

PETUNJUK PRAKTIKUM TEKNOBIOLOGI

Jilid
3



**FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA**

PETUNJUK PRAKTIKUM TEKNOBIOLOGI

Oleh :

Dewi Retnaningati, S.Pd., M.Sc || Dr. Dra. Exsyupransia Mursyanti, M.Si
Ir. Ign. Pramana Yuda, M. Si, Ph. D. || Andie Wijaya Saputra, S. Si. || C. E. Natalian Sunarsi, S. Si.
Caecilia Bekti R., S.Si || Joice, S. Si. || Stephanie Rani T. S, S. Si. || Adam Harsono
Andre Haryanto || Dhany Krisna || Gracia A. Glorizky || Novini Rosari Dosa || Yohanes Candra Gunawan

© Gosyen Publishing 2019



Gosyen Publishing

Jatirejo 58B RT07/RW21

Sendangadi, Mlati, Sleman, Yogyakarta, 55285

www.gosyenpublishing.web.id

e-mail : gosyenpublishing@yahoo.com

Ilustrasi Dalam : Andy Gp

Ilustrasi Sampul : Tim Gosyen

Cetakan Pertama 2019

Katalog Dalam Terbitan (KDT):

PETUNJUK PRAKTIKUM TEKNOBIOLOGI;

Dewi Retnaningati, S.Pd., M.Sc || Dr. Dra. Exsyupransia Mursyanti, M.Si
Ir. Ign. Pramana Yuda, M. Si, Ph. D. || Andie Wijaya Saputra, S. Si. || C. E. Natalian Sunarsi, S. Si.
Caecilia Bekti R., S.Si || Joice, S. Si. || Stephanie Rani T. S, S. Si. || Adam Harsono
Andre Haryanto || Dhany Krisna || Gracia A. Glorizky || Novini Rosari Dosa || Yohanes Candra Gunawan

viii, 92 hlm; 205 x 275 cm.

ISBN 978-602-5411-53-3 (no.jil.lengkap)

978-602-5411-56-4 (jil.3)

Anggota IKAPI DIY

No. 098/DIY/2017

Hak Cipta dilindungi Undang-undang.

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apa pun, termasuk fotokopi, tanpa izin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Buku Petunjuk Praktikum ini, yang merupakan kumpulan dari banyak mata praktikum, merupakan panduan yang disusun sebagai pegangan bagi mahasiswa untuk mempersiapkan diri dalam melaksanakan praktikum. Hal ini dimaksudkan untuk membantu pemahaman mahasiswa mengenai mata praktikum yang akan ditempuh sehingga mahasiswa dapat melakukan praktikum dengan baik dan benar. Selain itu, praktikum dapat berjalan dengan lancar dan efektif, serta sesuai dengan waktu yang disediakan.

Buku petunjuk praktikum untuk semua mata praktikum wajib dibagi menjadi 3 seri buku. Hal ini dimaksudkan untuk mengakomodasi banyaknya mata praktikum yang terdapat dalam kurikulum di Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Setiap seri buku merupakan kumpulan dari beberapa petunjuk praktikum berdasarkan tahun akademik dimana mata praktikum tersebut terselenggara. Adapun rinciannya adalah sebagai berikut:

1. Buku Petunjuk Praktikum I terdiri dari: buku petunjuk praktikum Kimia Dasar Biofisika, Kimia Organik, Struktur dan perkembangan Tumbuhan, Struktur dan perkembangan Hewan
2. Buku Petunjuk Praktikum II terdiri dari: buku petunjuk praktikum Kimia Analisa Instrumentasi, Biokimia, Fisiologi Hewan, Mikrobiologi, Fisiologi Tumbuhan, Bioassay, Ekologi, Teknologi Bioproses
3. Buku Petunjuk Praktikum III terdiri dari: Praktikum Genetika, Kultur Jaringan Tumbuhan, Metabolisme dan Analisis bahan Alam, Teknologi DNA

Setiap mata praktikum mempunyai bobot 1 SKS sehingga banyaknya acara praktikum yang disajikan dalam buku petunjuk ini disesuaikan dengan SKS-nya, sedangkan materi praktikum disesuaikan dengan mata kuliahnya. Setiap buku petunjuk praktikum memuat tata tertib praktikum, aturan penilaian, serta acara praktikum yang akan dilakukan. Pada setiap acara praktikum berisi judul acara praktikum, tujuan praktikum, cara kerja dan parameter pengamatan.

Dengan tersusunnya buku petunjuk praktikum ini, diucapkan banyak terima kasih kepada penyusun serta semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan buku petunjuk praktikum ini sehingga dapat tersusun dengan baik dan diterbitkan.

Akhir kata, semoga buku petunjuk praktikum ini bermanfaat bagi para mahasiswa.

Yogyakarta, Juli 2019

Dekan Fakultas Teknobiologi, UAJY

(Dr. Dra. Exyupransia Mursyanti, MSi)

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR iii

DAFTAR ISI v

PETUNJUK PRAKTIKUM GENETIKA

LATIHAN 1
DAUR SEL DAN MITOSIS 1

LATIHAN 2
SIMULASI ANALISIS KARYOTIPE 3

LATIHAN 3
PENYIMPANGAN RASIO FENOTIP PADA PERSILANGAN
DIHIBRID 7

LATIHAN 4
PENENTUAN JENIS KELAMIN 11

LATIHAN 5
FAKTOR MENURUN DAN EKSPRESINYA 15

DAFTAR PUSTAKA 21

**PETUNJUK PRAKTIKUM
KULTUR JARINGAN TUMBUHAN**

PENGANTAR KULTUR IN VITRO	23
ACARA I PENGENALAN ALAT, STERILISASI PERALATAN DAN PEMBUATAN LARUTAN STOK	25
ACARA II PEMBUATAN MEDIUM DAN STERILISASI MEDIUM	29
ACARA III STERILISASI EKSPLAN DAN KULTUR KALUS	31
ACARA IV STERILISASI EKSPLAN DAN KULTUR EMBRIO ZYGOTIK	35
ACARA V STERILISASI EKSPLAN DAN KULTUR KOTILEDON	37
ACARA VI SUBKULTUR KALUS	39
ACARA VII OVERPLANTING	41
ACARA VIII AKLIMATISASI ANGGREK <i>in vitro</i>	43
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN:	
MEDIUM DASAR MURASHIGE dan SKOOG atau MS-MEDIUM (1962)	47

MEDIUM VACIN & WENT	48
PEMBUATAN LARUTAN STOK	49

**PETUNJUK PRAKTIKUM
TEKNOLOGI DNA**

ACARA 1 PENGENALAN ALAT, BAHAN, DAN TEKNIK PIPETTING	53
ACARA 2 PEMBUATAN LARUTAN	55
ACARA 3 BIOKALKULATOR	57
ACARA 4 ISOLASI DNA SECARA SEDERHANA	65
ACARA 5 ISOLASI DNA	67
ACARA 6 ELEKTROFORESA	73
ACARA 7 DESAIN PRIMER	75
ACARA 8 POLYMERASE CHAIN REACTION	87

PETUNJUK PRAKTIKUM GENETIKA

Dewi Retnaningati, S.Pd., M.Sc

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	iii
LATIHAN 1 DAUR SEL DAN MITOSIS	1
LATIHAN 2 SIMULASI ANALISIS KARYOTIPE	3
LATIHAN 3 PENYIMPANGAN RASIO FENOTIP PADA PERSILANGAN DIHIBRID	7
LATIHAN 4 PENENTUAN JENIS KELAMIN	11
LATIHAN 5 FAKTOR MENURUN DAN EKSPRESINYA	15
DAFTAR PUSTAKA	21

LATIHAN 1

DAUR SEL DAN MITOSIS

Pendahuluan

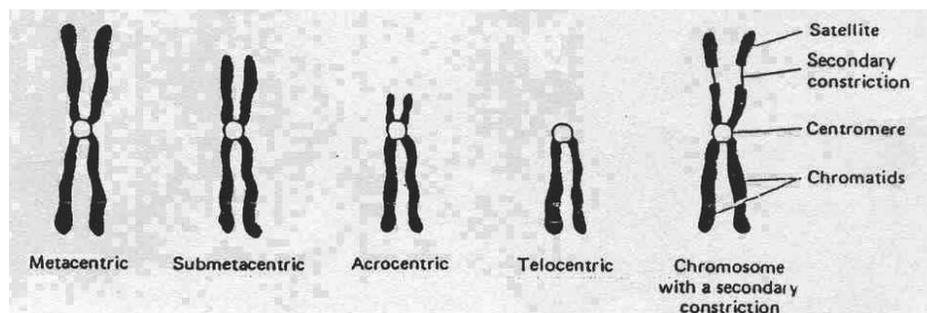
Sel eukaryota berkembangbiak dengan jalan membelah. Ciri khas pembelahan sel adalah pembagian genom secara identik pada setiap sel anakan. Pembagian isi nukleus disebut karyokinesis atau, lebih umum disebut mitosis. Pembelahan nukleus diikuti oleh pembelahan sitoplasma yang disebut sitokinesis.

Pada kehidupan sel, mitosis merupakan sebagian dari program yang lebih besar yaitu daur sel. Sel yang aktif membelah berada, secara bergantian, dalam keadaan mitosis dan interfase. Interfase terdiri dari 3 tahap yaitu G_1 ; S; dan G_2 . Lama mitosis dan setiap tahapan pada interfase bervariasi sesuai dengan organisme.

Stadium (Fase) pada Mitosis

1. **Profase:** Kromosoma; panjang tipis, terdiri dua kromatid, yang pada suatu tempat berlekatan. Tempat perlekatan disebut sentromer atau lekukan (konstriksi) primer. Gelendong mitosis belum terlihat. Selubung nukleus masih tampak.
2. **Metafase:** kromosoma telah memendek dan menebal serta tersusun di daerah ekuatorial (= lempeng metafase). Setiap kromosoma metafase mempunyai ciri khas.

Terdapat empat tipe kromosom metafase (lihat gambar).



Gelendong mitosis sudah terbentuk. Selubung nukleus menghilang.

3. **Anafase:** Kromatid-kromatid terpisah. Berada di kutub-kutub sel. Bentuk kromosom ditentukan oleh letak sentromer. Selubung nukleus belum terlihat.
4. **Telofase:** Sel anakan telah terbentuk. Selubung nukleus terlihat lagi.

Indeks mitosis:

Dalam populasi sel yang aktif membelah, hanya beberapa sel yang berada dalam salah satu fase mitosis. Prosentase sel yang sedang membelah ditentukan sebagai indeks mitosis. Indeks ini dapat dihitung dengan cara :

$$\frac{\text{Jumlah sel yang berada dalam fase mitosis}}{\text{Jumlah sel yang terlihat (= yang ada)}} \times 100\%$$

Latihan ini bertujuan untuk mengenal fase-fase mitosis dan menentukan jumlah kromosoma.

Dalam latihan ini digunakan akar bawang merah dengan alasan bahwa jumlah kromosom sedikit dan berukuran relatif besar.

Cara kerja

1. Umbi bawang ditumbuhkan dalam cawan petri yang berisi air hingga berakar.
2. Akar yang telah tumbuh dipotong dengan silet pada bagian ujungnya sekitar 3-4 mm dan dimasukkan dalam flakon berisi asam asetat 45% kemudian disimpan pada suhu 4°C selama 15 menit.
3. Setelah difiksasi, kemudian ujung akar-ujung akar tersebut dibilas dan di-maserasi dengan HCl 1N dan disimpan pada suhu 55°C selama 2-5 menit.
4. Selanjutnya ujung akar-ujung akar tersebut dibilas lagi dan diwarnai dengan aceto-arcein 1% selama 1 jam.
5. Setelah terwarnai, ujung akar-ujung akar tersebut diletakkan pada gelas benda. Bagian tepi irisan diserap dengan tissue. Selanjutnya ditetesi gliserin dan disquash (dipencet). Preparat kemudian ditutup dengan gelas penutup dan dilekatkan dengan cutex.
6. Amati dan gambarkan fase-fase mitosis. Hitung jumlah kromosom dan indeks mitosis, pada buku laporan praktikum.

LATIHAN 2

SIMULASI ANALISIS KARYOTIPE

Pendahuluan

Karyotipe adalah jumlah yang tetap kromosom diploid atau haploid. Dari individu normal, ditinjau dari segi ukuran, bentuk, dan cacah. Karyotipe merupakan ciri atau karakter dari suatu individu, species, genus, atau klasifikasi lain. Kromosom yang disusun diambil dari kromosom metafase.

Berdasarkan indeks sentromer (IS) dapat ditentukan tipe kromosoma. Is dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$Is = \frac{\text{Panjang lengan pendek}}{\text{Panjang seluruh lengan}} \times 100$$

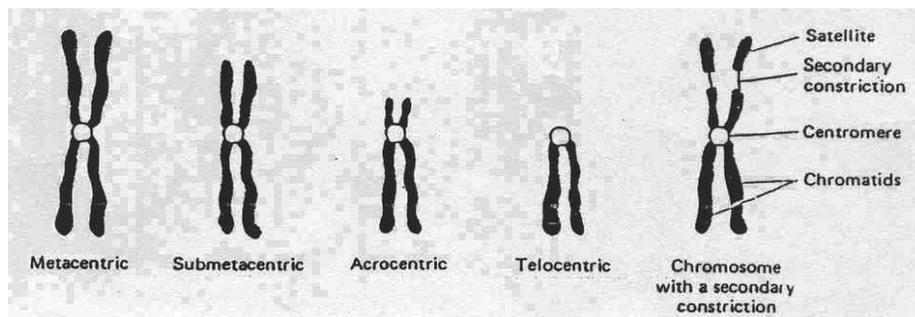
Is berkisar antara 38 – 50 → tipe metasentris (= m) = median

Is berkisar antara 26 – 27 → tipe submetasentris (= sm) = submedian

Is berkisar antara 13 – 25 → tipe akrosentris (= st) = subterminal

Is berkisar antara 0 – 12 → tipe telosentris (= t) = terminal

Selain empat tipe di atas terdapat kromosom satelit



Karyotipe suatu individu dapat mengalami perubahan dalam jumlah maupun struktur, akibat pengaruh radiasi senyawa-senyawa tertentu atau mutagen.

Perubahan jumlah kromosom

1. **Euploid** yaitu suatu perubahan kelipatan jumlah kromosom dasar (n). Jumlah kromosom yang melebihi diploid dinamakan poliploid, sehingga ada individu triploid ($3n$), tetraploid ($4n$), pentaploid ($5n$), heksaploid ($6n$), dan sebagainya.
2. **Aneuploid** yaitu suatu perubahan yang tidak merupakan kelipatan dari jumlah kromosom dasar, melainkan ada kekurangan atau kelebihan kromosom jika dibandingkan dengan yang diploid. Aneuploid dibedakan atas:
 - a. Monosomi ($2n-1$) yaitu suatu individu diploid yang kehilangan satu kromosom. Contoh: penderita sindroma Turner yang memiliki formula kromosom $22AAXO$ atau $45, XO$.
 - b. Trisomi ($2n+1$) yaitu suatu individu diploid yang mempunyai kelebihan satu kromosom. Penderita sindroma Down pada manusia merupakan salah satu contoh adanya trisomi pada autosom 21. Karena itu penderitanya dapat perempuan atau laki-laki dan formulanya adalah sebagai berikut:
 - Perempuan = $22AAXX, + 21$ atau $47,XX, + 21$
 - Laki-laki = $22AAXY, + 21$ atau $47,XY, + 21$
 - c. Nullisomi ($2n-2$)
 - d. Dobel monosomi ($2n-1-1$)
 - e. Dobel trisomi ($2n+1+1$)
 - f. Tetrasomi ($2n+2$)

Aneuploid umumnya terjadi karena ada peristiwa gagal memisah ("Nondis-junction")

Perubahan struktur kromosom (= aberrasi kromosom)

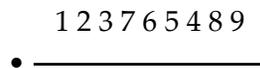
1. Defisiensi yaitu peristiwa hilangnya suatu segmen dari sebuah kromosom yang disebabkan karena kromosom patah dan potongan itu hilang. Pada keadaan ini kromosom akan menjadi lebih pendek dan hilangnya gen-gen akibat patahnya kromosom akan berakibat pada penampakan fenotip.
2. Duplikasi yaitu peristiwa bahwa suatu segmen dari kromosom mempunyai gen-gen yang terulang susunannya, misalnya:

1 2 3 4 5 6 7 8
• —————

3. Translokasi adalah suatu peristiwa menempelnya potongan suatu kromosom pada potongan kromosom lainnya yang bukan homolognya.

A	A	L	L	L	L	A	A
B	B	M	M	M	M	B	B
C	C	N	N	C	C	N	N
D	D	O	O	D	D	O	O

4. Inversi yaitu peristiwa bahwa suatu segmen dari sebuah kromosom mempunyai urutan gen terbalik, misalnya:



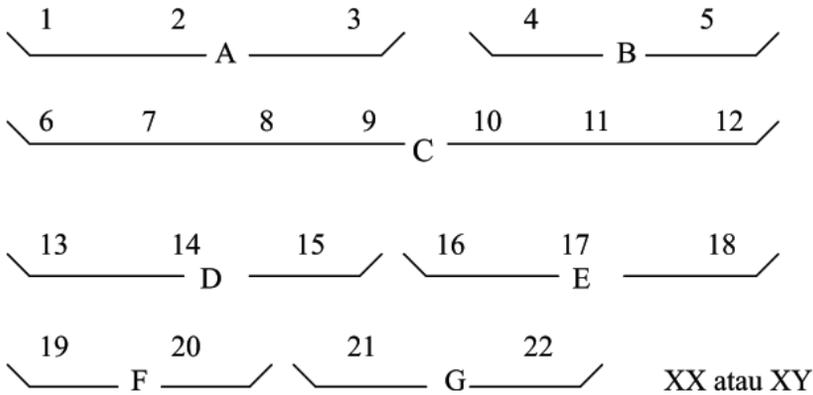
Latihan ini dilaksanakan untuk mengetahui karyotipe suatu species dan menyusunnya dalam bentuk diagram, serta menentukan normal tidaknya individu tersebut.

Bahan dan Cara Kerja

a. Kromosom manusia

1. Setiap praktikan akan memperoleh gambar kromosom manusia dalam keadaan metafase.
2. Perhatikan nomor gambar yang saudara terima, kemudian guntinglah secara hati-hati tiap kromosom.
3. Sediakan satu halaman dalam buku praktikum untuk membuat karyotipe yaitu dengan cara melekatkan guntingan-guntingan kromosom tadi dan kemudian diatur untuk membuat karyotipe. Dalam membuat karyotipe hendaknya hati-hati, karena kemungkinan ada kelainan kromosom.
4. Buatlah laporan dalam buku praktikum sebagai berikut:

Tanggal:
 Karyotipe gambar no.:
 Seks:



Diagnosis dari karyotipe:Formula kromosom:

Skema terjadinya individu yang memiliki kelainan kromosom itu (jika memang ada kelainan dan diketahui cara menerangkannya).

b. Kromosom nyamuk

1. Setiap praktikan akan memperoleh gambar kromosom nyamuk dalam keadaan metafase.
2. Guntinglah secara hati-hati tiap kromosom.
3. Hitunglah indeks sentromer masing-masing kromosom tersebut.
4. Sediakan satu halaman dalam buku praktikum untuk membuat karyotipe; yaitu dengan cara melekatkan guntingan-guntingan kromosom tadi dan kemudian diatur untuk membuat karyotipe.

Soal:

Isilah daftar berikut ini:

Penderita	Formula kromosom	Seks L/P	Jumlah seks-kromatin
Sindroma Tutner
Sindroma Down
- Perempuan	P
- Laki-laki	L
Sindroma Klinefelter
Manusia XYY

LATIHAN 3

PENYIMPANGAN RASIO FENOTIP PADA PERSILANGAN DIHIBRID

Pendahuluan

Perkawinan atau persilangan dihibrid adalah persilangan antara individu-individu dengan dua pasang alel berbeda pada dua loki. F₁ dari persilangan ini menunjukkan fenotipe sama. Fenotipe F₂ hasil persilangan antar F₁ memberikan empat kelompok fenotip dengan perbandingan 9 : 3 : 3 : 1. Kenyataan di lapangan menunjukkan bahwa sering terjadi penyimpangan rasio fenotip dari 9 : 3 : 3 : 1 berubah menjadi misalnya: 13 : 3; 9 : 7 atau 12 : 3 : 1. Timbulnya penyimpangan rasio ini disebabkan karena adanya interaksi gen.

Latihan ini dilakukan dengan tujuan untuk memahami adanya interaksi gen. Materi yang digunakan adalah jagung yang bijinya berwarna lebih dari satu.

Test X² (Chi-square Test)

Dalam percobaan perkawinan yang kita lakukan kadang menghasilkan keturunan yang tidak sesuai dengan Hukum Mendel. Oleh karena itu perlu diadakan evaluasi hasil percobaan yang kita lakukan dibandingkan dengan keadaan secara teoritis. Suatu cara untuk melakukan evaluasi itu ialah melakukan tes X² (Chi-square Test). Dalam perhitungan harus diperhatikan besarnya nilai dk (derajat kebebasan).

$$dk = \Sigma \text{ fenotip} - 1$$

Test X² dinyatakan dengan rumus sebagai berikut

$$(|d| - \frac{1}{2})^2$$

$$\text{Untuk } dk = 1 \text{ digunakan rumus } X^2 = \frac{\quad}{e}$$

$$\Sigma d^2$$

$$\text{Untuk } dk > 1 \text{ digunakan rumus } X^2 = \frac{\quad}{e}$$

Dimana d = deviasi/penyimpangan yakni selisih antara hasil yang diperoleh (observed) dan hasil yang diharapkan atau hasil secara teoritis (expected)
 E = hasil yang diharapkan (expected)

Setelah nilai χ^2 diperoleh selanjutnya kita menggunakan tabel χ^2 . Bila nilai kemungkinan makin ke arah kanan atau menjauhi nilai 1 berarti hasil percobaan yang diperoleh adalah tidak baik. Jadi apabila nilai χ^2 terletak di kolom kemungkinan 0,05 atau kurang berarti faktor kemungkinan hanya berpengaruh 5% atau kurang dan ada faktor lain yang mempengaruhi percobaan sehingga data percobaan yang didapatkan adalah buruk. Apabila nilai χ^2 terletak di kolom 0,01 atau 0,001 berarti data percobaan sangat buruk jadi faktor kemungkinan memiliki pengaruh sangat besar.

Contoh :

Suatu tanaman berbatang tinggi heterozigotik (Tt) menyerbuk sendiri dan menghasilkan keturunan 25 tanaman berbatang tinggi dan 15 tanaman berbatang pendek. Apakah hasil tersebut dapat dipercaya? Menurut hukum Mendel monohybrid yang menyerbuk sendiri seharusnya menghasilkan fenotip dengan perbandingan 3 : 1. Jadi secara teoritis akan menghasilkan 30 tanaman berbatang tinggi dan 10 tanaman berbatang pendek.

	Batang Tinggi	Batang Pendek	Jumlah
o (observed)	25	15	40
e (expected)	30	10	40
d (deviasi)	-5	5	
$\chi^2 = \frac{(d - \frac{1}{2})^2}{e}$	$\chi^2 = \frac{(-5 - \frac{1}{2})^2}{30}$	$\chi^2 = \frac{(5 - \frac{1}{2})^2}{10}$	

$$\chi^2 = 0,675 + 2,025 = 2,7$$

Selanjutnya dengan tabel χ^2 kita mencari nilai kemungkinan pada kolom dk = 1 ke arah kanan dan mencari letak angka 2,7. Ternyata angka 2,7 ada di antara angka 1,07– 2,71 yakni antara kolom kemungkinan 0,30 dan 0,10. Ini berarti terletak di sebelah kanan kolom 0,05. Kesimpulannya hasil percobaan yang diperoleh adalah baik dan masih memenuhi hukum Mendel sehingga hasil percobaan dapat dipercaya.

Tabel χ^2 (Chi-square)

dk	Kemungkinan								
	0,99	0,90	0,70	0,50	0,30	0,10	0,05	0,01	0,001
1	0,0002	0,016	0,15	0,46	1,07	2,71	3,84	6,64	10,83
2	0,02	0,21	0,71	1,39	2,41	4,61	5,99	9,21	13,82
3	0,12	0,58	1,42	2,37	3,67	6,25	7,82	11,35	16,27
4	0,30	1,06	2,20	3,36	4,88	7,78	9,49	13,28	18,47
5	0,55	1,61	3,00	4,35	6,06	9,24	11,07	15,09	20,52
6	0,87	2,20	3,83	5,35	7,23	10,65	12,59	16,81	22,46
7	1,24	2,83	4,67	6,35	8,38	12,02	14,07	18,48	24,32
8	1,65	3,49	5,53	7,34	9,52	13,36	15,51	20,09	26,13
9	2,09	4,17	6,39	8,34	10,66	14,68	16,92	21,67	27,88
10	2,56	4,87	7,27	9,34	11,78	15,99	18,31	23,21	29,59
15	5,23	8,55	11,71	14,34	17,32	22,31	25,00	30,58	37,70
20	8,26	12,44	16,27	19,34	22,78	28,41	31,41	37,57	45,32
25	11,52	16,47	20,87	24,34	28,17	34,38	37,65	44,31	56,62
30	14,95	20,60	25,51	29,34	33,53	40,26	43,77	50,89	59,70

Cara kerja: (dikerjakan di buku laporan).

1. Hitunglah warna biji dari tiap jagung yang diterima dari asisten.
2. Buatlah tabel dan isikan data Anda ke dalamnya.
3. Lakukan uji χ^2 (kuadrat) untuk mengetahui apakah hasil pengamatan Anda sesuai dengan rasio fenotip yang diharapkan.
4. Tulislah interaksi gen yang saudara dapatkan pada jagung yang diamati.
5. Buatlah diagram persilangan mulai dari P sampai dengan didapatkannya rasio fenotip tersebut. Simbol gen dapat digunakan huruf sesuai urutan abjad.
6. Buatlah soal-soal yang tertera

Soal:

1. Suatu persilangan tanaman dihibrid menghasilkan keturunan yang memperlihatkan rasio 9 tanaman berbunga merah : 3 tanaman berbunga kuning : 4 tanaman berbunga putih. Namun ketika tanaman dihibrid tersebut diujisilang didapatkan keturunan 10 tanaman berbunga merah. 4 tanaman berbunga kuning dan 18 tanaman berbunga putih. Coba buatlah pengujian χ^2 dan tetapkanlah apakah hasil ujisilang tersebut dianggap baik atau tidak.

2. Persilangan tanaman dihibrid lainnya menghasilkan keturunan yang memperlihatkan perbandingan fenotip 12 tanaman berbunga putih : 3 ber-bunga merah : 1 berbunga kuning. Ujisilang tanaman-tanaman dihibrid tersebut menghasilkan keturunan 44 tanaman berbunga putih, 34 tanaman berbunga kuning. Buktikan dengan tes χ^2 apakah hasil uji silang tersebut dapat dipercaya kebenarannya.

LATIHAN 4

PENENTUAN JENIS KELAMIN

Pendahuluan

Kromosom pada manusia berjumlah 46, yang dikelompokkan menjadi 44 kromosom dan 2 kromosom seks. Pada perempuan, pasangan kromosom seks adalah XX, sedangkan pada laki-laki adalah XY. Penentuan jenis kelamin seseorang dapat ditentukan dengan dengan pemeriksaan seks kromatin atau badan Barr. Badan barr dapat diamati pada sel epitel yang banyak ditemukan dari lapisan mukosa mulut, vagina, atau uretra. Neutrofil granulosit dari wanita memperlihatkan adanya drumstick seperti alat pemukul genderang. Apabila sex chromatin-nya berjumlah 1 maka individu tersebut adalah wanita normal, bila jumlah sexchromatin-nya tidak ada maka individu tersebut pria karena pria hanya memiliki satu kromosom-X.

Tujuan

1. Menetapkan jenis kelamin
2. Mengidentifikasi barr body dan drumstick dengan uji seks kromatin

Alat dan Bahan

1. Sel epitel mukosa mulut dan sel darah perifer praktikan
2. Tusuk gigi dan gelas obyek
3. Disposable lancet dan kapas
4. Alkohol 70 %
5. Pewarna crecyl violet (100 ml crecyl violet dilarutkan dalam methanol, kemudian ditambahkan aquades sampai 100 ml)
6. Larutan fiksatif (methanol 95 %)
7. Pewarna Giemsa dalam buffer fosfat pH 6.8 (v/v = 1:1)
8. Air mengalir
9. Mikroskop dan staining jar

Cara Kerja

a. Barr body dari sel epitel mukosa mulut

1. Ambil lapisan mukosa mulut dengan tusuk gigi, kemudian oleskan pada gelas obyek, lalu dikering-anginkan.
2. Kemudian preparat dicelupkan ke dalam staining jar berisi larutan fiksatif (methanol absolut) selama 5 menit, kering-anginkan.
3. Teteskan pewarna crecyl violet, biarkan selama 3-5 menit, kemudian cuci dengan air mengalir, lalu dikering-anginkan.
4. Amati preparat menggunakan mikroskop.
5. Gambarkan sel-sel endothel dengan barr body.
6. Bandingkan antara preparat dari praktikan laki-laki dan perempuan.
7. Hitung barr body per 100 sel.

b. Drumstick dari leukosit darah perifer

1. Ambil darah dari vena perifer dengan disposable lancet, sebelum diambil oleskan alcohol 70 % pada kulit yang akan diambil darahnya.
2. Teteskan darah ke gelas obyek dan ratakan hingga tipis dengan gelas obyek lain. Kering-anginkan.
3. Kemudian preparat dicelupkan ke dalam staining jar berisi larutan fiksatif (methanol absolut) selama 5 menit, kering-anginkan.
4. Teteskan pewarna Giemsa dalam buffer fosfat pH 6.8, biarkan selama 15-30 menit, cuci preparat dengan air mengalir dan kering-anginkan.
5. Amati menggunakan mikroskop dan gambarkan sel yang mengandung inti dengan bentuk drumstick.

1. Jumlah Barr body per 100 sel epitel (data kelas)

No	Probandus	Jenis kelamin	Jumlah bar body/100sel

2. Drumstick dari leukosit darah perifer
 - a. Gambar drumstick (♀ dan ♂) (data kelompok)

No	Probandus	Jenis kelamin	Gambar Hasil Pengamatan

LATIHAN 5

FAKTOR MENURUN DAN EKSPRESINYA

Pendahuluan

Faktor menurun atau gen berada di kromosom. Terdapat dua kelompok kromosom yaitu kromosom somatis yang disebut autosom dan kromosom kelamin. Setiap kromosom memiliki berpuluh-puluh bahkan beribu-ribu gen. Gen ada yang dominan ada yang resesif, yang autosomal dan terkait kromosom kelamin. Ekspresi gen ada yang dipengaruhi jenis kelamin ada pula yang tidak.

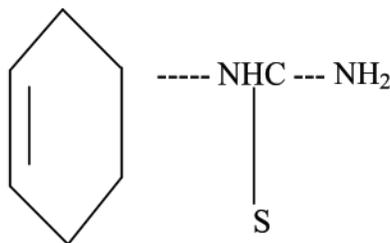
Latihan A : Tes PTC (Phenylthio Carbamida)

Pendahuluan

Sifat keturunan pada manusia ada yang ditentukan oleh gen pada autosom. Karena terletak pada autosom, ekspresi dari gen ini pada perempuan maupun laki-laki mempunyai kemungkinan yang sama. Hal ini disebabkan pula bahwa pada laki-laki maupun perempuan mempunyai jumlah autosom yang sama.

Salah satu contoh sifat keturunan pada manusia yang ditentukan oleh gen autosomal yang bersifat dominan adalah sifat dapat tidaknya orang merasakan rasa pahit apabila dilakukan tes PTC.

PTC merupakan senyawa kimia yang mudah larut dalam air dan mempunyai rumus kimia sebagai berikut:



Bagi sementara orang zat ini terasa pahit, sehingga mereka disebut pengecap (“taster”), sedangkan sebagian lain tidak merasakan apa-apa sehingga mereka disebut buta kecap (“non taster”).

Blakeske (1932) membuktikan bahwa kemampuan seorang untuk mengecap PTC ditentukan oleh gen dominan autosol T, sehingga seseorang taster kemungkinan memiliki genotip TT atau Tt sedangkan seorang nontaster kemungkinan genotip tt.

Tujuan

1. Untuk mencari ambang rasa terhadap PTC pada praktikan
2. Untuk menganalisa perbedaan pada laki-laki dan perempuan dalam kemampuannya mengecap PTC dengan menggunakan tes X_2 .
3. Untuk menghitung frekuensi gen pengecap pada populasi praktikan.

Alat dan Bahan:

- Kristal PTC
- Air suling (akuades)
- Air biasa
- Kertas saring
- Gelas minum untuk berkultur
- Botol berwarna coklat

Cara kerja

1. Membuat larutan PTC

P1	: larutan terpekat	1300	mg/l
P2	: larutan dengan konsentrasi	650	mg/l
P3	: larutan dengan konsentrasi	325	mg/l
P4	: larutan dengan konsentrasi	162,5	mg/l
P5	: larutan dengan konsentrasi	81,25	mg/l
P6	: larutan dengan konsentrasi	40,63	mg/l
P7	: larutan dengan konsentrasi	20,31	mg/l
P8	: larutan dengan konsentrasi	10,16	mg/l
P9	: larutan dengan konsentrasi	5,08	mg/l
P10	: larutan dengan konsentrasi	2,54	mg/l
P11	: larutan dengan konsentrasi	1,27	mg/l
P12	: larutan dengan konsentrasi	0,64	mg/l
P13	: larutan dengan konsentrasi	0,32	mg/l

2. Masing-masing praktikan dipanggil dan mencicipi kertas saring yang telah dicelupkan dalam larutan PTC pada berbagai konsentrasi, dari konsentrasi encer sampai pekat: Daerah lidah efektif untuk mengecap adalah pangkal lidah (dekat kerongkongan). Andaikata ada larutan yang tertelan, tidak membahayakan kesehatan. Seandainya

praktikan ragu-ragu mengenai rasa yang diperoleh, harap berkumur dengan air biasa dan percobaan diulang lagi.

3. Buatlah laporan hasil kerja kalian di buku praktikum sesuai tabel-tabel berikut.

Ambang rasa terhadap PTC bagi wanita/pria

Tgl.	No. Urut	No. Mhs.	N a m a	Umur	Ambang rasa

4. Membuat rekapitulasi sebagai berikut

	Taster	Non Taster	Jumlah
Laki-laki			
Perempuan			
Jumlah			

5. Membuat analisis statistik mengenai frekuensi gen dominan T dan alel resesif serta melakukan pengujian lewat tes X^2 .
6. Hasil analisis statistik dapat disimpulkan sebagai berikut:

Tabel I Prosentase mahasiswa “non taster” PTC

Jumlah yang diperiksa	Non Taster PTC		
	Banyaknya	%	Frekuensi
Laki-laki			
Perempuan			
Jumlah			

Tabel II Prosentase mahasiswa berdasarkan ambang rasa PTC

Kelamin	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₁₃
Laki-laki					
Prosentase					
Perempuan					
Prosentase					
Jumlah					
Prosentase					

Untuk mengkaji perbedaan kemampuan mengecap PTC pada pria dan wanita digunakan rumus:

$$E = \frac{A \times B}{N}$$

e : diharapkan ("expected")

A : jumlah "taster" atau "non taster" pria dan wanita

B : jumlah pria atau wanita yang diperiksa

N : jumlah semua pria dan wanita yang diperiksa

Untuk menguji dengan tes χ^2 (Chi-square-test) digunakan rumus:

$$\chi^2 = \frac{(d^2)}{e}$$

Untuk menghitung frekuensi gen dapat digunakan rumus Hardy Weinberg

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$p + q = 1$$

p : frekuensi untuk gen dominan T

q : frekuensi untuk alel resesif t

Frekuensi gen dihitung dari jumlah mahasiswa yang diperiksa, tidak dibedakan atas jenis kelaminnya.

Latihan B : Pengaruh Jenis Kelamin pada Ekspresi Gen

Pendahuluan

Pada individu selain terdapat gen yang terangkai kelamin, terdapat pula gen yang ekspresinya terpengaruh jenis kelamin. Sifat yang terpengaruh oleh jenis kelamin diekspresikan oleh gen yang berada di autosom. Pada individu jantan dan betina ekspresi gen tersebut berbeda, hal ini disebabkan oleh kegiatan hormon kelamin yang ada. Contoh ekspresi gen terpengaruh jenis kelamin: 1. Kebotakan, pada heterozigot jantan → botak, heterozigot betina tidak botak. 2. Buta warna, pada heterozigot jantan → buta warna, heterozigot betina → normal (pembawa).

Praktikum ini menggunakan sifat panjang jari telunjuk sebagai latihan dan bertujuan untuk mengetahui adanya ekspresi gen yang terpengaruh jenis kelamin dan menentukan genotip diri sendiri.

Cara Kerja

1. Buatlah sebuah garis horisontal yang jelas pada halaman buku praktikum Anda.
2. Letakkan tangan kanan atau kiri Anda di atas helaian kertas tadi sedemikian rupa, sehingga ujung jari telunjuk tepat menyinggung garis horisontal tersebut (perhatikan keterangan asisten).
3. Bubuhkan tanda letak ujung jari telunjuk Anda dengan menggunakan pensil atau bolpoint. Jika digunakan pasangan gen T dan t, bagaimanakah kemungkinan genotip Anda ?
4. Dengarkan baik-baik keterangan asisten.

Soal:

Misalkan Anda (baik laki-laki maupun perempuan) memiliki jari telunjuk lebih pendek daripada jari manis, menikah dengan seorang yang memiliki sifat demikian pula. Apabila:

- Semua anak laki-laki mempunyai sifat seperti Anda.
- Anak perempuan Anda yang memiliki sifat demikian pula, tetapi ada yang memiliki sifat kebalikannya.
 - a. Bagaimanakah kira-kira genotip Anda?
 - b. Bagaimanakah kemungkinan genotip suami/isteri Anda? (Jawaban harus disertai dengan bukti).

DAFTAR PUSTAKA

- Gardner, E.J. and D.P. SNUSTAD, 1984. *Principles of Genetics*, 7th ed, John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Petunjuk Praktikum Mikroteknik Hewan*, 1985. Laboratorium Histologi : -Embriologi- Mikrotek Hewan – Fakultas Biologi, UGM.
- Suryo, 1988. *Genetika Strata I*. Cetakan ke-2, Gadjah Mada Univ. Press, Yogyakarta. Suryo, 1988. *Genetika Manusia*. Cetakan ke-2, Gadjah Mada Univ. Press, Yogyakarta
- Yatim W. *Genetika Dasar*, 1984. Tarsito Bandung.

PETUNJUK PRAKTIKUM KULTUR JARINGAN TUMBUHAN

**Dr. Dra. Exsyupransia Mursyanti, M.Si
Dewi Retnaningati, S.Pd., M.Sc**

KATA PENGANTAR

Buku Petunjuk Praktikum Kultur Jaringan Tumbuhan ini disusun sebagai pegangan bagi mahasiswa untuk mempersiapkan diri dalam melaksanakan praktikum. Hal ini dimaksudkan untuk membantu pemahaman mahasiswa mengenai teknik kultur jaringan tanaman sehingga secara otomatis pula dapat membantu memperlancar jalannya praktikum.

Sesuai dengan kurikulum di Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Praktikum Kultur Jaringan merupakan praktikum wajib yang mempunyai bobot 1 SKS, sehingga latihan-latihan yang disajikan dalam buku petunjuk ini disesuaikan dengan bobot SKS-nya.

Penulis menyadari bahwa tidak ada karya yang sempurna. Oleh karena itu segala kritik dan saran yang sifatnya membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan dan penyempurnaan buku petunjuk praktikum ini.

Akhir kata, semoga buku petunjuk praktikum ini bermanfaat bagi para pembaca.

Yogyakarta, Juli 2020

Penulis

TATA TERTIB PRAKTIKUM

Agar praktikum dapat berjalan dengan lancar dan mudah, maka mahasiswa wajib mematuhi peraturan sebagai berikut :

1. Praktikan sudah harus ada di ruangan praktikum **5 menit** sebelum praktikum dimulai. Bagi yang **terlambat**, tidak diperkenankan mengikuti praktikum di hari itu.
2. Praktikan wajib mempelajari hal-hal yang berhubungan dengan materi yang dipraktikumkan.
3. Selama menjalankan praktikum, praktikan hanya diperkenankan membawa buku petunjuk praktikum serta alat-alat kelengkapan menulis.
4. *Pre-test/post-test* akan diadakan untuk tiap-tiap latihan.
5. Praktikan bertanggung jawab terhadap penggunaan peralatan di laboratorium. Kerusakan/hilang dan lain-lain menjadi tanggungan praktikan/kelompok.
6. Pada akhir praktikum, praktikan diwajibkan : menyelesaikan segala tugas yang diberikan, melakukan pengesahan pada asisten masing-masing serta menempuh **RESPONSI**.
7. Praktikan yang tidak hadir **lebih dari 2 kali** acara dinyatakan gugur dari praktikum Kultur Jaringan Tumbuhan.
8. Praktikan harus menggunakan jas praktikum selama melaksanakan praktikum.
9. Perhitungan **Nilai Akhir Praktikum** : $\frac{1P + 2L + 2R}{5}$

5

P : Nilai rata-rata pre/post-test

L : Nilai rata-rata laporan praktikum

R : Nilai responsi

10. Peraturan yang belum tertulis di sini akan ditetapkan kemudian.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
TATA TERTIB PRAKTIKUM	v
DAFTAR ISI	vii
PENGANTAR KULTUR <i>IN VITRO</i>	23
ACARA I PENGENALAN ALAT, STERILISASI PERALATAN DAN PEMBUATAN LARUTAN STOK	25
ACARA II PEMBUATAN MEDIUM DAN STERILISASI MEDIUM	29
ACARA III STERILISASI EKSPLAN DAN KULTUR KALUS	31
ACARA IV STERILISASI EKSPLAN DAN KULTUR EMBRIO ZYGOTIK	35
ACARA V STERILISASI EKSPLAN DAN KULTUR KOTILEDON	37
ACARA VI SUBKULTUR KALUS	39
ACARA VII OVERPLANTING	41

ACARA VIII	
AKLIMATISASI ANGGREK <i>in vitro</i>	43
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN:	
MEDIUM DASAR MURASHIGE dan SKOOG atau MS-MEDIUM (1962)	47
MEDIUM VACIN & WENT	48
PEMBUATAN LARUTAN STOK	49

PENGANTAR KULTUR IN VITRO

Kultur Jaringan Tumbuhan atau lebih tepat diistilahkan sebagai kultur *in vitro* merupakan metode perbanyakan vegetatif dengan menggunakan suatu bagian tanaman yang relatif kecil ukurannya, ditumbuhkan di atas atau di dalam suatu medium menjadi beratus-ratus, beribu-ribu atau berjuta-juta tanaman dalam kondisi aseptis (suci hama). Kultur in-vitro ini berkembang dari prinsip teori sel yang dikemukakan oleh Schleiden dan Shwan (1838-1839) yang menyatakan bahwa sel mempunyai kemampuan autonom, bahkan mempunyai daya totipotensi. Totipotensi secara teoritis adalah kemampuan tiap-tiap sel dari manapun asalnya bila diletakkan dalam lingkungan yang sesuai akan dapat tumbuh menjadi tanaman yang sempurna.

Dewasa ini teknik kultur *in vitro* sangat berkembang seiring dengan perkembangan Bioteknologi, lebih-lebih dengan ditemukannya rekombinan ADN. Apabila bioteknologi diibaratkan sebagai sebuah bangunan maka bangunan ini mempunyai dua tiang utama yaitu kultur *in vitro* dan Rekombinan ADN, sedang ilmu dasar lainnya merupakan dasar dari bangunan tersebut.

Dengan ditemukannya teknik rekombinan ADN, fusi protoplas serta kultur protoplas memungkinkan untuk memanipulasi sifat genetik suatu individu. Oleh karena itu teknik rekombinan ADN dan teknik kultur *in vitro* dianggap sebagai motor utama yang mendorong kemajuan bidang Biologi dan memberikan harapan yang cerah untuk mengatasi masalah-masalah keterbatasan sumber daya alam, pertambahan penduduk yang semakin meningkat, pencemaran lingkungan dan lain-lain.

Beberapa manfaat dari aplikasi kultur *in vitro* yaitu :

- Mendapatkan tanaman dalam jumlah yang relatif banyak (propagasi tanaman/*cloning*).
- Untuk mendapatkan metabolit sekunder, baik dalam segi kualitas maupun kuantitas.
- Untuk pemuliaan tanaman dan memperpendek siklus *breeding*
- Untuk menghasilkan tanaman yang mampu beradaptasi terhadap stres kekeringan, kadar garam, temperatur dan lain-lain.
- Untuk mendapatkan tanaman yang bebas virus dan patogen
- Untuk mendapatkan tanaman hibrid somatik, haploid dan diploid homozigot.

Metode yang digunakan : kultur protoplas, kultur sel, kultur anter dan tepung sari, kultur endosperm, kultur kalus, kultur embrio, kultur jaringan, kultur organ, kultur meristem dan lain-lain.

ACARA I

Pengenalan Alat, Sterilisasi Peralatan dan Pembuatan Larutan Stok

- Tujuan :**
- Mengetahui alat-alat yang dibutuhkan pada praktikum kultur jaringan tumbuhan
 - Mengetahui cara sterilisasi peralatan yang digunakan dalam kultur jaringan tumbuhan
 - Mengetahui pembuatan larutan stok dan fungsinya

Alat : - Erlenmeyer, botol kultur, gelas beker, skalpel, pinset, petridish, autoklaf, entkas, timbangan analitik, aluminium foil.

Cara kerja :

1. Sterilisasi alat
 - a. Cuci bersih Erlenmeyer, botol kultur, dan gelas beker, kemudian setelah kering, bagian 'mulutnya' ditutup dengan kertas aluminium foil.
 - b. Cuci bersih Petridish, skalpel dan pinset dan keringkan, kemudian dibungkus dengan kertas payung.
 - c. Cek autoklaf, kemudian isilah dengan air sampai batas sangsang.
 - d. Masukkan semua peralatan yang akan disterilisasi tersebut ke dalam autoklaf.
 - e. Tutup dan nyalakan autoklaf, sterilkan peralatan menggunakan autoklaf tersebut dengan tekanan 15 lb, temperatur 121°C selama 15 menit.
2. Sterilisasi ruang penabur : Entkas

Ruang penabur berupa entkas sebelum digunakan harus diseterilisasi dulu dengan menggunakan alkohol 70% atau spirtus, dengan cara sebagai berikut:

 - a. Membuka tutup entkas dan mengeluarkan tablet formalin
 - b. Semprotkan alkohol 70% atau spirtus ke seluruh permukaan entkas, lalu ditunggu sebentar
 - c. Usap dinding-dinding entkas dengan lap sampai bersih.
 - d. Tutup entkas dan masukkan kembali tablet formalin. ruang penabur juga harus dilengkapi formalin tablet untuk menjaga sterilitas dari ruang penabur.

3. Sterilisasi ruang penabur : *Laminar Air Flow* (LAF)
 - a. Matikan UV
 - b. Hidupkan TL
 - c. Semprotkan alkohol 70% atau spirtus ke semua bagian LAF, lalu ditunggu sebentar
 - d. Usap dinding-dinding LAF dengan lap sampai bersih. Lalu hidupkan fan.
 - e. Selanjutnya LAF siap digunakan untuk menabur. Semprot tangan semua alat yang akan digunakan dengan alkohol 70% sebelum menabur.
4. Pembuatan larutan stok

Oleh karena komponen penyusun medium kultur *in vitro* yang digunakan relatif kecil terutama komponen mikronutrien maka perlu pembuatan larutan stok terlebih dahulu. Hal ini dimaksudkan supaya penimbangan komponen penyusun medium dapat dilakukan secara tepat, akurat dan untuk menghemat pekerjaan. Konsentrasi larutan bisa 10, 100 atau bahkan 1000 kali dari setiap komponen. Larutan stok menghemat pekerjaan karena hanya sekali menimbang bisa digunakan untuk 10, 100 bahkan 1000 liter medium Hormon, vitamin dan asam-asam amino mudah rusak jika disimpan terlalu lama karena itu yang terbaik adalah membuat larutan stok dalam jumlah sedikit (10-15 ml). Cara kerja membuat larutan stok secara umum adalah sebagai berikut:

 - a. Untuk 10 ml larutan stok, sejumlah senyawa ditimbang dengan cermat kemudian dimasukkan dalam gelas ukur dan ditambah 5 ml alkohol absolut (100%) (atau 5,2 ml alkohol 95%)
 - b. Gojok pelan-pelan, jika senyawa tidak larut, ditambah setetes atau dua tetes asam (HCl) (untuk hormon kinetin tambahkan KOH).
 - c. Setelah senyawa larut semua, 2 ml alkohol 100% (atau 2,1 ml alkohol 95%) ditambahkan dan volume dipenuhi dengan penambahan aquades sampai 10 ml.
 - d. Selanjutnya diberi label yang meliputi nama senyawa, formula, konsentrasi larutan stok, jumlah yang digunakan perliter medium, tanggal pembuatan, dan nama pembuat
 - e. Larutan stok untuk bahan-bahan organik harus disimpan dalam freezer atau refrigerator (kulkas).
 - f. Pembuatan larutan stok yang lain dapat dilihat pada lampiran

Hasil Pengamatan :

Tabel dan Lampiran Gambar

Tabel 1. Pengenalan Alat

No	Nama Alat	Nomor Gambar	Fungsi	Keterangan Lain

Lampiran Gambar : Gambar diberi nomor dan judul gambar serta dilengkapi dengan keterangan spesifik mengenai bagian dari alat yang dimaksud.

ACARA II

PEMBUATAN MEDIUM DAN STERILISASI MEDIUM

- Tujuan :
- Mengetahui cara pembuatan medium MS dengan variasi hormon 2,4 D untuk budidaya *in vitro*
 - Mengetahui cara sterilisasi medium
 - Mengetahui ada tidaknya kontaminasi pada medium

- Bahan :
- Medium budidaya (MS), hormon 2,4 D, akuades, agar

- Alat :
- Erlenmeyer, botol, beker gelas, autoklaf, entkas, timbangan analitik, aluminium foil.

Cara kerja :

1. Pembuatan medium dan sterilisasi medium:
 - a. Bahan-bahan kimia ditimbang dan dilarutkan dalam 1000 cc aquadest
 - b. Pada medium tersebut diberi perlakuan variasi hormon 2,4 D
 - c. pH diukur antara 5,0-5,8
 - d. Untuk medium padat perlu ditambahkan agar-agar sebelum dipanaskan.
 - e. Larutan yang terjadi kemudian dipanaskan sampai semua bahan larut dan jernih, kemudian dibagi-bagikan ke dalam erlenmeyer atau botol steril
 - f. Selanjutnya botol atau erlenmeyer tersebut ditutup dengan aluminium foil dan disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit, dengan tekanan 15 lb dan temperatur 121° C.
2. Memasukkan botol medium ke dalam entkas/LAF
 - a. Botol atau erlenmeyer yang berisi media diusap dengan serbet atau kain bersih yang telah dibasahi dengan alkohol 70% atau spiritus pada dinding luarnya. Kemudian botol atau erlenmeyer tersebut dimasukkan ke dalam entkas. Selain itu skalpel, pinset, petridish dan alat lain yang diperlukan juga dimasukkan.

Hasil Pengamatan :

Tabel 1. Pembuatan Medium dengan Variasi Hormon 2,4 D

No	Medium dengan Variasi Hormon	Total Jumlah Botol	Jumlah Botol Terkontaminasi	Jumlah Botol Tidak Terkontaminasi	Jenis Kontaminan	Keterangan
1	MS 0					
2	MS 1					
3	MS 2					
4	MS 3					
5	MS 4					

Note: Medium MS 0 (Medium MS tanpa penambahan hormon)
Medium MS 1 (Medium MS dengan penambahan hormon 2,4 D 1 ppm)
Medium MS 2 (Medium MS dengan penambahan hormon 2,4 D 2 ppm)
Medium MS 3 (Medium MS dengan penambahan hormon 2,4 D 3 ppm)
Medium MS 4 (Medium MS dengan penambahan hormon 2,4 D 4 ppm)
Pengamatan dilakukan pada hari ke-5

ACARA III

STERILISASI EKSPLAN DAN KULTUR KALUS

- Tujuan :**
- Mengetahui adanya sifat totipotensi pada umbi akar dan daun
 - Mengetahui tahap-tahap yang harus dilakukan pada kultur kalus dengan eksplan umbi wortel dan daun telang
 - Mengetahui pengaruh 2,4 D terhadap berat, warna dan tipe kalus serta persentase kontaminasi dan jenis kontaminan

Bahan : Umbi wortel (*Daucus carota*), Daun Telang (*Clitoria ternatea*), Medium budidaya (MS) dengan penambahan 2,4 D pada berbagai konsentrasi, Alkohol 70%, Clorox 10%, Tween 20, Alkohol 70%, Akuadest steril

Alat : LAF/Entkas, Petridish, Skalpel, Pinset, Erlenmeyer

Cara kerja :

1. Pengambilan eksplan dan sterilisasi eksplan
 - a. Jaringan dari berbagai tanaman dapat dibudidayakan misal parenkim cadangan makanan, perisikel akar, kotiledon, mesofil daun, dan lain-lain atau organ tanaman yang sedang aktif mengadakan pertumbuhan misal meristem pucuk, primordia akar dan lain-lain.
 - b. Sterilisasi eksplan:
 - Secara Kimiawi : yaitu dengan menggunakan zat-zat kimia seperti sublimat, clorox, alkohol, antibiotik, perak nitrat dan lain-lain.
Sterilisasi secara kimiawi yaitu dengan jalan organ/jaringan tanaman dicuci bersih 2-3 kali dan kemudian diletakkan dalam erlenmeyer/botol. Timbang zat kimia yang akan digunakan sebagai sterilan dan dilarutkan dalam aquades steril. Selanjutnya kedua bahan tersebut dilarutkan dalam aquades steril. Selanjutnya kedua bahan tersebut dimasukkan ke dalam entkas. Organ/jaringan dimasukkan ke dalam sterilan sampai waktu yang dikehendaki. Setelah organ/jaringan dikeluarkan dari larutan sterilan, dikelupasi bagian terluarnya dan siap untuk ditaburkan ke dalam media.

- Secara Fisika : yaitu dengan pembakaran
Sterilisasi secara pembakaran yaitu dengan cara eksplan dibasahi dengan alkohol 70%, kemudian dibakar di atas lampu spiritus. Pembakaran dilakukan 2-3 kali. Setelah itu bagian terluar dari organ dihilangkan dan bagian yang tersisa siap ditaburkan ke dalam media.
2. Sterilisasi Eksplan & Kultur Umbi Wortel
 - a. Umbi wortel dicuci dengan deterjen dan bila perlu disikat sampai bersih.
 - b. Umbi kemudian dipotong dan diambil bagian tengahnya. Bagian tengah umbi ini kemudian masih diperkecil lagi 1 x 1 x 1 cm kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer steril.
 - c. Alat, bahan eksplan dan medium dimasukkan dalam entkas/LAF.
 - d. Eksplan direndam dalam larutan clorox 10% + tween 20 sebanyak 2 tetes selama 15 menit sambil erlenmeyer digoyang-goyang.
 - e. Setelah bahan sterilan dibuang, ekplan dibilas akuadest steril sampai bersih.
 - f. Dengan menggunakan pinset eksplan diletakkan dalam petridish (bagian tepinya sedikit dipotong), dan kemudian diletakkan pada medium budidaya.
 3. Sterilisasi Eksplan & Kultur Daun Telang
 - a. Daun dipetik dan dibersihkan dengan air + deterjen kemudian dimasukkan erlenmeyer steril dan ditutup kembali.
 - b. Alat, medium dan eksplan dimasukkan entkas pada kondisi aseptis juga termasuk akuadest steril akuadest steril dan larutan sterilant (Clorox 10% + tween 20 sebanyak 2 tetes)
 - c. Eksplan direndam dalam larutan pensteril selama 10 menit sambil digoyang-goyangkan.
 - d. Larutan sterilan dibuang diganti dengan akuadest steril. Pembilasan dengan akuadest steril ini diulang beberapa kali sampai bahan sterilan benar-benar hilang.
 - e. Dengan menggunakan pinset, eksplan diletakkan dalam petridish kemudian dipotong-potong (1 x 1 cm) dengan skalpel.
 - f. Botol media dibuka, kemudian eksplan diletakkan di atas medium agar dengan pinset.

Hasil Pengamatan :

A. Kultur Umbi Akar

Tabel 1. Pengamatan Kultur Kalus dari Umbi Akar

Hari Pengamatan	Berat Kalus	Warna Kalus	Tipe Kalus	Persentase Jumlah Botol Terkontaminasi	Jenis Kontaminan
1					
2					
3					
4					
5					

Note: Tipe kalus : *friable / compact*

Sebagai kontrol disediakan botol berisi medium tanpa eksplan

Pengamatan dilakukan 2x/minggu selama 3 minggu

B. Kultur Daun

Tabel 1. Pengamatan Kultur Kalus dari Daun

Hari Pengamatan	Berat Kalus	Warna Kalus	Tipe Kalus	Persentase Jumlah Botol Terkontaminasi	Jenis Kontaminan
1					
2					
3					
4					
5					

Note: Tipe kalus : *friable / compact*

Sebagai kontrol disediakan botol berisi medium tanpa eksplan

Pengamatan dilakukan 2x/minggu selama 3 minggu

ACARA IV

STERILISASI EKSPLAN DAN KULTUR EMBRIO ZYGOTIK

- Tujuan :**
- Memperbanyak tanaman melalui biji secara *in-vitro*
 - Mengetahui perkembangan biji setelah ditanam pada medium *in-vitro*
 - Mengetahui persentase perkecambahan
 - Mengetahui persentase kontaminan dan penyebabnya

Bahan : Biji buah naga (*Hylocereus undatus*), alkohol 70%, medium budidaya medium MS, chlorox 5%

Alat : Petridish, skalpel, pinset, erlenmeyer, lampu spiritus

Cara kerja :

1. Sterilisasi Eksplan & Penaburan Biji Buah Naga
 - a. Ruang penabur dibersihkan, alat dan medium dimasukkan entkas dalam kondisi aseptis
 - b. Biji Buah Naga terlebih dulu dicuci dengan aquades sampai bersih. Kemudian biji dikuliti dengan tangan satu persatu sampai lendir buah terlepas, dan barulah dimasukkan ke dalam entkas/LAF
 - c. Cuci biji menggunakan chlorox 5% dan bilas dengan aquades, diulangi sebanyak 3x
 - d. Dengan menggunakan skalpel dan pinset, biji diletakkan dalam petridish dengan kertas saringnya.
 - e. Botol media dibuka tutupnya dan dengan menggunakan pinset, biji diambil satu persatu dan ditanam merata ke seluruh permukaan medium.
 - f. Botol media ditutup kembali, kemudian dikeluarkan dari entkas dan diletakkan dalam ruang inkubator.
 - g. Petridish berisi media dibuka tutupnya dan dengan menggunakan pinset, biji diambil satu persatu dan ditanam merata ke seluruh permukaan medium.

- h. Petridish ditutup kembali, kemudian dikeluarkan dari entkas dan diletakkan dalam ruang inkubator.
- i. Lakukan pengamatan terhadap perkecambahan biji angrek/buah naga

Hasil Pengamatan :

Tabel dan Gambar

Tabel 1. Pertumbuhan Biji Buah Naga pada Medium MS di Botol Kultur

Botol ke-	Persentase Perkecambahan pada Pengamatan ke-						Persentase Perkecambahan	Penyebab Kontaminasi
	1	2	3	4	5	6		

Note : Pengamatan dilakukan 2x/minggu selama 3 minggu

Gambar : Dokumentasi foto secara mikroskopis (optilab) untuk perkembangan biji buah naga pada medium MS di petridish

Note : Pengamatan dilakukan setiap hari selama 1 minggu

ACARA V

STERILISASI EKSPLAN DAN KULTUR KOTILEDON

- Tujuan :**
- Mengetahui kemampuan kotiledon jagung untuk membentuk tunas/plantlet
 - Mengetahui perkembangan kotiledon jagung pada medium MS
 - Mengetahui persentase kotiledon jagung dalam membentuk tunas/plantlet dalam medium MS
 - Mengetahui persentase kontaminasi kotiledon jagung pada medium MS

Bahan : Jagung, alkohol 70%, medium budidaya (MS), Clorox 10%, Akuadest steril

Alat : Petridish, skalpel, pinset, erlenmeyer, lampu spiritus

Cara kerja :

1. Ruang penabur dibersihkan, alat dan medium dimasukkan entkas atau LAF dalam kondisi aseptis
2. Jagung terlebih dulu dicuci dengan aquades sampai bersih. Kemudian jagung dimasukkan atau dicuci dalam klorox 10% sebanyak 3 kali dengan dibilas aquades steril
3. Dengan menggunakan skalpel dan pinset, jagung diletakkan dalam petridish dibuka/ dipecah sampai keluar kotiledon yang utuh (jangan sampai pecah).
4. Botol media dibuka tutupnya dan dengan menggunakan pinset kotiledon diambil dan ditanam pada permukaan medium.
5. Dalam 1 botol medium dapat diisi 3 atau 4 kotiledon jagung
6. Botol media ditutup kembali secara steril, kemudian dikeluarkan dari entkas dan diletakkan dalam ruang inkubator.

Hasil Pengamatan :

Tabel dan Gambar

Tabel 1. Pertumbuhan Kotiledon Jagung pada Medium Kultur

Botol ke-	Jumlah Tunas/Plantlet yang Tumbuh pada Pengamatan ke-				Persentase Pembentukan Tunas/Plantlet	Persentase Kontaminasi
	1	2	3	4		

Note : Pengamatan dilakukan 2x/minggu selama 2 minggu

Gambar : Foto Perkembangan Pertumbuhan Kotiledon Jagung pada Medium Kultur

ACARA VI

SUBKULTUR KALUS

- Tujuan :**
- Mengetahui cara melakukan subkultur kalus
 - Mengetahui pertumbuhan kalus berdasarkan ada tidaknya kalus baru yang terbentuk, warna, dan tipe kalus
 - Mengetahui persentase kontaminasi

Bahan :

- Medium MS
- Kalus
- Alkohol 70%
- Spiritus
- Sprayer

Alat :

- Pinset steril (pendek dan panjang)
- Scalpel steril
- Petridish steril
- Bunsen
- *Laminar Air Flow* (LAF)
- Botol kultur steril

Cara Kerja :

1. Siapkan alat-alat: pinset, scalpel, petridish, botol berisi media kultur, alkohol dan Bunsen.
2. Nyalakan lampu dan blower LAF, kemudian masukkan alat-alat ke dalam LAF dengan terlebih dahulu menyemprotkan alkohol 70%.
3. Lampu dan blower dimatikan, kemudian lampu UV dinyalakan. Penyinaran lampu UV dilakukan selama 20-30 menit, setelah itu dimatikan.
4. Lampu dan blower LAF dinyalakan dan masukkan kalus yang sudah disemprot alkohol 70% ke dalam LAF.

5. Nyalakan Bunsen dan buka kertas payung dari setiap alat-alat steril. Masukkan ujung scalpel dan pinset ke dalam botol yang berisi alkohol 70%.
6. Keluarkan kalus dari botol dengan scalpel. Ujung pinset dilewatkan di atas api Bunsen. Selanjutnya letakkan kalus di petridish steril.
7. Tanam kalus pada media *overplanting* yang sudah disterilkan. Penanaman dilakukan pada jarak yang tidak terlalu dekat.
8. Simpan kultur pada ruang inkubasi.

Hasil Pengamatan :

Tabel 1. Pertumbuhan Hasil Subkultur Kalus

Hari Pengamatan ke-	Botol ke-	Pertumbuhan Kalus	Warna Kalus	Tipe Kalus	Persentase Kontaminasi	Jenis Kontaminan
1	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
2	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
....					

Note :

- Tipe kalus *friable/compact*
- Pengamatan dilakukan 2x/minggu selama 2 minggu
- Pertumbuhan kalus ditandai dengan pembentukan kalus yang baru.
- Pengukuran pertumbuhan dilakukan secara kualitatif dan ditandai dengan simbol +

ACARA VII

OVERPLANTING

- Tujuan :**
- Mengetahui cara melakukan *overplanting* sebagai salah satu teknik subkultur
 - Mengetahui jumlah planlet yang tumbuh dan morfologinya
 - Mengetahui persentase kontaminasi dan jenis kontaminan

Bahan :

- Medium Vacin and Went (VW) + arang aktif
- Planlet Anggrek (*Dendrobium* sp.)
- Alkohol 70%
- Spiritus
- Sprayer

Alat :

- Pinset steril (pendek dan panjang)
- Scalpel steril
- Petridish steril
- Bunsen
- *Laminar Air Flow* (LAF)
- Botol kultur steril

Cara kerja :

1. Persiapan meliputi, memilih bibit yang baik dan menyediakan media serta alat yang diperlukan.
2. Botol yang berisi bibit maupun media, petridish dan pinset dimasukkan dalam entkas pada kondisi aseptis.
3. Bibit *in vitro* dalam botol diambil 1 tanaman dengan pinset dan diletakkan dalam petridish.

4. Botol medium yang baru dibuka, kemudian satu-persatu bibit tersebut diatur pada medium dengan jarak yang teratur dan rapi, diusahakan tiap-tiap botol ditanami max 3 tanaman dengan ukuran seragam
5. Botol ditutup kembali dan siap dikeluarkan dari entkas/LAF

Hasil Pengamatan :

Tabel dan Gambar (Foto hasil pengamatan)

Tabel 1. Pertumbuhan Hasil *Overplanting* Plantlet

Pengamatan ke-	Botol ke-	Jumlah Planlet yang Tumbuh	Morfologi Planlet	Persentase Kontaminasi(%)	Jenis Kontaminan
1	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
2	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
...	...				

Note : Pengamatan dilakukan selama 5 hari berturut-turut

ACARA VIII

AKLIMATISASI ANGGREK *in vitro*

- Tujuan:**
- Mengetahui cara aklimatisasi anggrek *in vitro*
 - Mengamati pertumbuhan planlet hasil aklimatisasi

Bahan : Bibit anggrek dalam botol, akar pakis, pupuk kuda, batu merah atau arang kayu, pupuk NPK.

Alat : Kawat panjang, pot, tapisan atau kertas koran

Cara Kerja :

1. Persiapan bibit
 - a. Botol-botol yang berisi bibit diisi dengan air bersih sampai penuh sambil digoyang-goyang
 - b. Dengan kawat panjang yang sudah dibengkokkan, bibit anggrek ditarik keluar dengan hati-hati. Untuk bibit yang sudah besar akar ditarik terlebih dahulu daripada daunnya.
 - c. Bibit dicuci dengan air sampai benar-benar bersih dari sisa media.
 - d. Bibit dikumpulkan di atas tapisan atau kertas koran sampai kering.
2. Persiapan Kom-pot dan alas media
 - a. Pot dengan diameter 15 cm diberi lubang di bagian bawahnya.
 - b. Akar pakis yang lunak dan berwarna coklat ditumbuk agak halus (1-2 cm)
 - c. kemudian dicampur dengan pupuk kuda (4:1), bisa ditambahkan pupuk NPK 1 sendok makan tiap ember.
3. Cara Menanam Bibit
 - a. Kom-pot diisi dengan 1/2 bagian potongan arang kayu/batu merah, kemudian ditaburi alas media hingga permukaannya menjadi rata.
 - b. Tanaman bibit anggrek diletakkan atau ditanam berderet-deret sambil ditimbun bagian akarnya sehingga seluruh kom-pot penuh.

Catatan :

Jangan sampai bulbus tanaman/bibit anggrek tertimbun media, karena dapat mengakibatkan tanaman mati.

Hasil Pengamatan :

Tabel dan Gambar (Foto hasil pengamatan)

Tabel 1. Pengamatan Plantlet Hasil Aklimatisasi

Pengamatan ke -	Jumlah Planlet yang Hidup	Rata-rata Tinggi Planlet	Rata-rata Jumlah Daun	Warna Daun	Jumlah Planlet yang Mati	Jenis Kontaminan

Note : Pengamatan dilakukan selama 5 kali

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1990. *Budidaya Anggrek*. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Dixon, R.A., 1985. *Plant Cell Culture*, A practical approach, IRL Press, Oxford, Washington DC.
- Pieririk, R.L.M., 1987. *In-vitro Culture For Higher Plants*, Martinus Nijhorff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- Soeryowinoto, S.M., dan M. Soeryowinoto, 1977. *Perbanyakan Vegetatif pada Anggrek*. Penerbit Yayasan Kanisius, Yogyakarta.
- Suryowinoto, M., 1989. *Petunjuk Laboratorium Pemuliaan Tanaman Secara In- vitro*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM, Yogyakarta.

LAMPIRAN

MEDIUM DASAR MURASHIGE dan SKOOG atau MS-MEDIUM (1962)

Unsur Makro

KNO ₃	1900	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	mg/l
KH ₂ PO ₄	170	mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	mg/l

Unsur Mikro

FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	mg/l
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	37,3	mg/l
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	mg/l
H ₃ BO ₃	6,2	mg/l
KI	0,83	mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	mg/l
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	mg/l
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/l

Gula

Saccharosa	30	gram/l
------------	----	--------

Vitamin

Thiamin-HCl	0,1	mg/l
Asam nikotinat	0,50	mg/l
Pyridoxin-HCl	0,50	mg/l
Glysine	2,00	mg/l
Myo-inositol	100	mg/l
Agar-agar	8	gram/l
Ph	5,8	

MEDIUM VACIN & WENT

Unsur Makro

KNO_3	525	mg/l
KH_2PO_4	250	mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500	mg/l

Unsur Mikro

$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,75	mg/l
$\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_4$	28	mg/l

Gula

Sacharosa	20	gram/l
Agar-agar	8	gram/l
Charcoal	1	gram/l
Air kelapa	150	ml/l
Ph	4,8	- 5,6

PEMBUATAN LARUTAN STOK

1. Larutan Stok *Makronutrien* MS (untuk 500 ml larutan)

Ditimbang :

- Amonium Nitrat..... 33.000 mg
- Kalium Nitrat..... 38.000 mg
- Kalsium Klorida (2 aq.) 8.000 mg
- Magnesium Sulfat (7 aq.) 7.400 mg
- Kalium dihidrogen fosfat..... 3.400 mg

Bahan-bahan tersebut dimasukkan satu per satu secara berurutan dalam gelas piala 500 ml yang berisi aquades \pm 300 ml. Setiap kali memasukkan bahan kimia harus segera dilarutkan (diaduk) baru kemudian bahan berikutnya. Jangan memasukkan semua bahan kimia kemudian dilarutkan, karena akan terjadi PRESIPITAT (pengendapan).

Untuk itu melarutkan bisa dibantu dengan *magnetic stirrer*.

Larutan yang sudah jadi ditambahkan aquadest sampai volumenya menjadi 500 ml.

Kemudian tutup rapat dan beri label = Makro MS 10X (50 ml/l), untuk membuat 1 liter medium diperlukan 50 ml stok.

Untuk membuat media MS sebanyak 1.000 ml diambil larutan persediaan ini sebanyak 50 ml. Larutan persediaan ini disimpan dalam almari pendingin (4°C).

2. Larutan Stok *Mikronutrien* MS (untuk 500 ml atau 100 kali konsentrasi)

Ditimbang :

- Mangan (II) Sulfat Tetrahidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 2,23 g
- Seng Sulfat Heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,86 g
- Asam Borat (H_3BO_3)..... 0,62 g
- Kalium Iodida (KI)..... 0,083 g
- Natrium Molibdat Dihidrat ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,025 g
- Tembaga (II) Sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)..... 0,0025 g
- Kobalt Klorida Heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)..... 0,0025 g

Caranya seperti pembuatan larutan makronutrien. Beri label = Mikro MS 100X (5 ml/l), untuk membuat 1 liter medium diperlukan 5 ml stok.

3. Larutan Stok Besi / Iron (200 ml atau 40 kali konsentrasi)

Ditimbang :

- Besi (II) Sulfat Heptahydrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....1,112 g
- Natrium Adetat Dihidrat (Na_2EDTA)1,429 g

$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan aquades sedikit dan dipanaskan, jangan sampai mendidih terus digerus. Tambahkan beberapa tetes HCl untuk lebih mempercepat pelarutan.

Setelah $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ larut, kemudian ditambahkan Na_2EDTA sedikit demi sedikit lalu beri aquades sampai volume menjadi 200 ml.

Tutup rapat, kemudian beri label = Iron MS 40X (5ml/l). Larutan stok besi disimpan dalam botol gelap.

4. Larutan Stok Vitamin (200 ml atau 50 kali konsentrasi)

Ditimbang :

- Glycine0,1 g
- Nicotinic Acid0,025 g
- Pyridoxine HCl.....0,025 g
- Thiamin HCl0,005 g

Bahan-bahan tersebut ditimbang satu per satu dalam gelas piala 500 ml yang berisi aquades 150 ml. Larutan stok vitamin disimpan dalam botol gelap.

Setelah larut tambahkan aquades sampai volumenya menjadi 200 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 4 ml stok.

5. Larutan Stok Auksin (100 ml atau 1000 ppm)

Ditimbang bahan (IAA, 2,4-D, NAA, IBA) sebanyak 100 mg dan dimasukkan dalam gelas piala 100 ml yang berisi aquades ± 70 ml.

Sambil diaduk teteskan sedikit demi sedikit KOH 1 N dengan hati-hati sampai larut benar (jernih).

Pindahkan dalam labu takar 100 ml, tambahkan aquades sampai volume menjadi 100 ml. Tutup rapat beri label = NAA (1 mg/ml = 1000 ppm), untuk membuat perlakuan auksin pada media – 1 ml stok setara dengan 1 mg auksin (1 ppm)

6. Larutan Stok Kinetin (100 ml atau 1000 ppm)

Ditimbang bahan kinetin sebanyak 100 mg dan dimasukkan dalam gelas piala 100 ml yang berisi aquades \pm 70 ml.

Sambil diaduk teteskan sedikit demi sedikit HCl 1 N dan dipanaskan sebentar sampai larut menjadi jernih.

Setelah dingin, pindahkan dalam labu takar 100 ml, tambahkan aquades sampai volume larutan menjadi 100 ml. Kemudian tutup rapat, beri label kinetin (1 mg/ml = 1000 ppm). Untuk membuat perlakuan kinetin pada media = 1 ml stok setara dengan 1 mg kinetin (1 ppm).

PETUNJUK PRAKTIKUM TEKNOLOGI DNA

Ir. Ign. Pramana Yuda, M. Si, Ph. D.

Andie Wijaya Saputra, S. Si.

C. E. Natalian Sunarsi, S. Si.

Caecilia Bekti R., S.Si

Joice, S. Si.

Stephanie Rani T. S, S. Si.

Adam Harsono

Andre Haryanto

Dhany Krisna

Gracia A. Glorizky

Novini Rosari Dosa

Yohanes Candra Gunawan

DAFTAR ISI

ACARA 1 PENGENALAN ALAT, BAHAN, DAN TEKNIK PIPETTING	53
ACARA 2 PEMBUATAN LARUTAN	55
ACARA 3 BIOKALKULATOR	57
ACARA 4 ISOLASI DNA SECARA SEDERHANA	65
ACARA 5 ISOLASI DNA	67
ACARA 6 ELEKTROFORESA	73
ACARA 7 DESAIN PRIMER	75
ACARA 8 POLYMERASE CHAIN REACTION	87

ACARA 1

PENGENALAN ALAT, BAHAN, DAN TEKNIK PIPETTING

Pendahuluan

Untuk bisa mengerjakan praktikum pada acara-acara selanjutnya, diperlukan pengenalan dan pemahaman akan jenis dan fungsi dari beberapa alat dan bahan, yang digunakan dalam praktikum Teknologi DNA ini. Peralatan tersebut antara lain *adjustable pipet (micropipette)*, *vortex*, *water bath*, *centrifuge*, alat amplifikasi (*thermal cycler*) elektroforesa, *Safe Imager/UV Transilluminator*. Deskripsi tentang alat-alat tersebut beserta fungsi dan cara menggunakannya telah dijabarkan dalam Praktikum Biologi Molekuler (Listawan, 2008).

Tujuan

Tujuan praktikum acara ini adalah :

1. Memperkenalkan mahasiswa pada peralatan utama yang diperlukan dalam penelitian.
2. Mahasiswa mengetahui dan memahami fungsi dan cara kerja alat dan bahan yang digunakan dalam praktikum Teknologi DNA.
3. Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan teknik pipetting yang benar.

Bahan dan Alat

Peralatan dan bahan yang ada dan digunakan dalam praktikum acara ini adalah *microwave*, *adjustable pipet*, *vortex*, *water bath*, *centrifuge*, alat amplifikasi (*thermal cycler*), elektroforesa, *Safe Imager / UV Transilluminator Gel Doc*, *loading dye*, parafilm, ddH₂O, buffer.

Cara Kerja

1. Dosen dan / atau Asisten Praktikum akan menunjukkan dan menjelaskan tentang jenis, fungsi, dan cara kerja dari suatu alat dan bahan serta penjelasan mengenai teknik *pipetting* yang benar.
2. Buatlah gambar/foto dari alat tersebut.
3. Per kaya penjelasan dosen/asisten praktikum dengan referensi atau buku manual (petunjuk kerja) yang tersedia dari tiap alat tersebut.

ACARA 2

PEMBUATAN LARUTAN

Pendahuluan

Larutan (solution) adalah campuran homogen antara dua atau lebih substansi atau zat, yaitu zat terlarut dan zat pelarut. Zat terlarut bisa berbentuk cair atau padat. Sifat larutan cenderung sama dengan zat terlarut. Pembuatan larutan haruslah memperhatikan jenis bahan kimia, berat molekul, dan sifatnya serta konsentrasi yang diperlukan.

Konsentrasi menunjukkan banyaknya kandungan zat terlarut dalam zat pelarut. Satuan konsentrasi dapat dinyatakan dengan beberapa cara, yakni persen campuran (b/v), persen berat (b/b), persen volume (v/v), Molaritas (M), molalitas (m), ppm, Fraksimol (x), dan Normalitas (N). Satuan yang digunakan adalah International System of Units (SI). Pada bidang molekuler, dengan konsentrasi larutan yang kecil, satuan yang digunakan pada umumnya berada dibawah milli.

Tujuan

Tujuan praktikum acara ini adalah :

1. Mahasiswa paham konsep larutan, konsentrasi, dan satuan unit
2. Mahasiswa mampu menghitung konsentrasi larutan

Cara Kerja

1. Pembuatan larutan senyawa dalam bentuk padat atau bubuk

Buatlah larutan NaCl dengan konsentrasi 5M sebanyak 0,3 liter. Hitung berapa gram NaCl yang diperlukan? Berat molekul NaCl = 58,43

Hitunglah kebutuhan NaCl untuk membuat larutan dengan volume dan konsentrasi pada tabel berikut :

Konsentrasi Lar NaCl	Volume larutan	NaCl diperlukan (gram)
0.1 M	500 mL	
0.2 M	400 mL	
1 M	300 mL	

2. Pembuatan larutan dalam konsentrasi persen

Konsentrasi dalam persen campuran (b/v) berarti berat zat (gram) terlarut dalam 100 ml larutan. Hitunglah kebutuhan NaCl untuk membuat larutan dengan konsentrasi berikut:

Konsentrasi Lar NaCl	Volume larutan	NaCl diperlukan (gram)
20%	100 mL	
50%	200 mL	
30%	50 mL	

3. Pembuatan larutan dengan konsentrasi tertentu dari larutan stok

Pembuatan larutan dengan konsentrasi tertentu dari larutan stok Formula yang digunakan adalah $V_1 N_1 = V_2 N_2$

Ket : V = Volume N = Normalitas / Konsentrasi

Hitung dan Kerjakanlah :

- Konsentrasi larutan stok SDS 10%. Buatlah larutan SDS dengan konsentrasi 1% dalam volume 100 mL.
- Larutan 1 M NaCl, volume 100 mL. Konsentrasi larutan Stok 5M.
- Konsentrasi larutan stock dNTPs 20mM. Buatlah larutan kerja dengan konsentrasi 2,5 mM dengan volume 200 mL.
- Larutan stok primer konsentrasi 40,75 pmol/ μ L. Buatlah primer untuk larutan kerja dengan konsentrasi 2,5 pmol/ μ L dengan volume 100 μ L.

ACARA 3

BIOKALKULATOR

Pendahuluan

Biokalkulator merupakan perangkat lunak yang menjadi sarana untuk menghitung massa, volume, atau konsentrasi yang diperlukan untuk membuat larutan. Kalkulator Biomath menyediakan berbagai fungsi penting untuk percobaan biologi molekuler, termasuk konversi DNA dan protein, suhu leleh, molaritas dan perhitungan pengenceran. Terdapat 4 parameter utama yang perlu diperhatikan dalam perhitungan molaritas dan pengenceran, yaitu : massa, konsentrasi, volume dan berat molekul.

Tujuan

Tujuan praktikum acara ini adalah :

1. Mahasiswa mampu menghitung konsentrasi larutan, pengenceran dan molaritas menggunakan aplikasi Biomath (Promega)

Alat dan Bahan

Laptop / Smartphone Internet

Software Promega Biomath

Cara Kerja

- **Instal / Buka Promega BioMath Calculators**

Android : <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.promega.biomath> iOS:

<https://itunes.apple.com/WebObjects/MZStore.woa/wa/viewArtist?id=307546952> PC :

<https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath-calculators/>

Pada bagian "Other Calculator", Pilih "Dilution" untuk perhitungan pengenceran, dan "Molarity" untuk perhitungan molaritas

1. Perhitungan pengenceran (*Dilution*)

The screenshot shows the Promega website's Dilution calculator. On the left, a sidebar menu lists various conversion and calculation tools. The main area is titled "Dilution" and contains three input fields: "Stock Solution" (empty), "Final Concentration" (set to "mM"), and "Final Volume" (set to "L"). Below these fields are "Clear" and "Calculate" buttons. To the right, a "Formula" section explains the calculator's function: "This calculator will determine the volume of stock solution required to make a working solution of a specific concentration and volume. Enter the concentration of your stock solution, and the concentration and volume of the desired working solution."

Promega

DNA Conversions

- dsDNA: μg to pmol
- dsDNA: pmol to μg
- ssDNA: $\mu\text{g}/\text{ml}$ to pmol/ μl
- ssDNA: pmol/ μl to $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Linear DNA: μg to pmol of Ends
- Ligations: Molar Ratio of Insert:Vector
- Nucleic Acid: OD₂₆₀ to $\mu\text{g}/\text{ml}$

Protein Conversions

- Molar Conversions
- Coding Capacity of DNA

Other Calculators

- Dilution
- Molarity
- Temperature Conversion
- T_m for Oligos

Dilution

Stock Solution

M

Final Concentration

mM

Final Volume

L

Clear Calculate

Formula

This calculator will determine the volume of stock solution required to make a working solution of a specific concentration and volume.

Enter the concentration of your stock solution, and the concentration and volume of the desired working solution.

a. Pada bagian *Other Calculators*, pilih "*Dilution*"

This screenshot shows the same Promega Dilution calculator interface, but with values entered. The "Stock Solution" field now contains "292.25". The "Final Concentration" dropdown menu is open, showing a list of units: "M", "mM", " μM ", "nM", and "pM". The "Final Volume" field remains "L". The "Clear" and "Calculate" buttons are still visible at the bottom.

Promega

DNA Conversions

- dsDNA: μg to pmol
- dsDNA: pmol to μg
- ssDNA: $\mu\text{g}/\text{ml}$ to pmol/ μl
- ssDNA: pmol/ μl to $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Linear DNA: μg to pmol of Ends
- Ligations: Molar Ratio of Insert:Vector
- Nucleic Acid: OD₂₆₀ to $\mu\text{g}/\text{ml}$

Protein Conversions

- Molar Conversions
- Coding Capacity of DNA

Other Calculators

- Dilution
- Molarity
- Temperature Conversion
- T_m for Oligos

Dilution

Stock Solution

M
mM
 μM
nM
pM

Final Concentration

Final Volume

Clear Calculate

Formula

This calculator will determine the volume of stock solution required to make a working solution of a specific concentration and volume.

Enter the concentration of your stock solution, and the concentration and volume of the desired working solution.

- b. Isi jumlah larutan stok yang ada pada kolom “*Stock Solution*” kemudian sesuaikan satuan yang ada.

Promega

DNA Conversions

- dsDNA: μg to pmol
- dsDNA: pmol to μg
- ssDNA: $\mu\text{g}/\text{ml}$ to pmol/ μl
- ssDNA: pmol/ μl to $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Linear DNA: μg to pmol of Ends
- Ligations: Molar Ratio of Insert:Vector
- Nucleic Acid: OD₂₆₀ to $\mu\text{g}/\text{ml}$

Protein Conversions

Molar Conversions

Coding Capacity of DNA

Other Calculators

- Dilution
- Molarity
- Temperature Conversion
- T_m for Oligos

Dilution

Stock Solution

292.25

M

Final Concentration

15

mM

mM

μM

nM

pM

L

Clear Calculate

Formula

This calculator will determine the volume of stock solution required to make a working solution of a specific concentration and volume.

Enter the concentration of your stock solution, and the concentration and volume of the desired working solution.

- c. Isi konsentrasi larutan akhir yang ada pada kolom “*Final Concentration*” kemudian sesuaikan satuan yang ada.

Promega

DNA Conversions

- dsDNA: μg to pmol
- dsDNA: pmol to μg
- ssDNA: $\mu\text{g}/\text{ml}$ to pmol/ μl
- ssDNA: pmol/ μl to $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Linear DNA: μg to pmol of Ends
- Ligations: Molar Ratio of Insert:Vector
- Nucleic Acid: OD₂₆₀ to $\mu\text{g}/\text{ml}$

Protein Conversions

Molar Conversions

Coding Capacity of DNA

Other Calculators

- Dilution
- Molarity
- Temperature Conversion
- T_m for Oligos

Dilution

Stock Solution

292.25

M

Final Concentration

15

mM

Final Volume

100

ml

L

ml

μl

Clear Calculate

Formula

This calculator will determine the volume of stock solution required to make a working solution of a specific concentration and volume.

Enter the concentration of your stock solution, and the concentration and volume of the desired working solution.

- d. Isi volume larutan akhir yang ada pada kolom "Final Volume" kemudian sesuaikan satuan yang ada.

DNA Conversions

- dsDNA: μg to pmol
- dsDNA: pmol to μg
- ssDNA: $\mu\text{g/ml}$ to pmol/ μl
- ssDNA: pmol/ μl to $\mu\text{g/ml}$
- Linear DNA: μg to pmol of Ends
- Ligations: Molar Ratio of Insert:Vector
- Nucleic Acid: OD_{260} to $\mu\text{g/ml}$

Protein Conversions

Molar Conversions

Coding Capacity of DNA

Other Calculators

- Dilution
- Molarity
- Temperature Conversion
- T_m for Oligos

Dilution

Stock Solution

292.25

M

Final Concentration

15

mM

Final Volume

100

ml

Add 5.1 μl of stock solution.

Clear Calculate

← HASIL

Formula

This calculator will determine the volume of stock solution required to make a working solution of a specific concentration and volume. Enter the concentration of your stock solution, and the concentration and volume of the desired working solution.

- e. Klik "Enter" atau "Calculate", maka hasil pengenceran akan muncul.

2. Perhitungan Molaritas

DNA Conversions

- dsDNA: μg to pmol
- dsDNA: pmol to μg
- ssDNA: $\mu\text{g/ml}$ to pmol/ μl
- ssDNA: pmol/ μl to $\mu\text{g/ml}$
- Linear DNA: μg to pmol of Ends
- Ligations: Molar Ratio of Insert:Vector
- Nucleic Acid: OD_{260} to $\mu\text{g/ml}$

Protein Conversions

Molar Conversions

Coding Capacity of DNA

Other Calculators

- Dilution
- Molarity
- Temperature Conversion
- T_m for Oligos

Molarity

Molecular Weight (g/mol)

Final Concentration

M

Final Volume

L

Clear Calculate

Formula

This tool will calculate the molarity of a solution for a compound of known molecular weight. Enter the values for molecular weight, desired molarity and desired final volume.

a. Pada bagian *Other Calculators*, pilih “Molarity”

The screenshot shows a web-based calculator interface. On the left is a sidebar menu with categories: DNA Conversions, Protein Conversions, Molar Conversions, Coding Capacity of DNA, Other Calculators, Dilution, Molarity, Temperature Conversion, and T_m for Oligos. The 'Molarity' option is selected. The main area is titled 'Molarity' and contains the following fields: 'Molecular Weight (g/mol)' with a value of 292.25, 'Final Concentration' (empty), a unit dropdown menu set to 'M', and 'Final Volume' (empty). At the bottom are 'Clear' and 'Calculate' buttons. To the right, under the 'Formula' heading, is a text box explaining the tool's purpose: 'This tool will calculate the molarity of a solution for a compound of known molecular weight. Enter the values for molecular weight, desired molarity and desired final volume.'

b. Isi massa relatif molekul (Mr) yang ada pada kolom “Molecular Weight”.

This screenshot is similar to the one above, but with additional input. The 'Molecular Weight (g/mol)' field still contains 292.25. The 'Final Concentration' field now contains the value 15. The unit dropdown menu is expanded, showing options: M, mM, and μM. The 'Final Volume' field remains empty. The 'Clear' and 'Calculate' buttons are still present at the bottom. The 'Formula' text on the right is identical to the previous screenshot.

- c. Isi konsentrasi larutan akhir yang ada pada kolom "Final Concentration" kemudian sesuaikan satuan yang ada.

The screenshot shows a web-based calculator interface. On the left is a sidebar with categories: DNA Conversions, Protein Conversions, Molar Conversions, Coding Capacity of DNA, and Other Calculators. The main area is titled 'Molarity' and contains three input fields: 'Molecular Weight (g/mol)' with the value 292.25, 'Final Concentration' with the value 15, and 'Final Volume' with the value 10. The 'Final Volume' field has a dropdown menu with options: ml, L, ml, and µl. To the right of the 'Molarity' section is a 'Formula' section with text: 'This tool will calculate the molarity of a solution for a compound of known molecular weight. Enter the values for molecular weight, desired molarity and desired final volume.'

- d. Isi volume larutan akhir yang ada pada kolom "Final Volume" kemudian sesuaikan satuan yang ada.

This screenshot shows the same calculator interface as above, but with the 'Final Volume' dropdown menu set to 'ml'. Below the input fields, a grey message box displays the result: 'You will need 43.84 milligrams.' To the right of this message is a large white arrow pointing left towards the word 'HASIL' in large white capital letters. Below the message box are two buttons: 'Clear' and 'Calculate', with the 'Calculate' button circled in red.

- e. Klik "Enter" atau "Calculate", maka hasil pengenceran akan muncul.

Rumus :

1. Perhitungan kebutuhan Agarose

$$\frac{\%Agarose}{100} \times V = \dots gram$$

2. $M = \frac{n}{V}$

3. $n = \frac{m}{Mr}$

4. $V_1N_1 = V_2N_2$

Keterangan :

V = Volume (L)

M = Molar

N = Konsentrasi

Mr = Massa relatif molekul

n = mol

m = massa (gram)

ACARA 4

ISOLASI DNA SECARA SEDERHANA

Pendahuluan

DNA dapat ditemukan di semua sel hidup. Oleh karena itu, DNA dapat ditemukan di berbagai bentuk jaringan makhluk hidup, bukan hanya ditemukan dalam sel darah atau seperti pendapat umum selama ini. Berbagai protokol telah dikembangkan untuk mengekstraksi DNA dari berbagai macam material dasar. Protokol-protokol yang sudah ada, pada dasarnya memiliki prinsip yang sama, bahwa untuk mengisolasi DNA perlu memecah dinding sel dan inti sel, kemudian memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. Pada praktikum acara 4 ini akan dilakukan protokol yang sederhana, dengan menggunakan alat dan bahan yang bisa ditemukan dalam kehidupan sehari-hari.

Tujuan:

Tujuan praktikum acara ini adalah:

1. Memperkenalkan mahasiswa dengan metode ekstraksi DNA dengan metode sederhana, menggunakan alat dan bahan yang mudah ditemukan.'
2. Melakukan eksperimen sederhana tentang bahan-bahan materi sumber DNA.
3. Membandingkan secara kualitatif hasil ekstraksi DNA yang diperoleh dari materi sumber DNA tersebut.

Alat dan Bahan:

1. Materi sumber DNA: Apel, Jeruk
2. Pisau
3. Blender
4. Penyaring
5. Tabung Reaksi
6. Gelas Beker
7. Propipet
8. Pipet Ukur
9. Detergen
10. Air Keran

11. Jus Nanas
12. Pelunak Daging
13. Etanol 70% dan 90%

Cara Kerja:

1. 10 g sampel yang berbentuk padat (apel, ataupun jeruk) ditimbang, kemudian ditambahkan 50 ml larutan detergen serta 10 ml air keran, lalu diblender selama 1 menit, kemudian disaring.
2. Hasil saringan diambil \pm 5 ml, dipindahkan ke tabung reaksi, kemudian masing-masing sampel ditambahkan pelunak daging atau jus nanas sebanyak 5 ml, lalu di *vortex*.
3. Filtrat kemudian diambil sebanyak 5 ml, dipindahkan ke tabung reaksi baru, kemudian ditambahkan 5 ml etanol dingin secara perlahan melalui dinding tabung.
4. DNA yang terisolasi (yang berbentuk seperti busa kemudian naik ke larutan etnaol) diamati, kemudian dicatat hasilnya.

ACARA 5

ISOLASI DNA

Pendahuluan

Terdapat berbagai macam metode untuk mengisolasi DNA dari suatu materi sumber DNA. Pada dasarnya metode tersebut bertujuan untuk menghancurkan protein dan memisahkan DNA dari bagian-bagian lainnya. DNA yang sudah dipisahkan ini kemudian dapat dikonsentrasikan dengan memakai metode presipitasi alkohol. Cara mengisolasi DNA dapat dilakukan dengan mencernakan protein dengan memakai Proteinase K. Pada praktikum kali ini akan dilakukan beberapa macam metode isolasi dna yaitu menggunakan kit ekstraksi, dan metode salting out.

Tujuan

Tujuan dari praktikum acara ini yaitu:

1. Mengetahui berbagai jenis metode isolasi DNA
2. Mengetahui prinsip isolasi DNA jaringan hewan
3. Mengetahui prinsip isolasi DNA menggunakan kit ekstraksi dan metode Salting Out

Alat dan Bahan

- Alat yang digunakan pada praktikum ini adalah pinset, tusuk gigi, silet, alumunium foil, bunsen, 1,5 dan 2 ml *microcentrifuge tube* (Biologix), rak *microcentrifuge tube*, *micropipette*, *blue micropipette tips* 1000 μ l, *yellow micropipette tips* 200 μ l, *white micropipette tips* 10 μ l, *gSYNC TM DNA extraction kit* (Geneaid), *ABV-1 Vortexer* (AccuBioTech Co.,Ltd), *qikspin personal microcentrifuge* (Edwards Group Pty. Ltd), *water bath XMTD-204* (BaltaLab), *microcentrifuge MIKRO 120* (Hettich Instruments, LP).
- Bahan yang digunakan pada praktikum ini adalah
 1. Sumber materi DNA: darah burung yang disimpan dalam buffer dan kertas saring.
 2. Isolasi dengan *gSYNC TM DNA extraction kit* (Geneaid) : GST buffer, GSB buffer, W1 buffer, Wash buffer, Proteinase K, etanol absolut, Elution buffer, GS columns, 2 ml collection tubes, PBS.

3. Isolasi dengan metode salting out : salting out buffer lysis, SDS 10%, NaCl 6M, Proteinase K, etanol absolut, dan TE Buffer

Cara Kerja

Alur kerja isolasi DNA dengan *gSYNC TM DNA extraction kit* (Geneaid) sampel darah pada kertas saring :

1. Sterilisasi meja kerja dengan menggunakan alkohol 70%
2. Siapkan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan pada meja kerja, atur sehingga mempermudah pergerakan saat melakukan proses isolasi DNA.
3. Potong kertas filter yang menandung sampel darah dengan ukuran $\pm 5 \times 5$ mm, masukan ke dalam microtube (1,5 ml), sampel kemudian ditambahkan 200 μ L GST Buffer dan 20 μ L Proteinase K, lalu sampel divorteks.
4. Setelah divorteks seluruh sampel kemudian diinkubasi pada suhu 60 °C dengan menggunakan waterbath selama 30 menit atau hingga lisat menjadi jernih.
5. Setelah diinkubasi jika masih terdapat komponen yang tidak larut sempurna, sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit
6. Supernatan pada sampel yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke microcentrifuge tube berukuran 1,5 mL yang baru.
7. Sampel kemudian ditambahkan 200 μ L GSB Buffer kemudian divorteks selama 10 detik hingga sampel lisat dan buffer terhomogenisasi dengan baik.
8. Sampel kemudian ditambahkan 200 μ L absolute ethanol dan sesegera mungkin vorteks selama 10 detik.
9. Letakkan GS Column pada 2 mL Collection Tube, kemudian pindahkan seluruh campuran buffer dan sampel ke GS Column.
10. GS Column dan 2 mL Collection Tube yang berisi campuran buffer dan sampel, disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit.
11. Pisahkan GS Column dari 2 mL Collection Tube yang berisi larutan hasil sentrifugasi, letakkan GS Column pada 2 mL Collection Tube yang baru.
12. Pada GS Column ditambahkan 400 μ L W1 Buffer kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik.
13. Larutan hasil sentrifugasi pada 2 mL Collection Tube dibuang, kemudian GS Column diletakkan kembali pada 2 mL Collection Tube.
14. 600 μ L Wash Buffer ditambahkan pada GS Column lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik, larutan hasil sentrifugasi pada 2 mL Collection Tube dibuang.
15. GS Column diletakkan kembali pada 2 mL Collection Tube, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit untuk memastikan matriks pada GS Column kering.

16. GS Column kering diletakkan pada microcentrifuge tube berukuran 1,5 mL baru, 100 μ L pre-heated Elution Buffer ditambahkan tepat di tengah GS Column.
17. Diamkan GS Column dan microcentrifuge tube berukuran 1,5 mL selama 5 menit untuk memastikan pre-heated Elution Buffer meresap, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik.
18. Microcentrifuge tube pada bagian tutup diberi kode sampel, kemudian DNA hasil isolasi diletakkan pada suhu -20°C .

Alur kerja isolasi DNA dengan gSYNC™ DNA extraction kit (Geneaid) sampel darah pada buffer :

1. Sterilisasi meja kerja dengan menggunakan alkohol 70%
2. Siapkan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan pada meja kerja, atur sehingga mempermudah pergerakan saat melakukan proses isolasi DNA.
3. Sampel darah pada buffer, diambil 20 μ L kemudian dimasukkan ke microtube (1,5 ml).
4. Sampel kemudian ditambahkan PBS Buffer hingga volume 200 μ L, kemudian ditambahkan 20 μ L Proteinase K, lalu campur dengan pipetting.
5. Setelah dicampur seluruh sampel kemudian diinkubasi pada suhu 60°C dengan menggunakan waterbath selama 5 menit.
6. Setelah diinkubasi sampel kemudian ditambahkan 200 μ L GSB Buffer lalu sampel divorteks.
7. Setelah dicampur seluruh sampel kemudian diinkubasi pada suhu 60°C dengan menggunakan waterbath selama 5 menit, tube berisi sampel dan larutan diinversi setiap 2 menit.
8. Sampel kemudian ditambahkan 200 μ L absolute ethanol dan sesegera mungkin vorteks selama 10 detik.
9. Letakkan GS Column pada 2 mL Collection Tube, kemudian pindahkan seluruh campuran buffer dan sampel ke GS Column.
10. GS Column dan 2 mL Collection Tube yang berisi campuran buffer dan sampel, disentrifugasi pada kecepatan 14.000 RPM selama 1 menit.
11. Pisahkan GS Column dari 2 mL Collection Tube yang berisi larutan hasil sentrifugasi, letakkan GS Column pada 2 mL Collection Tube yang baru.
12. Pada GS Column ditambahkan 400 μ L W1 Buffer kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik.
13. Larutan hasil sentrifugasi pada 2 mL Collection Tube dibuang, kemudian GS Column diletakkan kembali pada 2 mL Collection Tube.
14. 600 μ L Wash Buffer ditambahkan pada GS Column lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik, larutan hasil sentrifugasi pada 2 mL Collection Tube dibuang.

15. GS Column diletakkan kembali pada 2 mL Collection Tube, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit untuk memastikan matriks pada GS Column kering.
16. GS Column kering diletakkan pada microcentrifuge tube berukuran 1,5 mL baru, 100 μ L pre-heated Elution Buffer ditambahkan tepat di tengah GS Column.
17. Diamkan GS Column dan microcentrifuge tube berukuran 1,5 mL selama 5 menit untuk memastikan pre-heated Elution Buffer meresap, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik.
18. Microcentrifuge tube pada bagian tutup diberi kode sampel, kemudian DNA hasil isolasi diletakkan pada suhu -20°C .

Alur kerja isolasi DNA dengan metode salting out sampel darah pada kertas saring :

1. Sterilisasi meja kerja dengan menggunakan alkohol 70%
2. Siapkan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan pada meja kerja, atur sehingga mempermudah pergerakan saat melakukan proses isolasi DNA.
3. Potong kertas filter yang menandung sampel darah dengan ukuran $\pm 5 \times 5$ mm, masukan ke dalam microtube (1,5 ml).
4. Sampel kemudian ditambahkan 120 μ L salting out buffer lysis, 8 μ L SDS 10%, dan 20 μ L Proteinase K kemudian sampel divorteks 10 detik.
5. Setelah dicampur seluruh sampel kemudian diinkubasi pada suhu 60°C dengan menggunakan waterbath selama 10 menit.
6. Setelah diinkubasi sampel kemudian ditambahkan 40 μ L NaCl 6M lalu sampel divorteks 15 detik.
7. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 6.500 rpm selama 15 menit.
8. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke microcentrifuge tube berukuran 1,5 mL yang baru.
9. Sampel kemudian ditambahkan 80 μ L absolute ethanol kemudian tube berisi sampel diinversi hingga terbentuk endapan.
10. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 RPM selama 30 menit.
11. Supernatan yang terbentuk dibuang dengan bantuan micropipet dan microtip, jangan mengambil dan mengenai pellet yang sudah terbentuk.
12. Tutup microcentrifuge tube dibuka, pellet yang terbentuk dikeringkan pada suhu ruang selama 1-3 menit.
13. Sampel kemudian ditambahkan 50 μ L TE buffer.
14. Microcentrifuge tube pada bagian tutup diberi kode sampel, kemudian DNA hasil isolasi diletakkan pada suhu -20°C .

Alur kerja isolasi DNA dengan metode salting out sampel darah pada buffer :

1. Sterilisasi meja kerja dengan menggunakan alkohol 70%
2. Siapkan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan pada meja kerja, atur sehingga mempermudah pergerakan saat melakukan proses isolasi DNA.
3. Sampel darah pada buffer, diambil 20 μ L kemudian dimasukkan ke microtube (1,5 ml).
4. Sampel kemudian ditambahkan 120 μ L salting out buffer lysis, 8 μ L SDS 10%, dan 20 μ L Proteinase K kemudian sampel divorteks 10 detik.
5. Setelah dicampur seluruh sampel kemudian diinkubasi pada suhu 60 °C dengan menggunakan waterbath selama 10 menit.
6. Setelah diinkubasi sampel kemudian ditambahkan 40 μ L NaCl 6M lalu sampel divorteks 15 detik..
7. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 6.500 rpm selama 15 menit.
8. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke microcentrifuge tube berukuran 1,5 mL yang baru.
9. Sampel kemudian ditambahkan 80 μ L absolute ethanol kemudian tube berisi sampel diinversi hingga terbentuk endapan.
10. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 RPM selama 30 menit.
11. Supernatan yang terbentuk dibuang dengan bantuan micropipet dan microtip, jangan mengambil dan mengenai pellet yang sudah terbentuk.
12. Tutup microcentrifuge tube dibuka, pellet yang terbentuk dikeringkan pada suhu ruang.
13. Sampel kemudian ditambahkan 50 μ L TE buffer.
14. Microcentrifuge tube pada bagian tutup diberi kode sampel, kemudian DNA hasil isolasi diletakkan pada suhu -20 °C.

ACARA 6

ELEKTROFORESA

Pendahuluan

Elektroforesa adalah suatu teknik pemisahan yang berdasarkan pada pergerakan/mobilitas ion-ion dalam suatu medan elektrik. Ion yang bermuatan positif akan bergerak ke elektrode bermuatan negatif, dan sebaliknya ion bermuatan negatif akan bergerak menuju elektrode positif. Laju migrasi/pergerakan ion berbeda-beda tergantung pada muatan total, ukuran dan bentuk.

Aplikasi teknik elektroforesa pada biologi molekuler menggunakan media/matrik gel (agarosa atau poliakrilimida). Elektroforesa gel ini digunakan untuk pemisahan DNA, RNA, atau protein. Tujuan penggunaan elektroforesa ini adalah untuk analisis, selain itu juga digunakan untuk persiapan sebelum digunakan untuk metode lainnya, seperti: *mass spectrometry*, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), PCR, *cloning*, DNA *sequencing*, atau *Southern blotting*.

Tujuan

Tujuan praktikum acara ini adalah :

1. Memperkenalkan mahasiswa dengan aplikasi teknik elektroforesa dalam biologi molekuler
2. Mahasiswa mampu melakukan visualisasi hasil ekstraksi DNA dengan elektroforesa gel
3. Mahasiswa mampu membuat gel agarose dengan konsentrasi tertentu

Alat dan Bahan

- Elektroforesa
- Power supply
- *Gel Logic 200 Imaging system*
- *Micropipette*
- *Microtips*
- Parafilm M
- TBE (0.5X)

- Sampel DNA hasil isolasi
- *Loading dye (Blue juice)*
- DNA *ladder*
- Agarosa
- ddH₂O

Cara kerja

1. Keluarkan sampel DNA dari *freezer*
2. Buat gel agarosa (0,8%) dengan cara sebagai berikut:
 - a. Timbang serbuk agarosa 24 mg dan masukan dalam gelas elemeyer
 - b. Tambahkan 30 ml TBE (0.5X), goyang sampai agarosanya tercampur merata
 - c. Panaskan dalam *microwave* selama 30-60 detik, sampai gel cair terlihat jernih
 - d. Biarkan sejenak sampai sedikit hangat, sebelum ditambah 1,5µl/30 ml DNA Stain dan goyang pelan-pelan supaya tercampur sempurna.
3. Larutan agarose (yang sudah tercampur DNA Stain dan masih hangat) dituangkan kedalam cetakan gel, pasang sisir sesuai dengan sumuran yang diperlukan, biarkan mengeras (20 - 30 menit).
4. Pindah gel yang sudah mengeras ke dalam bak elektroforesa, dan tambahkan TBE (0.5X) sampai gelnya terendam.
5. Pipet *loading dye* dan letakan pada plastik/kertas parafm, masing-masing 2 µl sebanyak sampel DNA yang akan di visualisiasi dengan elektroforesa, ditambah satu untuk DNA ladder.
6. Pipet DNA ladder (3 µl) campur kan dengan loading dye, kemudian masukan dalam sumuran yang pertama pada gel campurkan yang sudah disiapkan.
7. Lakukan hal yang sama untuk sampel DNA yang akan diuji.
8. Jalankan elektroforesa pada tegangan 100 volt selama 30 menit.
9. Hasil pemisahan fragmen DNA dilihat dengan menggunakan alat *Gel Logic 200 Imaging system*.
10. Perhatikan ukuran DNA hasil isolasi dengan membandingkan dengan DNA ladder, pada kolom pertama. Bandingkan pula intensitas pita yang dihasilkan.
11. Foto dan simpan hasil visualnya dalam folder yang telah ditentukan.
12. Buang gel pada tempat yang telah ditentukan dan bersihkan semua peralatan yang digunakan.

ACARA 7

DESAIN PRIMER

Pendahuluan

Salah satu komponen utama penentu keberhasilan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah primer. Primer merupakan suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang menjadi komplemen awal fragmen DNA pada 5' dan 3' dari akhir fragmen DNA. Primer berfungsi untuk memulai (prekursor) sintesis rantai DNA yang dilakukan oleh DNA polimerase. Pada PCR diperlukan satu set primer yang masing-masing terletak di kedua ujung fragmen DNA target, yaitu primer *forward* (arah sintesis maju) dan primer *reverse* (arah sintesis terbalik), namun pada beberapa kasus primer yang digunakan dapat salah satu saja (*forward* atau *reverse*). Desain primer biasanya diperlukan apabila belum ada sekuen primer untuk penelitian yang dilakukan. Agar dihasilkan primer yang baik, maka primer yang dibuat harus memenuhi beberapa syarat yang diperlukan, diantaranya:

- 1) Panjang sekuen 17-28 basa
- 2) Komposisi basa (G+C) antara 50-60%
- 3) Akhir 3' dari pasangan primer tidak saling komplementer (dapat menyebabkan primer dimer)
- 4) Sekuen di desain sedemikian agar tidak komplementer sendiri, hal ini dapat menyebabkan struktur sekunder
- 5) Akhir sekuen primer sebaiknya G, C, atau CG, atau GC
- 6) T_m antara 55-80°C, jika membuat pasangan primer: T_m sama atau tidak jauh berbeda (<30°C)

Tujuan

Tujuan praktikum acara ini adalah:

1. Mengetahui prinsip-prinsip dasar dalam mendesain primer
2. Mengetahui cara mendesain primer
3. Mengetahui cara menguji keakuratan primer yang telah didesain

Alat dan bahan

- Sekuen DNA
- Laptop
- Internet
- Software MEGA
- Program desain primer

Cara kerja

A. Java

Java Update

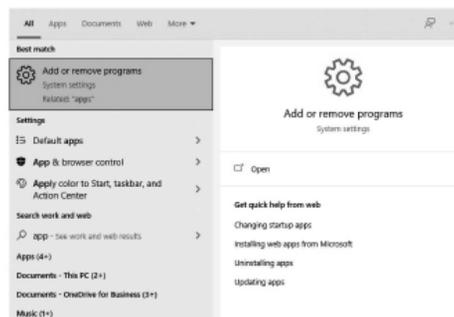
1. Uninstall older versions of Java
2. Install the latest version of Java:
 1. For Windows User
 2. For Mac OS X User
 3. For Linux



Uninstall older versions of Java

- Tekan tombol *windows logo key*
- Pilih Add or remove programs

n.b. pengguna OS non-Windows harap menyesuaikan



Uninstall older versions of Java

- Search: "Java"
- Pilih Uninstall



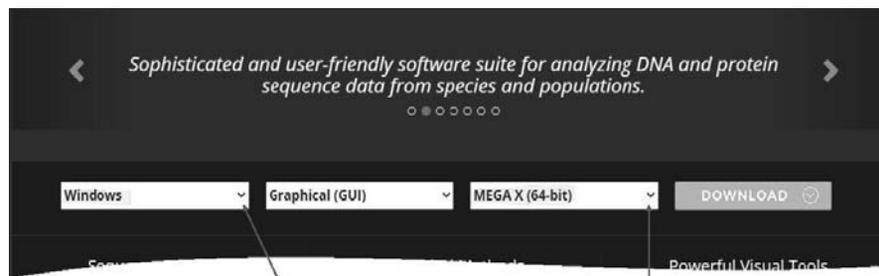
Install the latest version of Java

- <https://www.java.com/en/download/manual.jsp>
- Download & Install (Pilih salah satu sesuai OS, kecuali bagi pengguna Windows 64 bit, install versi Java untuk Windows 32 bit):
 1. Windows 32 bit
 2. Windows 64 bit
 3. Mac OS X
 4. Linux

Install pada **default directory** (jangan mengubah lokasi direktori Java saat proses instalasi)



B. Mega



MEGA

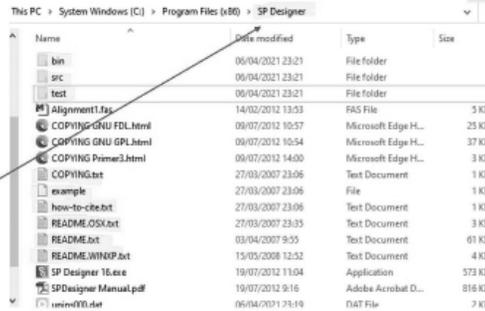
- <https://www.megasoftware.net/>
- Pilih MEGA software sesuai OS
- Download & Install

C. SP Designer



Install SP Designer

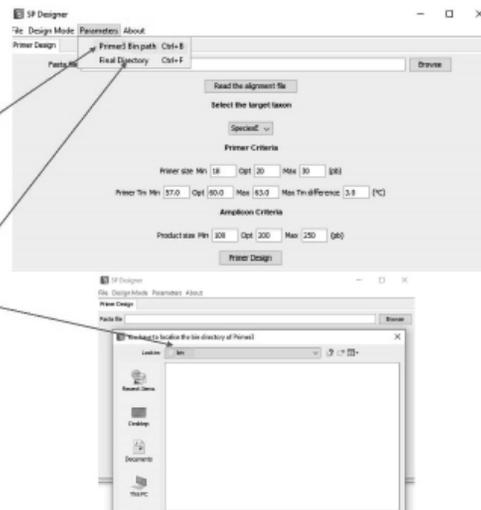
- SP Designer diinstal pada **default directory** (seperti saat install Java), sebut saja **folder A**
- Pindahkan **ISI FOLDER primer3-1.1.4-WINXP** yang telah di unduh ke dalam **folder A** tersebut (ke dalam folder SP Designer yang terinstal).



Running SP Designer

- Jalankan program **SP Designer**
- Pilih **Parameters Menu bar** SP Designer dan pilih direktori: **folder A** → **folder bin**
- Pilih **Open**

n.b. Final Directory Menu Bar boleh dialokasikan ke direktori manapun dan catat nama direktorinya.

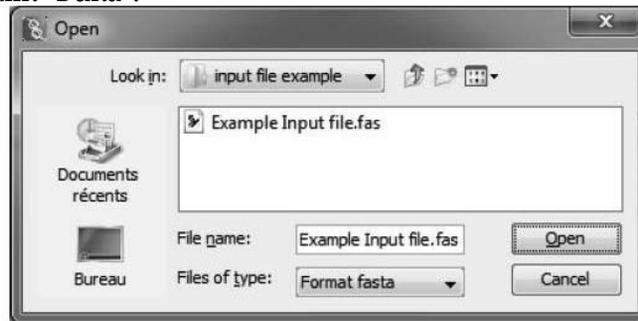


1. Instal program SP Designer
2. Siapkan sekuen DNA yang telah di-alignment menggunakan program MEGA
3. File yang berisi sekuen DNA dinamai dengan format seperti di bawah ini:

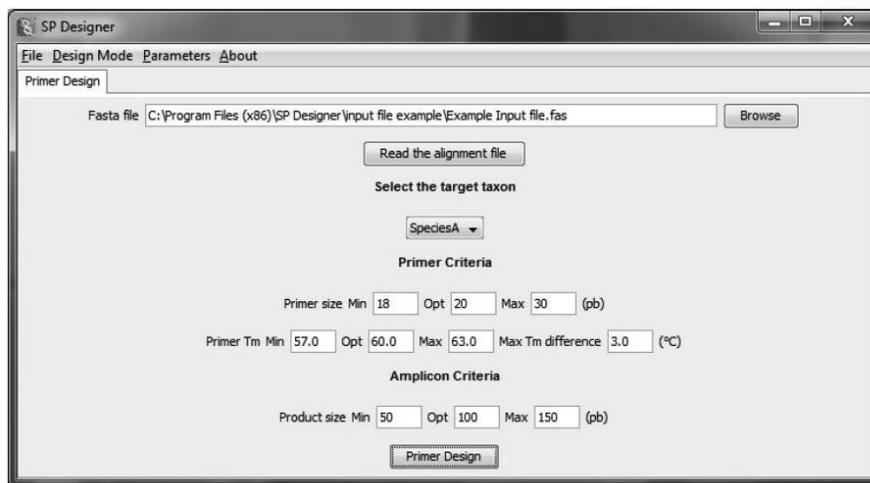
```

SpeciesA-001 GTTAGCGTGTGTTCCGGTGGTCAATTCGGCCGGTGTGCAGCAAAATTCATAATTCGAGACGGCACTCGGAAGGCCATTTCCGCGACTCGCG
SpeciesA-002 GTTAGCGTGTGTTCCGGTGGTCAATTCGGCCGGTGTGCAGCAAAATTCATAATTCGAGACGGCACTCGGAAGGCCATTTCCGCGACTCGCG
SpeciesB-001 ATTCGCTCA---CGCGTCATG---TACGGACGC---GATGATGACGATCGAGAA---CGGGCACA---CATTCCGAAGACAT---GCGAGCGTGCGA
SpeciesB-002 ATTCGCTCA---CGCGTCATG---TACGGACGC---GATGATGACGATCGAGAA---CGGGCACA---CATTCCGAAGACAT---GCGAGCGTGCGA
SpeciesC    GTTCGCTCA---CGCGTCATG---TACGGTCCG---GCGGAGGACGATCGAGAA---CGTTAACA---CATTCCGAAGACATTTCCGAGCGTGCGA
SpeciesD    GCTCGCTCA---CGCGTCATG---TACGGCCGC---GTCGAGCAGATCGAGAA---CGTAGACA---CATTCCGAAGACATTTCCGAGCGTGCGT
    
```

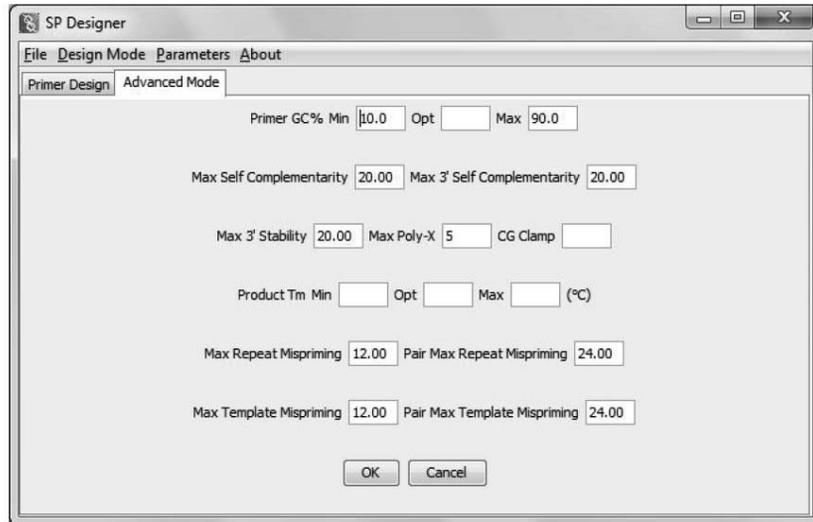
4. Pertama-tama, kita harus memilih file input. Klik File> Impor atau "Browse". Pilih file input dan klik "Buka".



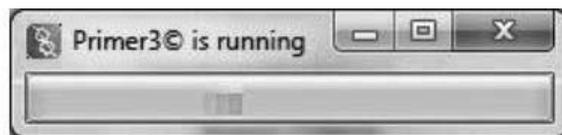
5. Kemudian, pilih takson target (yang akan dirancang oleh SP Designer) di antara semua taksa yang terdeteksi oleh SP Designer (pilih salah nama yang disediakan dalam file input). Untuk melakukannya, tekan "Read the alignment file" dan pilih takson target dalam daftar yang disediakan di bawah tombol dan kalimat "Select the target taxon".



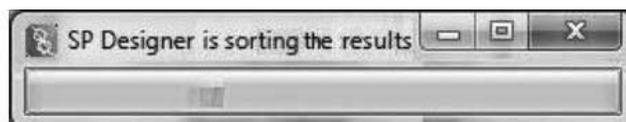
6. Langkah berikutnya adalah pengisian parameter biokimia untuk mendesain primer (parameter dapat diisi sesuai keinginan berdasarkan acuan yang digunakan)



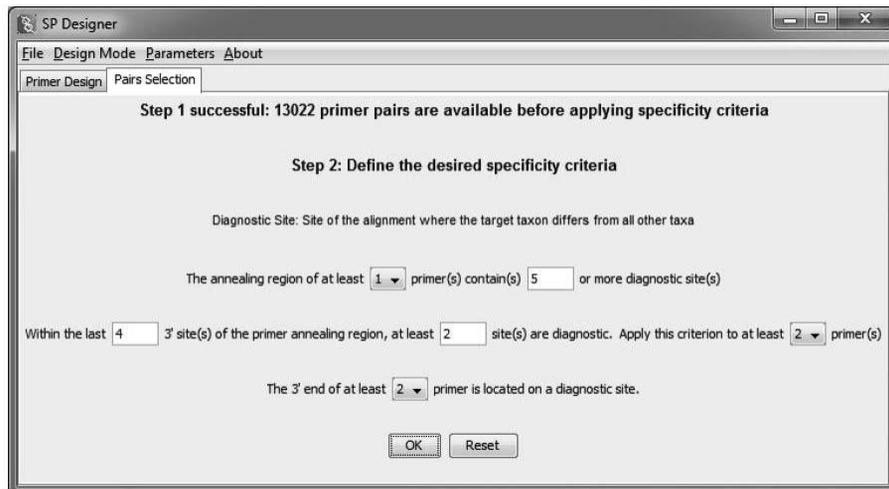
7. Jika semua parameter telah diisi, klik "OK" untuk melanjutkan ketahap berikutnya, jika tidak, klik "Cancel".
8. Kemudian, klik "Desain Primer" untuk menjalankan langkah desain pasangan primer.
9. Proses di bawah ini berarti bahwa Primer3 © sedang membuat daftar primer kiri dan kanan.



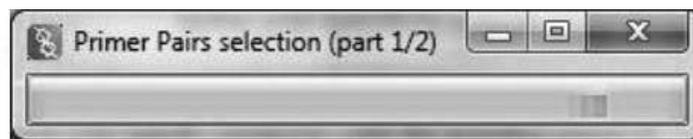
10. Proses di bawah ini berarti bahwa SP Designer membuat daftar pasangan primer di luar output Primer3



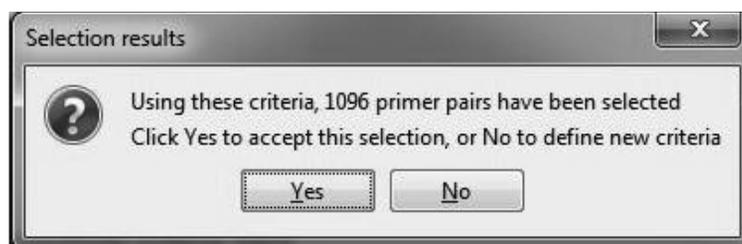
11. Setelah SP Designer mengurutkan output dari Primer3, jendela berikut akan muncul. Kemudian isi kolom kriteria spesifik.
12. Dalam contoh kami, kami akan memilih kriteria spesifisitas yang sangat ketat karena urutan dari berbagai spesies sangat berbeda satu sama lain.



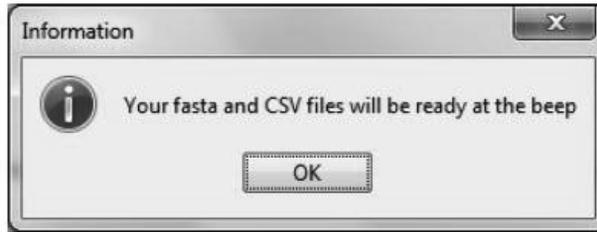
13. Ketika kriteria Anda dipilih, klik "OK" dan tunggu sampai akhir proses.



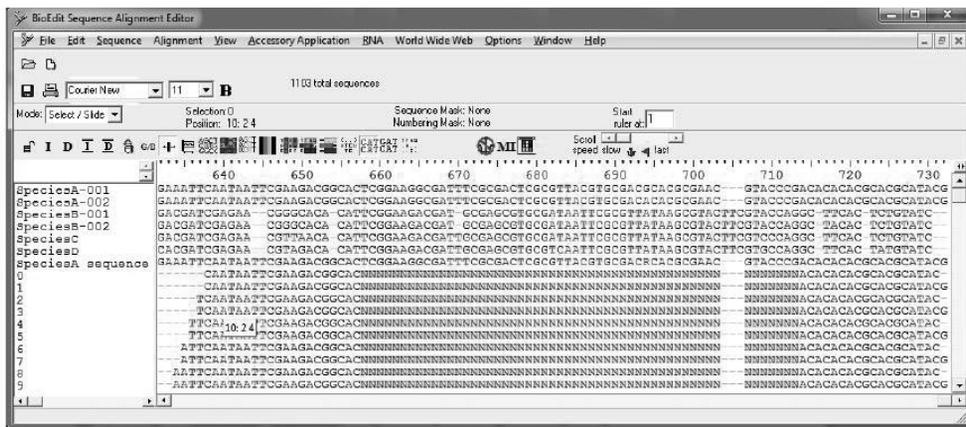
14. Setelah tahap pemilihan kriteria, dan sebelum melangkah lebih jauh, SP Designer menampilkan berapa banyak pasangan primer yang dapat dipilih berdasarkan kriteria spesifisitas.
15. Jika jumlah pasangan tidak cukup atau terlalu tinggi (artinya kriteria spesifisitas terlalu ketat atau Anda dapat dengan mudah memilih primer yang lebih spesifik), klik "NO" untuk menentukan kriteria lagi. Jika Anda puas dengan jumlah hasil, klik "Yes".



16. SP Designer kemudian menyiapkan file output, jendela menampilkan progres proses. Setelah "beep", file output siap di direktori yang Anda tentukan di Parameter> Direktori Final, atau di desktop Anda jika tidak ada direktori yang ditentukan.



17. Untuk setiap desain, subdirektori dibuat dan dinamai "TempDir SP Designer" diikuti dengan tanggal dan waktu pembuatannya. Ini berisi perataan FASTA, tabel CSV dan dua file teks. File fasta berisi urutan awal, pasangan primer yang dirancang diposisikan pada penyelarasan dan urutan konsensus yang digunakan oleh perangkat lunak untuk membedakan takson target dari yang lain.



18. Primer yang dirancang muncul sebagai satu urutan (satu baris) yang terdiri dari (i) celah sampai situs pertama dari primer forward, (ii) urutan primer forward, (iii) rangkaian "N" antara primer forward dan reverse, (iv) urutan primer reverse dan (v) celah sampai akhir alignment.
19. File CSV menyediakan: skor pasangan primer, dan setiap primer, urutan, Tm dan GC% dari masing-masing primer, dan data lainnya. Nama primer identik dalam file FASTA dan CSV.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	SEQ_CODE	PCR_PRODUCT_SIZE	PRIMER_PAIR_PENALTY	PRIMER_LEFT_PENALTY	PRIMER_RIGHT_PENALTY	PRIMER_LEFT_SEQUENCE	PRIMER_RIGHT_SEQUENCE	PRIMER_LEFT
2	0	91	166.23401	121.759	44.475	CAATAATCGAAGACGGCAC	GTATGCGTGC GTGTGTGT	617
3	1	92	205.647	121.759	83.888	CAATAATCGAAGACGGCAC	CGTATGCGTGC GTGTGTGT	617
4	2	92	165.564	121.089	44.475	TCAATAATCGAAGACGGCAC	GTATGCGTGC GTGTGTGT	616
5	3	93	204.57699	121.089	83.888	TCAATAATCGAAGACGGCAC	CGTATGCGTGC GTGTGTGT	616
6	4	93	187.79099	143.316	44.475	TTCAATAATCGAAGACGGCAC	GTATGCGTGC GTGTGTGT	615
7	5	94	227.204	143.316	83.888	TTCAATAATCGAAGACGGCAC	CGTATGCGTGC GTGTGTGT	615
8	6	94	188.57101	144.496	44.475	ATTCAATAATCGAAGACGGCAC	GTATGCGTGC GTGTGTGT	614
9	7	95	228.384	144.496	83.888	ATTCAATAATCGAAGACGGCAC	CGTATGCGTGC GTGTGTGT	614
10	8	95	191.022	146.547	44.475	AAATCAATAATCGAAGACGGCAC	GTATGCGTGC GTGTGTGT	613
11	9	96	230.435	146.547	83.888	AAATCAATAATCGAAGACGGCAC	CGTATGCGTGC GTGTGTGT	613
12	10	96	209.11401	164.639	44.475	AAATCAATAATCGAAGACGG	GTATGCGTGC GTGTGTGT	612
13	11	97	248.52701	164.639	83.888	AAATCAATAATCGAAGACGG	CGTATGCGTGC GTGTGTGT	612
14	12	97	208.435	163.96	44.475	GAAATCAATAATCGAAGACGG	GTATGCGTGC GTGTGTGT	611
15	13	98	247.848	163.96	83.888	GAAATCAATAATCGAAGACGG	CGTATGCGTGC GTGTGTGT	611
16	14	98	231.39499	186.92	44.475	CGAATCAATAATCGAAGACGG	GTATGCGTGC GTGTGTGT	610

20. Satu file teks bernama "parameter_recap_file.txt" berisi seluruh fitur yang Anda pilih untuk pasangan primer yang telah dirancang. Dan yang lainnya, bernama "sample_primer3_in.txt" berisi file input yang dibuat oleh SP Designer untuk Primer3 ©.

```

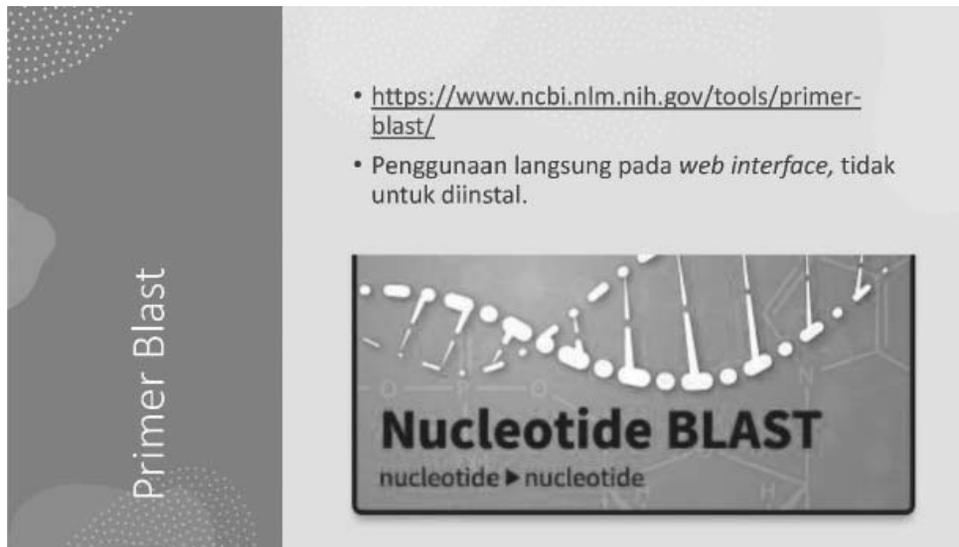
1 Input fasta file : C:\Program Files (x86)\SP Designer\input file example\Example Input file.fas
2 Selected species : SpeciesA
3
4 Primer design criteria :
5
6 Primer size : Minimum 18 Optimal 20 Maximum 30 (pb)
7 Primer Tm : Minimum 57.0 Optimal 60.0 Maximal 63.0 Maximal tm Difference 3.0 (°C)
8 Product size : Minimum 50 Optimal 100 Maximal 180 (pb)
9 Primer GCs : Minimum 10.0 Maximum 90.0
10 Maximum self complementarity : 20.00 Maximum 5' self complementarity : 20.00
11 Maximum 3' stability : 20.00 Maximum poly-X : 5
12
13 Maximum repeat mispriming : 12.00 Pair maximum repeat mispriming : 24.00
14 Maximum template mispriming : 12.00 Pair maximum template mispriming : 24.00
15
16 Primer Pairs selection :
17
18 The annealing region of at least 1 primer(s) contain(s) 5 or more diagnostic site(s)
19 Within the last 4 3' site(s) of the primer annealing region, at least 2 site(s) are diagnostic. Apply this criterion to at least 2 primer(s)
20 The 3' end of at least 2 primer is located on a diagnostic site.

```

21. Dari beberapa primer yang telah di desain, pilih primer yang akan digunakan. Sebelum primer dipesan dan dites secara *in vitro*, sebaliknya primer dites secara *in silico*.

*untuk selengkapnya bisa dibaca di SP Designer Manual Book

D. NCBI Primer Blast



1. In silico test dilakukan dengan fitur Primer Blast di situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).
2. Primer (yang akan di *blasting*) disalin (*copy*) dan ditempel (*paste*) pada kolom yang ada (kolom primer *forward* dan *reverse* diperhatikan)
3. NR dipilih di bagian database, kolom *organism* dikosongkan (tulisan *Homo sapiens*) dihapus) dan tombol *Get Primer* dipilih.
4. Hasil *Detailed Primer Reports* ditunggu

ACARA 8

POLYMERASE CHAIN REACTION

Pendahuluan

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode untuk memperbanyak suatu potongan sekuens secara *in vitro*, yang ditemukan oleh Kary Mullis pada April 1983. Deskripsi mengenai prosedur metode ini untuk pertama kali dipublikasikan pada tahun 1985. Karya yang menjadi salah satu tonggak penting perkembangan biologi molekuler ini mengantarkan Mullis memperoleh penghargaan Nobel pada tahun 1993.

Enzim yang dipakai pada proses PCR pada pertama kalinya adalah Klenow - suatu enzim polimerase dari *E. coli*, yang aktif pada suhu 37 °C, dan segera dirusak pada suhu tinggi. Penemuan enzim polimerase yang berasal dari *Thermus aquaticus*, yang tidak mudah rusak pada suhu tinggi dan alat otomatis yang dapat menaikkan suhu (*Thermocycler*), membuat metode PCR menjadi mudah dikerjakan. Sejak saat itu, PCR telah menjadi metode pemeriksaan dasar dan penting untuk laboratorium riset dan analitik.

Dasar-dasar PCR telah dimanfaatkan secara luas dan telah pula di aplikasikan untuk berbagai macam kepentingan khusus seperti karakterisasi gen, kloning dan ekspresinya dan juga diagnostik DNA. PCR dimanfaatkan untuk deteksi organisme patogen, mengidentifikasi mutasi-mutasi yang bertanggung jawab terhadap berbagai penyakit keturunan. Selain itu DNA *fingerprinting* telah dimanfaatkan untuk keperluan dunia kedokteran dan kedokteran forensic serta pada ekologi molekuler.

Tujuan

Tujuan praktikum acara ini adalah:

1. Mengetahui prinsip-prinsip dasar *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
2. Mengetahui aplikasi dari *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
3. Mengetahui hasil amplifikasi fragmen DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction*

Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada praktikum ini adalah 1,5 ml *microcentrifuge tube*, 0,2 ml *microtube* atau PCR tube, rak *microcentrifuge tube*, cetakan gel agarose, *tissue*, timbangan analisis, *micropipette*, *blue micropipette tips* 1000 µl, *yellow micropipette tips* 200 µl, *white*

micropipette tips 10 µl, ABV-1 *Vortexer*, *Qikspin personal microcentrifuge*, *water bath* XMTD-201, *microcentrifuge* MIKRO 120, labu erlenmeyer 50 ml, *microwave oven* M1974CE, Parafilm M, *electrophoresis system* Mupid-exU, *gel logic 200 imaging system* (Kodak), kulkas, dan Veriti™96-well *thermal cycler* (Applied Biosystems™).

Bahan digunakan pada praktikum ini adalah hasil isolasi DNA pada acara Isolasi DNA, *Ethidium bromide* 1% (AppliChem, GMBH), ddH₂O, *agarose molecular grade* (Vivantis), 100 bp *DNA Ladder* (SMOBiO), 0,5% TAE Buffer, pH8.0, Ultra Pure Grade (Vivantis), 0,5x TBE Buffer, pH8.0, *ultra pure grade* (Vivantis), *ultrapure™ distilled water* (invitrogen), KOD FX Neo 1103 (2x), KOD FX Neo 1103 PCR buffer, dNTPs (2Mm), pri F (10pmol/ µl), primer R (10pmol/ µl), dan *gel loading dye* (SIGMA).

Cara kerja

1. Sterilisasi meja kerja dengan menggunakan alkohol 70%
2. Siapkan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan pada meja kerja, atur sehingga mempermudah pergerakan saat melakukan proses dalam praktikum.
3. Siapkan dan nyalakan mesin Veriti™ 96-well *thermal cycler* (Applied Biosystems™) pada bagian belakang mesin (*booting* sekitar 15 menit)
4. Seluruh komponen *master mix* dimasukkan dan dicampurkan ke microtube 1,5 ml sesuai jumlah dan urutan (kecuali DNA template) serta telah dikalikan dengan jumlah sampel sesuai pada tabel di bawah,

Komponen	Volume 1X reaksi (µl)
PCR Grade Water	1,2
2x PCR buffer KOD Fx Neo	5
2mM dNTPs	2
10 µM Primer Forward	0,3
10 µM Primer Reverse	0,3
1U/µl KOD FX (DNA Polimerase)	0,2
DNA Template	1
Volume total	10

5. *Master mix* pada microtube 1,5 ml diambil sebanyak 9 ul kemudian dimasukkan ke PCR tube
6. DNA template yang merupakan hasil isolasi sebelumnya, diambil sebanyak 1 ul dan dimasukkan ke PCR tube yang telah berisi master mix.
7. PCR tube pada bagian tutup diberi kode sampel yang sesuai, kemudian seluruh PCR tube yang telah berisi DNA template dan *master mix* dimasukkan ke dalam *thermal cycler*.
8. Kondisi suhu, dan jumlah siklus reaksi PCR diatur sesuai dengan tujuan praktikum.

- Seluruh PCR tube yang telah berisi *DNA template* dan *master mix* dimasukkan ke mesin Veriti™ 96-well thermal cycler yang telah diatur kondisi siklus amplifikasinya.

Tahap	Suhu	Waktu
Predenaturasi°C
Siklus (....x) Denaturasi°C
<i>Anneling</i>°C
<i>Extention</i>°C
Final extension°C
Holding°C	∞

- Jalankan mesin amplifikasi dengan cara click *run*, tunggu hingga proses selesai.
- Setelah selesai, matikan mesin *thermal cycler* dari layar, serta matikan keseluruhan mesin dengan menekan tombol bagian belakang.
- Produk PCR dielektroforesis sesuai acara praktikum sebelumnya.
- Hasil elektroforesa dilihat dalam *Gel Logic 200 Imaging system*
- Perhatikan hasil visualisasinya, dan ukur panjang fragmen dengan membandingkan dengan *ladder* DNA yang digunakan.

LAMPIRAN

Tampilan Layar Mesin Thermal Cycler

