

PENUNTUN PRAKTIKUM REKAYASA GENETIKA S1 BIOLOGI BERBASIS KOMPETENSI



Disusun oleh :

HERMIN PANCASAKTI KUSUMANINGRUM

REJEKI SITI FERNIAH

ANTO BUDIHARJO

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN MATEMATIKA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

**PENUNTUN PRAKTIKUM
REKAYASA GENETIKA
S1 BIOLOGI
BERBASIS KOMPETENSI**

Disusun oleh :

**HERMIN PANCASAKTI KUSUMANINGRUM
REJEKI SITI FERNIAH
ANTO BUDIHARJO**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN MATEMATIKA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

KATA PENGANTAR

Dengan mengucap puji syukur ke hadirat Allah SWT, tim penyusun Buku Petunjuk Praktikum Rekayasa Genetika berbasis kompetensi dapat menyelesaikan penulisan buku ini. Perbedaan buku ini dengan sebelumnya adalah adanya Praktikum Latihan Keterampilan, Latihan Pra Penelitian dan Latihan penelitian. Praktikum dengan model tersebut merupakan aktivitas praktikum berbasis aplikasi dan kombinasi *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*, *Research based learning*, *Self directed learning*, *Small discussion Group* dan *Cooperative learning*. Buku ini diharapkan dapat menjadi penuntun dan inspirasi bagi pengampu dan asisten dalam memandu jalannya praktikum Rekayasa Genetika khususnya bagi mahasiswa di Jurusan Biologi FSM UNDIP.

Praktikum Rekayasa Genetika mempelajari aspek-aspek dasar dan terapan dalam Rekayasa Genetika, mulai dari keamanan laboratorium, pengenalan alat. Bahan, medium, mikroorganisma, isolasi DNA kromosom dan ekstrakromosom, elektroforesis. PCR dan analisis gen serta analisis protein.. Semoga praktikum yang dituntun melalui buku ini tidak hanya dapat menunjang teori-teori yang diberikan pada perkuliahan Rekayasa Genetika namun juga sebagai contoh aplikasi di bidang Rekayasa Genetika.

Semarang, Oktober 2015

Tim Penyusun

DAFTAR ISI

Kata Pengantar	1
Daftar Isi	2
Tata Tertib Praktikum	3
Petunjuk kerja dan kenyamanan kerja dalam melaksanakan praktikum	4
Daftar Acara Praktikum	
1 Keamanan Laboratorium Rekayasa Genetika	6
2 Pengenalan Alat, Bahan dan Medium	12
3 Pengenalan mikroorganisme Alami dan Hasil Rekayasa Genetika	18
4 Pembuatan Medium dan Buffer	21
5 Isolasi DNA Genom Bakteri <i>Wild Type</i>	29
6 Isolasi DNA Bakteri Rekombinan <i>Escherichia coli</i> JM 109	34
7 Isolasi DNA Darah	38
8 Isolasi DNA Khamir	42
9 Isolasi DNA Mikroalga	48
10 Isolasi DNA Tanaman	53
11 Isolasi DNA Plasmid	58
12 Isolasi DNA Hewan	62
13 Pembuatan Gel Elektroforesis	67
14 Elektroforesis	72
15 PCR	76
16 Sekuensing	80
17 Analisis filogenetika	84
Daftar Pustaka	87

TATA TERTIB PRAKTIKUM

Dalam Praktikum Rekayasa Genetika mahasiswa wajib mematuhi tata tertib sebagai berikut:

1. Mahasiswa datang 5 menit sebelum jam praktikum.
2. Mahasiswa mengenakan jas laboratorium dengan rapi, tidak mengenakan kaos oblong dan sandal.
3. Sebelum praktikum dimulai dilakukan pretes selama 10 – 15 menit. Mahasiswa yang terlambat berhak menyusul dengan tambahan waktu maksimal 5 menit.
4. Mahasiswa yang terlambat setelah pretes selesai dinyatakan TIDAK mengikuti acara praktikum dan mendapat nilai NOL.
5. Praktikum dilakukan secara berkelompok dengan masing-masing dipandu oleh seorang asisten.
6. Selama praktikum mahasiswa wajib menjaga kebersihan dan ketertiban laboratorium.
7. Praktikum dilakukan dengan cermat dan hati-hati, terutama pada perlakuan organisme hidup dan penggunaan reagen-reagen kimia.
8. Setelah selesai melakukan praktikum mahasiswa wajib membersihkan meja masing-masing dan menempatkan kembali peralatan praktikum sesuai dengan seharusnya.
9. Alat-alat praktikum yang rusak atau hilang menjadi tanggung jawab satu kelompok praktikum.

Petunjuk kerja bagi asisten :

1. Asisten di laboratorium bertugas membimbing mahasiswa untuk bekerja dengan benar, baik dan aman.
2. Asisten datang 15 menit lebih awal , untuk membantu persiapan praktikum
3. Asisten membantu mengecek apakah semua bahan, alat dan kertas kerja yang diperlukan untuk praktikum sudah tersedia dalam kondisi baik dan siap digunakan
4. Asisten harus mengetahui jenis bahan dan alat yang akan digunakan pada percobaan hari tersebut dan cara pemakaiannya
5. Asisten mendampingi mahasiswa yang sedang melaksanakan praktikum serta menjaga kelancaran dan keselamatan kerja.
6. Selama praktikum, setiap orang yang terlibat dalam praktikum harus membiasakan menutup kran air dan gas, mematikan listrik dan api serta mencuci tangan

7. Setiap orang yang terlibat dalam praktikum harus meninggalkan laboratorium dalam keadaan bersih.
8. Asisten harus berkomunikasi dengan Dosen penanggung jawab praktikum Genetika dan Ketua Laboratorium Genetika sebelum, selama dan setelah praktikum untuk keamanan, kelancaran dan keberhasilan praktikum.

Petunjuk kerja bagi praktikan :

1. Dilarang bekerja di laboratorium tanpa ada asisten atau laboran atau Dosen yang mengawasi.
2. Dilarang bermain-main, bersenda gurau dan membawa *handphone* di laboratorium
3. Dilarang bermain-main dengan bahan, larutan dan peralatan laboratorium.
4. Bahan, alat tulis dan buku kerja harus dipersiapkan sebelum masuk laboratorium seperti jenis peralatan, dan cara membuang limbah sisa percobaan.
5. Dilarang makan, minum dan merokok di laboratorium.
6. Menjagalah kebersihan tempat dan meja praktikum
7. Senantiasa berhati-hati dan bersungguh-sungguh dalam melaksanakan praktikum untuk menghindari kecelakaan kerja selama praktikum
8. Mencatat seluruh hasil praktikum dengan rapi dan lengkap
9. Menggunakan jas laboratorium berlengan panjang selama melakukan praktikum secara rapi dan segera melepas setelah keluar ruangan.

Acara 1.
KEAMANAN LABORATORIUM
REKAYASA GENETIKA

A. Kompetensi

:

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti dan memahami keamanan laboratorium Rekayasa Genetika, proses dan mekanisme yang tercakup di dalamnya, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum hari ini, mahasiswa dapat mengetahui, melaksanakan dan menjaga keamanan laboratorium Rekayasa Genetika. Mengetahui standar prosedur keamanan laboratorium rekayasa Genetika
3. Indikator :
 1. Mahasiswa mengetahui prosedur keamanan laboratorium Rekayasa Genetika 70% benar
 2. Mahasiswa melaksanakan prosedur keamanan laboratorium Rekayasa Genetika
 3. Mahasiswa mampu menjaga keamanan laboratorium Rekayasa Genetika
4. *Soft skill* : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Laboratorium merupakan tempat dilakukannya percobaan dan penelitian oleh Dosen, mahasiswa, peneliti dan laboran. Kegiatan yang dilakukan memerlukan kehati-hatian dan jaminan keamanan karena menggunakan berbagai bahan dan larutan kimia, berbagai peralatan gelas kaca dan alat-alat yang dapat menyebabkan terjadinya kecelakaan bila dilakukan dengan cara yang tidak tepat. Keselamatan kerja di laboratorium merupakan persyaratan bagi terselenggaranya aktivitas di laboratorium dengan baik. Setiap pengguna laboratorium harus menjaga keamanan dan keselamatan kerja di laboratorium.

Beberapa persyaratan keamanan yang diperlukan bagi laboratorium adalah :

1. Laboratorium harus mudah dibersihkan. Permukaan meja laboratorium harus tahan terhadap air dan tahan terhadap asam, alkali, pelarut dan disinfektan.
2. Limbah bahan dan larutan kimia sisa percobaan harus dibuang dengan cara yang tepat agar tidak menyebabkan polusi pada lingkungan.
3. Limbah mikroorganisme dan organisme berbahaya harus dibuang dengan cara yang tepat agar tidak membahayakan lingkungan.
4. Bahan terkontaminasi dan organisme kontaminan harus didaur ulang dalam wadah yang kuat dan anti bocor.
5. Penggunaan alat gelas harus berhati-hati karena pecahan kaca dapat menimbulkan luka.
6. Penggunaan lampu spiritus dan bunsen harus berhati-hati dalam karena dapat menimbulkan kebakaran.
7. Penggunaan semua peralatan praktikum dan penelitian harus berhati-hati dan mengikuti aturan penggunaan alat untuk menghindari resiko kecelakaan dan kerusakan alat.
8. Menyediakan peralatan pemadam kebakaran di laboratorium.
9. Menyediakan disinfektan dan sterilisator yang efektif harus tersedia untuk segera digunakan jika terjadi tumpahan dan memusnahkan mikroorganisme berbahaya
10. Laboratorium harus memiliki wastafel yang dapat digunakan untuk mencuci tangan.
11. Laboratorium harus memiliki ventilasi yang baik untuk menjaga aliran udara dan kesehatan.
12. Pintu laboratorium harus ditutup ketika praktikum dan penelitian sedang berlangsung.
13. Semua bahan limbah, jika tidak dibakar, harus dibuang di tempat yang aman.
14. Kecelakaan dan insiden harus segera dilaporkan kepada dan dicatat oleh laboran.

Bahan dan larutan kimia

Bahan kimia berpotensi menyebabkan terjadinya kebakaran, mengganggu kesehatan, menyebabkan sakit atau luka, merusak, menyebabkan korosi dsb. Pengguna bahan dan larutan kimia harus mengetahui berbagai karakter bahan kimia dari label yang tertera pada kemasan dan cara penggunaannya secara tepat.

Penelitian Rekayasa Genetika seringkali membutuhkan Keselamatan kerjap menggunakan kerangka kerja untuk mencegah mengantisipasi dan mengatasi dengan bahaya tempat kerja. Hal tersebut mengutamakan strategi berdasarkan pada asumsi bahwa cara terbaik untuk mencegah dan mengendalikan resiko bahaya adalah untuk secara sistematis melakukan pencegahan di laboratorium daripada harus mengatasi bahaya yang muncul. Jenis-jenis tindakan yang mungkin digunakan untuk melindungi praktikan dan dosen di laboratorium, diprioritaskan dari yang paling efektif, yaitu:

- prosedur kontrol
- administrasi
- cara kerja atau simulasi
- alat pelindung diri (APD).

Contoh bahan dan alat yang berbahaya untuk praktikum rekayasa genetika, meliputi:

- Chemical Fume Hood, dan
- Kabinet Keamanan Hayati (BSCs).

Kontrol oleh administrator atau laboran adalah mereka yang secara khusus menjaga, mengatur jadwal dan tugas-tugas dengan cara yang meminimalkan paparan mereka terhadap bahaya tempat kerja.

Contoh meliputi:

- Mengembangkan Rencana Kebersihan Kimia, dan
- Mengembangkan Prosedur Operasional Standar kimia penanganan.

Praktek kerja adalah prosedur yang aman dan tepat

pekerjaan yang digunakan untuk mengurangi durasi, frekuensi atau intensitas paparan bahaya. Ketika

mendefinisikan kontrol kerja praktek yang aman.

Penelitian Biologi molekuler juga memerlukan peralatan, mikroorganisme, bahan, dan medium yang bersih dan terhindar dari kontaminasi. Pekerjaan dalam biologi molekuler sering mengalami kontaminasi yang baru bisa diketahui pada akhir beberapa tahap pekerjaan. Seringkali kita tidak tahu pada saat kapan dan pada tahapan yang mana kontaminasi itu

terjadi. Yang paling merugikan adalah apabila kita baru mengetahui bahwa DNA telah diamplifikasi dan disekuensing adalah bukan dari organisme yang kita gunakan melainkan dari kontaminan akibat kerja kita yang kurang hati-hati dan aseptik. Oleh karena itu, kita perlu mengontrol apakah setiap tahapan sudah kita lakukan dengan baik dan benar sebelum melanjutkan ke tahap berikutnya. Kontrol terhadap peralatan yang digunakan juga merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan penelitian biologi molekuler.

Pada saat akan menggunakan peralatan perlu diperiksa apakah peralatan dalam kondisi bersih dan dapat bekerja dengan baik. Uji peralatan terhadap mikropipet misalnya dilakukan dengan melihat bahwa bila kita ingin mengambil 10 μ l larutan apakah sudah benar, maka diperbandingkan dengan mikropipet lainnya yang berukuran sama. Bagi mereka yang belum terbiasa dengan peralatan molekuler, disarankan sering berlatih menggunakan alat lebih baik dilakukan sebelum bekerja untuk menghindari kesalahan pengukuran dan mengetahui cara penggunaan alat tersebut secara baik dan benar. Jangan menyamakan pengukuran molekuler yang membutuhkan akurasi yang sangat tinggi dengan pengukuran bidang lain karena kesalahan sedikit akan berakibat fatal. Disamping sering bekerja dengan bahan kimia yang berbahaya, penelitian molekuler juga banyak menggunakan bahan yang mahal dan sukar diperoleh. Jangan malu dan ragu untuk bertanya bila tidak tahu agar pekerjaan kita memperoleh hasil yang baik dan benar.

Science Safety Symbols

These symbols appear in laboratory activities to alert you to possible dangers and to remind you to work carefully.



Safety Goggles Always wear safety goggles to protect your eyes during any activity involving chemicals, flames or heating, or the possibility of flying objects, particles, or substances.



Lab Apron Wear a laboratory apron to protect your skin and clothing from injury.



Breakage Handle breakable materials such as thermometers and glassware with care. Do not touch broken glass.



Heat-Resistant Gloves Use an oven mitt or other hand protection when handling hot materials. Heating plates, hot water, and glassware can cause burns. Never touch hot objects with your bare hands.



Plastic Gloves Wear disposable plastic gloves to protect yourself from contact with chemicals or organisms that could be harmful. Keep your hands away from your face, and dispose of the gloves according to your teacher's instructions at the end of the activity.



Heating Use a clamp or tongs to hold hot objects. Do not touch hot objects with your bare hands.



Sharp Object Scissors, scalpels, pins, and knives are sharp. They can cut or puncture your skin. Always direct sharp edges and points away from yourself and others. Use sharp instruments only as directed.



Electric Shock Avoid the possibility of electric shock. Never use electrical equipment around water, or when the equipment or your hands are wet. Be sure cords are untangled and cannot trip anyone. Disconnect equipment when it is not in use.



Poison Do not let any poisonous chemical get on your skin, and do not inhale its vapor. Wash your hands when you are finished with the activity.



Physical Safety This activity involves physical activity. Use caution to avoid injuring yourself or others. Follow instructions from your teacher. Alert your teacher if there is any reason that you should not participate in the activity.



Animal Safety Treat live animals with care to avoid injuring the animals or yourself. Working with animal parts or preserved animals may also require caution. Wash your hands when you are finished with the activity.



Plant Safety Handle plants only as your teacher directs. If you are allergic to any plants used in an activity, tell your teacher before the activity begins. Avoid touching poisonous plants and plants with thorns.



Flames Tie back loose hair and clothing, and put on safety goggles before working with fire. Follow instructions from your teacher about lighting and extinguishing flames.



No Flames Flammable materials may be present. Make sure there are no flames, sparks, or exposed sources of heat present.



Fumes Poisonous or unpleasant vapors may be produced. Work in a ventilated area. Avoid inhaling a vapor directly. Test an odor only when directed to do so by your teacher, using a wafting motion to direct the vapor toward your nose.



Disposal Chemicals and other materials used in the activity must be disposed of safely. Follow the instructions from your teacher.



Hand Washing Wash your hands thoroughly when finished with the activity. Use antibacterial soap and warm water. Lather both sides of your hands and between your fingers. Rinse well.

Soal :

1. Jelaskan arti simbol-simbol yang anda jumpai pada botol kimia yang anda gunakan untuk praktikum Rekayasa Genetika
2. Bagaimana cara mengelola bahan kimia yang bersifat sangat asam
3. Bagaimana cara mengatasi apabila ada kebakaran di laboratorium

Acara 2.

PENGENALAN ALAT, BAHAN DAN MEDIUM

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengetahui alat, bahan dan medium; mampu menggambarkan alat, bahan dan medium yang digunakan dalam teknik-teknik Rekayasa Genetika, dan mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum hari ini, mahasiswa dapat menggambarkan alat dan mengetahui komposisi bahan dan medium yang digunakan dalam teknik-teknik Rekayasa Genetika
3. Indikator :
 1. Mampu menggambarkan alat-alat yang digunakan dalam teknik rekayasa genetika 70% benar
 2. mengetahui mengetahui komposisi bahan yang digunakan dalam teknik rekayasa genetika 70% benar
 3. mampu mengetahui komposisi medium yang digunakan dalam teknik rekayasa genetika 70% benar.
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
- 5.
6. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Penelitian Biologi molekuler seringkali membutuhkan peralatan yang bersifat spesifik dan mahal karena penggunaan bahan-bahan yang berukuran sangat kecil dan berjumlah sangat sedikit berkisar 0.1 μl - 1000 μl dengan akurasi yang sangat tinggi. Pengukuran yang kurang tepat dapat menyebabkan kesalahan dalam pekerjaan molekuler dan mengakibatkan kita tidak berhasil memperoleh capaian yang diharapkan. Peralatan yang dapat bekerja dengan baik dan benar, akurasi yang tepat, dan kehati-hatian sangat menentukan keberhasilan penelitian dalam bidang biologi molekuler. Beberapa peralatan merupakan peralatan yang biasa digunakan dalam bidang mikrobiologi.

Penelitian Biologi molekuler juga memerlukan peralatan, mikroorganisme, bahan, dan medium yang bersih dan terhindar dari kontaminasi. Pekerjaan dalam biologi molekuler sering mengalami kontaminasi yang baru bisa diketahui pada akhir beberapa tahap pekerjaan. Seringkali kita tidak tahu pada saat kapan dan pada tahapan yang mana kontaminasi itu terjadi. Yang paling merugikan adalah apabila kita baru mengetahui bahwa DNA telah diamplifikasi dan disekuensing adalah bukan dari organisme yang kita gunakan melainkan dari kontaminan akibat kerja kita yang kurang hati-hati dan aseptik. Oleh karena itu, kita perlu mengontrol apakah setiap tahapan sudah kita lakukan dengan baik dan benar sebelum melanjutkan ke tahap berikutnya. Kontrol terhadap peralatan yang digunakan juga merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan penelitian biologi molekuler.

Pada saat akan menggunakan peralatan perlu diperiksa apakah peralatan dalam kondisi bersih dan dapat bekerja dengan baik. Uji peralatan terhadap mikropipet misalnya dilakukan dengan melihat bahwa bila kita ingin mengambil 10 μl larutan apakah sudah benar, maka diperbandingkan dengan mikropipet lainnya yang berukuran sama. Bagi mereka yang belum terbiasa dengan peralatan molekuler, disarankan sering berlatih menggunakan alat lebih baik dilakukan sebelum bekerja untuk menghindari kesalahan pengukuran dan mengetahui cara penggunaan alat tersebut secara baik dan benar. Jangan menyamakan pengukuran molekuler yang membutuhkan akurasi yang sangat tinggi dengan pengukuran bidang lain karena kesalahan sedikit akan berakibat fatal. Disamping sering bekerja dengan bahan kimia yang berbahaya, penelitian molekuler juga banyak menggunakan bahan yang mahal dan sukar diperoleh. Jangan malu dan ragu untuk bertanya bila tidak tahu agar pekerjaan kita memperoleh hasil yang baik dan benar.

Tabel berikut ini menunjukkan peralatan yang biasa digunakan dalam biologi molekuler dan kegunaannya :

No	Alat	Fungsi
1	<i>Hot plate</i>	Pembuatan medium
2	<i>Magnetic stirrer</i>	Pengaduk medium
3	<i>Autoclave</i>	Sterilisasi
4	<i>Ultra centrifuge</i>	Pengendap sel pada suhu dingin
5	<i>Freezer -20°C</i>	Penyimpan bahan kimia molekuler
6	<i>Freezer -80°C</i>	Penyimpan DNA dan RNA
7	<i>Micro centrifuge</i>	Pengendap sel
8	<i>Waterbath</i>	Pengaturan suhu reaksi dan inkubasi
9	Elektroforesis	Visualisasi DNA
10	Spektrofotometer	Pengukur konsentrasi sel dan DNA
11	<i>Thermocycler (Polymerase Chain Reaction)</i>	Perbanyak DNA
12	Inkubator 15°C	Penyambungan fragmen DNA dan vektor
13	<i>Shaker Inkubator 37°C</i>	Penumbuh sel
14	Mesin pembuat es batu	Pembuat es batu serut
15	Microwave	Pencair media padat
16	<i>Laminar air flow</i>	Ruang suci hama
17	<i>Ultra Violet transilluminator</i>	Visualisasi DNA hasil elektroforesis
18	<i>TLC (Thin Layer Chromatography)</i>	Pengukur jenis dan jumlah senyawa kimia
19	<i>HPLC (High Performed Liquid Chromatography)</i>	Pengukur jenis dan jumlah senyawa kimia
20	<i>Vortex</i>	Meratakan suspensi
21	Mikropipet 0.1 - 10 µl (tip putih)	Mengambil larutan
22	Mikropipet 2 - 50 µl (tip kuning)	Mengambil larutan
23	Mikropipet 10 - 100 µl (tip kuning)	Mengambil larutan
24	Mikropipet 100 - 1000 µl (tip biru)	Mengambil larutan
25	Pengukur pH	Mengukur pH
26	Timbangan Sartorius	Menimbang bahan kimia

2. Medium

Pada umumnya medium dibuat untuk ukuran satu liter. Setiap medium cair yang digunakan untuk pertumbuhan kultur mikroorganisme harus diautoklaf terlebih dahulu. Idealnya tempat yang digunakan untuk pembuatan medium dan medium berbanding 1 : 5 agar diperoleh aerasi yang cukup selama pertumbuhan mikroorganisme.

Pada saat menimbang bubuk bahan medium sebaiknya wajah ditutup menggunakan masker untuk mencegah inhalasi. Gunakan sarung tangan untuk memegang medium yang panas dan jangan menggojog medium panas terlalu keras agar tidak tumpah mengenai tangan. Pemanasan berlebihan akan membuat medium meluber keluar.

Pembuatan medium dibuat dengan menambahkan bahan dalam sejumlah air namun kurang dari yang diinginkan, lalu aduk dengan *magnetic stirrer* diatas *hot plate* sampai terlarut sempurna. Ukurlah pH sesuai dengan yang dikehendaki terlebih dahulu. Setelah itu baru tambahkan air sampai mencapai volume yang dikehendaki.

Pembuatan medium menggunakan agar dilakukan dengan cara menimbang bahan yang sama ditambahkan agar sebanyak 15 g tiap liter medium. Setelah medium diautoklaf, lalu didinginkan pada suhu ruang sampai suhu 50 °C . Pada petri yang berdiameter 10 cm, dituangkan sekitar 25-30 ml medium agar dekat dengan lampu bunsen untuk menghindari kontaminasi. Bila terdapat gelembung udara pada medium agar, maka lewatkan medium dalam petri diatas bunsen. Biarkan memadat dan dapat disimpan pada suhu 4°C dengan posisi terbalik.

Alternatif lain dalam membuat medium agar di petri adalah dengan membuat medium dalam volume yang agak besar di dalam erlenmeyer. Selanjutnya pada saat akan digunakan, cairkan medium menggunakan "microwave" lalu tuang di petri sesuai dengan jumlah petri yang akan digunakan dekat dengan lampu bunsen lalu dibiarkan memadat. Medium di erlenmeyer dapat disimpan kembali pada suhu 4 °C.

a. Medium Luria Bertani (LB)

Bahan	: Triptone	10 g
	Yeast extract	5 g
	NaCl	10 g
	ddH ₂ O	1 L

Semua bahan dilarutkan kedalam 950 ml dH₂O. pH diatur 7,0 menggunakan 5 N NaOH(sekitar 0,2 ml). Volume larutan ditambah sampai 1 L. Sterilisasi dengan autoklaf menggunakan suhu 121 °C atau 15 lb/sq selama 20 menit.

b. Medium Luria Bertani Agar (LBA)

Bahan	: Triptone	10 g
	Yeast extract	5 g
	NaCl	10 g
	Agar	15 g/L
	ddH ₂ O	1 L

Semua bahan dilarutkan kedalam 950 ml dH₂O. pH diatur 7,0 menggunakan 5 N NaOH (sekitar 0,2 ml). Volume larutan ditambah sampai 1 L. Sterilisasi dengan autoklaf menggunakan suhu 121 °C atau 15 lb/sq selama 20 menit. Pada saat mengeluarkan medium LBA dari dalam autoklaf, pakailah serbet karena panas lalu goyanglah medium pelan-pelan supaya agar tercampur secara merata. Jangan terlalu keras supaya tidak tumpah.

c. Medium LB atau LBA dengan antibiotik

Bahan	: Triptone	10 g
	Yeast extract	5 g
	NaCl	10 g
	Antibiotik	50 mg/ml dalam dH ₂ O
	ddH ₂ O	1 L

Semua bahan dilarutkan kedalam 950 ml dH₂O. pH diatur 7,0 menggunakan 5 N NaOH (sekitar 0,2 ml). Volume larutan ditambah sampai 1 L. Sterilisasi dengan autoklaf menggunakan suhu 121 °C atau 15 lb/sq selama 20 menit. Biarkan medium menjadi dingin sampai suhu sekitar 50 °C. Antibiotik kemudian ditambahkan dalam medium.

Bila medium LBA dengan antibiotik akan dituang ke dalam cawan petri maka isikan sebanyak 30-35 ml medium untuk setiap cawan petri berukuran 90 mm. Apabila terdapat gelembung udara pada medium yang telah dituang maka lewatkan petri diatas Bunsen sebelum medium memadat. Pada saat medium sudah memadat dengan sempurna maka petri dibalik.

Medium dapat disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan. Pada saat akan digunakan, keluarkan medium ke suhu ruang 1-2 jam sebelumnya. Bila medium langsung digunakan tanpa disimpan terlebih, maka akan terdapat gelembung udara pada tutup petri saat diinkubasi pada suhu 37 °C. Hal ini dapat menyebabkan koloni bakteri akan tumbuh menyebar dan dapat memicu kontaminasi. Cara mengatasi masalah tersebut adalah dengan membersihkan gelembung air pada permukaan petri dekat dengan Bunsen lalu menyimpan petri pada suhu 37 °C selama beberapa jam dengan posisi terbalik. Cara yang lain adalah dengan menghentakkan tutup petri secara cepat sekali dengan Bunsen sementara petri tempat medium diletakkan terbalik untuk mengurangi kontaminasi.

Soal :

1. Apakah fungsi dari UV transilluminator
2. Bagaimana cara mengambil larutan sebanyak 20 µl ?
3. Sebutkan 5 jenis alat yang di!gunakan dalam teknik rekayasa genetika dan gambarkan

Acara 3.

PENGENALAN MIKROORGANISME ALAMI DAN HASIL REKAYASA GENETIKA

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti dan memahami mikroorganisme alami dan mikroorganisme hasil rekayasa genetika, sifat-sifat, pertumbuhan dan perbedaannya serta mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa dapat mengerti dan memahami mikroorganisme alami dan mikroorganisme hasil rekayasa genetika, sifat-sifat, pertumbuhan dan perbedaannya.
3. Indikator :
 - 1.Mampu mengetahui dan menjelaskan mikroorganisme alami dan hasil rekayasa genetika 70% benar
 - 2.Mampu menjelaskan sifat-sifat mikroorganisme alami dan hasil rekayasa genetika 70% benar
 3. Mampu menjelaskan pertumbuhan mikroorganisme alami dan hasil rekayasa genetika 70% benar
 4. Mampu menjelaskan perbedaan mikroorganisme alami dan hasil rekayasa genetika 70% benar
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Penelitian Biologi molekuler memerlukan mikroorganisme, mikroorganisme hasil rekayasa genetika. Kedua jenis mikroorganisme tersebut akan diperbanyak dan disimpan pada media yang tertentu. Bakteri dapat disimpan pada *stab culture* selama dua tahun lebih atau dalam stok gliserol dalam waktu tidak terbatas.

Perbanyak mikroorganisme

Stab cultures

Gunakan gelas vial berukuran 2-3 ml dengan ujung berulir bertutupkan karet. Masukkan agar cair sampai dua sepertiga tabung. Vial disterilisasi dengan autoklaf dengan tutup tabung dikendorkan menggunakan suhu 121 °C atau 15 lb/sq selama 20 menit. Keluarkan vial dari autoklaf, biarkan agak dingin lalu kencangkan tutup vial. Simpan pada suhu ruang sampai diperlukan. Penyimpanan bakteri dilakukan dengan mengambil satu koloni tunggal bakteri dengan jarum inokulasi steril dan tusukkan beberapa kali pada agar samapai ke dasar tabung. Tutuplah tabung dengan rapat lalu berikan label pada tabung maupun tutupnya. Simpan pada ruang gelap pada suhu ruang.

Stok gliserol

1). Kultur Bakteri pada media cair

Kultur bakteri yang digunakan sebanyak 0.85 ml dan dimasukkan dalam 1.5 tabung eppendorf lalu ditambah 0.15 ml gliserol steril (sterilisasi dengan autoklaf menggunakan suhu 121 °C atau 15 lb/sq selama 20 menit). Kultur divorteks untuk memastikan bahwa gliserol tersebar secara merata. Pindahkan kultur dalam eppendorf dalam wadah tertutup rapat. Dinginkan kultur gliserol dalam es kering-etanol atau dalam nitrogen cair lalu simpanlah stok gliserol pada suhu -70 °C untuk penyimpanan dalam jangka waktu lama.

Pemulihan kultur dilakukan dengan membuka tutup eppendorf menggunakan jarum inokulasi steril lalu segera digoreskan di atas permukaan agar. Kultur dalam stok gliserol segera dikembalikan pada suhu -70 °C, sedangkan hasil goresan diinkubasi pada suhu 37 °C semalam.

2). Kultur bakteri pada Media padat

Bakteri yang tumbuh pada media padat diambil dan dimasukkan dalam 2 ml medium LB. Medium LB yang mengandung 30% gliserol lalu tambahkan dengan volume yang sama. Kultur divorteks untuk memastikan bahwa gliserol tersebar secara merata. Bagilah kultur tersebut dalam beberapa eppendorf. Pindahkan kultur dalam eppendorf dalam wadah tertutup rapat. Dinginkan kultur gliserol dalam es kering-etanol atau dalam nitrogen cair lalu simpanlah stok gliserol pada suhu -70 °C untuk penyimpanan dalam jangka waktu lama.

Strain Mikroorganisme

a. *Escherichia coli* DH5α :

genotip : *supE44ΔlacU169(ø80lacZΔM15)hsdR17*
recA1endA1gyrA96thi-1relA1

Karakter : Strain rekombinan untuk memperbanyak dan menumbuhkan plasmid dan kosmid. Sifat *ø80lacZΔM15* menunjukkan α -komplementasi dengan ujung amino β -galaktosidase yang disandi pada vektor pUC (Hanahan, 1983)

b. *Escherichia coli* JM 109 :

genotip : *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96relA1 thiΔ(lac-pro AB) F'[traD36 proAB*
' lacI^q lacZΔM15]

Karakter : Strain rekombinan yang sesuai untuk vektor pembawa mutasi amber dan akan memodifikasi tapi tidak memotong DNA asing

Soal :

1. Apakah yang dimaksud dengan organisme hasil rekayasa genetika
2. Jelaskan karakter *Escherichia coli* DH5α !
3. Mengapa kita harus menggunakan organisme hasil rekayasa genetika ?

ACARA 4.

PEMBUATAN MEDIUM DAN BUFER

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengetahui fungsi dan membuat medium dan bufer yang digunakan dalam teknik-teknik Rekayasa Genetika, dan mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa dapat mengetahui fungsi dan membuat medium dan bufer yang digunakan dalam teknik-teknik Rekayasa Genetika
3. Indikator :
 1. Mampu menjelaskan fungsi medium yang digunakan dalam teknik rekayasa genetika 70% benar
 2. mampu membuat medium yang digunakan dalam teknik rekayasa genetika 70% benar
 3. mampu menjelaskan fungsi bufer yang digunakan dalam teknik rekayasa genetika 70% benar.
 4. mampu membuat bufer yang digunakan dalam teknik rekayasa genetika 70% benar
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Semua bahan kimia dan pelarut (air) yang digunakan harus memiliki tingkatan yang sesuai untuk digunakan dalam pekerjaan biologi molekuler. Pelarut yang digunakan (air) yang digunakan juga harus memenuhi standar molekuler yaitu dH₂O (aquadest), ddH₂O (aquabidest), dddH₂O (miliQ) yaitu sudah melalui beberapa tingkat penyaringan dan memiliki pH netral yaitu 7. Hampir semua medium, larutan dan buffer harus disterilisasi terlebih dahulu. Medium, larutan dan buffer yang tahan panas disterilisasi menggunakan autoklaf, sedangkan bahan kimia tidak tahan panas atau dapat rusak akibat pemanasan disterilisasi menggunakan filter 0.22 µm. Sterilisasi diperlukan untuk mencegah kontaminasi dan menjaga agar medium, larutan dan buffer aman untuk disimpan dalam jangka waktu yang cukup lama. Beberapa larutan tidak memerlukan sterilisasi seperti larutan asam, larutan basa dan senyawa organik.

Penyimpanan larutan dan buffer dapat dilakukan pada suhu ruang kecuali untuk beberapa larutan dan buffer tertentu. Biasanya larutan dan buffer dibuat dalam bentuk larutan stok yang dapat diencerkan sewaktu-waktu. Oleh karena, harus selalu disediakan air steril untuk mengencerkan larutan stok. Larutan yang digunakan dalam pekerjaan biologi molekuler adalah larutan yang sudah diencerkan.

1. 0.5 M EDTA

Bahan : Na₂EDTA.2H₂O (BM 372.2 g/mol) 186.1 g
NaOH (BM 40g/mol) 20 g
dH₂O 1 L

Semua bahan dilarutkan kedalam 950 ml dH₂O. pH diatur 8,0. Volume larutan ditambah sampai 1 L. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C atau 15 lb/sq selama 20 menit.

Garam trisodium lebih mudah larut dibandingkan garam disodium. Oleh karena itu sebaiknya disiapkan juga larutan stok 0.5 M Na₂EDTA dan 0.5 M NaOH.

2. 1 N HCl

Konsentrasi standar HCl adalah 36% (w/w) atau 11.6 N. Hal yang penting untuk diperhatikan dalam proses pembuatan larutan ini adalah, **tambahkan asam pada air, jangan air ditambahkan pada asam.** Tidak dibutuhkan sterilisasi.

Bahan : HCl standar 36% 8.6 ml
ddH₂O steril 91.4 L

Pembuatan larutan 0.1 N HCl dari larutan stok 1 N HCl dilakukan dengan mengambil 10 ml 1 N HCl ditambah 90 ml air.

3. 5 M NaCl

Bahan : NaCl (BM = 58.44 g/mol) 29.2 g
ddH₂O 100 ml

4. 10 N NaOH

Bahan : NaOH (BM = 40 g/mol) 400 g
ddH₂O 1 L

Pembuatan NaOH 10 N harus dilakukan secara berhati-hati untuk menghindari kecelakaan karena gelas yang dipakai kurang kuat. Jadi pilihlah alat gelas yang agak tebal. Pada awalnya gunakan terlebih dahulu 900 ml air lalu masukkan NaOH kemudian diaduk secara merata. Setelah merata ditambahkan air sampai volume 1 L. Larutan tidak usah disterilisasi.

5. Loading buffer

Bahan : 0.25% bromophenol blue
40% (w/v) sukrosa dalam dH₂O

6. 10 M Amonium asetat

Bahan : Amonium asetat (BM 77.1 g/mol) 771 g
ddH₂O 1 L

Sterilisasi reagen dengan filter 0.22 µm.

7. 70% (v/v) etanol

Bahan : Etanol absolut 70 ml
ddH₂Osteril sampai 100 ml

Larutan tidak perlu disterilisasi.

8. 80% (v/v) gliserol

Bahan : Gliserol 80 ml
ddH₂Osteril sampai 100 ml

Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C atau 15 lb/sq selama 20 menit.

9. 10 mg/ml Etidium Bromida

Bahan : Etidium bromida	1 g
ddH ₂ O steril	100 ml

Campur larutan secara merata lalu disimpan di botol gelap. Larutan tidak perlu disterilisasi.

10. Ampisilin (100 mg/ml)

Bahan : Ampisilin	1 g
ddH ₂ O steril	10 ml

Campur larutan secara merata lalu dibuat alikuot. Larutan tidak perlu disterilisasi. Larutan antibiotik disimpan di botol gelap. Larutan antibiotik disimpan pada suhu -20 °C.

Ampisilin merupakan antibiotik turunan penisilin. Ampisilin pada konsentrasi tinggi bersifat bakteriosid terhadap sel yang sedang tumbuh. Penghambatan dilakukan terhadap dinding sel dengan mencegah ikatan antara peptidoglikan. β -laktamase yang disandi oleh gen *bla* menunjukkan ketahanan dengan memecah cincin β -laktam. Biasanya ampisilin digunakan dalam medium pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi 25 -50 μ g/ml.

11. 10% (w/v) Sodium Dodesil Sulfat

Bahan : SDS	100 g
ddH ₂ O	1 L

Pada awalnya gunakan terlebih dahulu 900 ml air lalu masukkan NaOH kemudian diaduk secara merata. Setelah merata ditambahkan air sampai volume 1 L. Larutan tidak usah disterilisasi.

12. Bufer TAE 10X (Sambrook dan Maniatis, 1995) :

Bahan : Basa Tris 2M	48.4 g
Asam asetat glasial (17.4 M)	11.42 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	40 ml g
ddH ₂ O	1 L

Semua bahan dilarutkan kedalam 950 ml dH₂O. pH diatur 7,0 menggunakan 5 N NaOH(sekitar 0,2 ml). Volume larutan ditambah sampai 1 L. Sterilisasi dengan autoklaf menggunakan suhu 121 °C atau 15 lb/sq selama 20 menit.

13. 1 M Bufer Tris-HCl

Bahan : Tris (BM 121 gr/mol) 121 gr
ddH₂O 1 L

Pembuatan larutan 1 M Tris biasanya akan menghadapi kesulitan karena Tris merupakan bahan yang tidak mudah larut, sehingga air harus ditambahkan sedikit demi sedikit. Perhatikan tabel dibawah bila akan digunakan HCl standar 36%. Setelah pH yang diinginkan tercapai baru ditambahkan air sampai volume 1 L. Sterilisasi dengan autoklaf menggunakan suhu 121 °C atau 15 lb/sq selama 20 menit. Lebih baik pembuatan larutan Tris dilakukan dalam volume yang lebih kecil atau kurang dari 1 L.

pH (25 °C)	Volume HCl 36% (ml)
7.20	76
7.40	71.3
7.60	66
7.80	56
8.00	46
8.20	38
8.40	28.5
8.60	21
8.80	14
9.00	8.6

Perhatian : Tris mempunyai koefisien temperatur yang cukup bermakna. Pada saat larutan berganti derajat temperaturnya dari 25 °C ke 5 °C, maka pH akan naik dengan rerata 0.03 unit pH tiap derajat sentigrade. Sebaliknya bila terjadi kenaikan suhu dari 25 °C ke 37°C maka ph akan mengalami penurunan rata-rata 0.025 unit pH tiap derajat sentigrade.

14. 0.05 M Bufer Tris-HCl

Penyiapan Bufer Tris 0.05 M pada berbagai pH dapat dilakukan dengan mencampur 50 ml 0.1. M basa Tris dengan volume 0.1 N HCl yang tertera pada tabel di bawah ini lalu tambahkan air sampai mencapai volume 100 ml. Sterilisasi dengan autoklaf menggunakan suhu 121 °C atau 15 lb/sq selama 20 menit.

pH (25 °C)	Volume 0.1 N HCl (ml)
7.10	45.7
7.20	44.7
7.30	43.4
7.40	42.0
7.50	40.3
7.60	38.5
7.70	36.6
7.80	34.5
7.90	32.0
8.00	29.2
8.10	26.2
8.20	22.9
8.30	19.9
8.40	17.2
8.50	14.7
8.60	12.4
8.70	10.3
8.80	8.5
8.90	7.0

15. Buffer TE (Sambrook dan Maniatis, 1995) :

pH	Tris-Cl	EDTA
7.4	10 mM Tris-Cl pH 7.4	1 mM EDTA pH 8.0
7.6	10 mM Tris-Cl pH 7.6	1 mM EDTA pH 8.0
8.0	10 mM Tris-Cl pH 8.0	1 mM EDTA pH 8.0

Nilai pH rata-rata pada berbagai larutan Stok :

Larutan	1 N	0.1 N	0.01 N	0.001 N
Asam asetat	2.4	2.9	3.4	3.9
Asam Hidroklorat	0.10	1.07	2.02	3.01
Asam Sulfat	0.3	1.2	2.1	
Asam Sitrat		2.1	2.6	
Amonium hidroksida	11.8	11.3	10.8	10.3
Sodium hidroksida	14.05	13.07	12.12	11.13
Sodium bikarbonat		8.4		
Sodium karbonat		11.5	11.0	

REAGEN ORGANIK

1. Fenol

Fenol yang dijual secara komersial untuk biologi molekuler biasanya berbentuk cair, jernih dan tidak berwarna sehingga dapat langsung digunakan tanpa harus didistilasi ulang. Kadang-kadang fenol cair berwarna jambon atau oranye, dan bila hal ini terjadi maka harus segera dikembalikan pada produsen. Kristal fenol tidak disarankan untuk dipakai karena harus didistilasi terlebih dahulu pada suhu 160°C untuk menghilangkan hasil oksidasi seperti kuinon. Senyawa kuinon dapat memecah ikatan fosfodiester dan dapat menyebabkan ikatan silang (cross-linking) DNA dan RNA.

Perhatian : Fenol bersifat sangat korosif dan menyebabkan luka bakar. Gunakan sarung tangan, jas laboratorium dan gelas kaca yang aman saat menggunakan fenol. Semua pekerjaan yang melibatkan fenol harus dikerjakan di ruang asam. Kulit yang terkena fenol harus segera dibilas air lalu dicuci dengan sabun. *Jangan menggunakan etanol/alkohol !!!* .

Ekuilibrasi fenol

Sebelum digunakan, fenol harus diekuilibrasi sampai pH mencapai > 7.8 karena DNA dapat terpotong-potong pada pH asam.

- a. Fenol cair harus disimpan pada suhu -20°C . Pada saat diperlukan, fenol dapat dikeluarkan dari pendingin, dan biarkan sejenak pada suhu ruang kemudian cairkan pada suhu 68°C . Tambahkan hidroksikuinolin samapai konsentrasi 0.1%. Senyawa hidroksikuinolin merupakan antioksidan, sebagian merupakan penghambat Rnase dan kelator lemah senyawa logam. Warna oranya merupakan cara untuk mengidentifikasi senyawa organik.
- b. Fenol yang telah mencair ditambah dengan bufer 0.5 M Tris-Cl pH 8.0 dengan volume yang sama pada suhu ruang. Ratakan campuran dengan pengaduk selama 15 menit. Pada saat kedua fase telah terpisah, ambillah fasa atas.
- c. Tambahkan kembali bufer 0.5 M Tris-Cl pH 8.0 dengan volume yang sama pada fenol di suhu ruang. Ratakan campuran dengan pengaduk selama 15 menit. Ulangi terus tahap diatas sampai pH fenol mencapai > 7.8 (diukur dengan kertas pH).
- d. Setelah fenol diekuilibrasi dan fasa cair dihilangkan, tambahkan 0.1 M Tris-Cl pH 8.0 sebanyak 0.1 volume yang telah diberi 0.2% merkptoetanol. Larutan fenol dapat disimpan dalam botol gelap dan bertahan samapi lebih dari 1 bulan.

2. Fenol : kloroform : IAA (25 : 24 : 1)

Larutan fenol : kloroform dan IAA (25:24:1) biasa digunakan percobaan molekuler untuk menghilangkan kontaminasi protein pada saat isolasi DNA. Kloroform akan mendenaturasi protein serta memfasilitasi pemisahan antara fasa cair dan fasa organik. Isoamil alkohol akan mengurangi buih protein yang terbentuk saat ekstraksi DNA.

Larutan fenol : kloroform : IAA dapat disimpan dibawah larutan 100 mM Tris-Cl pH 8.0 pada botol gelap pada suhu 4°C selama lebih dari 1 bulan.

Soal :

1. Bagaimana cara membuat Buffer Tris-Cl pH 8.0
2. Bagaimana cara melakukan ekuilibarsi fenol ?
3. DNA disimpan dalam larutan apa?

ACARA 5.

ISOLASI DNA GENOM BAKTERI *WILD TYPE*

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA genom bakteri *wild type*, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar: Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA genom bakteri *wild type*.
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti tahapan dalam teknik isolasi DNA dari DNA genom bakteri *wild type* 70% benar
 2. Mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA genom bakteri *wild type* 70% benar
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Sebelum tahun 1970, DNA merupakan molekul sel yang paling sulit untuk dianalisis. *Deoxyribo nucleic acid* (DNA) merupakan cetak biru suatu makhluk hidup dengan kemampuan menyimpan dan menggandakan informasi genetik yang terdapat di dalamnya. Namun sejalan dengan perkembangan ilmu genetika dan penemuan teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetik, hal tersebut menjadi lebih mudah. Perubahan yang mendasar adalah ditemukannya cara untuk memurnikan dan memperbanyak fragmen DNA. Penemuan enzim restriksi oleh Smith dan Wilcok (1970) dan Heitman (1993), penemuan vektor kloning oleh Cohen *et al.* (1973) dan Bolivar *et al.* (1977), isolasi enzim DNA ligase oleh Higgins dan Cozzarelli (1979) menjadi pembuka dan berharga bagi perkembangan teknologi rekayasa genetik.

DNA suatu organisme terdapat dalam kromosom dan di luar kromosom (DNA ekstrakromosom). Plasmid, kloroplas dan mitokondria merupakan sumber DNA diluar kromosom. DNA di luar kromosom diperoleh selama evolusi melalui proses endosimbiosis antara organisme bersel tunggal (prokariot) membentuk organisme bersel banyak/multiseluler atau eukariot. DNA kromosom dan ekstrakromosom bekerjasama menjaga kelangsungan hidup suatu organisme.

Materi genetik atau DNA dari berbagai makhluk hidup dapat diambil dan dilihat. Selanjutnya DNA tersebut dapat diperbanyak untuk digunakan bagi analisis dan keperluan lebih lanjut. Isolasi DNA merupakan tahapan pertama yang harus dilakukan untuk mengambil DNA dari sel makhluk hidup.

Isolasi DNA genom membutuhkan penyiapan DNA kromosom dengan kualitas yang baik karena akan digunakan untuk berbagai manipulasi genetik yang lain. Sejak analisis genom dilakukan untuk banyak sampel dan DNA genom tersebut dipakai dalam waktu yang lama maka dibutuhkan suatu upaya besar agar diperoleh kualitas DNA yang baik dalam jumlah besar.

Isolasi atau pengambilan DNA dari makhluk hidup terbagi atas beberapa tahapan yaitu penumbuhan dan perbanyakkan sel, penghancuran dinding sel, penghilangan RNA dan protein serta pemurnian DNA. Sel akan ditumbuhkan dan diperbanyak dalam medium dalam tenggang waktu 24 jam lalu dipanen pada saat sel membelah secara aktif pada umur sel yang muda agar DNA mudah diambil. Medium untuk perbanyakkan sel harus mengandung nutrisi

penting yang dibutuhkan oleh sel. Medium untuk penumbuhan sel bakteri biasanya menggunakan medium Luria Bertani (Brown, 1995).

Sel organisme terbungkus oleh membran sitoplasma dan dikelilingi oleh dinding sel yang kuat terdiri dari ikatan antara protein dan lemak. Semua pelindung materi genetik organisme tersebut harus dipecah untuk mengeluarkan bagian dalam sel termasuk DNA. Penghancuran dinding sel dapat dilakukan dengan cara mekanik, kimiawi dan enzimatik. Secara mekanik isolasi DNA menggunakan getaran ultrasonik atau sonikasi dan penggerusan. Enzim lisozim biasanya digunakan untuk memecah dinding sel secara enzimatik untuk mengeluarkan DNA. Enzim lisosim akan mendigesti senyawa polimerik yang menyebabkan kekakuan dinding sel. Larutan kimiawi pemecah dinding sel biasanya menggunakan detergen seperti etilen diamina tetra asetat (EDTA), sodium klorida, atau sodium dodesil sulfat. Bahan kimia EDTA akan menghilangkan ion magnesium yang mempertahankan keutuhan selubung sel dan menghambat aktivitas enzim perusak DNA. Bahan deterjen seperti SDS akan menghilangkan molekul lemak sehingga merusak membran sel. Bagian sel yang tidak dikehendaki selain DNA atau kontaminan dihilangkan dengan cara pengendapan menggunakan fenol, kloroform dan IAA (*Indol acetic acid*). Pemurnian dan pemekatan DNA dilakukan menggunakan etanol (Watson, 1988).

Prinsip dasar isolasi DNA umumnya terdiri atas perbanyakan atau kultivasi sel sehingga diperoleh DNA dalam jumlah besar. Kultivasi sel kemudian diakhiri dengan panen sel pada saat usia sel mencapai tingkat pembelahan tertinggi dan kepadatan sel terbesar. Selanjutnya dilakukan pemecahan dinding sel dengan bantuan enzim. Pada saat itu, dibutuhkan detergen untuk membantu lisis inti sel dan melepaskan DNA. Sel biasanya akan lisis dalam larutan SDS yang mengandung sukrosa. Sukrosa dibutuhkan untuk meningkatkan viskositas sel dan membantu mengeluarkan DNA. Setelah DNA diperoleh maka harus dilindungi dari nuklease dan dibebaskan dari kontaminasi protein lain. Kontaminasi protein akan menghambat reaksi enzimatik pada tahap manipulasi berikutnya. Aktivitas nuklease akan dihambat oleh EDTA sedangkan degradasi protein akan dilakukan oleh Protease K. Selanjutnya DNA akan dimurnikan menggunakan ekstraksi fenol dan dipresipitasi menggunakan etanol.

Penentuan kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan cara mengukur absorbansi DNA dengan spektrofotometer (OD) pada panjang gelombang 260 nm dan OD 280 nm. Kemurnian DNA diperoleh dari rasio antara absorbansi pada OD₂₆₀ dan OD₂₈₀. Kemurnian kurang dari 1.8 menunjukkan bahwa DNA telah terkontaminasi dengan fenol dan protein. Nilai kemurnian diatas 1.8 menunjukkan DNA telah terkontaminasi RNA.

Kemurnian DNA dikatakan baik apabila perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibandingkan dengan panjang gelombang 280 nm adalah 1.8.

Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{pengenceran}$$
$$\text{Konsentrasi DNA aktual } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Konstr DNA } (\mu\text{g/ml})}{100} \times \text{volume aktual } (\mu\text{l})$$

Cara kerja

Tahapan Isolasi DNA bakteri menurut Sambrook dan Maniatis (1989) adalah sebagai berikut :

- a) Koloni tunggal *E. coli* ditumbuhkan di 5 ml medium LB cair 20 ml, digojog semalam dengan kecepatan 300 rpm pada suhu 37°C. Alternatif lain adalah kultur dari stok gliserol sebanyak 100 µl *E. coli* JM 109 diinokulasikan ke dalam 5 ml medium Luria Bertani.
- b) kultur *E. coli* JM telah diinkubasi diinokulasikan dalam 500 ml medium LB. Kultur diinkubasikan pada suhu 37 °C semalam menggunakan penggojogan 300 rpm sampai mencapai fase tengah logaritmik. Dibutuhkan waktu sekitar 2-3 jam dengan nilai absorbansi 0.7 – 0.8 pada panjang gelombang 600 nm..
- b) Kultur *E. coli* dimasukkan ke dalam tabung kemudian disentrifugasi menggunakan *microcentrifuge* dengan kecepatan maksimum 6.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang.
- c) Pelet diresuspensi dengan 20 ml larutan TEG (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM glukosa, dibuat segar tiap kali isolasi DNA) dan ditambahkan 10 µl larutan enzim lisozim 10 mg/ml untuk memecah dinding sel. Suspensi diinkubasi dalam penangas bersuhu 37 °C selama 1 jam, lalu disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit.
- d) Pelet sel resuspensikan kedalam 20 ml bufer lisis sebanyak 20 ml (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 8.0 dan 10% SDS, larutan ini dibuat segar)
- e) Dilakukan purifikasi menggunakan 10 ml fenol : kloroform : IAA 25:24:1. Suspensi dicampur secara merata dengan cara membolak balik tabung dan dibiarkan di suhu ruang selama 15 menit. Suspensi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit.
- f) Larutan akan terbagi menjadi dua bagian (fasa). Fasa atas dipindahkan ke tabung baru steril. Selanjutnya ditambah larutan etanol 96% dingin sebanyak dua kali volume

fasa atas yang telah diperoleh. Suspensi diinkubasikan pada suhu -20°C selama semalam.

- g) Suspensi digoyang pelan-pelan. Bila ada benang DNA yang muncul maka benang tersebut diambil dan dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga baru. Bila tidak ada benang maka suspensi disentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit.
- h) Supernatan dibuang dan pelet dikeringanginkan sampai larutan etanol benar-benar habis. Pelet kemudian dilarutkan dalam 40 μl TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 7.6; 1 mM EDTA). Disimpan di pada suhu -20°C atau DNA hasil isolasi langsung dilihat melalui elektroforesis.
- i. Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA

Uji kualitatif DNA dilakukan dengan menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1%. Kualitas ditentukan dengan munculnya pita DNA genom pada gel agarosa. Semua sampel DNA masing-masing sebanyak 2 μl dicampur dengan 1 μl *loading dye* dimasukkan kedalam sumur gel agarosa. Selanjutnya elektroforesis dijalankan (*running*) dengan arus listrik 100 volt selama 20 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi dengan GelDoc. Uji kuantitatif DNA kentang dilakukan dengan menggunakan alat *Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spectrophotometer*. Semua sampel DNA masing-masing sebanyak 1 μl ditetaskan pada plot uji nanodrop spektrofotometer yang sebelumnya telah dikalibrasi dengan menggunakan 1 μl larutan blanko (ddH_2O). Selanjutnya hasil konsentrasi dan kemurnian DNA yang keluar pada layar komputer dicatat. Konsentrasi DNA ditentukan berdasarkan nilai absorbansi A260, nilai A260 = setara dengan 50 μg DNA/ml. Sedangkan kemurniannya ditentukan berdasarkan $\text{A}_{260}/\text{A}_{280} = 1,8 - 2,0$.

Soal :

1. Bagaimanakah karakter genom bakteri ?
2. Bagaimana cara menentukan kemurnian DNA?
3. Bagaimana cara mennetukan konsntrasi DNA ?

ACARA 6.
ISOLASI DNA GENOM BAKTERI REKOMBINAN
***Escherichia coli* JM 109**

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA genom bakteri *Escherichia coli* JM 109, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA genom bakteri *Escherichia coli* JM 109.
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti tahapan dalam teknik isolasi DNA dari DNA genom bakteri *Escherichia coli* JM 109 70% benar
 2. Mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA genom bakteri *Escherichia coli* JM 109 70% benar
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Sebelum tahun 1970, DNA merupakan molekul sel yang paling sulit untuk dianalisis. *Deoxyribo nucleic acid* (DNA) merupakan cetak biru suatu makhluk hidup dengan kemampuan menyimpan dan menggandakan informasi genetik yang terdapat di dalamnya. Namun sejalan dengan perkembangan ilmu genetika dan penemuan teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetik, hal tersebut menjadi lebih mudah. Perubahan yang mendasar adalah ditemukannya cara untuk memurnikan dan memperbanyak fragmen DNA. Penemuan enzim restriksi oleh Smith dan Wilcok (1970) dan Heitman (1993), penemuan vektor kloning oleh Cohen *et al.* (1973) dan Bolivar *et al.* (1977), isolasi enzim DNA ligase oleh Higgins dan Cozzarelli (1979) menjadi pembuka dan berharga bagi perkembangan teknologi rekayasa genetik.

DNA suatu organisme terdapat dalam kromosom dan di luar kromosom (DNA ekstrakromosom). Plasmid, kloroplas dan mitokondria merupakan sumber DNA diluar kromosom. DNA di luar kromosom diperoleh selama evolusi melalui proses endosimbiosis antara organisme bersel tunggal (prokariot) membentuk organisme bersel banyak/multiseluler atau eukariot. DNA kromosom dan ekstrakromosom bekerjasama menjaga kelangsungan hidup suatu organisme.

Materi genetik atau DNA dari berbagai makhluk hidup dapat diambil dan dilihat. Selanjutnya DNA tersebut dapat diperbanyak untuk digunakan bagi analisis dan keperluan lebih lanjut. Isolasi DNA merupakan tahapan pertama yang harus dilakukan untuk mengambil DNA dari sel makhluk hidup.

Isolasi DNA genom membutuhkan penyiapan DNA kromosom dengan kualitas yang baik karena akan digunakan untuk berbagai manipulasi genetik yang lain. Sejak analisis genom dilakukan untuk banyak sampel dan DNA genom tersebut dipakai dalam waktu yang lama maka dibutuhkan suatu upaya besar agar diperoleh kualitas DNA yang baik dalam jumlah besar.

Isolasi atau pengambilan DNA dari makhluk hidup terbagi atas beberapa tahapan yaitu penumbuhan dan perbanyakkan sel, penghancuran dinding sel, penghilangan RNA dan protein serta pemurnian DNA. Sel akan ditumbuhkan dan diperbanyak dalam medium dalam tenggang waktu 24 jam lalu dipanen pada saat sel membelah secara aktif pada umur sel yang muda agar DNA mudah diambil. Medium untuk perbanyakkan sel harus mengandung nutrisi

penting yang dibutuhkan oleh sel. Medium untuk penumbuhan sel bakteri biasanya menggunakan medium Luria Bertani (Brown, 1995).

Sel organisme terbungkus oleh membran sitoplasma dan dikelilingi oleh dinding sel yang kuat terdiri dari ikatan antara protein dan lemak. Semua pelindung materi genetik organisme tersebut harus dipecah untuk mengeluarkan bagian dalam sel termasuk DNA. Penghancuran dinding sel dapat dilakukan dengan cara mekanik, kimiawi dan enzimatik. Secara mekanik isolasi DNA menggunakan getaran ultrasonik atau sonikasi dan penggerusan. Enzim lisozim biasanya digunakan untuk memecah dinding sel secara enzimatik untuk mengeluarkan DNA. Enzim lisosim akan mendigesti senyawa polimerik yang menyebabkan kekakuan dinding sel. Larutan kimiawi pemecah dinding sel biasanya menggunakan detergen seperti etilen diamina tetra asetat (EDTA), sodium klorida, atau sodium dodesil sulfat. Bahan kimia EDTA akan menghilangkan ion magnesium yang mempertahankan keutuhan selubung sel dan menghambat aktivitas enzim perusak DNA. Bahan deterjen seperti SDS akan menghilangkan molekul lemak sehingga merusak membran sel. Bagian sel yang tidak dikehendaki selain DNA atau kontaminan dihilangkan dengan cara pengendapan menggunakan fenol, kloroform dan IAA (*Indol acetic acid*). Pemurnian dan pemekatan DNA dilakukan menggunakan etanol (Watson, 1988).

Prinsip dasar isolasi DNA umumnya terdiri atas perbanyakan atau kultivasi sel sehingga diperoleh DNA dalam jumlah besar. Kultivasi sel kemudian diakhiri dengan panen sel pada saat usia sel mencapai tingkat pembelahan tertinggi dan kepadatan sel terbesar. Selanjutnya dilakukan pemecahan dinding sel dengan bantuan enzim. Pada saat itu, dibutuhkan detergen untuk membantu lisis inti sel dan melepaskan DNA. Sel biasanya akan lisis dalam larutan SDS yang mengandung sukrosa. Sukrosa dibutuhkan untuk meningkatkan viskositas sel dan membantu mengeluarkan DNA. Setelah DNA diperoleh maka harus dilindungi dari nuklease dan dibebaskan dari kontaminasi protein lain. Kontaminasi protein akan menghambat reaksi enzimatik pada tahap manipulasi berikutnya. Aktivitas nuklease akan dihambat oleh EDTA sedangkan degradasi protein akan dilakukan oleh Protease K. Selanjutnya DNA akan dimurnikan menggunakan ekstraksi fenol dan dipresipitasi menggunakan etanol.

Penentuan kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan cara mengukur absorbansi DNA dengan spektrofotometer (OD) pada panjang gelombang 260 nm dan OD 280 nm. Kemurnian DNA diperoleh dari rasio antara absorbansi pada OD₂₆₀ dan OD₂₈₀. Kemurnian kurang dari 1.8 menunjukkan bahwa DNA telah terkontaminasi dengan fenol dan protein. Nilai kemurnian diatas 1.8 menunjukkan DNA telah terkontaminasi RNA.

Kemurnian DNA dikatakan baik apabila perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibandingkan dengan panjang gelombang 280 nm adalah 1.8.

Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{pengenceran}$$
$$\text{Konsentrasi DNA aktual } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Konstr DNA } (\mu\text{g/ml})}{100} \times \text{volume aktual } (\mu\text{l})$$

Cara Kerja

- a. Koloni tunggal *E. coli* ditumbuhkan pada 5 ml medium LB cair 20 ml, digojog semalam dengan kecepatan 300 rpm pada suhu 37°C
- b. Setelah diukur kerapatan optiknya senilai 0,5 – 0,6, kultur *E. coli* diambil 5 ml lalu ditumbuhkan pada 200 ml medium LB.
- c. Kultur disentrifugasi 12.000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang. Pellet ditambah buffer lisis (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 8, 10 mg/ml enzim lisosim) dan diinkubasi 1 jam pada suhu 37°C.
- d. larutan ditambah 1 ml 10% SDS, 4 ml 5 M NaClO₄, 40 ml chloroform : IAA (24:1) digojog selama 15 menit pada suhu ruang disentrifugasi 12.000 rpm selama 20 menit
- e. Fasa atas diambil dan ditambah dua kali volume etanol 96% dingin. Inkubasi semalam di suhu 20° C
- f. Suspensi disentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit
- g. Pelet DNA dikeringkan anginkan lalu DNA diresuspensi dengan 40 µl TE pH 8,0. Disimpan di pada suhu –20° C

ACARA 7.

ISOLASI DNA DARAH

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA darah, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA darah.
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti tahapan dalam teknik isolasi DNA darah 70% benar
 2. Mampu melakukan teknik isolasi DNA darah 70% benar
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Sebelum tahun 1970, DNA merupakan molekul sel yang paling sulit untuk dianalisis. *Deoxyribo nucleic acid* (DNA) merupakan cetak biru suatu makhluk hidup dengan kemampuan menyimpan dan menggandakan informasi genetik yang terdapat di dalamnya. DNA merupakan bahan penyusun gen dan makromolekul beruntai ganda berbentuk heliks yang berfungsi sebagai pewarisan sifat yang menyimpan beragam materi genetik. Penelitian DNA pertama dilakukan oleh Friedrich Miescher pada tahun 1869. Beliau mengisolasi suatu materi yang dinamainya nuclein karena berasal dari nukleus sel darah putih. Nuclein bersifat asam sehingga selanjutnya disebut sebagai asam nukleat. Asam nukleat memiliki dua jenis yaitu asam deoksiribonukleat (DNA) dan asam ribonukleat (RNA). Sejalan dengan perkembangan ilmu genetika dan penemuan teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetik, hal tersebut menjadi lebih mudah. Perubahan yang mendasar adalah ditemukannya cara untuk memurnikan dan memperbanyak fragmen DNA. Penemuan enzim restriksi oleh Smith dan Wilcok (1970) dan Heitman (1993), penemuan vektor kloning oleh Cohen *et al.* (1973) dan Bolivar *et al.* (1977), isolasi enzim DNA ligase oleh Higgins dan Cozzarelli (1979) menjadi pembuka dan berharga bagi perkembangan teknologi rekayasa genetik.

Materi genetik atau DNA dari berbagai makhluk hidup dapat diambil dan dilihat. Selanjutnya DNA tersebut dapat diperbanyak untuk digunakan bagi analisis dan keperluan lebih lanjut. Isolasi DNA merupakan tahapan pertama yang harus dilakukan untuk mengambil DNA dari sel makhluk hidup.

Isolasi DNA genom membutuhkan penyiapan DNA kromosom dengan kualitas yang baik karena akan digunakan untuk berbagai manipulasi genetik yang lain. Sejak analisis genom dilakukan untuk banyak sampel dan DNA genom tersebut dipakai dalam waktu yang lama maka dibutuhkan suatu upaya besar agar diperoleh kualitas DNA yang baik dalam jumlah besar.

Isolasi atau pengambilan DNA dari makhluk hidup terbagi atas beberapa tahapan yaitu penumbuhan dan perbanyakkan sel, penghancuran dinding sel, penghilangan RNA dan protein serta pemurnian DNA. Sel akan ditumbuhkan dan diperbanyak dalam medium dalam tenggang waktu 24 jam lalu dipanen pada saat sel membelah secara aktif pada umur sel yang muda agar DNA mudah diambil. Medium untuk perbanyakkan sel harus mengandung nutrien penting yang dibutuhkan oleh sel. Medium untuk penumbuhan sel bakteri biasanya menggunakan medium Luria Bertani (Brown, 1995).

Sel organisme terbungkus oleh membran sitoplasma dan dikelilingi oleh dinding sel yang kuat terdiri dari ikatan antara protein dan lemak. Semua pelindung materi genetik organisme tersebut harus dipecah untuk mengeluarkan bagian dalam sel termasuk DNA. Penghancuran dinding sel dapat dilakukan dengan cara mekanik, kimiawi dan enzimatik. Secara mekanik isolasi DNA menggunakan getaran ultrasonik atau sonikasi dan penggerusan. Enzim lisozim biasanya digunakan untuk memecah dinding sel secara enzimatik untuk mengeluarkan DNA. Enzim lisozim akan mendigesti senyawa polimerik yang menyebabkan kekakuan dinding sel. Larutan kimiawi pemecah dinding sel biasanya menggunakan detergen seperti etilen diamina tetra asetat (EDTA), sodium klorida, atau sodium dodesil sulfat. Bahan kimia EDTA akan menghilangkan ion magnesium yang mempertahankan keutuhan selubung sel dan menghambat aktivitas enzim perusak DNA. Bahan deterjen seperti SDS akan menghilangkan molekul lemak sehingga merusak membran sel. Bagian sel yang tidak dikehendaki selain DNA atau kontaminan dihilangkan dengan cara pengendapan menggunakan fenol, kloroform dan IAA (*Indol acetic acid*). Pemurnian dan pemekatan DNA dilakukan menggunakan etanol (Watson, 1988).

Prinsip dasar isolasi DNA umumnya terdiri atas perbanyakan atau kultivasi sel sehingga diperoleh DNA dalam jumlah besar. Kultivasi sel kemudian diakhiri dengan panen sel pada saat usia sel mencapai tingkat pembelahan tertinggi dan kepadatan sel terbesar. Selanjutnya dilakukan pemecahan dinding sel dengan bantuan enzim. Pada saat itu, dibutuhkan detergen untuk membantu lisis inti sel dan melepaskan DNA. Sel biasanya akan lisis dalam larutan SDS yang mengandung sukrosa. Sukrosa dibutuhkan untuk meningkatkan viskositas sel dan membantu mengeluarkan DNA. Setelah DNA diperoleh maka harus dilindungi dari nuklease dan dibebaskan dari kontaminasi protein lain. Kontaminasi protein akan menghambat reaksi enzimatik pada tahap manipulasi berikutnya. Aktivitas nuklease akan dihambat oleh EDTA sedangkan degradasi protein akan dilakukan oleh Protease K. Selanjutnya DNA akan dimurnikan menggunakan ekstraksi fenol dan dipresipitasi menggunakan etanol.

Penentuan kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan cara mengukur absorbansi DNA dengan spektrofotometer (OD) pada panjang gelombang 260 nm dan OD 280 nm. Kemurnian DNA diperoleh dari rasio antara absorbansi pada OD₂₆₀ dan OD₂₈₀. Kemurnian kurang dari 1.8 menunjukkan bahwa DNA telah terkontaminasi dengan fenol dan protein. Nilai kemurnian diatas 1.8 menunjukkan DNA telah terkontaminasi RNA. Kemurnian DNA dikatakan baik apabila perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibandingkan dengan panjang gelombang 280 nm adalah 1.8.

Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{pengenceran}$$
$$\text{Konsentrasi DNA aktual } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Konstr DNA } (\mu\text{g/ml})}{100} \times \text{volume aktual } (\mu\text{l})$$

Cara Kerja :

- a. Darah total sebanyak 50 ml ditambah 0.5 ml larutan Tris EDTA (TE) di dalam tabung eppendorf 1.5 ml.
- b. Larutan disentrifugasi selama 10 detik pada kecepatan 13.000 g
- c. Supernatan dibuang dan pelet dicampur merata dengan 0.5 ml TE
- d. Tahap 2 dan 3 diulang dua kali.
- e. Supernatan dibuang dan pelet dicampur merata dengan 100 ml buffer K (0.5 % Tween 20 dan 100 mg/ml enzim Proteinase K
- f. Larutan DNA diinkubasi pada suhu 56°C selama 45 menit
- g. Larutan DNA diinkubasi pada suhu 95°C selama 10 menit.
- h. Simpan DNA di suhu -20°C sebelum proses selanjutnya

ACARA 8.

ISOLASI DNA KHAMIR

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA khamir, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA khamir
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti tahapan dalam teknik isolasi DNA khamir 70% benar
 2. Mampu melakukan teknik isolasi DNA khamir 70% benar
 - 3.
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Sebelum tahun 1970, DNA merupakan molekul sel yang paling sulit untuk dianalisis. *Deoxyribo nucleic acid* (DNA) merupakan cetak biru suatu makhluk hidup dengan kemampuan menyimpan dan menggandakan informasi genetik yang terdapat di dalamnya. Namun sejalan dengan perkembangan ilmu genetika dan penemuan teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetik, hal tersebut menjadi lebih mudah. Perubahan yang mendasar adalah ditemukannya cara untuk memurnikan dan memperbanyak fragmen DNA. Penemuan enzim restriksi oleh Smith dan Wilcok (1970) dan Heitman (1993), penemuan vektor kloning oleh Cohen *et al.* (1973) dan Bolivar *et al.* (1977), isolasi enzim DNA ligase oleh Higgins dan Cozzarelli (1979) menjadi pembuka dan berharga bagi perkembangan teknologi rekayasa genetik.

DNA suatu organisme terdapat dalam kromosom dan di luar kromosom (DNA ekstrakromosom). Plasmid, kloroplas dan mitokondria merupakan sumber DNA diluar kromosom. DNA di luar kromosom diperoleh selama evolusi melalui proses endosimbiosis antara organisme bersel tunggal (prokariot) membentuk organisme bersel banyak/multiseluler atau eukariot. DNA kromosom dan ekstrakromosom bekerjasama menjaga kelangsungan hidup suatu organisme.

Materi genetik atau DNA dari berbagai makhluk hidup dapat diambil dan dilihat. Selanjutnya DNA tersebut dapat diperbanyak untuk digunakan bagi analisis dan keperluan lebih lanjut. Isolasi DNA merupakan tahapan pertama yang harus dilakukan untuk mengambil DNA dari sel makhluk hidup.

Isolasi DNA genom membutuhkan penyiapan DNA kromosom dengan kualitas yang baik karena akan digunakan untuk berbagai manipulasi genetik yang lain. Sejak analisis genom dilakukan untuk banyak sampel dan DNA genom tersebut dipakai dalam waktu yang lama maka dibutuhkan suatu upaya besar agar diperoleh kualitas DNA yang baik dalam jumlah besar.

Isolasi atau pengambilan DNA dari makhluk hidup terbagi atas beberapa tahapan yaitu penumbuhan dan perbanyakkan sel, penghancuran dinding sel, penghilangan RNA dan protein serta pemurnian DNA. Sel akan ditumbuhkan dan diperbanyak dalam medium dalam tenggang waktu 24 jam lalu dipanen pada saat sel membelah secara aktif pada umur sel yang muda agar DNA mudah diambil. Medium untuk perbanyakkan sel harus mengandung nutrisi

penting yang dibutuhkan oleh sel. Medium untuk penumbuhan sel bakteri biasanya menggunakan medium Luria Bertani (Brown, 1995).

Sel organisme terbungkus oleh membran sitoplasma dan dikelilingi oleh dinding sel yang kuat terdiri dari ikatan antara protein dan lemak. Semua pelindung materi genetik organisme tersebut harus dipecah untuk mengeluarkan bagian dalam sel termasuk DNA. Penghancuran dinding sel dapat dilakukan dengan cara mekanik, kimiawi dan enzimatik. Secara mekanik isolasi DNA menggunakan getaran ultrasonik atau sonikasi dan penggerusan. Enzim lisozim biasanya digunakan untuk memecah dinding sel secara enzimatik untuk mengeluarkan DNA. Enzim lisosim akan mendigesti senyawa polimerik yang menyebabkan kekakuan dinding sel. Larutan kimiawi pemecah dinding sel biasanya menggunakan detergen seperti etilen diamina tetra asetat (EDTA), sodium klorida, atau sodium dodesil sulfat. Bahan kimia EDTA akan menghilangkan ion magnesium yang mempertahankan keutuhan selubung sel dan menghambat aktivitas enzim perusak DNA. Bahan deterjen seperti SDS akan menghilangkan molekul lemak sehingga merusak membran sel. Bagian sel yang tidak dikehendaki selain DNA atau kontaminan dihilangkan dengan cara pengendapan menggunakan fenol, kloroform dan IAA (*Indol acetic acid*). Pemurnian dan pemekatan DNA dilakukan menggunakan etanol (Watson, 1988).

Prinsip dasar isolasi DNA umumnya terdiri atas perbanyakan atau kultivasi sel sehingga diperoleh DNA dalam jumlah besar. Kultivasi sel kemudian diakhiri dengan panen sel pada saat usia sel mencapai tingkat pembelahan tertinggi dan kepadatan sel terbesar. Selanjutnya dilakukan pemecahan dinding sel dengan bantuan enzim. Pada saat itu, dibutuhkan detergen untuk membantu lisis inti sel dan melepaskan DNA. Sel biasanya akan lisis dalam larutan SDS yang mengandung sukrosa. Sukrosa dibutuhkan untuk meningkatkan viskositas sel dan membantu mengeluarkan DNA. Setelah DNA diperoleh maka harus dilindungi dari nuklease dan dibebaskan dari kontaminasi protein lain. Kontaminasi protein akan menghambat reaksi enzimatik pada tahap manipulasi berikutnya. Aktivitas nuklease akan dihambat oleh EDTA sedangkan degradasi protein akan dilakukan oleh Protease K. Selanjutnya DNA akan dimurnikan menggunakan ekstraksi fenol dan dipresipitasi menggunakan etanol.

Penentuan kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan cara mengukur absorbansi DNA dengan spektrofotometer (OD) pada panjang gelombang 260 nm dan OD 280 nm. Kemurnian DNA diperoleh dari rasio antara absorbansi pada OD₂₆₀ dan OD₂₈₀. Kemurnian kurang dari 1.8 menunjukkan bahwa DNA telah terkontaminasi dengan fenol dan protein. Nilai kemurnian diatas 1.8 menunjukkan DNA telah terkontaminasi RNA.

Kemurnian DNA dikatakan baik apabila perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibandingkan dengan panjang gelombang 280 nm adalah 1.8.

Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{pengenceran}$$

$$\text{Konsentrasi DNA aktual } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Konstr DNA } (\mu\text{g/ml})}{100} \times \text{volume aktual } (\mu\text{l})$$

Cara kerja

Tahapan Isolasi DNA *S. cere* menurut Sambrook dan Maniatis (1989) adalah sebagai berikut :

- Satu koloni tunggal *S. cerevisiae* diinokulasikan ke dalam 5 ml medium *Yeast Potato Dextrose* (YPD) cair. Kultur diinkubasikan pada suhu 30 °C selama semalam menggunakan penggojogan 250 - 350 rpm. Metode ini biasanya akan menghasilkan 2 µg DNA untuk setiap ml sel haploid ragi yang ditumbuhkan dengan kepadatan 1 – 2 x 10⁸ sel/ml. Bila digunakan sel diploid maka akan memperoleh hasil dua kali lipat.
- Seluruh kultur *S. cerevisiae* yang telah tumbuh dipindahkan dalam 200 ml medium YPD. Kultur diinkubasikan pada suhu 37 °C semalam menggunakan penggojogan 250 - 350 rpm sampai pertumbuhan mencapai akhir fase logaritmik atau awal fase stasioner. Biasanya dibutuhkan waktu sepuluh jam (5 generasi) untuk mencapai akhir fase logaritmik atau awal fase stasioner pada ragi. Tetapi sel ragi setidaknya harus berjumlah 1 – 2 x 10⁸ sel/ml. Hal ini dapat tercapai bila kultur memperoleh aerasi yang baik sehingga kapasitas erlenmeyer sebaiknya 5-10 kali dibandingkan volume medium.
- Tempatkan sel di dalam es batu selama 30 menit
- Pindahkan kultur sel dalam tabung sentrifugasi lalu disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm (2000 g) pada suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan dibuang.
- Pelet sel dilarutkan dalam 1/12 volume 1 M sorbitol/100 mM EDTA/100 mM β-merkaptotanol dengan komposisi :

Komponen dan konsentrasi akhir	Jumlah yang harus ditambahkan tiap 100 ml
1 M sorbitol	18.2 g
100 mM EDTA	20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
H ₂ O	Sampai volume 100 ml
100 mM β-merkaptotanol	0.7 ml dari 14.3 M β-merkaptotanol

Campurkan semua bahan kecuali β-merkaptotanol. Simpan pada suhu 4 °C selama lebih dari 6 bulan. Penambahan β-merkaptotanol dilakukan saat larutan akan digunakan.

- b. Tambahkan 10 ml Zymolase-60T (2 mg/ml) ke dalam sel dan campurkan pada suspensi dengan cara dijentik-jentik menggunakan jari. Suspensi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam agar terbentuk spheroplast.

Tahap ini ditujukan untuk mengurangi ketahanan dinding sel dan membentuk spheroplast sehingga DNA dapat diisolasi. Terdapat beberapa alternatif untuk enzim yang akan digunakan yaitu Zymolase-100T atau Zymolase-20T (berbeda dalam hal derajat kemurniannya), enzim yang melisiskan dinding sel ragi dan glusulase. Semua enzim tersebut adalah β -glukanase yang akan mendigesti, melemahkan dan menghilangkan dinding sel ragi. Penggunaan β -merkptoetanol akan membantu proses tersebut.

Zymolase-60T dilarutkan dalam 50% gliserol pada konsentrasi 2 mg/ml. Buatlah alikuot untuk 100 μ l dan penyimpanan dilakukan pada suhu -20 °C lebih dari satu tahun.

- c. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm (450 g) pada suhu 37 °C selama 5 menit untuk mengumpulkan spheroplast. Buanglah supernatan secara hati-hati karena pelet sel mudah lepas, sangat bening dan lunak.
- d. Pelet sel dilarutkan dalam 1/6 volume 50 mM ris-Cl/20 mM EDTA

Komponen dan konsentrasi akhir	Jumlah yang harus ditambahkan tiap 100 ml
50 mM Tris-Cl	50 ml 1 M EDTA (pH 7.4 pada 25 °C)
20 mM EDTA	40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
H ₂ O	0.91 L

- e. Tambahkan 1/10 volume 10% SDS dan campurkan secara merata. Inkubasi pada suhu 65 °C selama 30 menit untuk melisiskan spheroplast.
- f. Sentrifugasi spheroplast yang telah mengalami lisis dalam tabung sentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan 5000 rpm (2000 g) selama 1-2 menit untuk menghilangkan sisa debris sel.
- g. Pindahkan supernatan menggunakan pipet ke dalam tabung baru. Buanglah pelet.
- h. Tambahkan 1/15 volume 5 M potasium asetat pada supernatan. Tempatkan di atas es selama 1 jam. Tahap ini akan mengendapkan SDS menjadi garam potasium.
- i. Sentrifugasi suspensi dengan kecepatan 3000 rpm (700 g) pada suhu 4 °C selama 10 menit.
- j. Pindahkan supernatan pada tabung baru dan buang pelet sel.

- k. Presipitasi asam nukleat dengan 1 volume isopropanol. Jangan keringkan pelet. Pada tahap ini asam nukleat akan diperoleh melalui sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm (700 g) selama 10 menit. Jangan keringkan pelet.
- l. Pelet DNA dilarutkan dalam 300 μ l TE pH 7.4. Ditambahkan 15 μ l RNase A-bebas DNase (1mg/ml) pada suspensi dan dicampur menggunakan vortex. Suspensi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Cara pembuatan RNaseA bebas DNase dilakukan dengan cara melarutkan RNaseA dalam H₂O sampai konsentrasi 1 mg/ml tercapai. Rebuslah larutan tersebut selama 10 menit untuk menonaktifkan DNase. Bagilah menjadi aliquot dengan volume 400 μ l dan simpan pada suhu -20 °C. Suspensi itu dapat bertahan sampai setahun lebih.
- m. Ekstraksi larutan DNA dengan fenol. Gunakan fenol yang telah disaturasi dengan 1 M Tris-Cl (pH 8.0 pada suhu 25 °C)
- n. DNA yang terdapat dalam fasa cair dikumpulkan menggunakan 1/3 volume amonium asetat (pH 7.4) dan 2.5 volume etanol absolut. Pelet DNA jangan dikeringanginkan.
- o. Larutkan DNA dalam 100 μ l TE pH 7.4. Ukurlah konsentrasi DNA yang diperoleh kemudian buatlah konsentrasi akhir larutan DNA menjadi 200 μ l menggunakan TE pH 7.4.

ACARA 9.

ISOLASI DNA MIKROALGA

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA mikroalga, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain

2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA mikroalga

3. Indikator :1. Mampu mengerti tahapan dalam teknik isolasi DNA mikroalga 70% benar
2. Mampu melakukan teknik isolasi DNA mikroalga 70% Benar

4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.

5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Sebelum tahun 1970, DNA merupakan molekul sel yang paling sulit untuk dianalisis. *Deoxyribo nucleic acid* (DNA) merupakan cetak biru suatu makhluk hidup dengan kemampuan menyimpan dan menggandakan informasi genetik yang terdapat di dalamnya. Namun sejalan dengan perkembangan ilmu genetika dan penemuan teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetik, hal tersebut menjadi lebih mudah. Perubahan yang mendasar adalah ditemukannya cara untuk memurnikan dan memperbanyak fragmen DNA. Penemuan enzim restriksi oleh Smith dan Wilcok (1970) dan Heitman (1993), penemuan vektor kloning oleh Cohen *et al.* (1973) dan Bolivar *et al.* (1977), isolasi enzim DNA ligase oleh Higgins dan Cozzarelli (1979) menjadi pembuka dan berharga bagi perkembangan teknologi rekayasa genetik.

DNA suatu organisme terdapat dalam kromosom dan di luar kromosom (DNA ekstrakromosom). Plasmid, kloroplas dan mitokondria merupakan sumber DNA diluar kromosom. DNA di luar kromosom diperoleh selama evolusi melalui proses endosimbiosis antara organisme bersel tunggal (prokariot) membentuk organisme bersel banyak/multiseluler atau eukariot. DNA kromosom dan ekstrakromosom bekerjasama menjaga kelangsungan hidup suatu organisme.

Materi genetik atau DNA dari berbagai makhluk hidup dapat diambil dan dilihat. Selanjutnya DNA tersebut dapat diperbanyak untuk digunakan bagi analisis dan keperluan lebih lanjut. Isolasi DNA merupakan tahapan pertama yang harus dilakukan untuk mengambil DNA dari sel makhluk hidup.

Isolasi DNA genom membutuhkan penyiapan DNA kromosom dengan kualitas yang baik karena akan digunakan untuk berbagai manipulasi genetik yang lain. Sejak analisis genom dilakukan untuk banyak sampel dan DNA genom tersebut dipakai dalam waktu yang lama maka dibutuhkan suatu upaya besar agar diperoleh kualitas DNA yang baik dalam jumlah besar.

Isolasi atau pengambilan DNA dari makhluk hidup terbagi atas beberapa tahapan yaitu penumbuhan dan perbanyakkan sel, penghancuran dinding sel, penghilangan RNA dan protein serta pemurnian DNA. Sel akan ditumbuhkan dan diperbanyak dalam medium dalam tenggang waktu 24 jam lalu dipanen pada saat sel membelah secara aktif pada umur sel yang muda agar DNA mudah diambil. Medium untuk perbanyakkan sel harus mengandung nutrisi

penting yang dibutuhkan oleh sel. Medium untuk penumbuhan sel bakteri biasanya menggunakan medium Luria Bertani (Brown, 1995).

Sel organisme terbungkus oleh membran sitoplasma dan dikelilingi oleh dinding sel yang kuat terdiri dari ikatan antara protein dan lemak. Semua pelindung materi genetik organisme tersebut harus dipecah untuk mengeluarkan bagian dalam sel termasuk DNA. Penghancuran dinding sel dapat dilakukan dengan cara mekanik, kimiawi dan enzimatik. Secara mekanik isolasi DNA menggunakan getaran ultrasonik atau sonikasi dan penggerusan. Enzim lisozim biasanya digunakan untuk memecah dinding sel secara enzimatik untuk mengeluarkan DNA. Enzim lisosim akan mendigesti senyawa polimerik yang menyebabkan kekakuan dinding sel. Larutan kimiawi pemecah dinding sel biasanya menggunakan detergen seperti etilen diamina tetra asetat (EDTA), sodium klorida, atau sodium dodesil sulfat. Bahan kimia EDTA akan menghilangkan ion magnesium yang mempertahankan keutuhan selubung sel dan menghambat aktivitas enzim perusak DNA. Bahan deterjen seperti SDS akan menghilangkan molekul lemak sehingga merusak membran sel. Bagian sel yang tidak dikehendaki selain DNA atau kontaminan dihilangkan dengan cara pengendapan menggunakan fenol, kloroform dan IAA (*Indol acetic acid*). Pemurnian dan pemekatan DNA dilakukan menggunakan etanol (Watson, 1988).

Prinsip dasar isolasi DNA umumnya terdiri atas perbanyakan atau kultivasi sel sehingga diperoleh DNA dalam jumlah besar. Kultivasi sel kemudian diakhiri dengan panen sel pada saat usia sel mencapai tingkat pembelahan tertinggi dan kepadatan sel terbesar. Selanjutnya dilakukan pemecahan dinding sel dengan bantuan enzim. Pada saat itu, dibutuhkan detergen untuk membantu lisis inti sel dan melepaskan DNA. Sel biasanya akan lisis dalam larutan SDS yang mengandung sukrosa. Sukrosa dibutuhkan untuk meningkatkan viskositas sel dan membantu mengeluarkan DNA. Setelah DNA diperoleh maka harus dilindungi dari nuklease dan dibebaskan dari kontaminasi protein lain. Kontaminasi protein akan menghambat reaksi enzimatik pada tahap manipulasi berikutnya. Aktivitas nuklease akan dihambat oleh EDTA sedangkan degradasi protein akan dilakukan oleh Protease K. Selanjutnya DNA akan dimurnikan menggunakan ekstraksi fenol dan dipresipitasi menggunakan etanol.

Penentuan kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan cara mengukur absorbansi DNA dengan spektrofotometer (OD) pada panjang gelombang 260 nm dan OD 280 nm. Kemurnian DNA diperoleh dari rasio antara absorbansi pada OD₂₆₀ dan OD₂₈₀. Kemurnian kurang dari 1.8 menunjukkan bahwa DNA telah terkontaminasi dengan fenol dan protein. Nilai kemurnian diatas 1.8 menunjukkan DNA telah terkontaminasi RNA.

Kemurnian DNA dikatakan baik apabila perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibandingkan dengan panjang gelombang 280 nm adalah 1.8.

Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{pengenceran}$$
$$\text{Konsentrasi DNA aktual } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Konstr DNA } (\mu\text{g/ml})}{100} \times \text{volume aktual } (\mu\text{l})$$

Cara kerja Isolasi DNA Alga *Dunaliella*

Modifikasi metode CTAB (“Cetyltrimethyl ammonium bromide”) sebagaimana dikemukakan oleh Dellaporta *et al.* (1983) dalam Ausubel (1995) digunakan untuk isolasi DNA genom alga *Dunaliella* sp. Sebagai berikut :

- a. Kultur alga *Dunaliella* sp. Sebanyak 15 ml disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit .
- b. Pelet digerus dalam mortar lalu ditambahkan 1 ml buffer ekstraksi (2 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA pH 8; dan 1.4 M NaCl, 1 % (w/v) yang telah dihangatkan pada suhu 65°C, sambil dihancurkan dan diaduk secara merata.
- c. Ditambahkan 25 μl enzim lisosim dengan konsentrasi 25 mg/ml lalu larutan dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.
- d. Ditambahkan 750 μl SDS 10% lalu diinkubasi kembali dalam waterbath suhu 37°C selama 1 jam. Inkubasi dilanjutkan pada suhu 65°C selama 1 jam sambil dibolak-balik secara merata.
- e. Suspensi selanjutnya diekstraksi dengan kloroform pada volume yang sama lalu dibolak-balik 100 – 150 kali sampai merata lalu disentrifugasi 5 menit dengan kecepatan 13.000 rpm.
- f. Fasa atas diambil dan dipindahkan kedalam tabung eppendorf 1.5 yang baru.
- g. Selanjutnya DNA dipresipitasi menggunakan 0.6 volume isopropanol dan 1/10 volume Sodium asetat 3 M lalu disimpan pada suhu -20°C semalam.
- h. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang sementara pelet dicuci dengan 100 μl etanol 70 % .
- i. Pelet dikering-anginkan lalu diresuspensi dalam 50 μl buffer TE dan disimpan pada suhu -20°C.
- j. Konsentrasi dan kemurnian DNA diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260nm dan 280 nm.

- k. Larutan DNA dianalisis dengan elektroforesis dalam 0.8 % gel agarose dan dihitung konsentrasinya menggunakan spektrofotometer.
- l. Hasil karakterisasi secara kuantitatif dilakukan menggunakan UV transluminator lalu difoto.
- m. DNA yang diperoleh dimurnikan dengan menggunakan RnaseA yang diinkubasi selama 37°C selama 1 jam.

ACARA 10.

ISOLASI DNA TANAMAN

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA tanaman, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA tanaman
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti tahapan dalam teknik isolasi DNA tanaman 70% benar
 2. Mampu melakukan teknik isolasi DNA tanaman 70% Benar
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Sebelum tahun 1970, DNA merupakan molekul sel yang paling sulit untuk dianalisis. *Deoxyribo nucleic acid* (DNA) merupakan cetak biru suatu makhluk hidup dengan kemampuan menyimpan dan menggandakan informasi genetik yang terdapat di dalamnya. Namun sejalan dengan perkembangan ilmu genetika dan penemuan teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetik, hal tersebut menjadi lebih mudah. Perubahan yang mendasar adalah ditemukannya cara untuk memurnikan dan memperbanyak fragmen DNA. Penemuan enzim restriksi oleh Smith dan Wilcok (1970) dan Heitman (1993), penemuan vektor kloning oleh Cohen *et al.* (1973) dan Bolivar *et al.* (1977), isolasi enzim DNA ligase oleh Higgins dan Cozzarelli (1979) menjadi pembuka dan berharga bagi perkembangan teknologi rekayasa genetik.

DNA suatu organisme terdapat dalam kromosom dan di luar kromosom (DNA ekstrakromosom). Plasmid, kloroplas dan mitokondria merupakan sumber DNA diluar kromosom. DNA di luar kromosom diperoleh selama evolusi melalui proses endosimbiosis antara organisme bersel tunggal (prokariot) membentuk organisme bersel banyak/multiseluler atau eukariot. DNA kromosom dan ekstrakromosom bekerjasama menjaga kelangsungan hidup suatu organisme.

Deoxyribonucleic acid yang diisolasi dari tanaman sering terkontaminasi oleh polisakarida dan metabolit sekunder seperti tanin, pigmen alkaloid, dan flavonoid. Keberadaan polisakarida dan senyawa metabolit sekunder dalam sel tanaman sering menyulitkan dalam isolasi asam nukleat. Senyawa kontaminan tersebut dapat menghambat aktivitas enzim. Adanya polisakarida dalam tanaman ditandai dengan kekentalan pada hasil isolasi DNA yang menyebabkan kesulitan dalam pekerjaan pemipetan DNA sehingga mengakibatkan pita-pita DNA yang terbentuk pada elektrogram tidak dapat terlihat dengan jelas (*smear*). Selain itu, keberadaan polisakarida juga akan menghambat aktivitas *Taq* DNA polimerase pada amplifikasi DNA. *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol.

Metode Doyle & Doyle telah digunakan pada berbagai jenis kelompok tanaman dan beberapa kelompok hewan. Prosedur ini digunakan untuk mengisolasi seluruh genom DNA (nukleus, kloroplas, dan mitokondria) serta memiliki keunggulan seperti tahapan yang cepat, murah, dan cocok untuk digunakan bersama prosedur yang lain, seperti isolasi DNA

diperkaya untuk cpDNA. Selain itu, sampel yang digunakan juga sedikit, hanya menggunakan 0,01 gram atau kurang dari jaringan segar.

Penentuan kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan cara mengukur absorbansi DNA dengan spektrofotometer (OD) pada panjang gelombang 260 nm dan OD 280 nm. Kemurnian DNA diperoleh dari rasio antara absorbansi pada OD₂₆₀ dan OD₂₈₀. Kemurnian kurang dari 1.8 menunjukkan bahwa DNA telah terkontaminasi dengan fenol dan protein. Nilai kemurnian diatas 1.8 menunjukkan DNA telah terkontaminasi RNA. Kemurnian DNA dikatakan baik apabila perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibandingkan dengan panjang gelombang 280 nm adalah 1.8.

Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{pengenceran}$$

$$\text{Konsentrasi DNA aktual } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Konstr DNA } (\mu\text{g/ml})}{100} \times \text{volume aktual } (\mu\text{l})$$

Cara kerja

- Daun tanaman sebanyak 2 atau 3 lembar ditempatkan dalam tabung mikrosentrifuge lalu ditambahkan 20 *glass beads* (diameter 3 mm) dan dinginkan didalam nitrogen cair. Metode ini akan menghasilkan 100-500 µg DNA per g jaringan. Gunakan capmix mixer untuk menghancurkan daun selama 15 menit.
- Alternatif dari metode ini adalah geruslah daun menggunakan mortar dan pestle yang telah didinginkan pada suhu -20°C. Penggerusan dilakukan diatas es batu atau nitrogen cair.
- Tambahkan 0.5 ml bufer ekstraksi DNA pada hancuran daun lalu campur sampai homogen. Suspensi diinkubasi dalam waterbath suhu 65°C selama 30 menit.

Komponen bufer ekstraksi DNA tanaman :

Komponen dan konsentrasi akhir	Jumlah yang harus ditambahkan tiap 500 ml
1.4 M NaCl	140 ml dari 5 M NaCl
100 mM Tris-Cl	50 ml 1 M EDTA (pH 7.4 pada 25 °C)
20 mM EDTA	20 ml dari 0.5 M EDTA (pH 8.0)
3% (w/v) CTAB	15 g

H ₂ O	Sampai 500 ml
1% (v/v) β-merkapttoetanol	5 ml dari 14.3 M β-merkapttoetanol

Campurkan semua bahan kecuali β-merkapttoetanol. Bagi dalam 10 ml alikuot dan dapat disimpan pada suhu ruang selama beberap tahun. Penambahan β-merkapttoetanol dilakukan saat larutan akan digunakan.

- d. Ekstraksikan suspensi dengan 1 volume kloroform : isoamil alkohol (24:1). Pada metode ini tidak diperlukan ekstraksi dengan fenol.
- e. Presipitasi DNA dengan tahapan :
 - Tambahkan 1 volume isopropanol dalam fasa cair lalu tabung dibolak-balik. Diamkan pada suhu ruang selama 10 menit
 - Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g pada suhu ruang selama 10 menit. Buang supernatan.
 - Cucilah pelet dengan menambahkan 400 µl etanol 70%.
 - Sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 g lalu supernatan dibuang
 - Pelet dikeringanginkan
- f. Larutkan DNA dalam 300 µl buffer TE pH 7.4. Ukurlah konsentrasi DNA lalu sesuaikan konsentrasi akhir menjadi 100 mg/ml mdenggunakan TE pH 7.4. DNA dapat disimpan pada suhu -20°C.

ACARA 11.

ISOLASI DNA PLASMID

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA plasmid, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA plasmid
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti tahapan dalam teknik isolasi DNA plasmid 70% benar
 2. Mampu melakukan teknik isolasi DNA plasmid 70% benar
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

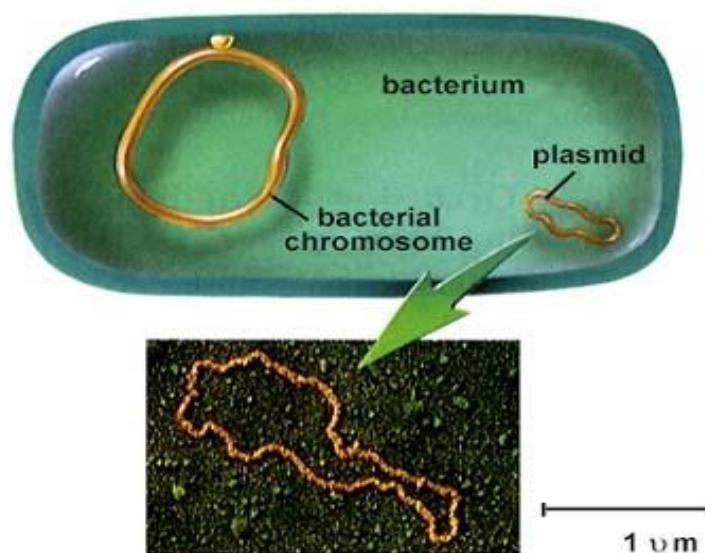
Dasar Teori

Sebelum tahun 1970, DNA merupakan molekul sel yang paling sulit untuk dianalisis. *Deoxyribo nucleic acid* (DNA) merupakan cetak biru suatu makhluk hidup dengan kemampuan menyimpan dan menggandakan informasi genetik yang terdapat di dalamnya. Namun sejalan dengan perkembangan ilmu genetika dan penemuan teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetik, hal tersebut menjadi lebih mudah. Perubahan yang mendasar adalah ditemukannya cara untuk memurnikan dan memperbanyak fragmen DNA. Penemuan enzim restriksi oleh Smith dan Wilcock (1970) dan Heitman (1993), penemuan vektor kloning oleh Cohen *et al.* (1973) dan Bolivar *et al.* (1977), isolasi enzim DNA ligase oleh Higgins dan Cozzarelli (1979) menjadi pembuka dan berharga bagi perkembangan teknologi rekayasa genetik.

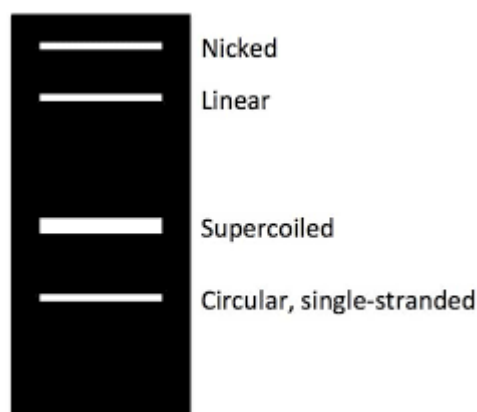
DNA suatu organisme terdapat dalam kromosom dan di luar kromosom (DNA ekstrakromosom). Plasmid, kloroplas dan mitokondria merupakan sumber DNA diluar kromosom. DNA di luar kromosom diperoleh selama evolusi melalui proses endosimbiosis antara organisme bersel tunggal (prokariot) membentuk organisme bersel banyak/multiseluler atau eukariot. DNA kromosom dan ekstrakromosom bekerjasama menjaga kelangsungan hidup suatu organisme.

Plasmid merupakan DNA ekstrakromosomal yang umumnya mempunyai struktur sirkuler, namun ada juga yang linear seperti *Borrelia burgdorferi* dan *Streptomyces* (Gambar 1.8). Plasmid mampu bereplikasi secara mandiri karena mempunyai ORI (*origin of replication*). Plasmid mempunyai DNA untai ganda yang sebagian besar tersusun menjadi superkoil karena enzim topoisomerase sebagian DNA untai ganda lepas selama berlangsungnya replikasi plasmid. Struktur superkoil akan menyebabkan DNA plasmid berada dalam konformasi lingkaran tertutup kovalen atau *covalently closed circular* (ccc), namun apabila kedua utas DNA terlepas maka akan plasmid akan kembali dalam keadaan normal (tidak terpilin) yang disebut sebagai *open circular* (oc). Plasmid pertama kali ditemukan oleh Robert Koch tahun 1887 dalam *Bacillus anthracis* penyebab penyakit antraks. Sekitar tahun 1950 Lederberg dan Hayes menemukan peran plasmid dalam konjugasi *Escherichia coli*. Plasmid juga mempunyai beberapa fungsi sebagai resistensi terhadap antibiotik pada bakteri enterik yang dapat dipindah-pindahkan antar organisme. Saat ini plasmid telah banyak diproduksi sebagai vektor kloning. Plasmid memiliki beberapa kriteria sebagai vektor kloning yaitu tidak membunuh sel inang, mudah dimurnikan, ukuran kecil,

jumlah salinan yang tinggi (*high copy number*), mempunyai ORI, memiliki gen marka seleksi dan gen pelapor (reporter) serta mempunyai situs pemotongan enzim restriksi untuk memudahkan penyisipan DNA ke dalam vektor plasmid. Inang plasmid ada yang berspektrum luas artinya bisa hidup di beberapa inang namun ada yang sempit yang ditentukan oleh daerah *ori*. Plasmid berspektrum sempit misalnya pBR322, pET, pUC (*ori* dari ColE1) dan hanya bisa bereplikasi di *E. coli*, *Salmonella* dan *Klebsiella*. Plasmid RK2 dari bakteri Gram – berspektrum luas dan bisa bereplikasi di hampir semua bakteri Gram –. Plasmid RF1010 bisa bereplikasi di hampir semua bakteri Gram +, pUB110 dari *Staphylococcus aureus*, bereplikasi dalam bakteri Gram +.



Gambar 1. Plasmid pada bakteri



Gambar 2. Visualisasi hasil Isolasi DNA Plasmid

Cara kerja

Isolasi DNA Plasmid Skala Mini

- a. Kultur *E. Coli* 1,5 - 5 ml disentrifugasi 12.000 rpm selama 1menit
- b. Pellet diresuspensi dalam 100 µl larutan I (TEG : 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM glukosa, dibuat segar tiap kali isolasi DNA) dan diletakkan dalam es selama 1 menit.
- c. 200 µl larutan II ditambahkan (0,2 N NaOH, 1% SDS disiapkan segar), dihomogenkan dan diletakkan dalam es 1 menit
- d. 150 µl larutan III ditambahkan (Potassium Asetat : 29,4 g potassium asetat ditambah 11 ml asam asetat glasial dalam 100 ml) diletakkan dalam es selama 4 menit.
- e. Disentrifugasi 13.000 rpm 5 menit. Ditambahkan phenol : cloroform : IAA (25:24:1) sebanyak 450 µl dan campurkan dengan menggunakan vortek. Disentrifugasi 13.000 rpm 2 menit.
- f. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru yang bersih. Pada waktu mengambil supernatan usahakan jangan sampai menyentuh bagian interphase.
- g. Ditambahkan 2 volume etanol absolut ke dalam supernatan. Diinkubasikan pada suhu ruangan selama 5 menit. Disentrifugasikan selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.
- h. Jika tidak ada pellet yang terbentuk maka disimpan lebih dulu pada suhu -20°C semalam. Disentrifugasi 12.000 rpm 5 menit.
- i. Supernatan dibuang secara hati-hati dengan pipet mikro. Pelet DNA dicuci dengan 1 ml etanol 70%
- j. Pelet DNA diresuspensi dengan 40 µl TE pH 8,0. Disimpan di pada suhu -20°C

Isolasi DNA Plasmid Skala Midi

- a. Kultur *E. coli* 50 ml disentrifugasi 3000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C
- b. Supernatan dibuang, pellet diresuspensi dalam 4 ml larutan I (TEG) dan diletakkan dalam es selama 5 menit.
- c. 8 ml larutan II ditambahkan dihomogenkan dan diletakkan dalam es 5 menit
- d. 6 ml larutan III ditambahkan diletakkan dalam es selama 10 menit.

- e. Disentrifugasi 13.000 rpm 15 menit. Supernatan ditambah 17 ml isopropanol. Diletakkan dalam suhu kamar 15 menit.
- f. Disentrifugasi 13.000 rpm 10 menit. Pellet dilarutkan dalam 2 ml TE.
- g. Ditambah 2,5 ml 4,4 M LiCl. Diletakkan dalam es selama 1 jam
- h. Disentrifugasi 13.0000 rpm 10 menit. Supernatan ditambah 10 ml etanol absolut. Disentrifugasi 13.0000 rpm 10 menit.
- i. Pellet dicuci dengan etanol absolut dan disentrifugasi 13.000 rpm 10 menit.
- j. Pellet diresuspensikan dalam 200 μ l TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA). Disimpan pada suhu 4°C, semalam.
- k. Ditambah 8 μ l Rnase dan diinkubasi dalam *waterbath* suhu 37°C 1 jam lalu Ditambah 20 μ l 10 SDS, diinkubasi dalam *waterbath* suhu 70°C 10 menit.
- l. Diekstraksi satu kali dengan 228 μ l PCIA / *phenol-chloroform-isoamyl alcohol* (50:50:1). Disentrifugasi 13.000 rpm 2 menit. Supernatan ditambah 40 μ l 3 M Na-asetat pH 5,5 dan 800 μ l etanol absolut, disimpan pada suhu -20°C semalam. Disentrifugasi 13.000 rpm 10 menit,
- m. Bila pellet agak keruh diresuspensi dalam 200 μ l TE dan ditambah 200 μ l PCIA, lalu disentrifugasi 13.000 rpm 2 menit. Supernatan ditambah 40 μ l Na-asetat pH 5,5 dan 500 μ l etanol absolut. Disimpan dalam freezer -80oC 1 jam. Disentrifugasi 13.000 rpm ; 10 menit.
- n. Pellet dicuci dengan Etanol 70%. Resuspensikan pellet dalam 100 μ l TE dan disimpan pada suhu -20 °C.

ACARA 12.

ISOLASI DNA HEWAN

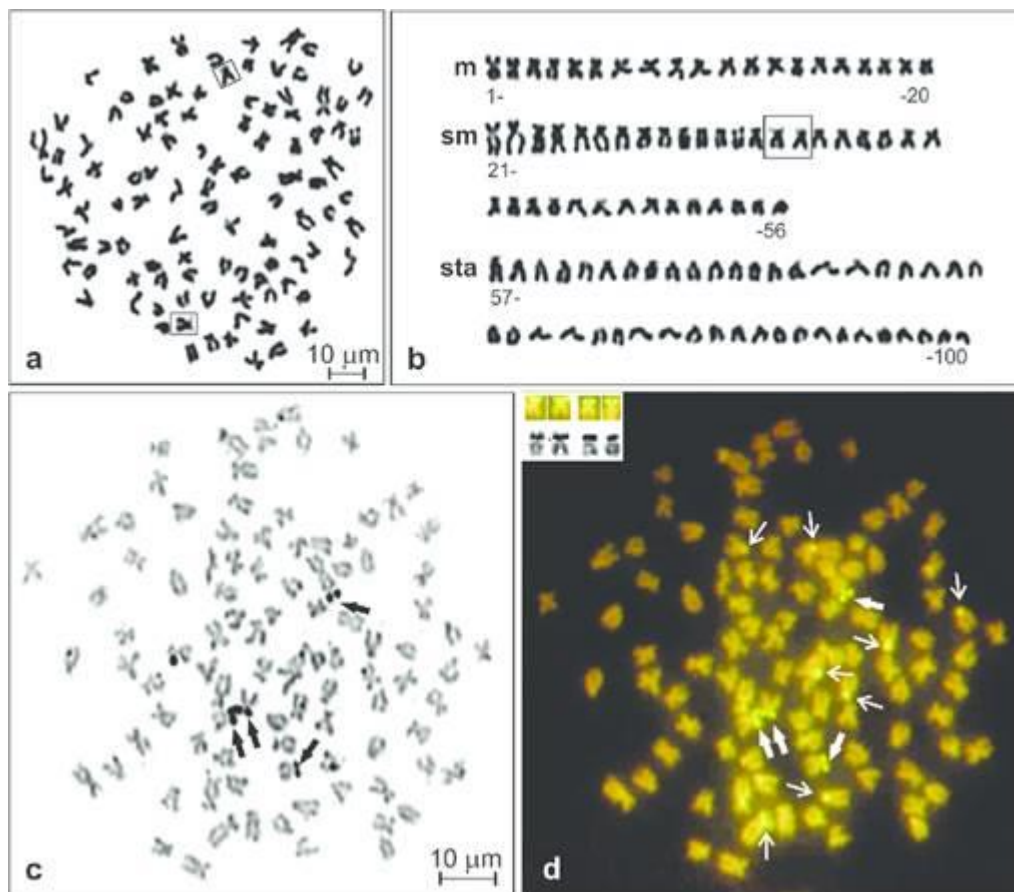
A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA dari DNA hewan, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti tahapan dan mampu melakukan teknik isolasi DNA hewan
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti tahapan dalam teknik isolasi DNA hewan 70% benar
 2. Mampu melakukan teknik isolasi DNA hewan 70% benar
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Sebelum tahun 1970, DNA merupakan molekul sel yang paling sulit untuk dianalisis. *Deoxyribo nucleic acid* (DNA) merupakan cetak biru suatu makhluk hidup dengan kemampuan menyimpan dan menggandakan informasi genetik yang terdapat di dalamnya. Namun sejalan dengan perkembangan ilmu genetika dan penemuan teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetik, hal tersebut menjadi lebih mudah. Perubahan yang mendasar adalah ditemukannya cara untuk memurnikan dan memperbanyak fragmen DNA. Penemuan enzim restriksi oleh Smith dan Wilcok (1970) dan Heitman (1993), penemuan vektor kloning oleh Cohen *et al.* (1973) dan Bolivar *et al.* (1977), isolasi enzim DNA ligase oleh Higgins dan Cozzarelli (1979) menjadi pembuka dan berharga bagi perkembangan teknologi rekayasa genetik.



Sumber : Spoz *et al.*, 2014

Gambar 1. Kromosom Ikan

Isolasi DNA genom membutuhkan penyiapan DNA kromosom dengan kualitas yang baik karena akan digunakan untuk berbagai manipulasi genetik yang lain. Sejak analisis genom dilakukan untuk banyak sampel dan DNA genom tersebut dipakai dalam waktu yang lama maka dibutuhkan suatu upaya besar agar diperoleh kualitas DNA yang baik dalam jumlah besar.

Isolasi atau pengambilan DNA dari makhluk hidup terbagi atas beberapa tahapan yaitu penumbuhan dan perbanyakan sel, penghancuran dinding sel, penghilangan RNA dan protein serta pemurnian DNA. Sel akan ditumbuhkan dan diperbanyak dalam medium dalam tenggang waktu 24 jam lalu dipanen pada saat sel membelah secara aktif pada umur sel yang muda agar DNA mudah diambil. Medium untuk perbanyakan sel harus mengandung nutrisi penting yang dibutuhkan oleh sel. Medium untuk penumbuhan sel bakteri biasanya menggunakan medium Luria Bertani (Brown, 1995).

Sel organisme terbungkus oleh membran sitoplasma dan dikelilingi oleh dinding sel yang kuat terdiri dari ikatan antara protein dan lemak. Semua pelindung materi genetik organisme tersebut harus dipecah untuk mengeluarkan bagian dalam sel termasuk DNA. Penghancuran dinding sel dapat dilakukan dengan cara mekanik, kimiawi dan enzimatik. Secara mekanik isolasi DNA menggunakan getaran ultrasonik atau sonikasi dan penggerusan. Enzim lisozim biasanya digunakan untuk memecah dinding sel secara enzimatik untuk mengeluarkan DNA. Enzim lisozim akan mendigesti senyawa polimerik yang menyebabkan kekakuan dinding sel. Larutan kimiawi pemecah dinding sel biasanya menggunakan detergen seperti etilen diamina tetra asetat (EDTA), sodium klorida, atau sodium dodesil sulfat. Bahan kimia EDTA akan menghilangkan ion magnesium yang mempertahankan keutuhan selubung sel dan menghambat aktivitas enzim perusak DNA. Bahan deterjen seperti SDS akan menghilangkan molekul lemak sehingga merusak membran sel. Bagian sel yang tidak dikehendaki selain DNA atau kontaminan dihilangkan dengan cara pengendapan menggunakan fenol, kloroform dan IAA (*Indol acetic acid*). Pemurnian dan pemekatan DNA dilakukan menggunakan etanol (Watson, 1988).

Prinsip dasar isolasi DNA umumnya terdiri atas perbanyakan atau kultivasi sel sehingga diperoleh DNA dalam jumlah besar. Kultivasi sel kemudian diakhiri dengan panen sel pada saat usia sel mencapai tingkat pembelahan tertinggi dan kepadatan sel terbesar. Selanjutnya dilakukan pemecahan dinding sel dengan bantuan enzim. Pada saat itu, dibutuhkan detergen untuk membantu lisis inti sel dan melepaskan DNA. Sel biasanya akan lisis dalam larutan SDS yang mengandung sukrosa. Sukrosa dibutuhkan untuk meningkatkan viskositas sel dan membantu mengeluarkan DNA. Setelah DNA diperoleh

maka harus dilindungi dari nuklease dan dibebaskan dari kontaminasi protein lain. Kontaminasi protein akan menghambat reaksi enzimatik pada tahap manipulasi berikutnya. Aktivitas nuklease akan dihambat oleh EDTA sedangkan degradasi protein akan dilakukan oleh Protease K. Selanjutnya DNA akan dimurnikan menggunakan ekstraksi fenol dan dipresipitasi menggunakan etanol.

Penentuan kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan cara mengukur absorbansi DNA dengan spektrofotometer (OD) pada panjang gelombang 260 nm dan OD 280 nm. Kemurnian DNA diperoleh dari rasio antara absorbansi pada OD₂₆₀ dan OD₂₈₀. Kemurnian kurang dari 1.8 menunjukkan bahwa DNA telah terkontaminasi dengan fenol dan protein. Nilai kemurnian diatas 1.8 menunjukkan DNA telah terkontaminasi RNA. Kemurnian DNA dikatakan baik apabila perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibandingkan dengan panjang gelombang 280 nm adalah 1.8.

Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{pengenceran}$$
$$\text{Konsentrasi DNA aktual } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Konstr DNA } (\mu\text{g/ml}) \times \text{volume aktual } (\mu\text{l})}{100}$$

Isolasi DNA Hewan Modifikasi Metode Ausubel (1995)

Sumber DNA untuk isolasi biasanya dari alat gerak atau daging hewan. Sampel diambil dan dikeringkan diatas tisu, dijepit, kemudian dipotong-potong kecil dengan menggunakan pinset dan gunting steril. Hasil yang lebih baik akan didapat bila daging diblender terlebih dahulu. Hasil blender atau potongan langsung ditampung di dalam mortar steril kemudian dihancurkan (digerus) atau diratakan dengan pastle steril sampai benar-benar hancur di atas es batu. Sampel ditambah dengan 2,4ml bufer digesti, 10 μL Lizosim 10mg/ml, dan 1 ml SDS 10%. Sampel digerus hingga tercampur merata dengan bahan-bahan tersebut. Semua sampel dimasukkan ke dalam eppendorf. Semua sampel dalam eppendorf diinkubasi pada suhu 50°C selama 12 jam. Setiap 30 menit sekali digojog. Hasil dari inkubasi ditambah dengan fenol : kloroform 1:1 kemudian divortex selama 10 detik dan dimasukan ke dalam sentrifug selama 5 menit dengan kecepatan 6.000 rpm. Fase paling atas hasil sentrifugasi dipindahkan kedalam mikrosentrifuga yang baru dan ditambah dengan sodium asetat 3M pH 5,2 sebanyak 1/10 volume fase atas yang didapat kemudian dihomogenkan sampai merata. Sampel yg sudah tercampur merata dengan sodium asetat ditambah dengan etanol 100% sebanyak 2 volume, dihomogenkan sampai merata dan didiamkan pada suhu dingin dalam es

batu yang sudah hancur selama 5 menit. Semua sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 6.000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan yang terbentuk dipindahkan ke mikrosentrifuga yang baru. Supernatan yang didapatkan ditambah dengan etanol 70% pada suhu ruang dan disentrifugasi kembali untuk mendapatkan supernatan. Supernatan baru yang terbentuk dipindahkan ke mikrosentrifuga baru dan dikering anginkan. Pelet yang sudah kering ditambah dengan bufer TE pH 8. Hasil disimpan dalam *freezer* untuk kemudian masuk ke tahap elektroforesis.

Metode lain yang digunakan untuk mengisolasi DNA hewan umumnya menggunakan metode Chelex. Metode ini memberikan cara yang sangat cepat untuk mengisolasi DNA dan menghindarkannya dari enzim degradatif dan beberapa kontaminan potensial yang mungkin menghambat proses tersebut. Pada prinsipnya, Chelex resin hendak perangkap kontaminan seperti, meninggalkan DNA dalam larutan. Dalam prakteknya, Chelex ekstraksi dapat rentan terhadap degradasi, dan harus disimpan dalam freezer saat tidak digunakan, atau pencabutan tersebut harus digunakan dalam waktu 24 jam dari ekstraksi. Jika jaringan diekstrak mengandung pigmen dan inhibitor lainnya untuk eksperimen hilir, sering berhasil untuk mencairkan ekstraksi Chelex 1 : 9 dengan air suling sebelum digunakan. Pengambilan ekstrak perlu dilakukan menggunakan pipet dari lapisan atas untuk menghindari resin yang dapat menkontaminasi DNA yang akan diperoleh.

ACARA 13.

PEMBUATAN GEL ELEKTROFORESIS

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti cara pembuatan gel elektroforesis, bahan yang dibutuhkan dan tahapannya sebagai salah satu tahap dalam teknik rekayasa genetika, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa dapat diharapkan dapat mengerti cara pembuatan gel elektroforesis dan tahapannya.
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan gel elektroforesis 70% benar
 2. mengetahui tahap-tahap pembuatan gel elektroforesis 70% benar
 3. mampu membuat gel elektroforesis 70% benar.
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Elektroforesis adalah pemisahan molekul bermuatan listrik di dalam medan listrik. Sedangkan elektroforesis gel adalah pemisahan asam nukleat atau protein di dalam medan listrik melalui media gel.

Molekul DNA membawa muatan listrik negatif dan bila ditempatkan pada medan listrik akan bermigrasi menuju kutub positif. Kecepatan migrasi molekul DNA tergantung pada dua faktor yaitu bentuk dan muatan listrik. Ukuran molekul DNA akan dapat dibedakan pada elektroforesis menggunakan gel. Suatu gel yang biasanya terbuat dari agarose akan membentuk kerangka lubang-lubang yang kompleks untuk dilewati molekul DNA menuju elektrode positif. Makin kecil molekul DNA makin cepat migrasinya melewati gel. Oleh karena itu elektroforesis gel akan memisahkan molekul DNA sesuai dengan ukurannya. Elektroforesis dapat dilakukan selain menggunakan gel agarose juga poliakrilamide. Elektroforesis dapat dilakukan selain menggunakan gel agarose juga poliakrilamide.

Teknik elektroforesis dikembangkan untuk memisahkan biomolekul yang lebih besar. Metode elektroforesis semakin berkembang dengan ditemukannya gel Kanji sebagai substrat elektroforesis pada tahun 1955 oleh Oliver Smithies. Dia memperlihatkan bahwa gel yang terbuat dari larutan kanji dapat digunakan untuk memisahkan protein-protein serum manusia. Cara yang dilakukan adalah menuangkan larutan kanji panas ke dalam cetakan plastik, setelah dibiarkan mendingin kanji tersebut akan membentuk gel yang padat namun rapuh. Gel kanji berperan sebagai fasa diam (*stationary phase*) menggantikan kertas saring Whatman pada teknik terdahulu. Selanjutnya ilmuwan lain menemukan bahan kimia lain yang dapat digunakan sebagai bahan gel yang lebih baik, seperti agarosa dan polimer akrilamida.

Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE)

Teknik elektroforesis gel makin berkembang dan disempurnakan, hingga 12 tahun kemudian ditemukan gel poliakrilamida (*PAGE = Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) yang terbentuk melalui proses polimerisasi akrilamida dan bis-akrilamida. PAGE ini mampu memisahkan campuran DNA/RNA atau protein dengan ukuran lebih besar. Teknik ini belum dapat digunakan untuk memisahkan DNA dengan ukuran yang sangat besar, misalnya DNA kromosom. Campuran DNA kromosom tidak dapat dipisahkan meskipun ukuran mereka berbeda-beda.

Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Pada pertengahan tahun 1980-an, Schwartz dan Cantor menemukan teknik untuk memisahkan campuran DNA berukuran sangat besar menggunakan teknik *Pulse-field Gradient Gel Electrophoresis* (PFGE). Teknik tersebut menggunakan arus pendek medan listrik tegak lurus yang arahnya berganti-ganti. Teknik PFGE kini digunakan secara luas oleh para ahli biologi dalam studi *genotyping* berskala besar, juga analisa epidemiologi molekular pada patogen.

Teknik-teknik di atas merupakan pintu masuk bagi penelitian-penelitian lainnya dalam bidang biologi molekular yang kini berkembang sangat pesat. Sulit dibayangkan sebuah laboratorium biologi molekular dapat menghasilkan sesuatu tanpa teknik elektroforesis. Tanpa elektroforesis, DNA/RNA yang sedang kita teliti akan bercampur dengan kontaminan yang tidak kita inginkan, sulit pula membayangkan cara mengetahui ukuran DNA/RNA/protein yang lebih praktis selain dengan elektroforesis, bahkan teknik DNA sekuencing modern sekalipun sangat bergantung pada teknik elektroforesis ini.

Elektroforesis digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA dan RNA. Ukuran molekul DNA akan dapat dibedakan pada elektroforesis menggunakan gel. Elektroforesis gel adalah pemisahan asam nukleat atau protein di dalam medan listrik melalui media gel. Gel yang digunakan dalam elektroforesis terdiri dari gel agarosa dan gel poliakrilamida. Gel agarosa memiliki pori yang kompleks untuk dilewati molekul DNA dan RNA menuju kutub positif. Konsentrasi gel yang semakin tinggi akan memiliki pori yang semakin kecil. Molekul DNA yang berukuran kecil akan lebih cepat migrasinya melewati gel dibandingkan dengan molekul yang berukuran besar. Oleh karena itu elektroforesis gel akan memisahkan molekul DNA sesuai dengan ukurannya.

Elektroforesis Gel poliakrilamida (*Polyacrylamide gel electrophoresis-PAGE*) akan menghasilkan pita yang lebih jelas dan tajam dibandingkan gel agarosa sehingga lebih sesuai bila digunakan untuk DNA dan RNA yang berukuran kurang dari 1 kb serta protein. Elektroforesis gel untuk protein terdiri dari SDS-PAGE untuk pemisahan berdasarkan berat molekul, IEF (iso-electric focusing gel) untuk pemisahan berdasar muatan listrik dan PAGE 2 dimensi untuk pemisahan menggunakan kombinasi Berat molekul dan muatan.

Elektroforesis gel terdiri dari dua fasa dasar yang disebut *fasa diam* dan *fasa gerak* (eluen). Fasa diam berfungsi menyaring materi yang akan dipisah, sementara fasa gerak berfungsi membawa materi yang akan dipisah. Fasa gerak akan menggunakan larutan

penyangga untuk menjaga kestabilan materi pada gel elektroforesis. Elektroda positif dan negatif terletak pada bagian ujung alat elektroforesis.

Materi yang akan di elektroforesis dimasukkan dalam kolom (*well*/sumur) pada bagian kutub negatif. Setelah aliran listrik diberikan, terjadi aliran elektron dan zat objek akan bergerak dari elektrode negatif ke arah sisi elektrode positif. Kecepatan pergerakan ini berbeda-beda, tergantung dari muatan dan berat molekul DNA (Tabel 3.1). Kisi-kisi gel berfungsi sebagai pemisah. Obyek yang berberat molekul lebih besar akan lebih lambat berpindah.

Hasil elektroforesis akan dilihat menggunakan alat UV transluminator (Gambar 3.2). DNA akan diwarnai terlebih dahulu agar bisa dilihat diatas lampu UV. Pewarna yang biasa digunakan adalah etidium bromida. Hal ini disebabkan etidium bromida akan terinterkalasi pada DNA sehingga saat dilihat diatas lampu UV maka DNA tersebut akan berpendar. Etidium bromida merupakan bahan beracun dan berbahaya karena dapat menyebabkan mutasi sehingga kita harus menggunakan sarung tangan dan masker agar tidak terhirup. Pengamatan menggunakan UV transluminator juga dilakukan di kamar gelap agar pendaran DNA yang sudah terwarnai dapat terlihat.

Pita-pita DNA akan menunjukkan posisi fragmen-fragmen dengan ukuran berbeda dapat dilihat dengan jelas di bawah penyinaran ultraviolet setelah pengecatan etidium bromida asalkan terdapat DNA yang cukup. Etidium bromida (EtBr) adalah pewarna interkalator. Fluoresensi EtBr akan lebih menonjolkan rantai ganda DNA sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi produk rantai ganda setelah isolasi DNA. Ukuran marker dan kontrol hasil isolasi DNA organisme lain dapat dielektroforesis dalam sumuran berdekatan dengan ampikon untuk dapat mendeterminasi ukuran ampikon secara akurat.

Bahan :

1. Agarosa
2. DNA : marker dan sampel
3. Bahan pemuat gel (*loading buffer*) :biru bromofenol
4. Buffer elektroforesis : TAE, TBE, atau TPE
5. Pewarna DNA : EtBr

Cara kerja :

- a. Pembuatan gel agarose 1% dengan cara menimbang 0,3 g agarose dan dimasukkan ke dalam 30 ml bufer TAE.

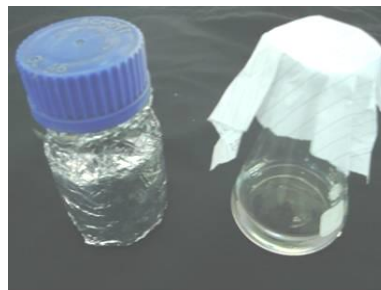


- b. Agarose dilarutkan dengan menggunakan microwave oven selama 1 menit

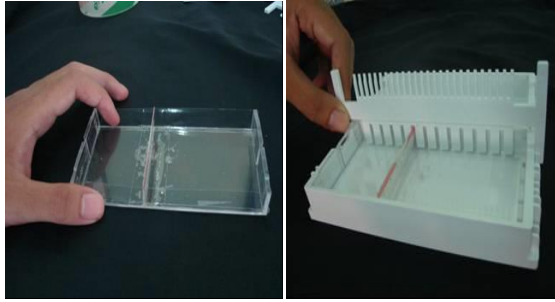


- c. Setelah agarose larut, Tambahkan ethidium bromide dengan konsentrasi $5 \mu\text{l}/100 \text{ ml}$ sebanyak $1,5 \mu\text{l}$. EtBr dicampur dengan gel panas hingga merata,

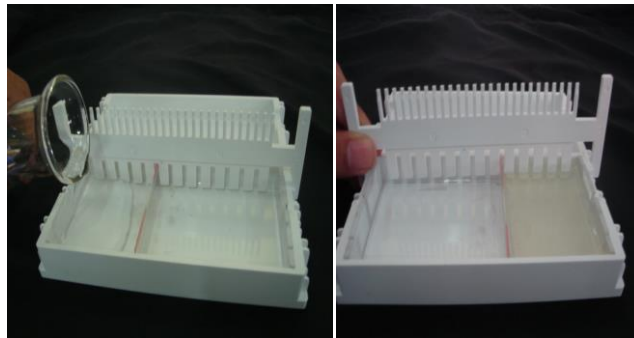
Catatan: penambahan ethidium bromide juga dapat dilakukan di akhir elektroforesis, yaitu dengan merendam gel ke dalam larutan ethidium bromide $5 \mu\text{l}/100 \text{ ml}$ dalam buffer.



- d. Biarkan gel agak dingin ($50-60^{\circ}\text{C}$) . Sambil menunggu, siapkan cetakan elektroforesis dan pasang sisir pada elektroforesis.



- e. Gel kemudian dituang dalam cetakan (gel tray) yang dipasang sisir (*comb*) untuk mencetak sumuran (*well*)



- f. Setelah gel memadat diambil sisirnya, lalu dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang berisi buffer 0.5 X TAE. Gel harus terendam secara penuh dalam buffer.

ACARA 14.

Elektroforesis

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti fungsi dan tahapan elektroforesis sebagai salah satu teknik rekayasa genetika, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa dapat diharapkan dapat mengerti tahapan elektroforesis
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti fungsi elektroforesis 70% benar
 2. mengetahui tahap-tahap elektroforesis 70% benar
 3. mampu membuat gel elektroforesis 70% benar.
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Elektroforesis adalah pemisahan molekul bermuatan listrik berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya di dalam medan listrik yang dipengaruhi oleh kuat arus listrik dan muatan listrik. Teknik ini dikemukakan pertama kali oleh Ferdinand Frederic Reuss pada tahun 1807. Sejarah penemuan elektroforesis berkembang pada abad ke 19 saat Johan Wilhelm Hittorf, Walther Nernst dan Friedich Kohlrausch mengukur sifat dan gerakan ion pada larutan dibawah pengaruh medan listrik dan membuat rumus tentang gerakan tersebut. Arne Tiselius pada tahun 1931 membuat sebuah mesin bernama Tiselius *apparatus* yang prinsip kerjanya berdasarkan pergerakan menggunakan gaya elektroforesis sampai batas tertentu. Teknik itu berkembang pada tahun 1940 dan 1950 melalui penggunaan kertas saring dan gel. Pada tahun 1960 gel elektroforesis telah digunakan untuk memisahkan molekul biologis berdasarkan perbedaan fisik dan kimia materi dalam skala menit. Setelah itu proses pemisahan dan analisis kimiawi berbasis elektroforesis semakin berkembang sampai abad ke 21.

Medan listrik dialirkan pada suatu media yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Teknik ini digunakan dengan memanfaatkan muatan listrik pada molekul yaitu DNA, RNA dan protein. Molekul DNA dan RNA pada pH 7,5 - 8 merupakan molekul yang bermuatan negatif. Molekul DNA yang bermuatan negatif bila ditempatkan pada medan listrik akan bermigrasi menuju kutub positif. Kecepatan migrasi molekul DNA tergantung pada ukuran, bentuk molekul dan muatan. Pergerakan molekul DNA dapat dijelaskan dengan gaya Lorentz, yang terkait dengan sifat-sifat dasar elektris bahan yang diamati dan kondisi elektrik lingkungan dengan rumus :

$$\vec{F}_e = q\vec{E}$$

F = gaya Lorentz,

q = muatan yang dibawa oleh objek,

E = medan listrik

Teknik pemisahan DNA/RNA melalui elektroforesis ini berawal dari sekelompok ilmuwan biokimia di awal tahun 1950-an yang sedang meneliti mekanisme molekular hidrolisis DNA/RNA. Pada tahun 1952, Markham dan Smith mempublikasikan suatu alat yang digunakan untuk hidrolisis RNA terjadi melalui mekanisme pembentukan zat antara

fosfat siklik, yang menghasilkan nukleosida 2'-monoposfat dan 3'-monoposfat. Peralatan itu dinamakan 'elektroforesis', yang dibuat dari kertas saring *Whatman* nomor 3, sebuah tangki kecil dan berbagai larutan penyangga (*buffer*). Nukleotida yang sudah terhidrolisis ditaruh di atas kertas saring, kemudian arus listrik dialirkan melalui kedua ujung alat elektroforesis. Arus listrik yang dialirkan ini ternyata dapat memisahkan campuran kompleks reaksi tadi menjadi komponen-komponennya, ini akibat adanya perbedaan minor antara struktur molekul RNA yang belum terhidrolisis, zat antara dan hasil reaksi (*nukleosida 2'-monoposfat* dan *nukleosida 3'-monoposfat*) yang menyebabkan mobilitas alias pergerakan pada kertas saring yang berbeda-beda kecepatannya. Pada akhir proses elektroforesis komponen tersebut terpisah-pisah, sehingga dapat diisolasi dan diidentifikasi setiap komponen tersebut.

Prinsip dasar elektroforesis :

1. DNA, RNA, dan protein adalah molekul bermuatan listrik.
2. DNA dan RNA pada pH 7.5 – 8 bermuatan negatif, sedangkan protein ada yang bermuatan negatif atau positif.
3. Molekul bermuatan negatif akan bergerak menuju kutub positif pada medan listrik.
4. Molekul berukuran kecil bergerak lebih cepat dibandingkan molekul berukuran besar.
5. Untuk pergerakan molekul diperlukan media yang berpori-pori, yaitu gel. Makin tinggi konsentrasi gel, ukuran pori makin kecil.

Macam elektroforesis berdasarkan media dan fungsinya:

1. Elektroforesis gel agarosa : gel berupa agarosa, untuk memisahkan DNA/RNA
2. Elektroforesis gel poliakrilamid : gel berupa poliakrilamid, untuk memisahkan DNA/RNA < 1 kb dan protein.

Peran elektroforesis dalam analisis genetik:

1. Menentukan ukuran fragmen DNA
2. Analisis fragmen DNA yang diamplifikasi melalui PCR
3. Identifikasi persamaan/perbedaan genetik individu
4. Digunakan dalam preparasi purifikasi DNA
5. Analisis protein berdasar BM dan/atau muatan listrik

Pita-pita DNA akan menunjukkan posisi fragmen-fragmen dengan ukuran berbeda dapat dilihat dengan jelas di bawah penyinaran ultraviolet setelah pengecatan etidium bromida asalkan terdapat DNA yang cukup. Etidium bromida (EtBr) adalah pewarna

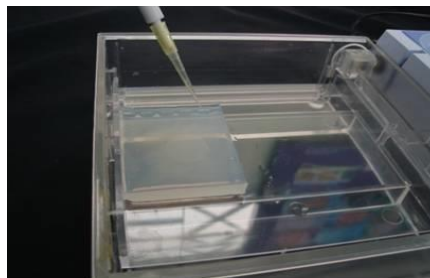
interkalator. Fluoresensi EtBr akan lebih menonjolkan rantai ganda DNA sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi produk rantai ganda setelah isolasi DNA. Ukuran marker dan kontrol hasil isolasi DNA organisme lain dapat dielektroforesis dalam sumuran berdekatan dengan ampikon untuk dapat mendeterminasi ukuran ampikon secara akurat.

Bahan :

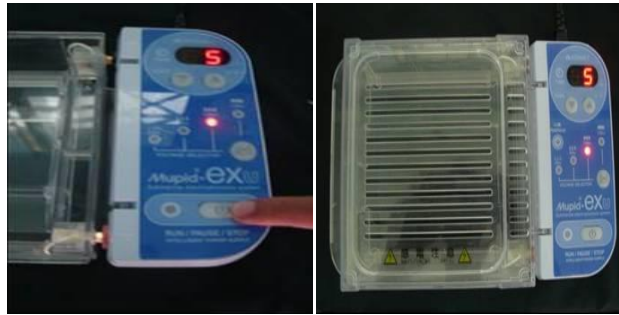
1. Agarosa
2. DNA : marker dan sampel
3. Bahan pemuat gel (*loading buffer*) :biru bromofenol
4. Buffer elektroforesis : TAE, TBE, atau TPE
5. Pewarna DNA : EtBr

Cara kerja :

- a. Sampel DNA yang akan dielektroforesis dicampur dengan 1x konsentrasi *loading buffer*. Perbandingan antara sampel DNA dengan *loading buffer* tergantung pada volume sampel. Usahakan agar semua sampel tercampur dengan bufer.
- b. Pada praktikum kali ini loading DNA dilakukan dengan campuran sebagai berikut :
10 μ l sampel DNA + 3 μ l *loading buffer*.
- c. Sampel yang telah di tambah *loading buffer* dimasukkan dalam sumuran pada gel agarose



- d. Tangki elektroforesis dihubungkan dengan sumber arus. Sumber arus dihidupkan dengan voltage konstan. Voltage dan lama waktu elektroforesis tergantung pada banyaknya sampel DNA yang dielektroforesis.



- e. Elektroforesis dihentikan sampai pewarna hampir mencapai ujung tempat gel.
- f. Hasil elektroforesis akan dapat dilihat di atas UV transluminator



BAB 15.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti fungsi dan tahapan PCR sebagai salah satu teknik rekayasa genetika, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa dapat diharapkan dapat mengerti tahapan PCR
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti fungsi PCR 70% benar
 2. mengetahui tahap-tahap PCR 70% benar
 3. mampu membuat PCR 70% benar.
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Perbanyakan gen secara *in vitro* dapat dilakukan dengan amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR yang ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1985. *Polymerase*

Chain Reaction” (PCR) adalah proses untuk memperbanyak satu urutan asam nukleat spesifik dalam asam nukleat atau campuran asam nukleat dimana masing-masing asam nukleat terdiri dari dua untai komplementer yang terpisah dengan panjang yang sama atau atau tidak.

Proses PCR memerlukan pemisahan dua untai asam nukleat dengan dua primer oligonukleotida, dan memperpanjang primer (urutan basa pendek untuk memulai proses amplifikasi) untuk membentuk rantai pemanjangan primer yang komplementer dengan DNA cetakan. Langkah-langkah reaksi dapat dilakukan bertahap atau sekaligus dan dapat diulang sesering yang diinginkan. Tahapan yang terjadi adalah pemisahan rantai DNA menggunakan perlakuan panas menghasilkan dua rantai tunggal, disebut sebagai tahap denaturasi. Tahap berikutnya adalah penempelan primer pada tiap rantai tunggal DNA dimana primer harus komplemen dengan DNA cetakan dilanjutkan dengan proses pemanjangan primer atau ekstensi. Proses tersebut terjadi dengan bantuan enzim polimerase. Pemisahan rantai yang baru terbentuk untuk digunakan sebagai cetakan lanjut adalah tahap untuk memulai siklus berikutnya.

Komponen-komponen yang dibutuhkan untuk PCR yaitu fragmen DNA yang akan diamplifikasi (DNA cetakan), sepasang primer oligonukleotida, enzim DNA *polymerase* yang tahan panas, empat macam nukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP), serta bufer reaksi yang mengandung $MgCl_2$. Alat ini mampu secara cepat mengubah temperatur yang dibutuhkan untuk siklus berulang.

Siklus PCR dibagi menjadi 3 tahap yaitu pemisahan utas DNA pada suhu tinggi (denaturasi), penempelan primer, dan pemanjangan primer menjadi utas baru DNA oleh enzim DNA polimerase. Tiap-tiap tahapan memerlukan suhu yang berbeda. Tahap predenaturasi merupakan tahap awal reaksi yang berlangsung pada suhu tinggi, yaitu $92^{\circ}C$ hingga $96^{\circ}C$, dilakukan sampai 3-5 menit untuk memastikan semua utas DNA terpisah. Tahap denaturasi merupakan tahap reaksi selanjutnya akan berlangsung pada suhu tinggi, yaitu $94-98^{\circ}C$ selama 20-30 detik. Tahap denaturasi akan memisahkan rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal sebagai DNA cetakan dengan memutuskan ikatan hidrogen antar pasangan basa. Semakin panjang untaian rantai DNA, semakin lama waktu yang diperlukan untuk tahap denaturasi.

Tahap selanjutnya adalah penurunan suhu yang akan menyebabkan penempelan primer atau *annealing* pada suhu sekitar $42^{\circ}C$ hingga $65^{\circ}C$ selama 20-40 detik. Suhu penempelan ini bersifat spesifik yang merupakan rata-rata dari nilai titik leleh atau *melting temperature* (T_m) yang dimiliki masing-masing primer, yaitu primer hulu/*forward* (*5'-end*)

dan primer hilir/*reverse* (3'-end). Perbanyak fragmen DNA dilakukan oleh urutan basa tunggal berukuran 10-20 basa yang disebut primer. Primer menempel pada bagian DNA cetakan yang memiliki urutan basa komplementer dengan urutan basa primer. Tahap ini di dalam replikasi sel berfungsi sebagai inisiasi sintesis DNA oleh primase untuk membentuk RNA primer pada daerah awal replikasi (ORI=*Origin of Replication*).

Tahap ketiga adalah perpanjangan primer yang bertujuan memberikan kondisi optimum bagi kerja enzim Taq polimerase dalam memanjangkan primer guna membentuk utas DNA baru. Enzim polimerase yang digunakan untuk menganalisis penempelan dua buah primer pada proses PCR salah satu jenisnya adalah *Taq* polimerase.

Bahan

Sampel DNA hasil Isolasi, ddH₂O, KAPATaq Extra HotStart, primer universal 18S Forward (5'-GTAGTCATATGCTTGTCT-3') dan 18S Reverse (5'-AGGGCAAGTGTGGTGCCAGC-3'), *nuclease free water*

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini ialah *gel ice*, tabung mikrosentrifuga, mikropipet, tip biru, tip kuning, tip putih, microcentrifuge, Thermalcycler BioRad C1000.

Cara kerja

Amplifikasi DNA diawali dengan pembuatan larutan koktail PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan total volume reaksi adalah 25 µl yang terdiri atas 2 µl DNA *template*, 12,5 µl KAPATaq *Extra HotStart*, 1,25 µl primer *Forward* universal 18S, 1,25 µl primer *Reverse* universal 18S dan 8 µl *nuclease free water*. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR *Thermalcycler* dengan pengaturan kondisi PCR berdasarkan protokol Koktail PCR KAPA TaqTM *Extra HotStart* yaitu pra denaturasi PCR suhu 95°C selama 3 menit, diikuti oleh 35 siklus yang terdiri dari tahap denaturasi dengan suhu 95 °C selama 15 detik, pelekatan primer (*annealing*) dengan suhu 52 °C selama 15 detik, dan tahap elongasi dengan suhu 72 °C selama 1 menit. Proses amplifikasi diakhiri dengan fase pemanjangan pada suhu 72 °C selama 1 menit dan suhu penyimpanan pada tahap akhir 4 °C. Produk PCR yang diharapkan ± 500bp dengan kombinasi kedua primer tersebut

BAB 16.
SEKUENSING

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti fungsi dan tahapan sekuensing sebagai salah satu teknik rekayasa genetika, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa dapat diharapkan dapat mengerti tahapan sekuensing
3. Indikator :
 1. Mampu mengerti fungsi sekuensing 70% benar
 2. mengetahui tahap-tahap sekuensing 70% benar
 3. mampu membuat sekuensing 70% benar.
4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.
5. Kegiatan Belajar Mengajar :

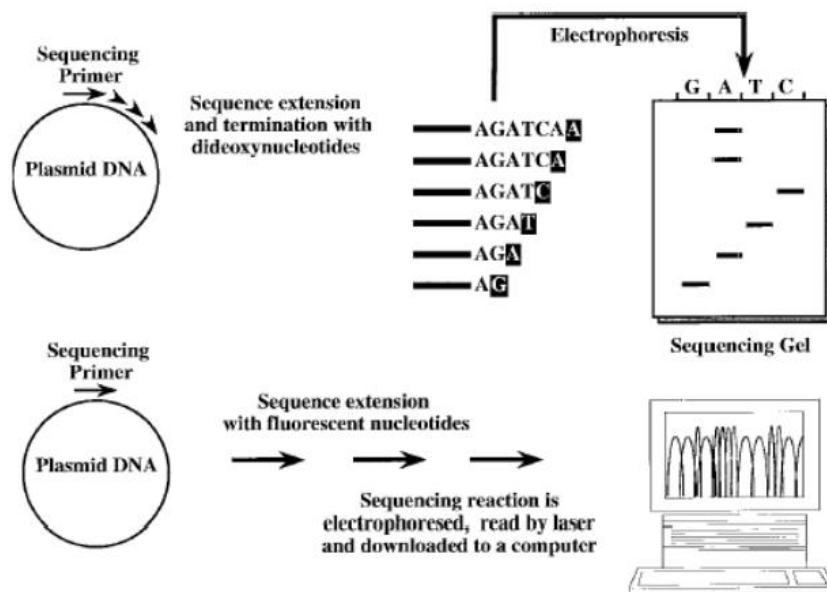
Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Sekuensing DNA adalah suatu teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Sekuensing merupakan suatu proses modifikasi replikasi DNA yang dilakukan secara *in vitro*. Hal yang membedakan sekuensing dengan replikasi DNA

dalam kondisi normal yaitu adanya dideoksinukleotida (ddNTPs) dalam reaksi sekuensing, sedangkan yang terdapat dalam kondisi normal yaitu deoksinukleotida. Perbedaan dari keduanya yaitu tidak adanya grup 3'-OH pada dideoksinukleotida yang berguna bagi DNA polimerase untuk memperpanjang rantai. Dideoksinukleotida akan terinkorporasi pada ujung 3' untai DNA yang baru disintesis. DNA polimerase tidak dapat menambahkan basa baru pada ddNTP. Dengan demikian, inkorporasi ddNTP mengakibatkan penghentian sintesis rantai DNA. Manfaat dari sekuensing DNA yaitu untuk menentukan identitas dan fungsi gen atau fragmen DNA lain. Manfaat tersebut dapat diperoleh dengan cara membandingkan sekuen sampel dengan sekuen DNA lain yang sudah diketahui sebagai sumber. Selain itu, sekuensing juga dapat dimanfaatkan untuk mengidentifikasi sebuah mutasi gen dan dapat digunakan untuk membandingkan gen homolog diantara spesies.

Metode sekuensing yang umum digunakan yaitu metode Maxam-Gilbert dan Sanger, tetapi metode Sanger merupakan metode yang lebih banyak digunakan (Gambar). Metode ini dilakukan dengan adanya DNA cetakan, primer, dan polimerase pada suatu reaksi yang berisi dideoksinuleotida dan deoskinukleotida. Sedangkan pada Metode Maxam-Gilbert diawali menggunakan piperidin untuk memotong DNA, selanjutnya ditambahkan dimetil sulfat yang akan bereaksi dengan guanin, asam format yang akan bereaksi dengan adenin dan guanin, serta hidrazin yang akan bereaksi dengan sitosin dan timin.



Gambar . Alur Sekuen DNA Metode Sanger

Hasil sekuensing metode Sanger dibaca dari urutan 5' ke 3' yaitu pembacaan pita DNA mulai dari kutub positif ke kutub negatif (dari pita DNA terjauh ke pita DNA terdekat dari lubang sumuran), sedangkan untuk mengetahui urutan DNA template maka dilakukan pembacaan secara komplementer dari arah sebaliknya. Sekuensing DNA secara otomatis dari produk PCR dapat dilakukan. Suatu mesin juga digunakan untuk mempersiapkan reaksi sekuensing untuk skala besar. Peralatan yang telah ada di era modern ini memungkinkan untuk membaca sekuensing secara langsung sekaligus dapat menyimpan data di dalam database komputer. Adanya otomatisasi ini mempunyai keuntungan seperti mengurangi kerja manusia, mengurangi faktor kesalahan dalam pembacaan dan penulisan urutan DNA.

Umumnya, mesin yang ada saat ini dilengkapi dengan *fluorecent* (suatu pewarna yang berfluorensi) sebagai pengganti radioaktif. Pewarnaan ini dapat diinkorporasikan ke dalam primer sekuensing atau ke dalam nukleotida. Elektroforesis gel digunakan untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukurannya, sama halnya dengan sekuensing manual. Namun, deteksi fragmen DNA yang berfluoresensi pada sekuensing otomatis diperlukan bantuan sinar laser dan sinyal yang diproses oleh komputer. Hasil sekuensing secara otomatis dapat dibaca berdasarkan *pick-pick* yang terbentuk pada layar computer.

Cara kerja :

Tahap - tahap *cycle sequencing* adalah :

1. Mencampur seluruh bahan seperti pada tahap PCR untuk mengamplifikasi sekuen DNA target namun menggunakan ddNTPs yang telah terlabeli zat *fluorescent*.
2. Purifikasi selanjutya dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan ddNTPs berlebih yang dapat mengganggu pembacaan sekuen pada mesin *sequencer*.
3. Hasil pembacaan oleh mesin *sequencer* yaitu elektroferogram yang berbentuk seperti kurva naik turun dengan warna yang berbeda. Warna biru menunjukkan basa C, warna merah menunjukkan basa T, warna hitam menunjukkan basa G, warna hijau menunjukkan basa A, dan warna ungu atau biru muda menunjukkan N (*error*).



Gambar. Contoh elektroferogram

BAB 17.

ANALISIS FILOGENETIKA

A. Kompetensi :

1. Standar Kompetensi : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat mengerti fungsi dan tahapan analisis filogenetika sebagai salah satu tahapan analisis rekayasa genetika, mampu mengaitkan materi praktikum dengan ilmu-ilmu yang lain
2. Kompetensi Dasar : Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa dapat diharapkan dapat mengerti tahapan analisis filogenetika

3. Indikator :
 1. Mampu mengerti fungsi analisis filogenetika 70% benar
 2. mengetahui tahap-tahap analisis filogenetika 70% benar
 3. mampu membuat analisis filogenetika 70% benar.

4. Soft skill : Dapat bekerjasama, bertanggung jawab, berani mengemukakan pendapat atau bertanya, menghargai pendapat orang lain, belajar mandiri, mawas diri, pengendalian diri, motivasi, belajar sepanjang hayat.

5. Kegiatan Belajar Mengajar :

Mahasiswa berdiskusi dalam kelompok kecil (5 mahasiswa per kelompok), dipandu oleh seorang Dosen dan asisten. Kegiatan belajar mengajar menggunakan metode *Problem solving*, *Discovery learning*, *Problem based learning*,

Dasar Teori

Keragaman genetik merupakan salah satu dasar untuk mengetahui tingkat perubahan dan nilai keberhasilan dalam seleksi suatu populasi (Wulandari, 2008). Keragaman genetik menjadi sangat penting bagi tanaman karena berguna untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan sekitar. Dasar dalam penyusunan strategi untuk konservasi, pemuliaan, pengelolaan dan pemanfaatan sumber daya genetik tanaman secara berkelanjutan diperlukan informasi keragaman genetik tanaman pada tingkat individu, spesies dan populasi. Penilaian keragaman genetik tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan metode analisis morfologi, biokimia dan molekuler DNA. Metode analisis molekuler DNA dilakukan untuk mengetahui persamaan dan perbedaan sifat antar individu sehingga diperoleh sebuah nilai persamaan (*similarity*). Penentuan keragaman genetik secara morfologi membutuhkan waktu yang lama, relatif lebih mahal, dan hasil

sangat dipengaruhi oleh lingkungan dan keragaman yang diperoleh terbatas dan tidak konsisten.

Pemahaman mengenai keanekaragaman makhluk hidup sering kali dilakukan menggunakan analisis filogenetik melalui rekonstruksi hubungan kekerabatan (*phygenetic relationship*). Filogenetik merupakan sebuah model untuk merepresentasikan hubungan nenek moyang organisme, sekuen molekul atau keduanya. Hubungan nenek moyang tersebut dapat digambarkan dalam pohon filogenetik. Pohon filogenetik merupakan suatu pendekatan yang dapat menunjukkan hubungan evolusi dan kedekatan antara organisme.

Tujuan dari penyusunan filogenetik yaitu untuk mengkonstruksi hubungan dengan tepat antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya. Filogenetika juga dapat menganalisis perubahan yang terjadi dalam evolusi organisme yang berbeda. Sekuens hasil analisis yang mempunyai kedekatan akan teridentifikasi dengan sekuens tersebut menempati cabang yang bertetangga pada pohon. Analisis filogenetika dapat digunakan untuk mengikuti perubahan yang terjadi secara cepat yang mampu mengubah spesies seperti virus.

Analisis filogenetik memiliki tiga tahapan penting yaitu *sequence alignment*, rekonstruksi pohon filogenetika dan evaluasi pohon filogenetika dengan uji statistik. *Alignment* bertujuan untuk mengetahui dan mencocokkan karakter sekuens yang homolog. *Alignment* akan menunjukkan posisi sekuens yang tidak mengalami perubahan (*conserve*) dan sekuens yang mengalami perubahan menjadi berbeda (*divergent*) dengan *common ancestor*. Hasil *alignment* yang mirip dari sekuens nukleotida atau protein dari dua organisme yang berbeda menunjukkan kedua organisme diduga diturunkan dari sekuens *common ancestor*.

Analisis filogenetik secara molekuler dapat dilakukan menggunakan nukleotida atau asam amino. Sekuen nukleotida atau asam amino dalam analisis filogenetik digunakan untuk menentukan bagaimana suatu hubungan keluarga diturunkan selama proses evolusi. Sekuen berbeda yang saling berhubungan akan terletak pada cabang bagian dalam dari pohon filogeni.

Cara kerja

Analisis dilakukan dengan 2 tahap yaitu analisis sekuens dan analisis filogenetik.

1. Analisis Sekuens

Analisis sekuen dilakukan setelah memperoleh urutan basa nukleotida pada daerah target 18S rRNA sampel DNA yang digunakan. Hasil urutan basa nukleotida yang diperoleh selanjutnya dianalisis untuk mengetahui kesamaan sekuennya dengan data GenBank menggunakan *Basic Alignment Search Tool* (BLAST) pada NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)

2 . Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik dilakukan untuk mengetahui hubungan evolusi dan hubungan kekerabatan sampel DNA dengan organisme lain yang ditunjukkan dengan pohon filogenetik. Tahap analisis filogenetik dilakukan menggunakan aplikasi molekuler seperti ClustalX yang berguna untuk mensejajarkan sekuen sampel yang diperoleh dengan sekuen organisme lain pada situs NCBI dan menggunakan aplikasi MEGA6 untuk mengkonstruksi pohon filogenetiknya.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B, D.Bray, J Lewis , M. Ralf, K. Roberts, JD Watson. 1991. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publ. London.
- Ausubel, F., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology. A Compedium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. 3rd Ed . Wiley & Sons. Inc. USA. 2-10.
- Bireen, B., E.D. Green, S. Klapholz, R.M. Myers, J. Roskams. *Genome Analysis, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press. USA
- Brinkman, F., and Leipe. 2001. Phylogenetic Analisis. In: *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analisis of Gene and Protein*. Baxevanis, A.D., and B.F.F. Ouellette (Eds.). John Willey and Sons. Halaman 323-358.
- Brown, TA. 1995. *Gene Cloning : an Introduction*. Third Edition. Chapman and Hall London.
- Cheng, F.S., S.K. Brown and N.F. Weeden. 1997. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. *Hortscience*. 32(5): 921-922.
- Devereux, R. dan S.S. Wilkinson. 2004. *Amplification of Ribosomal RNA Sequences*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limitson phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Lewin B. 1997. *Genes VI*. Oxford Univ. Press.
- Newton CR, A.Graham. 1997. *PCR*. Second Edition. Springer Bios Scientific Publishers. UK
- Reece, R. J. 2004. *Analysis of Genes and Genomes*. England: John Wiley & Son. Hal. 40-350.
- Sambrook J, EF.Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Watson JD, J. Tooze, DT Kurtz. 1988. *DNA Rekombinan Suatu Pelajaran Singkat*. Terj. W. Gunarso. Penerbit Erlangga. Jakarta
- Yuwono T, 2003. *Petunjuk Laboratorium Teknik Biologi Molekuler*. PAU Bioteknologi UGM
- _____.T, 2007. *Biologi Molekuler*. Erlangga. Jakarta

DAFTAR ISTILAH

Agarosa	Suatu bubuk yang terbuat dari agar merah yang digunakan sebagai media pembawa DNA untuk elektroforesis
CCC	konformasi lingkaran tertutup kovalen atau <i>covalently closed circular (ccc)</i> , dari DNA plasmid
COI	salah satu gen penyandi protein yang terdapat pada mitokondria yang bertanggung jawab dalam langkah akhir fosforilasi sebelum pembentukan ATP
DNA	bahan penyusun gen dan makromolekul beruntai ganda berbentuk heliks yang berfungsi sebagai pewarisan sifat yang menyimpan beragam materi genetic
Enzim restriksi	adalah suatu enzim yang bisa memotong untai DNA secara spesifik sesuai dengan urutan yang dikenalnya
Elektroforesis	pemisahan molekul bermuatan listrik berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya di dalam medan listrik yang dipengaruhi oleh kuat arus listrik dan muatan listrik
<i>double helix</i>	Nukleotida berbentuk ulir ganda
Isolasi DNA	pengambilan DNA dari makhluk hidup yang terbagi atas beberapa tahapan yaitu penumbuhan dan perbanyakan sel, penghancuran dinding atau membran sel, pemisahan DNA dari bahan selain DNA yaitu RNA dan protein serta pemurnian DNA.
Kloroplas	organel pada tanaman berupa plastid yang mengandung klorofil dan mengandung DNA ekstrakromosomal
<i>loading dye</i>	Pewarna DNA
Mitokondria	struktur dalam sel yang mengandung DNA ekstrakromosomal dan berperan dalam mengubah energi dari makanan menjadi bentuk yang dapat digunakan oleh sel melalui proses fosforilasi oksidatif
nukleotida	molekul organik basa nitrogen, pentosa (gula berkarbon lima), dan gugus fosfat
ORI	<i>origin of replication</i> yaitu titik awal replikasi pada prokariot dan eukriot
palindromik	suatu urutan DNA yang sama jika dibaca dengan arah berlawanan pada setiap untainya
PAGE	<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> yaitu elektroforesis yang mampu

memisahkan campuran DNA/RNA atau protein dengan ukuran lebih besar.

PFGE *Pulse-field Gradient Gel Electrophoresis* yaitu teknik untuk memisahkan campuran DNA berukuran sangat besar

Plasmid DNA ekstrakromosomal pada bakteri yang umumnya mempunyai struktur sirkuler

Polymerase Chain Reaction” (PCR) proses untuk memperbanyak satu urutan asam nukleat spesifik dalam asam nukleat atau campuran asam nukleat dimana masing-masing asam nukleat terdiri dari dua untai komplementer yang terpisah sesuai dengan ukuran fragmen

vektor kloning Wahana pembawa gen sisipan atau gen target dalam teknik kloning gen