



MODUL PRAKTIKUM

# BIOLOGI MOLEKULER



Disusun Oleh

Febriana Dwi Wahyuni, M.Si.

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI  
FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS ESA UNGGUL  
JAKARTA  
2019**

## **KATA PENGANTAR**

Dengan mengucapkan puji syukur kehadiran 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 September 2019

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. Pengenalan Alat-alat di laboratorium Biologi Molekuler .....	1
2. Isolasi DNA Bakteri .....	3
3. Elektroforesis .....	6
4. Uji Kuantitas DNA dengan spektrofotometri .....	8
5. Isolasi plasmid .....	10
6. Isolasi DNA tanaman .....	14
7. Isolasi RNA .....	18
8. Preparasi PCR .....	20
9. Purifikasi DNA dan RNA .....	23
10. qPCR .....	25
Daftar Pustaka .....	28

## TOPIK I

### PENGENALAN ALAT-ALAT LABORATORIUM BIOLOGI MOLEKULER

#### **Pendahuluan**

Biologi molekuler merupakan cabang ilmu biologi yang mempelajari segala aktivitas pada aras molekul. Pembelajaran tentang biologi molekuler akan lebih efektif apabila diikuti dengan kegiatan praktikum. Pengenalan alat-alat laboratorium merupakan langkah awal yang harus dilakukan sebelum memulai kegiatan praktikum atau penelitian biologi molekuler. Setiap alat yang ada di laboratorium mempunyai fungsi dan cara kerja yang berbeda-beda. Adapun tujuan dari topik praktikum ini adalah mahasiswa dapat memahami prinsip kerja alat-alat yang sering digunakan di laboratorium biologi molekuler, seperti mikropipet, elektroforesis, gel documentation, sentrifugasi, spektrofotometer, thermocycler dan Laminar Air Flow. Alat-alat tersebut nantinya akan sering digunakan untuk beberapa tujuan, seperti isolasi DNA, isolasi plasmid, analisis DNA secara kualitatif dan kuantitatif, serta PCR. Selain memahami prinsip kerja pada masing-masing alat, diharapkan mahasiswa juga mampu menggunakan alat-alat tersebut dengan baik dan benar sehingga meminimalisir terjadinya kerusakan alat dan data yang diperoleh lebih akurat.

#### **Kompetensi Dasar**

- Mahasiswa dapat menyebutkan dan menjelaskan fungsi alat-alat yang ada di laboratorium biologi molekuler.
- Mahasiswa dapat mengoperasikan alat-alat yang ada di laboratorium biologi molekuler dengan baik dan benar.

#### **Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam praktikum ini yaitu mikropipet, elektroforesis, gel documentation, sentrifugasi, spektrofotometer, dan thermocycler.

**Hasil Pengamatan**

<b>No</b>	<b>Nama Alat</b>	<b>Prinsip Kerja</b>

## TOPIK II

### ISOLASI DNA BAKTERI

#### 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.

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 (N<sub>2</sub>) atau pencacahan di dalam buffer ekstraksi bertujuan untuk memperluas bidang reaksi dan meningkatkan efisiensi isolasi DNA.

#### Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu melakukan isolasi DNA Bakteri dengan menggunakan kit yang sudah tersedia

## Alat dan Bahan

### Alat

- Gelas ukur 1000 mL
- Labu erlenmeyer 250 mL
- Mikropipet
- Microtube

### Bahan:

- gSYNC DNA Extraction Kit
- Bakteri *Eschericia coli*
- Medium NA
- Akuades
- Alkohol

## Cara Kerja

Metode Isolasi DNA dengan menggunakan gSYNC DNA Extraction Kit

1. Sampel terdapat di dalam tabung 1,5 mL
2. Tambahkan 200  $\mu$ l PBS dan 20  $\mu$ l Proteinase K dan campurkan dengan menggunakan mikropipet
3. Kemudian inkubasi pada suhu 60<sup>0</sup>C selama 5 menit
4. Setelah itu tambahkan 200  $\mu$ l GSB Buffer dan campurkan dengan vortex
5. Sampel kemudian diinkubasi kembali pada 60<sup>0</sup>C selama 20 menit. Tabung dibolak-balikkan setiap 5 menit.
  - Selama inkubasi, masukkan 200  $\mu$ l Elution Buffer ke dalam tabung 1,5 ml baru dan inkubasi pada 60<sup>o</sup>.
6. Tambahkan 200  $\mu$ l etanol absolut ke dalam sampel dan dicampur dengan vortex selama 10 detik
7. Letakkan GS Column ke dalam collection tube
8. Pindahkan seluruh sampel ke dalam GS Column.
9. Sentrifugasi pada 14.000 xg selama 1 menit, buang collection tube beserta larutan di dalamnya.
10. Letakkan GS column ke dalam collection tube baru.
11. Tambahkan 400 ul W1 buffer ke dalam GS Column dan sentrifugasi pada 14.000 xg selama 30 detik
12. Buang cairan yang tertampung dalam collection tube, kembalikan GS column ke collection tube kembali.
13. Tambahkan kembali W1 Buffer ke dalam GS Column sebanyak 600 ul dan sentrifugasi pada 14.000 xg selama 30 detik

14. Buang cairan yang tertampung dalam collection tube, kembalikan GS column ke collection tube.
15. Sentrifugasi GS column pack pada 14.000 xg selama 3 menit.
16. Pindahkan GS column ke tabung 1,5 ml
  17. Tambahkan 40 ul Elution Buffer ke bagian TENGAH column.
  18. Biarkan pada suhu ruang selama 3 menit, Setelah itu sentrifugasi kembali pada 14.000 x g selama 30 detik.
  19. DNA berhasil diisolasi dan dapat disimpan pada suhu -20°C

### **Lembar Pengamatan**

## TOPIK III

### ELEKTROFORESIS

#### Pendahuluan

DNA tanaman yang telah diisolasi menggunakan 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. Dalam metode elektroforesis, pita DNA genom normal akan tampak sebagai pendar tak putus pada gel agarosa setelah proses elektroforesis.

#### Kompetensi Dasar

- Mahasiswa mampu membuat gel elektroforesis
- Mahasiswa mampu menganalisis DNA dari hasil isolasi maupun PCR secara kualitatif menggunakan gel documentation

#### Alat dan Bahan

##### Alat

- Gelas ukur 1000 mL
- Labu erlenmeyer 50 mL
- Mikropipet & microtube
- Seperangkat alat elektroforesis
- UV transluminator

##### Bahan:

- DNA marker
- Sample DNA
- Agarosa
- Larutan Buffer TAE 50x
- Parafilm
- Fluorosafe DNA stain
- Loading dye 6x
- Alkohol
- Akuades

#### Cara Kerja

##### A. Pembuatan gel agarose

1. Terlebih dahulu buatlah TAE 1x sebanyak 1 liter
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  $\mu$ l sampel DNA dan 2  $\mu$ l 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

### **Lembar Pengamatan**

--

## TOPIK IV

### UJI KUANTITAS DNA DENGAN SPEKTROFOTOMETRI

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  $\lambda$  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.

#### Kompetensi Dasar

- Mahasiswa mampu mengoperasikan spektrofotometer
- Mahasiswa mampu menganalisis kualitas DNA

#### Alat dan Bahan

##### Alat

- Spektrofotometer
- Kuvet
- Mikropipet & microtube

##### Bahan:

- Sample DNA
- Alkohol
- Akuades

#### Cara Kerja

##### Penentuan Kuantitas DNA menggunakan spektrofotometer

1. Ambil 10  $\mu\text{l}$  sampel DNA hasil isolasi dengan mikropipet, lalu ditambahkan dengan aquadest 1000  $\mu\text{l}$  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 nm, kemudian lakukan pembacaan kedua pada  $\lambda$ 280 nm

5. Kemurnian DNA dapat dihitung dari nilai absorbansi  $A_{260}$  nm dibagi  $A_{280}$  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

## TOPIK V

### 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 *Eschericia 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 sirkular), *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 denaturated*, *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 perbanyakkan 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 $\mu$ g. Sedangkan untuk jumlah yang lebih besar (100-200 $\mu$ g) digunakan midi preparation dan maxi preparation untuk jumlah yang lebih besar dari 200  $\mu$ 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 dari bakteri

### **Alat dan Bahan**

#### Alat

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

#### Bahan:

- Bakteri *E. coli*
- Media pertumbuhan bakteri (LB)
- Ethanol absolut
- Ethanol 70%
- Aquadest steril

### **Cara Kerja**

DNA vektor pGAPZ $\alpha$  diisolasi menggunakan QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, USA).

1. Koloni tunggal bakteri *JM transforman* pUC19 dinokulasikan ke 25 ml medium LB cair dan diinkubasi di dalam shaker-incubator dengan kecepatan rotasi 150 rpm pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 16 jam (semalam).

2. Kultur bakteri hasil inkubasi 16 jam sebanyak 3 ml diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan  $5.700 \times g$  selama 5 menit.
3. Pelet sel diresuspensi dengan 1 ml larutan STE dan disentrifugasi dengan kecepatan  $5.700 \times g$  selama 5 menit.
4. Pelet sel bakteri diresuspensi dengan 250  $\mu$ l Buffer P1 sampai homogen.
5. Suspensi ditambah 250  $\mu$ l Buffer P2 dan diresuspensi kembali dengan cara dibolak-balik sebanyak 4-6 kali.
6. Suspensi yang dihasilkan akan berubah warnanya menjadi biru.
7. Suspensi selanjutnya ditambah 350  $\mu$ l N3 dan diresuspensi dengan cara yang sama sehingga warna suspensi kembali seperti warna awal.
8. Tahap selanjutnya tabung mikrosentrifuga disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm ( $17,900 \times g$ ) selama 10 menit.
9. Supernatan yang dihasilkan dipindah dengan cara memipet ke dalam collection tube yang dilengkapi dengan QIAprep spin column dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm ( $17,900 \times g$ ) selama satu menit.
10. Cairan yang melewati membran dibuang dan QIAprep spin column dimasukkan kembali ke dalam tabung mikrosentrifuga.
11. QIAprep spin column dicuci dengan 500  $\mu$ l PB dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama satu menit.
12. Cairan yang melewati QIAprep spin column dibuang, dan ke dalam QIAprep spin column ditambahkan kembali 750  $\mu$ l buffer PE, dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama satu menit.
13. Cairan yang melewati QIAprep spin column kembali dibuang dan disentrifugasi ulang untuk menghilangkan sisa buffer pencuci.
14. QIAprep spin column dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga 1,5 ml baru dan ditambah dengan 50  $\mu$ l buffer EB, dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama satu menit (elusi pertama).
15. QIAprep spin column dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga 1,5 ml yang lain dan ditambah dengan 50  $\mu$ l buffer EB. Tabung mikrosentrifuga beserta QIAprep spin column disentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama satu menit (elusi kedua).

16. Amatilah hasil isolasi DNA plasmid dengan melihat visualisasi sampel larutan DNA plasmid yang diperoleh menggunakan elektroforesis gel agarosa (Percobaan II)

**Lembar Pengamatan**

--

## TOPIK VI

### 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 bergabung 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 melisis membran sel juga dapat berperan dalam mengurangi aktivitas enzim nuklease yang merupakan enzim pendegradasi DNA.

Dua metode untuk mengisolasi DNA tanaman adalah metode CTAB (*cetyltrimethyl-ammonium bromide*) dan metode SDS (*sodium dodecylsulfate*). CTAB dan SDS adalah deterjen 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).

### Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu melakukan isolasi DNA tanaman dengan menggunakan kit isolasi DNA tanaman

### 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  $\pm 700$  mL ddH<sub>2</sub>O.

Turunkan pH ke 8.0 dengan menambahkan HCl ( $\pm 50$  mL).

Tera volume menjadi 1 L menggunakan ddH<sub>2</sub>O.

### **5 M NaCl**

292.2 g NaCl

Larutkan menggunakan  $\pm 700$  mL ddH<sub>2</sub>O.

Tera volume menjadi 1 L menggunakan ddH<sub>2</sub>O.

### **0.5 M EDTA**

186.12 g EDTA

Larutkan menggunakan  $\pm 700$  mL ddH<sub>2</sub>O.

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

Tera volume menjadi 1 L menggunakan ddH<sub>2</sub>O.

### **10% CTAB atau SDS**

100 g CTAB atau SDS

Larutkan menggunakan  $\pm 700$  mL ddH<sub>2</sub>O.

Tera volume menjadi 1 L menggunakan ddH<sub>2</sub>O.

## **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  $\mu$ 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 65<sup>0</sup>C selama 30 menit
6. Sampel diinkubasi di suhu ruang selama 10 menit

7. Tambahkan 700  $\mu\text{l}$  CIA ke dalam sampel dan dibolak-balik secara perlahan untuk mencampur
8. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{l}$
17. Simpan DNA pada  $-20^{\circ}\text{C}$
18. Analisis hasil isolasi DNA dapat dilakukan dengan metode elektroforesis

### Lembar Pengamatan

--

## PERCOBAAN VII

### 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 menggunakan kit Isolasi RNA

#### Alat dan Bahan

<b>Alat</b>		<b>Bahan</b>	
- Mikrosentrifus	- Vortex	- Daging ayam	- RNase
- Microtube	- Incubator	- ddH <sub>2</sub> O	- Kloroform
- Mikropipet dan tips	- Beaker glass	- isopropyl alcohol	- <i>Tripure Isolation Reagent</i>
	- Rak tube	- DEPC	

## Cara Kerja

### Tahapan Isolasi RNA dengan *Tripure Isolation Reagent*

1. 50 - 100 mg jaringan di homogenkan dengan 750  $\mu$ l Tripure.
2. Ambil 250  $\mu$ l jaringan yang sudah larut dan masukkan ke micotube
3. Inkubasi suhu ruang (15-30°C) selama 5 menit
4. Tambahkan 200  $\mu$ l kloroform per 750  $\mu$ l Tripure
5. Vortex selama 15 detik
6. Inkubasi pada suhu 30°C selama 5 menit
7. Sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 x g selama 15 menit dengan suhu 4°C.
8. Ambil fase aqueous (70% dari volume Tripure yang ditambahkan)
9. Tambahkan 500  $\mu$ l isopropyl alcohol
10. Inkubasi pada suhu 15-30°C selama 10 menit
11. Sentrifugasi 12.000 x g selama 10 menit pada suhu 4°C
12. RNA berupa endapan
13. Cuci endapan dengan 1 mL 75% etanol
14. Vortex dan sentrifugasi 7500 x g selama 5 menit pada suhu 4°C
15. Buang supernatant
16. Keringkan endapan RNA selama 5-10 menit
17. Tambahkan RNase *free water* 20  $\mu$ l
18. Simpan RNA pada suhu -20°C

## Lembar Pengamatan

--

## TOPIK VIII

### 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 mengaktivasi DNA Polymerase (pada hot-start PCR) dan Final extension umumnya dilakukan pada suhu 70-72<sup>0</sup>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
- ddH<sub>2</sub>O

### Cara Kerja

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

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

Keterangan: konsentrasi DNA dan primer tergantung kondisi saat praktikum

3. PCR master mix terdiri atas:

<b>Komponen</b>	<b>Konsentrasi final dalam volume PCR total</b>
Vi Buffer A	1x
dNTP	0,08 mM
MgCl <sub>2</sub>	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:
- PCR master mix
  - Primer
  - 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

--

## TOPIK IX

### PURIFIKASI DNA HASIL PCR

#### Pendahuluan

Kualitas DNA yang baik yang diperoleh dari hasil ekstraksi merupakan syarat dasar yang harus dipenuhi dalam studi molekuler. Untuk mendapatkan DNA dengan kemurnian yang tinggi dapat dilakukan dengan melakukan purifikasi. Begitu pula dengan amplifikasi DNA melalui teknik PCR. Apabila DNA hasil amplifikasi tersebut akan digunakan untuk analisis lebih lanjut, maka perlu dilakukan purifikasi. Prinsip dari purifikasi yaitu membersihkan hasil ekstraksi atau amplifikasi dari zat-zat lainnya. Purifikasi bisa dilakukan dari hasil PCR yang berupa cairan ataupun dari hasil elektroforesis berupa gel.

#### Kemampuan Dasar

Setelah melakukan praktikum ini, diharapkan mahasiswa mampu melakukan purifikasi hasil PCR maupun isolasi DNA dengan tingkat kemurnian yang tinggi

#### Alat dan Bahan

- GenepHlow™ Gel/PCR Kit
- Microtube
- Mikropipet dan tips
- Vortex
- Sampel DNA dari hasil elektroforesis/PCR

#### Cara Kerja

##### Purifikasi DNA dengan GenepHlow™ Gel/PCR Kit

1. Transfer 100 µl produk PCR ke microtube 1,5 mL
2. Tambahkan **Gel/PCR buffer** sebanyak 5x Volume produk PCR
3. Kemudian Vortex

*Apabila terjadi perubahan warna dari kuning menjadi ungu, tambahkan 10 µl sodium asetat 3M (pH 5) dan campurkan secara merata.*

4. Tempatkan **DFH Column** ke 2 mL tube koleksi
5. Pindahkan sampel ke **DFH Column**

6. Sentrifugasi 14-16.000 x g selama 30 detik
7. Buang supernatant
8. Kembalikan **DFH Column** ke dalam tube koleksi
9. Tambahkan **600 µl Wash Buffer** ke dalam **DFH Column**
10. Biarkan selama 1 menit
11. Sentrifugasi 14-16.000 x g selama 30 detik
12. Buang supernatant
13. Kembalikan **DFH Column** ke dalam tube koleksi
14. Sentrifugasi ualng 14-16.000 x g selama 3 menit untuk mengeringkan kolom
15. Pindahkan DFH Column ke dalam microtube 1,5 mL
16. Tambahkan 20-50 µL Elution buffer di tengah DFH column
17. Diamkan selama 2 menit
18. Sentrifugasi 14-16.000 x g selama 2 menit
19. Simpan hasil purifikasi ke dalam freezer

### Lembar Pengamatan

--

## TOPIK X

### 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 mengoperasikan mesin qPCR
- Mahasiswa mampu melakukan analisis dari hasil qPCR

## **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
- ddH<sub>2</sub>O (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  $\mu\text{l}$  larutan mix pada setiap PCR tube yang akan digunakan
6. Tambahkan masing-masing 2  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O (kontrol negatif), kontrol positif, dan sampel DNA yang akan diuji pada PCR tube yang sudah berisi 23  $\mu\text{l}$  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 <sup>0</sup> C	10 menit
Denaturasi	95 <sup>0</sup> C	15 detik
Annealing-ekstensi	60 <sup>0</sup> 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