



MODUL PRAKTIKUM

BIOLOGI MOLEKULER



Disusun Oleh

Febriana Dwi Wahyuni, M.Si.



**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ESA UNGGUL
JAKARTA**

2017



KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmatNya sehingga penyusunan pedoman praktikum Biologi Molekuler ini dapat terselesaikan dengan baik. Pedoman praktikum ini disusun bagi mahasiswa program studi Bioteknologi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul yang mengikuti mata kuliah Biologi Molekuler agar dapat melaksanakan praktikum dengan sebaik-baiknya.

Pedoman praktikum ini dapat disusun dengan bantuan dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih kami sampaikan ke berbagai pihak yang telah memberikan kontribusi, baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan Pedoman Praktikum ini

Penulis berharap semoga Pedoman praktikum ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan dapat membantu khususnya bagi para mahasiswa yang menempuh mata kuliah Biologi molekuler ini. Penulis menyadari bahwa Pedoman Praktikum ini masih jauh dari sempurna sehingga penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca yang sifatnya membangun demi terus meningkatkan kualitas dan kesempurnaan Pedoman Praktikum ini.

Jakarta, 1 April 2017

Penulis



TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Praktikan datang di laboratorium 10 menit sebelum kegiatan praktikum dimulai (tidak boleh terlambat)
2. Praktikan menggunakan jas laboratorium dan alas kaki selama berada di dalam laboratorium
3. Praktikan meletakkan tas di tempat yang telah disediakan
4. Praktikan wajib mengikuti semua tata tertib laboratorium
5. Praktikan mengikuti instruksi yang diberikan oleh asisten dan tidak membuat kegaduhan selama berada di laboratorium
6. Praktikan sudah membaca pedoman praktikum sebelum kegiatan praktikum berlangsung demi terciptanya kelancaran dalam kegiatan praktikum
7. Praktikan harus membersihkan meja setelah kegiatan praktikum selesai
8. Praktikan wajib membuat laporan praktikum
9. Praktikan wajib mengikuti seluruh kegiatan praktikum (kehadiran 100%)

DAFTAR ISI

Kata Pengantar	i
Tata Tertib Praktikum	ii
DAFTAR ISI	iii
1. Isolasi DNA tanaman	1
2. Isolasi DNA dengan metode CTAB	4
3. Isolasi plasmid	8
4. Pembuatan gel agarosa dan Analisis DNA hasil Isolasi dengan spektrofotometri...	12
5. Preparasi PCR	15
6. Isolasi RNA	18
7. QPCR	21
Daftar Pustaka	24



1. ISOLASI DNA TANAMAN

Pendahuluan

DNA (*Deoxyribose Nucleic Acid*) adalah suatu bahan genetik yang berfungsi untuk mengkode semua informasi yang dibutuhkan untuk proses metabolisme. DNA tersusun atas tiga komponen utama yaitu gula deoksiribosa, basa nitrogen dan fosfat yang tergabung membentuk nukleotida. Molekul DNA ini terikat membentuk kromosom, dan ditemukan di nukleus, mitokondria dan kloroplas. DNA tersusun heliks ganda (*double helix*), dimana basa nitrogen saling berpasangan komplementer (basa purin berpasangan dengan basa pirimidin) melalui ikatan hidrogen dan antara nukleotida yang satu dengan nukleotida yang lain dihubungkan dengan ikatan fosfat. DNA terdapat di dalam setiap sel makhluk hidup dan disebut sebagai "cetak biru kehidupan" karena molekul ini berperan penting sebagai pembawa informasi hereditas yang menentukan struktur protein dan proses metabolisme lain.

DNA dari berbagai organisme bisa diisolasi. Isolasi DNA dapat dilakukan melalui tiga tahapan yaitu lisis (pemecahan dinding sel), ekstraksi DNA, dan presipitasi DNA. Meskipun isolasi DNA dapat dilakukan dengan berbagai cara, akan tetapi pada setiap jenis atau bagian tanaman dapat memberikan hasil yang berbeda, hal ini karena adanya senyawa polifenol dan polisakarida dalam konsentrasi tinggi yang dapat menghambat pemurnian DNA. Jika isolasi DNA dilakukan dengan sampel buah, maka perbedaan kadar air pada masing-masing buah, dapat memberikan hasil yang berbeda pula. Buah dengan kadar air tinggi akan menghasilkan isolat yang berbeda jika dibandingkan dengan buah berkadar air rendah. Semakin tinggi kadar air maka sel yang terlarut di dalam ekstrak akan semakin sedikit, sehingga DNA yang terpresipitasi juga akan sedikit.

Proses isolasi DNA diawali dengan pemecahan dinding dan membran sel. Tujuannya yaitu untuk mengeluarkan DNA dari sel. Penghancuran dinding sel dapat dilakukan secara mekanik maupun secara kimiawi. Cara mekanik bisa dilakukan dengan pemblenderan atau penggerus menggunakan mortar dan pestil, sedangkan secara kimiawi dapat dengan pemberian bahan yang dapat merusak membran sel dan membran inti, salah satunya adalah deterjen. Penambahan deterjen dalam isolasi DNA dapat dilakukan karena deterjen tersebut selain berperan dalam melisiskan membran sel juga dapat berperan dalam mengurangi aktivitas enzim nuklease yang merupakan enzim pendegradasi DNA

Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu melakukan isolasi DNA tanaman yang baik dan benar

Kemampuan Akhir yang diharapkan

Setelah melakukan kegiatan praktikum ini, diharapkan mahasiswa mampu menyiapkan sampel tanaman dan mengisolasi DNA tanaman

Alat dan Bahan

Alat

- Tabung reaksi
- Beaker glass
- Timbangan
- Gelas aqua
- Pipet tetes

- Pisau
- Vortex
- Blender
- Spatula

Bahan:

- Buah (pepaya, tomat)
- Detergent (rinso, attack)
- Aquadest
- Garam
- Ethanol absolut
- Kertas saring

Cara Kerja

1. Buah dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil
2. Buah yang telah dipotong kemudian ditimbang sampai beratnya 100 g
3. Diambil 100 g buah dan 100 ml aquades, kemudian diblender hingga halus (\pm 30 detik)
4. Masing-masing buah yang telah diblender dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi yang berbeda sebanyak 4 mL
5. Larutkan detergent ke dalam 60 ml aquades
6. Larutan detergent kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang berisi jus buah
7. Tambahkan 1 spatula garam dapur ke dalam masing-masing tabung reaksi, kemudian aduk hingga larut
8. Campuran kemudian disaring sebanyak 2x dengan kertas saring
9. Lalu tambahkan ethanol absolut sebanyak 5 mL ke dalam masing-masing campuran
10. Larutan kemudian dihomogenkan dengan menggunakan mesin vortex
11. Amati dan catat hasil yang tampak dari keseluruhan proses meliputi warna, bentuk, serta sedikit banyaknya DNA yang terbentuk.

Lembar Pengamatan

No	Buah	Pengamatan	
		Rinso	Attack
1.	Pepaya		
2.	Tomat		



2. ISOLASI DNA DENGAN METODE CTAB

Pendahuluan

DNA pada organisme tingkat tinggi seperti manusia, hewan dan tumbuhan terdapat di dalam inti sel, dan beberapa organ lain di dalam sel seperti mitokondria dan kloroplas. Penyebutan nama DNA juga didasarkan pada lokasi asalnya. DNA genom inti (*nuclear DNA genome*) berasal dari inti sel, DNA genom mitokondria berasal dari mitokondria, DNA genom kloroplas berasal dari kloroplas.

Perkembangan penelitian dibidang bioteknologi dan biologi molekuler, memungkinkan untuk mengekstraksikan DNA atau RNA dari bagian sel baik pada tanaman, hewan, bakteri atau mikroorganisme lainnya. Prinsip dasar isolasi DNA adalah :

1. Penghancuran (lisis) dinding sel dan membran sel menggunakan detergen untuk membebaskan DNA
2. Degradasi protein menggunakan protease (protease berfungsi mendegradasi protein)
3. Presipitasi DNA menggunakan alkohol (etanol atau isopropanol) dan garam (misalnya NA-asetat)
4. Pelarutan DNA dengan air atau buffer TE (Tris-EDTA) pH 8.

Dua metode untuk mengisolasi DNA tanaman adalah metode CTAB (*cetyltrimethyl-ammonium bromide*) dan metode SDS (*sodium dedocylsulfate*). CTAB dan SDS adalah detergen yang berfungsi dalam lisis DNA tanaman. CTAB dapat memisahkan polisakarida dari DNA karena perbedaan kelarutannya. Polisakarida dapat menghambat aktivitas enzim pada proses lanjutan penggunaan DNA (misalnya PCR). Isolasi DNA menggunakan *DNA isolation kit* juga merupakan salah satu cara yang paling praktis namun dengan biaya yang cukup tinggi. Pengetahuan mengenai beberapa metode dasar isolasi DNA dibutuhkan untuk menentukan metode yang paling efisien dalam mengisolasi DNA pada kondisi tertentu (jumlah bahan tanaman terbatas, jumlah sampel besar, sampel mengandung banyak pengotor, dan lain sebagainya).

Dalam proses isolasi DNA, tahap penghancuran (lisis) dinding sel sangat ditentukan oleh persiapan sampel dan persiapan buffer ekstraksi. Secara umum, semakin luas bidang reaksi antara sel dengan buffer lisis akan semakin meningkatkan efisiensi isolasi DNA. Penghancuran jaringan tanaman menggunakan nitrogen cair (N₂) atau pencacahan di dalam

buffer ekstraksi bertujuan untuk memperluas bidang reaksi dan meningkatkan efisiensi isolasi DNA.

Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu melakukan isolasi DNA dengan metode CTAB

Kemampuan Akhir yang diharapkan

Setelah mengikuti praktikum ini praktikan diharapkan mampu menyiapkan bahan/ sampel tanaman, menyiapkan buffer yang diperlukan untuk mengisolasi DNA tanaman, dan melakukan prosedur standar isolasi DNA (metode CTAB)

Alat dan Bahan

Alat

1. Gunting (bilas menggunakan 70% etanol sebelum digunakan)
2. Mortar dan Pestle
3. Microtube
4. Micropipette
5. Water bath 65 °C dan 95 °C
6. Centrifuge 4 °C

Bahan

1. Bibit *Setaria italic* atau tanaman lainnya
2. Nitrogen cair (pilihan)
3. Buffer lysis CTAB
4. DNA isolation Kit
5. Aquades
6. Etanol atau isopropanol dingin
7. CIA (Chloroform;isoamyl alcohol 24:1)

Cara Kerja

A. Preparasi Buffer CTAB

No	Komponen	Konsentrasi larutan stok	Konsentrasi final di larutan kerja
1	Tris HCl pH 8.0	0.5 M	0.1 M
2	NaCl	5 M	1.4 M
3	EDTA	5 M	0.02 M
4	CTAB	10%	2%

1 M Tris HCl pH 8.0

121.1 g Tris

Larutkan menggunakan ± 700 mL ddH₂O.

Turunkan pH ke 8.0 dengan menambahkan HCl (± 50 mL).

Tera volume menjadi 1 L menggunakan ddH₂O.

5 M NaCl

292.2 g NaCl

Larutkan menggunakan ± 700 mL ddH₂O.

Tera volume menjadi 1 L menggunakan ddH₂O.

0.5 M EDTA

186.12 g EDTA

Larutkan menggunakan ± 700 mL ddH₂O.

Tambahkan 16-18g butiran NaOH untuk menyesuaikan pH ke 8.0

Tera volume menjadi 1 L menggunakan ddH₂O.

10% CTAB atau SDS

100 g CTAB atau SDS

Larutkan menggunakan ± 700 mL ddH₂O.

Tera volume menjadi 1 L menggunakan ddH₂O.

B. Metode Isolasi DNA menggunakan CTAB

1. Sampel berupa daun tanaman diambil dengan menggunakan gunting yang telah dibilas dengan alkohol 70%
2. Sampel ($\pm 0,5-1$ g) digerus dalam mortar menggunakan pistil dan nitrogen cair
3. Tambahkan 700 μ l buffer ekstraksi (CTAB) ke dalam mortar dan digerus hingga merata
4. Pindahkan sampel ke dalam *microtube* 1,5 mL menggunakan pipet yang telah dipotong ujungnya
5. Rendam *microtube* di dalam *water bath* bersuhu 65⁰C selama 30 menit
6. Sampel diinkubasi di suhu ruang selama 10 menit
7. Tambahkan 700 μ l CIA ke dalam sampel dan dibolak-balik secara perlahan untuk mencampur
8. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4⁰C selama 10 menit
9. Akan terbentuk 2 lapisan, ambil lapisan teratas dan pindahkan ke *microtube* 1,5 mL yang baru

10. Tambahkan ethanol absolut sebanyak 2x dari volume supernatan, lalu bolak-balik secara perlahan
11. Inkubasi sampel pada suhu ruang selama 10 menit
12. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit
13. Supernatan dibuang
14. Endapan DNA dicuci dengan 70% ethanol
15. Endapan dikeringanginkan di suhu ruang \pm 15-20 menit atau dengan menggunakan *vaccum*
16. DNA dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 μ l
17. Simpan DNA pada -20°C
18. Analisis hasil isolasi DNA dapat dilakukan dengan metode elektroforesis

Lembar Pengamatan

 <p>Universitas Esa Unggul</p>	 <p>Universitas Esa Unggul</p>	 <p>Universitas Esa Unggul</p>
 <p>Universitas Esa Unggul</p>	 <p>Universitas Esa Unggul</p>	 <p>Universitas Esa Unggul</p>

3. ISOLASI PLASMID

Pendahuluan

Setiap organisme memiliki DNA yang terletak dalam inti sel yang disebut sebagai DNA kromosomal, begitu pula bakteri. Selain DNA kromosomal, bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal, yaitu plasmid. Bentuk plasmid adalah sirkuler *double helix* dengan ukuran 1 kb sampai lebih dari 200 kb. Pada bakteri jumlah plasmid yang dimiliki bervariasi. Plasmid mengandung gen yang tidak diperlukan untuk kelangsungan hidup bakteri. Plasmid hanya memberikan sifat istimewa yang dimiliki oleh bakteri tersebut misalnya resistensi terhadap antibiotik. Beberapa karakteristik dari plasmid antara lain: dapat ditransfer ke bakteri lain dan memiliki ORI (*Origin of replication*) sehingga mampu mereplikasi diri tanpa pengaturan dari DNA kromosom.

Berdasarkan jumlahnya, plasmid di dalam sel dapat dibedakan menjadi: *Low copy number plasmid* dimana dalam satu sel hanya mengandung satu atau beberapa plasmid saja dan *High copy number* dimana dalam satu sel mengandung banyak plasmid hingga ribuan, contohnya bakteri *Escherichia coli*. Selain itu, plasmid juga memiliki bentuk yang beragam, antara lain: *Supercoiled* (DNA plasmid berbentuk sirkular dengan bentuk rantai yang terpilin), *Relaxed circular* (kedua ujung DNA menyatu dan berbentuk sirkuler), *Supercoiled denature* (kedua ujung DNA menyatu tapi pasangan basanya tidak sempurna), dan *Nicked open circular* (rantai DNA yang terpotong pada salah satu sisi saja).

Berbagai macam bentuk plasmid itu akan mempengaruhi kecepatan migrasi plasmid dalam elektroforesis. Urutan migrasi bentuk-bentuk plasmid tersebut dari yang paling cepat adalah *supercoiled*, *supercoiled denatured*, *relaxed circular*, dan *nicked open circular*. Bentuk plasmid yang semakin kecil atau ramping akan lebih mudah bergerak melalui pori gel agarose sehingga akan mencapai bagian bawah terlebih dahulu. Ada berbagai macam kegunaan dari plasmid, dalam rekayasa genetika plasmid digunakan sebagai vektor untuk kloning DNA. Selain itu plasmid juga banyak digunakan untuk memperbanyak jumlah DNA tertentu sehingga bisa mengekspresikan gen tertentu. Alasan utama penggunaan plasmid ini adalah karena plasmid memiliki peta restriksi, adanya marker sehingga dapat diketahui apakah gen insert masuk atau tidak, memiliki copy number yang besar, dan mudah dimodifikasi sesuai dengan tujuan tertentu. Karena plasmid

memiliki fungsi yang bisa dimanfaatkan keuntungannya, maka ada banyak cara yang digunakan untuk mengisolasi plasmid tersebut.

Plasmid yang diisolasi berasal dari bakteri. Proses ini dikenal sebagai proses mini preparation karena jumlahnya hanya sekitar 1-20 μ g. Sedangkan untuk jumlah yang lebih besar (100-200 μ g) digunakan midi preparation dan maxi preparation untuk jumlah yang lebih besar dari 200 μ g. Inti dari isolasi plasmid bakteri adalah menghancurkan membran sel sehingga semua organel sel dapat keluar. Sehingga didapatkan DNA kromosomal serta DNA ekstrakromosomal (plasmid). Untuk memperoleh plasmid saja harus dilakukan pemurnian dari debris membran sel, organel sel, dan pengotor lainnya. Metode yang dapat digunakan untuk isolasi plasmid salah satunya yaitu metode *Alkaline lysis*.

Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu mengisolasi DNA plasmid

Kemampuan Akhir yang diharapkan

Setelah melakukan kegiatan praktikum ini, diharapkan mahasiswa mampu mengisolasi DNA plasmid dari bakteri

Alat dan Bahan

Alat

- Mikropipet dan tip
- Microtube 1,5 mL dan 2 mL
- Rak tube
- Beaker glass
- Sentrifuge
- Oven
- Shaker

Bahan:

- Bakteri *E. coli*
- Media pertumbuhan bakteri (LB)
- Larutan suspensi sel (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA)
- Larutan lisis (0,2 M NaOH, 1% SDS)
- Ethanol absolut
- Ethanol 70%
- Aquadest steril
- Sodium asetat 3M
- Larutan netralisasi (1,32 M kalium asetat pH 4,8)

Cara Kerja

1. Menyiapkan kultur bakteri *Escherichia coli* yang ditumbuhkan dengan cara diinkubasi goyang dalam suhu 37⁰C dalam waktu semalam
2. Ambil 10 mL bakteri dalam kultur cair dengan mikropipet
3. Masukkan kultur bakteri ke dalam microtube 2 mL

4. Endapkan bakteri dengan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 6 menit
5. Buang supernatan
6. Resuspensi endapan dengan 100 µl larutan A (EDTA dan Tris-HCl)
7. Inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit
8. Resuspensi endapan dengan 200 µl larutan B (NaOH dan SDS), kemudian bolak-balik
8x
9. Inkubasi di dalam es selama 5 menit
10. Resuspensi endapan dengan 150 µl larutan C (Ka-Asetat), lalu *tapping*
11. Inkubasi di dalam es selama 5 menit
12. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit
13. Pindahkan supernatan ke dalam microtube 1,5 mL yang baru
14. Tambahkan NaOAc sebanyak 0,1x volume supernatan dan ethanol absolut sebanyak
2,5x volume supernatan
15. Inkubasi dalam suhu 0°C selama 2 jam
16. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit
17. Tandai pelet yang terbentuk di dinding microtube dengan spidol, lalu buang
supernatan
18. Balik tutup microtube dan letakkan di atas tissue
19. Tambahkan 1 mL ethanol 70% ke dalam microtube
20. Sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit
21. Buang supernatan, dan keringkan endapan di dalam oven
22. Larutkan endapan dengan menambahkan 20 µl ddH₂O
23. Simpan hasil isolasi plasmid ke dalam freezer
24. Analisis hasil isolasi dapat dilakukan dengan elektroforesis

Lembar Pengamatan



4. PEMBUATAN GEL AGAROSA DAN ANALISIS DNA DENGAN SPEKTROFOTOMETRI

Pendahuluan

DNA tanaman yang telah diisolasi menggunakan metode CTAB, SDS, DNA-isolation kit maupun metode lainnya, harus terlebih dahulu dihitung konsentrasinya maupun dicek kualitasnya sebelum dapat digunakan dalam proses selanjutnya. Tujuan dari penghitungan konsentrasi dan cek kualitas DNA adalah untuk menjamin bahwa jika ada kegagalan dalam proses selanjutnya (misalnya PCR atau *genomic southern hybridization*) bukanlah akibat rendahnya kuantitas dan/atau kualitas DNA.

Penghitungan kuantitas (konsentrasi) DNA dapat dilakukan dengan metode spektrometri. Pada prinsipnya basa nitrogen pada DNA dapat menyerap cahaya UV, sehingga semakin tinggi konsentrasi DNA semakin tinggi pula cahaya UV yang diserap. Tingginya cahaya UV yang diserap oleh basa nitrogen pada DNA ditunjukkan oleh nilai absorbansi pada λ 260 nm (A_{260}). Konsentrasi untai ganda DNA murni pada nilai absorbansi $A_{260} = 1$ adalah 50 $\mu\text{g/ml}$.

Penentuan kualitas DNA dapat dilakukan dengan menghitung rasio absorbansi pada A_{260} dengan A_{280} (rasio $A_{260}:A_{280}$) atau dengan melihat pita DNA melalui elektroforesis. Nilai maksimal rasio $A_{260}:A_{280}$ adalah 2. Semakin rendah nilai rasio tersebut, semakin rendah kualitas DNA akibat kontaminasi protein. Dalam metode elektroforesis, pita DNA genom normal akan tampak sebagai pendar tak putus pada gel agarosa setelah proses elektroforesis.

Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu menganalisis DNA secara kualitatif dan kuantitatif

Kemampuan Akhir yang diharapkan

Setelah mengikuti praktikum ini, diharapkan mahasiswa mampu mempersiapkan gel agarose untuk elektroforesis, mengkuantifikasi (menghitung konsentrasi) DNA melalui metode spektrofotometri dan menentukan kualitasnya melalui elektroforesis.

Alat dan Bahan

Alat

- Kertas parafilm
- Gelas ukur 1000 mL
- Labu erlenmeyer 50 mL
- Sarung tangan
- Mikropipet & microtube
- Seperangkat alat elektroforesis
- UV transluminator
- Spektrofotometer

Bahan:

- DNA marker
- Sample DNA
- Agarosa
- Larutan Buffer TAE 50x
- Akuades
- Alkohol
- Loading dye 6x
- Larutan Ethidium bromida

Cara Kerja

A. Pembuatan gel agarose

1. Terlebih dahulu buat 50x TAE Buffer :

Tris base : 24,2 gram

Asam asetat glasial : 5,7 mL

EDTA 0,5M pH 8,0 : 10 mL

Larutkan menggunakan aquades hingga 100 mL

2. Buat 500 mL larutan buffer TAE 1x dengan cara mencampurkan 10 mL TAE 50x ke dalam 490 mL akuades
3. Buat gel agarosa 1% dengan cara menimbang agarosa 0,6 g untuk dilarutkan ke dalam buffer TAE 1x hingga volume 60 mL
4. Larutan agarosa dididihkan hingga larut sempurna
5. Gel dituangkan ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir
6. Setelah mengeras, ambil sisir dengan hati-hati dan tempatkan gel pada chamber yang telah diisi dengan larutan buffer TAE 1x (pastikan bahwa gel terendam seluruhnya dalam TAE)
7. Siapkan kertas parafilm
8. Masukkan 10 µl sampel DNA dan 2 µl loading dye 6x ke dalam sumuran gel dengan cara mencampurkan kedua bahan tersebut terlebih dahulu secara merata pada kertas parafilm menggunakan mikropipet
9. Buatlah catatan mengenai nomor sumuran dan jenis sampel DNA yang dimasukkan

10. Hubungkan kabel dari sumber arus ke tangki elektroforesis (pastikan bahwa kabel yang tersambung ke kutub negatif berada di dekat sumuran)
11. Nyalakan sumber arus, aturlah voltase dan waktu running (100 volt dan 40 menit)
12. Keluarkan gel dari chamber kemudian rendam di dalam Etbr selama 10 menit
13. Letakkan gel di atas UV transluminator
14. Amati pita-pita DNA yang tervisualisasi

B. Penentuan Kuantitas DNA menggunakan spektrofotometer

1. Ambil 10 μl sampel DNA hasil isolasi dengan mikropipet, lalu ditambahkan dengan aquadest 1000 μl aquadest
2. Setelah dicampur, pindahkan kedalam kuvet spektrofotometer
3. Buat blanko spektrofotometer dengan kuvet berisi 1 mL aquadest
4. Absorbansi sampel dibaca dengan spektrofotometer pada $\lambda 260 \text{ nm}$, kemudian lakukan pembacaan kedua pada $\lambda 280 \text{ nm}$
5. Kemurnian DNA dapat dihitung dari nilai absorbansi $A_{260 \text{ nm}}$ dibagi $A_{280 \text{ nm}}$
6. Konsentrasi dapat dihitung dengan cara :
`
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) = $A_{260} \times \text{FP}$ (Faktor pengenceran) $\times 50 \mu\text{g/mL}$

Lembar Pengamatan



5. PREPARASI PCR

Pendahuluan

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu reaksi invitro untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer, dan dilakukan di dalam thermocycler. Metode ini dikembangkan untuk mempercepat isolasi DNA spesifik tanpa membuat dan melakukan pustaka genom. Tidak ada protokol standar reaksi PCR yang dapat digunakan untuk semua reaksi amplifikasi DNA sehingga perlu dilakukan optimasi untuk menghasilkan protokol spesifik untuk setiap reaksi. Walaupun tidak terdapat protokol standar, terdapat prinsip dasar dalam PCR yang harus selalu dipenuhi. Secara garis besar, terdapat lima komponen utama dalam PCR, yaitu:

1. Template DNA
2. Enzim DNA polymerase
3. dNTP (deoxynucleosida triphosphate): terdiri dari 4 macam basa yaitu dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP
4. Primer: sepasang DNA utas tunggal atau oligonukleotida pendek yang menginisiasi sekaligus membatasi reaksi pemanjangan rantai atau polimerisasi DNA
5. Buffer: air dan garam (Mg^{2+} dan atau K^{+}) dengan pH tertentu

PCR meliputi tiga tahapan utama, yaitu:

1. Denaturasi: untuk memisahkan DNA menjadi utas tunggal
2. Annealing: yaitu proses penempelan primer
3. Extension: yaitu proses pemanjangan DNA baru

Selain ketiga proses tersebut biasanya PCR didahului oleh *Pra-denaturation* dan diakhiri *Final extension*. Pra-denaturasi dilakukan selama 1-10 menit di awal reaksi untuk memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktifasi DNA Polymerase (pada hot-start PCR) dan Final extension umumnya dilakukan pada suhu $70-72^{\circ}C$ selama 5-15 menit untuk memastikan bahwa setiap utas tunggal yang tersisa sudah diperpanjang secara sempurna. Reaksi PCR tidak menggandakan seluruh DNA tetapi hanya mampu menggandakan DNA pada daerah tertentu dengan panjang tertentu (tergantung kondisi PCR: terutama kualitas enzim, template, dan primer). Primer yang digunakan dalam PCR beragam jenisnya tergantung tujuan yang akan dicapai.

Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu menjelaskan proses replikasi yang dilakukan dengan metode PCR

Kemampuan Akhir yang diharapkan

Setelah mengikuti praktikum ini, diharapkan mahasiswa mampu melakukan prosedur standar persiapan PCR

Alat dan Bahan

- PCR *microtube*
- Thermal cycler
- Micropipette dan tip
- Vortex
- DNA genom hasil isolasi
- PCR kit
- ddH₂O

Cara Kerja

1. Menyiapkan PCR Master Mix (DNA polimerase, buffer, air)
2. Dalam setiap *microtube*, volume PCR total adalah 20 μ L, yang terdiri atas:

Komponen	Konsentrasi dalam larutan	Volume yang dipipet dari working solution
PCR master mix	1x	10 μ l
Template DNA	60ng/20 μ l	5 μ l
Primer	50 pmol/20 μ l	5 μ l
Volume total larutan		20 μ l

Keterangan: konsentrasi DNA dan primer tergantung kondisi saat praktikum

3. PCR master mix terdiri atas:

Komponen	Konsentrasi final dalam volume PCR total
Vi Buffer A	1x
dNTP	0,08 mM
MgCl ₂	1,5 mM
DNA polymerase	2-3 Unit

4. Komponen PCR ditambahkan ke dalam *microtube* dengan cara dipipet dan ditempelkan pada dinding *microtube*. Tiap komponen ditempelkan pada sisi dinding

yang berbeda. Urutan memasukkan komponen PCR ke dalam microtube adalah sebagai berikut:

- a. PCR master mix
 - b. Primer
 - c. Template DNA
5. Setelah seluruh microtube terisi, microtube dispin/ sentrifuse untuk mengumpulkan larutan di dasar microtube. Larutan PCR dihomogenasi (dicampur) dengan cara menjentik (tapping) bagian ujung microtube dan kemudian divortex sekali lagi. Jika PCR akan ditunda, maka sample dapat disimpan pada suhu $-20^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$
 6. Masukkan *microtube* ke dalam thermal cycler
 7. Atur suhu sesuai kebutuhan
 8. Analisis hasil PCR dapat dilihat dengan elektroforesis

Lembar Pengamatan

6. ISOLASI RNA

Pendahuluan

Sel didalamnya terkandung protein, DNA dan RNA. RNA terdiri atas mRNA, tRNA dan rRNA. Asam ribonukleat (RNA) merupakan salah satu biomolekul yang memiliki beberapa fungsi berbeda. Molekul RNA adalah polimer panjang yang tidak bercabang dari gugus ribonukleotida monofosfat yang digabungkan dengan ikatan fosfodiester. Secara kimia dan biologi, molekul RNA bersifat tidak stabil terutama pada suhu tinggi dan dalam keadaan basa. Perbedaan antara DNA dengan RNA adalah RNA disusun oleh prekursor ribonukleotida sedangkan DNA disusun dari prekursor deoksiribonukleotida, pada RNA tidak terdapat basa timin tetapi sebagai gantinya adalah basa urasil, dan gugus hidroksil pada RNA bergabung dengan karbon posisi 2 pada gula ribosa sedangkan pada DNA tidak.

Asam ribonukleotida (RNA) dibentuk oleh asam deoksiribonukleotida (DNA) yang berfungsi untuk mensistesis protein di dalam inti sel. Berdasarkan letak dan fungsinya RNA dibagi tiga, yaitu *messenger RNA* (mRNA), *transport RNA* (tRNA) dan *ribosome RNA* (rRNA). mRNA berfungsi sebagai cetakan dalam sintesis protein. tRNA berfungsi untuk menterjemahkan kode-kode yang dibawa oleh mRNA. Sedangkan rRNA tersimpan dalam ribosom dan berperan aktif dalam proses sintesis protein.

Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu melakukan isolasi RNA dengan benar

Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Setelah melakukan praktikum ini, diharapkan mahasiswa dapat melakukan isolasi RNA sebagai dasar untuk sintesis cDNA

Alat dan Bahan

Alat

- Mikrosentrifus
- Microtube 1 & 2 mL
- Rak tube

Bahan

- Epitel pada rongga mulut
- ddH₂O
- DEPC
- C:I (Kloroform:Isoamilakohol)
- etanol 70%
- DNase 1mg/mL
- MOPS
- formaldehid

- Mikropipet dan tips
- Beaker glass
- inkubator

- CTAB
- β -mercaptoetanol
- litium klorida

- formamide
- EDTA

Cara Kerja

1. Korek pipi bagian dalam dengan tusuk gigi secara perlahan
2. Kemudian kumur-kumur dan masukkan ke dalam gelas ukur, kemudian ambil 1 mL dan pindahkan ke mikrotube 2 mL
3. Tambahkan 600 μ l buffer ekstraksi (CTAB ditambah 1,2 μ l β -mercaptoetanol)
4. Inkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit dan diinkubasi kembali pada suhu dingin selama 5 menit.
5. Setelah itu ditambahkan C:I (kloroform:isoamilalkohol 24:1), lalu dibolak-balik hingga tercampur rata
6. sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm 4°C.
7. Ambil supernatant (fase atas) dan ditambahkan 600 μ l fenol, lalu dibolak-balik hingga tercampur rata dan disentrifugasi kembali pada kondisi yang sama.
8. Supernatant ditambah $\frac{1}{4}$ kali volume LiCl 10 M dan diinkubasi pada suhu -20°C selama satu malam (*overnight*),
9. Sentrifugasi selama 25 menit pada kecepatan 10.000 rpm 4°C.
10. Endapan selanjutnya dicuci dengan etanol 70%,
11. disentrifugasi, dikering-udarkan, lalu diresuspensi dengan 20 μ l ddH₂O yang diperlakukan dengan 0,1% DEPC.
12. Tahapan selanjutnya yaitu penghilangan DNA kontaminan dengan menambahkan 1,1 μ l buffer DNase dan 0,2 μ l DNase.
13. Inkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C, lalu ditambahkan 1 μ l EDTA.
14. Inkubasi kembali selama 10 menit pada suhu 65°C, lalu simpan pada suhu dingin untuk menjaga kestabilan RNA total.
15. Kualitas RNA ditentukan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% dengan larutan penyangga MOPS. Sebanyak 1 μ l RNA dicampur dengan premiks (5% 20 kali MOPS, 50% formamida, 17,5% formaldehid dan 27,5% air DEPC), kemudian dielektroforesis selama 30 menit pada tegangan 100 volt.



Lembar Pengamatan



7. Real Time PCR (qPCR)

Pendahuluan

Salah satu teknik yang banyak diaplikasikan dan telah berkembang saat ini adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan alat *Thermal Cycler* PCR yang mampu mengamplifikasi fragmen DNA secara *in vitro*. Dalam perkembangannya, telah dikembangkan teknik *Realtime* PCR yang mampu mengevaluasi dan melakukan kuantifikasi secara langsung. *Realtime* PCR adalah teknik yang digunakan untuk menggandakan DNA target dari suatu organisme yang dilakukan untuk tujuan mengetahui kuantitas DNA target, melihat kuantitasnya secara relatif, ekspresi gen (kuantifikasi mRNA), deteksi keberadaan DNA target, menentukan jenis SNP (*Single Nucleotide Polimorfism*), menentukan kurva T_m (*Melting Curve*), dan melakukan skrining *High Resolution Melting* (HRM). Teknik ini dilakukan dengan mengintegrasikan teknik PCR dengan komputer dan perangkat lunak.

Berbeda dengan instrumen PCR konvensional, dengan *Realtime* PCR, kita dapat mengamati proses penggandaan DNA target secara *realtime* dari satu siklus PCR ke siklus PCR selanjutnya tanpa perlu melakukan elektroforesis untuk melihat hasilnya. Biasanya kita perlu menggunakan teknik ini apabila menginginkan deteksi yang jauh lebih sensitif dengan limit deteksi dan limit kuantifikasi yang lebih rendah, melakukan analisa kuantitatif, dan menghemat waktu dari running hingga mendapatkan data. Berikut ini macam-macam aplikasi dari *realtime* PCR:

1. Analisa kuantitatif

Pada aplikasi *realtime* PCR untuk analisa kuantitatif ini membutuhkan kurva standard dengan konsentrasi yang dipersiapkan dengan cara membuat pengenceran secara serial.

Nilai kuantitatif sampel akan diekstrapolasi secara otomatis oleh software dari persamaan regresi dari kurva standard.

2. Genotyping SNP

Pada Genotyping SNP ini dibutuhkan primer Forward dan reverse dengan 2 probe yang masing-masing akan menempel pada DNA target tipe liar dan mutan. Hasilnya berupa data cluster berupa homozigot dan heterozigot tipe liar atau mutan.

3. Melting Curve

Aplikasi Melting curve ini digunakan untuk mengetahui titik T_m ($^{\circ}\text{C}$) dari amplicon yang terbentuk. Dapat juga digunakan untuk menguji sejumlah set primer untuk mencari kombinasi terbaik untuk amplifikasi.

4. High Resolution Melting

Digunakan untuk melakukan skrining DNA target yang mempunyai lebih dari satu SNP atau untuk melihat % metilasi dari DNA target. Hasilnya merupakan kandidat untuk sekuensing untuk mengkonfirmasi sekuen nukleotida.

Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu melakukan teknik *Realtime* PCR

Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Setelah melakukan praktikum ini, diharapkan mahasiswa memahami tentang prinsip dasar, aplikasi, dan instrumentasi PCR dan *Realtime* PCR serta meningkatkan keterampilan aplikasi teknik PCR dan *Realtime* PCR.

Alat dan Bahan

- PCR microtube
- Mesin qPCR
- Micropipette dan tip
- Vortex
- Sentrifuse
- DNA genom hasil isolasi
- qPCR kit
- SYBR Green I (DNA-binding dye)/probe
- Fluorescence primer
- ddH₂O (DNAse free water)

Cara Kerja

1. Menyiapkan PCR Master Mix (dilakukan di dalam es)
2. PCR master mix terdiri atas: DNA polimerase, buffer, dNTPs, SYBR Green I/probe

3. Vortex dahulu semua reagen yang akan digunakan agar larutan homogen
4. Siapkan sampel DNA hasil ekstraksi menggunakan kit yang tersedia
5. Masukkan masing-masing 23 μ l larutan mix pada setiap PCR tube yang akan digunakan
6. Tambahkan masing-masing 2 μ l ddH₂O (kontrol negatif), kontrol positif, dan sampel DNA yang akan diuji pada PCR tube yang sudah berisi 23 μ l larutan mix
7. Tutup well menggunakan *sealing plastic* untuk PCR tube, lalu spin down untuk menurunkan larutan di bawah tube
8. Masukkan PCR *tube* ke dalam mesin *real-time* PR, lalu atur penamaan sampel dan semua parameter yang dibutuhkan
9. Atur program PCR seperti tabel di bawah ini

Tahapan	Parameter	
	Suhu	Waktu
Inisial denaturasi	95 ⁰ C	10 menit
Denaturasi	95 ⁰ C	15 detik
Annealing-ekstensi	60 ⁰ C	45 detik
Pengulangan	40 siklus	

10. Setelah proses PCR selesai, dapat langsung dilakukan analisis data

Lembar Pengamatan

DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel, *et al.* 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. Volume 1. John Wiley & Sons, Inc., New York : xxxviii + 12.10 + A1.29 + 17 halaman.
- Cowell I.A. 1997. *cDNA Library Protocols: Preparations of Competent Cells for High-Efficiency Plasmid Transformation of Escherecia coli*. Vol 69: 129-137. Humana Pr. ScienceDirect.
- Jusuf M. 2001. *Genetika 1. Struktur dan Ekspresi Gen*. CV Sagung Seto. Jakarta
- Suharsono dan Widyastuti, U. 2006. *Penuntun Praktikum Pelatihan Teknik Pengklonan Gen*. Pusat Penelitian Sumber Daya Hayati dan Bioteknologi, IPB
- Tim Pengajar Agronomi.dan Hortikultura. 2014. *Pedoman Praktikum Teknik Laboratorium Bioteknologi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul