

**MODUL PRAKTIKUM
REKAYASA GENETIKA (IBT 441)**



TIM PENGAJAR:

Seprianto, M.Si



**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
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 Rekayasa Genetika**”.

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 Agustus 2017

Tim Penyusun

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	2
DAFTAR ISI.....	3
PENDAHULUAN.....	4
Percobaan 1. Deteksi Cendawan Patogen Pada Tanaman (Isolasi DNA).....	6
Percobaan 2. Deteksi Cendawan Patogen Pada Tanaman 2.....	9
Percobaan 3. Amplifikasi Daerah ITS pada Ribosom Tanaman.....	11
Percobaan 4. Amplifikasi Daerah 16S rRNA pada Genom Bakteri.....	13
Percobaan 5. Pembuatan sel Kompeten <i>E .coli</i> DH5 α	17
Percobaan 6. Ligasi dan Transformasi Gen 16S rRNA dalam <i>E .coli</i> DH5 α	20
Percobaan 7.PCR Koloni Transforman.....	24
Percobaan 8. Isolasi Plasmid Rekombinan.....	26
Percobaan 9. Pemotongan Plasmid dengan Enzim Restriksi.....	29

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Bioteknologi berasal dari kata bio yang berarti makhluk hidup dan teknologi yang berarti sesuatu yang memudahkan manusia. Bioteknologi merupakan pemanfaatan bahan-bahan atau proses-proses biologi untuk memecah masalah atau menghasilkan produk yang berguna. Bioteknologi mencakup seluruh pemanfaatan organisme untuk kepentingan manusia. Produk bioteknologi yang sudah dikenal dalam kehidupan sehari-hari adalah tempe, yoghurt, dan nata. Saat ini pengertian bioteknologi telah bergeser pada hal-hal yang berkaitan dengan rekayasa genetika organisme serta rekombinasinya. Teknologi DNA atau rekayasa genetika merupakan kesinambungan dari proses yang terjadi secara alami di alam dengan menggunakan sains dan teknologi baru. Genetically Modified Organism (GMO) atau organisme transgenic merupakan organisme yang telah mengalami modifikasi bahan genetik, sehingga secara sederhana semua organisme merupakan GMO karena dalam proses reproduksinya terjadi pencampuran bahan genetik kedua inangnya.

Praktikum Rekayasa Genetika merupakan bagian dari mata kuliah Rekayasa Genetika yang bertujuan untuk memberikan pemahaman kepada mahasiswa tentang teknis dalam praktek dilaboratorium yang berkaitan dengan isolasi DNA, identifikasi bakteri secara molekuler, marka molekuler, deteksi gen tertentu dari whole genom pada bakteri atau tanaman, pembuatan sel kompeten pada *E coli*, transformasi gen kedalam vektor, pemotongan vektor rekombinan dengan beberapa enzim restriksi serta beberapa praktek lainnya yang berkaitan dengan rekayasa genetika. Didalam buku panduan ini akan diulas topik – topik yang sudah menjadi ketetapan dalam Rencana Pembelajaran Studi (RPS) praktikum rekayasa genetika yang telah disusun sebelumnya. Topik yang diulas merupakan topik awal yang akan menjadi stimulus untuk mahasiswa dalam mendalami kemampuan melakukan pekerjaan didalam laboratorium dalam hal praktek maupun untuk penelitian dalam menyelesaikan tugas akhir. Semoga ilmu yang sedikit ini memberikan manfaat dan akan terus berguna untuk selanjutnya.

B. Tujuan dan Manfaat Praktikum

Praktikum ini bertujuan untuk memperkenalkan metode – metode yang berkaitan dengan teknis dalam penelitian rekayasa genetika

C. Manfaat Praktikum Rekayasa Genetika

- ✓ Mahasiswa terampil dalam menggunakan teknik-teknik laboratorium yang telah diajarkan untuk memanipulasi organisme hidup
- ✓ Mahasiswa dapat memahami berbagai jenis vektor kloning dan vektor ekspresi berbasis bakteri dan virus DNA.
- ✓ Memahami dan mencoba berbagai metoda ekstraksi DNA dan RNA dengan berbagai keterbatasan dan kelebihan.
- ✓ Mampu melakukan kloning gen dan menganalisis hasil kloning dengan menggunakan berbagai teknik molekuler.
- ✓ Memahami berbagai strategi untuk melakukan kloning gen dan genomik DNA seperti pembuatan pustaka genomik dan pustaka cDNA dan teknik identifikasinya.
- ✓ Memahami teknik-teknik transformasi genetik untuk mikroorganisme, tanaman, hewan dan berbagai keterbatasan dan kelebihan.

TATA TERTIB PRAKTIKUM REKAYASA GENETIKA

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 dipakai 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 DETEKSI CENDAWAN PATOGEN PADA TANAMAN

1. ISOLASI DNA TANAMAN "METODE CTAB DAN DNA ISOLATION KIT

A. Pendahuluan

Pada dasarnya sel mengandung dua asam nukleat, yaitu DNA dan RNA. DNA yang terdapat di inti sel adalah DNA kromosomal, DNA yang terdapat di luar inti sel atau sitoplasmik adalah DNA ekstrakromosomal, yaitu DNA mitokondria, DNA kloroplas, DNA plasmid. Proses denaturasi dan renaturasi molekul DNA tergantung pada banyaknya faktor, beberapa diantaranya adalah temperatur, pH, konsentrasi iso elektrolit dan rasio (GC:AT). Temperatur, T- melting (T_m) yang tinggi menyebabkan untai ganda (double helix) DNA akan terurai menjadi untai tunggal (single helix). Apabila temperatur ini diturunkan secara perlahan maka akan terjadi renaturasi menjadi untai ganda DNA kembali seperti semula. pH (derajat keasaman) yang ekstrim pun (pH < 3, atau pH > 10) dapat menyebabkan DNA terdenaturasi. Konsentrasi iso elektrolit seperti Na⁺ dan K serta makin tinggi rasio kandungan basa nukleotida (GC:AT) maka akan memperlambat proses denaturasi DNA.

Untuk memperoleh isolate DNA dari sampel ada beberapa hal yang harus diperhatikan dan dilakukan secara benar (Fatchiyah dkk, 2008), yaitu

1. Pemecahan dinding sel atau jaringan yang DNA-nya akan di isolasi. Pemecahan dinding sel yang sering dilakukan adalah dengan menggunakan bahan kimia. Sel dirusak dengan buffer lysis yang mengandung senyawa kimia yang dapat merusak interitas barrier dinding sel. Senyawa kimia yang umumnya digunakan adalah lysosim, CTAB (*cetyl-trimethyl-ammonium bromide*), Tris-Cl, atau detergen, SDS (sodium dodecyle sulphate)
2. Debris sel dipisahkan dari larutan DNA
3. Presipitasi RNA dan protein agar diperoleh DNA yang murni
4. Presipitasi DNA dengan ethanol dingin dan garam (Na-asetat)
5. Pemurnian DNA dari ekstrak sel dengan menggunakan bahan kimia (fenol, fenol: kloroform, isopropanol, fenol:kloroform: isoamyl alcohol)
6. Pemurnian DNA dari kontaminan protein menggunakan enzim protease yaitu Pronase atau proteinase- K; dan kontaminan RNA dengan menggunakan RNase. Pemisahan DNA dari molekul RNA dan protein dapat dilakukan dengan menggunakan densitas gradient sentrifugasi CaCl₂, Selain itu menggunakan garam dengan konsentrasi tinggi, misalnya 0.25M sodium acetate atau 0.1M sodium chloride
7. Presipitasi akhir DNA dapat dilakukan dengan menggunakan ethanol dingin dibawah kondisi ionic yang kuat. Dan dicuci dengan EtOH 70%
8. Pellet DNA dilarutkan dengan buffer TE (Tris -EDTA) atau ddH₂O steril.

Jaringan tanaman yang akan di preparasi DNA-nya, harus diperlakukan lebih dahulu dalam nitrogen cair (N₂) dan segera dilakukan penggerusan supaya diperoleh ekstrak sel yang halus. Kemudian ekstrak sel diperlakukan dengan ekstrak buffer yang dicampur dengan-mercaptoethanol (fresh) dan selanjutnya seperti pada jaringan organisme lain.

B. Tujuan

Setelah mengikuti praktikum ini, praktikan diharapkan mampu menyiapkan bahan/sampel tanaman, menyiapkan buffer yang digunakan untuk isolasi DNA dan melakukan prosedur standar isolasi DNA dengan metode CTAB dan DNA Isolation kit)

C. Alat dan Bahan

Bahan	Alat
1. Daun tanaman yang terinfeksi jamur patogen	1. Gunting steril
2. Daun tanaman sehat	2. Mortar dan pestle
3. Nitrogen cair	3. Microtube
4. Buffer lisis CTAB	4. MicroCentrifuge 4 °C
5. DNA isolation Kit	5. Mikropipet
6. Aquades	6. Water bath 65 °C dan 95 °C
7. isopropanol dingin	
8. CIA (Cloroform: isoamyl alcohol 24:1)	
9. Etanol absolut	
10. Alkohol 70%	

Preparasi Buffer CTAB

No	Komponen	Konsentrasi Lar stok	Konsentrasi lar final
1	Tris HCL pH8	0.5 M	0.1
2	NaCl	5 M	1.4
3	EDTA	5 M	0.02
4	CTAB	10 %	2%

D. Cara Kerja

1. Metode Isolasi DNA menggunakan CTAB

1. Sampel daun tanaman diambil dengan menggunakan gunting yang telah di bilas dengan alkohol 70%
2. Sampel (1- 2 g) digerus didalam mortar menggunakan pestle dan nitrogen cair
3. Buffer Ekstraksi CTAB sebanyak 1 ml ditambahkan kedalam mortar dan digerus hingga homogen
4. Sampel dipindahkan ke dalam 1.5 ml mikrotub menggunakan pipet yang telah dipotong ujungnya
5. Inkubasi mikrotube kedalam waterbath dengan suhu 65 °C selama 30 menit (setiap 10 menit dibolak balik)
6. Sampel diinkubasi suhu ruang selama 10 menit
7. Sebanyak 700 µL CIA ditambahkan ke dalam sampel dan dibolak balik secara perlahan-lahan agar bercampur merata
8. Sampel disentrifugasi dalam kecepatan 10.000 – 15.000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit
9. Larutan DNA (bewarna bening bagian atas) akan memisah dengan larutan kloroform (bewarna hijau)
10. Fase atas (±650 µL) dipindahkan ke dalam mikrotub yang baru
11. Tambahkan Kloroform 1x volume supernatan (bolak balik)
12. Sentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm, dan ambil supernatan bagian atas dan pindahkan ke mikrotub yang baru

13. Tambahkan isopropanol dingin sebanyak 0.7x volume supernatan dan 0,1 volume Na acetat (3M pH 5) tujuan untuk penguapan DNA
14. Inkubasi 10 menit pada suhu ruang
15. Sentrifugasi dalam kecepatan 8000 rpm pada suhu 4 °C selama 15 menit
16. Buang supernatan dan Endapan pelet DNA dicuci dengan alkohol 70% sebanyak 700 µL
17. Sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit (ulangi 1x)
18. Pelet dikering anginkan pada suhu ruang atau menggunakan vacum
19. DNA dilarutkan dengan ddH₂O atau TE buffer sebanyak 50 – 100 µL
20. DNA disimpan pada suhu -20 °C

2. Metode Isolasi Menggunakan KIT protokol (Sigma, Modifikasi)

Cara Kerja

- a. Larutan ekstraksi sebanyak 100 µL disiapkan dalam mikrotub 2 mL
- b. Sebagian kecil jaringan tanaman (misal ujung daun) diambil menggunakan gunting dan dimasukkan ke dalam mikrotub berisi larutan ekstraksi (vortek secukupnya, sampel harus dalam keadaan terendam)
- c. Mikrotube direndam di dalam waterbath bersuhu 95 °C selama 5 menit
- d. Larutan dilusi ditambahkan sebanyak 100 µL dan vortek secukupnya
- e. Aquades ditambahkan sebanyak 300 µL
- f. Larutan dipindahkan ke mikrotub 1.5 mL baru (usahakan sisa daun tidak terbawa)
- g. Sebanyak 200 µL CIA ditambahkan dan divortek secukupnya
- h. Sampel disentrifugasi dalam kecepatan 10.000 – 15.000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 – 15 menit
- i. Supernatan dipindahkan ke mikrotub 1.5 mL baru
- j. Etanol absolut ditambahkan sebanyak 2x volume supernatan
- k. Jika suspensi/ gumpalan lendir tidak terlihat, sampel diinkubasi pada -20 °C selama 10 menit
- l. Sampel disentrifugasi dalam kecepatan 8000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit
- m. Supernatan dibuang (DNA berupa endapan pada dasar mikrotub) .
- n. Kering anginkan endapan DNA pada suhu ruang 15 – 20 menit atau menggunakan vacum.
- o. Pelet DNA dilarutkan dengan menggunakan ddH₂O atau TE buffer sebanyak 50 – 100 µL dan disimpan pada -20 °C

PERCOBAAN II
DETEKSI CENDAWAN PATOGEN PADA TANAMAN

2. Kuantifikasi dan Cek Kualitas DNA dengan Nanoquant DNA dan Elektroforesis

A. Pendahuluan

DNA tanaman yang telah diisolasi menggunakan metode CTAB dan Kit Isolasi DNA maupun metode lainnya, harus terlebih dahulu dihitung konsentrasinya maupun dicek kualitasnya sebelum dapat dipergunakan dalam proses selanjutnya. Tujuan dari perhitungan konsentrasi dan cek kualitas DNA adalah untuk menjamin bahwa jika ada kegagalan dalam proses selanjutnya (misal PCR atau genomic southern hybridization) bukanlah akibat rendahnya kualitas dan kualitas DNA

Perhitungan Kuantitas (Konsentrasi) DNA dapat dilakukan dengan metode spektrofotometer. 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} (A_{260} / A_{280}) atau dengan nilai 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 pendaran tak putus pada gel agarose setelah proses elektroforesis.

B. Tujuan

Setelah mengikuti praktikum ini praktikan diharapkan mampu mempersiapkan gel agarose untuk elektroforesis, mengukur kualitas DNA dengan menghitung konsentrasi DNA melalui metode spektrofotometer dan elektroforesis

C. Alat dan Bahan

Bahan DNA genom hasil isolasi praktikum sebelumnya Aquabides Agarose Buffer TAE Ethidium Bromide (EtBr) atau staining Syber green Loading dye Marker 1 Kb DNA Ladder	Alat Nanoquant spektrofotometer Elektroforesis Chamber Mikropipet Mikrotub Gel Doc
--	---

E. Cara Kerja

Mempersiapkan Larutan Kerja dan Pembuatan Gel Agarose

1. Siapkan 500 mL *Running Buffer* (TAE 1X)

Buat larutan pengenceran larutan TAE 10x menjadi TAE 1x dengan aquades dengan rumus pengenceran

$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

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

B. Penentuan Kuantitas DNA Menggunakan Nanoquant DNA

Pengukuran Kosentrasi dan Kemurnian DNA dengan menggunakan *Infinite M200 PRO Nanoquant*

Catatan: prosedur kerja akan di jelaskan oleh laboran dan catat tahap demi tahap

A. Penentuan Kualitas DNA melalui Elektroforesis

- B. 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.
- C. 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.
- D. 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
- E. 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.
- F. 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

PERCOBAAN III
DETEKSI CENDAWAN PATOGEN PADA TANAMAN

1. Amplifikasi Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA RIBOSOM PADA CENDAWAN

A. Pendahuluan

Sekarang ini dikembangkan pendekatan molekuler sebagai metode baru untuk mendeteksi dan mengidentifikasi suatu organisme yang lebih cepat dan tepat. Dengan pendekatan tersebut memungkinkan untuk mendeteksi cendawan yang bersifat patogen pada tanaman dengan teknik sederhana dan akurat. Selanjutnya pendekatan molekuler pada berbagai bidang penelitian semakin dipermudah dengan ditemukannya metode PCR oleh Kary Mullis untuk mengaplikasikan DNA secara invitro. Perbedaan profil fragmen DNA hasil amplifikasi dengan PCR dapat digunakan sebagai petunjuk adanya perbedaan pada organisme yang mampu membedakan antara genus, spesies bahkan genotipe spesifik dari patogen

Cendawan merupakan organisme yang heterotrofik. Gen cendawan yang pertama kali disekuen adalah subunit kecil gen rRNA dan daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer region*) yang dapat dijadikan target analisis identifikasi dan keragaman genetik. Keanekaragaman genetika dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Daerah ITS merupakan DNA yang paling banyak di sekuen pada cendawan. Daerah ini secara khusus telah dimanfaatkan untuk menentukan sistematika molekuler pada tingkat spesies, dan juga dalam satu spesies. Hal ini digunakan karena daerah ITS memiliki tingkat variasi yang tinggi dibandingkan daerah lainnya pada rDNA sub unit kecil dan sub unit besar. Metode amplifikasi dengan PCR dan selanjutnya melakukan dengan analisis sekuen DNA dapat digunakan dalam menurunkan primer spesifik untuk mengetahui perbedaan ukuran fragmen DNA dari beberapa spesies yang akan dideteksi. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan analisis daerah ITS hasil amplifikasi PCR untuk menurunkan primer spesifik

B. Tujuan Praktikum

- ✓ Mahasiswa dapat memahami teknik Identifikasi dan menganalisis daerah ITS pada Cendawan
- ✓ Mahasiswa dapat melakukan deteksi patogen yang menginfeksi tanaman

C. Alat dan Bahan

Bahan	Alat
DNA Tanaman yang terinfeksi	Micropipete
DNA tanaman sehat	Microtube
Agarose	Microwave
ddH ₂ O	Mesin PCR
Master Mix PCR	Freezer
Loading Dye	Electrophoresis BioRad
Marker 1 Kb DNA Ladder	UV trans Illuminator (Gel Doc)
Buffer TAE 1x	
primer ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')	
Primer ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')	

D. Cara Kerja

Amplifikasi Daerah ITS dengan Teknik PCR

Komposisi mix PCR untuk volume total 25 μ L

PCR Master mix	: 12,5 μ L (setengah dari volume total)
Primer ITS1	: 1 μ L
Primer ITS4	: 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 3 menit
Denaturasi	: 95 °C 30 detik
Annealing	: 52 °C 30 detik
Axtension	: 72 °C 2 menit
And Axtension	: 72 °C 5 menit
Cooling	: 4 °C pause

Running pada Mesin Thermocycler (PCR)

Tahapan penggunaan Mesin PCR dapat dilihat pada Instruksi Kerja Alat (IKA) yang ada di laboratorium

Elektroforesis dan Pengamatan Hasil PCR

Cara Kerja :

- ✓ Agarose yang telah mengeras dimasukkan kedalam dalam wadah/ bak elektroforesis dan direndam keseluruhan dalam buffer TAE 1x.
- ✓ Pada lubang pertama pada gel dimasukkan marker DNA (ladder 1 kb) diikuti DNA hasil PCR dengan mencampurkan 1 μ l loading dye untuk tiap sampel pada kertas parafin.
- ✓ Ambil 5 μ l dari tiap sampel DNA kemudian campurkan dengan baik menggunakan mikropipet.
- ✓ Tuangkan masing – masing campuran tersebut pada lubang sumuran yang tersedia.
- ✓ Switch dinyalakan dengan tegangan 100 V selama 30 menit. Kemudian gel diangkat dimasukkan ke dalam ethidium bromide selama 10 menit.
- ✓ Gel yang berisi visualisasi fragmen DNA diangkat lalu diletakkan di atas UV Trans Illuminator, Amati pita DNA yang muncul dan didokumentasikan

PERCOBAAN IV
Amplifikasi Gen 16S rRNA pada Genom Bakteri

A. Pendahuluan

Studi keanekaragaman genetik pada prinsipnya bertujuan untuk mengkaji komposisi genetik individu di dalam atau antar populasi dan untuk mengetahui faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya modulasi atau dinamika keanekaragaman genetik dari populasi tersebut. Secara umum keanekaragaman genetik pada suatu populasi dapat terjadi karena gen mengalami mutasi, rekombinasi, dan perpindahan sekelompok populasi dari suatu tempat ke tempat yang lain.

Di antara berbagai teknik yang digunakan, RNA ribosomal paling banyak digunakan sebagai penanda molekuler. Pada prokaryota terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Di antara ketiganya, 16S rRNA yang paling sering digunakan. Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan analisis. Analisis gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan filogenetik dan menganalisis suatu ekosistem.

Sejalan dengan itu, maka untuk identifikasi dan klasifikasi mikroorganisme haruslah diketahui terlebih dahulu karakteristik atau ciri – ciri mikroorganisme tersebut salah satunya bakteri. Oleh karena itu ukurannya yang sangat kecil, sangat menyulitkan dalam identifikasi. Skrining bakteri menggunakan teknik sekuens 16S rRNA merupakan suatu teknik moderen dalam mengidentifikasi suatu spesies organisme. Teknik ini dilakukan dengan menganalisa struktur atau susunan basa DNA yang terdapat di daerah subunit pada 16S rRNA

B. Tujuan Praktikum

- ✓ Mengetahui teknik mengisolasi DNA genom Bakteri, serta cara menghitung kemurnian DNA bakteri
- ✓ Mahasiswa mengetahui ukuran partial gen 16S rRNA berdasarkan primer 16S rRNA Universal
- ✓ Untuk mengetahui karakteristik molekuler dari bakteri dan dapat mengidentifikasi dengan 16S rRNA

C. Alat Dan Bahan

Bahan	Alat
Kit Extraction DNA Bacteria (Genaid)	Micropipete
Kit High Pure PCR Product Purification	Microtube
Buffer Lisis CTAB	Microwave
PCI (Phenol Chloroform Isoamylalcohol)	Mesin PCR
Kultur cair sel bakteri	Freezer
Agarose	Electrophoresis BioRad
Natrium asetat (NaOAc)	UV trans Iluminator (Gel Doc)
ddH ₂ O	
Master Mix PCR	
Loading Dye	
Marker 1 Kb DNA Ledder	
Buffer TAE 1x	

27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')
1492R (5'CGGTTACCTTGTTACGACTT-3')

D. Cara Kerja

Isolasi DNA Genom Bakteri

Metode KIT

Metode Penggunaan KIT untuk Ekstraksi DNA ada pada Protokol KIT (Kit Extraction DNA Bacteria (Genaid))

Metode CTAB

1. Kultur cair bakteri dimasukkan kedalam mikro tube 1,5 ml, kemudian disentrifuse menggunakan Homogenizer dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit hingga didapat pellet 50-100 mg.
2. Cairan supernatan dibuang dan tambahkan 600 µl CTAB, menginkubasi sampel pada suhu 65°C selama 15-30 menit.
3. Tambahkan 600 µl larutan Chloroform Isoamylalcohol (CI) (24:1), membolak-balik secara perlahan (8x).
4. Sentrifuge sampel dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C.
5. Supernatan diambil dan tambahkan PCI (Phenol Chloroform Isoamylalcohol) (25:24:1) sebanyak 1x volume supernatan yang didapat, kemudian membolak-balik sampel secara perlahan
6. Sentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C.
7. Supernatan diambil dan ditambahkan 0,1x volume supernatan Natrium asetat (NaOAc) pH 5,2 kemudian menambahkan etanol 100% sebanyak 2x volume supernatan. Mempresipitasi sampel selama 2 jam pada freezer (-20 °C)
8. Sentrifugasi sampel dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C.
9. Supernatan dibuang dan pellet yang tertinggal dicuci dengan 500 µl etanol 70%
10. Sentrifugasi sampel dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Buang supernatan dan kering anginkan pellet DNA selama 10 – 15 menit atau menggunakan vacum dryer selama 10-15 menit
11. Tambahkan 50 µl ddH₂O.
12. Tambahkan RNase sebanyak 0,2x volume ddH₂O dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C.
13. Tahap berikutnya menginaktifkan RNase selama 10 menit pada suhu 70 °C.
14. Setelah mendapatkan DNA total untuk melihat hasil visualisasi DNA dengan gelelektroforesis hasil isolasi DNA Genom menggunakan agarose 1% dengan tegangan 100 volt selama 30 menit menggunakan buffer TAE 1x

Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan primer Universal

Komposisi mix PCR untuk volume total 20 µL

PCR Master mix	: 10 µL (setengah dari volume total)
Primer 27F	: 0.5 µL
Primer 1492R	: 0.5 µL
DNA template	: 1 µL
ddH ₂ O	: 8 µL

Siklus PCR yang digunakan 30x siklus

Pre-denaturasi	: 94 °C 3 menit	
Denaturasi	: 94 °C 30 detik	
Annealing	: 55 °C 30 detik	
Axtension	: 72 °C 1 menit	
And Axtension	: 72 °C 5 menit	
Cooling	: 4 °C	pause

Running pada Mesin Thermocycler (PCR)

Tahapan penggunaan Mesin PCR dapat dilihat pada Instruksi Kerja Alat (IKA) yang ada di laboratorium

Elektroforesis dan Pengamatan Hasil PCR

Cara Kerja :

- ✓ Agarose yang telah mengeras dimasukkan ke dalam wadah/ bak elektroforesis dan direndam keseluruhan dalam buffer TAE 1x.
- ✓ Pada lubang pertama pada gel dimasukkan marker DNA (ladder 1 kb) diikuti DNA hasil PCR dengan mencampurkan 1 µl loading dye untuk tiap sampel pada kertas parafin.
- ✓ Ambil 5 µl dari tiap sampel DNA kemudian campurkan dengan baik menggunakan mikropipet.
- ✓ Tuangkan masing – masing campuran tersebut pada lubang sumuran yang tersedia.
- ✓ Switch dinyalakan dengan tegangan 100 V selama 30 menit. Kemudian gel diangkat dimasukkan ke dalam ethidium bromide selama 10 menit.
- ✓ Gel yang berisi visualisasi fragmen DNA diangkat lalu diletakkan di atas UV Trans Illuminator, Amati pita DNA yang muncul dan didokumentasikan

Purifikasi DNA Hasil PCR dari Gel Agarose

Bahan yang digunakan untuk purifikasi (*Kit High Pure PCR Product Purification Qiagen, made in Japan*), terdiri dari tiga larutan, yaitu larutan 1 (*Binding Buffer*) yang berfungsi mencairkan gel agarose; larutan 2 (*Washing Buffer*) untuk mencuci DNA; dan larutan 3 (*Elution Buffer*) untuk melepaskan DNA dari matriks pengikat DNA. Purifikasi dilakukan pada gel elektroforesis berkonsentrasi 1 %.

Langkah Kerja

- ✓ Tabung 1,5 ml kosong yang akan digunakan ditimbang.
- ✓ Gel agarose yang mengandung fragmen DNA dipotong, lalu dimasukkan ke tabung yang sudah ditimbang.
- ✓ Tabung yang sudah berisi gel kembali ditimbang. Selisih berat tabung yang berisi gel dengan berat kosong (berat gel ± 300mg) dihitung. Lalu ditambahkan 500 µL buffer (larutan 1) pada sampel dan campur dengan cara divorteks.
- ✓ Inkubasi pada 55-60⁰ C selama 10-15 menit sampai semua agarose larut
- ✓ Setelah gel larut, sampel didinginkan hingga suhu ruang.

- ✓ DF kolom ditempatkan pada tabung 2 ml. Sampel dipindahkan ke DF kolom (lebih dari 700 μ L), lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.
- ✓ Buang larutan dari tabung 2 ml kemudian tempatkan kembali DF kolom pada tabung 2 ml.
- ✓ Tambahkan 600 μ L *wash buffer*, lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.
- ✓ Larutan dibuang dari tabung 2 ml, kemudian tempatkan kembali DF kolom pada tabung 2 ml. Kembali disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit.
- ✓ DF kolom dipindahkan ke tabung 1,5 ml yang baru.
- ✓ DNA dielusi dengan menambahkan 30-50 μ l *elution buffer* di tengah-tengah membran DF kolom, lalu diinkubasi selama 2 menit. Disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit lalu DNA disimpan pada suhu 4 $^{\circ}$ C. DNA siap digunakan

PERCOBAAN V
TRANSFORMASI DAN ANALISIS KLONING GEN 16S PADA BAKTERI *Escherichia Coli* DH5 α

1. PEMBUATAN SEL KOMPETEN

A. Pendahuluan

Teknologi rekayasa genetika kini sudah semakin canggih, kalau dulu rekayasa dilakukan dengan memindahkan gen dari satu organisme ke organisme lainnya dengan teknik kloning, maka sekarang gen sudah bisa disintesis secara artifisial di laboratorium. Bahkan banyak perusahaan yang menawarkan jasa sintesis gen ini dengan harga relatif murah. Dalam teknologi rekayasa tidak terlepas dari transformasi gen yang merupakan penyisipan DNA dalam organisme organisme hidup yang menjadi pembawa gen dengan ekspresi materi genetik asing yang masuk melalui dinding sel.

Pada praktikum ini, kita dapat membuat suatu bakteri menjadi kompeten (istilah untuk bakteri yang siap bertransformasi), bakteri yang digunakan adalah *Escherichia coli* DH5 α yang merupakan bakteri gram negatif yang sensitif terhadap pengaruh hambatan pertumbuhan antibiotik ampisilin dan tetrasiklin. Pengambilan pada phase log sel bakteri mampu mengambil DNA pada lingkungan dengan mendinginkannya pada larutan yang mengandung kation divalen seperti Ca²⁺ untuk membuat dinding sel menjadi permeable dan dapat dilalui oleh DNA plasmid. Seleksi terhadap sel-sel transforman merupakan faktor kunci dalam keberhasilan metode yang dikembangkan untuk transformasi genetik. Untuk itu pada DNA plasmid yang kita transformasikan harus ada gen penyandi antibiotik resisten agar bakteri hostnya menjadi tahan hidup di media yang mengandung antibiotik. Jadi bakteri yang tidak berhasil disusupi oleh plasmid akan mati dengan sendirinya

Tidak semua bakteri dapat menjadi objek dari transformasi, hanya sel kompeten bakteri yang dapat digunakan. Sel kompeten adalah bakteri yang telah diberi perlakuan fisika atau kimia yang meningkatkan kemampuannya untuk menerima DNA rekombinan. Pembuatan kompeten sel dapat dilakukan dengan metode penambahan CaCl₂ atau dengan penambahan DMSO/metode TSS. Sel kompeten harus di panen pada Log-fase dan disimpan pada temperatur dingin (-80°C), karena akan menurunkan kualitas kompeten sel jika dibiarkan dalam temperatur ruang.

B. Tujuan Praktikum

- ✓ Mahasiswa dapat memahami prosedur pembuatan sel kompeten *E. coli* Top 10/ *E. coli* DH5 α

B. Alat dan Bahan

Bahan	Alat:
1. Kultur sel <i>E. coli</i> Top 10 / <i>E. coli</i> DH5 α	Inkubator shaker
2. Media LB Cair (luria Bertani)	Waterbath shaker
3. Media LB padat	Facon Tube 15 ml
4. Gliserol 10%	Erlemeyer
5. CaCl ₂	Spektrofotometer
6. DMSO	Mikrotube
7. Nitrogen Cair	Sentrifugator cold

1. Cara Kerja

Pembuatan Media Cair Luria Bertani

Komposisi dalam 100 mL Akuades		100 mL	500 mL
✓ NaCl	1%	1 gr	5 gr
✓ Trypton	1%	1 gr	5 gr
✓ Yeast Ekstrak	0,5%	0,5 gr	2,5 gr
✓ Bacteriological Agar	2%	2 gr	10 gr

*Jika media cair, tanpa ditambahkan Agar

Semua Bahan di larutkan kedalam akuades 500 mL menggunakan erlemeyer 1 L, cek kondisi pH media sampai keadaan netral (pH 7), jika asam, dapat ditambahkan NaOH secara perlahan – lahan. Media siap di sterilisasikan dengan Autoclaf. Sebelum dituang kedalam petridisk, media dipastikan dalam kondisi hangat – hangat kuku (55 °C). Jika Media diberi kandungan antibiotik *ampicilin 100 µL/mL*. Maka dapat ditambahkan ampicilin 500 µL dan media siap didistribusikan ke dalam petridisk.

Pembuatan sel kompeten dengan Metode CaCl₂

1. Kumpul sel bakteri *E. coli* DH5α kedalam 10 ml media LB cair selama 24 jam (over night) pada Waterbath shaker dengan suhu 37 °C
2. Ambil sebanyak 5 mL dan pindahkan kedalam media LB cair yang baru 100 ml
3. Inkubasi selama 2 – 3 jam hingga OD (optical Density) mencapai OD₆₀₀ = 0,4 – 0,8 pada inkubator shaker dengan suhu 37 °C
4. Sebanyak 1,5 ml kultur bakteri *E. coli* DH5α dimasukan ke dalam mikrotub 2 ml dan diinkubasi dalam ice box selama 10 menit
5. Sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit.
6. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal dalam mikrotub diresuspensi dengan 495 µl TFB (CaCl₂)
7. Inkubasi kembali dalam ice box selama 10 menit
8. Sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 4 °C.
9. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal ditambahkan 125 µl TFB (CaCl₂) dan 8, 8 µl DMSO dan inkubasi dalam ice box
10. Sel *E. coli* DH5α siap digunakan untuk transformasi

Pembuatan Sel Kompeten dengan metode Gliserol

1. Kumpul sel bakteri *E. coli* DH5α kedalam 10 ml media LB cair selama 24 jam (over night) pada Waterbath shaker dengan suhu 37 °C
2. Ambil sebanyak 5 mL dan pindahkan kedalam media LB cair yang baru 100 ml
3. Inkubasi selama 2 – 3 jam hingga OD (optical Density) mencapai OD₆₀₀ = 0,4 – 0,8 pada inkubator shaker dengan suhu 37 °C
4. Cek OD (Optical Density) dengan menggunakan spektrofotometer
5. Distribusikan kultur bakteri ke dalam facon tube 15 ml (Buat 4 Tube)
6. Sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 6 menit dengan suhu 4 °C. Buang supernatan
7. Ulangi ke tahap 5 sampai diperoleh pelet bakteri yang cukup banyak
8. Sel pelet bakteri diresuspensi dengan menambahkan 10 mL gliserol 10%
9. Sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 6 menit dengan suhu 4 °C. Buang supernatan

10. Tambahkan 5 mL gliserol 10% pada masing – masing tabung dan jadikan 2 tabung dari 4 tabung sebelumnya
11. Sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 6 menit dengan suhu 4 °C. Buang supernatan
12. Ulangi dari tahap 10 – 11
13. Setelah diperoleh sel pelet, tambahkan 1 mL gliserol 10% kealam masing – masing tabung, resuspensi sampai homogen
14. Distribusikan sebanyak 75 µL ke masing – masing mikrotube 1,5 mL (1x reaksi Transformasi), pastikan tabung tertutup sempurna dan secara cepat tabung dimasukkan kedalam nitrogen cair
15. Jika belum digunakan, sel dapat disimpan pada suhu – 80 °C

Note: Pemindahan sel bakteri serta, penambahan gliserol dan penuangan supernatan harus dilakukan di dalam Biological Safety Cabinet

PERCOBAAN VI
TRANSFORMASI DAN ANALISIS KLONING GEN 16S rDNA ke DALAM BAKTERI
***Escherichia Coli* DH5 α**

2. Ligasi Dan Transformasi Plasmid Ke Dalam Sel Kompeten

A. Pendahuluan

Transformasi adalah memasukkan molekul DNA rekombinan ke dalam sel hidup, biasanya bakteri, yang kemudian akan tumbuh dan membelah untuk memproduksi atau memperbanyak klon. Secara umum, terdapat dua tujuan dari transformasi DNA rekombinan pada bakteri. Tujuan yang pertama adalah memproduksi DNA rekombinan dalam jumlah yang besar dari material awal yang sedikit. Hanya dari beberapa nanogram DNA rekombinan dapat menghasilkan beberapa mikrogram dalam tiap koloni bakteri dalam plat agar dan beberapa milligram dalam kultur cair bakteri, ribuan bahkan jutaan kali meningkat produksinya. Tujuan kedua dari transformasi adalah agar jumlah produksi DNA rekombinan memenuhi untuk tahap pemurnian. Penting sekali dilakukan pemurnian dari DNA rekombinan, karena dalam hasil ligasi selain terdapat vektor plasmid dan DNA sisipan yang telah terligasi terdapat pula: molekul vektor tidak terligasi, molekul DNA tidak terligasi, molekul vektor yang mengalami resirkularisasi tanpa DNA sisipan, dan DNA rekombinan yang membawa fragmen DNA yang salah

Proses transformasi dapat dilakukan dengan metode heat shock dan elektroporasi. Metode heat shock dilakukan dengan inkubasi pada temperatur tinggi dan rendah. Dengan melakukan teknik 'heat-shock' — mendinginkan, memanaskan dan mendinginkan kembali— bakteri, maka DNA dapat masuk ke dalam sel. Selain teknik 'heat-shock', sejak tahun 1980 telah digunakan teknik 'elektroforasi' yaitu dengan mengejutkan sel bakteri dengan medan listrik berkekuatan tinggi (10-20 kV/cm). Metode elektroporasi dilakukan dengan mengalirkan aliran listrik

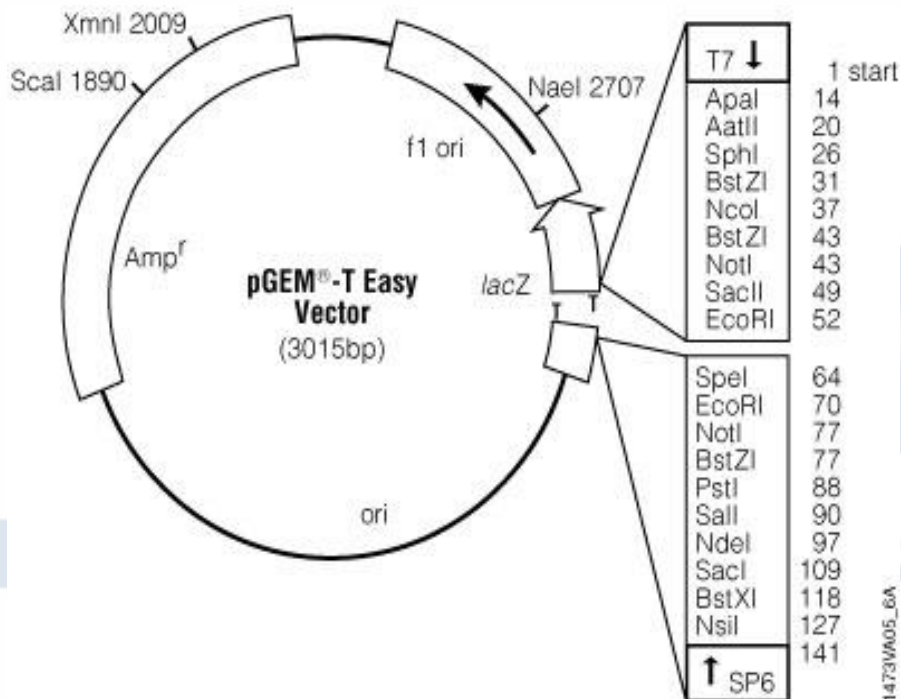
Proses transformasi tidak terlepas dari vektor yang menjadi peranan sebagai pembawa gen yang disisipkan dengan menggunakan plasmid. Plasmid sebagai vektor kloning memiliki ukuran yang kurang dari 10 kb. Plasmid harus memiliki daerah pengenalan bagi DNA sisipan, daerah ini disebut dengan *multiple cloning site* (MCS) yang diapit oleh 2 enzim restriksi sebagai tempat penempelan sisipan. Kebanyakan plasmid memiliki sekuens DNA yang menjadi origin of replication (ORI) yang di kenal dengan angka penggandaan/copy number yang menjadi angka penggandaan spesifik bagi tiap plasmid sehingga plasmid dapat memperbanyak diri dalam sel secara independen.

B. Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa dapat memahami dan melakukan proses ligasi /penyisipan DNA ke dalam vektor kloning
2. Mahasiswa mengetahui proses transformasi vektor rekombinan kedalam sel kompeten dengan metode Heat shock dan Elektroforasi
3. Mahasiswa dapat membedakan bakteri transforman berdasarkan seleksi biru putih

C. Bahan dan Alat

Bahan	Alat
Sel Kompeten <i>E. coli</i> Top 10 / <i>E. coli</i> DH5α	Inkubator
Plasmid pGEM®-T Easy (Gambar 1)	Inkubator Shaker
Buffer Ligasi	Waterbath
Control Insert DNA	Thermoblock
T4 DNA Ligase	Elektroforator
Media LB cair tanpa ampicilin	Mikrotub
Media LB cair + ampicilin 100 <i>ampicilin</i> 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	Petridist
Media LB padat + ampicilin 100 <i>ampicilin</i> 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	Tabung reaksi
PCR produk (DNA sisipan)	Cuvet logam
IPTG	Laminar Air Fow
X-gal	



D. Prosedur Kerja

1. Ligasi PCR produk (DNA sisipan) kedalam Plasmid pGEM®-T Easy

Komposisi Ligasi

Komponen	Reaksi Standar	Kontrol reaksi
2x Buffer Ligasi	5 μL	5 μL
pGEM®-T Easy	1 μL	1 μL
PCR produk (DNA)	3 μL	-
Control Insert DNA	-	2 μL
T4 DNA Ligase	1 μL	1 μL

- ✓ Campurkan berlahan – lahan menggunakan mikropipet

- ✓ Inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang, untuk hasil yang lebih baik, inkubasi selama 1 malam pada suhu 4 °C (suhu kulkas).
- ✓ Hasil ligasi Siap ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5α

2. Transformasi Hasil Ligasi ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5α

Ada 2 metode yang digunakan dalam mengintroduksi Vektor rekombinan kedalam sel kompeten

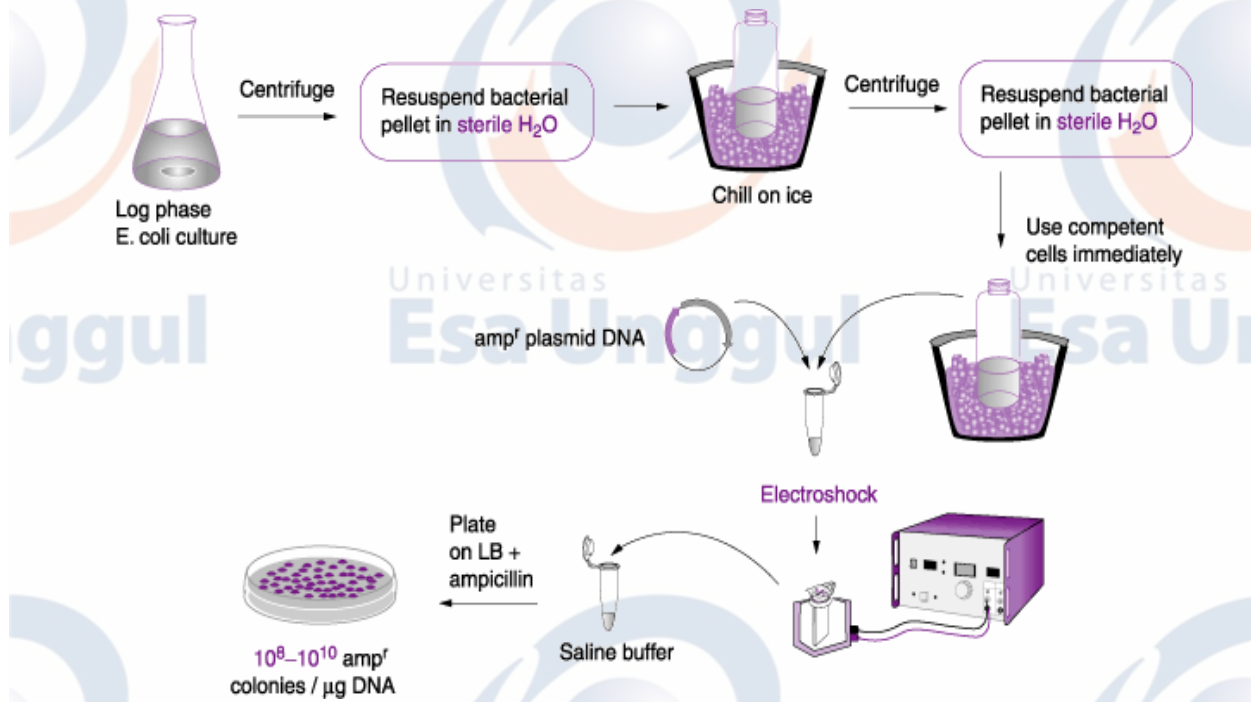
Metode Heat shock (Sambrook et al, 2001)

- ✓ Sebanyak 75 µl sel kompeten bakteri dimasukan ke dalam mikrotub yang baru dan ditambahkan 5 µl hasil ligasi
- ✓ Campurkan secara perlahan dengan menggunakan mikropipet pada mikrotub yang berisi sampel dan vektornya.
- ✓ Inkubasi dalam ice box selama 30 menit.
- ✓ Sampel dimasukan kedalam thermoblock dengan suhu berkisar 45 °C – 60 °C. Dengan melakukan teknik 'heat-shock' mendinginkan, memanaskan dan mendinginkan kembali bakteri, maka DNA dapat masuk ke dalam sel.
- ✓ Sampel kembali di taruh ke dalam ice box selama 5 menit, kemudian ditambahkan 100 µl 2 YT (yeast triptopan)
- ✓ Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C.
- ✓ Setelah itu ditambahkan sebanyak 10 µl IPTG dan 50 µl X-Gal kemudian homogen kan dengan mikropipet.
- ✓ Tahapan yang terakhir adalah sampel disebar pada media padat LB +ampicilin 100 µl/mL secara aseptis
- ✓ Inkubasi selama 1 malam, pertumbuhan sel bakteri yang kompeten ditandai dengan tumbuhnya koloni biru dan koloni putih. Koloni biru merupakan sel yang membawa plasmid kosong sedangkan sel koloni yang berwarna putih merupakan koloni yang membawa vektor dengan sisipan (vektor rekombinan)

Metode Elektroforasi

- ✓ Pipet sebanyak 5 µl hasil ligasi, masukan ke dalam tabung yang berisi 75 µl kompeten sel *E. coli* DH5α
- ✓ Resuspensi secara perlahan dengan menggunakan mikropipet, usahakan tidak ada gelembung yang terbentuk
- ✓ Pindahkan ke dalam cuvet logam steril, kemudian pasang cuvet pada alat elektroforator dengan tegangan 2,8 Volt dengan sekali kejut
- ✓ Tambahkan 1 mL media LB ke dalam cuvet dan resuspensi secara perlahan (tidak ada gelembung)
- ✓ Pindahkan semua kultur sel yang ada dalam cuvet ke dalam mikrotub yang baru dan goyang secara perlahan
- ✓ Inkubasi selama 1 jam dengan suhu 37 °C pada waterbath shaker dengan kecepatan 180 rpm
- ✓ Tahapan yang terakhir adalah sampel disebar pada media padat LB +ampicilin 100 µl/mL secara aseptis
- ✓ Inkubasi selama 1 malam, pertumbuhan sel bakteri yang kompeten ditandai dengan tumbuhnya koloni biru dan koloni putih. Koloni biru merupakan sel yang

membawa plasmid kosong sedangkan sel koloni yang berwarna putih merupakan koloni yang membawa vektor dengan sisipan (vektor rekombinan)



Gambar 2. Alur Kerja Transformasi Gen Pada Sel Bakteri

PERCOBAAN VII
TRANSFORMASI DAN ANALISIS KLONING GEN 16S rDNA ke DALAM BAKTERI
***Escherichia Coli* DH5 α**

3. PCR Koloni Bakteri Transforman

A. Pendahuluan

PCR 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. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit sepasang primer. Primer yang berada sebelum target disebut primer forward dan primer yang berada setelah target disebut primer reverse. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru disebut sebagai enzim polymerase. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP (nukleotida berbasis *Adenine*), dCTP (nukleotida berbasis *Cytosine*) dan dTTP (nukleotida berbasis *Thymine*).

PCR koloni merupakan metode cepat dalam menentukan plasmid yang membawa sisipan pada sel kompeten *E. Coli*. Transformasi sel dapat dilisiskan dalam air pada tahap pemanasan awal atau ditambahkan langsung ke dalam reaksi PCR dengan cara ditotolkan. Langkah pemanasan awal ini menyebabkan pelepasan DNA plasmid dari sel, sehingga bisa menjadi template untuk reaksi amplifikasi. Primer yang dirancang untuk secara khusus menargetkan insert DNA dan dapat digunakan untuk menentukan apakah konstruksi mengandung fragmen DNA yang ditargetkan. Sebagai alternatif, primer yang menargetkan DNA vektor yang mengapit sisipan dapat digunakan untuk menentukan apakah sisipan itu benar atau tidak. Masukkan primer tertentu dapat memberikan informasi mengenai spesifisitas dan ukuran DNA sisipan. Sementara penggunaan primer spesifik vektor memungkinkan penyaringan beberapa konstruk secara bersamaan. PCR Koloni juga bisa digunakan untuk menentukan orientasi sisipan. Amplifikasi PCR plasmid menggunakan primer spesifik sisipan yang dipasangkan dengan primer spesifik vektor dapat dirancang untuk menghasilkan ampikon dengan ukuran tertentu jika sisipan berada dalam orientasi yang benar. Hasil desain eksperimental, ada tidaknya amplitudo PCR dan ukuran produk ditentukan oleh elektroforesis pada gel agarosa.

Primer yang digunakan dalam PCR koloni merupakan bawaan dari plasmid yang kita gunakan sehingga konfirmasi daerah sisipan akan lebih akurat. Pada praktikum ini menggunakan plasmid pGEM[®]-T Easy yang membawa T7 promotor sebagai primer forward dan SP6 merupakan primer reverse.

B. Tujuan Praktikum

- ✓ Mahasiswa dapat menentukan sel transforman yang membawa vektor dengan sisipan dengan metode PCR koloni
- ✓ Dapat membedakan koloni transforman berdasarkan seleksi biru putih pada koloni

C. Alat dan Bahan

Bahan	Alat:
1. Koloni Tranforman <i>E. coli</i> DH5 α	Thermocycler (mesin PCR)
2. PCR master Mix	Elektroforesis Chamber
3. Marker 1 Kb DNA Ladder	Mikropipet
4. Loading dye	Tusuk gigi steril
5. Agarose	Mikrotube
6. TAE buffer	PCR tube
7. Primer T7 :5'TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Gel Doc
8. Primer SP6:5'TACGATTTAGGTGACACTATAG-3	

D. Cara Kerja

Komposisi mix PCR untuk volume total 20 μL

PCR Master mix	: 10 μL (setengah dari volume total)
Primer T7	: 0.5 μL
Primer SP6	: 0.5 μL
DNA template	: 1 μL / 1 tusuk gigi
ddH ₂ O	: 8 μL

Siklus PCR yang digunakan 30x siklus

Pre-denaturasi	: 94 °C 5 menit
Denaturasi	: 94 °C 1 menit
Annealing	: 56 °C 1 menit
Axtension	: 72 °C 1 menit
And Axtension	: 72 °C 5 menit
Cooling	: 4 °C pause

Running pada Mesin Thermocycler (PCR)

Tahapan penggunaan Mesin PCR dapat dilihat pada Instruksi Kerja Alat (IKA) yang ada di laboratorium

Elektroforesis dan Pengamatan Hasil PCR

Cara Kerja :

- ✓ Agarose yang telah mengeras dimasukkan ke dalam wadah/ bak elektroforesis dan direndam keseluruhan dalam buffer TAE 1x.
- ✓ Pada lubang pertama pada gel dimasukkan marker DNA (ladder 1 kb) diikuti DNA hasil PCR dengan mencampurkan 1 μl loading dye untuk tiap sampel pada kertas parafin.
- ✓ Ambil 5 μl dari tiap sampel DNA kemudian campurkan dengan baik menggunakan mikropipet.
- ✓ Tuangkan masing – masing campuran tersebut pada lubang sumuran yang tersedia.
- ✓ Switch dinyalakan dengan tegangan 100 V selama 45 menit. Kemudian gel diangkat dimasukkan ke dalam ethidium bromide selama 10 menit.
- ✓ Gel yang berisi visualisasi fragmen DNA diangkat lalu diletakkan di atas UV Trans Illuminator, Amati pita DNA yang muncul dan didokumentasikan

PERCOBAAN VIII
TRANSFORMASI DAN ANALISIS KLONING GEN 16S rDNA ke DALAM BAKTERI
***Escherichia Coli* DH5 α**

4. Isolasi Plasmid Rekombinan dari Sel transforman

A. Pendahuluan

Plasmid adalah molekul DNA sirkular yang dapat bereplikasi secara autonom dalam sel bakteri hospes dan tersebar secara luas pada sel prokariot. Ukuran dari plasmid beragam dari yang pendek hingga yang berukuran ratusan kb (1-250 kb). Plasmid hampir selalu membawa satu atau lebih gen yang bermanfaat bagi hospesnya. Salah satunya kemampuan bertahan dalam konsentrasi toksik antibiotik seperti kloramfenikol dan ampisilin dikarenakan keberadaan dari plasmid bakteri yang membawa gen resisten antibiotik. Kebanyakan plasmid memiliki sekuens DNA yang menjadi *origin of replication*, sehingga plasmid dapat memperbanyak diri dalam sel secara independen.

Salah satu contoh plasmid buatan yang banyak digunakan dalam kloning gen adalah Plasmid pGEM-T Easy merupakan plasmid sirkular terbuka, memiliki dua buah *origin of replication* dan gen ketahanan terhadap ampisilin (Amp). Plasmid ini mengandung multy cloning site. Karena memiliki kelebihan timin yang menggantung di ujung terbuka plasmid (T overhang), plasmid ini sering dipakai sebagai vektor untuk produk PCR yang selalu memiliki kelebihan adenin pada ujungnya tanpa memerlukan tahapan pemotongan terlebih dahulu. Plasmid pGEM-T Easy juga termasuk plasmid high copy number yang mengandung T7 dan SP6 promotor pada daerah MCS yang cocok untuk menyimpan gen insert dalam sel inang. Selain itu, pGEM-T Easy merupakan vektor yang berukuran kecil yaitu 3015 bp. Ukuran tersebut relatif kecil sehingga vektor dapat membawa DNA target cukup banyak dan memudahkan preparasi DNA sisipan dalam jumlah besar. Vektor berukuran kecil lebih mudah dimasukkan ke dalam sel inang dan lebih mudah dimurnikan karena cenderung tidak rapuh dibandingkan dengan vektor berukuran besar.

E. Tujuan Praktikum

- ✓ Mahasiswa dapat melakukan isolasi Plasmid dalam sel tranforman *E. coli* DH5 α

F. Alat dan Bahan

Bahan	Alat:
1. Koloni Tranforman <i>E. coli</i> DH5 α	Elektroforesis Chamber
2. GeneJet Plamid Minipred KIT	Mikropipet
3. LB cair + ampisilin 100 μ L/mL	Shaker Inkubator
4. Etanol absolut	Tabung Reaksi
5. ddH ₂ O	Mikrotube
6. Alkohol 70%	PCR tube
7. Larutan SOL 1, SOL 2, SOL 3	Gel Doc

8. Cara Kerja

Isolasi Plasmid dengan metode Phenol (Sambrook et al, 2001)

- ✓ Sebanyak 1,5 ml kultur sel bakteri yang telah disisipkan plasmid dimasukkan ke dalam mikrotub.
- ✓ Sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit.
- ✓ Tambahkan 100 µl SOL 1 dan resuspensi secara homogen, tambahkan 200 µl SOL 2 sambil dibolak balik selama 5 menit. Kemudian tambahkan SOL 3 sambil dibolak balik sebanyak 8 kali dan sentrifugasi 10.000 rpm selama 15 menit.
- ✓ Ambil supernatan dan tambahkan PCI sebanyak 1 kali volume sampel kemudian divortek
- ✓ Sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit. Ambil fase atas dan tambahkan ETOH (Etanol) 100% taruh pada wadah yang berisi es selama 30 menit.
- ✓ Sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 20 menit, buang supernatan. Pada mikrotub terdapat pelet
- ✓ Cuci pelet dengan ethanol 70 % sebanyak 500 µl kemudian sentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit.
- ✓ Untuk mengeringkan sisa – sisa alkohol pada pelet, vacum mikrotub selama 15 menit.
- ✓ Encerkan pelet dengan ddH₂O sebanyak 20 – 30 µl tergantung banyaknya pelet yang didapat.
- ✓ Tambahkan RNase 2 kali volume inkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit dan inaktifasi RNase pada suhu 70 °C selama 10 menit.
- ✓ Cek plasmid dengan elektroforesis untuk melihat kosentrasi dengan menggunakan marker 1 Kb DNA Ladder atau dengan nanoquant.
- ✓ Sebagian dari stok larutan sampel dilanjutkan untuk pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi.

Isolasi Plasmid dengan GeneJet Plasmid Miniprep KIT (Geneid)

- ✓ Sebanyak 5 mL kultur sel bakteri transforman dikultur dalam media LB cair + ampicilin selama 24 jam
- ✓ Sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C
- ✓ Buang supernatan, resuspensi pelet dengan 250 µl dengan resuspensi solution (pipet up and down)
- ✓ Tambahkan 250 µl buffer lysis solution, campurkan secara invert (bolak balik)
- ✓ Tambahkan 350 µl Neutralization Solution, campurkan secara invert (bolak balik)
- ✓ Sentrifugasi selama 5 menit, untuk menghilangkan debris cromosomal DNA dengan 12000 rpm
- ✓ Terbentuk 2 presipitat, supernatan yang bening di transfer ke dalam GeneJet spin colom(jangan terbawa debris yang putih)
- ✓ Sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12000 rpm, buang supernatan yang ada dalam tabung
- ✓ Tambahkan 500 µl wash solution (yang telah ditambahkan dengan etanol)
- ✓ Sentrifugasi 12000 rpm selama 1 menit, buang supernatan
- ✓ Tambahkan 500 µl wash solution kedalam spin colom
- ✓ Sentrifugasi 12000 rpm selama 1 menit, buang supernatan
- ✓ Untuk menghilangkan etanol yang masih tersisa, sentrifugasi kembali selama 3 menit dengan 12000 rpm suhu 4 °C

- ✓ Pindahkan spin colom kedalam mikrotub yang baru dan tambahkan 50 μ l elution buffer tepat pada pertengahan membran, kemudian inkubasi selama 2 menit pada suhu ruang
- ✓ Sentrifugasi 12000 rpm selama 2 menit,
- ✓ Plasmid siap dipotong dengan menggunakan Enzim Restriksi



PERCOBAAN IX
TRANSFORMASI DAN ANALISIS KLONING GEN 16S rDNA ke DALAM BAKTERI
Escherichia Coli DH5α

5. Pemotongan Plasmid Rekombinan dengan Enzim Restriksi

A. Pendahuluan

Enzim restriksi adalah enzim yang bekerja untuk memotong fragmen DNA pada situs spesifik. Seperti diketahui, di dalam Bioteknologi terdapat dua kategori enzim yang berperan dalam proses rekombinasi DNA, yaitu enzim yang berperan dalam isolasi DNA dan penyiapan DNA rekombinan (di mana dua molekul DNA dikombinasikan). DNA spesifik atau gen diisolasi/diambil dari DNA dengan memotong sugar–phosphat backbone DNA asalnya, dan DNA dari dua sumber yang berbeda dicampur dan dikombinasi. Molekul DNA rekombinan tidak dapat dibuat dengan mudah tanpa adanya dua jenis enzim, yaitu: enzim restriksi endonuklease yang berperan sebagai “gunting” untuk memotong DNA pada situs spesifik dan DNA ligase yang berperan sebagai lem yang merekatkan dua molekul DNA di dalam tabung reaksi. Restriksi endonuklease memotong sugar–phosphat backbone DNA pada kedua utasnya. Restriksi endonuklease mengenali urutan spesifik di dalam molekul DNA. Urutan yang spesifik tersebut pada umumnya terdiri dari 4 – 6 pasang basa dan bersifat palindromik (palindrom). Palindrom merupakan daerah yang memiliki urutan basa yang sama dengan utas pasangannya jika dibaca dari arah yang sama yaitu 5’ – 3’ .

Setiap enzim restriksi mengenali urutan spesifik dan memotong hanya di tempat-tempat tertentu dari urutan basa tersebut. Enzim restriksi memotong DNA double strands dengan memutus ikatan kovalen di antara phosphat dari satu deoksiribonukleotida dengan gula dari deoksiribonukleotida yang berbatasan dengannya. Terdapat dua tipe hasil pemotongan, ujung rata (blunt end) dan ujung kohesif (sticky end). Ujung rata (blunt end) dihasilkan ketika dua utas molekul dipotong pada posisi yang sama, bagian akhirnya rata dan tidak ada nukleotida yang tidak berpasangan. Ujung kohesif (sticky end) dihasilkan ketika setiap molekul DNA dipotong pada posisi yang tidak sama sehingga salah satu utas (5’ atau 3’) menggantung dengan beberapa nukleotida. Akhiran single strand yang tidak rata ini dapat berpasangan secara spontan dengan basa 3 pasangannya sehingga disebut “sticky” (mudah lengket) atau kohesif

B. Tujuan Praktikum

- ✓ Mahasiswa mengetahui dan dapat melakukan cara pemotongan plasmid dengan menggunakan enzim restriksi
- ✓ Mahasiswa dapat melakukan konfirmasi sisipan yang dalam dalam vektor berdasarkan ukuran

C. Alat dan Bahan

Bahan	Alat:
1. Plasmid pGEM-T Easy rekombinan	Elektroforesis Chamber
2. Enzim restriksi EcoR1	Mikropipet
3. 10x Buffer EcoR1	Mikrotube
4. ddH ₂ O	Gel Doc
	Inkubator

D. Cara Kerja

Pemotongan Plasmid dengan Enzim restriksi EcoR1

- ✓ Campurkan komponen tersebut kedalam 1 mikrotub

Komposisi

1. ddH₂O 3,5 µl
2. 10 Buffer EcoR1 1 µl
3. DNA Plasmid 5 µl
4. Enzim EcoR1 0,5 µl

Note : Enzim selalu dalam penyimpanan pada suhu – 20 °C

- ✓ Inkubasi selama 3 Jam pada suhu 37 °C
- ✓ Cek hasil pemotongan dengan elektroforesis dan dokumentasikan menggunakan Gel Doc
- ✓ Jika terbentuk 2 pita dengan ukuran yang berbeda, satu pita merupakan vektor dan satu pita lai ya merupakan sisipan. Artinya DNA gen 16S rRNA berhasil disisipkan ke dalam vektor pGEM-T Easy.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T. 2006. Gene Cloning and DNA Analysis an Introduction, 5th edition. Australia: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd
- Chen, B., Janes, H. 2002. PCR Cloning Protocols, Second Edition. New Jersey: Humana Press Inc
- Moelhard, C. 2007. Molecular Biology and Genomics, The Experimenter Series. California: Elsevier Academic Press
- Sambrook, J., Russell, D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Suharsono dan Widyastuti, U. 2006. Penuntun Praktikum Pelatihan Teknik Pengklonan. Bogor : IPB