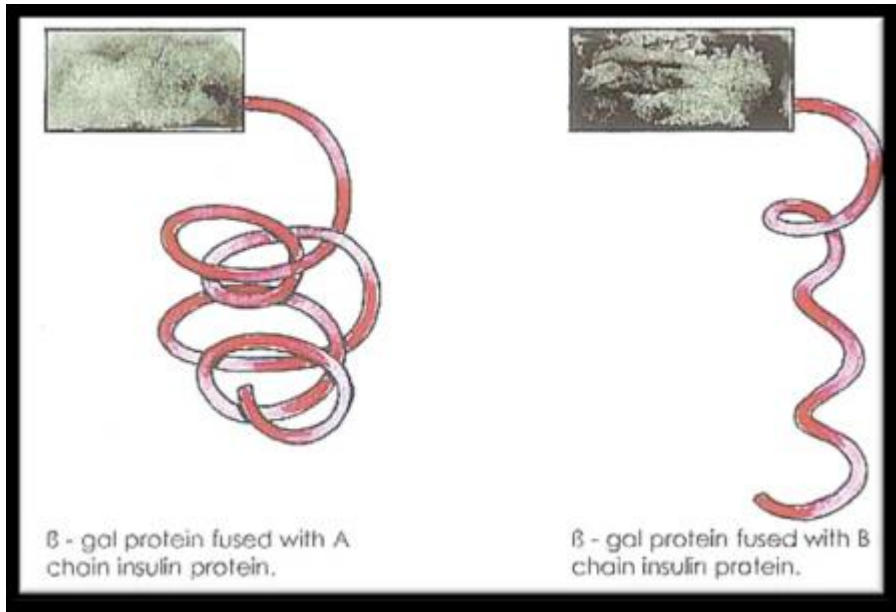
Antikodon menggabungkan asam amino, metionin, kemudian ditempatkan di setiap awal rantai yang memungkinkan pemindahan protein insulin dari asam amino sel bakteri itu. 'Gen' sintetik rantai A dan B kemudian secara terpisah dimasukkan ke dalam gen untuk enzim bakteri, B-galaktosidase, yang dibawa dalam plasmid vektor tersebut. Pada tahap ini, sangat penting untuk memastikan bahwa kodon gen sintetik kompatibel dengan B-galaktosidase. Plasmid rekombinan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam sel E. coli.



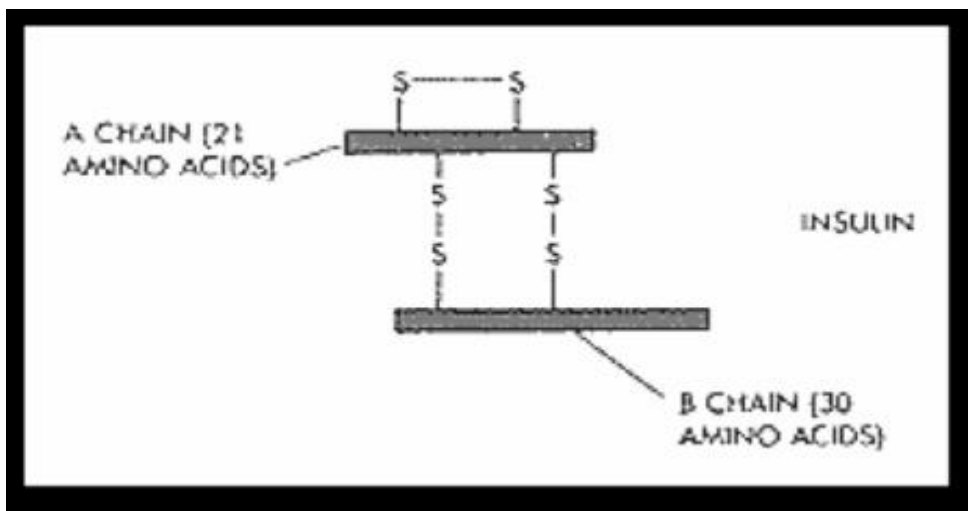
Praktis penggunaan teknologi DNA rekombinan dalam sintesis insulin manusia membutuhkan jutaan salinan plasmid bakteri yang telah digabungkan dengan gen insulin dalam rangka untuk menghasilkan insulin. Gen insulin diekspresikan bersama dengan sel mereplikasi galaktosidase-B di dalam sel yang sedang menjalani mitosis.



Protein yang terbentuk, sebagian terdiri dari B-galaktosidase, bergabung ke salah satu rantai insulin A atau B. Rantai insulin A dan rantai B kemudian diekstraksi dari fragmen B-galaktosidase dan dimurnikan.



Kedua rantai dicampur dan dihubungkan kembali dalam reaksi yang membentuk jembatan silang disulfida, menghasilkan Humulin murni (insulin manusia sintetis).



### E. Implikasi Biologis Dari Rekayasa Genetika Humulin Rekombinan

Humulin merupakan protein hewani yang dibuat dari bakteri sedemikian rupa sehingga strukturnya benar-benar identik dengan molekul alami. Hal ini akan mengurangi kemungkinan komplikasi yang disebabkan produksi antibodi oleh tubuh manusia. Dalam studi kimia dan farmakologi, insulin rekombinan DNA manusia yang diproduksi secara komersil telah terbukti bisa dibedakan dari insulin pankreas manusia.

Awalnya, kesulitan utama yang dihadapi adalah kontaminasi produk akhir oleh sel inang, sehingga meningkatkan resiko kontaminasi dalam kaldu fermentasi. Bahaya ini diatasi dengan ditemukannya proses pemurnian. Ketika dilakukan tes pada produk akhir insulin, termasuk teknik terbaik *radio-immuno assay*, tidak ada 'kotoran' yang terdeteksi.

Seluruh prosedur, sekarang dilakukan dengan menggunakan sel ragi sebagai media pertumbuhan, karena sel ragi dapat menghasilkan sebuah molekul insulin manusia yang hampir lengkap dengan struktur tiga dimensi yang sempurna. Ini meminimalkan kebutuhan untuk prosedur pemurnian kompleks dan mahal.

#### **F. Pemberian Insulin Pada Penderita Diabetes Millitus**

Pemberian injeksi insulin secara teratur dalam meningkatkan kadar insulin dalam darah penderita dapat meminimumkan komplikasi. Pengobatan ini hanya mungkin dilaksanakan bila insulin tersedia dalam jumlah besar dengan kemurnian dan mutu yang baik. Pemberian insulin kepada penderita diabetes hanya bisa dilakukan dengan cara suntikan, jika diberikan melalui oral insulin akan rusak didalam lambung. Setelah disuntikan, insulin akan diserap kedalam aliran darah dan dibawa keseluruh tubuh. Disini insulin akan bekerja menormalkan kadar gula drah (blood glucose) dan merubah glucose menjadi energi.

Perlu diperhatikan daerah mana saja yang dapat dijadikan tempat menyuntikan insulin. Bila kadar glukosa darah tinggi, sebaiknya disuntikan di daerah perut dimana penyerapan akan lebih cepat. Namun bila kondisi kadar glukosa pada darah rendah, hindarilah penyuntikan pada perut. Secara urutan, area proses penyerapan paling cepat adalah perut, lengan atas dan paha. Insulin akan lebih cepat diserap apabila daerah suntikan digerakkan. Penyuntikan insulin pada satu daerah yang sam dapt mengurangi variasi penyrapan. Penyuntikan insulin selalu pada satu daerah yang sama dapat merangasangterjadinya perlemakan dan menyebabkan gangguan penyerapan insulin. Daerah suntikan sebaiknya berjarak 1 inchi (+2,5 cm) dari daerah sebelumnya. Lakukanlah rotasi di dalam satu daerah selam satu minggu, lalu baru pindah ke daerah yang lain.

Kerja insulin dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya:

- a) Dosis. Semakin tinggi dosisnya maka semakin cepat reaksinya
- b) Tempat injeksi. Pada umumnya insulin diberiakn dengan injeksi menembus kulit. Pada pemberian intravena aksinya ceapt, pada transdermal atau secar subkutan maka pada otot terjadi degredasi insulin 20-25 %. Makanya harus diperhitungkan untuk mendapatkandosis yang tepat. Kebanyakan insulin diinjeksikan pada perut (interperional) .Jarum untuk injeksi insulin kecil sekali dan pendek (0,5-1,0 cm). Dapat juga menggunakan implant pada dada yang dapat mensuplai insulin sedikit demi sedikit.

- c) Kehadiran antibodi insulin. Hal ini terutama pada penggunaan hewan sebagai insulin. Jika digunakan insulin dari luar dikhawatirkan terjadi reaksi antigen antibodi maupun kerusakan lain, kecuali pada penderita autoimun.
- d) Aktivitas fisik. Semakin banyak aktivitas fisik yang kita lakukan maka kita perlu energi (dari glukosa) yang semakin besar sehingga tidak perlu aksi insulin yang ekstra untuk mengubah glukosa menjadi glikogen (insulin yang diperlukan semakin sedikit).