

**BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM  
BIOTEKNOLOGI**

**Penyusun:  
Kholifah Holil, M.Si.**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2014**

## **KATA PENGANTAR**

Segala puji syukur ke hadirat Allah SWT atas kesempatan yang diberikan untuk selesainya penyusunan buku petunjuk praktikum bioteknologi ini. Buku petunjuk ini disusun berdasarkan kebutuhan mahasiswa biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang khususnya untuk para mahasiswa yang menempuh mata kuliah bioteknologi.

Buku petunjuk ini terdiri dari beberapa bagian tetapi secara garis besar buku petunjuk praktikum ini berisi dasar-dasar praktikum yang dilakukan dalam bioteknologi baik bioteknologi konvensional maupun bioteknologi modern. Sebagai dasar praktikum maka diharapkan buku petunjuk ini memberikan ketrampilan dasar bagi para mahasiswa khususnya mahasiswa yang menempuh mata kuliah bioteknologi dan umumnya bagi mahasiswa biologi atau mahasiswa yang serumpun.

Pada akhirnya tak ada gading yang retak. Saran dan kritik untuk pengembangan lebih lanjut guna penyempurnaan buku petunjuk ini benar-benar sangat diharapkan dan semoga bermanfaat.

Malang, September 2014

Penyusun

## TOPIK I

### PEMANFAATAN ACETOBACTER XYLINUM PADA PEMBUATAN NATA DE COCO

#### A. Pendahuluan

Bioteknologi sudah dikenal sejak jaman dahulu. Pada tahun 6000SM orang-orang jaman dahulu sudah pandai membuat anggur, roti, dan lain-lain. Ciri khas dalam bioteknologi adalah adanya agensia jasad hidup yang digunakan dengan memanfaatkan konsep-konsep dalam biologi dan ilmu pendukung lainnya (kimia) untuk kemudian menghasilkan suatu produk.

Salah satu agensia jasad hidup yang dimanfaatkan dalam bioteknologi adalah *Acetobacter xylinum* yang dimanfaatkan untuk pembuatan nata. *Acetobacter xylinum* ini adalah salah satu bakteri yang mempunyai kemampuan untuk mengambil glukosa dari larutan gula untuk kemudian digabungkan dengan asam lemak untuk membentuk precursor (penciri nata) pada membrane sel. Prekursor ini selanjutnya dikeluarkan dan bersama enzim mempolimerasi glukosa menjadi selulosa.

#### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui manfaat *Acetobacter xylinum* dalam pembuatan nata de coco.
2. Untuk memahami prinsip kerja dari *Acetobacter xylinum* dalam pembuatan nata de coco.
3. Untuk memahami perbedaan antara bioteknologi konvensional dan bioteknologi modern.

#### C. Alat dan Bahan

Timbangan Analitik	Kompur
Panci	Pengaduk
Gelas Ukur	Saringan Kain
Bak Plastik/Beaker Glass/Toples Bening	Karet Gelang
Koran	100 ml air kelapa
0,5 gr $K_2HPO_4$	0,06 gr $(NH_4)_2SO_4$
0,02 gr $MgSO_4$	10 gr gula pasir
0,25gr Ekstrak Khamir/Yeast/Pepton	Starter
Asam Asetat Glasial (sampai pH 3-5)	

#### D. Cara Kerja

- 1) Sterilkan alat-alat yang akan digunakan.
- 2) Saring air kelapa dengan menggunakan saringan kain.
- 3) Rebus air kelapa dan tambahkan gula pasir.
- 4) Biarkan mendidih (kurang lebih 15 menit).

- 5) Kecilkan api dan tambahkan 0,5 gr  $K_2HPO_4$ , 0,06 gr  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,02 gr  $MgSO_4$  dan 0,25 gr Ekstrak Khamir/Yeast/Pepton serta asam asetat glacial (sampai pH 3-5).
- 6) Jika bahan-bahan yang ditambahkan sudah hancur matikan kompor.
- 7) Saring dengan menggunakan saringan kain yang steril dan tempatkan dalam bak plastic biakan, biarkan dingin.
- 8) Jika sudah dingin tambahkan starter dan tutup biakan dengan menggunakan koran steril. Tempatkan biakan di tempat yang jauh dari guncangan.
- 9) Fermentasi biakan selama 15 hari.
- 10) Pada saat dipanen, rendam nata yang sudah terbentuk selama 3 hari (untuk menghilangkan rasa masam).
- 11) Potong nata sesuai selera dan rebus dengan menggunakan air gula. Nata siap untuk dikonsumsi.

#### E. Pertanyaan

1. Sebutkan peran *Acetobacter xylinum* dalam pembuatan nata de coco
2. Jelaskan fungsi masing-masing bahan yang saudara gunakan pada praktikum di atas.

## TOPIK II

### PEMANFAATAN MIKROBA SEBAGAI DEKOMPOSER DALAM PEMBUATAN PUPUK ORGANIK

#### A. Pendahuluan

Meningkatnya jumlah penduduk yang diiringi dengan adanya peningkatan kebutuhan hidup memungkinkan juga terjadinya peningkatan akan hasil samping karena aktivitas tersebut. Sampah adalah salah satu limbah padat yang dihasilkan dari proses aktivitas yang dilakukan oleh manusia, hewan, maupun makhluk hidup yang lain yang dapat berupa zat organik dan zat anorganik yang jika tidak dikelola akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan. Sampah yang beredar di lingkungan bisa berupa sampah sisa sayuran, makanan, kotoran, kaleng, kertas, dan lain-lain. Dari beberapa sampah tersebut ada yang cepat terurai dan ada juga yang susah terurai.

Untuk mengatasi permasalahan sampah maka perlu dikelola untuk dimanfaatkan menjadi pupuk organik dengan bantuan mikroba saprofit. Dalam hal ini mikroba akan menguraikan protein, karbohidrat dan lain-lain yang mungkin masih tersisa di dalam sampah yang diuraikan dan masih bias dimanfaatkan. Hasil proses penguraian tersebut dapat berupa gas amoniak, methane dan lain-lain yang untuk selanjutnya dapat dijadikan pupuk untuk tanaman.

Ada beberapa factor yang perlu diperhatikan dalam memanfaatkan mikroba sebagai decomposer diantaranya adalah kadar air bahan, bentuk dan jenis bahan, temperatur, pH, dan jenis mikroba yang berperan didalamnya. Selama proses penguraian tersebut maka perubahan pH dan temperatur merupakan indicator yang paling mudah untuk diamati. Kedua parameter tersebut menggambarkan proses dekomposisi sampah oleh mikroba. Pada permulaan penguraian sampah maka bahan akan berada pada kisaran pH optimal 6,0 – 8,0 dan akan menurun sampai asam. Jika pH terlalu tinggi dapat diturunkan dengan menambahkan kotoran hewan, urea, atau pupuk nitrogen dan jika derajat keasaman terlalu rendah bisa ditingkatkan dengan menambahkan kapur dan abu dapur kedalam bahan kompos. Proses penurunan ataupun peningkatan tersebut karena aktivitas sejumlah mikroorganisme yang terlibat dalam penguraian sampah dimana bahan organik dirubah menjadi asam organik. Sedangkan temperatur optimum yang dibutuhkan mikroorganisme untuk merombak bahan tersebut adalah 35 – 55°C.

Secara umum ada 5 macam bakteri yang dimanfaatkan sebagai decomposer seperti Bakteri fotosintetik, *Lactobacillus sp*, *Streptomyces sp*, *Ragi (yeast)*, *Actinomycetes*. Beberapa bakteri tersebut banyak beredar di pasaran dalam bentuk campuran berbagai bakteri atau dalam bentuk isolat murni. Bakteri-bakteri tersebut akan membantu proses penguraian sampah dalam proses fermentasi dan ketika diaplikasikan pada tanaman akan membantu meningkatkan kesuburan tanaman.

## **B. Tujuan**

1. Untuk mengetahui manfaat mikroba sebagai dekomposer dalam pembuatan pupuk organik
2. Untuk memahami prinsip kerja mikroba sebagai dekomposer dalam pembuatan pupuk organik

## **C. Alat dan Bahan**

Jerami (potong kecil-kecil)  
Kotoran ternak (2000gr)/Sisa Sayuran atau makanan  
CaCO<sub>3</sub> (secukupnya)  
Bekatul (secukupnya)  
Arang sekam (secukupnya)  
Air (secukupnya/20ml)  
EM4 (5ml)  
Gula pasir (5mg)  
Kompos jadi  
Timbangan  
Karung  
Sarung tangan  
Cangkul Sekop  
Termohigrometer  
Kardus bekas

## **D. Cara Kerja**

### **Cara 1 (menggunakan karung)**

1. Larutkan EM4 dan gula di dalam air.
2. Lapisan pertama: campurkan kotoran ternak/sisa sayuran dengan arang sekam. Tambahkan dengan larutan EM4 dan gula yang sudah dicampur air. Campur kembali sampai rata (jaga jangan terlalu basah amupun terlalu kering).
3. Lapisan kedua: campurkan bekatul dan jerami. Tambahkan dengan larutan EM4 dan gula yang sudah dicampur air. Campur kembali sampai rata (jaga jangan terlalu basah amupun terlalu kering).
4. Masukkan lapisan pertama dan kedua ke dalam karung. Tutup rapat.
5. Pada hari kedua campurkan 2 lapisan tadi dan tutup kembali.
6. Monitor perubahan (suhu, kelembaban, pH serta perubahan fisik).
7. Hentikan proses pembuatan pupuk organik tersebut pada saat campuran sudah tidak terlalu panas (biasanya adalah 4 hari). Deteksi hal tersebut dengan cara memasukkan tangan/jari ke dalam campuran. Jika masih terlalu panas maka proses dekomposisi belum selesai.
8. Catat perubahan yang terjadi.
9. Jika pupuk sudah didapatkan aplikasikan untuk digunakan dalam menanam sayuran atau yang lain. Bedakan bagaimana hasil yang didapatkan.

## Cara 2 (menggunakan keranjang takakura)

1. Pahami keranjang takakura yang akan digunakan.



2. Siapkan keranjang plastic berpori, lapiasi bagian dalam dengan kardus bekas, bagian bawah disangga dengan batu bata (biar terjadi sirkulasi). Semprot bagian dalam dan luar kardus dengan starter cair (EM4).
3. Siapkan 2 bantal arang sekam dengan cara memasukkan sekam ke dalam kantong kain yang berpori. Semprot bagian dalam dan luar kardus dengan starter cair (EM4).
4. Siapkan kompos jadi yang mau dijadikan starter (kira-kira ketebalan 5cm).
5. Campurkan sampah dan bahan-bahan lain yang digunakan.
6. Susun yang sudah disiapkan di atas sesuai dengan gambar.
7. Monitor perubahan yang terjadi (suhu, kelembaban, pH serta perubahan fisik) dan hentikan proses pembuatan pupuk sama halnya dengan yang dilakukan pada pembuata cara pertama.
8. Hentikan proses pembuatan pupuk organic tersebut pada saat campuran sudah tidak terlalu panas (biasanya adalah 4 hari). Deteksi hal tersebut dengan cara memasukkan tangan/jari ke dalam campuran. Jika masih terlalu panas maka proses dekomposisi belum selesai.
9. Catat perubahan yang terjadi.
10. Jika pupuk sudah didapatkan aplikasikan untuk digunakan dalam menanam sayuran atau yang lain. Bedakan bagaimana hasil yang didapatkan.

**E. Data Pengamatan**

No	Jenis Sampah	Perubahan pH			Perubahan suhu			Perubahan Kelembaban			Perubahan fisik
		yang terjadi pada hari ke									
		0	2	4	0	2	4	0	2	4	
1	Kontrol (tanpa mikroba)										
2	Perlakuan (mikroba)										

**F. Bahan Diskusi**

1. Jelaskan peran masing-masing bahan yang digunakan.
2. Berdasarkan data yang sudah saudara dapatkan apakah ada perbedaan pada masing-masing perlakuan. Mengapa demikian?
3. Jelaskan apa peran detail dari mikroba yang saudara gunakan?



## TOPIK III PREPARASI KULTUR SEL TANAMAN

### A. Pendahuluan

Organisme multiseluler mempunyai kemampuan totipotensi yaitu kemampuan sel untuk memperbanyak diri dan membentuk organisme lengkap. Kondisi ini akan terjadi jika sel tersebut ditumbuhkan pada lingkungan yang sama kondisinya dengan lingkungan aslinya. Dengan konsep ini maka membuka pemikiran kita bahwa jika kita menggunakan sedikit dari bagian tanaman dan jika kemudian bahan tersebut ditumbuhkan pada media yang sesuai maka akan terbentuk organisme tanaman yang lengkap. Teknik yang digunakan untuk menghasilkan tanaman baru seperti tersebut di atas adalah teknik kultur jaringan. Dengan teknik ini akan didapatkan tanaman dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang singkat.

Namun demikian, dalam teknik kultur jaringan dibutuhkan beberapa faktor untuk bisa menghasilkan tanaman seperti yang diharapkan. Salah satu faktor yang menunjang keberhasilan dalam teknik kultur jaringan adalah tahap preparasi yang terdiri dari persiapan alat dan bahan yang akan digunakan serta pada pembuatan media. Media kultur jaringan terdiri dari campuran garam-garam anorganik/garam mineral, gula, vitamin, asam amino, zat pengatur tumbuh, air serta bahan pematid. Untuk tujuan tertentu seringkali ditambahkan arang aktif.

Senyawa kimia yang terkandung dalam media kultur *in vitro* (unsur hara makro dan mikro) perlu disusun dalam komposisi tertentu (berimbang), karena perimbangan yang tepat akan sangat menentukan tipe pertumbuhan yang akan terbentuk dari eksplan yang akan ditanam. Dalam media kultur sumber karbon yang berupa gula merupakan komponen yang selalu ada sebagai sumber energi, kecuali dalam media untuk tujuan yang sangat spesifik.

### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui alat, bahan, dan media apa yang perlu dipersiapkan dalam teknik kultur jaringan tanaman.
2. Untuk mengetahui teknik dan perhitungan dalam pembuatan media dalam teknik kultur jaringan tanaman.

### C. Alat dan Bahan

Timbangan Analitik	Kompur Gas Lengkap
Autoklaf	pH meter
Hot Plate dan Magnetic stirrer	Bunsen
Pipet Tetes	Erlenmeyer
Beaker Glass	Gelas Ukur
Mikropipet dan Tip Berbagai Ukuran	Spatula
Pinset	Gunting
Pisau	Scalpel

Aluminium Foil	Tissue
Kapas	Kertas Label
Selotip	Alat Tulis
Botol Kultur	Plastik
Karet Gelang	Korek Api
Spiritus	Alkohol 70%
Garam mineral	Vitamin
Zat Pengatur Tumbuh	Sukrosa
Aquades Steril	Bacto Agar

## D. Cara Kerja

### 1. Sterilisasi Alat

- Rendam alat-alat yang akan digunakan dengan menggunakan air yang ditambah dengan larutan teepol. Biarkan selama 24 jam.
- Sikat dan bilas alat-alat tersebut di bawah air mengalir lakukan sebanyak 20x.
- Bilas dengan aquades dan Deionized Water (DI).
- Keringkan alat-alat tersebut dalam oven.
- Jika sudah kering bungkus dengan aluminium foil dan sterilisasi dalam oven pada suhu 125°C selama 3 jam.

### 2. Pembuatan Larutan Stock Media

Larutan stock yang akan dipersiapkan diklasifikasikan atas stok hara makro, stok hara mikro, stok vitamin dan stok zat pengatur tumbuh. Cara pembuatan larutan stok: misalkan kita ingin membuat stok A maka dalam 1 liter media MS terdapat 1650 mg  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Untuk memudahkan pembuatan media, konsentrasi dinaikkan 50 kali sehingga dalam 1 liter larutan stock terdapat  $1650 \text{ mg} \times 50 = 82.500 \text{ mg} = 82,50 \text{ gr } \text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Untuk mengetahui banyaknya volume yang harus diambil, dipergunakan rumus pengenceran yaitu:

$$V1.M1 = V2.M2$$

Keterangan:

V1: Volume awal , M1: Konsentrasi awal, V2: Volume akhir (stock yang harus diambil), M2: Konsentrasi larutan stock

Contoh:

Berapakah volume larutan stock yang harus diambil (V2) jika dalam 1 liter media MS (V1) terdapat 1650 mg  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (M1) dan untuk membuat larutan stock konsentrasi dinaikkan sebesar 50 kali?

Jawab:  $V1.M1 = V2.M2$

$$1000 \text{ ml} \times 1650 \text{ mg} = V2 \times (1650 \times 50) \text{ mg}$$

$$1000 \text{ ml} \times 1650 \text{ mg} = V2 \times 82500 \text{ mg}$$

$$V2 = 1.650.000 : 82.500$$

$$V2 = 20 \text{ ml}$$

Catatan:

- Stok hara makro dibuat 50 kali konsentrasi.
- Stok hara mikro, Fe-EDTA, dan vitamin dibuat 100 kali konsentrasi.
- Stok ZPT masing-masing dibuat sebanyak 100 ml dengan konsentrasi 1 ppm.

Konsentrasi ZPT:

Penulisan konsentrasi ZPT umumnya dalam bentuk ppm (mg/liter) atau dalam bentuk mikromol (uM;  $10^{-6}$ M).

Konsentrasi ppm ke uM:

$$\text{uM} = 1000 \times \text{ppm} : \text{BM}$$

Konversi uM ke ppm

$$\text{ppm} = \text{BM} \times \text{uM} : 1000$$

Catatan:

BM IAA = 175,19

BM IBA = 203,24

Contoh:

Konversi ppm IAA ke uM

$$0,5 \text{ ppm IAA} = 1000 \times 0,5 : 175,19 = 2,85 \text{ uM IAA}$$

Tabel 1: Komponen –Komponen Dalam Media Tumbuh

Hara	Stok	Senyawa	Mg/l Media
Makro	A	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
	B	$\text{KNO}_3$	1900
	C	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	D	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
		$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
Mikro	E	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
		$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37,3
	F	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	27,3
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
		$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
		KI	0,83
		$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,03
		$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03
		Vitamin	G
Niacin	0,5		
Pyridoxine-HCl	0,5		
Thiamin-HCl	0,1		
Glycine	2,0		
Sumber		Sukrosa	30.000

Karbon			
Bahan Pemas		Bacto Agar	8.000
Zat Pengatur Tumbuh		Auksin	Sesuai Kebutuhan
		Sitokinin	Sesuai Kebutuhan

### 3. Pembuatan Media

- a. Timbang sukrosa sesuai kebutuhan, larutkan dalam aquades (dalam beaker glass 1 liter).
- b. Masukkan bahan-bahan mulai stok A sampai stok G (sesuai table 1) ke dalam beaker glass 1 liter.
- c. Tambahkan ZPT sesuai kebutuhan.
- d. Tambahkan aquades steril sampai volume yang diinginkan. Lakukan pengaturan pH yaitu antara 5,6-5,8. Bila terlalu asam naikan dengan cara menambahkan NaOH dan bila terlalu basa turunkan dengan cara menambahkan HCl sampai tercapai pH yang diinginkan.
- e. Pindahkan media dalam wadah dengan volume 2 liter, tambahkan bacto agar (untuk pembuatan media padat) sesuai kebutuhan.
- f. Panaskan media sampai agar benar-benar larut.
- g. Masukkan media kultur ke dalam botol kultur (volume media per botol tergantung jenis bahan tanam).
- h. Tutup botol kultur dengan aluminium foil/penutup botol, dan berilah label.
- i. Sterilisasi media dalam autoklaf pada suhu 121°C, 1 Atm (selama 15 menit)
- j. Keluarkan media dari autoklaf, simpan media di ruang kultur dan media siap untuk digunakan.

## TOPIK IV KULTUR KALUS

### A. Pendahuluan

Kultur kalus bertujuan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali. Kalus diharapkan memperbanyak dirinya (massa selnya) secara terus menerus. Sel-sel penyusun kalus adalah sel-sel parenkim yang mempunyai ikatan yang renggang dengan sel-sel lain. Dalam kultur in vitro, kalus dapat dihasilkan dari potongan organ yang steril, di dalam media yang mengandung auksin dan kadang-kadang juga sitokinin.

Kultur kalus memiliki potensial morfogenetik yang bervariasi. Kalus yang diperoleh dari beberapa jenis tanaman atau dari berbagai jenis eksplan seringkali gagal beregenerasi membentuk tunas, atau hanya mampu membentuk akar saja, namun bukan berarti kalus tidak dapat beregenerasi tetapi hanya memerlukan media, zat pengatur tumbuh serta lingkungan yang cocok untuk proses regenerasinya (George dan Sherington, 1984).

### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui teknik dalam kultur kalus.
2. Untuk memahami pembentukan kalus dalam kultur secara in vitro.

### C. Alat dan Bahan

Bahan tanam (Wortel)	Media MS
ZPT (2,4-D 1 mg/l, IBA 1mg/l)	Alkohol 70%
Clorox 20%	Aquades steril
Spiritus	Bunsen
Korek Api	Aluminium Foil/Tutup botol
Scalpel Blade	Pinset
Petridish	Erlenmeyer

### D. Cara Kerja

1. Siapkan umbi wortel yang sehat dan segar, buang bagian-bagian yang kotor.
2. Cuci wortel dengan detergen, gosok/sikat, kupas kulit luarnya, lalu dipotong kira-kira 2 cm.
3. Sterilkan dalam alkohol 70% selama 1 menit.
4. Bilas dengan aquades steril.
5. Rendam dalam larutan Clorox 20% selama 10 menit.
6. Bilas lagi tiga kali dalam aquades steril.
7. Bagian permukaan eksplan yang kontak dengan larutan sterilisasi dipotong,
8. Ambil bagian kambium dan tanam dalam media yang telah tersedia.

**E. Data Pengamatan**

<b>Perlakuan</b>	<b>No botol</b>	<b>Saat muncul kalus pada hari ke</b>	<b>Warna kalus</b>	<b>% Berkalus</b>	<b>Keterangan</b>
2,4-D 1mg/l	1				
	2				
	3				
IBA 1mg/l	1				
	2				
	3				

## TOPIK V PREPARASI KULTUR SEL HEWAN

### A. Pendahuluan

Kultur sel/jaringan hewan adalah salah satu usaha menumbuhkan sel/jaringan secara *in vitro*. Usaha ini memerlukan kondisi aseptis yang tinggi yang menyangkut mulai dari persiapan alat dan bahan, persiapan media, pelaksanaan sampai pada pemeliharaan. Kondisi yang tidak aseptis memungkinkan tumbuhnya kontaminan-kontaminan tertentu seperti bakteri, protozoa, dan jamur. Tumbuhnya kontaminan ini akan merusak lingkungan untuk tumbuhnya sel itu sendiri. Oleh karenanya diperlukan kehati-hatian dan kecermatan bekerja serta pemahaman yang tinggi dalam menjaga sterilitas dalam teknik kultur sel/jaringan.

Sebagai sumber nutrisi maka sel atau jaringan yang ditumbuhkan membutuhkan media tumbuh. Media tersebut harus mengandung karbohidrat, asam amino, vitamin, garam, lemak, faktor penumbuh, hormone, zat-zat bioaktif, mineral, dan serum. Masing-masing komponen tersebut terkandung pada beberapa media yang tersedia.

### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui dan memahami alat dan bahan yang diperlukan dalam kultur sel/jaringan hewan.
2. Untuk mengetahui dan memahami teknik sterilisasi alat dan bahan yang diperlukan dalam kultur sel/jaringan hewan.
3. Untuk mengetahui dan memahami cara pembuatan media dalam kultur sel/jaringan hewan.

### C. Alat dan Bahan

Oven	Autoklaf
Tabung Reaksi	Rak Tabung
Bunsen	Korek Api
Erlenmeyer	Botol Tutup Ulir
Selotip Kertas	Sprayer
Botol Koleksi	Laminar Air Flow (LAF)
Gunting	Sendok Timbang
Timbangan Analitik	Aluminium Foil
Parafilm	Sput 10 ml
Mikropipet	Blue Tip
Yellow Tip	Inkubator CO <sub>2</sub>
Masker	Sarung Tangan
Filter Millipore	Alkohol 70%
Spiritus	Tissue
Kertas Label	Teepol
Deionized Water (DI)	Aquades
NaCl	TCM 199
FBS	NaHCO <sub>3</sub>

Hepes  
Parafin Oil

Penicillin  
Streptomycin

## D. Cara Kerja

### 1. Sterilisasi

- Rendam alat-alat yang akan digunakan dalam air yang sudah ditambah dengan teepol. Biarkan selama 24 jam.
- Sikat dan bilas di bawah air mengalir, lakukan pembilasan di bawah air mengalir sebanyak 20 kali.
- Bilas dengan aquades dan Deionized Water (DI).
- Keringkan alat-alat tersebut dalam oven.
- Jika sudah kering, bungkus dengan aluminium foil.
- Untuk alat-alat selain bahan plastic (glassware dll) sterilisasi dilakukan dalam oven pada suhu 125°C selama 3 jam.
- Sedangkan alat-alat berupa plastic (selang infus, blue tip, yellow tip dll) sterilisasi dilakukan di dalam autoklaf pada 121°C, 1Atm selama 15 menit. Setelah itu keringkan dalam oven.
- Alat-alat siap untuk digunakan.

### 2. Pembuatan Media

- **Medium Transport (NaCl 0,9%)**
  - a. 1000 ml aquades ditambah dengan 9 gram NaCl.
  - b. Homogenkan dengan *magnetic stirrer*.
  - c. Masukkan ke dalam botol steril (masing-masing 100ml) dan kemudian tutup dengan *aluminium foil*.
  - d. Sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.
  - e. Simpan dalam suhu ruang, jika ingin digunakan tambah dengan 0,006g/100ml penicillin dan 0,01g/100ml streptomycin.
- **Medium IVM (Stock)**
  - a. Timbang 0,95g TCM 199, 0,22g NaHCO<sub>3</sub>, 0,006g penicillin, 0,01 gram streptomycin, dan 0,238g Hepes. Selanjutnya bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam 100 ml *deionized water* (DI) steril.
  - b. Homogenkan dengan *magnetic stirrer*.
  - c. Filter dengan menggunakan *Millipore* ukuran 0,22µm.
  - d. Simpan stock pada suhu 4°C dan siap untuk digunakan.



## TOPIK VI IN VITRO MATURATION

### A. Pendahuluan

Kultur sel dan jaringan merupakan teknik yang digunakan secara luas dalam berbagai disiplin ilmu mulai ilmu-ilmu dasar tentang sel dan biologi molekuler sampai bidang aplikasi bioteknologi yang sedang berkembang dengan pesat. Di bidang biologi, teknologi ini dapat bermanfaat untuk mempelajari interaksi sel, mekanisme control intraseluler untuk diferensiasi dan perkembangan sel, fungsi-fungsi sel, analisa kromosom, perkembangan embrio, serta perkembangan sel-sel spesifik. Di bidang farmasi dan kedokteran teknologi ini dimanfaatkan untuk memproduksi vaksin antivirus dan untuk pengobatan lainnya (contoh teknik stem cell untuk pengobatan luka bakar, kanker darah dll). Sedangkan di bidang peternakan teknologi ini bermanfaat untuk menghasilkan ternak-ternak unggul (melalui cloning), melestarikan hewan-hewan langka dan lain-lain. Sementara itu di bidang reproduksi, teknik kultur sel dan jaringan dimanfaatkan dalam *in vitro fertization* (IVF), *in vitro maturation* (IVM), dan lain-lain.

IVM merupakan salah satu teknik dalam kultur sel yang dilakukan untuk mendapatkan oosit/ovum yang matang yang kemudian oosit tersebut nantinya digunakan untuk kepentingan lebih lanjut. Oosit hasil IVM selanjutnya digunakan sebagai bahan dasar untuk keperluan penelitian parthenogenesis, IVF, dan untuk keperluan sebagai sel resipien pada teknik transfer inti (cloning).

### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui dan memahami tahap-tahap yang dilakukan dalam IVM.
2. Untuk mengetahui dan memahami perkembangan oosit yang dimaturation secara *in vitro*.

### C. Alat dan Bahan

Tabung Reaksi	Rak Tabung
Bunsen	Korek Api
Erlenmeyer	Botol Tutup Ulir
Petridish Besar	Selotip Kertas
Sprayer	Botol Koleksi
Laminar Air Flow (LAF)	Gunting
Aluminium Foil	Falcon
Parafilm	Sputil 10 ml
Mikropipet	Blue Tip
Yellow Tip	Inkubator CO <sub>2</sub>
Hematokrit	Selang Infus
Masker	Sarung Tangan
Filter Millipore	Petridish kecil

Alkohol 70%	Spiritus
Tissue	Kertas Label
Deionized Water (DI)	NaCl 0,9%
TCM 199 (Stock)	FBS
Penicillin	Parafin Oil
Streptomycin	

## D. Cara Kerja

### 1. Pembuatan Medium IVM

- Ambil 9 ml medium stok dan tambahkan 1 ml serum FBS, masukkan ke dalam tabung reaksi (tabung 1: medium berserum 10%). Sedangkan pada tabung lain ambil 9,5 ml medium stok dan tambahkan 500µl serum FBS (tabung 2: medium berserum 5%). Sementara itu tabung 3 berisi 5 ml medium stok.
- Filter medium pada masing-masing tabung reaksi dengan menggunakan *Millipore* ukuran 0,22µm.
- Ambil 25 µl medium berserum 10% masukkan dalam falcon (buat bentuk drop), tambahkan paraffin oil. Tambahkan kembali 25 µl medium berserum dan berikutnya tambahkan kembali paraffin oil. Lakukan hal yang sama sampai drop yang dibentuk berisi 100µl medium berserum 10%. Sisa medium yang dibuat drop tuang pada petridish kecil (bagi menjadi 3 petridish).
- Inkubasi dalam incubator CO<sub>2</sub> sampai saat digunakan.

### 2. IVM

- Koleksi ovarium dari RPH
  - Potong jaringan ikat yang melekat pada ovarium dan cuci sampai bersih dengan menggunakan NaCl 0,9% yang sudah ditambah dengan penicillin dan streptomycin.
  - Jika sudah bersih masukkan dalam botol koleksi yang juga berisi NaCl 0,9% dan penicillin serta streptomycin.
  - Masukkan botol koleksi ke dalam termos yang berisi air hangat.
  - Bawa ke laboratorium.
- Aspirasi oosit
  - Di laboratorium masukkan ovarium hasil koleksi dari RPH ke dalam *waterbath* pada suhu 38°C,
  - Dalam kondisi steril aspirasi oosit melalui folikel antral yang berdiameter 3-7mm dengan menggunakan *disposable syringe* 10ml dan jarum berukuran 21 G (sprit diisi dengan 0,5-1ml *washing medium*).
  - Tempatkan hasil aspirasi dalam tabung reaksi yang berada dalam *waterbath* yang sama.
  - Tambahkan 5 ml medium tidak berserum.

c. *Washing oosit*

- Endapkan hasil aspirasi dalam tabung reaksi selama 10 menit.
- Buang supernatant (bagian atasnya) sisakan 1-2ml, tambahkan 5 ml medium berserum 5%, biarkan selama 10 menit.
- Buang kembali supernatant (bagian atasnya) sisakan 1-2ml, tambahkan 4 ml medium berserum 5%, biarkan selama 10 menit.
- Buang supernatant (bagian atasnya) sisakan 1 ml. Tuang pellet ke dalam petridish kecil dan bilas sisa pellet pada tabung dengan 1 ml medium berserum 5% dan hasilnya tuang pada petridish kecil tadi.

d. *Seleksi oosit*

- Dengan menggunakan hematokrit yang telah dihubungkan dengan selang infus, seleksi oosit di bawah mikroskop dengan cara memindahkan dan memilih hanya oosit yang memiliki cumulus oophorus dan corona radiata yang kompak ke dalam petridish kecil yang berisi medium berserum 10%.
- Lakukan proses pemindahan tersebut sampai 3x.

e. *Maturasi dan Evaluasi Oosit*

- Dengan menggunakan hematokrit maka oosit yang sudah diseleksi dipindahkan ke dalam drop medium maturasi yang telah diinkubasi minimal 2 jam sebelum. Masing-masing drop isi 5-10 oosit.
- Inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 38,5°C selama 1x24 jam.
- Amati perkembangan sel-sel kumulusnya. Perkembangan sel-sel kumulus dikelompokkan menjadi 3 yaitu kualitas 0 (oosit dengan sel-sel kumulus yang tidak berkembang sama sekali), kualitas 1 (oosit dengan sel-sel kumulus yang berkembang hanya sebagian), dan kualitas 2 (oosit dengan sel-sel kumulus yang berkembang seluruhnya).

## TOPIK VII ISOLASI DNA

### A. Pendahuluan

DNA atau *deoxyribonucleid acid* adalah material genetic yang tersusun atas tiga komponen. Komponen-komponen tersebut adalah molekul gula pentose (deoxyribosa), gugus phosphate, dan basa nitrogen. Pada organisme tingkat tinggi (manusia, hewan, dan tumbuhan) DNA dapat kita temukan dalam inti sel (DNA inti), mitokondria (DNA mitokondria), dan di dalam kloroplas (DNA kloroplas). DNA yang ditemukan di dalam inti disebut juga DNA kromosomal sedangkan yang ditemukan di luar inti disebut DNA ekstrakromosomal.

Pada saat ini, DNA dapat disolasi untuk kemudian digunakan untuk proses lanjutan (PCR, RFLP, dll). Proses isolasi DNA dilakukan melalui serangkaian proses penghancuran dinding sel atau membrane sel, penghilangan protein dan RNA, dan pengendapan DNA serta pemanenan. Prinsip dasar pada proses isolasi DNA adalah memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Hasil isolasi merupakan tahapan penting untuk langkah berikutnya. Oleh sebab itu dalam pelaksanaannya harus dilakukan dengan baik dan bebas kontaminasi, dan diusahakan didapatkan DNA dalam bentuk rantai panjang.

Proses pemisahan DNA dari tempatnya dilakukan dengan homogenasi dan penambahan buffer ekstraksi atau buffer lisis untuk mencegah DNA rusak. Sedangkan untuk membantu terjadinya lisis biasanya dilakukan inkubasi pada suhu sekitar 60°C. Dalam proses ini juga digunakan senyawa fenol, chloroform, dan isoamyl alcohol untuk memaksimalkan proses lisis.

Ketika DNA sudah didapatkan maka sebelum dilakukan proses lanjutan seperti PCR dan elektroforesis maka perlu dilakukan pengukuran kuantitas DNA. Alat yang digunakan untuk melakukan pengukuran tersebut adalah spektrofotometer. Prinsip kerja dari spektrofotometer adalah iradiasi sinar ultra violet yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Penyerapan sinar tersebut oleh nukleotida secara maksimal dicapai pada gelombang 260nm, sedangkan penyerapan maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang 280nm.

Kemurnian DNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi protein dalam larutan. Kemurnian larutan DNA dapat dilihat dengan membagi nilai OD260 dengan OD280. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1.8-2.0. Jika nilai rasio lebih kecil dari 1.8 maka masih ada kontaminasi protein atau fenol di dalam larutan.

**B. Tujuan**

1. Untuk mengetahui dan memahami teknik isolasi DNA leukosit dengan *Metode Salting Out*.
2. Untuk mengetahui dan memahami teknik isolasi DNA dari folikel bulu ayam atau ekor mencit/tikus.
3. Untuk mengetahui dan memahami pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometer.

**C. Bahan****1. Isolasi DNA Leukosit Metode Salting Out**

- a. Ery Lysis Buffer  
155mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$ , dan 0.1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .
- b. Cell Lysis Solution  
10mM Tris-CL pH 8.0, 25mM EDTA pH 8.0, 20% SDS.
- c.  $\text{NH}_4\text{COOH}$  Solution  
Untuk 10 ml ambil 3.854g+10ml  $\text{H}_2\text{O}$
- d. Tris-EDTA (TE) 0.01M pH 8.0  
10mM Tris-HCl (pH 8.0)+1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pH 8.0
- e. Tris-EDTA (TE) 0.01M pH 7.6  
10mM Tris HCl (pH 7.6)+1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pH 8.0

**2. Isolasi DNA dari Folikel Bulu Ayam atau Ekor Mencit/Tikus**

10mM Tris-Cl pH 8.0, 20mM EDTA, 0.1% SDS, 20mM NaCl.

Catatan: siapkan menjelang akan digunakan per 50 $\mu\text{l}$  (48 $\mu\text{l}$  Lysis Buffer+2 $\mu\text{l}$  10mg/ml proteinase-K) untuk satu sampel.

**D. Cara Kerja****1. Isolasi DNA Leukosit Metode Salting Out**

- a. Masukkan 2 ml darah ke dalam EDTA-Vacutainer-Tube (Venoject), goyang secara perlahan membentuk angka delapan.
- b. Pindahkan ke dalam tabung sentrifus, tambahkan 6ml RBC *Lysis Solution* 1x. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
- c. Sentrifus pada 1500rpm selama 10 menit (pada suhu ruang).
- d. Buang supernatant. Jika pellet masih berwarna merah ulangi langkah b sampai pellet berwarna putih. Pellet yang berwarna putih menandakan adanya sel limfosit. Sedangkan pellet yang berwarna merah menandakan adanya sel darah merah.
- e. Pelet ditambah dengan 750 $\mu\text{l}$  *cell Lysis Solution*, kemudian lakukan pipeting (untuk homogenasi).
- f. Tambahkan 2 $\mu\text{l}$  RNase A (10mg/ml), kocok kurang lebih 25 kali dan inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.
- g. Tambah 500 $\mu\text{l}$  *protein precipitation solution*, vortex.
- h. Sentrifus pada kecepatan 10.000rpm pada suhu 4oC selama 15menit. Setelah disentrifus presipitat akan tampak berwarna coklat muda. Jika presipitat belum terbentuk maka ulangi prosedur g.

- i. Pindahkan supernatan (mengandung DNA) yang diperoleh pada prosedur di atas ke dalam eppendorf steril yang sudah berisi 1.5ml ethanol absolute.
- j. Kocok eppendorf perlahan-lahan sampai benang-benang DNA berwarna putih, selanjutnya pindahkan ke eppendorf baru.
- k. Untuk mengendapkan DNA, sentrifus pada kecepatan 10.000rpm pada suhu 4°C selama 10 menit.
- l. Buang supernatant, tambah pellet dengan ethanol 70%.
- m. Sentrifus pada kecepatan 10.000rpm pada suhu 4°C selama 15 menit.
- n. Buang supernatant, keringkan pellet dalam oven suhu 57°C.
- o. Rehidrasi DNA dalam 50-100 buffer TE (pH 7.6) kemudian tempatkan pada suhu 37°C selama 2 jam untuk memperoleh DNA terlarut. Pastikan larutan homogen. Simpan pada suhu -20°C.
- p. Ukur kemurnian dan konsentrasi DNA dengan spektrofotometer UV-Vis pada OD260 dan OD280.

## 2. Isolasi DNA dari Folikel Bulu Ayam atau Ekor Mencit/Tikus

- a. Folikel bulu ayam atau ekor mencit/tikus 0.5cm dipotong-potong halus.
- b. Masukkan ke dalam eppendorf 1.5ml.
- c. Tambahkan 50µl Lysis Buffer.
- d. Inkubasi pada suhu 55°C (minimal 1jam).
- e. Sesekali mix dengan jari, pada akhir inkubasi vortex dan spindown sebentar.
- f. Tambahkan 450ml aquades, campur sempurna.
- g. Sentrifus dengan kecepatan 12.000rpm pada suhu 4°C, selama 10 menit.
- h. Pindahkan supernatant pada eppendorf 1.5ml yang baru, simpan di freezer atau pada -20°C.
- i. Ukur kemurnian dan konsentrasi DNA dengan spektrofotometer UV-Vis pada OD260 dan OD280.

## 3. Pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometer

- a. Tentukan faktor pengenceran yang akan digunakan. Jika kita ingin membuat pengenceran 50 kali maka ambil sampel DNA yang akan diukur konsentrasinya sebanyak 1µl, masukkan ke dalam eppendorf 0.5ml. Tambahkan 49µl aquades steril. Vortex hingga homogen dan sentrifus dengan kecepatan rendah.
- b. Hidupkan spektrofotometer. Pilih **analysis mode** dari main window dan **click Nucleic Acid** (application programe). **Click UV Lamp** (diperlukan 20 menit untuk pemanasan sebelum digunakan untuk membaca) dan **click Visible Light Lamps** (tidak diperlukan pemanasan).
- c. Letakkan cuvet yang telah berisi aquades steril sebanyak 50µl pada tempat cuvet (*cuvette compartment*) dalam spektrofotometer

- dan **click Blank**, sekarang spektrofotometer siap digunakan untuk mengukur konsentrasi sampel DNA.
- d. Masukkan larutan sampel DNA yang telah diencerkan ke dalam cuvet (jaga jangan sampai timbul gelembung). Letakkan cuvet yang berisi sampel DNA tersebut pada tempat cuvet (*cuvette compartment*) dalam spektrofotometer. **Click Reading Sample**, maka akan keluar data OD260, OD280, dan ratio OD260 dengan OD280.
  - e. Bersihkan cuvet dengan menyemprotkan air distilasi dan keringkan dengan tissue. Cuvet siap digunakan untuk sampel DNA berikutnya.

## TOPIK VIII POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

### A. Pendahuluan

PCR merupakan teknik perbanyakan molekul DNA dengan ukuran tertentu secara enzimatik melalui mekanisme perubahan suhu. Teknik ini dilakukan secara berulang-ulang (30-35 siklus). Sebagai hasilnya maka akan didapatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula.

Secara umum teknik PCR dilakukan melalui beberapa tahap yaitu tahap denaturasi, *annealing*, dan tahap *extension*. Masing-masing tahap memiliki suhu yang berbeda-beda. Tahap denaturasi adalah tahap pemisahan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Suhu yang umum digunakan untuk memisahkan untai DNA ini adalah suhu 94-95°C selama 30 detik. Apabila DNA target mengandung banyak nukleotida G-C maka suhu denaturasi dapat ditingkatkan. Sedangkan tahap *annealing* biasanya dilakukan pada suhu 36-72°C selama 30 detik. Pada tahap ini terjadi proses penempelan primer pada DNA yang telah mengalami denaturasi pada tahap pertama. Primer yang digunakan akan efektif jika berukuran kecil yaitu sekitar 18-25 basa dengan 50-60% mengandung G-C. Tahap terakhir pada teknik PCR adalah tahap *extension* yaitu tahap dimana primer dengan bantuan enzim DNA Polymerase akan membentuk untaian DNA komplemen (pasangan) dari DNA induk yang dijadikan sebagai cetakannya (*template*). Tahap ini disebut juga tahap elongasi dan berlangsung pada suhu 72°C (waktu tergantung pada panjang pendeknya DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi).

### B. Tujuan

Untuk mengetahui dan memahami teknik PCR.  
Untuk mengamplifikasi DNA

### C. Alat dan Bahan

Mesin Thermal Cycler Untuk Proses PCR	Tabung Eppendorf
Blue, Yellow, White Tip	Mikropipet
Vortex	Mesin Sentrifus
Rak Tabung	Sarung Tangan
Enzim Taq Polymerase	dNTP
Buffer PCR	Primer
DNA Template	Aquades Steril

### D. Cara Kerja

1. Tentukan jumlah sampel untuk analisis PCR.
2. Siapkan tabung PCR 0.2ml atau 0.5ml yang sudah steril. Jumlah tabung tergantung pada jumlah sampel.
3. Beri label/nama pada setiap tabung PCR.
4. Tambahkan DNA template/sampel ke dalam setiap tabung PCR.



5. Buat cocktail atau master mix yang mengandung (buffer, Taq polymerase, dNTP, primer, aquades steril) dengan menggunakan tabung eppendorf 0.5ml atau 1.5ml. Komponen PCR yang telah disebutkan di atas dicampur dengan konsentrasi tertentu. Pada table 1 diberikan contoh cara membuat resep campuran larutan PCR dengan volume 50 $\mu$ l.
6. Bila jumlah sampel DNA yang dimasukkan adalah 3 $\mu$ l, maka sebanyak 47 $\mu$ l dari cocktail (lihat table 2) dimasukkan ke masing-masing tabung yang telah berisi sampel DNA. Usahakan jangan sampai timbul gelembung udara. Pada table 2 diperlihatkan contoh perhitungan cara membuat larutan PCR dengan total sampel sebanyak 10 sampel.
7. Kemudian masukkan tabung ke Thermal Cycler Machine dan jalankan mesin tersebut dengan menekan START sesuai program yang diinginkan.

Tabel 1. Campuran larutan dalam PCR untuk setiap reaksi

Komponen	Konsentrasi Stock Solution	Konsentrasi dalam reaksi	Volume yang digunakan/diambil dari stock ( $\mu$ l)
PCR Buffer	10x	1x	5.0
dNTP	2.5mM	0.2mM	4
Primer Forward	2.5pmol/ $\mu$ l	12.5 pmol	5.0
Primer Reverse	2.5pmol/ $\mu$ l	12.5 pmol	5.0
Taq Polymerase	5 Unit/ $\mu$ l	1.25 Unit/ $\mu$ l	0.25
Sampel DNA			X
Air			Y
Total			50.0

Keterangan:

X: tergantung konsentrasi sampel DNA

Y: diisi aquades steril hingga volume total = 50  $\mu$ l

Tabel 2. Perhitungan cara membuat cocktail larutan PCR

Komponen	Volume yang dibutuhkan (µl)	yang dibutuhkan untuk cocktail PCR (di x 11)
Buffer PCR	5.0	55.0
dNTP	5.0	55.0
Primer F	5.0	55.0
Primer R	5.0	55.0
Taq Polymerase	0.5	5.5
Aquades Steril	26.5	291.5
Total	47.0	517.5
Sampel DNA	3.0	-

Tabel 3. Komposisi Buffer PCR yang umum digunakan dalam PCR

Komponen	Konsentrasi Yang Dibutuhkan
Tris pH 8.4	10mM
KCl	50mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM
Gelatin	0.01%
NP40	0.01%
Tween 20	0.01%
Triton X-100	0.1%

## TPOK IX ELEKTROFORESIS

### A. Pendahuluan

Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul yang bermuatan (dari kutub negative menuju ke kutub positif) di dalam gel yang direndam dalam larutan penyangga. Ada bermacam-macam zat kimia yang dapat digunakan sebagai gel di dalam proses elektroforesis. Penggunaan jenis gel disesuaikan dengan tujuan yang akan dicapai. Secara umum ada 2 jenis gel yang biasa digunakan yaitu Agarose Gel Electrophoresis (AGE) dengan visualisasi menggunakan ethidium bromide dan Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE) dengan visualisasi menggunakan silver staining. Kedua cara elektroforesis ini banyak digunakan dalam visualisasi produk PCR. Prinsipnya alat elektroforesis dibagi menjadi 2 yaitu horizontal elektroforesis dan vertical elektroforesis.

### B. Tujuan

Untuk mengetahui dan memahami proses elektroforesis pada sampel DNA

### C. Alat dan Bahan

Horizontal Agarose Gel Electrophoresis Apparatus	Power Supply
Well-Forming Combs (Sisir pembentuk Sumur)	Camera Polaroid
Microwave atau Hotplate	UV Transilluminator
Blue, Yellow, White Tip	Mikropipet
1xbuffer TAE	Agarose DNA ladder
Ethidium Bromide (10mg/ml)	Loading Dye

### D. Cara Kerja

#### 1. Pembuatan Gel Agarose

- Tentukan konsentrasi atau persentase agarose yang dibutuhkan, dan hal ini tergantung dari ukuran fragmen DNA yang dianalisis. Persentase gel agarose yang direkomendasikan, adalah sebagai berikut:
  - a. 0.5% agarose untuk fragmen DNA berukuran 1.000-30.000 pb.
  - b. 0.7% agarose untuk fragmen DNA berukuran 800-12.000 pb.
  - c. 1.5% agarose untuk fragmen DNA berukuran 200-3.000 pb.
  - d. 2.0% agarose untuk fragmen DNA berukuran 50-2.000 pb.
- Pilih tipe agarose yang digunakan. Kebanyakan tipe yang digunakan adalah standard agarose. Misalnya telah ditentukan akan dibuat 2% gel agarose dalam volume 200ml 1xbuffer TAE, maka jumlah agarose yang akan ditimbang yaitu  $2 \text{ gram}/100\text{ml} \times 200\text{ml} = 4 \text{ gram}$ .
- Tempatkan 4 gram agarose ke dalam erlenmeyer dan isi dengan larutan 1xbuffer TAE sampai volume 200ml, kemudian kocok sampai merata.
- Panaskan dalam microwave sampai mendidih sampai larutan menjadi jernih.

- Dinginkan agarose kira-kira sampai 60°C dan tambahkan 5µl ethidium bromide (10mg/ml) dan campur hingga merata.
- Setelah itu larutan dituang ke dalam tray dan pasang well-forming combs, tunggu kurang lebih 30 menit atau sampai gel mengeras. Lepas well-forming combs secara perlahan-lahan dan gel agarose siap digunakan untuk elektroforesis.

## **2. Proses Elektroforesis**

- Letakkan tray yang berisi agarose di dalam tank elektroforesis dan tuang larutan 1xbuffer TAE ke dalam tank tersebut hingga sekitar 1mm di atas permukaan gel.
- Ambil sampel dengan mikropipet sebanyak kapasitas sumur (well) yang biasanya sekitar 4-8µl. Letakkan sampel di atas parafilm atau plastic cling wrap dan tambahkan loading dye buffer sebanyak 1/10 volume sampel kemudian aduk hingga merata. Ambil larutan tersebut dengan mikropipet dan masukkan ke dalam sumur (well) pada gel agarose.
- Setelah sampel dimasukkan dalam sumur (well), tutup tank elektroforesis dan hubungkan arus listrik (hati-hati tegangan listrik cukup tinggi). Setelah itu proses elektroforesis siap dijalankan.
- Lamanya elektroforesis tergantung persentase gel agarose, tegangan arus listrik, dan ukuran molekul DNA. Sebagai gambaran proses elektroforesis untuk: tegangan listrik yang digunakan 100 volt. Ukuran fragmen DNA yang dianalisis 50-2000 pasang basa maka proses elektroforesis memerlukan waktu sekitar 30 menit.
- Setelah proses elektroforesis selesai, matikan arus listrik dan ambil tray dengan menggunakan sarung tangan. Taruh gel pada UV transilluminator dan jika pita/band molekul DNA kelihatan terang maka ambil dokumentasi dengan menggunakan camera Polaroid.