

PENUNTUN PRAKTIKUM INSTRUMENTASI BIOTEKNOLOGI (IBK511)



TIM PENGAJAR:

Seprianto, M.Si

Dr. Aroem Naroeni, DEA



**FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ESA UNGGUL
2017**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT, atas berkat dan rahmatNya sehingga tim penyusun dapat menyelesaikan **“Penuntun Praktikum Instrumentasi Bioteknologi”**.

Panduan ini disusun sebagai penuntun bagi mahasiswa/i program studi Bioteknologi untuk matakuliah Instrumentasi Bioteknologi. Diharapkan dengan adanya buku panduan ini, mahasiswa akan dapat belajar mandiri dan terstruktur sehingga hasil yang diperoleh lebih optimal dalam penguasaan isi materi. Buku panduan ini bermanfaat bagi mahasiswa/i baik dalam kegiatan pembelajaran di perkuliahan maupun dalam melaksanakan praktikum di laboratorium.

Kami menyadari bahwa isi dari buku panduan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan dalam hal penyempurnaan pada masa yang akan datang.

Jakarta, 15 April 2017

Tim Penyusun

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Bioteknologi secara sederhana sudah dikenal oleh manusia sejak ribuan tahun yang lalu. Pada masa ini, bioteknologi berkembang sangat pesat, terutama di negara-negara maju. Kemajuan ini ditandai dengan ditemukannya berbagai macam teknologi semisal rekayasa genetika, kultur jaringan, rekombinan DNA, pengembangbiakan sel induk, kloning, dan lain-lain. Bioteknologi memiliki laboratorium yang menjadi tempat dimana kegiatan penelitian untuk mewujudkan praktek keilmuan. Dalam laboratorium tersebut terdapat berbagai macam alat yang memiliki fungsi cara penggunaan yang beranekaragam. Pada dasarnya setiap alat memiliki nama yang menunjukkan kegunaan alat, prinsip kerja atau proses yang berlangsung ketika alat digunakan. Beberapa kegunaan alat dapat dikenali berdasarkan namanya. Penamaan alat-alat yang berfungsi mengukur biasanya diakhiri dengan kata meter seperti termometer, hygrometer dan spektrofotometer, dll. (Moningka, 2008)

Dalam rangka mewujudkan visi dan misi Universitas Esa Unggul tentu didukung dengan sarana dan prasarana yang mendukung melalui penataan dan kelengkapan sarana dan prasarana laboratorium terutama pada program studi Bioteknologi yang dasarnya tidak terlepas dengan laboratorium. Oleh sebab itu, pendirian laboratorium bioteknologi yang menunjang kegiatan perkuliahan mesti mempunyai kelengkapan alat – alat laboratorium karena merupakan basic dalam melakukan praktikum maupun penelitian yang berbasis laboratorium. Penyelenggaraan praktikum akan dikembangkan untuk mewujudkan kompetensi dasar yang diharapkan dari matakuliah praktikum tersebut yang relevan dengan kompetensi lulusan-lulusan (Program Learning Outcomes) Program Studi Bioteknologi yang telah dirumuskan berdasarkan Kerangka Kualifikasi Nasional Indonesia (KKNI).

Instrumentasi Bioteknologi merupakan mata kuliah yang bertujuan untuk memberikan pemahaman awal kepada mahasiswa tentang alat-alat/ instrument serta metode yang biasa digunakan di dalam laboratorium pada program studi Bioteknologi. Buku panduan ini berisi praktikum teknik instrumentasi yang biasa digunakan dalam laboratorium. Hal ini diberikan karena kemampuan menggunakan alat dan melakukan pekerjaan di dalam laboratorium merupakan skill dasar yang harus dimiliki oleh mahasiswa Bioteknologi. Sehingga nantinya saat melaksanakan penelitian skripsi maupun setelah memasuki dunia kerja, lulusan prodi Bioteknologi akan lebih terampil dalam melakukan perannya di laboratorium. Di dalam buku panduan ini akan diulas topik – topik yang sudah menjadi ketetapan dalam Rencana Pembelajaran Studi (RPS) praktikum bioteknologi. Topik yang diulas merupakan topik awal yang akan menjadi stimulus untuk mahasiswa dalam mendalami kemampuan melakukan pekerjaan di dalam

laboratorium. Semoga ilmu yang sedikit ini memberikan manfaat dan akan terus berguna untuk selanjutnya.

Tujuan dan Manfaat Praktikum

Praktikum ini bertujuan untuk memperkenalkan alat-alat yang ada di laboratorium bioteknologi serta fungsi dan cara penggunaannya kepada mahasiswa sehingga tidak salah dalam penggunaan alat pada praktikum bioteknologi selanjutnya serta membantu dalam proses penelitian.

TATA TERTIB PRAKTIKUM INSTRUMENTASI BIOTEKNOLOGI



A. Ketentuan Sebelum Praktikum

- ✓ Praktikan datang tepat waktu, bagi yang terlambat lebih dari 10 menit tidak diperkenankan mengikuti praktikum pada hari itu.
- ✓ Setiap kali praktikum, praktikan membawa jas lab dan petunjuk praktikum.
- ✓ Sebelum masuk ruang praktikum, praktikan menyerahkan laporan praktikum sementara.

B. Ketentuan Selama Dan Sesudah Praktikum

- ✓ Setelah praktikum, setiap kelompok membereskan semua alat yang dipakai dan mengembalikannya pada laboran sesuai dengan jumlahnya.
- ✓ Setiap praktikan atau kelompok mengganti alat yang rusak atau hilang selama di pakai atau dipinjam sebelum ujian akhir praktikum (UAP).
- ✓ Posttest/pretest di adakan sebelum atau sesudah praktikum
- ✓ Hasil pengamatan selama praktikum dilaporkan segera setelah praktikum selesai hari itu sebagai laporan sementara. Untuk pengamatan yang melibatkan kelompok lain (kolektif)
- ✓ Mahasiswa dilarang membawa makanan atau minuman serta bersenda gurau selama praktikum berlangsung.

C. Laporan Praktikum dan Tugas

- ✓ Laporan praktikum dikerjakan dirumah dan dikumpulkan 1(satu) minggu setelah pengamatan terakhir dilakukan, Di kumpulkan secara kolektif menurut asisten yang membimbing pada saat praktikum
- ✓ Laporan sementara praktikum boleh ditulis tangan dengan syarat tulisan harus rapi, dan asisten berhak mengembalikan laporan tersebut jika laporan dianggap tidak layak untuk dikumpulkan dan dikoreksi.
- ✓ Laporan dan tugas yang diberikan dikumpulkan tepat waktu, keterlambatan dalam mengumpulkan akan dikenai sanksi pengurangan nilai

PERCOBAAN I

TEKNIK DASAR : PIPETTING DAN TIMBANGAN

A. Pendahuluan

Pipetting merupakan salah satu teknik yang menentukan keberhasilan dalam beberapa penelitian yang ada di dalam biologi. Teknik pipetting yang tepat memungkinkan reagen yang digunakan menghasilkan data yang sesuai dengan yang diharapkan. Di dalam laboratorium genetika dan biologi molekuler penggunaan reagen yang digunakan dalam jumlah kecil sehingga penggunaan pipetting menjadi kebutuhan utama. Volume cairan yang digunakan di dalam laboratorium genetika dan biologi molekuler berkisar antara 2µl-1000µl.

Ketepatan dalam pengambilan reagen dengan menggunakan mikropipet yang tepat memungkinkan mendapatkan hasil yang sesuai dan terhindar dari pemborosan reagen yang digunakan. Selain teknik pipetting yang tepat maka sentrifugasi juga menjadi factor yang menentukan keberhasilan penelitian di dalam laboratorium genetika dan biologi molekuler. Sentrifugasi memungkinkan memisahkan komponen yang akan dipisahkan dengan menggunakan kecepatan tertentu dan disesuaikan dengan bahan/reagen/sampel yang akan dipisahkan. Ketidaktepatan pemilihan kecepatan sentrifus menyebabkan tidak terpisahnya bahan yang akan dipisahkan. Keberhasilan sentrifugasi akan ditunjukkan dengan 2 komponen berupa pellet dan supernatant.

B. Tujuan

- ✓ Memahami prinsip dasar dan teknik pipetting dalam mentransfer cairan sesuai dengan yang diharapkan.
- ✓ Memahami teknik pemilihan mikropipet yang digunakan dalam mentransfer cairan dengan ukuran tertentu
- ✓ Memahami teknik penimbangan yang baik
- ✓ Mengurangi presisi dalam penimbangan

C. Alat dan Bahan

1. Mikropipet (2-20 ul, 10-100 ul, 100-1000 ul)
2. Tip (Berbagai Ukuran)
3. Mikrotube (200 ul dan 1.5ml-2ml)
4. Timbangan analitik
5. Tissue
6. beakerglass (50 ml, 100 ml)
7. Kertas label dan Aluminium Foil
8. pipet serologi (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)
9. Balp atau pipet aid

D. Bahan Praktikum

1. Aquades
2. Larutan Viskositas (Minyak)

E. Cara Kerja

1. Teknik Pipetting

- a. Transfer aquades dan Larutan Viskositas di bawah ini dengan menggunakan mikropipet yang telah ditetapkan dan masukkan ke dalam tube yang telah disediakan. Volume aquades yang harus ditransfer adalah sebagai berikut:

Mikropipet

NO	Volume Yang akan di pipet	Ukuran mikropipet yang dipakai
1	1500 μ l	100-1000 μ l
2	550 μ l	100-1000 μ l
3	200 μ l	100-1000 μ l
4	200 μ l	20 – 200 μ l
5	57 μ l	20 – 200 μ l
6	3 μ l	2- 10 μ l

Pipet Serologi (Khusus Aquades)

NO	Volume Yang akan di pipet	Ukuran pipet serologi yang dipakai
1	18 ml
2	10 ml
3	6.5 ml
4	1 ml
5	0.5 ml

- b. Lakukan proses transfer masing-masing volume aquades dan larutan viskositas tersebut diatas sebanyak 3 kali.
c. Timbang aquades yang sudah ditransfer ke dalam tube dan catat hasilnya.

2. Teknik Penimbangan

Cara Kerja

- Sambungkan Aliran listrik terlebih dahulu
- Pastikan timbangan dalam keadaan bersih dan stabil
- Tekan Tombol on/off yang teletak pada sebelah kanan atau kiri timbangan
- Biarkan posisi angka pada display menjadi 0.000
- Jika angka tidak stabil Auto zero kan timbangan dengan menekan tombol zero
- Letakan objek/wadah kosong yang akan ditimbang, kemudian catat hasil pengukurannya.
- Kondisikan timbangan dalam keadaan autozero pada saat objek/wadah masih diatas timbangan.
- timbang kembali objek/ wadah tersebut setelah di isi dengan aquades dan catat hasilnya.
- Angkat objek/wadah tesebut dan kembalikan timbangan dalam keadaan zero (kondisi normal)

- j. Timbang kembali objek/wadah yang telah diisi dengan aquades tadi secara keseluruhan dan catat hasil pengukurannya.
- k. Hitunglah hasil pengukuran berat aquades yang di timbang setelah timbangan dikembalikan pada kondisi normal dan bandingkan hasilnya dengan pengukuran aquades pada kondisi timbangan outozero dengan wadah kosong di atasnya.

1 ml air = 1 gram

F. Data Pengamatan

1. Teknik Pipetting Miropipet (Aquades)



NO	Volume Yang akan di pipet	Ukuran mikropipet	Hasil Penimbangan pada			Rata - rata
			ulangan 1	2	3	
1	1500 µl	100-1000 µl				
2	550 µl	100-1000 µl				
3	200 µl	100-1000 µl				
4	200 µl	20 – 200 µl				
5	57 µl	20 – 200 µl				
6	3 µl	2- 10 µl				

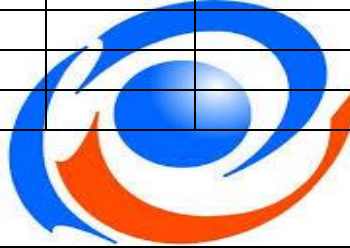
Larutan Viskositas

NO	Volume Yang akan di pipet	Ukuran mikropipet	Hasil Penimbangan pada			Rata - rata
			ulangan 1	2	3	
1	1500 µl	100-1000 µl				
2	550 µl	100-1000 µl				
3	200 µl	100-1000 µl				
4	200 µl	20 – 200 µl				
5	57 µl	20 – 200 µl				
6	3 µl	2- 10 µl				

Pipet Serologi (Aquades)

NO	Volume	Ukuran pipet serologi	Hasil Penimbangan pada			Rata – Rata
			1	2	3	
1	18 ml				
2	10 ml				
3	6.5 ml				
4	1 ml				
5	0.5 ml				

2. Teknik Penimbangan



NO	Volume Yang akan di pipet	Berat tabung kosong			Berat aquades			Rata - rata
		1	2	3	1	2	3	
1	1500 µl							
2	550 µl							
3	200 µl							
4	200 µl							
5	57 µl							
6	3 µl							

G. Bahan Diskusi

1. Apakah ada perbedaan hasil penimbangan volume aquades yang telah ditransfer menggunakan mikropipet? Mengapa demikian?
2. Sebutkan prinsip dasar yang saudara temukan pada praktikum pipetting?
3. Apakah hubungan hasil penimbangan dengan ketepatan dalam pengukuran volume pipetting, Mengapa demikian?
4. Sebutkan prinsip dasar yang saudara temukan pada praktikum timbangan

PERCOBAAN II

PEMBUATAN LARUTAN, HOMOGENITAS DAN SENTRIFUGASI

A. Pendahuluan

Selain teknik pipetting yang tepat maka sentrifugasi juga menjadi faktor yang menentukan keberhasilan penelitian di dalam laboratorium genetika dan biologi molekuler. Sentrifugasi memungkinkan memisahkan komponen yang akan dipisahkan dengan menggunakan kecepatan tertentu dan disesuaikan dengan bahan/reagen/sampel yang akan dipisahkan. Ketidaktepatan pemilihan kecepatan sentrifus menyebabkan tidak terpisahnya bahan yang akan dipisahkan. Keberhasilan sentrifugasi akan ditunjukkan dengan 2 komponen berupa pellet dan supernatant

B. Tujuan

- ✓ Memahami teknik penggunaan dan prinsip kerja sentrifus.
- ✓ Memahami teknik pemilihan kecepatan sentrifus yang tepat dalam memisahkan sampel tertentu
- ✓ Mempelajari Teknik Kerja Vortex mixer
- ✓ Mempelajari tentang pembuatan larutan dengan ketepatan yang baik dan menggunakan glassware

C. Alat Praktikum

1. Sentrifugasi
2. Gelar Ukur
3. Beakerglass
4. Timbangan Analitik
5. magnetik stirer
6. Labu Ukur (100 ml)
7. Micropipet dan Tip
8. Tabung Reaksi
9. Vortek Mixer

D. Bahan Praktikum

1. Aquades
2. NaCl
3. Kopi
4. Teh

E. Cara Kerja

A. Pembuatan Larutan

- 1 Mempelajari macam-macam alat-alat gelas dan penggunaannya
 - ✓ Amati masing-masing alat gelas
 - ✓ Pelajari nama dan kegunaannya masing-masing
 - ✓ Gambar dan catat dalam laporan praktikum
- 2) Pembuatan larutan NaCl 3 % dan NaCl 5 M sebanyak 100 mL
 - ✓ Hitung dengan cermat berat NaCl yang dibutuhkan untuk membuat larutan NaCl 3% dan NaCl 5 M sebanyak 100 mL

- ✓ Timbang NaCl sejumlah yang dibutuhkan dengan menggunakan timbangan analitik (Melakukan SOP penggunaan timbangan analitik)
- ✓ Masukkan sedikit akuades ke dalam beaker glass
- ✓ Tuang NaCl hasil penimbangan ke dalam beaker glass
- ✓ Homogenkan larutan dengan menggunakan magnetik stirer (Melakukan SOP penggunaan magnetik stirer) atau dengan vortek mixer
- ✓ Tambahkan aquades sampai volume mencapai 100 mL dengan menggunakan labu ukur



B. Sentrifugasi

1) Pemisahan bahan terlarut dalam suatu suspensi

- ✓ Ambil sebanyak 1 ml larutan NaCl 3% yang telah anda buat dan masukkan ke dalam *micro tube*
- ✓ Sentrifus dengan kecepatan 8000 g selama 30 detik (**Melakukan SOP penggunaan sentrifugasi**)
- ✓ Mikro tube dikeluarkan dari alat sentrifugator
- ✓ Memisahkan supernatant dari pellet dengan menggunakan mikro pipet (**Melakukan SOP penggunaan Micro pipet**)

2) Teknik Sentrifugasi

- ✓ Ambil 1.5 ml sampel air tersuspensi dan kopi hitam, masukkan ke dalam tube ukuran 2ml (buat 2 kali ulangan)
- ✓ Lakukan penimbangan masing masing mikrotub yang telah berisi sampel untuk memastikan keseimbangan.
- ✓ Letakkan masing – masing mikrotube pada lubang yang ada pada rotor secara berhadapan sesuai dengan berat yang sama/volume yang sama
- ✓ Sentrifugasi masing-masing sampel tersebut dengan menggunakan kecepatan yang berbeda (misal dengan kecepatan 5000 rpm, 6000 \times g dan 10.000 rpm)
- ✓ Amati dan foto larutan sebelum disentrifugasi dan sesudah sentrifugasi
- ✓ Catat volume supernatant yang diperoleh dan berapa kali sentrifugasi yang perlu dilakukan sampai supernatant terbebas dari pellet (bening)

C. Data Pengamatan

Hitunglah nilai konversi rpm ke dalam bentuk rcf

RPM	RCF/xg	Lama sentrifugasi (Menit)	Volume Supernatan (μ L)
5000	5	
.....	6000	3	
10000	1	

Rumus koversi rcm ke rcf

$$g = (1.118 \times 10^{-5}) R S^2$$

Ket:

g : Nilai RCF(time gravity)

R: Diameter rotor (cm)

S: Nilai rpm

Perhitungan



D. Bahan Diskusi

1. Sebutkan prinsip dasar yang saudara temukan dalam praktikum sentrifugasi
2. Bagaimana hasil pengamatan sampel sebelum dan sesudah di sentrifugasi
3. Apakah ada perbedaan hasil supernatan yang didapat dari masing – masing sampel dengan masing-masing nilai rpm dan waktu yang digunakan ?

PERCOBAAN III **TEKNIK STERILISASI**

A. Pendahuluan

Sterilisasi merupakan salah satu teknik yang penting dalam bekerja dalam laboratorium. Dengan sterilisasi, maka kontaminasi dapat dihindari, baik itu kontaminasi agen biologis, bahan kimia, dan lain-lain. Kontaminasi dapat menyebabkan terjadinya positif/negatif palsu yang dapat membuat hasil riset sia-sia dan tersebabnya agen biologis berbahaya seperti mikroorganisme patogen yang dapat membahayakan pekerja di laboratorium.

Sterilisasi adalah salah satu teknik dasar dalam laboratorium kultur jaringan untuk mempersiapkan sampel, alat maupun bahan yang digunakan agar steril atau terbebas dari kontaminan. Teknik sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara diantaranya adalah dengan menggunakan sterilisasi kering dengan menggunakan oven, sterilisasi basah dengan menggunakan autoklaf, sterilisasi dengan menggunakan membrane, sinar UV, dan lain-lain. Pemilihan jenis sterilisasi terutama didasarkan pada komponen yang akan disterilisasi. Komponen alat-alat berbahan kaca dapat disterilisasi dengan menggunakan sterilisasi kering karena alat-alat tersebut tidak akan rusak dengan pemanasan tinggi. Suhu yang dapat digunakan untuk sterilisasi kering adalah suhu 125°C selama 3 jam atau suhu 160°C selama 1 jam. Sedangkan sterilisasi untuk alat non kaca dan bahan yang mudah rusak dengan pemanasan tinggi maka dapat dilakukan dengan menggunakan autoklaf 121 °C, 1Atm selama 15 menit

B. Tujuan

- ✓ Memahami prinsip dasar teknik sterilisasi
- ✓ Menjelaskan macam-macam teknik sterilisasi.
- ✓ Menjelaskan mengenai peralatan yang digunakan laboratorium untuk sterilisasi dan cara-cara merawat alat-alat tersebut.
- ✓ Memahami teknik penggunaan autoklaf dan oven
- ✓ Memahami teknik sterilisasi dengan BSC (Biological Safety Cabinet)

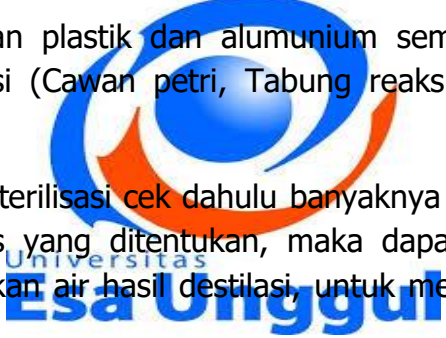
C. Alat dan Bahan

1. Autoklaf
2. Oven
3. BSC
4. Glassware
5. Plastik Tahan Panas
6. Cawan petri
7. Tabung Reaksi
8. Caret Gelang
9. Alumium foil
10. Alkohol 70%

D. Cara Kerja

a. Teknik sterilisasi dengan Autoclaf

Cara Kerja :

- 
- ✓ Bungkus rapat dengan plastik dan alumunium semua peralatan glasware yang akan di strilisasi (Cawan petri, Tabung reaksi, pinset dan peralatan lainnya)
 - ✓ Sebelum melakukan sterilisasi cek dahulu banyaknya air dalam autoklaf. Jika air kurang dari batas yang ditentukan, maka dapat ditambah air sampai batas tersebut. Gunakan air hasil destilasi, untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat.
 - ✓ Masukkan peralatan dan bahan. Jika mensterilisasi botol bertutup ulir, maka tutup harus dikendorkan,
 - ✓ Tutup autoklaf dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada udara yang keluar dari bibir autoklaf. Klep pengaman jangan dikencangkan terlebih dahulu.
 - ✓ Atur timer dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C, kemudian nyalakan autoklaf.
 - ✓ Tunggu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar klep pengaman. Kemudian klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan tunggu sampai selesai. Perhitungan waktu 15' dimulai sejak tekanan mencapai 1 atm.
 - ✓ Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada preisure gauge menunjuk ke angka nol. Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati

Note : Sebelum bekerja semprot tangan terlebih dahulu dengan alkohol 70%

Perawatan Alat:

1. Bersihkan ruang dalam mesin autoclave
2. Bersihkan Filternya
3. Bersihkan pengendali airnya
4. Perbaiki komponen yang rusak
5. Gunakan air murni (aquades) dalam membersihkan dan pengendali air mesin autoclave

b. Sterilisasi kering dengan Oven

Cara Kerja :

1. Bungkus alat-alat gelas dengan menggunakan kertas atau alumunium foil.
2. Atur pengatur suhu oven menjadi 180°C dan alat di sterilkan 2-3 jam.

Perawatan Alat:

1. Rawat motor blower (bagian yang meniup angin panas dalam oven) seperti diolikan secara rutin
2. Letakkan oven di tempat yang memiliki sirkulasi udara agar blower cepat dingin ketika tidak dipakai
3. Pasang oven ke stop kontak dengan voltase yang benar (oven 240V dipasang pada stop kontak yg voltasenya sama)
4. Periksa elemen pemanas oven dengan rutin agar oven dapat bekerja dengan lancar

c. Sterilisasi dengan BSC

Cara Kerja:

1. Sebelum bekerja, pastikan pratikan sudah memakai alat pelindung diri (APD)
2. Nyalaka alat dengan menekan tombol on/off
3. Hidupkan lampu UV selama 2 jam sebelum memulai bekerja
4. Lampu UV akan mati secara otomatis/ dimatikan sebelum mulai bekerja
5. Hidupkan blower dengan menekan FAN ON
6. Semprot permukaan BSC dengan alkohol 70%

Mematikan Kabinet

1. Keluarkan seluruh alat, bahan dan sampah yang telah digunakan dari dalam BSC
2. Bersihkan meja BSC dengan alkohol 70%
3. Biarkan blower menyala selama 10 menit untuk menghilangkan kontaminasi setelah bekerja
4. Matikan blower dengan menekan tombol FAN OFF
5. Nyalakan lampu ultraviolet jika laminair tidak digunakan
6. Pastikan kaca penutup terkunci dan pada posisi terendah.

Perawatan Alat:

1. Pastikan kaca penutup terkunci dan pada posisi terendah.
2. Usap permukaan interior BSC dengan alcohol 70% atau disinfektan cocok dan biarkan menguap.
3. Masukkan alat dan bahan yang akan dikerjakan, jangan terlalu penuh (overload) karena memperbesar resiko kontaminan.

4. Atur alat dan bahan yang telah dimasukkan ke BSC sedemikian sehingga efektif dalam bekerja dan tercipta areal yang benar-benar steril.
5. Kerja aseptis dan jangan sampai pola aliran udara terganggu oleh aktivitas kerja.
6. Setelah selesai bekerja, biarkan 2-3 menit supaya kontaminan tidak keluar dari BSC.
7. Usap permukaan interior BSC dengan alcohol 70% dan biarkan menguap lalu tangan dibasuh dengan desinfektan

E. Bahan Diskusi

1. Jelaskan prinsip dasar kerja Autoclaf, oven dan Biological Safety Cabinet



2. Foto peralatan sebelum di sterilisasi dan sesudah sterilisasi

PERCOBAAN IV

HOT PLATE STIRER, WATERBATH DAN INKUBATOR

A. Pendahuluan

Hotplate stirrer merupakan alat pemanas listrik dengan elemen logam berbentuk plate yang dilengkapi dengan magnetik sebagai untuk pengadukan. Hot plate stirrer dan Stirrer bar (magnetic stirrer) berfungsi untuk menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan. Pelat (plate) yang terdapat dalam alat ini dapat dipanaskan sehingga mampu mempercepat proses homogenisasi. Elemen pemanas pada bagian lempengan logam berfungsi untuk mengubah energi listrik menjadi energi panas (kalor). Pengadukan dengan bantuan batang magnet Hot plate dan magnetic stirrer seri SBS-100 dari SBS® misalnya mampu menghomogenkan sampai 10 L, dengan kecepatan sangat lambat sampai 1600 rpm dan dapat dipanaskan sampai 425 °C.

Waterbath adalah instrumen ilmiah yang digunakan untuk mengatur suhu zat mengalami panas. Waterbath sering digunakan di dalam laboratorium ilmu kimia yang berhubungan dengan temperature aplikasi. Waterbath atau yang bisa disebut penangas air merupakan wadah yang berisi air yang bisa mempertahankan suhu air pada kondisi tertentu selama selang waktu yang ditentukan. Alat ini juga dilengkapi dengan pengaduk (shaker) yang dapat diatur dengan kecepatan yang diinginkan.

Inkubator adalah alat untuk menginkubasi atau pertumbuhan mikroba pada suhu yang terkontrol (umumnya diatas suhu ambient). Alat ini dilengkapi dengan pengatur suhu, dan pengatur waktu. Semakin kecil ukuran inkubator maka semakin rentan pula perubahan suhunya saat pintu inkubator dibuka. Perlu dipertimbangkan pula keseragaman suhu yang ada di dalam dengan memperhatikan pola penempatan elemen pemanas atau terdapatnya kipas penyebar suhu. Pintu kaca yang terdapat pada beberapa model dibiarkan tertutup saat melihat biakan secara sekilas supaya tidak terjadi penurunan suhu.

B. Tujuan Praktikum

- ✓ Memahami prinsip pemanasan larutan serta homogenitas
- ✓ Memahami prinsip kerja alat Hotplate stirer, Waterbath dan Inkubator
- ✓ Mahasiswa dapat menggunakan alat tersebut sesuai dengan SOP serta cara perawatannya

C. Alat Dan Bahan

Alat	Bahan
1. HotPlate Stirer	1. Aquades
2. Waterhbart	2. Garam dapur
3. Inkubator	
4. Beaker glass	
5. Magnetik stirer	
6. Tabung reaksi	
7. Cawan Petri	
8. Termometer	
9. Stopwatch	

D. Cara Kerja

1. Hotplate stirer

Cara Kerja

1. Hubungkan instrumen dengan sumber listrik
2. Tekan tombol power (ON/OFF)
3. Atur suhu sesuai yang diinginkan
4. Letakan wadah (beaker glass) yang berisi air di atas lempengan pemanas
5. Masukkan stirer ke dalam wadah larutan yang akan diaduk
6. Putar tombol magnetic stirer sampai kecepatan putaran yang diinginkan
7. Setelah selesai, putar tombol sampai posisi off dan putus sambungan listrik



Pengamatan

pemanasan

Panaskan aquades dengan volume 200 ml dan 400 ml. dengan pengaturan suhu yang sama dan suhu yang berbeda. Amati perubahan suhu setiap satu menit dengan menggunakan termometer. catat waktu yang dibutuhkan untuk mencapai air hingga mendidih ?

Volume	Suhu (°C)	(menit)/suhu	Suhu (°C)	(menit)/suhu
200 ml	90	2 (.....)	50	2 (.....)
		3 (.....)		3 (.....)
		5 (.....)		5 (.....)
		7 (.....)		8 (.....)
400 ml	90	2 (.....)	70	2 (.....)
		3 (.....)		3 (.....)
		5 (.....)		5 (.....)
		7(.....)		8 (.....)

Kelarutan

Sedia aquades kedalam 4 beaker glas volume 250 ml. Tambahkan garam 10 gram pada masing – masing wadah tersebut. Masukan magnetik stirer kedalam wadah tersebut. Amati proses kelarutan larutan garam dengan perlakuan tertentu

Volume (ml)	Perlakuan/waktu kelarutan (detik)			
	Tanpa pemanas/stirer	Pemanas/tanpa stirer	Pemanas/stirer	Tidak ada perlakuan
250	

Perawatatan :

1. Selalu membersihkan plate setelah pemakaian
2. Jangan meletakkan materi mudah terbakar di atas plate
3. Selalu cabut steker bila sedang tidak digunakan

2. Inkubator

1. Hubungkan instrumen dengan sumber arus melalui stabilizer
2. Tekan tombol power dari OFF ke On
3. Atur suhu sesuai dengan kebutuhan
4. Letakkan spesimen di dalam inkubator
5. Setelah selesai tekan tombol On ke OFF

Perawatan

- Inkubator selalu dalam kondisi on
- Cek suhu secara berkala dalam ruangan inkubator dengan termometer
- Pastikan inkubator mempunyai stabilizer untuk pencegahan anjloknya listrik



3. Waterbath

1. Hubungkan instrumen dengan sumber arus melalui stabilizer
2. Tekan tombol power dari OFF ke On
3. Isi air kira-kira 90 % dari total volume water bath
4. Atur suhu dan kecepatan shaker (rpm) sesuai dengan kebutuhan
5. Setelah selesai tekan tombol On ke OFF

Perawatan

- Pastikan air di ganti setiap 1 minggu sekali agar
- Buang air setelah digunakan
- Pastikan air dalam wadah selalu pada batas maksimal, jika kurang tambahkan air.
- Jika tidak digunakan, tutup alat dengan plastik pengaman

Bahan Diskusi

1. Jelaskan prinsip kerja masing – masing alat

2. Jelaskan hasil pengamatan yang di peroleh dari pemasaran dan kelarutan

PERCOBAAN V

TEKNIK PCR KONVENSIONAL

A. Pendahuluan

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu reaksi in vitro untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintetis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut. Prosesnya dilakukan dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu termosikler. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit sepasang primer. Primer yang berada pada daerah sebelum daerah target disebut sebagai primer forward, dan yang berada setelah daerah target disebut reverse. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru dikenal dengan enzim polymerase. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP (nukleotida berbasis adenine), dCTP (sitosin), guanine, dGTP (guanin), dan dTTP (timin)

B. Tujuan Praktikum

- ✓ Mengetahui prinsip kerja PCR
- ✓ Memahami teknik dasar PCR
- ✓ Mampu mengoperasikan alat thermocycler sesuai dengan SOP

B. Alat dan Bahan

Alat: 1. Thermocycler 2. Mikrotub (200 μ L dan 1.5 μ L) 3. Labu erlemeyer (250 ml) 4. mini spin 5. vortek mixer	Bahan: PCR master Mix Primer F Primer R Sampel DNA Aquadess (ddH ₂ O)
---	--

D. Cara Kerja

Pembuatan Reaksi PCR

Komposisi mix PCR untuk volume total 25 μ L

PCR Master mix	: 12,5 μ L (setengah dari volume total)
Primer F	: 1 μ L
Primer R	: 1 μ L
DNA template	: 1 μ L
ddH ₂ O	: 9,5 μ L

Siklus PCR yang digunakan 30x siklus

Pre-denaturasi	: 95 °C	4 menit
Denaturasi	: 95 °C	1 menit
Annealing	: 56 °C	1,5 menit
Axtension	: 72 °C	1 menit
And Axtension	: 72 °C	7 menit
Cooling	: 4 °C	pause

Teknik Penggunaan Thermocycler (mesin PCR)

Cara Kerja:

1. Sambungkan colokkan **Master Cycler Personal** dengan listrik (220 volt) melalui stravolt
2. Tekan tombol **ON / OFF** disisi belakang alat

Akan tampil:

Main – Menu

AAL

--/25,10

10 : 11 : 23

I Start

I FILES

I OPT

I Lid Incu



3. Gunakan tanda panah yang ada display alat
4. Untuk menulis program baru:
 - ✓ Arahkan kursor pada **FILES**, kemudian **ENTER**
 - ✓ Arahkan kursor pada **NEW**, kemudian **ENTER**
 - ✓ Arahkan kursor pada **BLOK**, kemudian **SEL**

Catatan: jika memilih tube saja, maka kita set ukuran tube PCR-nya dan juga volumenya

- ✓ Arahkan kursor pada **Lid**, ketik 105 0C
 - ✓ Arahkan kursor ke tepi kiri, kemudian tekan sel
 - ✓ Masukkan programnya dengan pilihan:
 - Jika temperatur : tekan **SEL 1X**, kemudian masukkan temperatur & waktunya
 - Jika menunggu : tekan **SEL 2X**, kemudian masukkan pada temperatur untuk menunggu
 - Jika berhenti pada tahap : tekan **SEL 3X**, kemudian masukkan mulai pengulangannya dan berapa banyak pengulangannya
 - **Example:** Pengulangan dimulai no:2 sebanyak 30 pengulangan (*Cycle*). Maka kita masukkan **GO TO 2 REP 29** Jika ingin berhubungan dengan program lain tekan **SEL 6X**, kemudian masukkan nama program yang sudah di *save* dialat
 - ✓ Kemudian tekan **EXIT**
 - ✓ Jika ingin menyimpan tekan **ENTER**
 - ✓ Tulis nama program, dengan cara memilih hurufnya dengan menekan **SEL**, kemudian pindah kursornya untuk setiap huruf yang diinginkan
 - ✓ Tekan **ENTER**
5. Untuk melihat program yang sudah ada:
 - a. Pindah kursor pada **FILES**, kemudian **ENTER**
 - b. Pilih **LOAD**, kemudian **ENTER**
 6. Pilih program yang diinginkan, kemudian **ENTER**
 7. Untuk **'RUN'** Alat:
 - a. Buka alat dengan memutar tombol kunci kearah kiri

PERCOBAAN VI

PEMBUATAN GEL AGAROSE DAN ELEKTROFORESIS

A. Pendahuluan

Elektroforesis pada prinsipnya merupakan proses bergeraknya molekul bermuatan melalui pori-pori gel dibawah pengaruh medan listrik dengan kekuatan tertentu. Pada pH mendekati netral DNA bermuatan negatif, sehingga molekul ini dapat bermigrasi dari katoda ke anoda dengan mobilitas yang dipengaruhi oleh ukuran dan konformasi fragmen DNA, kekuatan arus listrik, konsentrasi etidium bromida (EtBr), kekuatan ion buffer, dan konsentrasi gel yang digunakan

Ada berbagai metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi komponen DNA, RNA, dan protein dalam sel. Metode elektroforesis horizontal maupun vertical adalah salah satu metode yang digunakan untuk memisahkan DNA, RNA, dan protein agar bias tampak terlihat. Metode ini merupakan metode memisahkan komponen tersebut dengan cara menggerakkan molekul bermuatan pada suatu medan listrik dan salah satunya sangat bergantung pada gel yang digunakan yang berperan sebagai media pemisahan. Ada beberapa pilihan gel yang bisa digunakan diantaranya adalah gel agarose dan gel poliakrilamide.

Gel agarose adalah gel yang umum digunakan untuk migrasi DNA dan dapat dipilih dengan menggunakan berbagai konsentrasi. Fatchiyah dkk (2011) mengemukakan bahwa untuk memisahkan genom utuh konsentrasi yang umum digunakan adalah 0.8%. Sedangkan hasil amplifikasi DNA dapat menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1.5-2%.

B. Tujuan Praktikum

1. Dapat Memahami prinsip kerja elektroforesis dan pembuatan gel
2. Mengetahui prosedur kerja pembuatan gel dan elektroforesis

C. Alat dan Bahan

1. Elektroforesis chamber
2. Comb dan tray (cetakan gel)
3. Mikropipet
4. Timbangan analitik
5. Larutan TAE 1x
6. Agarose / Agar swallow
7. Aquades steril
8. Etidium Bromida/ SYBER Gold

D. Cara Kerja

Mempersiapkan Larutan Kerja

1. Siapkan 500 mL *Running Buffer* (TAE 1X)
Buat larutan pengenceran larutan TAE 10x menjadi TAE 1x dengan aquades dengan rumus pengenceran

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

2. Pembuatan Gel Agarose 1 % dan 2 %

3. Timbang agarose/swallow sebanyak 0.5 gram ke dalam 50 ml TAE 1x (untuk Agarose 1%) dan 1 gram ke dalam 50 ml TAE 1x
4. Larutkan agarosa dalam *Running Buffer* (TAE 1X), panaskan dengan microwave/ hotplate sesuai dengan petunjuk kemudian dinginkan sampai mendidih (larutan bening) sebelum dituang ke dalam *tray* (tempat gel) dinginkan terlebih dahulu (60 °C).

Catatan : Bisa ditambahkan 0,5 µg/mL Ethidium bromide atau SYBER Gold ke dalam larutan gel untuk mengamati pemisahan selama proses elektroforesis.

Mencetak Gel

1. Susun nampan tempat gel diatas nampan pencetak gel, dengan menempatkan penahan karet pada ujung nampan pencetak gel.
2. Tempatkan sisir pada tempatnya dan pastikan bahwa bagian bawah dari sisir tidak menempel pada nampan tempat gel (kira – kira berjarak 1,0 mm di atas nampan).
3. Tuang larutan agarosa yang telah dibuat dan biarkan selama \pm 30 menit sampai gel benar – benar mengeras.
4. Lepaskan sisir dari tempatnya dengan hati – hati.
5. Lepaskan gel dari nampan pencetak gel dan tempatkan pada alat elektroforesis. Posisi sumuran diletakkan pada tempat yang berwarna gelap. Catat kondisi gel, kekuatan gen serta kondisi lainnya

Running Electrophoresis

1. Letakkan tray yang berisi gel ke dalam tank elektroforesis dan tuang larutan 1xbuffer TAE ke dalam tank tersebut hingga sekitar 1mm di atas permukaan gel.
 2. Ambil sampel dengan mikropipet sebanyak kapasitas sumur (well) yang biasanya sekitar 4-8 µl. Letakkan sampel di atas parafilm atau plastic cling wrap dan tambahkan loading dye buffer sebanyak 1/10 volume sampel kemudian aduk hingga merata. Ambil larutan tersebut dengan mikropipet dan masukkan ke dalam sumur (well)gel yang telah dibuat pada langkah 1.
 3. Setelah sampel dimasukkan dalam sumur (well), tutup tank elektroforesis dan hubungkan arus listrik (hati-hati tegangan listrik cukup tinggi), pelajari menu-menu yang ada terkait fungsi dan cara mengoperasikannya. Setelah itu proses elektroforesis siap dijalankan
 4. Lamanya elektroforesis tergantung persentase gel, tegangan arus listrik, dan ukuran molekul DNA. Sebagai gambaran proses elektroforesis untuk: tegangan listrik yang digunakan 100 volt. Ukuran fragmen DNA yang dianalisis 50-2000 pasang basa maka proses elektroforesis memerlukan waktu sekitar 30 menit.
 5. Setelah proses elektroforesis selesai, matikan arus listrik dan ambil tray dengan menggunakan sarung tangan. Taruh gel pada UV transilluminator dan jika pita/band molekul DNA kelihatan terang maka dokumentasikan.
- Catatan:** dalam proses praktikum yang dilakukan ganti beberapa komponen di atas dengan menggunakan bahan-bahan yang telah disediakan. 1x buffer TAE dapat diganti dengan aquades dan loading dye juga dapat diganti dengan metilen blue

E.Data Pengamatan

Pembuatan Gel Agarose

NO	Konsentrasi Agarose	Hasil (Tekstur)
1	1%	
2	2%	

Elektroforesis

NO	Konsentrasi Agarose	Kondisi pada saat dimasukkan sampel	Keterangan
1	1%		
2	2%		

F.Bahan Diskusi

1. Apakah ada perbedaan hasil pada praktikum pembuatan gel agarose dengan berbagai konsentrasi? Mengapa demikian
2. Kesulitan apa yang saudara temukan pada pembuatan gel agarose dan bagaimana saudara mengatasi itu?
3. Apa hasil yang saudara dapatkan ketika melakukan pemisahan DNA dengan menggunakan elektroforesis yang memanfaatkan gel agarose sebagai matriksnya?
4. Jelaskan fungsi gel agarose pada praktikum yang saudara lakukan dan jika pada praktikum tersebut digantikan dengan menggunakan agar-agar biasa apa prinsip yang sama dan prinsip yang tidak sama yang saudara temukan pada praktikum yang sudah dilakukan

PERCOBAAN VII

SPEKTROFOTOMETER: ELISA MULTIMODE READER (TECAN)

A. Pendahuluan

Spektrofotometri adalah suatu metode analisis yang berdasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang yang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dan detector vacuum phototube atau tabung foto. Fungsi alat spektrofotometer dalam laboratorium adalah mengukur transmitansi atau absorbansi suatu contoh yang dinyatakan dalam fungsi panjang gelombang. Prinsip kerja spektrofotometer adalah bila cahaya (monokromatik maupun campuran) jatuh pada suatu medium homogen, sebagian dari sinar masuk akan dipantulkan, sebagian di serap dalam medium itu, dan sisanya diteruskan. Nilai yang keluar dari cahaya yang diteruskan dinyatakan dalam nilai absorbansi karena memiliki hubungan dengan konsentrasi sampel. Studi spektrofotometri dianggap sebagai perluasan suatu pemeriksaan visual yang lebih mendalam dari absorbansi energi. Hukum Beer menyatakan absorbansi cahaya berbanding lurus dengan dengankonsentrasi dan ketebalan bahan/medium hampa.

B. Tujuan Praktikum

- ✓ Mahasiswa dapat memahami prinsip kerja dari spektrofotometer
- ✓ Memahami prosedur kerja alat dan prosedur pengukuran sampel sesuai dengan analisis yang diinginkan
- ✓ Mahasiswa dapat membuat larutan standar dengan spektrofotometer
- ✓ Mahasiswa dapat mengukur konsentrasi DNA

C. Alat dan Bahan

Alat: 1. Elisa Multimode Reader (TECAN) 2. Tabung reaksi 3. Cuvet 4. Mikroplate 5. Mikropipet 6. Mikrotube	Bahan: Glukosa Akuades DNA Pereaksi DNS
--	---

D. Cara Kerja

1. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA
Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA dengan menggunakan **Infinite M200 PRO Nanoquant**
Catatan: prosedur kerja akan di jelaskan oleh laboran dan catat tahap demi tahap
2. Pembuatan standar Glukosa **Software I- Control**
Tahap awal pembuatan kurva standar adalah membuat larutan stok glukosa

- ✓ 1 gram (1000 mg) glukosa dilarutkan dalam 100 ml H₂O steril, berarti dalam 1 ml stok larutan mengandung 10 mg glukosa, yang kita perlukan dalam membuat kurva standar glukosa adalah konsentrasi 1 mg/ml glukosa sehingga 100 µl larutan stok diencerkan dengan 900 µl H₂O steril.
- ✓ Pembuatan kurva standar menggunakan pengenceran bertingkat seperti yang terdapat pada tabel 1.
- ✓ Rumus pengenceran $V_1N_1 = V_2N_2$

Tabel 1. Konsentrasi glukosa untuk pembuatan kurva standar glukosa

Tabung	Konsentrasi (mg/ml)	Stok yang dipipet (ml)	H ₂ O steril (ml)
1	0.00	0	2
2	0.05	0.1	1.9
3	0.1	0.2	1.8
4	0.15	0.3	1.7
5	0.2	0.4	1.6
6	0.25	0.5	1.5
7	0.3	0.6	1.4

- ✓ Pada masing-masing larutan glukosa murni dalam tabung reaksi kemudian kita menambahkan 2 ml pereaksi DNS setiap tabungnya.
- ✓ Larutan divortex untuk homogenisasi kemudian dipanaskan dalam air mendidih suhu 100°C selama 15 menit (gunakan *stopwatch*).
- ✓ diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.
- ✓ Kurva standar dibuat dengan memplot data konsentrasi glukosa pada sumbu X dan data absorbansinya pada sumbu Y.

E. Data Pengamatan

A. Kosentrasi DNA

Sampel DNA	Abs 260 nm	Abs 280 nm	260/280 Kemurnian DNA	Kosentrasi DNA
1				
2				

B. Kurva Standar Glukosa

Hitung Nilai absorbansi masing – masing Kosentrasi

Konsentrasi (mg/ml)	Absorban 1
0,000	
0,050	
0,100	
0,150	
0,200	
0,250	
0,300	

Interpretasikan Data dalam bentuk kurva Standar

DAFTAR PUSTAKA

Tim Penyusun Bioteknologi Pertanian. 2013. *Petunjuk Praktikum Instrumentasi*.
Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang