

MODUL PRAKTIKUM BIOLOGI MOLEKULER



Nurlian Augustin Ningrum, M.Sc.

Daftar isi

- I. Dasar Biologi Molekuler**
- II. Isolasi DNA**
 - Topik I. Pengenalan Alat Biologi Molekuler**
 - Topik II. Isolasi DNA Jaringan Hewan**
 - Topik III. Isolasi DNA Folikel Rambut Manusia**
- III. Uji Kuantitatif dan Kualitatif**
 - Topik V. Uji Kuantitatif menggunakan Nanodrops/Spektrofotometer**
- IV. Amplifikasi DNA**
 - Topik VI. Amplifikasi DNA dengan Polymerase Chain Reaction**
 - Topik VII. Elektroforesis agarose**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita ucapkan kehadiran Allah SWT, yang telah memberi hidayah-Nya sehingga Modul Praktikum Biologi Molekuler ini dapat diselesaikan. Modul ini dimaksudkan untuk membantu mahasiswa dalam melaksanakan praktikum sehingga dapat memahami teori yang telah diberikan di kelas.

Modul praktikum ini terdiri beberapa topik yang terkait teknik dalam penelitian biologi molekuler diantaranya seperti pengenalan alat, teknik pipetting, isolasi DNA dari tanaman, darah dan folikel rambut, uji kuantitatif dan kualitatif DNA, Isolasi protein serta pengukuran kadar protein.

Dalam penyusunan Modul Praktikum ini pasti masih banyak terdapat kekurangan. Oleh sebab itu, penyusun sangat berterimakasih bila pembaca berkenan memberi masukan, kritik, maupun saran untuk sempurnanya Modul Praktikum ini yang diharapkan akan semakin meningkatkan kualitas proses belajar mengajar.

Akhir kata, penulis berharap agar Modul Praktikum ini dapat bermanfaat dalam meningkatkan kualitas proses belajar mengajar dan membantu mahasiswa dalam melaksanakan praktikum.

Medan, Maret 2024,

Dosen Pengampu

Nurlian Augustin N

TATA TERTIB LABORATORIUM

Adapun tata tertib Laboratorium Biologi Molekuler sebagai berikut:

1. Para mahasiswa harus menghadiri seluruh percobaan dalam masa praktikum dan tidak dibenarkan meninggalkan praktikum tanpa alasan yang sah (surat dokter, dan lain-lain) dan perlu mendapat persetujuan dosen penanggung jawab praktikum.
2. Praktikan yang terpaksa tidak dapat mengikuti praktikum pada waktu yang telah ditentukan, harus mengikuti praktikum pengganti bersama-sama dengan kelompok praktikum yang lain pada minggu tersebut atas persetujuan penanggung jawab praktikum
3. Setiap kali praktikum, praktikan harus :
 - a. Mempersiapkan materi/bahan yang akan dipraktikumkan
 - b. Hadir 10 menit sebelum praktikum dimulai
 - c. Bekerja dengan tenang dan tertib
 - d. Melakukan pengamatan dengan benar dan jujur
 - e. Mematuhi semua petunjuk asisten dan laboran
4. Setiap kali praktikum dilakukan kuis praktikum
5. Selama praktikum berlangsung, praktikan dilarang:
 - a. Mengenakan T-shirt dan/atau sandal
 - b. Meletakkan tas dan/ atau buku di atas meja praktikum, kecuali buku penuntun dan buku catatan praktikum.
 - c. Berjalan-jalan di laboratorium, mengobrol dan membuat gaduh.
 - d. Coret-coret dengan pensil, pulpen atau spidol pada meja, kursi, dinding serta alat laboratorium.

6. Selesai praktikum, tinggalkan laboratorium dalam keadaan bersih tanpa sampah, dengan alat-alat yang bersih dan tersusun rapi seperti ketika praktikan masuk ke laboratorium

7. Pelanggaran terhadap tata tertib ini akan dikenakan sanksi

Dasar Biologi Molekuler

Cabang-cabang ilmu biologi sangatlah beragam seperti halnya Biokimia yang membahas mengenai reaksi-reaksi kimia dalam jasad hidup yang juga membahas mengenai hubungan antara reaksi dan reaktan. Namun dalam ilmu biokimia reaksi kesetimbangan dapat dipengaruhi oleh perubahan ekspresi gen yang mengkode enzim-enzim tertentu yang berperan di dalam reaksi biokimia sehingga pembahasan mengenai perubahan ekspresi gen yang menyebabkan reaksi biokimiawi tercakup di dalam studi biologi molekuler. Respon makhluk hidup terhadap suatu stimulan biasanya dipelajari di dalam fisiologi sel. Namun, aspek-aspek fisiologi sel tersebut juga dapat bersinggungan dengan ranah Biologi molekuler. Contohnya adalah reaksi anatara antigen dengan antibodi

Konsep dasar biologi molekuler mengawali pengetahuan tentang teori dasar dan perkembangan terakhir biologi molekuler. Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi dalam kajian ilmu hayati tidak lepas dari analisis tingkat seluler dan molekuler, terutama sejak a da human genome project (HGP) tahun 1990-an sampai dengan perkembangan terakhir berbasis nanoteknologi. Biologi molekuler tidak terlepas dari pembicaraan mengenai dna serta protein, hal ini dikarenakan kedua materi tersebut menjadi objek yang paling sering dibahas terkait biologi molekuler dan aplikasinya.

Dna merupakan molekul penyusun kromosom yang tersusun atas basa-basa nukleotida, gula pentosa dan deoksiribosa. Nukleotida dna terdiri dari area yang mengkode gen-gen disebut exon, daerah non-coding dna atau intron, regulator gen dan daerah berurutan berulang seperti mikrosatelit, telomer, VNTR, STS dan SNPs. Protein merupan kelompok biomakromolekul yang sangat heterogen. Ketika berada diluar makhluk hidup ataupun sel, prtein sangat tidak stabil. Untuk mempertahankan fungsinya setiap jenis protein membutuhkan kondisi tertentu ketika viekstraksi dari normal biological milieu. Protein yang diekstraksi hendaknya dihindarkan dari proteiolisis atau dipertahankan aktivitas enzimatiknya.

TOPIK I

PENGENALAN ALAT-ALAT LABORATORIUM BIOLOGI MOLEKULER

Pendahuluan Biologi molekuler merupakan cabang ilmu biologi yang mempelajari segala aktivitas pada aras molekul. Pembelajaran tentang biologi molekuler akan lebih efektif apabila diikuti dengan kegiatan praktikum. Pengenalan alat-alat laboratorium merupakan langkah awal yang harus dilakukan sebelum memulai kegiatan praktikum atau penelitian biologi molekuler.

Dalam melakukan percobaan dilaboratorium atau bekerja dalam laboratorium terutama laboratorium kimia, seseorang akan selalu dihadapkan pada hal-hal yang berhubungan dengan bahan-bahan kimia, peralatan yang dapat berbahaya dan merugikan bagidiri sendiri, orang lain maupun lingkungan sekitar, bila tidak digunakan dengan baik. Sepertilayaknya pekerjaan lain, bekerja dalam laboratorium molekuler juga mempunyai resiko kecelakaan kerja. Resiko ini dapat disebabkan karena faktor ketidaksengajaan, keteledorandan sebab-sebab lain yang diluar kendali manusia.

Setiap alat yang ada di laboratorium mempunyai fungsi dan cara kerja yang berbeda-beda. Adapun tujuan dari topik praktikum ini adalah mahasiswa dapat memahami prinsip kerja alat-alat yang sering digunakan di laboratorium biologi molekuler, seperti mikropipet, elektroforesis, gel documentation, sentrifugasi, spektrofotometer, thermocycler dan Laminar Air Flow. Alat-alat tersebut nantinya akan sering digunakan untuk beberapa tujuan, seperti isolasi DNA, isolasi plasmid, analisis DNA secara kualitatif dan kuantitatif, serta PCR. Selain memahami prinsip kerja pada masing-

masing alat, diharapkan mahasiswa juga mampu menggunakan alat-alat tersebut dengan baik dan benar sehingga meminimalisir terjadinya kerusakan alat dan data yang diperoleh lebih akurat.

Kompetensi Dasar

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

Alat dan Bahan

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

Prosedur Kerja

1. Mahasiswa mencari referensi mengenai alat yang akan dipraktikkan
2. Mahasiswa mempersiapkan diri serta kelompoknya untuk melakukan praktikum
3. Membawa alat tulis serta alat dokumentasi
4. Mahasiswa memasuki laboratorium dengan rapi, serta mendengarkan penjelasan serta mencatat nama alat.
5. Mahasiswa dilarang mengoperasikan alat tanpa perintah dosen pengampu
6. Mahasiswa memperhatikan alat-alat yang ada serta membandingkan dengan literatur yang telah disiapkan.
7. Mahasiswa membuat laporan sementara.

Soal Pembahasan :

Jawablah pertanyaan berikut sebagai salahsatu bahan untuk membahas hasil pengamatan laporan praktikum anda!

1. Mengapa kalian harus mempelajari alat-alat yang digunakan dalam praktikum Biologi Molekuler?
2. Jelaskan lah urgensi dari mempelajari Biologi Molekuler bagi seorang Mahasiswa Biologi!
3. Hal apa saja yang harus diperhatikan sebelum mengoperasikan alat-alat yang ada di laboratorium Biologi Molekuler!
4. Jelaskan manfaat yang anda dapatkan dari menulis laporan terkait Pengenalan alat Praktikum Biologi Molekuler!

Hasil Pengamatan :

no	Nama Alat	Gambar	Prinsip Kerja

Topik II

Teknik Pippeting

Teknik Pippeting. Pipetting merupakan salah satu teknik yang menentukan keberhasilan dalam beberapa penelitian yang ada di dalam biologi. Kegiatan pipetting adalah pengambilan volume bermanfaat untuk ketepatan dalam pengambilan sesuai prosedur yang diinginkan. Teknik pipetting yang tepat memungkinkan reagen yang digunakan menghasilkan data yang sesuai dengan yang diharapkan. Di dalam laboratorium genetika dan biologi molekuler penggunaan reagen yang digunakan dalam jumlah kecil sehingga penggunaan pipetting menjadi kebutuhan utama. Volume cairan yang digunakan di dalam laboratorium genetika dan biologi molekuler berkisar antara 2 μ l-1000 μ l.

Ketepatan dalam pengambilan reagen dengan menggunakan mikropipet yang tepat memungkinkan mendapatkan hasil yang sesuai dan terhindar dari pemborosan reagen yang digunakan. Aktivitas penelitian maupun analisis di bidang Biologi Molekuler dengan pippeting tentunya tidak dapat terlepas dari penggunaan instrument laboratorium berupa mikropipet. Mikropipet digunakan untuk mengukur dan mentransfer sejumlah liquid dalam volume mikroliter. Mikropipet adalah alat untuk memindahkan cairan yang bervolume cukup kecil, biasanya kurang dari 1000 μ l. Banyak pilihan kapasitas dalam mikropipet, misalnya mikropipet yang dapat diatur volume pengambilannya (adjustable volume pipette) antara 1 μ l sampai 20 μ l, atau mikropipet yang tidak bisa diatur volumenya, hanya tersedia satu pilihan volume (fixed volume pipette) misalnya mikropipet 5 μ l. dalam penggunaannya, mikropipet memerlukan tip.

Berikut beberapa komponen penting mikro pipet :

- Plunger button : bagian ini bergerak ke atas ketika dilepas dan ke bawah ketika ditekan. Bagian ini berfungsi untuk menarik/mengeluarkan cairan
- Top eject button : berfungsi mendorong plastik tip agar terlepas dari mikropipet
- Volume indicator : menunjukkan jumlah cairan yang dipipet

- Volume adjustment : bagian pengaturan jumlah cairan yang dipipet
- Tip attachment : bagian penempelan disposable tip
- Plastik tip : bagian yang berkontak langsung dan menampung liquid saat dilakukan proses penarikan volume tertentu liquid hingga ditransfer. Besar kecilnya disesuaikan dengan kapasitas mikropipet dan volume liquid yang ditransfer.

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

Kompetensi Dasar

- Mahasiswa dapat menggunakan *micropipet* dengan teknik yang benar
- Mahasiswa mampu membandingkan akurasi dan presisi dari pengambilan cairan menggunakan micropipet.

Alat dan Bahan

Alat

1. Mikropipet (2-20 ul, 10-100 ul, 100-1000 ul)
2. Tip (Berbagai Ukuran)
3. Mikrotube (200 ul dan 1.5ml-2ml)
4. Timbangan analitik
5. Tissue
6. Beakerglass (50 ml, 100 ml)

7. Kertas label

Bahan Praktikum

1. Aquades

2. Larutan Viskositas (Minyak)

Prosedur Kerja

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

No	Volume Yang akan di pipet	Ukuran mikropipet yang dipakai
	1500 μl	100 - 1000 μl
	200 μl	100 - 1000 μl
	160 μl	20 - 200 μl
	57 μl	20 - 200 μl
	2.5 μl	0.5 - 10 μl

b. Lakukan proses transfer masing-masing volume aquades dan larutan viskositas tersebut diatas sebanyak 2 kali.

c. Timbang aquades yang sudah ditransfer ke dalam tube dan catat hasilnya. Lakukan sebanyak 2 kali pengulangan.

2. Teknik Penimbangan

Cara Kerja

a. Sambungkan Aliran listrik terlebih dahulu

b. Pastikan timbangan dalam keadaan bersih dan stabil

c. Tekan Tombol on/off yang teletak pada sebelah kanan atau kiri timbangan

d. Biarkan posisi angka pada display menjadi 0.000

- e. Jika angka tidak stabil Auto zero kan timbangan dengan menekan tombol zero
- f. Letakan objek/wadah kosong yang akan ditimbang, kemudian catat hasil pengukurannya.
- g. Kondisikan timbangan dalam keadaan autozero pada saat objek/wadah masih diatas timbangan.
- h. timbang kembali objek/ wadah tersebut setelah di isi dengan aquades dan catat hasilnya.
- i. Angkat objek/wadah tersebut dan kembalikan timbangan dalam keadaan zero (kondisi normal)
- j. Timbang kembali objek/wadah yang telah diisi dengan aquades tadi secara keseluruhan dan catat hasil pengukurannya.
- k. Hitunglah hasil pengukuran berat aquades yang di timbang setelah timbangan dikembalikan pada kondisi normal dan bandingkan hasilnya dengan pengukuran aquades pada kondisi timbangan outozero dengan wadah kosong diatasnya.

Hasil Pengamatan :

Volume yang akan diambil	Ukuran Mikropipet	Hasil Penimbangan pada ulangan		Rata-rata
		1	2	

Soal Pembahasan :

1. Apa saja yang perlu diperhatikan dalam melakukan pippeting menggunakan micropipet?
2. Apa saja kesalahan yang membuat akurasi pippeting menjadi tidak akurat?
3. Bagaimana prinsip kerja dari micropipet?
4. Ada berapa jenis sampel yang harus diperhatikan dalam proses pemipetan pada mikropipet?
5. Apa saja faktor yang mempengaruhi keakuratan pemipetan?

Topik III

Isolasi DNA

Pendahuluan

DNA pada organisme tingkat tinggi seperti manusia, hewan dan tumbuhan terdapat di dalam inti sel, dan beberapa organ lain di dalam sel seperti mitokondria dan kloroplas. Penyebutan nama DNA juga didasarkan pada lokasi asalnya. DNA genom inti (nuclear DNA genome) berasal dari inti sel, DNA genom mitokondria berasal dari mitokondria, DNA genom kloroplas berasal dari kloroplas. Perkembangan penelitian dibidang bioteknologi dan biologi molekuler, memungkinkan untuk mengekstraksikan DNA atau RNA dari bagian sel baik pada tanaman, hewan, bakteri atau mikroorganisme lainnya.

Isolasi DNA merupakan teknik dasar dari bioteknologi dan biomolekular yang harus dikuasai di laboratorium. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari partikel-partikel lainnya seperti lipid, protein, polisakarida, dan zat lainnya. Isolasi DNA berguna untuk beberapa analisis molekuler dan rekayasa genetika seperti genom editing, transformasi dan PCR.

Prinsip dasar isolasi DNA adalah :

1. Penghancuran (lisis) dinding sel dan membran sel untuk mengeluarkan DNA dari sel.
2. Degradasi protein menggunakan protease (protease berfungsi mendegradasi protein)
3. Presipitasi DNA menggunakan alkohol (etanol atau isopropanol) dan garam (misalnya NA-asetat)

4. Pelarutan DNA dengan air atau buffer TE (Tris-EDTA) pH 8.

Dalam proses isolasi DNA, tahap penghancuran (lisis) dinding sel sangat ditentukan oleh persiapan sampel dan persiapan buffer ekstraksi. Metode lisis sel dapat dilakukan secara fisik dan kimia. Secara fisik sel dipecah dengan kekuatan mekanik yaitu secara freeze thaw, bead mill homogenization dan resonansi misalnya dengan sonikasi. Sedangkan secara kimia sel dirusak dengan buffer lisis berisi senyawa kimia yang dapat merusak integritas barrier dinding sel, misalnya SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) dan CTAB. Secara umum, semakin luas bidang reaksi antara sel dengan buffer lisis akan semakin meningkatkan efisiensi isolasi DNA. Penghancuran jaringan tanaman menggunakan nitrogen cair (N₂) atau pencacahan di dalam buffer ekstraksi bertujuan untuk memperluas bidang reaksi dan meningkatkan efisiensi isolasi DNA.

Kompetensi Dasar

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

Alat dan Bahan

Bahan:

- Gelas ukur 1000 mL
- Labu erlenmeyer 250 mL
- Larutan Isolasi DNA (50mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% Tween-20, Proteinase K)
- Microtube
- Dneasy Plant mini Kit
- Dneasy Blood and Tissue Kit

- Darah + EDTA
- Daun Tumbuhan
- Akuades
- Alkohol
- aluminium foil
- microtube steril
- es batu

Alat :

- Mortar
- Mikropipet
- Sentrifuse
- Inkubator/oven
- Vortex
- Water bath

Prosedur Kerja

Isolasi DNA tumbuhan

- Sebelum Memulai Praktikum, pastikan untuk menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- Panaskan waterbath disuhu 65°C
- Timbang sebanyak 100 mg sampel daun yang sudah dibersihkan dari debris , kemudian lakukan penghancuran sampel dengan menggunakan mortal.
- Tambahkan 400 µl Buffer AP1 dan 4 µl Rnase A, vortex dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 65°C.
- Tambahkan buffer P3 sebanyak 130 µl, campurkan dan inkubasi pada selama 5 menit pada es.

- Sentrifugasi lisat dengan kecepatan 20.000 x g atau 14.000rpm.
- Ambil lisat dan pindahkan pada Qiashredder spin column dan sentrifus dengan kecepatan 20.000 x g selama 2 menit.
- Pindahkan sampel yang ada pada collection tube ke microtube steril, kemudian tambahkan 1.5 kali volume Buffer AW1. Dan campurkan dengan pippeting
- Pindahkan sebanyak 650 µl campuran tersebut ke Spin column dan sentrifus 1 menit dengan kecepatan 6000 x g (8000 rpm)
- Buang cairan yang terdapat pada microtube
- Tambahkan 500 µl Buffer AW2 dan sentrifus kembali, ulangi langkah ini 1 kali.
- Pindahkan spin column ke microtube baru, kemudian tambahkan 100 µl Buffer AE untuk elusi. Inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang dan sentrifus kembali selama 1 menit. Ulangi langkah ini.
- Hasil elusi berupa DNA murni dan dapat disimpan untuk langkah selanjutnya

Isolasi DNA Darah Hewan

- Siapkan mikrotube, kemudian masukkan 20 µl Proteinasi K dan tambahkan 100 µl darah hewan.
- Tambahkan PBS sampai pada volume 220 µl.
- Tambahkan Buffer AL 200 µl , vortex dan inkubasi disuhu 56°C selama 10 menit.
- Tambahkan 200 µl ethanol p.a 96% dan vorteks
- Pindahkan campuran tersebut ke Dneasy Mini Spin Coloum, sentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit.

- Buang cairan yang ada pada collection tube, pasang kembali spin column.
- Tambahkan 500 µl Buffer AW1, dan sentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit, buang cairan pada collection tube.
- Tambahkan 500 µl Buffer AW2, sentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit, buang cairannya
- Ulangi langkah ini jika diperlukan
- Elusi : Pindahkan spin column ke mikrotube baru, tambahkan 100 µl AE Buffer pada spin column kemudian inkubasi selama 1 menit pada suhu ruang, kemudian sentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit.
- Hasil elusi dapat disimpan pada suhu -4°C

Isolasi DNA Folikel Rambut Manusia

- Masukkan 100 µl Larutan Isolasi DNA pada mikrotube.
- Pilihlah 5 helai rambut, kemudian potong bagian yang mendekati folikel rambut masing-masing 1.5cm pada bagian pangkal tengah dan ujung rambut.
- Masukkan pada tabung yang berisi larutan isolasi, inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- Setelah itu tabung mikrotube diinkubasi dengan suhu 92°C selama 10 menit.
- Sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.
- Supernatan dipindahkan ke dalam mikrotube baru dan dapat disimpan pada suhu -4°C.

Soal Pembahasan :

1. Jelaskan teknik lisis sel yang dilakukan pada praktikum yang kalian lakukan?
2. Jelaskan fungsi dari setiap Buffer yang telah kalian gunakan pada kit isolasi DNA!
3. Jelaskan perbedaan serta pro-con antara Isolasi DNA menggunakan kit Isolasi komersial dan menggunakan teknik isolasi DNA sederhana?
4. Berikan contoh tahapan dalam melakukan Isolasi DNA tanpa menggunakan KIT Isolasi DNA Komersial.

Topik IV, V

Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA

Pendahuluan

Asam deoksiribonukleat atau lebih dikenal sebagai DNA adalah sejenis asam nukleat, yang merupakan molekul biologis utama yang menyusun setiap organisme. Di dalam sel, DNA biasanya terletak di dalam inti sel. Tetapi mitokondria juga mengandung DNA, sehingga disebut DNA mitokondria. Secara garis besar, peran DNA dalam sel adalah sebagai materi genetik. Dengan kata lain, DNA menyimpan cetak biru semua aktivitas sel. Ini umumnya berlaku untuk setiap organisme. Keberadaan DNA pada organisme dapat ditentukan dengan dua cara, yaitu secara kualitatif dengan elektroforesis gel agarosa dan secara kuantitatif dengan spektrofotometri. Analisis dan kuantifikasi DNA telah menjadi proses umum di laboratorium sehari-hari sebagai titik awal dari berbagai prosedur yang dilakukan di laboratorium biologi molekuler.

Salah satu metode yang paling umum digunakan untuk memperkirakan konsentrasi asam nukleat adalah pengukuran serapan sampel pada 260 nm. Rasio serapan 260/280, 260/230, dan 260/325 digunakan untuk menentukan kemurnian DNA dan keberadaan kontaminan dalam sampel biologis selama proses ekstraksi DNA. DNA yang mengandung basa-basa purin dan pirimidin dapat menyerap cahaya UV pada spektrofotometer. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV dengan panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau phenol dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm. Sehingga dengan adanya perbedaan penyerapan cahaya UV ini kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai

absorbansi 280. DNA berkualitas baik memiliki kemurnian antara 1,8 – 2,0 dan konsentrasi diatas 100 ng/μl berdasarkan pengukuran dengan spektrofotometer.

Selain pengujian secara kuantitatif, DNA dapat divisualisasikan keberadaannya dengan pengujian kualitatif. Metode standart yang digunakan untuk identifikasi, pemisahan, dan purifikasi fragmen DNA aalah menggunakan elektroforesis gel agarosa. Migrasi elektroforesis DNA melalui gel agarosa, arus listrik dan suhu. Molekul DNA yang bermuatan negatif saat elektroforesis pada gel agarosa berbanding terbalik dengan konsentrasi gelnya. Migrasi struktur molekul yang besar aka lebih lambat dibandingkan struktur molekul yang lebih kecil falam proses melewati pori-pori gel. Larutan DNA yang bermuatan negatif dimasukkan kedalam sumur-sumur pada gel agarosa dan diletakkan pada kutub negatif. Apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan buffer yang sesuai maka DNA akan bergerak menuju kutub positif. Setelah proses tersebut selesai, pita DNA dapat divisualisasikan dengan menggunakan sinar UV (UV-Box) ataupun Gel documentation.

Untai pita DNA dapat berpendar pada gel yang telah di warnai dengan gel stain yang mengandung ethidium bromida yag dapat berpendar saat terkena lampu UV. Larutan ethidium bromida ini digunakan sebagai alat untuk mengidentifikasi dan mengukur semi-kualitato fragmen DNA yang terseparasi dalam gel. Selain itu larutan EtBr akan terikat diantara dua untai ganda pita DNA dan berinteraksi diantara basa molekul DNA sehingga menyebabkan pita DNA dalam Gel agarosa akan berpendar kuning jingga bila disinari ultraviolet

pada panjang gelombang yang pendek karena pewarna ini mengandung zat fluorescence.

Kompetensi dasar

Mahasiswa mampu melakukan pengujian kualitas dan kuantitas DNA sebelum melakukan penelitian lebih lanjut.

Alat dan Bahan

Bahan :

- Agarosa
- Bubuk Agar-agar plain (tidak berwarna)
- TBE 1x
- Loading dye
- Gel stain
- Sampel DNA
- Marker DNA
- Aquadest

Alat :

- Spektrofotometer
- Set Micropipet
- Elektroforesis
- Gel Doc
- Hotplate
- Erlenmeyer

Uji Kuantitatif DNA

- Setiap Sampel DNA yang akan diuji kualitas serta kuantitas nya dengan menggunakan spektrofotometer nanodrops.

- Hidupkan spektrofotometer, pilihlah program “nucleic acid”
- Tunggu program berjalan, dan ikuti instruksinya.
- Siapkan blanko serta sampel DNA.
- Nilai kemurnian DNA dihitung dengan cara nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm.

Uji Kualitatif DNA

- Buatlah gel agarosa dengan konsentrasi 1% dengan cara menimbang 0.4 gram agarosa.
- Tambahkan 40 ml TAE 1x atau TBE 1x ke dalam erlenmeyer ukuran 200 µl yang didalamnya telah berisi Agarosa 0.4 gram.
- Panaskan larutan tersebut dengan menggunakan Hotplat hingga larut sempurna.
- Gel yang sudah larut kemudian didinginkan sebentar dan ditambahkan gel stain yang berisi ethidium bromida
- Gel dituangkan dalam chamber yang telah dipasang sisir pada alat elektroforesis.
- Biarkan gel memadat dan siap digunakan untuk running di elektroforesis.
- Masukkan sampel DNA sebanyak 2 µl yang telah dicampur dengan loading dye sebanyak 1 µl kedalam masing-masing sumuran.
- Hidupkan power supply dan atur pada tegangan 85 volt selaman 30 menit.
- Angkat gel yang sudah dirunning dan diamkan pada larutan aquadest selama 3 menit.
- Visualisasi menggunakan Gel-doc.

Hasil Pengamatan :

Uji Kuantitatif DNA	Rasio Kemurnian 260/280	Konsentrasi DNA (ng/ μ l)	keterangan
Sampel			

Soal Pembahasan

1. Apa saja hal yang mempengaruhi kemurnian hasil isolasi DNA?
2. Bagaimana mengantisipasi untuk mendapatkan hasil isolasi DNA yang murni?
3. Bagaimana jika hasil Isolasi DNA dengan tingkat kemurnian yang tidak baik digunakan untuk uji selanjutnya?
4. Hasil uji kualitatif tidak menunjukkan adanya pita DNA, apa yang kemungkinan terjadi?

Topik VI Amplifikasi DNA

Pendahuluan

Amplifikasi DNA adalah teknik terkini yang memiliki dampak besar pada penelitian ilmiah dalam 2 dekade terakhir. Salah satu teknik amplifikasi DNA yang cukup sering digunakan adalah PCR (Polymerase chain reaction) yaitu suatu proses sintesis enzimatis untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro*. Teknik PCR dapat meningkatkan jumlah untai DNA hingga ribuan jutaan kali dari jumlah semula. Setiap urutan nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap „n” siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target.

Penggunaan PCR telah berkembang secara tepat seiring dengan perkembangan biologi molekuler. PCR digunakan untuk mengidentifikasi penyakit genetik, infeksi oleh virus, diagnosis dini penyakit seperti AIDS, Genetic profiling in forensic, legal and Biodiversity application, biologi evolusi, site-directed mutagenesis of genes dan mRNA Quantification di sel maupun jaringan.

Teknik Dasar Amplifikasi PCR

Penemuan awal dari teknik PCR didasarkan pada tiga *waterbaths* yang mempunyai temperatur yang berbeda. *Thermal-cycler* pertama kali dipublikasikan pada tahun 1986, akan tetapi *DNA polymerase* awal yang digunakan masih belum *thermostable*, dan harus ditambahkan di setiap siklusnya. Kelemahan lain temperature 37°C yang digunakan bias dan menyebabkan *non-specific priming*, sehingga menghasilkan produk yang tidak dikehendaki. *Taq DNA polymerase* yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* (*Taq*) dikembangkan pada tahun 1988. Enzim ini tahan sampai temperature mendidih 100°C , dan aktifitas maksimal pada temperatur $92-95^{\circ}\text{C}$.

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang meliputi denaturasi, annealing dan ekstensi oleh enzim *DNA polimerase*. Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk

membuat hibrid dengan ujung-5' menuju ujung-3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan. Dasar siklus PCR ada 30-35 siklus meliputi:

- 1) Predenaturation DNA template (94-95°C)
- 2) Denaturation (95°C), 30 detik
- 3) Annealing, penempelan primer pada templat (48-60°C), 30 detik
- 4) extension (72°C), waktu tergantung panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi.
- 5) Final extension, (72°C),

Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi amplifikasi jumlah DNA. Peningkatan jumlah siklus PCR diatas 35 siklus tidak memberikan efek yang positif.

Denaturasi untai ganda DNA merupakan langkah yang kritis selama proses PCR. Temperatur yang tinggi pada awal proses menyebabkan pemisahan untai ganda DNA. Temperatur pada tahap denaturasi pada kisaran 92-95°C, suhu 94°C merupakan pilihan standar. Temperatur denaturasi yang tinggi membutuhkan kandungan GC yang tinggi dari DNA template, tetapi half-life dari Taq DNA Polymerase menekan secara tajam pada temperatur sekitar 95°C.

Primer Annealing, pengenalan (annealing) suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi primer itu sendiri. Optimalisasi temperatur annealing dimulai dengan menghitung Melting Temperature (T_m) dari ikatan primer dan DNA template. Cara termudah menghitung untuk mendapatkan melting-temperatur yang tepat menggunakan rumus

$$T_m = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}.$$

Rumus standar dapat dilihat di subbab primer pada komponen PCR. Sedang temperatur annealing biasanya 5°C dibawah T_m primer yang sebenarnya. Secara praktis, T_m ini dipengaruhi oleh komponen buffer, konsentrasi primer dan DNA template.

Extension ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5" menuju ujung 3" dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Pada setiap satu kilobase (1000bp) yang akan diamplifikasi memerlukan waktu 1 menit. Sedang bila kurang dari 500bp hanya 30 detik dan pada kisaran 500 tapi kurang dari 1kb perlu waktu 45 detik, namun apabila lebih dari 1kb akan memerlukan waktu 2 menit di setiap siklusnya. Adapun temperatur ekstensi berkisar antara 70-72°C.

Komponen PCR

Pada reaksi PCR diperlukan DNA template, primer spesifik, enzim DNA polimerase yang thermostabil, buffer PCR, ion Mg 2+, dan thermal cycler.

1. Template DNA

Ukuran target amplifikasi biasanya kurang dari 1000 pasangan basa (bp) atau 1KB, Hasil amplifikasi yang efisien antara 100-400bp. Walaupun kemungkinan hasil amplifikasi lebih dari 1 kB tetapi prosesnya kurang efisien, karena produk yang panjang rentan terhadap inhibitor yang mempengaruhi kerja enzim DNA polymerase dan waktu yang diperlukan lebih lama. Hal ini dapat menyebabkan hasil amplifikasi yang tidak diinginkan.

2. Primers

Primer disusun dari sintesis oligonukleotida sepanjang 15-32bp dan primer ini harus mampu mengenali urutan yang akan diamplifikasi. Untuk standar amplifikasi sepasang primer akan mempunyai kisaran pasangan basa sekitar 20 basa panjangnya pada tiap primernya. Kandungan GC harus antara 45-60%. Annealing temperatur antara primer yang digunakan harus berkisar antara 1°C. Ujung 3" dari setiap primer harus G atau C, akan tetapi hindari susunan nukleotida G/C berturut-turut tiga pada ujung ini, misal CCG, GCG, GGC, GGG, CCC, GCC. Pada penentuan atau penyusunan sepasang primer,

penting diperhatikan urutan primer tidak saling komplementer sehingga membentuk dimer-primers, berikatan satu sama lain, atau membentuk hairpins. Hal lainnya hindari menyusun primer pada daerah DNA repetitif.

3. Taq DNA polymerase

Enzim ini bersifat thermostabil dan diisolasi dari *Thermus aquaticus*. Aktivitas polimerisasi DNANYa dari ujung-5' ke ujung-3' dan aktivitas enzimatik ini mempunyai waktu paruh sekitar 40 menit pada 95°C. Biasanya untuk setiap 100µl volume reaksi ditambahkan 2.0-2.5 unit.

4. PCR buffer dan konsentrasi Mg²⁺

Buffer standar untuk PCR tersusun atas 50mM KCl, 10mM Tris-Cl (pH8.3) dan 1.5mM MgCl₂. Buffer standard ini akan bekerja dengan baik untuk DNA template dan primer dengan kondisi tertentu, tetapi mungkin tidak optimum dengan kombinasi yang lain. Produk PCR buffer ini terkadang dijual dalam bentuk tanpa atau dengan MgCl₂. Konsentrasi ion magnesium dalam PCR buffer merupakan faktor yang sangat kritikal, karena kemungkinan dapat mempengaruhi proses annealing primer, temperatur dissosiasi untai DNA template, dan produk PCR.

5. Nucleotides (dNTPs)

Konsentrasi yang biasanya digunakan untuk setiap dNTP adalah 200 µM. Pada konsentrasi ini penting untuk mengatur konsentrasi keempat dNTP pada titik estimasi K_m untuk setiap dNTP. 50mM, harus selalu diatur pH7.0. Konsentrasi yang tinggi akan menimbulkan ketidakseimbangan dengan enzim polymerase. Sedang pada konsentrasi rendah akan memberikan ketepatan dan spesifitas yang tinggi tanpa mereduksi hasil akhir. Total konsentrasi dNTP dan ion saling terkait dan tidak akan merubah secara bebas.

Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu melakukan preparasi sampel PCR dengan akurasi yang baik.

Alat dan Bahan

Bahan :

- Sampel DNA
- PCR kit (Abclonal Poerpol 2x PCR mix)
- Aquabidest
- Primer
- Es batu

Alat :

- Mesin Thermocycler
- Mikropipet (1-10 uL, 2-20 uL, 20-100uL, 100-1000uL)
- Tip (white, yellow, blue)
- tabung mikrosentrifuga ukuran 0,2 mL dan 1,5 mL
- Baskom
- Handscoon
- Kamera D. PROSED

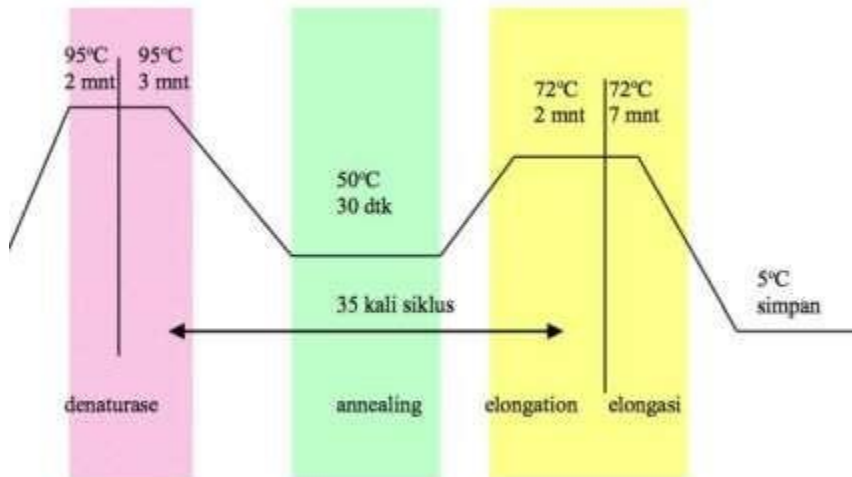
Prosedur Kerja

- Persiapkan semua alat dan bahan praktikum diatas meja kerja, pastikan menyediakan working space dengan suhu dingin (menggunakan es batu)
- Sterilkan meja kerja dengan menyemprotkan alkohol diseluruh permukaan meja kerja.
- Master mix yang akan dibuat dengan ketentuan seperti dibawah dibuat untuk 4 kali reaksi (4 sampel DNA) sehingga rumus yang ada dikalikan 4.
- Mulailah membuat master mix dengan ketentuan sebagai berikut :

Master mix PCR :

No	Bahan	1 sampel (25 μ l)
1	Powerpol 2x PCR Mix	12.5 μ l
2	Forward Primer	1.25 μ l
3	Reverse Primer	1.25 μ l
4	Nuclease-free water	4.5 μ l
5	DNA Template	5 μl

- DNA template ditambahkan paling akhir untuk mencegah master mix bereaksi jika terkena suhu yang lebih hangat.
- Setelah master mix selesai dibuat, tutup rapat dan masukkan ke mesin thermalcycler.
- Atur suhu, waktu, dan siklus pada mesin yang terprogram



-Tunggu hingga siklus berakhir, kemudian sampel hasil amplifikasi dapat disimpan pada suhu -4°C , atau langsung digunakan untuk analisis selanjutnya.

Soal Pembahasan :

1. Apa yang terjadi jika siklus PCR yang digunakan terlalu sedikit ataupun terlalu banyak?
2. Bagaimana mengantisipasi hasil amplifikasi yang tidak terjadi?
3. Bagaimana menentukan suhu annealing yang tepat?
4. Jelaskan teknik-teknik analisis lanjutan yang dapat dilakukan dari hasil amplifikasi DNA?

Daftar Pustaka

Yuwono, T., 2017, *Biologi Molekuler*, UGM Press, Yogyakarta.