

**BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM**

**TEKNIK ANALISIS BIOLOGI MOLEKULER**  
**(TABM)**

**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 teknik analisis biologi molekuler (TABM) ini. Buku petunjuk ini disusun berdasarkan kebutuhan mahasiswa biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang khususnya untuk para mahasiswa yang menempuh mata kuliah teknik analisis biologi molekuler (TABM).

Buku petunjuk ini terdiri dari beberapa bagian tetapi secara garis besar buku petunjuk praktikum ini berisi dasar-dasar praktikum yang dilakukan dalam teknik analisis biologi molekuler (TABM) baik untuk teknik analisis yang terkait DNA maupun Protein. Sebagai dasar praktikum maka diharapkan buku petunjuk ini memberikan ketrampilan dasar bagi para mahasiswa khususnya mahasiswa yang menempuh mata kuliah teknik analisis biologi molekuler (TABM) 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

### PENGENALAN ALAT-ALAT DALAM TEKNIK ANALISIS BIOLOGI MOLEKULER

#### A. Pendahuluan

Teknik analisis biologi molekuler adalah salah satu kunci dalam memahami dogma sentral dalam biologi. Keberadaan teknik ini akan membantu kita memahami proses replikasi, transkripsi, translasi, dan lain-lain. Dengan teknik ini dimungkinkan kita akan dapat mengenal organisme sampai pada tingkatan molekuler yaitu sampai pada tingkatan DNA, RNA, asam amino, dan protein.

Permasalahan yang ada pada saat ini adalah latar belakang ilmu dan keahlian yang dimiliki oleh mereka yang ingin mempelajari biologi molekuler sangat beragam. Oleh karena itu pemahaman terhadap teknik biologi molekuler menjadi sangat penting bagi para ilmuwan yang ingin menekuni bidang biologi molekuler. Pengetahuan awal mengenai alat-alat yang dipakai dalam teknik analisis biologi molekuler menjadi sangat penting untuk dipahami.

Alat-alat tersebut bisa dikelompokkan berdasarkan alat utama dan alat pendukung. Alat utama dapat berupa thermocycler, Elektroforesis, Geldoc transiluminator, sequencer, dan lain-lain. Sedangkan alat-alat pendukung lainnya diantaranya adalah oven, spektrofotometer, vortex, mikropipet, dan lain-lain.

#### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui alat-alat utama dan pendukung yang digunakan dalam teknik analisis biologi molekuler.
2. Untuk memahami prinsip kerja alat-alat utama dan pendukung yang digunakan dalam teknik analisis biologi molekuler.

#### C. Alat dan Bahan

1. Thermocycler
2. Elektroforesis
3. Sequencer
4. Geldoc transiluminator
5. RT-PCR
6. Spektrofotometer

#### D. Cara Kerja

1. Gambar/foto masing-masing alat yang digunakan dalam teknik analisis biologi molekuler.
2. Kenali masing-masing bagian yang menyusun alat tersebut.
3. Kenali juga masing-masing fungsinya dan cara kerjanya serta teknik pemeliharannya.

4. Buatlah SOP tentang alat tersebut.
5. Laporkan hasil yang saudara dapat dalam praktikum tersebut.

**E. Tugas/Pertanyaan**

Bandingkan kelebihan dan kekurangan masing-masing alat yang sudah saudara analisis dalam praktikum tersebut.

## TOPIK II

### ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL RAMBUT

#### 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.

DNA dari berbagai sumber di atas secara in vitro dapat diisolasi dan dipurifikasi dengan teknik-teknik tertentu dan ini merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi untuk menganalisis DNA. Pemilihan teknik mengisolasi dan memurnikan DNA yang tepat akan menghasilkan DNA dalam keadaan murni (pure) yaitu DNA yang terbebas dari komponen-komponen sel lainnya seperti RNA, protein, karbohidrat, dan lain-lain.

#### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui dan memahami teknik isolasi DNA dari sampel rambut.
2. Untuk mengetahui dan memahami teknik purifikasi DNA dari sampel rambut.
3. Untuk membandingkan hasil isolasi DNA dengan cara 1 dan dengan cara 2.

#### C. Alat dan Bahan

1. 10-20 folikel rambut yang bersih
2. Larutan A (200mM NaOH):
  - 1M NaOH = 2 ml
  - MilliQ = 8 ml
3. Larutan B (200mM HCl, 100mM Tris HCl, pH 8,5):
  - 1 M Tris HCl pH 8,5 = 1 ml
  - Concentrated HCl = 167 µl
  - MilliQ = 8,843 ml
4. Buffer H
  - 1x buffer PCR (ambil 10 ml)
  - Proteinase K, dengan konsentrasi 100 µg/ml (ambil 1 ml proteinase 10 mg/ml)
  - Tween 20 0,5% (ambil 0,5 ml)

- Tambahkan MilliQ hingga volume mencapai 100 ml dan simpan di freezer (suhu -20°C).
5. 3M Sodium Acetat (pH 4,8-5,2)
  6. Etanol Absolut
  7. Larutan TE

## D. Cara Kerja

### 1. Cara 1

- Potong 10-20 folikel rambut 3-5mm dengan menggunakan gunting steril dan masukkan ke dalam eppendorf 1,5ml.
- Tambahkan 50 µl larutan A ke dalam tabung eppendorf.
- Sentrifugasi sebentar agar folikel mengumpul di dalam larutan A.
- Panaskan pada suhu 95-100°C selama 15 menit.
- Sentrifugasi sebentar agar larutan yang menguap dan menempel di dinding atau tutup eppendorf turun ke bawah.
- Tambahkan 50 µl larutan B.
- Vortex dan sentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan maksimal 13.000 rpm.
- Pindahkan 90 µl larutan bagian atas ke tabung eppendorf yang baru, sisa kotoran berada di bagian bawah dibuang.
- Simpan pada suhu -20°C.

### 2. Cara 2

- Potong 10-20 folikel rambut 3-5mm dengan menggunakan gunting steril dan masukkan ke dalam eppendorf 1,5ml.
- Tambahkan 50 µl buffer H ke dalam tabung eppendorf.
- Sentrifugasi sebentar agar folikel mengumpul di dalam buffer H.
- Inkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit.
- Inkubasi pada suhu 95-100°C selama 10 menit agar proteinase K inaktif.
- Sentrifugasi sebentar agar larutan yang menguap dan menempel di dinding atau tutup eppendorf turun ke bawah.
- Simpan pada suhu -20°C.

### 3. Purifikasi Sampel Rambut

- Ambil 25 µl larutan DNA hasil isolasi.
- Tambahkan 2,5 µl 3 M sodium asetat (pH 4,8-5,2) dan 250 µl etanol absolute yang telah disimpan di dalam lemari pendingin (-4°C), kemudian dikocok perlahan-lahan dengan tangan.
- Inkubasi di dalam freezer -20°C selama 60 menit.
- Sentrifugasi pada 13.000 rpm selama 10 menit
- Buang supernatant.
- Keringkan pellet dengan bantuan aspirator.
- Tambahkan 12,5 µl larutan TE atau air milliQ dan simpan sampel DNA pada temperature 4°C.

## **E. Pertanyaan**

1. Apakah ada perbedaan hasil dari DNA yang diisolasi dengan cara 1 dan dengan cara 2. Jelaskan
2. Sebutkan dan jelaskan fungsi proteinase K.
3. Mengapa pada cara 2 pada akhir perlakuan proteinase K di inaktifkan. Jelaskan

### TOPIK III

## ISOLASI DNA DARI DARAH (MagmaMAX™ Kit) DAN FIBROBLAS BABY HAMSTER

### A. Pendahuluan

Secara umum DNA dapat diisolasi dari berbagai sumber yang dimiliki oleh sel. Beberapa sumber DNA yang biasa digunakan untuk mendeteksi keberadaan DNA adalah dari darah dan organ tubuh yang dimiliki. Masing-masing sumber DNA tersebut memiliki tingkat kesulitan yang berbeda-beda satu sama lain. Kesulitan teknik isolasi DNA dari darah tidak hanya bergantung pada pemisahan antara DNA dengan komponen lain dari sel (RNA maupun protein) akan tetapi juga bergantung pada pemisahan sel lain yang juga terkandung di dalam darah. Pada mamalia, hanya sel darah putih (buffy coat) yang mempunyai inti dan mengandung DNA. Oleh karena itu penggunaan darah untuk sumber DNA yang dimaksudkan adalah sel darah putih. Sementara itu, teknik isolasi DNA dari organ/jaringan tubuh juga memiliki tingkat kesulitan yang sama dengan yang ada pada darah. Pemilihan jenis organ yang digunakan menjadi salah satu bahan yang dapat dijadikan pertimbangan. Penggunaan jaringan yang masih muda tentu akan lebih menguntungkan daripada penggunaan jaringan dewasa. Konsep ini didasarkan karena pada jaringan yang masih muda lebih mudah diuraikan daripada jaringan dewasa sehingga DNA yang didapatpun akan jauh lebih banyak daripada yang didapat dari jaringan dewasa.

### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui teknik isolasi DNA dari darah
2. Untuk mengetahui teknik isolasi DNA dari fibroblast baby hamster

### C. Alat dan Bahan

1. Isolasi DNA darah  
Kit isolasi DNA: MagmaMAX™ Kit
2. Isolasi DNA fibroblast baby hamster
  - 10mM Tris-Cl pH 8.0, 20mM EDTA, 0.1% SDS, 20mM NaCl.
  - Catatan: siapkan menjelang akan digunakan per 50µl (48µl Lysis Buffer+2µl 10mg/ml proteinase-K) untuk satu sampel.

### D. Cara Kerja

#### 1. Isolasi DNA Darah

- Siapkan PK buffer/enzyme mix dengan komposisi sebagai berikut:

**Tabel 1. PK Buffer/Enzyme mix**

Component	Volume per tube (µL)
Proteinase K solution (100mg/ml)	16
PK Digestion Buffer	184
Total (PK Buffer/Enzyme mix)	200



Catatan: PK Buffer/Enzyme mix harus dalam keadaan fresh (dibuat sesaat sebelum digunakan)

- Ambil 200µl PK buffer/enzyme mix dan masukkan ke dalam eppendorf.
- Tambahkan 200µl sampel darah dan homogenasi dengan cara pipetting 5-7 kali. Kemudian lakukan vortex.
- Inkubasi selama 20 menit pada suhu 60°C.
- Tambahkan 600µl Multi-Sample DNA Lysis Buffer.
- Vortex selama 3 menit pada speed 1 atau 2.
- Tambahkan 40 µl DNA Binding Bead Mix kemudian vortex selama 3 menit pada speed 1 atau 2.

**Tabel 2. DNA binding bead mix**

<b>Component</b>	<b>Volume per tube (µL)</b>
DNA Binding Beads (10mg/ml)	32
Water, nuclease-free	8
Total (DNA binding bead mix)	40

- Tambahkan 800 µl isopropanol 100%, kemudian vortex selama 3 menit pada speed 1 atau 2.
- Tempatkan dalam magnetic stand selama 5 menit, buang supernatant.
- Cuci sampel dengan menggunakan 300 µl Wash Solution 1
- Ulangi langkah no 10 dengan menggunakan 300 µl Wash Solution 2 sebanyak 2 kali.
- Kering anginkan dalam magnetic stand selama 3 menit.
- Tambahkan 100 µl DNA Elution Buffer 1.
- Inkubasi selama 5 menit pada suhu 70°C, vortex selama 5 menit pada speed 1 atau 2.
- Tambahkan 100µl DNA Elution Buffer 2.
- Vortex selama 10-20 detik kemudian tempatkan dalam magnetic stand selama 5 menit. Jika diperlukan lakukan pipetting.
- Transfer hasil elusi yang berisi DNA ke dalam eppendorf baru dan tutup sesegera mungkin.
- Simpan DNA pada suhu 2-6°C (bertahan sampai 2 minggu) atau simpan pada suhu -20 sampai -80°C (bertahan sampai jangka waktu yang lama).

## **2. Isolasi DNA Fibroblas Baby Hamster**

- Fibroblas baby hamster dipotong-potong halus (0.5cm).
- Masukkan ke dalam eppendorf 1.5ml.
- Tambahkan 50µl Lysis Buffer.
- Inkubasi pada suhu 55°C (minimal 1jam).
- Sesekali mix dengan jari, pada akhir inkubasi vortex dan spindown sebentar.

- Tambahkan 450ml aquades, campur sempurna.
- Sentrifus dengan kecepatan 12.000rpm pada suhu 4°C, selama 10 menit.
- Pindahkan supernatant pada eppendorf 1.5ml yang baru, simpan di freezer atau pada -20°C.

**E. Pertanyaan**

1. Sebutkan fungsi masing-masing bahan yang digunakan.
2. Sebutkan kesulitan yang dihadapi pada praktikum yang sudah anda lakukan dan mengapa demikian

## TOPIK IV

### ISOLASI DNA TANAMAN

#### A. Pendahuluan

Perbedaan mendasar isolasi DNA pada tanaman adalah pada komponen yang dimiliki oleh dinding sel yang dimiliki dan adanya kandungan tertentu seperti fenol yang menjadi salah satu sumber kontaminan pada DNA yang diisolasi. Oleh karena itu kesulitan terbesar pada isolasi DNA pada tanaman adalah pada proses memecah dinding sel yang dimiliki dan menghilangkan sumber kontaminan tersebut. Untuk itu perlu perlakuan khusus untuk mengatasi hal tersebut. Penggunaan nitrogen cair, penggerusan, dan penggunaan  $\beta$ -merkaptotanol adalah salah satu pilihan untuk mengatasi kesulitan dalam isolasi DNA tanaman.

#### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui teknik isolasi DNA pada tanaman
2. Untuk mengetahui bahan-bahan dan fungsi bahan yang digunakan dalam isolasi DNA pada tanaman.

#### C. Alat dan Bahan

1. CTAB buffer ekstrak: dibuat dengan cara mensterilkan dengan autoklaf 2% CTAB, 1M Tris-HCl pH 8, 0.5M EDTA pH 8 dan 5M NaCl. Simpan dalam suhu ruang, kemudian tambahkan 2%  $\beta$ -merkaptotanol dan 0.1 mg/ml proteinase-K sesaat sebelum digunakan.
2. PCI: Phenol:Chloroform:Isoamilalcohol (25:24:1)
3. Nitrogen cair
4. 7.5M Amonium Sulfat
5. Etanol 70%
6. Buffer TE pH 7.6
7. Larutan Etanol:Cloroform
8. Ambil 1 ml etanol 96% dan campurkan dengan 24ml chloroform.

#### D. Cara Kerja

1. Timbang 0.1g daun muda dan bekukan dalam nitrogen cair.
2. Segera gerus dengan menggunakan mortal martil sampai halus menjadi bubuk.
3. Tambahkan 700 $\mu$ l buffer ekstrak, pindahkan ke dalam tabung eppendorf 1.5ml, kemudian vortex.
4. Inkubasi dalam waterbath bersuhu 65°C selama 30 menit.
5. Sentrifugasi dengan kecepatan 13000rpm pada suhu 4°C selama 10 menit.
6. Pindahkan supernatant yang diperoleh ke dalam tabung eppendorf 1.5ml yang baru. Tambahkan dengan PCI sejumlah volume yang sama kemudian vortex.

7. Sentrifugasi dengan kecepatan 13000rpm pada suhu 4°C selama 5 menit.
8. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1.5ml yang baru. Tambahkan dengan PCI sejumlah volume yang sama kemudian vortek.
9. Sentrifugasi 13000rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1.5ml yang baru kemudian ditambah dengan ammonium asetat 7.5M (0.1 vol) dan campur.
10. Inkubasi pada suhu -20°C selama 1-3jam.
11. Sentrifugasi 13000rpm selama 15 menit pada suhu 4°C.
12. Supernatant dibuang, kemudian pellet ditambah etanol 70% sebanyak 500µl dan homogenkan.
13. Setelah sentrifugasi, supernatant dibuang, pellet dikeringkan dalam incubator suhu 55°C.
14. DNA yang berupa pellet dilarutkan dalam 50µl buffer TE pH 7.6, larutan dicampur di suhu ruang sampai terlarut. DNA dapat disimpan pada suhu -20°C sampai saat digunakan.

#### **E. Pertanyaan**

Sebutkan dan jelaskan kesulitan-kesulitan apa saja yang anda hadapi pada praktikum di atas dan bagaimanakah cara mengatasinya.

## TOPIK V

### PENGUKURAN KONSENTRASI MOLEKUL DNA DENGAN METODE PLASTIC CLING WRAP

#### A. Pendahuluan

Ukuran molekul DNA teramat kecil sehingga tidak dapat dilihat dengan kasat mata. Namun demikian, ukuran panjang pendeknya, kuantitas, dan kualitas (tingkat kemurnian) molekul DNA dapat diketahui dengan akurat.

Kuantitas dan kualitas DNA dapat dilihat dengan menggunakan spektrofotometer dan dengan metode plastic cling wrap. Tingkat kemurnian DNA dengan spektrofotometer pada prinsipnya yaitu dengan melihat iradiasi sinar ultra violet yang diserap nukleotida dan protein dalam larutan. Penyerapan sinar tersebut dilakukan pada panjang gelombang 260nm, sedangkan penyerapan maksimal pada panjang gelombang 280nm. Sedangkan pengukuran dengan metode plastic cling wrap didasarkan pada membandingkan intensitas fluorescen yang dipancarkan oleh ethidium bromide dari sampel DNA dengan sampel DNA standard yang telah diketahui konsentrasinya.

#### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui teknik pengukuran kadar DNA dengan menggunakan metode plastic cling wrap.
2. Untuk mengetahui kadar DNA yang diukur dengan metode plastic cling wrap

#### C. Alat dan Bahan

1. UV transiluminator dan kamera (Gel-Doc)
2. Plastik cling wrap
3. Sampel DNA standard
4. Sampel DNA yang ingin diketahui kadarnya.
5. Larutan TE

#### D. Cara Kerja

1. Siapkan larutan stok etidium bromide (10mg/ml)
2. Ambil 2 $\mu$ l etidium bromide (larutan stok) dan masukkan ke dalam 10 ml TE.
3. Aduk sampai merata dan simpan dalam botol gelap (tidak tembus cahaya).
4. Hamparkan selebar plastic cling wrap di atas UV transiluminator.
5. Teteskan 1-5 $\mu$ l sampel DNA yang akan diukur konsentrasinya di atas plastic cling wrap tersebut, kemudian teteskan juga disebelahnya larutan DNA standard yang berkonsentrasi 2.5, 5, 10, dan 20 $\mu$ g/ml secara berurutan.

6. Setelah itu campurkan satu volume larutan TE (Tris-EDTA) yang mengandung 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ethidium bromide dengan sampel DNA yang akan diukur konsentrasinya dan larutan DNA standard.
7. Potret DNA tersebut. Bandingkan intensitas fluorescens antara DNA sampel dengan DNA standard.

**E. Tugas/Pertanyaan**

1. Sebutkan fungsi ethidium bromide pada praktikum di atas.
2. Berikan alasan penggunaan DNA standard dengan berbagai konsentrasi pada praktikum di atas.
3. Berapa kadar tertinggi dari sampel DNA yang diukur pada praktikum di atas.

## TOPIK VI

### POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

#### A. Pendahuluan

Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik perbanyakan/amplifikasi nukleotida melalui proses enzimatik yang dilakukan secara *in vitro*. Melalui teknik ini maka akan didapatkan nukleotida beberapa kali lipat dari jumlah nukleotida yang diamplifikasi. Salah satu kunci keberhasilan dari teknik ini adalah cara mengamplifikasi urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi DNA non target serta pada penggunaan suhu yang tepat pada berbagai tahap yang dilakukan.

Teknik ini meliputi 3 tahap yaitu tahap denaturasi, annealing, dan ekstensi. Pada tahap denaturasi akan terjadi proses pemisahan DNA dari untai ganda (*double strand*) menjadi DNA untai tunggal (*single strand*). Suhu pada tahap denaturasi berkisar antara suhu 92-95°C dengan suhu 94°C merupakan pilihan standar. Pada tahap annealing akan terjadi proses penempelan primer pada DNA target yang akan diamplifikasi. Suhu annealing biasanya adalah 5°C di bawah melting temperature ( $T_m$ ). Amplifikasi akan lebih efisien apabila suhu yang digunakan tidak kurang dari 37°C. Oleh karena itu, pemilihan suhu berkisar pada 55°C merupakan pilihan suhu yang tepat untuk tahap annealing agar dapat dihasilkan DNA yang mempunyai spesifitas yang tinggi. Sedangkan pada tahap ekstensi, terjadi proses pemanjangan untai baru DNA dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan DNA target dari ujung 5' sampai menuju ujung 3' DNA untai tunggal. Suhu yang umum digunakan dalam tahap ini adalah suhu 70-72°C. Secara umum berikut ini masing-masing suhu yang digunakan dari ketiga tahap dalam PCR:

Denaturasi : 95°C, 30 detik

Annealing : 55-60°C, 30 detik

Ekstensi : 72°C, waktu tergantung panjang pendeknya ukuran

DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi. Siklus amplifikasi biasanya berkisar pada 35 siklus.

#### B. Tujuan

Untuk mengetahui teknik amplifikasi DNA melalui teknik PCR.

#### C. Alat dan Bahan

Vivantis Amplification Kit

#### D. Cara Kerja

1. Thawing semua larutan/reagen yang akan dipakai.
2. Campurkan semua reagen yang akan dipakai dengan ketentuan sebagai berikut:

Reagent	Quantity ( $\mu$ l)	Final Concentration
Water, nuclease-free	38.1	-
10x ViBuffer A	5.0	1x
2mM Dntp mix	2.0	0.08mM
50mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5mM
10 $\mu$ M Forward Primer	1.0	0.2 $\mu$ M
10 $\mu$ M Reverse Primer	1.0	0.2 $\mu$ M
Control DNA (5ng/ $\mu$ l)	1.0	5ng
Taq DNA Polymerase (5u/ $\mu$ l)	0.4	2 unit
<b>Total Volume</b>	<b>50.0</b>	

- Homogenasi reagen, sentrifus sebentar agar larutan yang menempel di dinding atau tutup eppendorf turun ke bawah.
- Lakukan amplifikasi dengan ketentuan sebagai berikut:

Segment	No of cycles	Temperature	Duration
1	1	95	3 min
2	30	95	30 sec
		52	30 sec
		72	30 sec
3	1	72	5 min
	1	4	pause

- Ambil 5 $\mu$ l hasil PCR di atas dan elektroforesis dengan menggunakan 0.3-0.5 $\mu$ g VC 100bp plus DNA Ladder pada 1.0% gel agarose, dan warnai dengan menggunakan EtBr.

Catatan: Hasil PCR digunakan sebagai control positif (ukuran 1.4kb)

### E. Pertanyaan

- Sebutkan fungsi masing-masing bahan yang digunakan dalam praktikum di atas.
- Hitung kebutuhan masing-masing komponen penyusun bahan PCR di atas jika total volume yang diinginkan adalah 25 $\mu$ l.



## TOPIK VII

### 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.

## E. Pertanyaan

1. Jelaskan kegunaan elektroforesis horizontal dan vertical.
2. Jelaskan pula mekanisme pergerakan DNA pada gel yang digunakan dalam praktikum di atas.

## VIII

### ISOLASI PROTEIN

#### A. Pendahuluan

Protein adalah salah satu komponen penyusun sel yang berperan dalam membangun sel, menggantikan sel yang rusak, menjadi penyusun enzim, hormon, dan lain-lain. Berdasarkan komponen penyusunnya maka protein tersusun atas banyak asam amino hasil proses translasi yang dilakukan oleh sel. Oleh karena protein merupakan makromolekul yang ada di dalam sel dan memiliki gugus asam (COOH) dan dapat juga memiliki gugus basa (NH<sub>2</sub>), serta protein mudah rusak maka ekstraksi protein harus memperhatikan agar struktur protein tidak rusak (mengalami denaturasi) dengan cara melakukan proses isolasi pada suhu rendah (0-4°C) dalam buffer dan pH tertentu (tergantung pada jenis protein yang dianalisis).

Proses isolasi protein secara umum sama dengan isolasi pada DNA maupun RNA yaitu terdiri dari beberapa tahap yang meliputi tahap memisahkan sel dari jaringan, tahap menghancurkan membran/dinding sel, tahap memisahkan organel dari molekul penyusunnya serta tahap memisahkan protein dari molekul penyusun yang lain. Jika protein diisolasi dari darah maka dapat menggunakan plasma atau serum yang ada dalam darah. Oleh karena itu darah terlebih dahulu harus dipisahkan dari sel darah melalui proses sentrifugasi. Selanjutnya protein hasil isolasi dapat diketahui kadarnya dalam suatu sampel dengan menggunakan spektrofotometer dan kemudian dapat digunakan untuk kepentingan lebih lanjut baik untuk kepentingan elektroforesis maupun yang lain.

#### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui teknik isolasi protein pada sampel serum dan organ hewan (contoh hepar, ginjal, dan paru).
2. Untuk mengetahui kadar protein yang terdapat dalam sampel yang diisolasi.

#### C. Alat dan Bahan

1. Serum darah tikus/mencit
2. Hepar, ginjal, dan paru tikus/ mencit
3. Buffer Ekstrak yang terdiri dari 1mM PMSF dalam DMSO sebanyak 100µl, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4 sebanyak 500µl, 0.5% Nonidet P-40 sebanyak 5 µl serta aquabides sebanyak 345 µl.

#### D. Cara Kerja

##### Isolasi protein dari sampel organ hewan

1. Siapkan hewan coba yang akan digunakan dengan cara melakukan dislokasi.
2. Bedah dan ambil organ yang akan digunakan.

3. Timbang 0.5g sampel dan cuci dalam PBS, lakukan sampai sampel benar-benar terbebas dari darah yang menempel.
4. Hancurkan sampel dengan menggunakan mortal martil yang sudah dibekukan (ingat lakukan proses ini pada suhu rendah).
5. Tambahkan 1 ml bufer ekstrak ke dalam mortal martil yang berisi sampel yang digerus.
6. Ambil homogenat dan masukkan ke dalam tabung, lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit.
7. Ambil supernatan yang didapat dan masukkan ke dalam tabung yang baru dan selanjutnya gunakan untuk elektroforesis dan ukur juga kadar protein yang terkandung di dalamnya dengan menggunakan spektrofotometer.

#### **E. Pertanyaan**

1. Sebutkan fungsi bahan-bahan yang ada dalam buffer ekstrak yang digunakan dalam isolasi protein di atas.
2. Kesulitan apa yang saudara alami pada isolasi protein di atas dan bagaimana cara mengatasinya.

## TOPIK IX

### PENGUKURAN KADAR PROTEIN DENGAN MENGGUNAKAN METODE BIURET

#### A. Pendahuluan

Protein hasil isolasi dengan menggunakan buffer ekstrak dan reagen lain perlu diukur kadar protein yang terkandung di dalamnya. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kandungan protein yang terdapat dalam sampel yang diisolasi. Selain itu pengukuran dilakukan juga dengan tujuan untuk mengecek proses isolasi yang dilakukan apakah berhasil atau tidak.

Metode untuk mengukur kadar protein pada sampel yang diisolasi dapat menggunakan metode biuret, metode bradford, metode Lowry, dan lain-lain. Namun, dalam praktikum ini hanya menggunakan metode biuret sebagai pereaksinya dimana protein akan bereaksi dengan  $\text{CuSO}_4$  dan  $\text{NaOH}$  yang ada pada biuret membentuk kompleks yang berwarna ungu. Secara umum metode pengukuran ini ada 2 tahap yaitu tahap pembuatan kurva standar dan tahap pengukuran kadar protein sampel. Kedua tahap tersebut diukur dengan menggunakan spektrofotometer.

#### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui teknik pembuatan kurva standart protein
2. Untuk mengetahui teknik pengukuran kadar protein hasil isolasi

#### C. Alat dan Bahan

1. Bovine serum albumin (BSA)
2. Biuret
3.  $\text{NaCl}$  0.9%
4. Tabung reaksi
5. Kuvet
6. Spektrofotometer

#### D. Cara Kerja

1. Siapkan tabung reaksi dengan ketentuan sebagai berikut:

Reagent	Tabung							
	1	2	3	4	5	6	7	8
3.0 mg/mL BSA (mL)	0	0.2	0.4	0.7	1.0	2.0	3.0	-
Protein sample (mL)	-	-	-	-	-	-	-	1.0
0.9% $\text{NaCl}$ (mL)	3.0	2.8	2.6	2.3	2.0	1.0	0	2.0
<b>Final Concentration (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>0</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>700</b>	<b>1000</b>	<b>2000</b>	<b>3000</b>	<b>-</b>

2. Tambahkan 3 ml pereaksi biuret, vortex dan inkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 30 menit.
3. Masukkan sampel ke dalam kuvet dan selanjutnya masukkan ke dalam spektrofotometer.

4. Lakukan pembacaan nilai absorbansi pada tabung 7 dengan menggunakan panjang gelombang 540 nm, 550nm, dan 560 nm. Ulang pembacaan pada masing-masing panjang gelombang sebanyak 3 kali. Rerata tertinggi yang didapatkan pada panjang gelombang tertentu dijadikan patokan untuk digunakan pada pengukuran standart yang lain. Sebagai contoh jika rerata tertinggi didapatkan pada panjang gelombang 550nm maka standar selanjutnya dan sampel diukur pada panjang gelombang tersebut. Gunakan tabung 1 sebagai blanko.
5. Gambarkan kurva standar kadar protein yang diperoleh dengan mengplotkan nilai absorbansi pada sumbu y dan kadar protein dari masing-masing larutan pada sumbu x (gunakan program excell atau yang lain).
6. Hitung persamaan garis liniernya dengan persamaan  $y=a+bx$  dan perkirakan nilai r. Semakin teliti mengerjakannya maka nilai r yang didapatkan akan mendekati +1 atau 1.

#### **E. Pertanyaan**

1. Berikan alasan mengapa perlu dibuat kurva standar?
2. Apakah ada perbedaan hasil pada sampel yang saudara ukur, mengapa demikian?

# TOPIK X

## ANALISIS BIOLOGI MOLEKULER DENGAN METODE ELISA

### A. Pendahuluan

ELISA adalah salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui kadar protein tertentu dalam suatu sel. Prinsip dalam teknik ini adalah pada pengikatan antara antibody dan antigen. Ada 3 macam teknik ELISA diantaranya adalah indirect, sandwich, dan competitive ELISA. Berbagai teknik ELISA tersebut terletak pada reagen apa yang terlebih dahulu dilapiskan pada well yang digunakan.

Pada indirect ELISA, antigen terlebih dahulu dilapiskan pada well yang akan digunakan dan selanjutnya berturut-turut ditambahkan antibody, enzim, dan substrat. Sandwich ELISA diawali dengan melapiskan antibody, antigen, enzim dan substrat. Sedangkan pada competitive ELISA dimulai dengan menginkubasi antigen dengan antibody terlebih dahulu dan kemudian melapiskannya ke dalam well yang akan digunakan, menambahkan enzim dan substrat ke dalam well yang digunakan. Pada bagian akhir dari ketiga macam teknik ELISA selanjutnya adalah tahap pembacaan dengan menggunakan mesin ELISA READER. Adanya perubahan warna dari proses pelapisan sampel dengan antigen, antibody, enzim, dan substrat menunjukkan adanya kadar sampel yang dibaca.

Salah satu sampel yang dapat dibaca dengan menggunakan ELISA adalah testosterone. Hormon ini adalah hormone yang berpengaruh dalam sistim reproduksi laki-laki terutama dalam mempengaruhi spermatogenesis. Kadar hormone ini memungkinkan proses spermatogenesis dapat berjalan sehingga spermatozoa terbentuk. Untuk mengetahui keberadaan hormone tersebut ELISA adalah salah satu teknik yang memungkinkan apakah sampel serum yang diisolasi dari darah tersebut mengandung testosterone atau tidak (kualitatif) dan berapa kadar yang terkandung di dalamnya (kuantitatif).

### B. Tujuan

1. Untuk mengetahui alat-alat utama dan pendukung yang digunakan dalam teknik ELISA.
2. Untuk memahami prinsip kerja dalam teknik ELISA.
3. Untuk mengetahui kadar testosterone dari hasil pengukuran sampel serum dengan teknik ELISA.

### C. Alat dan Bahan

1. Mesin ELISA
2. Reagent ELISA untuk testosteron
3. Serum
4. Tissue
5. Mikropipet dan tips
6. Aluminium foil
7. Eppendorf PCR

#### D. Cara Kerja

1. Preparasi reagen  
Siapkan wash solution dengan cara mengencerkan wash solution dengan Deionized water (DI) dengan perbandingan (wash solution: DI= 1:30). Catatan setiap well membutuhkan 100µl wash solution/satu kali washing.
2. Pembuatan standart  
Standart 5 (80pg/ml)= 150 µl standart diluents+150 µl stock wash solution.  
Standart 4 (40pg/ml)= 150 µl standart diluents+150 µl standart 5.  
Standart 3 (20pg/ml)= 150 µl standart diluents+150 µl standart 4.  
Standart 2 (10pg/ml)= 150 µl standart diluents+150 µl standart 3.  
Standart 1 (5pg/ml)= 150 µl standart diluents+150 µl standart 2.
3. Persiapan sampel dengan cara memasukkan 40 µl sampel dilution dan 10 µl serum ke dalam eppendorf PCR, vortex.
4. Masukkan (standart, sampel) masing-masing 50 µl ke dalam well (kecuali blank well), tutup.
5. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C (gunakan incubator).
6. Setelah inkubasi selesai buka membrane plate, serap cairan dengan menggunakan tissue dan ketuk plate agar cairan terserap maksimal.
7. Washing dengan 100 µl wash solution yang telah dibuat pada point 1, goyang-goyang plate agar homogen. Buang cairan dengan cara menyerap cairan tersebut dengan menggunakan tissue seperti yang dilakukan pada point 6. Lakukan proses washing sebanyak 3 kali.
8. Menambahkan 50µl HRP-conjugate reagent ke dalam masing-masing well (kecuali blank well), tutup.
9. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C (gunakan incubator). Washing sama seperti yang dilakukan pada point 7.
10. Menambahkan 50 µl campuran chromogen A dan chromogen B ke dalam well. Inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C, hindari cahaya.
11. Menambahkan 50 µl stop solution, goyang-goyang. Amati perubahan warna (biru akan berubah menjadi kuning).
12. Baca absorbansinya dengan ELISA reader pada 450nm.
13. Untuk mengetahui kadar testosterone yang terkandung, masukkan data absorbansi ke dalam program excell. Buat kurva standart dengan menggunakan persamaan  $Y=ax+b$ , dimana  $x$  menunjukkan kadar testosterone, sedangkan  $y$  menunjukkan nilai absorbansi yang didapat. Selanjutnya dari hasil persamaan yang didapat masukkan nilai absorbansi dari sampel yang akan dicari kadarnya.
14. Laporkan hasil yang saudara dapat dalam praktikum tersebut.

#### E. Data pengamatan

- a. Intensitas warna (biru menjadi kuning)

Sampel	Intensitas warna
Standart 5 (80pg/ml)	
Standart 4 (40pg/ml)	



Standart 3 (20pg/ml)	
Standart 2 (10pg/ml)	
Standart 1 (5pg/ml)	
Sampel serum 1	
Sampel serum 2	

Keterangan:

Intensitas warna beri tanda +, ++, +++, dst

b. Nilai absorbansi

Sampel	Nilai absorbansi pada 450nm
Standart 5 (80pg/ml)	
Standart 4 (40pg/ml)	
Standart 3 (20pg/ml)	
Standart 2 (10pg/ml)	
Standart 1 (5pg/ml)	
Sampel serum 1	
Sampel serum 2	

c. Kadar testosteron (ng/ml)

Sampel	Kadar testosteron (ng/ml)
Sampel serum 1	
Sampel serum 2	

**F. Tugas/Pertanyaan**

1. Sebutkan masing-masing fungsi bahan yang digunakan dalam praktikum yang sudah saudara lakukan.
2. Berapa nilai persamaan regresi yang saudara dapatkan dan berapa pula nilai R yang didapatkan.
3. Jelaskan proses perubahan warna pada pada praktikum yang sudah saudara lakukan.
4. Apakah ada perbedaan hasil dari masing-masing sampel yang saudara uji, mengapa demikian?  
Kesulitan atau kegagalan apa yang saudara dapatkan dari praktikum yang sudah saudara lakukan. Mengapa demikian?