

Petunjuk Praktikum *BIOTEKNOLOGI*

Erlia Narulita



Tata tertib praktikum

1. Praktikan hadir 10 menit sebelum dimulai praktikum.
2. Dilakukan pretest pada awal praktikum dengan materi sesuai acara praktikum.
3. Praktikan wajib memakai jas lab selama praktikum dan masker saat bekerja di laminar.
4. Dilakukan in haln bagi praktikan yang nilainya tidak memenuhi syarat pretest / praktikum.
5. Setiap praktikan wajib mengikuti semua acara praktikum sampai selesai.
6. Praktikan membuat laporan sementara setiap kali selesai acara praktikum dengan pembahasan data sementara dari pengamatan yang sudah dikonsultasikan kepada asisten.
7. Tidak diijinkan makan, minum, merokok atau kegiatan yang bisa mengganggu pelaksanaan praktikum.
8. Menjaga kebersihan lingkungan laboratorium.
9. Pemakaian peralatan harus sejin asisten atau teknisi laboratorium.
10. Dilakukan ujian tulis (responsi) dari semua materi praktikum setelah berakhirnya praktikum.
11. Setiap praktikan wajib mengumpulkan laporan yang sudah dibendel saat sebelum ujian tertulis (responsi).

ACARA 1

MEDIA KULTUR JARINGAN

Tujuan

1. Membuat media kultur jaringan dengan baik dan benar.
2. Mengenal perbedaan bermacam-macam media kultur jaringan.

Pendahuluan

Media kultur mempunyai peranan penting dalam menentukan keberhasilan teknik kultur *in vitro*. Media kultur terdiri dari unsur hara makro, mikro, sumber karbon (gula), vitamin dan asam amino serta zat pengatur tumbuh. Senyawa-senyawa tersebut mempunyai arti penting untuk kelangsungan pertumbuhan tanaman yang dibudidayakan secara *in vitro*. Dalam kultur *in vitro* terdapat dua jenis media yaitu media padat dan media cair, dimana perbedaan terletak pada ada atau tidak agar. Media cair digunakan untuk tujuan tertentu seperti pembentukan *protocorn like body* (PLB) pada anggrek dan jahe.

Unsur hara makro N, P, K, Ca, Mg merupakan kebutuhan pokok pertumbuhan tanaman yang disediakan dalam bentuk garam-garaman anorganik. Macam-macam dan konsentrasi garam-garam anorganik yang diperlukan tergantung jenis media. Unsur hara mikro (Fe, Zn, B, Cu, Co dan Mo) adalah komponen protein sel tanaman yang penting dalam proses metabolisme dan fisiologi. Vitamin sangat penting dalam kultur jaringan tanaman, utamanya dalam memperbaiki pertumbuhan dan morfogenesis maupun dalam pembelahan sel. Terdapat sejumlah vitamin yang sering digunakan dalam media kultur, antara lain thiamine (B1), mio-inositol, niacin, pyridoksin (B6). Asam amino diperlukan dalam pertumbuhan kultur, karena merupakan sumber yang cepat diserap oleh sel tanaman. Beberapa asam amino telah dibuktikan mempunyai pengaruh positif terhadap pertumbuhan dan perkembangan kultur, misalnya cystein dapat mengurangi pencoklatan

pada kultur tebu, asparagin sering digunakan untuk merangsang regenerasi sel. Glycine sering digunakan dalam banyak formulasi media. Senyawa karbohidrat terutama gula, merupakan komponen yang selalu ada dalam media kultur, kecuali untuk tujuan yang sangat spesifik. Beberapa jenis senyawa gula yang sering digunakan sebagai sumber C adalah sukrosa, glukosa dan rafinosa. Sedangkan fruktosa dan galaktosa kurang efektif. Manosa dan laktosa paling tidak efektif. Senyawa gula juga berperan dalam tekanan osmotik media.

Ada lima macam golongan zat pengatur tumbuh (ZPT) yaitu sitokinin, auksin, giberalin, inhibitor dan ethylene. ZPT yang paling sering digunakan dalam kultur adalah auksin dan sitokinin, yang berperan merangsang pertumbuhan dan morfogenesis sel jaringan dan organ. Penambahan ZPT dari luar dapat mengubah kandungan ZPT endogen sel.

Metode

A. Cara membuat stok dengan volume 1 liter

Contoh :

Membuat stok NH_4NO_3 1650 mg/lit sebanyak 1 lt dengan pengambilan 20 ml. Berapa NH_4NO_3 yang ditimbang?

Jawab :

$$N1.V1 = N2.V2$$

$$N1. 20 = 1650 . 1000$$

$$N1 = 82500 \text{ mg}$$

Jadi NH_4NO_3 yang ditimbang sejumlah 82500 mg (82,5 gr) kemudian dilarutkan dalam 1000 ml aquades dan disimpan dalam suhu dingin sebagai **stok A** (demikian juga untuk stok lain).

B. Cara pembuatan media padat MS kultur jaringan sebanyak 1 liter

1. Siapkan semua larutan baku MS.

2. Ambil larutan baku sesuai ketentuan dan tuang ke dalam baker glass 1 liter yang sudah terisi aquades 300 ml.
3. Timbang gula 30 gr dan 8 gr bahan pematat (agar) dan masukkan dalam baker glass.
4. Aduk campuran di atas stirer dan ukur derajat keasaman dengan pH meter (5,8), gunakan NaOH 1N atau HCl 1N untuk mengaturnya.
5. Tambahkan aquades hingga mencapai 1000 ml.
6. Didihkan diatas perapian sampai agar melarut.
7. Tuangkan media dalam keadaan cair ke dalam botol-botol dengan ukuran ketebalan 1 cm.
8. Tutup semua botol dengan aluminium foil, dan ditandai menurut jenis medianya.
9. Sterilkan botol-botol berisi media di dalam autoclave selama 30 menit temperatur 121°C tekanan 17,5 psi.
10. Setelah autoclave mati, simpan media sambil menguji kesterilannya selama 3 x 24 jam.
11. Media steril siap ditanami.

Praktek membuat media kultur jaringan sebagai berikut :

- I. Media MS cair dengan perlakuan BAP 0,5 ppm + IAA 0,1 ppm
- II. Media MS padat dengan perlakuan NAA 0,25 ppm dan BAP 1 ppm
- III. Media MS padat dengan perlakuan NAA 1 ppm dan BAP 0,25 ppm
- IV. Media MS padat dengan perlakuan BAP 0,5 ppm
- V. Media MS padat dengan perlakuan 2,4 D 0,5 ppm

Pengamatan

- Amati media terkontaminasi, tentukan tingkat prosentase kontaminasi.
- Tentukan jenis mikroba yang menyebabkan kontaminasi.

Tabel 1.1 Komposisi media dasar Murashige & Skoog kultur jaringan tumbuhan

Jenis stok	Pengambilan (ml)	Jenis bahan kimia	MS (mg/l)
A	20	NH ₄ NO ₃	1650
B	20	KNO ₃	1900
C	10	CaCl 2H ₂ O	440
D	10	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
		KH ₂ PO ₄	170
E	5	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
		NaEDTA	37,3
F	5	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
		H ₃ BO ₃	6,2
		KI	0,83
		Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,25
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
		Mio-inositol	100
Vitamin	1	Niacin	0,5
		Pyridoksin HCl	0,5
		Thiamine HCl	01
		Glycine	2,0
		Sukrosa	30000
	30 g		

Sumber : Winata (1988)

Tabel 2.1 Jumlah media yang terkontaminasi dan jenis kontaminan

No	Pengamatan hari ke			
	1	2	3	Dst
	Σ K	Σ K	Σ K	Σ K
1	0 -	1 j	2 j,b	dst
2				
Dst				

Keterangan :

- Σ = jumlah kontaminasi
- K = jenis kontaminasi
- J = jamur
- B = bakteri

ACARA 2 TEKNIK ASEPTIK

Tujuan

1. Menguasai teknik aseptik dengan baik dan benar.
2. Mengenal perbedaan teknik aseptik lingkungan kerja, alat dan media, serta bahan tanam.

Pendahuluan

Teknik kultur jaringan (*in vitro*) adalah suatu pekerjaan yang memerlukan alat, media, bahan tanam dan lingkungan yang steril atau aseptik. Salah satu faktor pembatas dalam keberhasilan kultur *in vitro* adalah tingkat kontaminasi yang terjadi pada setiap saat dalam masa kultur. Tanaman dalam kultur yang terkontaminasi akan mengakibatkan pertumbuhan eksplan terhambat dan akhirnya mati.

Kontaminasi dapat berasal dari eksplan (baik secara eksternal maupun internal), organisme yang masuk ke dalam media/botol kultur atau alat-alat tanam, lingkungan kerja dan ruang kultur serta kecerobohan dalam pelaksanaan. Keanekaragaman sumber kontaminasi menyebabkan prosedur aseptik harus diperhatikan antara lain:

A. Sterilisasi lingkungan kerja

Lingkungan kerja yang steril dalam kultur *in vitro* adalah sangat penting. Dalam penanaman eksplan memerlukan tempat atau ruang steril dan bebas dari mikroorganisme. Tempat untuk menanam dan memindahkan eksplan disebut Laminar Air Flow Cabinet. Alat ini sudah disempurnakan dengan adanya aliran udara halus yang dihembuskan dari blower melalui suatu filter HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) dengan pori-pori $< 0.3 \mu\text{m}$. Aliran udara ini dapat mencegah kontaminan yang 'air borne' selama penanaman. Sebelum bekerja,

bagian dalam laminar disterilkan dengan alkohol teknis 70% dan diratakan/dikeringkan dengan tissue, kemudian dilanjutkan dengan menyalakan lampu ultra violet (UV) selama 0,5-1 jam untuk mematikan kontaminan di permukaan tempat kerja laminar.

B. Sterilisasi Alat dan Media

Alat-alat yang digunakan dalam penanaman berupa botol, erlenmeyer, baker glass, petridish, pinset, scalpel, gunting, jarum ose, dll. Sebelum disterilisasi sebaiknya peralatan dicuci dengan detergen kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Setelah kering dibungkus dengan kertas coklat/merang atau koran. Aluminium foil tidak direkomendasikan sebagai pembungkus karena uap tidak dapat menembus pembungkus. Temperatur yang digunakan untuk sterilisasi alat-alat dengan autoclave 121°C pada tekanan 17,5 psi (pounds per square inch) selama 20-30 menit. Sedangkan sterilisasi dengan oven, temperatur yang digunakan 150°C selama 4 jam.

C. Sterilisasi Bahan Tanam

Dalam kultur *in vitro*, sterilisasi kultur yang bebas kontaminan merupakan langkah yang sangat penting. Bahan tanam yang ada di lapang banyak mengandung debu, kotoran-kotoran dan berbagai kontaminan hidup pada permukaan. Apabila kontaminan ini tidak dihilangkan maka media yang mengandung gula, vitamin dan mineral merupakan sumber energi untuk hidup dan berkembang biak bagi kontaminan yang ada. Dalam beberapa hari tanaman akan mati baik sebagai akibat langsung maupun tidak langsung.

Setiap tanaman mempunyai tingkat kontaminasi berbeda tergantung pada jenis tanaman, bagian tanaman yang digunakan, morfologi permukaan, lingkungan tumbuh, musim, waktu pengambilan, mutu tanaman dan kondisi tanaman. Berdasarkan tingkat kontaminasi yang berbeda pada setiap tanaman, maka sulit menentukan prosedur

standar sterilisasi eksplan secara umum dan perlu dicari bagaimana prosedur sterilisasi tiap bahan tanam melalui percobaan pendahuluan.

Adapun prinsip sterilisasi eksplan adalah dapat mematikan kontaminan tanpa membunuh eksplan, karena baik kontaminan maupun eksplan merupakan benda hidup. Berhasilnya teknik sterilisasi merupakan langkah awal keberhasilan dalam kerja kultur *in vitro*.

Metode

A. Sterilisasi peralatan

Semua peralatan tanam yang digunakan dalam kultur *in vitro*, sebelumnya dicuci dengan detergen dan dibilas sampai bersih, pembilasan terakhir dengan menggunakan aquades, kemudian ditiriskan/dikering anginkan untuk selanjutnya disterilkan dengan autoclave dan disimpan di dalam oven untuk menjaga peralatan agar tidak terkontaminasi.

Peralatan pinset, gunting, scalpel, jarum ose, petridish, dll. Sebelum disterilkan, terlebih dahulu dibungkus dengan kertas coklat/koran. Setelah selesai sterilisasi, semua peralatan bisa digunakan dengan harapan menekan kontaminasi.

B. Sterilisasi media

Pada kultur *in vitro*, media tanam yang dipergunakan adalah media steril. Sterilisasi media sangat diperlukan sebagai upaya menghindari kontaminasi selama kultur. Teknik sterilisasinya dengan **autoclave**. Media yang telah dibuat dimasukkan ke dalam botol kultur dan ditutup dengan aluminium foil. Sterilisasi dilakukan selama 20-30 menit pada temperatur 121°C dengan tekanan 17,5 psi.

C. Sterilisasi bahan tanam

Bahan tanam dapat berasal dari lapang, rumah kaca dan dari kultur yang sudah steril. Eksplan dari lapang mempunyai tingkat

kontaminasi lebih tinggi dibandingkan dengan yang berasal dari rumah kaca. Eksplan tersebut berupa potongan tunas muda, batang, daun, akar, umbi, rimpang dan lain-lain. Cara sterilisasi eksplan yang akan ditanam berbeda-beda tergantung dari jenis tanaman, bagian tanaman yang digunakan. Teknik sterilisasi dapat dilakukan sebagai berikut :

- dicuci bersih dengan air mengalir
- digojog dengan pestisida/fungisida
- direndam dengan bahan kimia tertentu/antiseptik di laminar air flow
- dibilas dengan air steril, kemudian ditanam

Pengamatan

- Tentukan jenis mikroorganismenya dan ciri-ciri yang menyebabkan terkontaminasi
- Tentukan prosentase keberhasilan dari teknik aseptik

Tabel 2.1 Jumlah kultur yang terkontaminasi dan jenis kontaminan

No	Jenis bahan tanam		Jenis bahan tanam	
	Hari ke 7	Hari ke 14	Hari ke 7	Hari ke 14
	Σ	Σ	Σ	Σ
	K	K	K	K
1	0	0	0	0
	-	-	-	-
2				
3				
dst				

Keterangan :

Σ : Jumlah terkontaminasi

K : Jenis kontaminasi

J : jamur

B : bakteri

Acara 3 KULTUR ORGAN

Tujuan

1. Melakukan kultur organ dan sub kultur.
2. Untuk mendapat eksplan steril.
3. Mengetahui proses terbentuknya sel kalus dari sumber eksplan yang berbeda-beda.

Pendahuluan

Bagian tanaman secara umum terdiri dari akar, batang, daun serta bagian reproduktif yang berupa bunga, buah/biji. Bagian-bagian tanaman tersebut mampu untuk beregenerasi menjadi tanaman lengkap baik secara langsung maupun tak langsung. Peristiwa ini terjadi karena tanaman mempunyai sifat **totipotensi sel** yaitu dalam satu sel mempunyai kemampuan untuk menjadi tanaman lengkap, jika berada pada kondisi yang mendukung. Perangsangan pembentukan tunas atau akar pada kultur *in vitro* tergantung dari organ tanaman dan spesiesnya dimana eksplan diambil. Potongan jaringan yang berasal dari berbagai organ seperti daun, kambium batang, mahkota bunga, akar, umbi lapis, embrio, biji atau jaringan-jaringan muda memberikan harapan yang tinggi terhadap keberhasilan kultur organ.

Macam organ yang berbeda-beda umumnya menunjukkan kecepatan pembelahan sel yang berbeda pula. Organ tanaman seperti embrio muda, hipokotil, kotiledon dan batang muda merupakan bagian tanaman yang mudah untuk mengalami diferensiasi dan menghasilkan kalus. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis organ tanaman dalam kultur *in vitro* antara lain mencakup genotip sumber bahan tanaman, media dan ZPT yang digunakan, kondisi lingkungan inkubasi, fisiologi jaringan dari eksplan

secara optimal sehingga diperoleh tanaman lengkap. Kultur organ dengan bahan tanam berupa pucuk tanaman yang sehat dan bebas virus mempunyai aspek praktis sebagai perbanyak klon yang cepat dan bebas penyakit.

Metode

A. Embrio tembakau

1. Sterilkan biji tembakau dengan kloroks 20% selama 3 menit dan bilas. Ulangi 3x.
2. Ambil biji tembakau menggunakan pipet.
3. Tanam biji ke dalam media botol yang sudah disediakan.
4. Tunggu hingga berkecambah dan tumbuh menjadi planlet.

B. Daun tembakau

1. Pilih daun pucuk yang masih sehat.
2. Cuci dengan deterjen dan membilas di air mengalir.
3. Gojog dengan kloroks 20% selama 3 menit dan bilas. Ulangi 3x (di dalam LAF)
4. Potong daun dengan ukuran 1x1 cm.
5. Tanam daun ke media yang sudah disediakan.

C. Sub Kultur

1. Siapkan kultur tembakau yang sudah siap sub kultur dan media kosong
2. Keluarkan tanaman tembakau dari botol kultur dan letakkan di petridish steril.
3. Pisahkan satu per satu tanaman tumbuh yang menggerombol dengan menggunakan pinset dan pisau steril.
4. Tanam satu per satu tembakau ke dalam media kosong tersedia.

Pengamatan

- Amati perubahan yang terjadi pada bahan tanam. Perubahan menunjukkan adanya proses pertumbuhan pada bahan tanam berupa kalus, akar atau tunas.
- Buat grafik yang menyatakan pertumbuhan kalus, tunas dan akar.

Tabel 3.1 Pertumbuhan bahan tanaman hasil kultur organ

No	Pertumbuhan bahan tanam								
	Hari ke 7			Hari ke 14			Hari ke 21		
	Kalus	tunas	akar	Kalus	tunas	akar	Kalus	tunas	akar
1									
2									
3									

Acara 4

ISOLASI DNA DAN RNA TOTAL

Tujuan

1. Melakukan isolasi DNA dan RNA total.
2. Menentukan konsentrasi DNA dan RNA hasil isolasi.

Pendahuluan

Molekul DNA dalam suatu sel dapat diisolasi untuk berbagai keperluan seperti amplifikasi dan analisis DNA melalui elektroforesis. Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Prinsip utama dalam isolasi meliputi **lisis**, **pemisahan DNA** dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta **pemurnian DNA**. Isolasi DNA tanaman, isolasi DNA bakteri, dan isolasi DNA hewan pada dasarnya memiliki prinsip yang sama namun memiliki modifikasi pada teknik dan bahan yang digunakan. Metode yang digunakan untuk mengisolasi DNA dari berbagai jenis tanaman, organ tanaman, maupun jaringannya dapat dilakukan dengan berbagai cara. Namun pada intinya terdapat tiga faktor utama yang sangat penting untuk dalam melakukan purifikasi dan ekstraksi DNA secara optimal. Pertama adalah cara dalam menghomogenkan jaringan tanaman khususnya adalah dinding selnya. Kedua adalah komposisi dari larutan buffer yang ditambahkan dalam penggerusan jaringan tanaman dan yang ketiga adalah penghilangan enzim penghambat polisakarida.

Untuk mengetahui ekspresi suatu gen dapat dilakukan melalui isolasi RNA. Semua komponen di level selular hingga individu dikendalikan oleh ekspresi gen, sehingga dengan mempelajari RNA sebagai parameter biokimia sel dapat diketahui level transkriptomik suatu organisme. Prinsip Isolasi RNA tidak jauh berbeda dengan isolasi

DNA, yang meliputi **ekstraksi RNA**, **pemurnian RNA**, dan **presipitasi RNA**.

Isolasi DNA dan RNA dapat dilakukan dengan mudah menggunakan Kit Isolasi DNA/RNA. Penggunaan Kit memberikan hasil isolat DNA/RNA yang lebih murni dari kontaminan dan degradasi.

Metode

A. Metode Isolasi DNA Total

a) Alat dan Bahan:

- Kultur bakteri
- Kit isolasi DNA (Fermentas)
- Microtube
- Yellow tip
- Micropipet
- Sentriguge
- Mortar
- Spektrofotometer
- Seperangkat alat elektroforesis

b) Langkah Kerja

- 1) Daun kentang digerus dengan ditambahkan nitrogen cair, kemudian ditambahkan lysis solution sebanyak 400 µl dan dimasukkan kedalam tabung effendof 1,5 ml, diinkubasi 5 menit dengan suhu 65° C.
- 2) Ekstraksi dengan 600 µl kloroform dan homogenkan (bolak-balik 3-5 kali), sentrifugasi 10.000 rpm selama 2 menit. Ambil supernatannya dan peletnya dibuang, dipindahkan ke tabung effendorf baru.
- 3) Kemudian tambahkan 800 µl precipitation solution; campur dengan dibolak-balik perlahan pada suhu ruang selama 1-2

menit. Sentrifugasi 10.000 rpm selama 2 menit. Ambil peletnya dan supernatannya dibuang.

- 4) Larutkan pelet DNA dalam 100 µl 1,2 M larutan NaCl dan divortex perlahan. Presipitasi (diendapkan) dengan 300 µl ethanol dingin dan diinkubasi selama 10 menit pada 20°C, sentrifugasi 10.000 rpm selama 3-4 menit, kemudian ethanol dibuang. Setelah itu pellet dicuci lagi dengan ethanol dingin 70%. DNA dilarutkan dalam 100 µl air deion steril dengan divortex perlahan.
- 5) Diperoleh DNA total.
- 6) Ukur konsentrasi DNA menggunakan spektrofotometer, kemudian lakukan elektroforesis di gel agarose.

B. Metode Isolasi RNA total

a) Alat dan Bahan

- *Drosophila melanogaster*
- Refrigerated centrifuge
- Microcentrifuge
- Micropipet
- Aerosol barrier tips
- Vortex mixer
- Ethanol 70 %
- Tabung sentrifuga
- DEPC-treated water
- Trizol reagent
- Ice cold PBS
- Isopropyl alcohol
- Powder-free gloves

b) Langkah kerja

- 1) Gerus sampel berupa seekor *Drosophila melanogaster* (0.0512 g) dalam mortal dengan ditambahkan nitrogen cair, homogenisasi. Kemudian tambahkan 1 ml Trizol reagen. Setelah itu pindahkan

dalam tube, diinkubasi 5 menit pada suhu ruang, sentrifuge 12,000 rpm selama 5 menit. Kemudian pindahkan supernatan yang diperoleh ke dalam tube yang baru.

- 2) Tambahkan 0.2 ml chloroform dan vortex 15 detik. Kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit dan selanjutnya sentrifuge 12,000 g pada suhu 4°C selama 15 menit. Setelah sentrifuge, larutan akan terbagi menjadi tiga yaitu fase phenol chloroform yang berada paling bawah berwarna merah, interfase dan fase atas yang bening (aqueous phase). RNA terlarut dalam fase atas.
- 3) Pindahkan fase atas ke dalam tube baru. Volume yang dipakai sekitar 60% dari volume Trizol yang digunakan untuk homogenisasi. Kemudian presipitasi dengan menambahkan 0.5 ml isopropyl alkohol, inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan disentrifuge 12,000g 4°C selama 10 menit . Diperoleh a gell-like pellet disisi dan dasar tabung.
- 4) Buang supernatant, cuci dengan 75% ethanol, sentrifuge 7,500g pada 4°C selama 5 menit. Proses pencucian dilakukan 2X. Buang semua sisa etanol. Diperoleh pellet RNA.
- 5) Kering-anginkan (air-dry) pellet RNA selama 5-10 menit (jangan terlalu kering), setelah itu tambahkan DEPC-treated water dan dipipetting. Diperoleh total RNA.
- 6) Analisis selanjutnya dengan elektroforesis pada agarose gel dan spektrofotometri.

Diskusi

1. Apakah perbedaan prinsip isolasi DNA dan RNA?
2. Jelaskan masing-masing fungsi dari larutan yang digunakan!
3. Analisislah hasil elektroforesis DAN dan RNA yang kalian peroleh!
4. Analisislah hasil pengukuran konsentrasi DNA dan RNA!

Acara 5

PURIFIKASI DNA PLASMID

Tujuan

1. Melakukan isolasi dan purifikasi DNA plasmid.
2. Melakukan pemotongan DNA plasmid dengan enzim restriksi.

Metode

a) Alat dan Bahan

Microtube
Sentrifuge
Alat elektroforesis
Vortex
LB Cair
Kultur bakteri
Larutan I (GTE)
Larutan II (Buffer lysis)
Larutan III (KOH)
Ethanol absolute
Ethanol 70%
Larutan TE

b) Langkah Kerja

Isolasi plasmid dengan menggunakan metode alkali lisis, adapun tahapannya adalah sebagai berikut:

- 1) 6 ml medium LB cair yang berisi ampicillin, kanamycin, dan bakteri *E.coli* diinkubasi selama 16-18 jam (overnight). Setelah itu tuang ke dalam tabung 1,5 ml dan sentrifugasi 12.000 rpm selama 2 menit. Buang supernatan yang terbentuk, kemudian tambahkan lagi *collecting* bakteri dan ulangi langkah ini sampai *collecting* bakteri habis.

- 2) Tambahkan dengan 100 μ l solution 1, tabung diinversi beberapa kali dan inkubasi selama 1 menit. Larutan 1 (GTE) yang terdiri atas : 0,5 ml glukosa, Tris.Cl 0,25 ml, EDTA 0,2 ml dan deion 9,05 ml. Larutan ini berfungsi untuk pengkondisian sel.
- 3) Selanjutnya tambahkan 200 μ l solution II, diinversi beberapa kali kemudian inkubasi selama 1 menit pada suhu ruang, larutan II mengandung buffer lisis berupa NaOH dan SDS. Untuk memisahkan DNA kromosom dengan plasmid maka ditambahkan 350 μ l solution 3 yang mengandung potassium asetat, as.asetat glacial, dan deion kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Selanjutnya sentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit.
- 4) Pindahkan supernatan ke dalam EZ Column dan sentrifugasi 10.000 rpm selama 2 menit, cairan yang *flowthrough* dibuang kemudian ditambahkan 500 μ l wash solution selanjutnya sentrifugasi 10.000 rpm selama 2 menit, tahapan penambahan wash solution dilakukan 2 kali. Kemudian buang cairannya dan sentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit.
- 5) Pindahkan ke eppendorf 1,5 ml lalu tambahkan 50 μ l TE pH 8. Kemudian inkubasi pada suhu ruang selama menit, sentrifugasi 10.000 rpm selama 2 menit, selanjutnya simpan DNA plasmid yang diperoleh pada -20°C , TE pada tahapan ini berfungsi untuk melarutkan DNA plasmid.

Restriksi Plasmid DNA adalah memotong DNA plasmid yang diperoleh dengan menggunakan enzim restriksi. Restriksi yang dilakukan adalah *single digest* dan *double digest*. Komponen reaksi restriksi adalah: plasmid, enzim, buffer, dan H₂O. Langkah kerjanya meliputi:

- 1) Campur semua komponen dan resuspensi.
- 2) Inkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam, lalu simpan di -20°C (atau langsung langkah 3). Enzim restriksi yang digunakan dalam

single digest adalah NcoI dengan buffer H*, sedangkan pada restriksi double digest menggunakan 2 jenis enzim: NotI dan NcoI serta buffer multicore.

Komponen reaksi *single digest* dan *double digest*:

Komponen reaksi	volume	volume
DNA	2,0 µl	2,0 µl
NcoI	0,5 µl	0,5 µl
NotI	-	0,5 µl
Buffer	2,0 µl	2,0 µl
H ₂ O	5,5 µl	5,0 µl
Volume total	10 µl	10 µl

3) Selanjutnya untuk mengamati hasil restriksi maka dilakukan secara elektroforesis dengan membandingkan plasmid DNA yang direstriksi dengan plasmid DNA tanpa restriksi.

Diskusi

1. Apakah yang menyebabkan terjadinya *incomplete digestion*?
2. Mengapa bisa muncul *extra band(s)* pada gel?

Acara 6

PCR 16sRNA

Tujuan

Melakukan PCR 16sRNA.

Pendahuluan

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Metode ini banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik, misalnya untuk melipatgandakan suatu molekul DNA. Dengan metode ini, segmen tertentu pada DNA dapat digandakan hingga jutaan kali lipat dalam waktu relatif singkat. Kelebihan lain metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, misalnya DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 µg, oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM, dan reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 µl.

Prinsip kerja PCR secara umum adalah pada siklus pertama, pada tahap awal dengan suhu sekitar 94°C, DNA template akan memisah menjadi utas tunggal (tahap denaturasi). Pada tahap kedua, temperature diturunkan menjadi kira-kira 20-65 °C, sehingga primer akan menempel pada sekuen target pada DNA template (tahap annealing). Pada tahap ketiga, digunakan temperature 72 °C karena pada temperature tersebut aktifitas polymerase optimal (tahap elongasi). Kemudian enzim Taq polymerase akan memperpanjang daerah 3' dari penempelan DNA primer sampai mencapai sisi penempelan (binding site) dari pasangan primer yang lainnya. Karena proses ini terjadi pada posisi penempelan kedua primer di masing-masing utas tunggal DNA yang membatasi fragmen DNA target, maka fragmen target secara lengkap dapat mengalami replikasi.

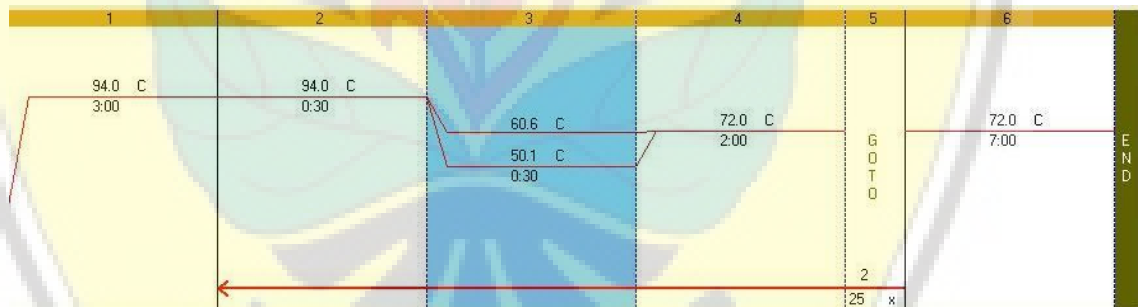
Metode

- 1) Siapkan mix larutan stok yang akan digunakan untuk PCR 16sRNA, yang terdiri dari :

Komposisi	9X	1X
DNA	8	2 μ L
Buffer	22.5	2.5 μ L
dNTPs	45	5 μ L
5u/ μ l Taq	2.25	0.25 μ L
PF	9	1 μ L
PR	9	1 μ L
MgCl ₂	18	2 μ L
Deion	101.25	11.25 μ L
Total	225	25 μ L

- 2) Bagi larutan stok ke dalam 9 tube @ 25 μ L
- 3) Masukkan tube ke dalam mesin PCR
- 4) *Setting* program PCR untuk 25 siklus, *running* selama kurang lebih 2.5 jam.

Program PCR yang digunakan:



- 5) Elektroforesis hasil PCR 16sRNA

Diskusi

1. Apabila tidak terbentuk *band* setelah reaksi PCR, apa sajakah kemungkinan penyebabnya? Jelaskan!
2. Mengapa perbedaan *temperature melting* dari primer *forward* dan *reverse* dianjurkan tidak lebih dari 10 °C?

Acara 7

TRANSFORMASI DAN LIGASI

Tujuan

1. Melakukan ligasi PCR produk dan pGEM-T Easy Vector.
2. Melakukan transformasi hasil ligasi ke sel kompeten *Escherichia coli*.

Pendahuluan

Ligasi (*ligation*) artinya menyambung DNA dengan vector. Pada umumnya, fragment DNA dan vektor (plasmid) yang akan digunakan untuk ligasi harus dipotong dulu dengan enzim restriksi tertentu. Namun khusus untuk pGEM-T Easy dan beberapa vektor untuk *basic cloning* bisa langsung digunakan untuk ligasi dengan DNA (*insert*) hasil PCR. Kloning ke dalam plasmid *E. coli* dalam bentuk sel kompeten masih merupakan metode terpenting untuk membuat DNA dalam jumlah besar dan murni. Plasmid memiliki *origin of replication* bakteri (ORI), gen resisten untuk seleksi dalam media antibiotik (Amp), dan gen yang dapat digunakan untuk mendeteksi penyisipan cDNA (*lacZ*). Setelah plasmid dibuka dan cDNA disisipkan dengan bantuan enzim restriksi dan ligasi, konstruksi DNA ini dimasukkan ke dalam bakteri *E. coli* melalui proses transformasi dengan cara syok panas (*heat shock*) atau dipanaskan pada 42°C selama 1 menit (*heat shock*) atau dengan memberikan aliran listrik (*electroporation*), sehingga DNA plasmid dapat melalui dinding bakteri masuk ke dalam sel bakteri.

Metode

a) Alat dan bahan:

- Laminar
- SOC cair
- LB padat
- Cawan petri
- Batang L + tempat alcohol

- Es
- Shaker
- Inkubator 42°
- Sel kompeten
- Tips kuning, putih, biru
- Mikropipet semua ukuran
- Microtube
- Falcon 50 ml
- Plastik Wrap
- Xgal, IPTG, Amp
- Hasil ligasi

b) Langkah Kerja

1) Formula untuk ligasi sebagai berikut (total volume 10 μ L):

a. Untuk rasio vector:insert=1:5

2x Ligation Buffer : 5 μ L

pGEM-T Easy Vector: 1 μ L

PCR product: 3 μ L

T4 Ligase: 1 μ L

b. Untuk rasio vector:insert=1:3

2x Ligation Buffer : 5 μ L

pGEM-T Easy Vector: 1 μ L

PCR product: 1.875 μ L

T4 Ligase: 1 μ L

De-ion: 1.125 μ L

2) Semuanya dicampur dalam e-tube dan diletakkan (inkubasi) pada suhu 16 °C selama minimal 16 jam atau overnight. Kemudian dilanjutkan dengan proses transformasi, yaitu men-transfer DNA yang telah tersambung dengan pGEM-T Easy pada bakteri E.coli yang sudah kompeten (sel kompeten).

3) Ambil sel kompeten *Escherichia coli* dari freezer dan taruh dalam es, tunggu sampai mencair. Pipet *ligation product* dan larutkan (mix)

dalam sel kompeten tersebut. Inkubasi dalam es selama 30 menit. Sambil menunggu, siapkan *heating block* atau *water bath*, setting suhu 42 °C. Setelah itu, inkubasi sel tersebut dalam *heating block* selama 90 detik. Segera taruh lagi dalam es selama 10 menit.

- 4) Tambahkan media SOC cair sebanyak 600 µL pada sel, dan inkubasi dalam shaker pada suhu 37 °C selama 3 jam. Lalu sentrifugasi selama 30 detik, dan sisakan sel sebanyak 100 ul.
- 5) Sambil menunggu yang 3 jam, siapkan plate LB yang mengandung antibiotik ampicillin, dan *spread* 2 µL IPTG dan 4 µL X-gal pada media tersebut sebanyak masing-masing 20 ul secara bergantian.
- 6) *Plating (spread)* sel pada media LB ampicillin yang juga telah mengandung IPTG dan X-gal tersebut. Inkubasikan pada suhu 37 °C selama 12 jam.
- 7) Keesokan harinya bisa dilihat koloni yang tumbuh. Akan terdapat koloni berwarna putih dan koloni berwarna biru. Untuk keperluan konfirmasi klon (*miniprep*), diambillah (*pick up*) dengan memakai tusuk gigi steril koloni yang berwarna putih. Koloni putih ditumbuhkan di kultur cair 5 ml LB cair + 5 µL amp + 1 koloni, kemudian inkubasi 37 °C selama 16-18 jam dengan *shaker*.
- 8) Isolasi plasmid

Diskusi

1. Apa sajakah kemungkinan hasil transformasi yang terbentuk? Mengapa hal tersebut terjadi?
2. Jelaskan faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan ligasi dan transformasi!

Acara 7

PENGENALAN WEBSITE BIOINFORMATIKA

Tujuan

1. Mengenal situs-website dari Gen BANK untuk DNA dan protein dari genom prokariot dan eukariot.
2. Mengenal situs-website program-program bioinformatika untuk mengolah data-data DNA dan protein (public domain dan komersial).
3. Berlatih untuk mengakses database DNA dan protein.

Metode

a. Pengenalan NCBI (Gene-Bank)

1. Pada browser anda, buka alamat berikut www.ncbi.nlm.nih.gov
2. Pada kotak isian "for" ketik kata Cancer, lalu klik [Go]
Q1: Berapa jumlah DATA Pubmed yang anda peroleh?
Q2: Berapa jumlah DATA Nucleotida yang anda peroleh?
Q3: Berapa jumlah DATA Taxonomy yang anda peroleh?
3. Klik link hasil DATA [Pubmed]
4. Klik Tab [Details]
Q4: Bagaimana entrez menginterpretasikan query "Cancer" yang anda masukkan untuk database pubmed ini?
5. Klik Tab [Limit], pada pull down menu " tag term" pilih opsi "MeSH Terms" (Medical subject heading Term), lalu klik [Go]
Q5: Berapa jumlah DATA Pubmed yang anda peroleh sekarang?
Q6: Berbedakah dengan jumlah DATA awal?
6. Klik Tab [Details]
Q6: Bagaimana Entrez menginterpretasikan query "Cancer" anda sekarang?
7. Kembali ke halaman muka NCBI (klik logo [NCBI] di sudut kiri

atas)

8. Pada pull down menu "search" pilih opsi "Nucleotida"
9. Pada kotak search Ketik kata Cancer, lalu klik [Go]
Q7: Berapa entry yang muncul? Berapa entry untuk core nucleotida? Buka salah satu entry (Klik Nomor Akses yang di Highlight pada entry yang pertama)
Q8: Berasal dari organisme apakah entry nukleotida tersebut? Berapa pasang basa sekuen nukleotida pada entry tersebut?
10. Ketik tab [Details]
Q9: Bagaimana entrez menginterpretasi query "Cancer" anda sekarang?
11. Pada kotak Details hapus interpretasi Cancer[All Fields], lalu klik [Search] Q10: Berapa data nukleotida yang diperoleh?
12. Kembali ke halaman muka NCBI
13. Pada pull down menu "Search" pilih Taxonomy, pada kotak "for" ketik Escherichia, link tersebut kemudian di klik
Q11: Berapa hasil DATA taxonomy yang muncul?
14. Klik pada salah satu hasil pencarian yang muncul
15. Beri tanda ceklis pada opsi "Nucleotida" dan "Protein", lalu klik [Display]
Q12: Berapakah jumlah DATA Nukleotida yang ada pada genus *Escherichia*?
Q13: Berapakah jumlah DATA Protein yang ada pada genus *Escherichia*?
16. Kembali ke halaman muka NCBI
17. Pada pull down menu "Search" pilih Nucleotida, pada kotak "for" ketik Escherichia, lalu klik [Go]
Q14: Berapakah jumlah DATA Nukleotida yang diperoleh?
18. Klik tab [Limit], pilih Fields "Organism", Molecule "mRNA", lalu klik [Go]
19. Klik tab [Details]

Q15: Tulis kembali Query yang tertulis pada kotak Query translation?

20. Klik tab [Preview/Index]

21. Pilih "Title" pada pull down menu, ketik "K12" di kotak isian sebelahnya, lalu klik [AND], lalu klik [Preview]

Q16: Berapa jumlah DATA yang muncul? Apa judul hasil subjek pertama?

b. Pengenalan Website Bioinformatik-Protein (Mengenali Expasy)

1. Pada browser anda buka www.expasy.org
2. Klik link [New UniProt WebSite] pada kotak Database
3. Klik Protein Knowledgebase (UniProtKB)di kolom search in lalu klik Fields
4. Klik [Start]
5. Click on **Fields** » to open the query builder
 - a. Select **Field**: Organism [OS]
 - b. Type: Bacillus
 - c. Click on **Add & Search**
6. Click on **Fields** » to open the query builder
 - a. Select **Field**: Gene Named
 - b. Type : Cel
 - c. Click on **Add & Search**
7. Click on **Fields** » to open the query builder
 - **Field**:
 - Protein
 - Name
 - Type
 - CelluloseClick on **Add & Search**

Q1: ada berapa entry yang muncul

8. Pada pull down menu view pilih [Short Description] lalu Klik [View] Q2: Apa no. Acc. entry yang pertama

9. Klik link pada kolom 'RootLibs' untuk entry pertama Q3: Apa nama

protein dari sekuen entry tersebut? Q4: Apa nama gen dari sekuen entry tersebut?

Q5: Berasal dari organisme apa sekuen entry tersebut?

Q6: Keyword apa saja yang yang bisa digunakan untuk mendapatkan entry ini?

c. Pengenalan NCBI - Influenza Virus Resource

1. Pada browser anda buka alamat ini www.ncbi.nlm.nih.gov
2. Pada pull down menu "Search" pilih nucleotida, pada kolom isian "for" isi dengan Acc. No. CS406467
Q1: sumber dari entry tersebut adalah dari organisme?
Q2: Adakah informasi subtype?
Q3: Adakah informasi strain?
Q4: Adakah informasi Host (inang)?
Q5: Adakah informasi Negara asal?
3. Kembali ke halaman muka NCBI
4. Pada kolom pilihan sebelah kanan klik link [Influenza Virus Resource]
5. Klik [Database] pada main menu di atas
6. Pada pilihan show: Ceklis Radio Button Nucleotida sequence
7. Pada Virus species: pilih [Influenzavirus A]; Pada Host: pilih [Avian]; Pada Country/Region: pilih [Asia]; Pada Segment: pilih [4(HA)]; Pada kolom isian Subtype: ketik "H5N1", Pada kolom isian From year: ketik "1996", Pada kolom isian To year: ketik "2006", lalu klik [Get Sequences]
Q6: Berasal dari negara manakah 6 entry pertama?
8. Kembali pada jendela main page-database Influenza Virus Resource
9. Pada pilihan show: Ceklis Radio Button Nukleotida
10. Pada Virus species: pilih [Influenzavirus A]; Pada Host: pilih [Avian]; Pada Country/Region: pilih [Indonesia]; Pada

Segment: pilih [any]; Pada kolom isian Subtype: ketik "H5N1", Pada kolom isian From year: ketik "1996", Pada kolom isian To year: ketik "2006", ceklis pilihan Full-length sequence, lalu klik [Add to Query Builder]

11. Pada Virus species: pilih [Influenzavirus A]; Pada Host: pilih [Avian]; Pada Country/Region: pilih [Vietnam]; Pada Segment: pilih [any]; Pada kolom isian Subtype: ketik "H5N1", Pada kolom isian From year: ketik "1996", Pada kolom isian To year: ketik "2006", ceklis pilihan Full-length sequence, lalu klik [Add to Query Builder]
12. Klik [Get Sequence]
Q7: Sebutkan salah satu nama virus (lengkap dengan strain, host, country dan tahun) dari entry yang menunjukkan full-length sequence?
13. Klik Acc. No. untuk entry yang pertama
Q8: Apa molekul dari sekuen pada entry tersebut?
14. Kembali pada jendela main page-database Influenza Virus Resource
15. Klik link [Here] untuk 'Advanced Search Tool' pada bagian atas
16. Pada Virus species: ceklis [Influenzavirus A] dan [Influenza B]; Pada Host: ceklis [Avian] dan [Swine]; Pada Country/Region: pilih [Hogkong] dan [Indonesia]; Pada Segment: pilih [4(HA)] dan [6(NA)]; Pada kolom isian Subtype: ketik "H5N1", Pada kolom isian From year: ketik "1996", Pada kolom isian To year: ketik "2006", lalu klik [Get Sequences]
Q9: Ada berapa entry yang muncul?
17. Klik Acc. No. entry yang terakhir
Q1: sumber dari entry tersebut adalah dari organisme?
Q2: Adakah informasi subtype, sebutkan?
Q3: Adakah informasi strain, sebutkan ?
Q4: Adakah informasi Host (inang), sebutkan ?
Q5: Adakah informasi Negara asal, sebutkan?

REFERENSI

Green, M.R. and Sambrook, J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Fourth Edition. CHSL Press.

Narulita, E., Addy, H.S., Kawasaki, T., Fujie, M. and Yamada, T. 2015. The involvement of the pilQ secretin of type IV pili in phage infection in *Ralstonia solanacearum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 469 : 868-872.

Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

Yusuf, Z. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Saintek*. Vol 5 (6).

