



PETUNJUK PRAKTIKUM BIOTEKNOLOGI KESEHATAN

TIM MK BIOTEKNOLOGI KESEHATAN:

Prof. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si.

Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si.

Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.



KATA PENGANTAR

Buku pedoman praktikum Bioteknologi Kesehatan ini digunakan sebagai pedoman dalam bekerja di laboratorium untuk praktikum mahasiswa yang menempuh MK Bioteknologi Kesehatan. Praktikum Bioteknologi Kesehatan merupakan pengembangan dari praktikum Biologi Molekuler yang sudah diberikan di semester semester sebelumnya. Di MK Bioteknologi Kesehatan, praktikum lebih ditekankan pada metode metode dasar aplikasi pengetahuan Biologi Molekuler dalam Bioteknologi Kesehatan Modern saat ini untuk mendukung materi perkuliahan yang disampaikan di kelas.

Penyusunan buku petunjuk praktikum ini dilakukan dengan tetap mempertimbangkan adanya “*update*” informasi dan pengetahuan sesuai dengan perkembangan bioteknologi kesehatan saat ini. Namun demikian sangat disadari bahwa penyusunannya tidak lepas dari kekurangan, oleh karena itu kami terbuka terhadap masukan yang konstruktif dari berbagai pihak untuk peningkatan kualitas praktikum MK Bioteknologi Kesehatan.

Pada kesempatan ini kami juga mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan materi maupun petunjuk teknis sehingga terwujud buku pedoman praktikum ini.

Jember, 19 Februari 2024
Penyusun

TATA TERTIB PRAKTIKUM BIOTEKNOLOGI

Tata tertib dalam menjalankan praktikum:

1. Mempelajari acara-acara praktikum dengan membuat pendahuluan, metode dalam bentuk bagan kerja sebelum melakukan praktikum
2. Masuk ke dalam laboratorium 5 menit sebelum praktikum dimulai
3. Hanya buku kerja yang dibawa ke ruang praktikum
4. Memperhatikan petunjuk-petunjuk yang diberikan oleh dosen atau asisten
5. Alat-alat yang dipakai harus dalam keadaan bersih dan utuh. Kalau ada kerusakan supaya segera melapor pada asisten
6. Bertanggung jawab terhadap alat-alat yang dirusakkan
7. Tidak boleh makan, minum, merokok di ruang praktikum selama bekerja
8. Kalau berhalangan hadir, harus memberi tahu secara tertulis
9. Selama praktikum diharuskan selalu menggunakan jas lab.

I. ISOLASI PLASMID

Plasmid merupakan molekul DNA sirkuler utas ganda yang berukuran kecil yaitu antara 1 kb- 200 kb (Snyder & Champness 2007). Plasmid hampir selalu membawa satu gen atau lebih dan sering kali gen-gen tersebut menyebabkan adanya ciri-ciri penting yang ditunjukkan oleh bakteri inangnya. Salah satu sifat yang mungkin dimiliki adalah keberadaan gen yang dapat resisten terhadap antibiotik. Hal ini dapat digunakan sebagai suatu *selectable marker* untuk memastikan bahwa bakteri dalam kultur mengandung gen tertentu. Plasmid memiliki satu urutan rangkai DNA yang dapat bertindak sebagai *origin of replication*, sehingga plasmid mampu memperbanyak diri didalam sel dan tidak tergantung pada kromosom bakteri (Brown, 2003). Di dalam satu sel, dapat ditemukan lebih dari satu plasmid dengan ukuran yang sangat bervariasi namun semua plasmid tidak mengkodekan fungsi yang penting untuk pertumbuhan sel tersebut. Umumnya, plasmid mengkodekan gen-gen yang diperlukan agar dapat bertahan pada keadaan yang kurang menguntungkan sehingga bila lingkungan kembali normal, DNA plasmid dapat dibuang. Sebagian besar plasmid memiliki struktur sirkuler, namun ada juga plasmid linear yang dapat ditemukan

pada mikroorganisme tertentu, seperti *Borrelia burgdorferi* dan *Streptomyces*. Plasmid ditemukan dalam bentuk DNA utas ganda yang sebagian besar tersusun menjadi superkoil atau kumparan terpilin. Struktur superkoil terjadi karena enzim topoisomerase membuat sebagian DNA utas ganda lepas (tidak terikat) selama replikasi plasmid berlangsung. Struktur superkoil akan menyebabkan DNA plasmid berada dalam konformasi yang disebut lingkaran tertutup kovalen atau covalently closed circular (ccc), namun apabila kedua utas DNA terlepas maka akan plasmid akan kembali dalam keadaan normal (tidak terpilin) dan konformasi tersebut disebut sebagai open circular (oc).

Plasmid yang digunakan pada praktikum isolasi plasmid ini adalah plasmid pGLO. Plasmid pGLO merupakan plasmid modifikasi yang disisipi gen yang mengkodekan *Green Fluorescent Protein* (GFP). Plasmid ini memiliki ukuran 5400 bp dan membawa titik *ori*, gen GFP, regulator *ara C* (pengatur ekspresi dari gen GFP), gen resistensi terhadap antibiotik ampicillin (Gambar 1.).



Gambar 1. Peta plasmid yang telah disisipi gen GFP

Berikut ini adalah metode isolasi plasmid:

A. BAHAN:

1. Solution I (150mM glukosa, 25mM Tris Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0))
2. Solution II (0,2 n NaOH, 1% SDS)
3. Solution III (60 ml 5M potassium acetate, 11,5 ml Glacial acetic acid, 28,5 ml H₂O)
4. PCI / Phenol : chloroform Isoamylalcohol (24:1)
5. Buffer TE
6. Ethanol pa
7. NaAc

B. ALAT:

1. Mini Sentrifuge Berpendingin
2. Micropipet

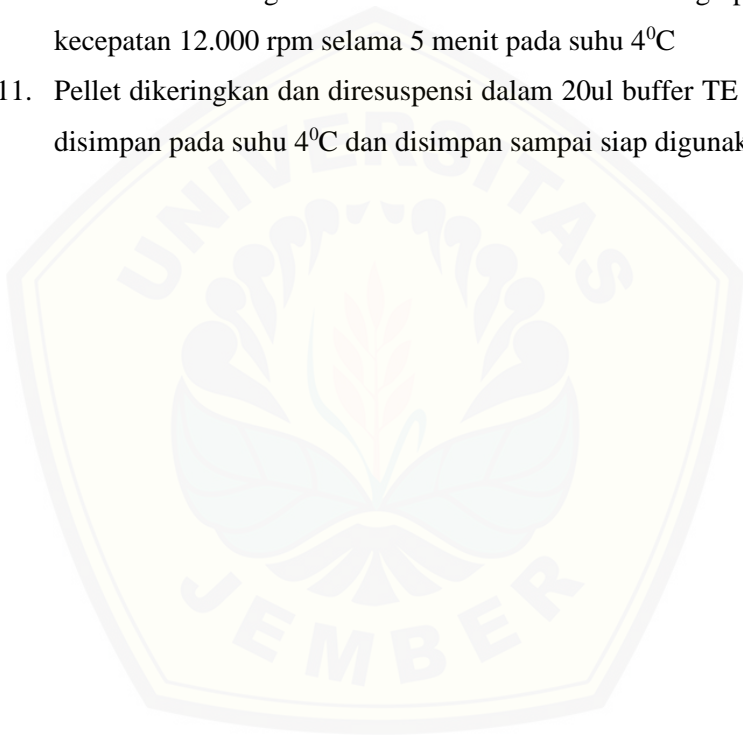
3. Vortex
4. Pengering DNA

C. CARA KERJA

1. Transfer single koloni bakteri pada media LB 2 ml yang mengandung antibiotik dan diinkubasi shaker selama satu malam pada suhu 37⁰C dengan kecepatan 120 rpm.
2. Masukkan 1,5 ml kultur bakteri pada ependorf. Sentrifus pada 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰C, kemudian supernatan dibuang
3. Tambahkan 100 ul solution I, pada pellet bakteri dan di vortex sampai bakteri benar-benar tersuspensi
4. Tambahkan 200 ul fresh solution II, kemudian dibolak-balik 5x (swirling) dan jangan di vortex. Inkubasi selama 5 menit sampai bening (menunjukkan lisis terjadi)
5. Tambahkan 150 ul solution III, lakukan swirling dan letakkan dalam es selama 5 menit
6. Sentrifuge 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4⁰C. transfer supernatan pada tube sentrifuge baru.
7. Selanjutnya ukur volume supernatan dan tambahkan PCI equal volume, lakukan vortex dan sentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit
8. Ambil supernatan (lap. Atas) lalu tambahkan ethanol pa dan 3M NaAc, ditambahkan masing-masing sebanyak 2,5 dan 0,1

dari volume supernatan. Selanjutnya dipresipitasi pada suhu - 20°C selama satu jam

9. Kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm 10 menit pada suhu 4°C
10. Pellet di cuci dengan 1ml 70% ethanol dan disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C
11. Pellet dikeringkan dan diresuspensi dalam 20ul buffer TE dan disimpan pada suhu 4°C dan disimpan sampai siap digunakan.



II. RESTRIKSI DAN LIGASI

Plasmid yang telah diisolasi biasanya perlu dianalisa lebih lanjut, terutama untuk verifikasi nya. Salah satu cara yang cepat untuk melakukan verifikasi DNA plasmid adalah dengan memotongnya dengan enzim restriksi tertentu, menganalisa fragmen-fragmen DNA hasil digesti melalui elektroforesis, mengukur ukuran total plasmid dan membandingkan lokasi enzim restriksi dengan lokasi peta plasmid yang tersedia. Pemilihan enzim restriksi yang akan digunakan tergantung pada DNA yang akan dianalisa dan tujuan digesti itu sendiri. Untuk verifikasi suatu DNA plasmid yang telah diketahui petanya, maka cukup dipilih enzim yang memotong disatu atau didua tempat saja. Hasil digesti DNA plasmid oleh enzim restriksi dapat dianalisa pada gel poliakrilamida atau agarosa. Secara umum poliakrilamida digunakan untuk memisahkan molekul berukuran kurang dari 1 kb, sedangkan agarosa untuk fragmen-fragmen berbobot molekul lebih besar 1 kb. Biasanya gel agarosa dengan konsentrasi 0.8%-1% paling baik untuk memisahkan fragmen DNA berukuran 1-20 kb.

Berdasarkan hasil pemotongan enzim restriksi, ada dua jenis enzim berdasarkan posisi pemotongannya yaitu pemotongan ujung lancip (*sticky end*) dan pemotongan ujung tumpul (*blunt end*). Adanya enzim restriksi endonuklease yang dapat “memotong” DNA dan ligase yang dapat menyambungkannya kembali, meletakkan dasar bagi pemotongan dan penyambungan DNA untuk mengklonkan sejumlah gen atau bagian gen tertentu.

Contoh Peta pemotongan DNA dengan menggunakan enzim restriksi.

Enzim	Urutan nukleotida	Enzim	Urutan nukleotida
<i>Apa I</i>	...GGGCC*C...	<i>Nsi I</i>	...ATGCA*T...
<i>Ava I</i>	...C*PyCGPuG...	<i>PaeR7 I or Xho I</i>	...C*TCGAG...
<i>Ava II</i>	...G*GA(T)CC...	<i>Pst I</i>	...CTGCA*G...
<i>BamH I</i>	...G*GATCC...	<i>Pvu II</i>	...CAG*CTG...
<i>Bgl I</i>	...GCCNNNN*NG	<i>Rsa I</i>	...GT*AC...
<i>Bgl II</i>	...A*GATCT...	<i>Sac I</i>	...GAGCT*C...
<i>RspD I or Cla I</i>	...AT*CGAT...	<i>Sac II</i>	...CCGC*GG...
<i>EcoR I</i>	...G*AATTC...	<i>Sal I</i>	...G*TCGAC...
<i>EcoR V</i>	...GAT*ATC...	<i>Sau3A I</i>	...*GATC...
<i>Hind III</i>	...A*AGCTT...	<i>Sma I</i>	...CCC*GGG...
<i>Kpn I</i>	...GGTAC*C	<i>Spe I</i>	...A*TAGT...
<i>Nco I</i>	...C*CATGG...	<i>Sph I</i>	...GCATG*C...
<i>Nde I</i>	...CA*TATG...	<i>Stu I</i>	...AGG*CCT...
<i>Not I</i>	...GC*GGCCGC	<i>Xba I</i>	...T*CTAGA...
		<i>Xho I</i>	...C*TCGAG...

Keterangan : * menunjukkan daerah pemotongan pada posisi nukleotida tertentu

Hampir semua urutan DNA yang dikenali oleh enzim restriksi adalah polindrom, yaitu bila mengenai kedua untai maka pada tiap untai akan terbaca dalam arah yang sama seperti terlihat pada tabel tersebut.

Ligasi merupakan proses penyambungan antara satu fragmen DNA dengan fragmen DNA lainnya. Faktor yang sangat berperan dalam proses ligasi adalah enzim ligase. Enzim ligase digunakan untuk menyambungkan DNA *insert* pada vektor. Enzim ini akan mengkatalis pembentukan ikatan kovalen antara gugus 3'OH dan 5'fosfat pada DNA (ikatan fosfodiester). Enzim ligase yang digunakan dalam praktikum ini adalah enzim T4 DNA ligase yang berasal dari T4 bakteriofage yang sangat efisien dalam meligasikan DNA (Carson & Robertson, 2006).

Metode Praktikum

Bahan :

- Insert DNA
- Plasmid
- T4 DNA ligase
- Enzim restriksi dan buffernya
- Enzim ligase dan buffernya
- dH₂O steril (nuclease free water) atau 1 x TE pH 8.0
- Standar ukuran molekul DNA
- Agarose
- 1 x TBE

- *Sample buffer*
- Larutan ethidium bromide 3 g/ml

Alat :

- Pipet mikro 20 μL
- Pipet mikro 200 μL
- Tabung mikro 1,5 mL
- Erlenmeyer 125 mL
- Elektroforesis gel mini
- UV-transsilluminator

Prosedur Kerja Restriksi

1. Masukkan komponen-komponen berikut ke dalam tabung eppendorf :

DNA (μL)	10Xbuffer (μL)	Enzim Restriksi (μL)	dH ₂ O steril (μL)	RNAase (μL)	Tot. Volum (μL)
Plasmid (3)	1	0	5.5	0.5	10
Plasmid (3)	1	0.5	4.5	0.5	10

2. Inkubasi dilakukan pada 37 °C, minimal 2 jam. Selama menunggu inkubasi, siapkan gel agarosa 1% (lihat materi

praktikum elektroforesis). Setelah larut agarose didinginkan dan dituangkan pada nampan plastik atau cetakan gel mini. Setelah agarose beku, dimasukkan dalam wadah elektroforesis, beri buffer TBE secukupnya (cukup menggenangi permukaan agarose saja)

3. Pelindung *chamber* ditutup dan running dilakukan pada 100 mA selama ± 30 menit atau sampai warna *buffer sample* mencapai bagian tepi bawah gel (hati-hati tegangan listrik tinggi).
4. Visualisasi dilakukan dengan UV-illuminator.

Prosedur kerja Ligasi dengan menggunakan T4 DNA ligase

Masukkan komponen-komponen berikut ke dalam tabung eppendorf :

DNA Vektor	10X buffer (μL)	T4 DNA Ligase unit	dH ₂ O steril μL	DNA sisipan dari perhitungan	Tot. Volum (μL)
50-100 ng (1 μL)	1	0.1-1 unit	10 μL	dari perhitungan	10

DNA sisipan yang digunakan disesuaikan dengan perhitungan dibawah ini:

$$\frac{\text{Vektor DNA}(\text{ng}) \times \text{insert}(\text{kb})}{\text{Vektor}(\text{kb})} \times \text{rasio molar} \frac{\text{insert}}{\text{vektor}} = \text{insert}(\text{ng})$$

III. VISUALISASI DNA

DNA yang telah diisolasi maupun direstriksi dapat divisualisasi dengan cara elektroforesis. Elektroforesis adalah suatu cara untuk memisahkan fraksi-fraksi suatu zat berdasarkan migrasi partikel bermuatan atau ion-ion makromolekul di bawah pengaruh medan listrik (Pomeranz dan Meloan, 1980). Migrasi partikel bermuatan tersebut dapat terjadi karena perbedaan ukuran, bentuk, muatan, atau sifat kimia molekul.

Boyer (1986) mengatakan bahwa elektroforesis umumnya dipergunakan untuk karakterisasi dan analisis molekul-molekul besar (polimer), di antaranya untuk menentukan berat molekul, mendeteksi kemurnian dan kerusakan protein, menetapkan titik isoelektrik, memisahkan spesies-spesies molekuler yang berbeda secara kualitatif maupun k-uantitatif. Dengan kata lain penentuan berat molekul suatu zat (dalam hal ini enzim) dapat dilakukan dengan elektroforesis.

Ada dua macam bahan penyangga yang umum dipergunakan dalam elektroforesis gel, yaitu gel pati dan gel poliakrilamid yang masing-masing mempunyai kekurangan dan kelebihan. Selain itu bahan penyangga (gel) dapat juga dicampur dengan bahan substrat, sehingga jika zat yang akan dianalisis berupa enzim dapat dilihat selain berat molekulnya, juga dapat dilihat aktivitas dari enzim itu.

Partikel yang bermuatan diantaranya adalah:

- Asam amino
- Protein
- Asam nukleat
- Ion-ion

Kegunaan elektroforesis

1. Menentukan berat molekul
2. Mendeteksi terjadinya pemalsuan bahan
3. Mendeteksi terjadinya kerusakan bahan seperti protein dalam pengolahan dan penyimpanan.
memisahkan molekul yang berbeda secara kuantitatif dan kualitatif
4. Menetapkan titik isoelektrik
5. Identifikasi dan Klasifikasi

Yang menentukan keberhasilan elektroforesis

1. Sistem buffer
 - Fungsi
Mempertahankan pH didalam reservoir dan dalam media penyangga sebagai elektrolit pembawa aliran listrik
 - Kondisi buffer

Harus tidak berinteraksi dengan makro molekul yang dipisahkan

- PH yang digunakan harus sesuai sehingga campuran makro molekul dapat terpisah satu sama lain tetapi tidak mengakibatkan denaturasi
2. Konsentrasi Gel
 - Harus disesuaikan, tidak boleh terlalu encer juga tidak boleh terlalu padat
 - Gel pati biasanya 9%-14%
 - Gel poliakrilamid biasanya 7,5%-10%
 - Gel agarose biasanya 0.8%-1.2%
 3. Tegangan listrik
 - Harus disesuaikan, tidak terlalu tinggi dan tidak terlalu rendah
 4. Suhu dan waktu running

Langkah Umum Elektroforesis

1. Preparasi sample dan persiapan gel.
Sampel
 - Mikroba : diisolasi
 - Sel tanaman/ jaringan : diekstrak
 - Darah : serum
2. Running

3. Pewarnaan dan Pembilasan
 - Protein : commasie blue
 - DNA : ethidium bromida
4. Interpretasi hasil
 - Muatan molekul
 - Berat molekul or panjang basa nukleotida untuk DNA (tergantung marker)

Dalam praktikum kali ini, akan dilakukan elektroforesis DNA dengan menggunakan agarose sebagai media elektroforesis.

Bahan-bahan:

- *loading dye*
- ekstrak DNA
- DNA ladder 1kb sebagai marker
- Agarose
- TBE 1x (*Tris Boric EDTA*)
- EtBr (*Ethidium Bromide*)

Alat-alat:

- neraca analitik
- erlenmeyer
- mikropipet dan mikrotip
- eppendorf
- cetakan gel
- mesin elektroforesis

- UV transilluminator

Metode elektroforesis dalam gel agarosa 1%

1. Siapkan Agarosa 1% dengan menimbang agarosa sebanyak 0,25 gr dan menambahkan larutan TBE 1X sebanyak 25 ml pada botol pembuatan gel.
2. Panaskan dalam microwave \pm selama 1 menit, hingga agarose terlarut dalam TBE.
3. Tambahkan 2 μ l *Ethidium bromide*, pada larutan gel tersebut lalu diratakan.
4. Tuang larutan gel pada cetakan. Tunggu hingga gel padat (\pm 30 – 60 menit) dan siap untuk digunakan untuk elektroforesis DNA.
5. Setelah gel memadat kemudian dimasukkan ke dalam kontainer elektroforesis yang sudah diisi dengan 1X TBE dan gel harus terendam semua.
6. Preparasi DNA/sample yang akan dielektroforesis dilakukan dengan menambahkan 1X loading dye (stok 6X) atau 2 μ l dalam 12 μ l total volume sampel.
7. Note : loading dye mengandung gliserol sebagai pemberat DNA sehingga DNA lebih mudah untuk dimasukkan dalam

sumur gel (comb) serta memberikan warna biru sebagai penanda posisi DNA yang dirunning.

8. Running dilakukan di mesin elektroforesis dengan menggunakan 80 – 100 V, sekitar 1 jam tergantung kepadatan gel dan hasil band DNA sampel yang diharapkan.
9. Visualisasi fragmen DNA dilakukan dengan UV-transilluminator dengan panjang gelombang 280 nm.
10. Penentuan ukuran fragmen DNA dilakukan dengan membandingkannya dengan marker DNA. Berbagai macam marker DNA dapat diperoleh secara komersial, diantaranya adalah 1 kb ladder yang memberikan ukuran pita-pita DNA dari 0.4 kb sampai 12 kb.

IV. TRANSFORMASI

TRANSFORMASI DNA PLASMID PADA *Escherichia coli* DH5- α DENGAN MENGGUNAKAN CaCl_2

Transformasi merupakan metode transfer molekul DNA organisme lain di dalam suatu lingkungan atau medium ke dalam sel organisme lain (Dale & Park, 2004). Transformasi bakteri diperkenalkan oleh Frederick Griffith pada tahun 1928 yaitu adanya transformasi genetik pada *Streptococcus pneumoniae*, dari kenyataan tersebut dapat dinyatakan bahwa suatu bakteri dapat melepaskan fragmen DNA-nya ke dalam sel bakteri yang lain (Snyder & Champness, 2007)

Proses transformasi sering menggunakan bakteri *Escherichia coli* sebagai sel inang. Fenotip strain *E.coli* hasil transforman akan berubah karena mendapatkan gen-gen baru yang dibawa oleh DNA tersebut. Molekul DNA tersebut dibawa ke dalam sel inang oleh suatu vektor yaitu plasmid. Pada praktikum ini plasmid yang akan diintroduksi ke dalam sel bakteri *E.coli* adalah plasmid pGLO dan pGMET Easy.

Transformasi plasmid pada bakteri *E.coli* DH5- α pada praktikum ini menggunakan CaCl_2 . CaCl_2 berfungsi untuk melemahkan dinding sel bakteri serta untuk mengikat DNA di permukaan sel. Masuknya DNA rekombinan kedalam sel

distimulasi oleh proses *heat shock*. Berikut ini merupakan metode transformasi menggunakan CaCl_2 .

Metode Praktikum

Bahan :

- *E. coli*, strain DH5- α
- 50 mM CaCl_2 steril
- Plasmid pGLO
- Plasmid pGMET Easy
- Media LB : LB agar plate, LB agar plate+ampicillin, LB agar plate+ampicillin+arabinosa

Alat-alat

- ependorf
- waterbath
- Micropipet
- Tip (10-100 μ l) dan (100-1000 μ l)

Cara Kerja :

I. Proses Transformasi

Koloni tunggal *E.coli* DH5- α dimasukkan dalam 250 μ l CaCl₂ 50 mM pada ketiga tabung ependorf (ependorf 1: perlakuan pGLO, ependorf 2: kontrol negatif (pGLO), ependorf 3: perlakuan pGMET Easy), kemudian diresuspensi dan dimasukkan dalam es selama 10 menit. Ependorf 1 ditambahkan dengan 10 μ l plasmid pGLO (tanda tutup ependorf dengan tanda +), ependorf 3 ditambahkan dengan 10 μ l plasmid pGMET Easy, kemudian pipeting pelan-pelan. Inkubasi ketiga ependorf tersebut pada es selama 15 menit.

Proses *heat shock* dilakukan dengan inkubasi ketiga ependorf tersebut pada waterbath dengan suhu 42°C selama 50 detik, kemudian inkubasi pada es selama 2 menit. Masing-masing ependorf tersebut ditambah dengan 250 μ l media LB cair, kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Sebanyak 100 μ l preparasi transformasi positif (yang berisi plasmid) disebar pada media LB agar+ampicilin dan 100 μ l pada media LB agar+ampicilin+arabinosa. Preparasi transformasi yang tidak berisi plasmid (kontrol negatif) ditumbuhkan pada media LB agar dan LB agar+ampicilin, masing-masing sebanyak 100 μ l. Inkubasi *plate* dilakukan pada suhu 37°C selama *overnight*.

II. Konfirmasi Keberhasilan Transformasi

Keberadaan gen yang dimasukkan ke dalam sel transforman sangat mempengaruhi metode yang akan digunakan untuk menentukan dan mengkonfirmasi berhasil atau tidaknya transformasi. Berdasarkan peta genetik dan restriksi yang dimiliki oleh pGLO maka dalam praktikum ini keberhasilan transformasi dapat diamati secara langsung dengan melihat GFP yang sudah diekspresikan serta peta restriksinya. Ekspresi GFP dapat langsung diamati melalui morfologi koloni. Jika transformasi berhasil, maka koloni yang tumbuh pada media LB+amp+ara akan berpendar dengan pendaran warna hijau ketika disinari dengan sinar UV, sedangkan koloni bakteri berisi plasmid pGLO yang tumbuh dalam media LB+amp akan berwarna putih dan tidak ada pendaran ketika disinari dengan lampu UV. *E.coli* tanpa plasmid (kontrol negatif) tidak akan tumbuh pada media LB+amp dan akan tumbuh menyebar di media LB tanpa tambahan ampisilin dan arabinosa.

V. PROTEIN TERAPEUTIK

Protein terapeutik merupakan molekul protein yang memiliki aktivitas sebagai obat sehingga dapat digunakan untuk keperluan klinis (Morrow, 2010). Protein terapeutik pada umumnya memiliki spesifitas tinggi yang tidak bisa ditiru dengan senyawa kimia sederhana. Reaksi protein terapeutik bersifat sangat spesifik dan jarang mengganggu proses biologis sehingga tidak menimbulkan efek samping. Tubuh manusia umumnya memberikan toleransi yang baik terhadap protein terapeutik dibandingkan dengan senyawa kimia. Selain itu, protein terapeutik bersifat unik dalam hal bentuk dan fungsinya (Leader *et al.*, 2008). Berdasarkan fungsi dan aktifitasnya, protein terapeutik dapat dibedakan menjadi beberapa jenis, seperti protein fusi, faktor pembekuan darah, faktor pembentukan tulang, anti-proliferatif, anti-koagulan dan anti-inflamasi (Dimitrov, 2012).

Selama beberapa dekade terakhir telah diketahui bahwa kelenjar saliva nyamuk yang bertindak sebagai vektor penyakit mengandung berbagai protein yang memiliki aktifitas sebagai anti-koagulan, anti-inflamasi dan mempengaruhi respon imun pada inang (Andrade *et al.* 2005, Fontaine *et al.* 2011). Protein-

protein tersebut diduga berperan dalam memfasilitasi nyamuk untuk melakukan *blood feeding* pada inang. Protein yang terkandung dalam kelenjar saliva vektor Arthropoda memiliki peranan penting sebagai “*counter-attack*” terhadap mekanisme pertahanan tubuh inang Vertebrata dalam menghambat proses *blood feeding*. Hal ini karena protein kelenjar saliva vektor Arthropoda memiliki potensi menghambat haemostasis inang Vertebrata melalui proses anti-koagulasi untuk menghambat vasokonstriksi (vasodilator), mengandung molekul spesifik (imunomodulator) yang berfungsi sebagai faktor anti-inflamasi dan menginduksi respon imun inang yang berupa respon alergi yang diwujudkan dengan rasa gatal di kulit dan kemerahan di lokasi gigitan (Fontaine *et al.* 2011). Komponen vasodilator dan imunomodulator pada kelenjar saliva dimanfaatkan oleh patogen untuk meningkatkan infektivitasnya di dalam tubuh inang Vertebrata, khususnya manusia (Rohousova and Volf, 2006).

Potensi saliva dalam meningkatkan transmisi patogen ke tubuh inang semakin mendorong banyak penelitian untuk melakukan identifikasi dan karakterisasi terhadap protein-protein yang terkandung dalam kelenjar saliva vektor Arthropoda. Salah satu metode proteomik untuk melakukan karakterisasi protein yaitu dengan analisis *Sodium Dodecyl Sulphate Poly-Acrilamide*

Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) dan dilanjutkan dengan analisis *Western Blot*. Analisis SDS-PAGE merupakan teknik elektroforesis gel yang menggunakan matrik poliakrilamida untuk memisahkan protein yang bermuatan berdasarkan berat molekulnya. Sedangkan analisis *Western Blot* dilakukan untuk menentukan berat molekul protein target yang dapat dikenali dan berikatan dengan antibodi yang digunakan sebagai detektor spesifik (Sambrook *et al.* 2008). Dengan demikian dapat diketahui profil protein imunogenik yang terdapat dalam kelenjar saliva vektor Arthropoda.

Bahan:

- PMSF dalam PBS
- Buffer sampel
- Buffer elektroda
- Akrilamid/bis-akrilamid 30%
- APS 10%
- Staining, desataining
- Membran PVDF
- Fiber pad
- Marker protein
- Methanol
- TBS
- Antibodi primer (Serum sehat endemik, serum sakit endemik, serum neonatus)

- Antibodi sekunder
- TMB
- NBT/BCIP

Alat:

- Mikropipet
- SDS-PAGE
- Western Blot *semi-dry*

Metode:

5.1 Ekstraksi Protein

Kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang telah di isolasi dimasukkan dalam ependorf dalam PBS dan PMSF. Ekstraksi protein kelenjar saliva dilakukan dengan menambahkan buffer sampel sebanyak 10 μ l kemudian dilakukan perebusan selama 3 menit dan protein siap digunakan untuk analisis selanjutnya.

5.2 Analisis Protein dengan Sodium Dodecyl Sulfat-Poli Acrylamide Gel elektroforesis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE dilakukan dengan menggunakan konsentrasi acrylamide 12,5%. Berikut ini adalah langkah yang harus disiapkan:

- Sampel protein disiapkan dengan menambahkan buffer sampel (0.06 M Tris HCL, pH 6,8 %, 2% SDS, 10% gliserol, 0,025% bromophenol blue dan β -mercaptoethanol)
- Panaskan pada suhu 95°C selama 3 menit.

- Sebanyak 10-60 μg protein dimasukkan dalam masing-masing sumur gel dan elektroforesis dilakukan pada 70 A selama 3-4 jam (Sambrook *et al*, 1989).
- Dilanjutkan dengan pewarnaan (staining) dan destaining untuk mengetahui pita-pita protein yang terbentuk.

5.3 Identifikasi protein imunogenik (western blot)

Analisis *western blot* digunakan untuk mendeteksi adanya ikatan spesifik antigen dan antibodi pada sampel protein menggunakan elektroforesis gel.

1. Membran PVDF dipotong sesuai ukuran gel akrilamid dan direndam dalam methanol selama 1 menit.
2. Gel akrilamid hasil SDS-PAGE, membran PVDF, dan *fiber pad* dengan ukuran yang sama dengan gel direndam terlebih dahulu dalam buffer transfer sebelum ditransfer ke membran, kemudian disusun seperti sandwich dengan susunan dari bawah *fiber pad*, membran PVDF, gel akrilamid hasil SDS-PAGE, *fiber pad*. Pastikan tidak ada gelembung udara.
3. Transfer protein dari gel akrilamid ke membran PVDF dilakukan selama 1 jam dengan tegangan 100 mA, 10 V.

4. Membran yang telah ditransfer dicuci dengan TBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit untuk menghilangkan sisa gel akrilamid yang melekat.
5. Inkubasi dilakukan dalam larutan *blocking* (5% *skim milk* yang terlarut dalam TBS) selama 1 jam.
6. Penambahan antibodi primer yang dilarutkan dalam 5% *skim milk*-TBS dengan perbandingan 1:500 dan diinkubasi *overnight* pada suhu 4°C.
7. Membran dicuci dengan TBS sebanyak 3x masing-masing selama 5 menit.
8. Antibodi sekunder ditambahkan dengan perbandingan 1: 5000 dalam 5% *skim milk*- TBS dan diinkubasi selama 2 jam.
9. Membran dicuci dengan TBS sebanyak 3x, masing-masing selama 5 menit hingga bersih.
10. Membran dikering anginkan kemudian ditetesi dengan BCIP/NBT dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan mencuci membran dalam akuades dan dikering anginkan.

VI. THE GENETIC FINGERPRINT

Genetic fingerprint merupakan salah satu contoh aplikasi untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar organisme dengan memanfaatkan marka molekuler. Aplikasi penggunaan teknologi ini diantaranya adalah untuk identifikasi secara pasti terdakwa kasus kriminal (*forensic molecular biology*) serta uji paternitas. Hanya untuk kembar identik uji ini tidak dapat digunakan karena kembar identik memiliki gen yang identik. setiap manusia memiliki 46 kromosom, 23 dari ayah dan 23 dari ibunya. DNA kita yang utuh mengandung kira-kira 3 milyar pasang basa, tetapi hanya sebagian kecil yang dimanifestasikan sebagai cetak biru tubuh kita. Pada praktikum kali ini, kita akan melihat salah satu situs penting yang menentukan hubungan kekerabatan antar manusia. Situs ini disebut lokus D1S80. Lokus ini terletak pada kromosom 1 dan terdiri dari urutan-urutan DNA dengan ulangan dan panjang yang sangat bervariasi untuk setiap orang. Langkah langkah berikut ini diperlukan untuk melakukan analisis *The Genetic Fingerprint*.

4.1. Preparasi sampel dengan Isolasi DNA Sel Mukosa.

Sampel DNA didapatkan dari sel mukosa yangn diambil dari rongga mulut manusia. Untuk mendapatkan sampel tersebut beberapa langkah berikut dilakukan :

- a. Berkumurlah dengan kuat dengan 8 ml air selama 2 menit
- b. tuangkan air kumur kedalam tabung plastik (tabung Falcon)
- c. Pindahkan 2 ml cairan ini kedalam tabung Eppidengan pipet dan putarlah (sentrifus) selama 2 menit pada kecepatan 3200 g.
- d. Buanglah cairannya (supernatan)
Ulangi langkah a) sampai c) paling sediki tsebanyak 2 kali.

Langkah langkah berikut dilakukan untuk isolasi DNA dari sampel sel sel mukosa tersebut.

- Tambahkan 500 μ l *buffer* lysis (50 mM Tris pH8;10mM EDTA; 2% SDS) pada pellet dengan tips biru.
- Jentikkan tabung Eppi dengan jari Anda sampai pellet menghilang (larut)
- Tambahkan 100 μ l *precipitation buffer* (kalium asetat 8 M), kocoklah tabung Eppi dan letakkan di dalam es selama 5 menit . Amati apa yang terjadi pada larutan tersebut.
- Tabung Eppi disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan maksimum untuk mengendapkan protein.

- Pindahkan sekitar 400 μl supernatant kedalam tabung Eppi baru yang telah berlabel.
- Tambahkan 360 μl isopropanol. Jika Anda sanggup memindahkan lebih dari 400 μl supernatant maka Anda harus menambahkan isopropanol.
- Kemudian letakkan kembali tabung Eppike dalam es selama beberapa menit.
- Kocoklah tabung dengan baik dan sentrifugasi kembali pada kecepatan maksimum selama 15 menit.
- Dengan hati-hati buanglah supernatant dan tambahkan 500 μl 70 % etanol dingin dan dilakukan sentrifugasi kembali pada kecepatan maksimum selama 5 menit.
- Setelah supernatant dibuang, Anda dapat melihat pellet putih kecil pada dasar tabung. Keringkan Eppi pada alat vakum evaporator kemudian tambahkan 30 μl air.
- Agar DNA larut dengan baik dalam air, tabung Eppi diletakkan kembali pada balok pemanas.

4.2. Amplifikasi daerah pengkode D1S80 dengan *Polimerase Chain Reactin* (PCR)

Bahan:

2 μ l Dna templa
10 μ l PCR master MIX
1 μ l primer F D1S80
1 μ l primer R D1S80
6 μ l H₂O +
20 μ l

- Gunakan tabung eppi kecil untuk PCR
- Letakkan tabung eppi dalam mesin PCR

Program PCR :

- Denaturasi 94°C selama 60 detik
- Annealing 63°C selama 60 detik
- sintesis DNA suhu dinaikkan sampai 72 °C selama 60 detik

Program diulang sebanyak 30 kali

Putaran terakhir berlangsung selama 5 menit pada suhu 72°C

Seluruh proses PCR berlangsung lebih kurang dua jam.