



Uhamka
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA

MODUL PRAKTIKUM BIOLOGI MOLEKULER
NURUL AZMAH NIKMATULLAH, S.Si, M.Kes

VISI, MISI, DAN TUJUAN PROGRAM STUDI D4 ANALIS KESEHATAN/ TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK

VISI

Pada tahun 2028 menjadi *prophetic teaching* program studi Analis Kesehatan/Teknologi Laboratorium Medik yang menghasilkan lulusan dengan kecerdasan spiritual, intelektual, emosional, dan sosial serta unggul di bidang biologi molekuler.

MISI

- a. Menyelenggarakan pendidikan dan pengajaran D4 Analis Kesehatan/Teknologi Laboratorium Medik yang terintegrasi dengan nilai-nilai Al-Islam dan Kemuhammadiyah;
- b. Menyelenggarakan pendidikan dan pengajaran D4 Analis Kesehatan/Teknologi Laboratorium Medik serta pembinaan kemahasiswaan yang bermutu tinggi untuk menghasilkan lulusan yang cerdas secara spiritual, intelektual, emosional, dan sosial, serta unggul di bidang biologi molekuler;
- c. Menyelenggarakan penelitian dan pengabdian kepada masyarakat bidang Analis Kesehatan/Teknologi Laboratorium Medik yang unggul dan bermanfaat secara nyata dalam kehidupan sehari-hari, khususnya di bidang biologi molekuler;
- d. Menyelenggarakan kerjasama dalam bidang Analis Kesehatan/Teknologi Laboratorium Medik pada tingkat nasional dan internasional.

TUJUAN

- a. Mewujudkan kampus yang memiliki norma akademik yang mengintegrasikan Al Islam dan Kemuhammadiyah dengan bidang Analis Kesehatan/Teknologi Laboratorium Medik;
- b. Menghasilkan sarjana terapan Analis Kesehatan/Teknologi Laboratorium Medik yang cerdas secara spiritual, intelektual, emosional, dan sosial, serta unggul dalam bidang biologi molekuler;

- c. Menghasilkan karya ilmiah dari penelitian dan kontribusi pengabdian kepada masyarakat bidang Analis Kesehatan/Teknologi Laboratorium Medik yang bermutu tinggi dan berdampak luas, khususnya di bidang biologi molekuler;
- d. Terselenggaranya kerjasama di bidang Analis Kesehatan/Teknologi Laboratorium Medik secara nasional dan internasional untuk tercapainya program studi yang berkemajuan.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah Yang Maha Esa, atas limpahan rahmat dan petunjuknya sehingga Modul Praktikum Biologi Molekuler dapat diselesaikan. Penuntun praktikum ini disusun guna memberikan petunjuk dan pegangan bagi para mahasiswa program Studi Analisis Kesehatan yang akan melaksanakan praktikum biologi molekuler.

Penyusun menyadari bahwa buku penuntun ini masih jauh dari sempurna dan mungkin masih terdapat banyak kekurangan. Untuk itu penyusun sangat mengharapkan kritik dan saran guna perbaikan Modul Praktikum Biologi Molekuler, dan nantinya untuk dapat lebih menyempurnakan di kemudian hari.

Semoga Modul Praktikum Biologi Molekuler ini dapat bermanfaat adanya.

Jakarta, 01 September 2023

Nurul Azmah N., M.Kes

DAFTAR ISI

<u>VISI, MISI, DAN TUJUAN.....</u>	<u>I</u>
<u>PROGRAM STUDI D4 ANALIS KESEHATAN/</u>	<u>I</u>
<u>TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK.....</u>	<u>I</u>
<u>KATA PENGANTAR.....</u>	<u>III</u>
<u>DAFTAR ISI.....</u>	<u>IV</u>
<u>TATA TERTIB PRAKTIKUM</u>	<u>VII</u>
<u>DESKRIPSI MATA KULIAH PRAKTIKUM</u>	<u>II</u>
<u>PETUNJUK PENGGUNAAN MODUL PRAKTIKUM.....</u>	<u>III</u>
<u>PRAKTIKUM 1: TEKNIK PIPETING.....</u>	<u>1</u>
1. KOMPETENSI DASAR.....	1
2. INDIKATOR CAPAIAN	1
3. TUJUAN PRAKTIKUM	1
4. URAIAN TEORI.....	1
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM.....	3
6. EVALUASI.....	5
7. SOAL LATIHAN.....	5
8. DAFTAR PUSTAKA.....	6
<u>PRAKTIKUM 2: ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL OLAHAN DAGING.....</u>	<u>7</u>
1. KOMPETENSI DASAR.....	7
2. INDIKATOR CAPAIAN	7
3. TUJUAN PRAKTIKUM	7
4. URAIAN TEORI.....	7
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM.....	8
6. EVALUASI.....	10
7. SOAL LATIHAN.....	10
8. DAFTAR PUSTAKA.....	10
<u>PRAKTIKUM 3: ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL RAMBUT</u>	<u>11</u>
1. KOMPETENSI DASAR.....	11
2. INDIKATOR CAPAIAN	11

3. TUJUAN PRAKTIKUM	11
4. URAIAN TEORI	11
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	12
6. EVALUASI	13
7. SOAL LATIHAN	14
8. DAFTAR PUSTAKA	14

PRAKTIKUM 4: ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL DARAH 15

1. KOMPETENSI DASAR.....	15
2. INDIKATOR CAPAIAN	15
3. TUJUAN PRAKTIKUM	15
4. URAIAN TEORI	15
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	16
6. EVALUASI	18
7. SOAL LATIHAN	18
8. DAFTAR PUSTAKA	18

PRAKTIKUM 5: ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL ISOLAT BAKTERI 19

1. KOMPETENSI DASAR.....	19
2. INDIKATOR CAPAIAN	19
3. TUJUAN PRAKTIKUM	19
4. URAIAN TEORI	19
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	20
6. EVALUASI	22
7. SOAL LATIHAN	22
8. DAFTAR PUSTAKA	22

PRAKTIKUM 6: ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL FESES..... 23

1. KOMPETENSI DASAR.....	23
2. INDIKATOR CAPAIAN	23
3. TUJUAN PRAKTIKUM	23
4. URAIAN TEORI	23
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	25
6. EVALUASI	26
7. SOAL LATIHAN	27
8. DAFTAR PUSTAKA	27

MATERI PRAKTIKUM 7: ISOLASI DAN PURIFIKASI RNA DARI SAMPEL SWAB NASOFARING 28

1. KOMPETENSI DASAR.....	28
2. INDIKATOR CAPAIAN	28
3. TUJUAN PRAKTIKUM	28

4. URAIAN TEORI.....	28
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM.....	30
6. EVALUASI.....	32
7. SOAL LATIHAN.....	32
8. DAFTAR PUSTAKA.....	33
<u>MATERI PRAKTIKUM 9: ELEKTROFORESIS DNA</u>	34
1. KOMPETENSI DASAR.....	34
2. INDIKATOR CAPAIAN	34
3. TUJUAN PRAKTIKUM	34
4. URAIAN TEORI	34
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	35
6. EVALUASI.....	37
7. SOAL LATIHAN.....	38
8. DAFTAR PUSTAKA.....	38
<u>MATERI PRAKTIKUM 10: KONSENTRASI DAN KEMURNIAN DNA..</u>	39
1. KOMPETENSI DASAR.....	39
2. INDIKATOR CAPAIAN	39
3. TUJUAN PRAKTIKUM	39
4. URAIAN TEORI	39
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	40
6. EVALUASI.....	40
8. DAFTAR PUSTAKA.....	41
<u>MATERI PRAKTIKUM 11: AMPLIFIKASI DNA.....</u>	42
1. KOMPETENSI DASAR.....	42
2. INDIKATOR CAPAIAN	42
3. TUJUAN PRAKTIKUM	42
4. URAIAN TEORI	42
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	45
6. EVALUASI.....	49
7. SOAL LATIHAN.....	50
8. DAFTAR PUSTAKA.....	50

TATA TERTIB PRAKTIKUM

Mahasiswa yang diperkenankan melakukan praktikum adalah mereka yang terdaftar secara akademik, yang selanjutnya disebut sebagai Praktikan.

1. Praktikan wajib hadir 10 menit sebelum praktikum dimulai, keterlambatan lebih dari 10 menit sejak praktikum dimulai , praktikan dianggap tidak hadir.
2. Jika berhalangan hadir, atau akan mengganti hari praktikan wajib memberikan keterangan tertulis terkait dengan alasan ketidakhadirannya kepada dosen atau asisten pengampu.
3. Praktikan memasuki ruang laboratorium dengan telah menggunakan jas laboratorium dan sepatu tertutup.
4. Praktikan wajib membawa laporan, laporan kerja praktikum, serbet, masker, tisu, dan alat-alat yang dibutuhkan pada saat praktikum.
5. Tidak diperbolehkan makan, minum, merokok, dan keluar masuk laboratorium kecuali ada izin dari koordinator pengampu praktikum.
6. Dilarang berisik, bercanda, tertawa atau mengganggu teman pada saat praktikum berlangsung.
7. Dilarang memakai perhiasan, “contact Lens/Soft Lens” yang dapat rusak karena bahan kimia.
8. Praktikan bertanggung jawab atas peralatan yang dipinjamnya, kebersihan meja masing-masing serta lantai disekitarnya.
9. Bila terjadi kerusakan alat atau alat gelas yang pecah maka praktikan wajib menggantinya segera.
10. Setelah menggunakan reagen, praktikan wajib meletakkan kembali ke tempat semula.
11. Sewaktu waktu Dosen, atau asisten jaga dapat melakukan tes untuk materi yang akan atau telah dikerjakan.

12. Praktikan melakukan analisis sesuai dengan materi yang dipraktikkan, mencatat hasilnya pada laporan praktikum serta meminta ACC pada dosen/asisten penjaga.

DESKRIPSI MATA KULIAH PRAKTIKUM

Mata kuliah Praktikum Biologi Molekuler merupakan mata kuliah wajib bagi mahasiswa program studi D4 Analisis Kesehatan. Mata kuliah ini mengajarkan tentang teknik analisis Biologi Molekuler terkait dengan teknik pipetting, preparasi sampel dan reagen, metode ekstraksi/isolasi DNA dan RNA dari berbagai macam sampel, teknik DNA elektroforesis (kualitas DNA), kuantitas DNA (Nanodrop), metode PCR dan validasi hasil amplifikasi PCR. Model pembelajaran yang digunakan yaitu praktikum, tanya jawab, diskusi dan kajian literatur.

PETUNJUK PENGGUNAAN MODUL PRAKTIKUM

Hal-hal yang harus diperhatikan :

1. Modul praktikum wajib dibawa pada saat memasuki laboratorium
2. Sebelum mulai praktikum saudara diwajibkan membaca dan memahami prosedur yang akan dilakukan setiap materi praktikum
3. Saudara wajib mengerti dan memahami materi dari setiap kegiatan praktikum serta mempelajari hubungannya dengan materi yang diperoleh dalam materi perkuliahan/buku teks.
4. Pada saat praktikum mahasiswa mencatat hasil pengamatan pada setiap lembaran evaluasi dan pembahasan.
5. Serahkan laporan praktikum anda tanpa ditunda-tunda.

Pembuatan Laporan

Laporan praktikum dikumpulkan perorangan dan dikumpulkan satu minggu setelah praktikum. Setiap laporan mengenai satu macam percobaan harus memuat hal – hal berikut:

1. Judul percobaan : Singkat dan tercantum tanggal serta kelompok percobaan
2. BAB I : Latar belakang dan tujuan praktikum
3. BAB II : Tinjauan Pustaka
4. BAB III : Metode Kerja
5. BAB IV : Hasil Praktikum
6. BAB V : Pembahasan
7. BAB VI : Kesimpulan
8. Daftar Pustaka : Minimal 15 artikel dan buku 10 tahun terakhir

PRAKTIKUM 1: TEKNIK PIPETING

1. Kompetensi Dasar

- a. Mampu menggunakan mikropipet dengan benar
- b. Mengetahui cara merawat mikropipet
- c. Mampu memipet sampel dan reagen secara akurat

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa mampu menggunakan mikropipet dengan benar serta mengetahui cara merawat mikropipet
- b. Mahasiswa mampu memipet sampel dan reagen sesuai dengan volume yang diinginkan secara akurat

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Menggunakan mikropipet dengan benar
- b. Merawat mikropipet
- c. Memipet sampel dan reagen secara akurat

4. Uraian Teori

Pipetting adalah proses menggunakan pipettor untuk mengukur dan mengeluarkan volume kecil cairan. Ini adalah teknik mendasar yang digunakan dalam banyak prosedur laboratorium, termasuk menyiapkan larutan, mengeluarkan sampel untuk analisis, dan melakukan berbagai jenis pengujian.

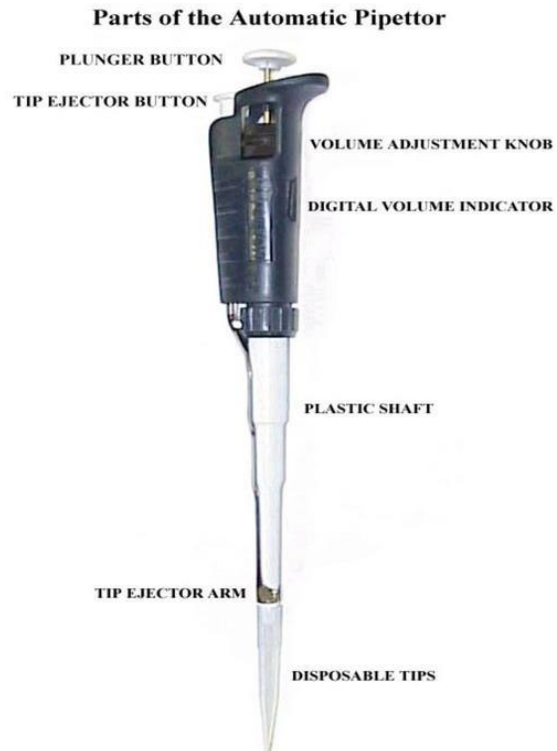
Pipetting merupakan salah satu teknik yang menentukan keberhasilan dalam beberapa penelitian yang ada di dalam biologi. Kegiatan *pipetting* adalah pengambilan volume bermanfaat untuk ketepatan dalam pengambilan sesuai prosedur yang diinginkan. Teknik *pipetting* yang tepat memungkinkan reagen yang digunakan 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 0.5 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 *pipetting* 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 mikropipet (gambar 1) :

- a. *Plunger button* : bagian ini bergerak ke atas ketika dilepas dan ke bawah ketika ditekan. Bagian ini berfungsi untuk menarik/mengeluarkan cairan
- b. *Top eject button* : berfungsi mendorong plastik tip agar terlepas dari mikropipet
- c. *Volume indicator* : menunjukkan jumlah cairan yang dipipet
- d. *Volume adjustment* : bagian pengaturan jumlah cairan yang dipipet
- e. *Tip attachment* : bagian penempelan *disposable tip*
- f. Plastik tip : bagian yang berkontak langsung dan menampung liquid saat dilakukan proses penarikan volume tertentu liquid hingga ditransfer. Besarkecilnya disesuaikan dengan kapasitas mikropipet dan volume liquid yang ditransfer.



Gambar 1. Bagian – bagian pipet

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat:

1. Mikropipet 0.5 – 10 μL
2. Mikropipet 10 – 100 μL
3. Mikropipet 20 – 200 μL
4. Mikropipet 100 – 1000 μL

Bahan:

1. Tip ukuran 10 μL
2. Tip ukuran 100 μL
3. Tip ukuran 200 μL
4. Tip ukuran 1000 μL
5. Aquades

6. Mikrotube 1.5 mL

b. Prosedur Kerja

1. Transfer aquades 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:

Tabel 1. Volume Pengukuran

NO	Volume yang akan di pipet	Ukuran mikropipet yang dipakai
1.	500 μL	100 – 1000 μL
2.	200 μL	100 – 1000 μL
3.	200 μL	20 – 200 μL
4.	150 μL	20 – 200 μL
5.	50 μL	20 – 200 μL
6.	100 μL	10 – 100 μL
7.	50 μL	10 – 100 μL
8.	20 μL	10 – 100 μL
9.	10 μL	10 – 100 μL
10.	10 μL	0.5 – 10 μL
11.	5 μL	0.5 – 10 μL
12.	3 μL	0.5 – 10 μL
13.	2 μL	0.5 – 10 μL
14.	1 μL	0.5 – 10 μL
15.	0.5 μL	0.5 – 10 μL

2. Lakukan proses transfer masing – masing volume aquades sesuai tabel 1 sebanyak 5 kali
3. Timbang aquades yang sudah ditransfer ke dalam tube dan catat hasilnya.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

NO	Volume yang akan di pipet	Ukuran mikropipet yang dipakai	Hasil Penimbangan
1.	500 μL	100 – 1000 μL	
2.	200 μL	100 – 1000 μL	
3.	200 μL	20 – 200 μL	
4.	150 μL	20 – 200 μL	
5.	50 μL	20 – 200 μL	
6.	100 μL	10 – 100 μL	
7.	50 μL	10 – 100 μL	
8.	20 μL	10 – 100 μL	
9.	10 μL	10 – 100 μL	
10.	10 μL	0.5 – 10 μL	
11.	5 μL	0.5 – 10 μL	
12.	3 μL	0.5 – 10 μL	
13.	2 μL	0.5 – 10 μL	
14.	1 μL	0.5 – 10 μL	
15.	0.5 μL	0.5 – 10 μL	

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

A. Sebutkan cara memipet reagen yang akurat !

B. Sebutkan cara memipet sampel yang akurat !

C. Berikan alasan mengapa harus memipet secara akurat !

8. Daftar Pustaka

1. Andalia,N.; Adriani; Wardani, A.H.; Sahli, I.T.; Yunus, R.; Solfaine, R.; Nikmatullah, N.A.; Meri; Rusdin, A.; Safitri, N.M., 2023, Biologi Molekuler, PT Global Eksekutif Teknologi, ISBN: 9786231983497
2. Lyman K, Fisher D, Chetkovich M. 2015. A novel method for reducing human pipetting errors. *Academic Journals*. 6(6) : 36-40
3. Seprianto, Naroeni A. 2017. *Penuntun Praktikum Instrumentasi Bioteknologi*
4. Subeno, E. 2009. Ketidakpastian Pengukuran. Balai metrologi Semarang: Semarang

PRAKTIKUM 2: ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL OLAHAN DAGING

1. Kompetensi Dasar

- a. Mampu mempersiapkan sampel olahan daging
- b. Mampu mempersiapkan reagen ekstraksi DNA
- c. Mampu mengisolasi DNA dari sampel olahan daging

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa dapat melakukan preparasi sampel olahan daging dan preparasi reagen ekstraksi DNA
- b. Mahasiswa dapat mengisolasi DNA dari sampel olahan daging

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan preparasi sampel olahan daging
- b. Melakukan preparasi reagen ekstraksi DNA
- c. Mengisolasi DNA dari sampel olahan daging

4. Uraian Teori

Deoxyribonucleic acid (DNA) adalah salah satu asam nukleat polinukleotida atau untai ganda. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) tersusun dari komponen seperti gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen. Untaian DNA terdiri dari rangkaian nukleotida dan terhubung dengan ikatan fosfodiester. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) adalah salah satu senyawa kimia yang terdapat pada makhluk hidup, DNA ini sangat penting dalam pewarisan sifat atau keturunan. DNA memiliki tugas sebagai pembawa materi genetik yang membawa sifat keturunan.

Ekstraksi DNA merupakan salah satu tahap utama yang dilakukan untuk mendapatkan DNA dari suatu sampel. Ekstraksi DNA ada beberapa proses penting dari awal proses ekstraksi hingga proses akhir ekstraksi. Tahapan pada proses ekstraksi DNA diawali dengan persiapan sampel, memilih metode ekstraksi sampai mendapatkan ekstrak DNA. Ekstraksi DNA dilakukan untuk proses pemisahan DNA dari komponen-komponen lain seperti lemak, protein, dan karbohidrat. Proses ekstraksi DNA terdapat tiga tahap yaitu dimulai dari

melisiskan dinding sel, pemisahan DNA dari komponen lain, dan pemurnian DNA. Proses penghancuran sel dalam ekstraksi DNA bertujuan untuk mengeluarkan bagian dalam sel, selanjutnya memisahkan DNA dari komponen lain seperti protein, karbohidrat, dan lemak.

Makanan merupakan kebutuhan pokok manusia yang pengolahannya perlu diperhatikan dengan baik dan benar agar bermanfaat bagi tubuh. Keberagaman makanan ini berkembang pesat sejalan dengan munculnya jenis olahan baru. Sosis merupakan salah satu jenis olahan berbahan dasar daging yang sangat digemari oleh masyarakat Indonesia terutama anak-anak. Akan tetapi belakangan ini tidak jarang masyarakat menemukan makanan yang tidak lagi terjamin keamanannya. Seperti pencampuran produk olahan daging dengan jenis daging lain yang tidak diperbolehkan untuk dikonsumsi masyarakat tertentu terkait dengan budaya dan agama. Pencampuran tersebut mempunyai tujuan agar dapat menekan biaya produksi. Contoh kasus yang telah beredar di beberapa daerah bahwa adanya penambahan daging tikus pada bakso sapi yang mengakibatkan kekhawatiran serta meresahkan masyarakat.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat:

1. Mikropipet 100 – 1000 μL
2. Mikropipet 10 – 100 μL
3. Heat block atau water bath
4. *Sentrifuge*
5. Vortex
6. Timbangan analitik

Bahan:

1. Sampel olahan daging (Sosis, Nugget, Bakso)
2. *Progenus EasyFast™ Extraction Kit for Meat Product* Kit ekstraksi DNA (*Solution A* dan *Solution B*)
3. *Nuclease Free Water* (NFW)
4. Mikrotube 1.5 mL

5. Tips filter ukuran 1000 μL
6. Tips filter ukuran 100 μL
7. Pisau bedah
8. Plastik wrap

b. Prosedur Kerja

Preparasi Reagen Ekstraksi DNA

1. NFW sebanyak 10 mL di pipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 mL
2. Solution A ditambahkan sebanyak 180 μL ke dalam tabung falcon, kemudian di homogenkan.
3. NFW sebanyak 10 mL di pipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 mL
4. Solution B ditambahkan sebanyak 180 μL ke dalam tabung falcon, kemudian di homogenkan.

Preparasi Sampel

1. Sampel olahan daging dicincang hingga halus
2. Sampel ditimbang sebanyak 250 mg kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 mL.
3. Sampel dilanjutkan ke tahapan ekstraksi

Ekstraksi DNA

1. Mikrotube yang berisi sampel ditambahkan dengan reagen *Solution A* sebanyak 500 μL .
2. Sampel dihomogenkan menggunakan alat *vortex* selama 10 detik.
3. Sampel yang telah di *vortex*, kemudian diinkubasi pada suhu 95°C selama 15 menit.
4. Mikrotube berisi sampel yang telah diinkubasi, dibiarkan pada suhu ruang.
5. Reagen *Solution B* sebanyak 500 μL ditambahkan ke dalam mikrotube .
6. Sampel dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 30 detik.

PRAKTIKUM 3: ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL RAMBUT

1. Kompetensi Dasar

- a. Mampu mempersiapkan sampel rambut
- b. Mampu mempersiapkan reagen ekstraksi DNA
- c. Mampu mengisolasi DNA dari sampel rambut

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa dapat melakukan preparasi sampel rambut dan preparasi reagen ekstraksi DNA
- b. Mahasiswa dapat mengisolasi DNA dari sampel rambut

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan preparasi sampel rambut
- b. Melakukan preparasi reagen ekstraksi DNA
- c. Mengisolasi DNA dari sampel rambut

4. Uraian Teori

Rambut merupakan struktur derivatif khusus dari kulit dan merupakan salah satu ciri khas yang mendefinisikan karakteristik dari manusia. Akar rambut terkubur dalam dibawah lapisan epidermis kulit dan terlindungi dalam folikel rambut. Setiap rambut mengalami proses pertumbuhan melalui siklus yang terdiri dari fase anagen, catagen dan telogen, yaitu fase tumbuh, regresi dan istirahat. Berbagai jenis sitokin dan hormon pertumbuhan dipercaya terlibat dalam regulasi siklus pertumbuhan rambut. Rambut memiliki peran penting dalam kehidupan sosial manusia dan merupakan salah satu daya tarik manusia.

Sampel beberapa rambut (7-10) dengan folikel utuh diperlukan untuk mendapatkan hasil terbaik dari tes DNA rambut. Untuk memastikan sampel rambut memiliki folikel yang diperlukan, penting untuk memperhatikan ujung rambut dengan cermat. Rambut dengan folikel utuh akan tampak sedikit lebih tebal di ujung akar dan anda akan melihat bola kecil berwarna terang yang disebut papila dermal. Setelah penyedia pengujian menerima sampel rambut, mereka dapat mulai memprosesnya untuk ekstraksi DNA.

Metode Ekstraksi DNA merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi analisis DNA yang diperoleh dari kromosom inti maupun dari organel, yaitu mitokondria dan kloroplas. Langkah-langkah yang diperlukan terdiri dari pemecahan membran sel dan membran inti yang dilanjutkan dengan pemisahan DNA dari berbagai komponen sel lain.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat :

1. Mikropipet 100 – 1000 μL
2. Mikropipet 10 – 100 μL
3. Heat block atau water bath
4. *Sentrifuge*
5. Vortex

Bahan:

1. Sampel rambut
2. gSYNC™ DNA Extraction Kit (GST buffer, Proteinase K, GSB buffer, W1 buffer, Wash buffer, Elution buffer, dan GS Column)
3. *Nuclease Free Water* (NFW)
4. Etanol absolut
5. Mikrotube 1.5 mL
6. Tips filter ukuran 1000 μL
7. Tips filter ukuran 100 μL

b. Prosedur Kerja

1. Rambut sebanyak 10 lembar dipotong sepanjang 0.5 – 1 cm dan sel folikel dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 mL
2. GST buffer sebanyak 200 μL dan Proteinase K sebanyak 20 μL dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 mL dan vortex
3. Sampel kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Setiap 5 menit, tabung di vortex.
4. GSB buffer sebanyak 200 μL ditambahkan ke dalam tabung sampel.

5. Sampel kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 60°C. Setiap 5 menit, tabung di vortex.
6. Etanol absolut sebanyak 200 µL ditambahkan ke dalam tabung sampel, kemudian di vortex selama 10 detik.
7. Larutan sampel dipipet kemudian dipindahkan ke dalam tabung GS Column.
8. GS Column disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, kemudian supernatan dibuang.
9. W1 buffer sebanyak 400 µL ditambahkan ke dalam tabung GS Column, kemudian disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 12.000 rpm, supernatan dibuang.
10. Wash buffer sebanyak 600 µL ditambahkan ke dalam tabung GS Column, kemudian disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 12.000 rpm, supernatan dibuang.
11. Tabung GS Column disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 12.000 rpm (untuk mengeringkan matriks column).
12. Tabung GS Column dipindahkan ke dalam mikrotube 1.5 mL baru.
13. Elution buffer sebanyak 50 µL ditambahkan ke dalam tabung GS Column, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3 menit.
14. Tabung GS Column disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 12.000 rpm.
15. Supernatan (DNA) disimpan pada -20°C sampai akan digunakan.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

- c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- A. Jelaskan secara singkat kriteria sampel rambut pada pemeriksaan biomol!
- B. Jelaskan fungsi dari larutan proteinase K!

8. Daftar Pustaka

1. Andalia,N.; Adriani; Wardani, A.H.; Sahli, I.T.; Yunus, R.; Solfaine, R.; Nikmatullah, N.A.; Meri; Rusdin, A.; Safitri, N.M., 2023, Biologi Molekuler, PT Global Eksekutif Teknologi, ISBN: 9786231983497
2. Ahmed, Omar dkk. 2014. Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. African Journal of Microbiology Research Vol. 8 (6), pp. 598-602.
3. Ratnasari, Y. A., & Faridah, I. N., 2019. Optimasi Metode Isolasi DNA Sampel FTA Cards Purelink Menggunakan ® Genomic DNA Kits dan Chelex-100. Skripsi. Universitas Ahmad Dahlan

PRAKTIKUM 4: ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL DARAH

1. Kompetensi Dasar

- a. Mampu mempersiapkan sampel darah
- b. Mampu mempersiapkan reagen ekstraksi DNA
- c. Mampu mengisolasi DNA dari sampel darah

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa dapat melakukan preparasi sampel darah dan preparasi reagen ekstraksi DNA
- b. Mahasiswa dapat mengisolasi DNA dari sampel darah

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan preparasi sampel darah
- b. Melakukan preparasi reagen ekstraksi DNA
- c. Mengisolasi DNA dari sampel darah

4. Uraian Teori

DNA adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis yang membawa informasi genetic yang diteruskan ketubuh dan keturunannya. Informasi genetic disusun dalam kodon sebagai tiga pasangan basa nukleotida dan menentukan bentuk, struktur, dan fisiologi tubuh. Secara structural, DNA merupakan polimer nukleotida, yang setiap nukleotidanya terdiri dari gula deoksiribosa, fosfat, dan basa.

Ekstraksi DNA merupakan metode pemurnian DNA dengan menggunakan metode fisik dan atau metode kimia dalam memisahkan DNA dari membrane sel, protein, dan komponen seluler lain dari sampel. Proses ekstraksi akan memisahkan molekul DNA dengan molekul lainnya seperti lemak, karbohidrat, protein, RNA dan lain – lainnya. Terdapat beberapa tahapan dalam metode ekstraksi DNA yaitu penghancuran (lisis) dinding sel, pemisahan DNA dari molekul lain dan pemurnian DNA.

Tahapan pertama pada proses metode ekstraksi adalah penghancuran (lisis) dinding sel, proses ini bertujuan untuk menghancurkan membran dan dinding sel sehingga bagian dalam sel keluar.

Darah adalah cairan yang terdapat pada semua makhluk hidup (kecuali tumbuhan) tingkat tinggi yang berfungsi mengirimkan zat-zat dan oksigen yang dibutuhkan oleh jaringan tubuh, mengangkut bahan-bahan kimia hasil metabolisme dan juga sebagai pertahanan tubuh terhadap virus atau bakteri.

Darah merupakan komponen esensial makhluk hidup yang berada dalam ruang vaskuler, karena perannya sebagai media komunikasi antar sel ke berbagai bagian tubuh dengan dunia luar karena fungsinya membawa oksigen dari paru-paru ke jaringan dan karbondioksida dari jaringan ke paru-paru untuk dikeluarkan, membawa zat nutrisi dari saluran cerna ke jaringan kemudian menghantarkan hormon dan materi-materi pembekuan darah.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat :

1. Mikropipet 100 – 1000 μL
2. Mikropipet 10 – 100 μL
3. Heat block atau water bath
4. *Sentrifuge*
5. Vortex

Bahan:

1. Sampel darah
2. Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (*Cell Lysis Solution, Nuclei Lysis Solution, Protein Precipitation Solution, DNA Rehydration Solution*)
3. *Nuclease Free Water (NFW)*
4. Etanol 70%
5. Isopropanol
8. Mikrotube 1.5 mL
9. Tips filter ukuran 1000 μL

10. Tips filter ukuran 100 μ L

b. Prosedur Kerja

1. Sampel darah sebanyak 300 μ L dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 mL
2. *Cell Lysis Solution* sebanyak 900 μ L ditambahkan ke dalam mikrotube 1.5 mL kemudian di vortex selama 10 detik.
3. Tabung sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, kemudian disentrifuge selama 20 detik dengan kecepatan 12.000 rpm.
4. Supernatan dibuang secara hati – hati tanpa menyentuh pellet putih, kemudian tabung di vortex selama 20 detik.
5. *Nuclei Lysis Solution* sebanyak 300 μ L ditambahkan ke dalam tabung. Sampel di *up and down* sebanyak 5 – 6 kali untuk melisiskan sel darah putih, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan di vortex selama 10 detik.
6. *Protein Precipitation Solution* sebanyak 100 μ L ditambahkan ke dalam tabung dan di vortex selama 20 detik kemudian disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 12.000 rpm
7. Supernatan sebanyak 300 μ L dipindahkan ke dalam mikrotube 1.5 mL baru, kemudian isopropanol ditambahkan sebanyak 300 μ L.
8. Larutan divortex, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.
9. Supernatan dibuang, kemudian etanol 70% ditambahkan sebanyak 300 μ L.
10. Larutan divortex, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, supernatan dibuang.
11. Tabung dibalikkan diatas kertas penyerap bersih agar etanol menguap.
12. *DNA Rehydration Solution* sebanyak 100 μ L ditambahkan ke dalam tube, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65°C selanjutnya larutan divortex.
13. Larutan (DNA) disimpan pada suhu -20°C hingga akan dikerjakan.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

A. Jelaskan kriteria sampel darah yang digunakan dalam ekstraksi DNA!

B. Jelaskan fungsi larutan isopropanol pada tahapan ekstraksi ini !

8. Daftar Pustaka

1. Andalia,N.; Adriani; Wardani, A.H.; Sahli, I.T.; Yunus, R.; Solfaine, R.; Nikmatullah, N.A.; Meri; Rusdin, A.; Safitri, N.M., 2023, Biologi Molekuler, PT Global Eksekutif Teknologi, ISBN: 9786231983497
2. Kotikalapudi, Rosaiah., Rajesh K. Patel. 2015. Comparative Study of The Influence of EDTA and Sodium Heparin on Long Term Storage of Cattle DNA. Cell J. 2015 Spring.
3. Qamar, Wajhul., Mohammad RashidKhanab., AzherArafahc. 2017. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDSproteinase K method. Saudi Journal of Biological Sciences volume 24.

PRAKTIKUM 5: ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL ISOLAT BAKTERI

1. Kompetensi Dasar

- a. Mampu mempersiapkan sampel isolate bakteri
- b. Mampu mempersiapkan reagen ekstraksi DNA
- c. Mampu mengisolasi DNA dari sampel isolat bakteri

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa dapat melakukan preparasi sampel isolat bakteri dan preparasi reagen ekstraksi DNA
- b. Mahasiswa dapat mengisolasi DNA dari sampel isolat bakteri

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan preparasi sampel isolat bakteri
- b. Melakukan preparasi reagen ekstraksi DNA
- c. Mengisolasi DNA dari sampel isolat bakteri

4. Uraian Teori

Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) adalah suatu makro molekul yang tersusun atas nukleotida, yang berfungsi sebagai molekul dasar pembawa sifat gen. Basa nukleid terdiri dari sub unit kecil yaitu kumpulan fosfat, gula pentosa, gula ribosa dan deoksiribosa serta basa nitrogen purin dan pirimidin. Komponen basa nitrogen pada DNA terdiri dari *adenine* (A), *cytosine* (C), *guanine* (G), *thymine* (T), DNA terbentuk dari empat nukleotida yang berikatan secara kovalen membentuk rantai polinukleotida, dimana basa – basa akan melekat pada tulang punggung gula – fosfat. Dua rantai polinukleotida saling berikatan melalui ikatan hidrogen antara basa – basa nitrogen pada rantai yang berbeda. Basa purin (A-T) akan berpasangan dengan pirimidin (G-C) . Adenin (A) berikatan hidrogen dengan timin (T), sedangkan guanine (G) berikatan dengan sitosin (C). DNA terdiri atas dua untai yang berpilin yang membentuk struktur heliks ganda yang berfungsi sebagai penyusun materi genetik.

Tahapan pertama pada proses metode ekstraksi adalah penghancuran (lisis) dinding sel, proses ini bertujuan untuk menghancurkan membran dan dinding sel sehingga bagian dalam sel keluar. Tahapan kedua adalah pemisahan DNA dari protein, karbohidrat dan lemak. Tahapan akhir dari metode ekstraksi DNA adalah pemurnian DNA, proses ini bertujuan untuk menghilangkan sisa – sisa zat/larutan yang digunakan pada proses ekstraksi. Komponen reagen yang digunakan pada metode ini antara lain:

1. Buffer lisis yang berfungsi untuk mengikat protein membran sehingga membran sel bocor dan sel pecah. Buffer ini bersifat hidrofobik sehingga dapat memisahkan protein dan senyawa lain dari DNA/RNA
2. Interphase (fenol – based), filter dan bead – charge yang bersifat hidrofilik sehingga dapat mengikat DNA/RNA.
3. Buffer wash yang berfungsi untuk mencuci sisa – sisa pecahan sel selain DNA/RNA. Buffer ini bersifat hidrofobik sehingga dapat memisahkan sisa – sisa pecahan sel dari DNA/RNA
4. Buffer elusi yang berfungsi untuk melepaskan DNA/RNA dari filter atau bead – charge. Buffer ini bersifat lebih hidrofilik sehingga dapat melepaskan DNA/RNA.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat :

1. Mikropipet 100 – 1000 μ L
2. Mikropipet 10 – 100 μ L
3. Heat block atau water bath
4. *Sentrifuge*
5. Vortex

Bahan:

1. Sampel isolat bakteri
2. Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (*Lytic enzyme, Nuclei Lysis Solution, RNase Solution, Protein Precipitation Solution, DNA Rehydration Solution*)

3. *Nuclease Free Water* (NFW)
4. Etanol 70%
5. Isopropanol
6. Mikrotube 1.5 mL
7. Tips filter ukuran 1000 μL
8. Tips filter ukuran 100 μL

b. Prosedur Kerja

1. Sampel biakan bakteri (gram negatif) sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 mL, kemudian disentrifuge selama 2 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, supernatan dibuang.
2. *Lytic enzyme* sebanyak 120 μL ditambahkan ke dalam mikrotube 1.5 mL kemudian di vortex selama 10 detik.
3. Tabung sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 40 menit, kemudian disentrifuge selama 2 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, supernatan dibuang.
4. *Nuclei Lysis Solution* sebanyak 600 μL ditambahkan ke dalam tabung. Sampel di *up and down* sebanyak 5 – 6 kali, kemudian diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit kemudian didinginkan hingga suhu ruang.
5. *RNase Solution* sebanyak 2 μL ditambahkan ke dalam tabung, sampel di *up and down* sebanyak 6 kali.
6. *Protein Precipitation Solution* sebanyak 200 μL ditambahkan ke dalam tabung dan di vortex selama 20 detik, kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit kemudian disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 12.000 rpm
7. Supernatan sebanyak 600 μL dipindahkan ke dalam mikrotube 1.5 mL baru, kemudian isopropanol ditambahkan sebanyak 600 μL .
8. Larutan divortex, kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.
9. Supernatan dibuang, kemudian etanol 70% ditambahkan sebanyak 600 μL ke dalam tabung.

10. Larutan divortex, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, supernatan dibuang.
11. Tabung dibalikkan diatas kertas penyerap bersih agar etanol menguap.
12. *DNA Rehydration Solution* sebanyak 100 μ L ditambahkan ke dalam tube, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65°C selanjutnya larutan divortex
13. Larutan (DNA) disimpan pada suhu -20°C hingga akan dikerjakan.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- A. Jelaskan kriteria sampel isolate bakteri yang digunakan dalam ekstraksi DNA!
- B. Jelaskan fungsi larutan etanol 70% pada tahapan ekstraksi ini !

8. Daftar Pustaka

1. Andalia,N.; Adriani; Wardani, A.H.; Sahli, I.T.; Yunus, R.; Solfaine, R.; Nikmatullah, N.A.; Meri; Rusdin, A.; Safitri, N.M., 2023, Biologi Molekuler, PT Global Eksekutif Teknologi, ISBN: 9786231983497
2. Ismaun; Muzuni; Hikmah,N, 2021, Deteksi Molekuler Bakteri *Escherichiacoli* Sebgai Penyebab Penyakit Diare Dengan Menggunakan Tehnik PCR, BIOMA : Jurnal Biologi Makassar.

PRAKTIKUM 6: ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA DARI SAMPEL FESES

1. Kompetensi Dasar

- a. Mampu mempreparasi sampel feses
- b. Mampu mempreparasi reagen ekstraksi DNA
- c. Mampu mengisolasi DNA dari sampel feses

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa dapat melakukan preparasi sampel feses dan preparasi reagen ekstraksi DNA
- b. Mahasiswa dapat mengisolasi DNA dari sampel feses

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan preparasi sampel feses
- b. Melakukan preparasi reagen ekstraksi DNA
- c. Mengisolasi DNA dari sampel feses

4. Uraian Teori

Ekstraksi DNA adalah suatu prosedur laboratorium yang bertujuan untuk mengisolasi dan memperoleh DNA dari suatu materi biologis, seperti sel, jaringan, atau organisme. Tujuan dari ekstraksi DNA bisa bermacam-macam, termasuk untuk analisis genetik, penelitian ilmiah, identifikasi forensik, atau aplikasi bioteknologi lainnya.

Proses ekstraksi DNA melibatkan serangkaian langkah untuk memecah sel dan komponen sel lainnya, memisahkan DNA dari komponen-komponen tersebut, dan kemudian mengumpulkan dan membersihkan DNA yang telah diekstraksi. Teknik dan metode ekstraksi DNA dapat bervariasi tergantung pada jenis sampel biologis yang digunakan, seperti darah, saliva, tanaman, atau bakteri.

Beberapa langkah umum dalam ekstraksi DNA melibatkan penghancuran sel untuk melepaskan DNA, penambahan zat kimia untuk mengendapkan komponen sel yang tidak diinginkan, dan akhirnya, pengambilan dan pemurnian DNA yang berhasil diekstraksi. Proses ini dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai

teknik dan reagen kimia yang dirancang untuk mengekstraksi dan memisahkan DNA dengan efisien.

Ekstraksi DNA pada sampel feses melibatkan langkah-langkah tertentu untuk memisahkan dan mengumpulkan DNA dari sisa-sisa makanan, bakteri, dan material lain yang terdapat dalam tinja. Berikut adalah beberapa langkah umum yang terlibat dalam ekstraksi DNA dari sampel feses:

1. Pengumpulan sampel: Pertama - tama sampel feses harus dikumpulkan dengan hati-hati menggunakan alat pengambil sampel khusus. Sampel ini kemudian disimpan dalam kondisi yang memungkinkan DNA tetap stabil, seperti dalam tabung berisi buffer pengawet.
2. Pemisahan sel DNA : Sampel feses mengandung banyak sel, serat, dan bahan-bahan lainnya. Untuk mendapatkan DNA, langkah awal melibatkan pemecahan sel dan pemisahan komponen-komponen tersebut. Ini dapat melibatkan penggunaan larutan enzim atau detergen untuk menghancurkan sel dan melepaskan DNA.
3. Pemurnian dan presipitasi DNA : DNA yang telah dilepaskan kemudian dipisahkan dari komponen lain dalam sampel menggunakan teknik seperti pemurnian dengan kolom atau metode presipitasi. Zat kimia seperti alkohol atau garam dapat digunakan untuk mengendapkan DNA, yang kemudian dapat diambil.
4. Cuci dan pengeringan : Setelah pemurnian, DNA yang dihasilkan kemungkinan masih mengandung beberapa kontaminan. Oleh karena itu, serangkaian pencucian dilakukan untuk membersihkan sisa-sisa kontaminan dan meningkatkan kemurnian DNA. DNA yang bersih kemudian dikeringkan untuk persiapan analisis lebih lanjut.
5. Penyimpanan DNA : DNA yang telah diambil dapat disimpan dalam suhu rendah untuk mempertahankan stabilitasnya. Ini memungkinkan sampel DNA tetap dapat digunakan untuk analisis genetik atau penelitian lebih lanjut.

Penting untuk dicatat bahwa ekstraksi DNA dari sampel feses dapat memiliki tantangan tersendiri karena adanya inhibitor yang mungkin ada dalam tinja, seperti pigmen atau senyawa kimia yang dapat menghambat reaksi PCR (Polymerase

Chain Reaction) yang umum digunakan dalam analisis genetik. Oleh karena itu, metode ekstraksi DNA yang sesuai dan metode deteksi yang sensitif diperlukan untuk mencapai hasil yang dapat diandalkan.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat :

1. Mikropipet 100 – 1000 μL
2. Mikropipet 10 – 100 μL
3. Heat block atau water bath
4. *Sentrifuge*
5. Vortex

Bahan:

1. Sampel feses
2. gSYNC™ DNA Extraction Kit (Proteinase K, GSB buffer, W1 buffer, Wash buffer, Elution buffer, dan GS Column)
3. *Nuclease Free Water* (NFW)
4. Etanol absolut
5. Mikrotube 1.5 mL
6. Tips filter ukuran 1000 μL
7. Tips filter ukuran 100 μL

b. Prosedur Kerja

Preparasi Sampel Feses

1. Sampel feses sebanyak 20 mg dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 mL steril
2. NFW sebanyak 1 mL ditambahkan ke dalam tabung yang berisi sampel, kemudian di vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam.
3. Supernatan sebanyak 200 μL dipipet, kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 mL baru dan dilanjutkan ke tahap ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA

1. Proteinase K sebanyak 20 μ L dimasukkan ke dalam tabung sampel, kemudian divortex selama 10 detik dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 5 mneit.
2. GSB buffer sebanyak 200 μ L dimasukkan ke dalam tabung sampel dan vortex, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 60°C. Setiap 5 menit, tabung di vortex.
3. Etanol absolut sebanyak 200 μ L ditambahkan ke dalam tabung sampel, kemudian di vortex selama 10 detik.
4. Larutan sampel dipipet kemudian dipindahkan ke dalam tabung GS Column.
5. GS Column disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, kemudian supernatan dibuang.
6. W1 buffer sebanyak 400 μ L ditambahkan ke dalam tabung GS Column, kemudian disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 12.000 rpm, supernatan dibuang.
7. Wash buffer sebanyak 600 μ L ditambahkan ke dalam tabung GS Column, kemudian disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 12.000 rpm, supernatan dibuang.
8. Tabung GS Column disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 12.000 rpm (untuk mengeringkan matriks column).
9. Tabung GS Column dipindahkan ke dalam mikrotube 1.5 mL baru.
10. Elution buffer sebanyak 50 μ L ditambahkan ke dalam tabung GS Column, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3 menit.
11. Tabung GS Column disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 12.000 rpm.
12. Supernatan (DNA) disimpan pada -20°C sampai akan digunakan.

6. Evaluasi

- a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- A. Jelaskan kriteria sampel feses yang digunakan dalam ekstraksi DNA!
- B. Jelaskan fungsi larutan etanol absolut pada tahapan ekstraksi ini !

8. Daftar Pustaka

1. Fangming Yang, Jihua Sun, Huainian Luo, Huahui Ren, Hongcheng Zhou, Yuxiang Lin, Mo Han, Bing Chen, Hailong Liao, Susanne Brix, Junhua Li, Huanming Yang, Karsten Kristiansen, Huanzi Zhong, Assessment of fecal DNA extraction protocols for metagenomic studies, *GigaScience*, Volume 9, Issue 7, July 2020, gaaa071, <https://doi.org/10.1093/gigascience/gaaa071>
2. Wei-Kai Wu, Chieh-Chang Chen, Suraphan Panyod, Rou-An Chen, Ming-Shiang Wu, Lee-Yan Sheen, Shan-Chwen Chang. 2019. Optimization of fecal sample processing for microbiome study — The journey from bathroom to bench. *Journal of the Formosan Medical Association*. Volume 118, Issue 2, February 2019, Pages 545-555. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.02.005>
3. Andalia,N.; Adriani; Wardani, A.H.; Sahli, I.T.; Yunus, R.; Solfaine, R.; Nikmatullah, N.A.; Meri; Rusdin, A.; Safitri, N.M., 2023, *Biologi Molekuler*, PT Global Eksekutif Teknologi, ISBN: 9786231983497

MATERI PRAKTIKUM 7: ISOLASI DAN PURIFIKASI RNA DARI SAMPEL SWAB NASOFARING

1. Kompetensi Dasar

- a. Mampu mempersiapkan sampel swab nasofaring
- b. Mampu mempersiapkan reagen ekstraksi RNA
- c. Mampu mengisolasi RNA dari sampel swab nasofaring

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa dapat melakukan preparasi sampel swab nasofaring dan preparasi reagen ekstraksi RNA
- b. Mahasiswa dapat mengisolasi RNA dari sampel swab nasofaring

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan preparasi sampel feses
- b. Melakukan preparasi reagen ekstraksi DNA
- c. Mengisolasi DNA dari sampel feses

4. Uraian Teori

RNA, atau Asam Ribonukleat, adalah suatu jenis molekul nukleat yang terdapat dalam sel-sel semua organisme hidup. RNA memiliki peran penting dalam menyimpan, mentransmisikan, dan mengekspresikan informasi genetik.

RNA dibuat melalui proses yang disebut transkripsi, yang melibatkan pembacaan urutan DNA dan sintesis molekul RNA yang sesuai. Pada eukariota, RNA kemudian dapat mengalami berbagai modifikasi post-transkripsional sebelum digunakan dalam proses biologis yang lebih lanjut. RNA memiliki peran penting dalam pengaturan ekspresi gen, transportasi genetik, dan banyak proses seluler lainnya.

Ekstraksi RNA dari swab nasofaring melibatkan beberapa langkah khusus untuk memastikan isolasi RNA yang berkualitas dari sel-sel yang terdapat di permukaan nasofaring. Metode ekstraksi RNA dari swab nasofaring dapat bervariasi, tetapi langkah-langkah umumnya mencakup hal-hal berikut:

1. Pengumpulan Sampel :

Sampel biologis, seperti jaringan, sel, atau darah, dikumpulkan dengan hati-hati untuk memastikan keintegritasannya.

2. Pemecahan Sel dan Pengeluaran RNA:

Sel dalam sampel dipecah untuk melepaskan komponen seluler, termasuk RNA. Enzim atau deterjen sering digunakan untuk memecahkan membran sel dan mengeluarkan RNA.

3. Pemisahan RNA

RNA harus dipisahkan dari DNA dan protein lainnya. Ini dapat dilakukan dengan menggunakan metode kimiawi atau membran filtrasi.

4. Presipitasi RNA

RNA kemudian diendapkan dengan menambahkan alkohol dan garam, membentuk gumpalan yang dapat diambil.

5. Pemurnian RNA

RNA yang diendapkan kemudian dimurnikan untuk menghilangkan kontaminan seperti protein, garam, dan enzim lainnya.

6. Analisis Kuantitatif dan Kualitatif

Kuantitas dan kualitas RNA yang dihasilkan diukur menggunakan metode seperti spektrofotometri atau analisis elektroforesis agar dapat memastikan bahwa RNA yang dihasilkan cukup dan berkualitas baik untuk analisis lebih lanjut.

7. Penyimpanan RNA

RNA yang berhasil diekstraksi dapat disimpan pada suhu rendah, biasanya pada -80°C , untuk mempertahankan kestabilannya.

Penting untuk dicatat bahwa proses ekstraksi RNA memerlukan tindakan hati-hati untuk menghindari kontaminasi dan degradasi RNA. Beberapa metode ekstraksi RNA yang umum digunakan termasuk metode fenol-kloroform, metode berbasis kolom, dan teknologi berbasis magnetik.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat :

1. Mikropipet 100 – 1000 μL
2. Mikropipet 10 – 100 μL
3. Mikropipet 0.5 – 10 μL
4. Heat block atau water bath
5. *Sentrifuge*
6. Vortex

Bahan:

1. Sampel swab nasofaring
2. PrimeWay Total RNA Extraction Kit (*TR Buffer, Wash Buffer R1, Wash Buffer R2, RNase – Free Water, PrimeWay Filter Column, PrimeWay RNA Column, Collection Tube, DNase I, DNase I Buffer*)
3. Etanol absolut
4. Mikrotube 1.5 mL
5. Tips filter ukuran 1000 μL
6. Tips filter ukuran 100 μL
7. Tips filter ukuran 10 μL

b. Prosedur Kerja

Preparasi reagen DNase I *solution* (1 sampel)

1. DNase I *buffer* sebanyak 45 μL dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 mL
2. DNase I sebanyak 5 μL dimasukkan ke dalam tabung kemudian di *up and down* selama 10 kali. DNase I *solution* siap untuk digunakan.

Preparasi sampel

1. Sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 mL steril
2. Tabung sampel disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.

3. Supernatan dibuang sebanyak 900 μL , sampel siap dilanjutkan ke tahapan ekstraksi.

Ekstraksi RNA

1. Sampel divortex selama 20 detik, kemudian TR buffer sebanyak 800 μL dan β -ME sebanyak 8 μL dimasukkan ke dalam tabung sampel,
2. Tabung sampel divortex selama 1 menit
3. *PrimeWay Filter Column* (biru) disimpan ke dalam *collection tube*, semua larutan sampel dimasukkan ke dalam *PrimeWay Filter Column* kemudian disentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 12.000 rpm
4. *PrimeWay Filter Column* dibuang, larutan pada *collection tube* disimpan.
5. Etanol absolut sebanyak 400 μL dimasukkan ke dalam *collection tube* yang berisi sampel kemudian di up and down.
6. *PrimeWay RNA Column* (putih) disimpan ke dalam *collection tube* baru.
7. Larutan sampel sebanyak 700 μL dimasukkan ke dalam *PrimeWay RNA Column* kemudian tabung disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, buang larutan dan *column* disimpan kembali ke dalam *collection tube*.
8. Step 7 diulang hingga semua larutan sampel habis.
9. *Wash buffer R1* sebanyak 700 μL dimasukkan kedalam *PrimeWay RNA Column* kemudian tabung disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, buang larutan dan *column* disimpan kembali ke dalam *collection tube*.
10. *5DNase I solution* sebanyak 50 μL dimasukkan ke dalam *PrimeWay RNA Column* kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang.
11. *Wash buffer R1* sebanyak 00 μL dimasukkan kedalam *PrimeWay RNA Column* kemudian tabung disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, buang larutan dan *column* disimpan kembali ke dalam *collection tube*.
12. *Wash buffer R2* sebanyak 500 μL dimasukkan kedalam *PrimeWay RNA Column* kemudian tabung disentrifugasi selama 1 menit dengan

kecepatan 12.000 rpm, buang larutan dan *column* disimpan kembali ke dalam *collection tube*.

13. *Wash buffer R2* sebanyak 500 μ L dimasukkan ke dalam *PrimeWay RNA Column* kemudian tabung disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, buang larutan dan *column* disimpan kembali ke dalam *collection tube*.
14. Tabung *Column* disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 12.000 rpm (untuk mengeringkan membran).
15. *PrimeWay RNA Column* dipindahkan ke dalam mikrotube 1.5 mL baru.
16. *RNase Free Water* sebanyak 60 μ L dimasukkan ke dalam *PrimeWay RNA Column* kemudian diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang.
17. Tabung disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm
18. Supernatan (RNA) disimpan pada suhu -80°C hingga akan digunakan

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- A. Jelaskan kriteria sampel swab nasofaring yang digunakan dalam ekstraksi RNA!
- B. Jelaskan fungsi larutan DNase I *solution* pada tahapan ekstraksi ini !

8. Daftar Pustaka

1. F. Morecchiato et al., “Evaluation of extraction-free RT-PCR methods for faster and cheaper detection of SARS-CoV-2 using two commercial systems,” *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 112, no. 9, pp. 264–268, 2021, doi: 10.1016/j.ijid.2021.09.046. [29] B. A. Rabe and C. Cepko, “SARS-CoV-2 detection using isothermal
2. M. Beissner et al., “Development of a combined RLEP/16S rRNA (RT) qPCR assay for the detection of viable *M. leprae* from nasal swab samples,” *BMC Infect. Dis.*, vol.19, no. 1, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1186/s12879-019-4349-9.
3. L. Jones et al., “Isothermal amplification and fluorescent detection of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2 variant virus in nasopharyngeal swabs,” *RT-LAMP Fluoresc. Detect. SARS-CoV-2*, vol. 16, no. 9, pp. 1–17, 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0257563.

MATERI PRAKTIKUM 9: ELEKTROFORESIS DNA

1. Kompetensi Dasar

- a. Mampu mempreparasi reagen elektroforesis
- b. Mampu membuat gel agarose
- c. Mampu mengoperasikan alat elektroforesis
- d. Mampu memvalidasi hasil ekstraksi DNA

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa dapat membuat gel agarose dan buffer TAE/TBE 1%
- b. Mahasiswa dapat dapat mengoperasikan alat elektroforesis
- c. Mahasiswa dapat memvalidasi hasil ekstraksi DNA menggunakan metode elektroforesis

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Mempreparasi reagen elektroforesis
- b. Membuat gel agarose
- c. Mengoperasikan alat elektroforesis
- d. Memvalidasi hasil ekstraksi DNA

4. Uraian Teori

Elektroforesis DNA adalah suatu teknik laboratorium yang digunakan untuk memisahkan fragmen-fragmen DNA berdasarkan ukuran mereka. Teknik ini memanfaatkan sifat muatan negatif DNA sehingga dapat bergerak ke arah anoda (elektroda positif) ketika dikenakan arus listrik melalui media yang memfasilitasi pergerakan DNA.

Langkah – Langkah elektroforesis DNA

1. Persiapan gel

Campurkan agarosa atau poliakrilamida dengan buffer elektroforesis dan panaskan campuran hingga cair. Tuangkan campuran ke dalam cetakan gel dan masukkan sisir elektroforesis untuk membuat sumur.

2. Pemuatan sampel

Campurkan sampel DNA dengan pewarna beban untuk memberi warna dan berat pada sampel. Muat sampel DNA ke dalam sumur gel menggunakan pipet.

3. Elektroforesis

Sambungkan kabel dari sumber listrik ke elektroda di ujung gel. Hidupkan sumber listrik dan atur voltase serta durasi elektroforesis sesuai dengan ukuran dan jenis gel.

4. Analisis Hasil

Setelah elektroforesis selesai, matikan listrik dan angkat gel dari wadah elektroforesis. Gunakan pewarna DNA seperti etidium bromida untuk mengecat gel.

5. Visualisasi dan foto dokumentasi

Tempatkan gel di bawah sumber cahaya ultraviolet (UV) untuk melihat dan mengambil foto hasil elektroforesis. Band-band DNA akan terlihat sebagai garis-garis pada gel.

6. Analisis data

Tentukan ukuran fragmen DNA dalam sampel dengan membandingkan dengan marker berbasis ukuran yang digunakan. Perhatikan pola migrasi dan intensitas band.

Elektroforesis DNA sering digunakan untuk berbagai tujuan, termasuk pemurnian DNA, analisis ekspresi gen, pemetaan fisik genom, dan deteksi polimorfisme genetik.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat :

1. Wadah elektroforesis
2. *Power supply*
3. Cetakan agarose
4. Gel doc
5. Erlenmeyer 250 mL

6. Gelas ukur 1000 mL
7. Botol steril ukuran 1000 mL
8. Mikropipet 0.5 – 10 μ L
9. Kompor listrik
10. Wadah gel agore

Bahan:

1. DNA
2. Tips filter 10 μ L
3. Agarose
4. TAE/TBE 10X
5. Aquadest steril
6. Pewarna DNA

b. Prosedur Kerja

Pembuatan TAE/TBE 1X

1. TAE/TBE 10X sebanyak 100 mL dimasukkan ke dalam gelas ukur 1000 mL
2. Aquadest steril sebanyak 900 mL ditambahkan ke dalam gelas ukur kemudian larutan dimasukkan ke dalam botol steril, dan di homogenkan.

Pembuatan gel agarose 1.5%

1. Agarose sebanyak 1.5 gram ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL
2. TAE/TBE 1X sebanyak 100 mL dimasukkan kedalam Erlenmeyer, dihomogenkan
3. Erlenmeyer dipanaskan hingga larutan agarose menjadi bening, dengan sekali2 menggoyangkan Erlenmeyer untuk melarutkan agarose
4. Cetakan gel disiapkan, kemudian garose dituang diatas cetakan, gel agarose dibiarkan hingga mengeras.

Pembuatan gel agarose 2%

1. Agarose sebanyak 2 gram ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL
2. TAE/TBE 1X sebanyak 100 mL dimasukkan kedalam Erlenmeyer, dihomogenkan
3. Erlenmeyer dipanaskan hingga larutan agarose menjadi bening, dengan sekali2 menggoyangkan Erlenmeyer untuk melarutkan agarose
4. Cetakan gel disiapkan, kemudian garose dituang diatas cetakan, gel agarose dibiarkan hingga mengeras.

Elektroforesis DNA

1. Pasang *power supply* dengan *electrophoresis cell unit*, kemudian sambungkan *power supply* dengan stop kontak melalui kabel yang sesuai.
2. Nyalakan tombol ON/OFF pada *power supply*.
3. Atur waktu dan voltase yang akan digunakan
4. Letakkan gel agarose yang telah dibuat ke dalam *electrophoresis cell unit*.
5. Tuang buffer TAE/TBE 1X yang digunakan sampai gel agarose tenggelam.
6. Masukkan campuran DNA hasil ekstraksi dengan loading dye (perbandingan 10:1) ke dalam sumur agarose.
7. Tutup *electrophoresis cell unit*, kemudian mulai proses elektroforesis.
8. Setelah selesai, rendam gel agarose dengan larutan pewarna selama 15 sampai 30 menit, kemudian amati pita DNA dengan uv *transilluminator/ Geldoc*

6. Evaluasi

- d. Hasil Percobaan

e. Pembahasan

f. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

A. Jelaskan fungsi dari gel agarose!

B. Jelaskan fungsi larutan TAE/TBE 1X !

8. Daftar Pustaka

1. Drabik, A., et al. 2016. *Gel Electrophoresis. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*. Elsevier B.V
2. Andalia,N.; Adriani; Wardani, A.H.; Sahli, I.T.; Yunus, R.; Solfaine, R.; Nikmatullah, N.A.; Meri; Rusdin, A.; Safitri, N.M., 2023, Biologi Molekuler, PT Global Eksekutif Teknologi, ISBN: 9786231983497

MATERI PRAKTIKUM 10: KONSENTRASI DAN KEMURNIAN DNA

1. Kompetensi Dasar

- a. Mampu mengoperasikan alat spektrofotometer nanodrop
- b. Mampu membaca dan menganalisa hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa mampu mengoperasikan alat spektrofotometer nanodrop
- b. Mahasiswa mampu membaca dan menganalisa hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Mengoperasikan alat spektrofotometer nanodrop
- b. Membaca dan menganalisa hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA

4. Uraian Teori

Deoxyribonucleic acid (DNA) yang telah didapatkan setelah hasil proses ekstraksi DNA menggunakan metode *Phenol-Chloroform* dinilai lebih maksimal untuk mengisolasi DNA dari sampel asal dan menghasilkan kemurnian DNA yang tinggi. Hasil ekstraksi DNA yang didapatkan akan dilakukan proses pemurnian dengan menggunakan etanol. Proses pemurnian DNA dilakukan untuk menghilangkan sisa residu setelah melewati proses ekstraksi DNA. Hasil pemurnian ekstrak DNA menggunakan metode *Phenol-Chloroform* memiliki nilai kemurnian yang baik dan memenuhi persyaratan yang dibutuhkan untuk analisis molekuler, yakni hasil kemurnian berkisar antara 1,8-2,0. Hasil nilai kemurnian ekstrak DNA lebih dari 2,0 menunjukkan bahwa hasil ekstrak DNA masih mengandung kontaminan dari fenol (Sambrook *et al.*, 2001), sedangkan apabila didapatkan nilai kemurnian ekstrak DNA sebesar kurang dari 1,8 menunjukkan bahwa hasil ekstrak DNA yang diperoleh masih mengandung kontaminasi senyawa protein.

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dilakukan menggunakan spektrofotometer, dan hasilnya dapat memberikan informasi penting untuk memastikan keberhasilan eksperimen atau analisis molekuler lebih lanjut. Dua rasio utama yang digunakan untuk mengevaluasi kemurnian DNA adalah rasio A260/A280 dan rasio A260/A230.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat:

1. Spektrofotometer nanodrop
2. Mikropipet 0.5 – 10 μL

Bahan:

1. DNA
2. Tips filter 10 μL

b. Prosedur Kerja

1. Nyalakan tombol ON/OFF pada power supply
2. lalu pilih DNA di layar monitor spektrofotometer
3. Lengan alat diangkat dan diteteskan larutan blank sebanyak 1 uL diatas lensa kemudian lengan alat diturunkan.
4. Lengan alat diangkat, bersihkan lensa kemudian DNA sebanyak 1 uL diteteskan diatas lensa kemudian lengan alat diturunkan.
5. Hasil pengukuran akan masuk secara otomatis kedalam sistem.
6. Lengan alat diangkat, bersihkan lensa, kemudian lanjutkan dengan sampel DNA yang lainnya seperti pada langkah 4.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

A. Kapan DNA dikatakan murni, jelaskan!

B. Jelaskan fungsi dari larutan blanko!

8. Daftar Pustaka

1. Andalia,N.; Adriani; Wardani, A.H.; Sahli, I.T.; Yunus, R.; Solfaine, R.; Nikmatullah, N.A.; Meri; Rusdin, A.; Safitri, N.M., 2023, Biologi Molekuler, PT Global Eksekutif Teknologi, ISBN: 9786231983497
2. Mohamad, F., Hikmatyar, Juwartina, I, R., Dasumiati. 2015. Isolasi dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) untuk Identifikasi Keragaman Genetik. Dalam: Jurnal Bioteknologi dan Biosains. Universitas Islam Syarif Hidayatullah. Tangerang Selatan. Hlm. 42-48.

MATERI PRAKTIKUM 11: AMPLIFIKASI DNA

1. Kompetensi Dasar

- a. Mampu membuat reagen mastermix *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
- b. Mampu memahami prinsip kerja dan tahapan PCR
- c. Mampu mengoperasikan alat *Thermal cyclers*
- d. Mampu memvalidasi hasil amplifikasi PCR

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa dapat membuat reagen mastermix PCR
- b. Mahasiswa mampu memahami prinsip kerja dan tahapan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
- c. Mahasiswa mampu mengoperasikan alat *Thermal Cyclers*
- d. Mahasiswa mampu mengamplifikasi DNA menggunakan alat *Thermal Cyclers*
- e. Mahasiswa dapat memvalidasi hasil amplifikasi PCR menggunakan metode elektroforesis

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Membuat reagen mastermix *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
- b. Memahami prinsip kerja dan tahapan PCR
- c. Mengoperasikan alat *Thermal cyclers*
- d. Memvalidasi hasil amplifikasi PCR

4. Uraian Teori

PCR konvensional adalah salah satu jenis metode PCR yang melibatkan beberapa tahapan berulang (siklus) dan pada setiap tahapan terjadi duplikasi target DNA. Dalam metode ini dibutuhkan beberapa komponen dalam prosesnya yaitu *template/* cetakan DNA, enzim DNA polimerase tahan panas, primer (*forward* primer dan *reverse* primer), dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), kofaktor MgCl₂, larutan penyangga dan NFW (*Nuclease Free Water*). Terdapat tiga tahapan dalam proses PCR yaitu denaturasi, annealing, dan extension,

tahapan – tahapan ini akan berulang sebanyak 25 – 30 kali (siklus). Proses PCR dapat dilihat gambar 1.

1. Pra denaturasi

Pra denaturasi merupakan tahapan awal pada metode PCR. Tahapan ini berlangsung selama 1 – 2 menit pada suhu 92 - 98 °C dengan 1 siklus. Tahapan ini berfungsi untuk memisahkan *double helix* DNA *template* menjadi *single*.

2. Denaturasi

Denaturasi merupakan tahapan lanjutan dari tahapan pra denaturasi, dimana pada tahapan ini *double helix* DNA *template* menjadi *single*. Tahapan ini berlangsung selama 30 detik – 1 menit (tergantung kit yang digunakan) pada suhu 92 – 98°C dengan siklus berulang selama 25 – 30 siklus.

3. Annealing (Penempelan primer)

Annealing merupakan tahapan lanjutan dari tahapan denaturasi, dimana pada tahapan ini kedua primer (*forward* primer dan *reverse* primer) akan menempel pada rantai DNA target. Tahapan ini berlangsung selama 30 – 45 detik pada suhu 37 – 65°C dengan siklus berulang selama 25 – 30 siklus.

4. Extension (Pemanjangan primer)

Extension merupakan tahapan lanjutan dari tahapan annealing. Pada tahapan ini enzim DNA polimerase akan memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Tahapan ini berlangsung selama 1 menit pada suhu 72°C dengan siklus berulang selama 25 – 30 siklus, dalam waktu satu detik diperkirakan terdapat 35 – 100 nukleotida yang tersusun.

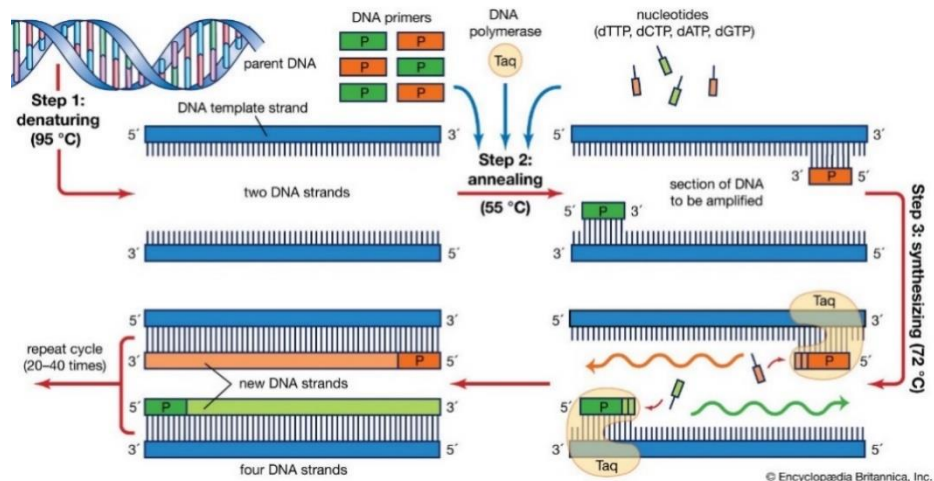
5. Post – extension

Post – extension merupakan tahapan akhir pada proses PCR setelah tahapan denaturasi, annealing dan extention berulang hingga 25 – 30 siklus. Tahapan ini berlangsung 5 menit pada suhu 72°C dengan satu siklus. Pada tahap ini diharapkan semua produk PCR terbentuk menjadi DNA untai ganda.

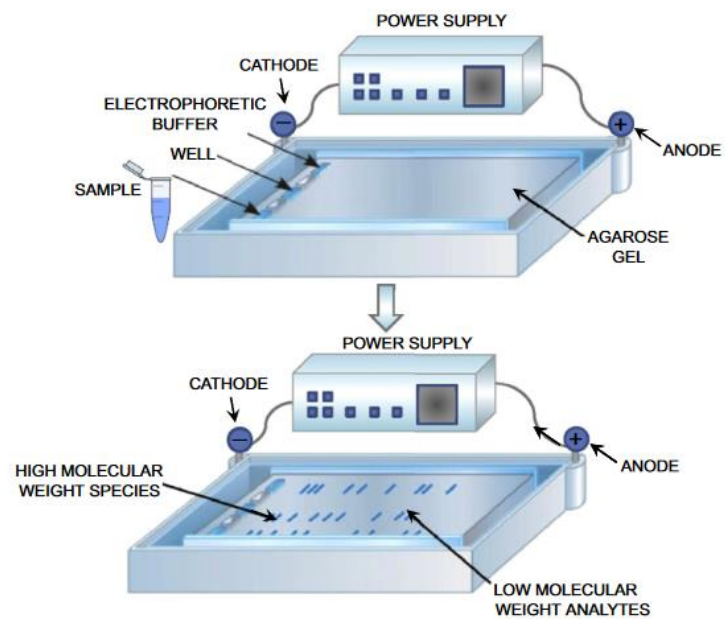
Produk PCR (DNA) dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Metode ini dimulai dengan meletakkan gel agarose pada wadah elektroforesis yang telah berisi larutan *buffer* garam setelah itu DNA dimasukkan kedalam sumur gel agarose kemudian alat

disambungkan ke aliran listrik. Adanya gugus fosfat pada DNA menyebabkan DNA bermuatan negatif sehingga posisi sumur gel agarose diletakkan di area kutub elektroda negatif pada wadah elektroforesis. Saat aliran listrik mengalir dalam gel agarose, DNA akan bergerak ke arah kutub elektroda positif. Pergerakan kecepatan DNA dalam gel agarose dipengaruhi oleh ukuran dari fragmen DNA. Fragmen DNA yang berukuran kecil akan cepat bergerak menuju kutub elektroda positif dikarenakan molekul DNA akan mudah melewati pori – pori gel agarose sedangkan fragmen DNA yang berukuran besar akan melambat bergerak menuju kutub elektroda positif dikarenakan hambatan dari pori – pori gel agarose yang kecil. Tahapan – tahapan elektroforesis dapat dilihat pada gambar 2.

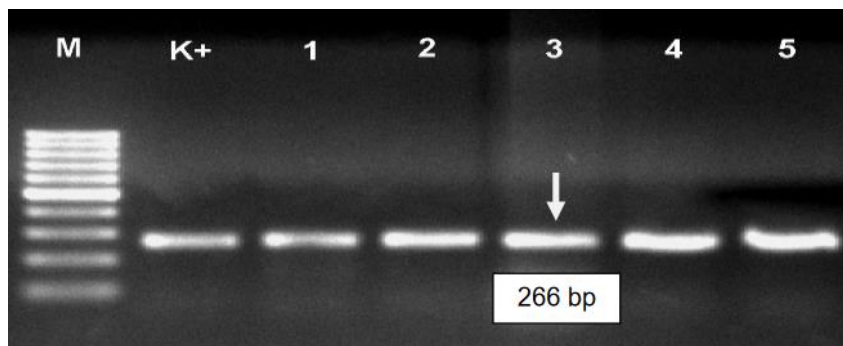
Kelebihan dari gel agarose adalah mampu memisahkan DNA mulai dari 70 pb (pasangan basa) hingga 800.000 pb dan lokasi DNA pada gel dapat diamati secara insitu dengan menggunakan staining gel sebagai pewarna. Staining gel akan menginterkalasi (menyisip ke dalam) DNA. Penggunaan staining gel bertujuan untuk membantu visualisasi, dimana staining gel akan memendarkan sinar ultraviolet. Jika gel disinari dengan ultraviolet dari bawah maka akan tampak pendaran berupa pita – pita pada gel (gambar 3).



Gambar 3 Tahapan – tahapan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)



Gambar 2 Tahapan – tahapan elektroforesis gel agarose



Gambar 3 Hasil visualisasi elektroforesis (Kode M: DNA marker, K+: kontrol positif PCR, 1 – 5: DNA sampel)

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat :

1. *Thermal cyclers*
2. Mikropipet 0.5 – 10 μL
3. Mikropipet 10 – 100 μL
4. Mikropipet 20 – 200 μL

5. Wadah elektroforesis
6. *Power supply*
7. Cetakan agarose
8. Gel doc
9. Erlenmeyer 250 mL
10. Gelas ukur 1000 mL
11. Botol steril ukuran 1000 mL
12. Kompor listrik
13. Wadah gel agore

Bahan:

1. GoTaq Green Master Mix
2. DNA
3. Tips filter 10 μ L
4. Tips filter 100 μ L
5. Tips filter 200 μ L
6. Agarose
7. TAE/TBE 10X
8. Aquadest steril
9. Pewarna DNA

b. Prosedur Kerja

Preparasi reagen master mix

For a 25 μ l reaction volume:

1. GoTaq® Green Master Mix, 2X 12.5 μ l
2. Upstream primer, 10 μ M 0.25–2.5 μ l
3. Downstream primer, 10 μ M 0.25–2.5 μ l
4. DNA template 1–5 μ l

Amplifikasi PCR

1. Sambungkan mesin ke **POWER SUPPLAY**
2. Tekan tombol “ON”

3. Pilih “**SYSTEM USER**”, maka akan muncul 3 sub menu :

A. Program : membuat, membaca, mengubah dan memulai running suatu program yang baru atau program yang sudah disimpan.

B. Program Default : mengubah *default setting* untuk heated lid, initial denaturation, final extension, final hold dan hot start, dimana pengaturan ini akan otomatis jika kita akan membuat program.

C. Gradient Calculator : menghitung temperatur pada masing-masing kolom di blok

D. Exit : kembali ke menu awal

● **Membuat dan Mengubah Program**

1. Copy dan ubah program yang sudah ada

A. Pilih “**Programs**”

B. Pilih salah satu template yang ada

C. Ketik program sudah terbuka, pilih **Copy** dan masukkan nama yang baru, tekan Enter

D. Pilih program hasil copyan, apabila akan mengubah programnya tekan **Edit**, lalu **atur** program sesuai dengan kebutuhan, setelah selesai pilih **Save**

2. **Mengubah** program yang sudah ada dan menyimpannya dengan nama yang berbeda

A. Pilih “**Programs**”

B. Pilih salah satu template yang ada, kemudian pilih **Edit**

C. **Atur** program sesuai dengan kebutuhan

D. Setelah selesai pilih **Save as** dan masukkan nama yang baru

3. Membuat program yang **baru**

A. Pilih “**Programs**”, lalu pilih **New**

B. Berikan nama pada program yang dibuat

C. **Atur** program sesuai dengan kebutuhan, setelah selesai pilih **Save**.

● **Menjalankan suatu Program** :

Klik **Programs** di main menu, pilih program yang akan dijalankan, setelah program terbuka, tekan **Run Gradient Calculator**

1. Pilih **Gradient Calculator**
2. Pilih **Temperature**, atur suhu tengah (contoh 30-50 °C maka set suhu di suhu 40 °C).
3. Pilih **Gradient** untuk mengatur jarak gradient yang diinginkan
4. Hasil perhitungan gradient per kolomnya bisa dicetak dengan menggunakan menu **Print**
5. Kemudian pilih **Exit**.

Pembuatan TAE/TBE 1X

3. TAE/TBE 10X sebanyak 100 mL dimasukkan ke dalam gelas ukur 1000 mL
4. Aquadest steril sebanyak 900 mL ditambahkan ke dalam gelas ukur kemudian larutan dimasukkan ke dalam botol steril, dan di homogenkan.

Pembuatan gel agarose 1.5%

1. Agarose sebanyak 1.5 gram ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL
2. TAE/TBE 1X sebanyak 100 mL dimasukkan kedalam Erlenmeyer, dihomogenkan
3. Erlenmeyer dipanaskan hingga larutan agarose menjadi bening, dengan sekali2 menggoyangkan Erlenmeyer untuk melarutkan agarose
4. Cetakan gel disiapkan, kemudian garose dituang diatas cetakan, gel agarose dibiarkan hingga mengeras.

Pembuatan gel agarose 2%

1. Agarose sebanyak 2 gram ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL
2. TAE/TBE 1X sebanyak 100 mL dimasukkan kedalam Erlenmeyer, dihomogenkan
3. Erlenmeyer dipanaskan hingga larutan agarose menjadi bening, dengan sekali2 menggoyangkan Erlenmeyer untuk melarutkan agarose

4. Cetakan gel disiapkan, kemudian garose dituang diatas cetakan, gel agarose dibiarkan hingga mengeras.

Elektroforesis DNA

1. Pasang *power supply* dengan *electrophoresis cell unit*, kemudian sambungkan *power supply* dengan stop kontak melalui kabel yang sesuai.
2. Nyalakan tombol ON/OFF pada *power supply*.
3. Atur waktu dan voltase yang akan digunakan
4. Letakkan gel agarose yang telah dibuat ke dalam *electrophoresis cell unit*.
5. Tuang buffer TAE/TBE 1X yang digunakan sampai gel agarose tenggelam.
6. Masukkan campuran DNA hasil ekstraksi dengan loading dye (perbandingan 10:1) ke dalam sumur agarose.
7. Tutup *electrophoresis cell unit*, kemudian mulai proses elektroforesis.
8. Setelah selesai, rendam gel agarose dengan larutan pewarna selama 15 sampai 30 menit, kemudian amati pita DNA dengan uv *transilluminator/ Geldoc*

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- A. Kapan hasil amplifikasi DNA dikatakan positif, jelaskan!
- B. Jelaskan tahapan – tahapan PCR!

8. Daftar Pustaka

1. Budiarto, B. R. 2015. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Perkembangan dan Perannya dalam Diagnostik Kesehatan*. BioTrenda, Vol. 6 No. 2
2. Dayanti, F. G., et al. 2019. *Perbandingan Nilai Pengukuran Kuantitatif Hasil Ekstraksi DNA Salmonella Typhi Menggunakan Metode Boiling, NaOH, Kit Komersial*. Jurnal Riset Kesehatan. Vol 11 (No. 1). Hlm. 1-8.
3. Farkas, D. H. & Holland, C. A. 2009. *Overview of Molecular Diagnostic Techniques and Instrumentation*. Cell and Tissue Based Molecular Pathology. Pages 19 - 32
4. Andalia, N.; Adriani; Wardani, A.H.; Sahli, I.T.; Yunus, R.; Solfaine, R.; Nikmatullah, N.A.; Meri; Rusdin, A.; Safitri, N.M., 2023, *Biologi Molekuler*, PT Global Eksekutif Teknologi, ISBN: 9786231983497