

MODUL PRAKTIKUM BIOLOGI MOLEKULER I



Disusun Oleh:

Fusvita Merdekawati S.ST, MM, M.Si
Anita Dwi Anggraini, S.ST, M.Si
Meutia Srikandi Fitria, S.Si, M.Biotech
Indah Sari, S.Si.T., M.Si
Kevin Giovani Pascoal, S.Si., M.Sc
Dr. Khoirul Anam, S.Si., M.Biomed
Reny Pratiwi, S.Si, M.Si, PhD

Reviewer:

Prof. Sri Darmawati, M.Si
Dr.rer.medic. Gabriella Gita Febriana, M.Res., S.Si



ASOSIASI INSTITUSI PENDIDIKAN TINGGI TEKNOLOGI
LABORATORIUM MEDIK INDONESIA (AIPTLMI)

2025

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur kita panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga Modul Praktikum Biologi Molekuler 1 ini dapat diselesaikan dengan baik. Biologi molekuler merupakan salah satu cabang ilmu yang sangat penting dalam perkembangan ilmu kesehatan modern, khususnya dalam mendukung pemeriksaan molekuler.

Modul ini dirancang untuk membekali mahasiswa dengan pemahaman dasar biologi molekuler sekaligus keterampilan praktis yang relevan dengan pemeriksaan molekuler di laboratorium kesehatan. Melalui praktikum, mahasiswa akan diperkenalkan pada teknik-teknik dasar seperti isolasi DNA, elektroforesis gel, serta prinsip analisis ekspresi gen. Penguasaan keterampilan ini merupakan pondasi penting untuk memahami dan mengembangkan metode diagnostik berbasis molekuler, misalnya PCR (*Polymerase Chain Reaction*), real-time PCR, serta berbagai teknik molekuler lain yang saat ini banyak digunakan dalam pemeriksaan klinis. Harapannya, modul ini bermanfaat untuk mengasah kompetensi mahasiswa dalam melakukan analisis laboratorium molekuler secara benar, akurat, dan sesuai standar.

Kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan kontribusi dalam penyusunan modul ini. Semoga modul ini dapat menjadi sarana pembelajaran yang bermanfaat, mendorong mahasiswa untuk berpikir kritis, serta memperkuat kapasitas tenaga laboratorium medik dalam menghadapi perkembangan ilmu dan teknologi kesehatan.

Wassalamualaikum Wr.Wb.

Jakarta, Agustus 2024

Ketua Umum AIPTLMI

Prof. Dr. Budi Santoso, M.Si.Med

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	1
DAFTAR ISI.....	2
BAB I DASAR-DASAR BIOLOGI MOLEKULER.....	3
BAB II MACAM-MACAM INSTRUMEN LABORATORIUM.....	20
BAB III SOLASI DNA METODE LIQUID PHASE (FENOL KLOOROFORM).....	29
BAB IV ISOLASI DNA METODE LIQUID PHASE (BOILING METHOD).....	41
BAB V ISOLASI DNA METODE MEKANIK (SONIKASI).....	46
BAB VI SOLASI ASAM NUKLEAT METODE SPIN COLUMN	53
BAB VII ISOLASI RNA METODE SOLID PHASE (MAGNETIC BEADS)	63
BAB VIII KUANTIFIKASI DAN KEMURNIAN ASAM NUKLEAT	70
BAB IX PEMERIKSAAN <i>Escherichia coli</i> DENGAN PCR KONVENSIONAL.....	77
BAB X PEMERIKSAAN HEPATITIS B DENGAN METODE REAL TIME PCR.....	86
BAB XI PEMERIKSAAN <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	97
BAB XII GEL ELEKTROFORESIS	109
BIODATA PENULIS.....	117

BAB I

DASAR-DASAR BIOLOGI MOLEKULER

Kompetensi Dasar : Mahasiswa mampu memahami dasar – dasar biologi molekuler

Indikator Capaian : Mahasiswa berhasil memahami dasar – dasar ilmu yang berkaitan dengan biologi molekuler

A. Konsep Dasar Biologi Molekuler

Sejarah biologi molekuler dimulai pada tahun 1930-an yang diawali dengan pertemuan berbagai disiplin ilmu biologi dan fisika beserta cabang ilmu lainnya seperti biokimia, genetika, mikrobiologi, virologi dan fisika. Biologi molekuler berperan dalam memahami kehidupan pada tingkat yang paling mendasar. Biologi molekuler merupakan cabang ilmu biologi yang mempelajari dasar molekuler dari aktivitas biologi di dalam dan di antara sel, termasuk sintesis, modifikasi, mekanisme dan interaksi molekuler. Dogma utama biologi molekuler menjelaskan proses di mana DNA ditranskripsikan menjadi RNA, kemudian diterjemahkan (translasi) menjadi protein (Jannah *et al.*, 2021).

Biologi molekuler memiliki cakupan yang cukup luas, pada awal perkembangannya. Biologi molekuler juga sulit dipisahkan dari biokimia dan merupakan ketimpangan. Akan tetapi sejak Biokimia mengkhususnya diri sebagai sebuah cabang ilmu biologi yang membahas mengenai reaksi-reaksi kimia yang terjadi di dalam sebuah sel atau pun makhluk hidup maka Biologi molekuler memiliki kesempatan untuk masuk ke dalam sebuah kesatuan ilmu tersendiri. Sebenarnya dari segi keterkaitan dengan cabang ilmu lain maka biologi molekuler bisa masuk ke dalam seluruh aspek selagi yang ditinjau berkaitan dengan DNA, RNA, asam amino atau protein.

Secara istilah biologi molekuler adalah ilmu yang membahas mengenai struktur, proses, dan mekanisme yang terjadi pada tingkat genomik, transkriptomik, dan proteomik. Secara garis besar Biologi molekuler dipisah berdasarkan kajian yang diamati yaitu genomik, transkriptomik dan proteomik. Genomik mempelajari seluruh materi genetik (*genom*) suatu organisme, termasuk struktur, fungsi, evolusi, dan pemetaan gen, yang menjadi dasar informasi biologis. Transkriptomik berfokus pada analisis transkrip RNA yang dihasilkan dari ekspresi gen, sehingga memberikan gambaran tentang gen mana yang aktif dalam kondisi atau jaringan tertentu. Sementara itu, proteomik mempelajari seluruh kumpulan protein yang dihasilkan oleh suatu sel atau organisme, mencakup kuantifikasi, modifikasi pasca-translasi, dan interaksi antarprotein. Ketiga dogma ini saling melengkapi untuk menggambarkan bagaimana informasi genetik dikonversi menjadi produk fungsional dan bagaimana respons biologis terjadi pada level molekuler.

Biologi Molekuler merupakan ilmu yang mempelajari sel baik pengertiannya maupun organella yang di dalam sel serta fungsinya sampai ke aras molekul penyusunnya. Biologi molekuler adalah ilmu multidisiplin karena mencakup biologi sel, biokimia, dan genetika. Perhatikan contoh sel penyusun membran plasma dan membran yang membungkus macam-macam organella, yang tersusun dari lipid bilayer (dua lapisan lemak) (Helwig *et al.*, n.d.).

Semua cabang makhluk hidup dapat ditinjau melalui biologi molekuler, disini kita ambil contoh kelainan diabetes mellitus, yang berkaitan dengan disfungsi atau resistensi insulin, diabetes bisa dilihat sebagai cabang ilmu kimia klinik kalau dikaitkan dengan diagnose, akan tetapi apabila dikaitkan dengan mutasi yang terjadi pada pasien diabetes mellitus maka hal tersebut akan masuk ke dalam bahasan biologi molekuler. Toxoplasma adalah gangguan kehamilan yang diakibatkan oleh protozoa apabila dikaitkan dengan morfologi dan tahapan organisme tersebut masuk ke dalam manusia sehingga mampu membuat gangguan kehamilan maka dapat dikategorikan sebagai bagian dari ilmu parasitologi, akan tetapi apabila dikaitkan dengan cara deteksi dengan menggunakan deteksi DNA pada pathogen maka bahasan ini masuk ke dalam ranah biologi molekuler (Mushlih, 2019).

Pengadaan DNA berkualitas tinggi dan utuh seringkali merupakan langkah pertama dan paling penting dalam banyak aplikasi biologi molekuler, seperti kloning DNA, sekuensing, PCR, dan elektroforesis. Pengisolasian keseluruhan DNA utuh dari berbagai macam sampel jaringan memiliki kesulitan yang berbeda karena tergantung dengan sifat fisik dan biokimia jaringan yang dituju. Sebagai contoh, banyak metode ekstraksi DNA akan bekerja dengan baik untuk jaringan seperti hati, tetapi cukup sulit dilakukan untuk jaringan jantung, jaringan lemak, otak, dan limpa. Isolasi yang paling umum dan mudah, khususnya isolasi genom pada hewan adalah menggunakan sampel darah atau cairan tubuh dari organisme tersebut (Puspitaningrum *et al.*, 2018).

B. Diagnostik Molekuler

Bidang diagnostik molekuler telah melihat banyak pertumbuhan dalam pengaturan klinis, memberikan pendekatan cepat dan sensitif untuk mendeteksi dan memantau berbagai macam penyakit manusia. Ada potensi yang sangat nyata untuk diagnostik molekuler untuk merevolusi perawatan pasien, menawarkan alat yang lebih jauh dari karakterisasi penyakit sederhana, menjangkau ke dalam domain karakterisasi pasien. Pendekatan diagnostik molekuler menggunakan teknik deteksi asam nukleat untuk menganalisis target DNA atau RNA. Tes berbasis molekuler dapat digunakan untuk mendeteksi berbagai kondisi klinis, seperti penyakit genetik bawaan, infeksi oleh agen penyakit menular, serta respons tubuh terhadap obat (farmakogenomik). Selain itu, tes ini juga berperan dalam pengembangan pengobatan yang dipersonalisasi dan penilaian prognosis penyakit, berdasarkan susunan genetik individu (*personalized medicine*). Hasil dari tes diagnostik molekuler

digunakan bersama dengan gejala yang disajikan dan keahlian klinis dari dokter yang melayani untuk lebih memahami etiologi penyakit, patogenesis, diagnosis dan prognosis.

Dalam menentukan metode diagnosis klinis yang tepat untuk mengetahui ada tidaknya infeksi pada manusia diperlukan pemeriksaan laboratorium. Salah satunya yaitu pemeriksaan mikroskopis dari sampel darah yang masih menjadi standar baku (*gold standard*) (Kementerian Kesehatan RI, 2018). Namun, pemeriksaan mikroskopis ini memiliki beberapa kelemahan yaitu memerlukan ketersediaan mikroskop cahaya yang memadai, tenaga pemeriksa yang terampil dan batas deteksi 50 - 100 parasit/ μ L darah. Dengan berkembangnya teknologi, saat ini diagnosis klinis berbasis Biologi Molekuler sudah mulai dikembangkan dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Siahaan, 2018; Herman *et al*, 2011). PCR merupakan proses biokimia yang menyalin dan amplifikasi template DNA dalam jumlah banyak menggunakan DNA polimerase yang stabil. Salah satu PCR yang biasa digunakan di laboratorium diagnostik yaitu *Real-Time* PCR (RT-PCR) (Lotfis, *et al*, 2014). *Real-Time* PCR memiliki beberapa keuntungan diantaranya yaitu memiliki kemampuan untuk memantau kemajuan reaksi PCR yang terjadi secara real-time, pembacaan secara langsung dengan menganalisis kurva Ct yang terbentuk, kemampuan untuk mengukur jumlah ampikon pada setiap siklus, lebih sensitif dan spesifik serta meminimalisir kontaminasi (BioRad, 2012). Pemeriksaan ini menjadi metode untuk mendeteksi *Plasmodium* sp. yang sensitif karena dapat mendeteksi level parasitemia yang sangat rendah dengan jumlah sedikit sampai dengan 1 - 5 parasit/ μ L (Herman *et al*, 2011).

Pemeriksaan laboratorium virus memerlukan komunikasi yang baik antara dokter dan tenaga laboratorium medik serta bergantung kepada kualitas spesimen dan informasi yang diberikan kepada laboratorium. Pilihan metode untuk konfirmasi laboratorium pada infeksi virus bergantung pada tahapan penyakit. Uji antibodi membutuhkan sampel yang diambil pada interval yang tepat, dan diagnosis seringkali tidak dapat dipastikan hingga masa konvalens. Isolasi virus atau deteksi antigen perlu dikerjakan ketika timbul epidemi baru, seperti pada kasus influenza ketika uji serologi tidak bermanfaat, dan ketika penyakit klinis yang sama dapat disebabkan oleh banyak agen yang berbeda. Sebagai contoh, meningitis aseptik (nonbakterial) dapat disebabkan oleh berbagai macam virus, serupa dengan hal ini sindrom penyakit pernafasan dapat disebabkan oleh berbagai macam virus serta mikoplasma dan agen lain (WHO, 2003).

Metode diagnostik berdasarkan teknik amplifikasi asam nukleat sebentar lagi akan menggantikan beberapa metode pemeriksaan, tetapi tidak semua teknik kultur virus. Akan tetapi, kebutuhan akan pengumpulan sampel dan interpretasi hasil uji yang baik tidak akan berubah. Lebih lanjut, akan ada saatnya ketika agen penyebab infeksi perlu diperoleh. Isolasi virus mungkin tidak dapat menetapkan penyebab suatu penyakit. Ada banyak faktor lain yang perlu diperhatikan. Beberapa virus bertahan hidup dalam penjamu manusia untuk jangka waktu yang lama, sehingga

isolasi herpesvirus, poliovirus, echovirus, atau koksavirus dari seorang pasien dengan penyakit yang tidak terdiagnosis tidak membuktikan bahwa virus tersebut merupakan penyebab penyakit. Pola klinis dan epidemiologi yang konsisten harus ditetapkan sebelum satu agen khusus dapat ditentukan sebagai penyebab atas munculnya gambaran klinis tertentu.

Diagnostik molekuler adalah suatu cabang dari diagnostik in vitro yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi penanda DNA dan produk turunannya pada manusia atau organisme lainnya. Melalui kemajuan sains dan teknologi terutama dalam teknologi diagnostik dan meningkatnya kesadaran masyarakat modern pada kesehatan dapat mempengaruhi perkembangan bidang diagnostik molekuler saat ini. Kemajuan bidang ini juga dipengaruhi oleh kemajuan teknologi biologi molekuler dimana secara teori kecenderungan penyakit tertentu seseorang dapat diketahui, sehingga dengan tersedianya teknologi seperti ini permintaan masyarakat terhadap test diagnostik juga semakin meningkat. Bila ditinjau dari efisiensi biaya dan kecepatan waktu yang ditawarkan maka jasa diagnostik molekuler suatu saat akan menjadi salah satu kebutuhan kesehatan yang menjadi rutin dalam masyarakat modern. Beberapa kelebihan diagnostik molekuler diantaranya adalah kecepatan dan hasil yang sangat spesifik (tepat), dapat mendeteksi sampai pada tingkat molekul DNA (gen), mendeteksi berbagai patogen yang tidak dapat di kultur, tersedianya data base membuat diagnostik menjadi jauh lebih baik, dan dilakukan dengan metoda yang tidak invasive sehingga dapat memberikan kenyamanan pada pasien yang bersangkutan. Diagnostik molekuler dapat digunakan untuk berbagai macam jenis diagnostik diantaranya :

1. Penyakit infeksi yang disebabkan oleh berbagai jenis patogen seperti bakteri, virus, jamur dan parasit.
2. Penyakit non-infeksi seperti kanker, penyakit degeneratif, penyakit kongenital dan kelainan genetis.
3. Non-penyakit seperti test DNA untuk keperluan identifikasi manusia
4. Material genetik lain seperti biomarker yang mempunyai hubungan dengan kesehatan.

1. Diagnostik Molekular Virus

Dengue merupakan suatu penyakit yang ditransmisikan oleh nyamuk yang hidup di daerah tropis dan subtropis. Pada beberapa tahun terakhir penyebarannya meningkat pada daerah perkotaan yang telah menjadi perhatian masalah kesehatan di dunia internasional. Insiden terjadinya Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue meningkat secara dramatis didunia selama beberapa dekade terakhir, lebih dari 2,5 milyar jiwa atau lebih dari 40 % dari populasi dunia yang mempunyai resiko terserang demam dengue. Berdasarkan data yang diperoleh, Asia Tenggara merupakan wilayah dengan jumlah kasus terbanyak, baik untuk kategori ringan maupun berat. Virus Dengue pertama kali

di isolasi oleh Hotta dkk selama perang dunia kedua yang berhasil mengisolasi virus type 1 dan 2. Kemudian pada saat terjadi wabah dengue di Manila ditemukan kembali DEN 3 dan DEN 4 oleh Hammon dkk. Dari keempat tipe serotipe tersebut secara epidemiologi sama namun terdapat perbedaan secara genetik dan antigen antara yang satu dan yang lain. Keempat serotipe tersebut dapat diklasifikasikan berdasarkan perbedaan genotipe berdasarkan variasi pada sekuens nukleotidanya. Di Indonesia, keempat serotipe virus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4) telah ditemukan beredar. Berdasarkan penelitian oleh Prastyowati dan rekan-rekannya, serotipe yang paling banyak ditemukan di wilayah Jawa Barat adalah **DENV-3**, yang disebut sebagai serotipe 3. Virus dengue dapat menyebabkan dua tipe infeksi yaitu primer dan sekunder. Infeksi primer terjadi jika demam akut yang dikenal sebagai demam dengue (*dengue fever*) yang akan hilang setelah kira-kira tujuh hari setelah terbentuk respon imun kompleks. Infeksi sekunder lebih berat dan menyebabkan demam berdarah dengue (DBD) atau *sindrom syok dengue* (DSS).

Demam berdarah dengue ataupun *Sindrom Syok Dengue* dapat berbahaya bagi penderita. Sampai saat ini belum ditemukan vaksin yang dapat menimbulkan kekebalan untuk 4 serotipe dengue secara lengkap, karena itu penelitian dan pengembangan vaksin serta diagnostik terus dilakukan untuk meningkatkan efektivitas pencegahan dan pengobatan penyakit ini. Karakteristik serotipe virus *dengue* perlu diketahui sejak dini untuk menentukan apakah virus yang menginfeksi termasuk varian yang memiliki faktor risiko menyebabkan *Demam Berdarah Dengue* (DBD) atau *Sindrom Syok Dengue* (SSD). Dengan menggunakan metode real time dapat mengetahui *serotipe dengue* dan dapat mengetahui perubahan epidemiologi dari infeksi yang terjadi.

Diagnostik yang ideal untuk *virus dengue* adalah metode yang mampu mendeteksi infeksi dengan cepat, akurat, dan dapat membedakan antara infeksi primer dan sekunder. Produk amplifikasi tersebut dapat dideteksi dengan *nested PCR*, *blot hybridization* dengan *probe*. Restriksi pada *site spesifik PCR amplicon* hasil PCR, sekuens analisis dan lain-lain. *Nested PCR* adalah teknik amplifikasi DNA yang menggunakan dua pasang primer dan dua tahap reaksi PCR untuk meningkatkan spesifisitas dan sensitivitas deteksi. Primer pertama digunakan untuk mengamplifikasi segmen target DNA secara umum, kemudian hasil amplifikasi tersebut menjadi template untuk reaksi PCR kedua yang menggunakan primer internal (lebih spesifik) terhadap segmen target. Teknik ini sangat berguna untuk mendeteksi jumlah DNA yang sangat rendah atau dalam sampel yang mengandung banyak kontaminan, seperti pada deteksi patogen termasuk *virus dengue*.

Blot hybridization seperti *Southern blot* untuk DNA atau *Northern blot* untuk RNA merupakan metode molekuler yang digunakan untuk mendeteksi sekuens spesifik asam nukleat. Proses ini melibatkan pemisahan fragmen DNA atau RNA melalui elektroforesis, transfer ke membran, dan hibridisasi dengan probe yang diberi label. Meskipun teknik ini sangat spesifik, penggunaannya lebih terbatas dalam diagnostik klinis karena waktu pengerjaan yang lebih lama dibanding teknik

amplifikasi. Seiring perkembangan teknologi, deteksi RNA virus seperti *dengue* kini lebih sering dilakukan menggunakan RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*) yaitu metode yang mengubah RNA virus menjadi cDNA melalui transkripsi balik, lalu mengamplifikasinya menggunakan PCR. RT-PCR memberikan hasil yang lebih cepat, sensitif, dan kuantitatif, serta menjadi standar dalam deteksi virus berbasis RNA. RT-PCR terbagi atas *one step* and *two step* RT-PCR. *One step* lebih menguntungkan karena lebih cepat, simpel, dan resiko kontaminasinya rendah dari pada *two step* RT-PCR. Tahap RT PCR terdiri dari :

1. Manajemen sampel : Sampel untuk pemeriksaan dapat berasal dari isolasi virus ataupun langsung dari serum pasien pada fase akut. Virus atau serum yang akan segera diperiksa dalam waktu kurang dari 24 jam sebaiknya disimpan pada suhu -4°C hingga -8°C untuk menjaga kestabilannya. Namun jika lebih dari 24 jam dilakukan penyimpanan sampel -70°C.
2. Ekstraksi RNA : RNA dipisahkan dari sampel serum atau isolasi virus dengan menggunakan suatu kit yang mempunyai carrier dan dapat mengikat RNA sehingga hasil ekstraksi RNA tersebut dapat digunakan. Ekstraksi RNA yang telah direhidrasi dapat disimpan pada suhu -70°C.
3. RT-PCR : Pemeriksaan ini diawali dengan mengubah RNA membentuk cDNA dengan enzim *reverse transkriptase*. Terdapat beberapa jenis enzim *reverse transkriptase* yang diketahui. Enzim reverse transkriptase adalah enzim yang digunakan untuk mengubah RNA menjadi DNA. Contoh jenis enzim reverse transkriptase antara lain HIV Reverse Transcriptase (RT), AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transcriptase, dan M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase. Enzim-enzim ini digunakan dalam proses transkripsi balik RNA menjadi DNA, seperti dalam teknik RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), yang sangat penting dalam penelitian molekuler dan diagnostik. Setelah terbentuk cDNA dilakukan PCR dengan langkah denaturasi, annealing primer dan elongasi. Proses sintesis cDNA dari RNA dilakukan melalui reaksi transkripsi balik pada suhu 50°C selama 30 menit, menggunakan enzim reverse transkriptase untuk mengubah RNA menjadi cDNA yang stabil dan dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut. Langkah-langkah PCR dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 15 menit, diikuti oleh siklus denaturasi pada 94°C selama 30 detik, annealing pada suhu 58°C selama 1 menit, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit.
4. Deteksi dan karakterisasi : Untuk mendeteksi dan mengkarakterisasi hasil amplifikasi, dilakukan elektroforesis pada gel agarose 2% dengan menggunakan alternatif pewarna yang lebih aman, seperti **SYBR Green** atau **GelRed**, yang dapat dipindai menggunakan UV transluminator dan dibandingkan dengan marker.

Selain virus seperti *dengue* yang merupakan penyebab utama penyakit infeksi di daerah tropis, agen infeksi lain yang juga penting untuk diperhatikan adalah bakteri. Bakteri memiliki kemampuan untuk menginvasi jaringan tubuh dan menimbulkan infeksi melalui mekanisme patogenitas, yaitu

kemampuan suatu mikroorganisme untuk menyebabkan penyakit (Silvia, 2018). Berbeda dengan virus yang membutuhkan sel inang untuk bereplikasi, bakteri dapat berkembang biak secara mandiri dan menghasilkan berbagai toksin atau enzim yang merusak jaringan tubuh. Pemahaman tentang karakteristik patogen bakteri ini penting dalam penegakan diagnosis dan penentuan terapi yang tepat pada kasus infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme non-virus (Silvia, 2018).

Bakteri berasal dari kata “*Bakterion*” yang berarti tongkat atau batang. Di masyarakat, bakteri dikenal dengan istilah kuman. Bakteri memiliki kemampuan bergerak dan berpindah tempat dengan bebas untuk menghindari penghancuran langsung oleh sistem imun inang, bersifat saprofitik, dan memiliki mekanisme untuk memasuki inangnya. Beberapa bakteri patogen yang berhasil menginfeksi sel inang dapat menyebabkan perubahan biokimiawi hingga kematian sel, seperti yang terjadi pada infeksi oleh *Listeria monocytogenes* atau *Shigella* spp., yang secara aktif merusak struktur sel selama proses penyebaran (Hartati dan Lestari, 2017).

Bakteri yang menyebabkan infeksi saluran pernafasan antara lain *Streptococcus grup A*, *Haemophilus influenzae tipe B*, dan *Streptococcus pneumoniae*, dan infeksi pada kulit umumnya dapat disebabkan oleh *Streptococcus grup A* atau *Staphylococcus aureus*, lalu infeksi pada pencernaan sering juga disebabkan oleh infeksi *Campylobacter*, *Shigella*, dan *Escherichia coli*, dan infeksi saluran urinaris sering disebabkan oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* dan *Proteus mirabilis* (Arie dkk, 2019). Terapi terhadap infeksi yang disebabkan oleh bakteri umumnya menggunakan antibiotik. Antibiotik berasal dari dua kata bahasa Yunani yaitu “anti” yaitu lawan dan “bios” yaitu hidup, dan bisa juga diartikan “melawan sesuatu yang hidup”. Antibiotik merupakan zat kimia yang berasal dari bakteri atau mikroorganisme lain dengan kemampuan mematikan atau menghambat pertumbuhan pada bakteri (Indriani, 2017; Farida dkk., 2017).

Umumnya antibiotik yang digunakan untuk terapi infeksi bakteri adalah golongan sefalosporin, antara lain cefadroxil, ceftriaxone, cefuroxim, cefazolin, cefixim, ceftazidime, dan cefotaksim. Golongan antibiotik ini sering digunakan daripada golongan antibiotik lainnya, dan seringnya penggunaan antibiotik ceftriaxone bisa mempengaruhi penyakit infeksi seperti pada sepsis, dan juga infeksi penyakit dalam. Pada antibiotik ceftriaxone memiliki spectrum luas dan dianggap mampu mengatasi kondisi infeksi (Rachmawati dkk, 2020).

Upaya peningkatan terapi atau pengobatan pasien terinfeksi bakteri resistan antibiotik dapat dilakukan dengan pemeriksaan diagnostik dalam laboratorium medis. Pemeriksaan ini sangat penting dilakukan dalam menegakkan sebuah diagnosa apakah seseorang terinfeksi agen bakteri patogen atau tidak dan apakah infeksi bakteri tersebut termasuk dalam strain yang resistan antibiotik atau tidak. Pada umumnya, laboratorium medis menggunakan teknik diagnostik konvensional seperti kultur dan mikroskopis untuk deteksi bakteri (Purnamasari, 2019).

Dalam perkembangannya terdapat teknik lain yang dapat diaplikasikan dalam uji diagnostik dalam laboratorium, yaitu metode molekuler. Metode molekuler merupakan aplikasi teknologi yang dapat mendiagnosis secara cepat dan tepat agen patogen yang menginfeksi tubuh. Salah satu teknologi ini adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Kajian pustaka ini disusun untuk memberikan gambaran tentang teknik diagnostik konvensional dan lanjutan untuk pemeriksaan infeksi bakteri dan identifikasi bakteri resistan antibiotik. Perbandingan teknik diagnostik yang disajikan berdasarkan perkembangannya, sehingga dengan adanya perbandingan tersebut dapat menjadi sebuah gambaran untuk uji diagnostik bagi pasien secara efektif dan efisien.

2. Diagnostik Molekular Bakteri

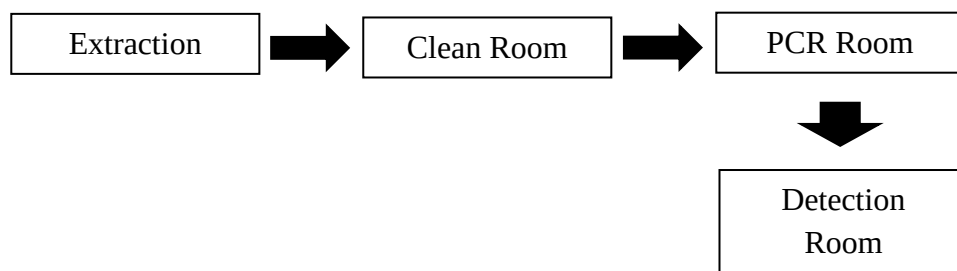
Materi genetik merupakan cetak biru kehidupan yang menentukan sifat-sifat fisik, biokimia, dan fisiologis makhluk hidup, termasuk bakteri. Pada bakteri, materi genetik berupa DNA tersusun dari nukleotida yang menyimpan informasi penting untuk replikasi, metabolisme, dan patogenitas. Informasi genetik ini kini dimanfaatkan dalam berbagai aplikasi, seperti identifikasi spesies bakteri, analisis hubungan filogenetik, dan deteksi keberadaan gen virulensi atau resistensi antibiotik. Melalui teknik molekuler seperti PCR dan sekuensing gen 16S rRNA, kita dapat mengidentifikasi dan mengklasifikasi bakteri dengan akurasi tinggi, bahkan untuk spesies yang sulit dibudidayakan di laboratorium. Dengan demikian, pemahaman terhadap materi genetik bakteri sangat penting dalam bidang mikrobiologi klinis, bioteknologi, dan epidemiologi.

Gelatinase adalah kelompok protease yang termasuk dalam metalloprotein ekstraselular atau metalproteinase yang mampu menghidrolisis gelatin dan senyawa lainnya misalnya feromon, kolagen, kasein dan fibrinogen. Gelatinase merupakan enzim penting yang penggunaannya tidak hanya pada industri kimia dan kedokteran saja, tetapi juga dalam bidang pangan dan ilmu biologi (Boran dan Regenstein 2010). Gelatinase dibagi menjadi dua tipe yaitu Gelatinase A(MMP-2) dan Gelatinase B(MMP-9) (Xin et al.2015). MMP-2 dan MMP-9 dikenal pertama kali sebagai kolagenase tipe IV berdasarkan pada aktivitasnya yang berlawanan dengan kolagen tipe IV pada membrane. Enzim gelatinase yang berasal dari mikroorganisme mampu menghidrolisis gelatin menjadi komponen-komponen seperti polipeptida, peptide, dan asam amino. Bakteri-bakteri diantaranya *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* dan *Serratia marcescens* diketahui mampu menghasilkan enzim gelatinase.

Mikroorganisme endofit mangrove dilaporkan dapat memproduksi metabolit Unik dan berguna untuk keperluan industri sehingga berpotensi untuk diisolasi sebagai penghasil gelatinase. Mikroorganisme endofit merupakan organisme hidup berukuran mikroskopis (bakteri dan jamur) yang hidup dalam jaringan tanaman (*xylem* dan *phloem*) daun, akar, buah, dan

batang. Bakteri endofitik adalah bakteri yang berada di dalam jaringan tanaman tanpa merugikannya secara substansial (Christina *et al.* 2013). Bakteri endofit ditemukan pada hampir semua jenis tanaman. Penelitian pada keragaman bakteri endofit mangrove menunjukkan bahwa tumbuhan mangrove merupakan sumber yang kaya bakteri endofit. Bakteri-bakteri yang telah berhasil diisolasi adalah *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* dan *Azospirillum* (Ryan *et al.* 2008; Reinhold-Hurek dan Hurek 2011).

C. Alur Kerja Deteksi Molekuler



Gambar 1.1. Skema Alur Kerja Deteksi Molekuler Laaboratorium Biologi Molekuler

Keterangan:

1. Clean Room : Ruangan untuk mempersiapkan Master Mix
2. Extraction Room : Ruangan khusus untuk ekstraksi DNA atau RNA dari sampel klinis dan memasukan template DNA atau RNA menggunakan mikropipet
3. PCR Room : Ruangan untuk mengamplifikasi DNA atau RNA menggunakan mesin PCR
4. Detection Room : Ruangan untuk mendeteksi dan menganalisa hasil PCR (elektroforesis menggunakan gel agarose).

Kegiatan Praktikum:

Dasar Teori : Sampel DNA dapat diperoleh dari berbagai sumber biologis, seperti folikel akar rambut yang mengandung sel dengan inti yang mengandung DNA, serta dari sampel klinis seperti dahak untuk mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), penyebab utama tuberkulosis (TBC). Tes Cepat Molekuler (TCM) digunakan untuk mendeteksi keberadaan DNA MTB dalam sampel dengan prinsip kerja amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR untuk menargetkan gen spesifik MTB, seperti gen *rpoB* yang terkait dengan resistensi rifampisin. Proses ini mencakup ekstraksi DNA, amplifikasi menggunakan primer spesifik, dan deteksi hasil amplifikasi untuk menentukan apakah sampel positif MTB serta apakah terdapat mutasi yang menunjukkan resistensi terhadap obat. Hasil dari TCM kemudian dianalisis untuk mengetahui status infeksi dan sensitivitas terhadap obat, yang membantu dalam penentuan pengobatan yang tepat.

: Preparasi Sampel Dahak

Pemeriksaan

Metode : Tes Cepat Molekuler (TCM)

Alat dan Bahan : Alat

1. Biosafety Cabinet
2. Biocontainment centrifuge
3. Tabung konikal/screw-capped tube steril
4. Pipet
5. Mikro tips steril berfilter
6. Spidol marker permanen

Bahan

1. Sampel (contoh dahak)
2. Kartrid
3. Disinfektan
4. APD

Cara Kerja :

1. Beri label identitas pada setiap kartrid. Identitas spesimen dapat ditempel atau ditulis pada bagian sisi kartrid. JANGAN memberikan label pada bagian barcode.

2. Bukalah penutup pot dahak, tambahkan Sample Reagent yang sudah tersedia sebanyak 2 kali volume spesimen. Komponen-komponen yang ada dalam sampel reagent adalah buffer lisis yang memecah sel dan melepaskan asam nukleat, detergen seperti SDS untuk melarutkan membran sel, protease untuk mendegradasi protein yang terkait dengan asam nukleat, serta RNase inhibitor untuk mencegah degradasi RNA. Selanjutnya campur Sample Reagent dengan spesimen, kocok, dan inkubasi.
3. Masukkan spesimen ke dalam kartrid.
4. Masukkan kartrid yang sudah berisi spesimen ke dalam alat TCM GeneXpert®.
5. Tutup kembali pot dahak, kemudian kocok dengan kuat sampai campuran dahak dan Sample Reagent menjadi homogen.
6. Diamkan selama 10 menit pada suhu ruang.
7. Kocok kembali campuran, lalu diamkan selama 5 menit.
8. Bila masih ada gumpalan, kocok kembali agar campuran dahak dan Sample Reagent menjadi homogen sempurna dan biarkan selama 5 menit pada suhu kamar.
9. Buka penutup kartrid, kemudian buka tempat penampung spesimen. Gunakan pipet yang disediakan untuk memindahkan spesimen dahak yang telah diolah sebanyak 2 ml (sampai garis batas pada pipet) ke dalam kartrid secara perlahan-lahan untuk mencegah terjadinya gelembung yang bisa menyebabkan eror.
10. Tutup kartrid secara perlahan dan masukan kartrid ke dalam alat TCM GeneXpert®.

Evaluasi

1. Apakah hasil yang terjadi jika proses sentrifugasi dilakukan terlalu lama?
2. Apa yang terjadi jika sampel reagent (SR) tidak ditambahkan dalam sampel pada proses preperasi sampel pemeriksaan TCM?
3. Sebutkan kekurangan dan kelebihan metode Tes Cepat Molekuler pada pemeriksaan bakteri *Tuberculosis*!

**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

Kegiatan Praktikum:

Dasar Teori : Preparasi sampel rambut untuk isolasi DNA memerlukan prosedur yang hati-hati untuk memastikan kualitas dan kuantitas DNA yang optimal. Folikel akar rambut merupakan sumber utama DNA dalam rambut, karena di bagian ini terdapat sel-sel hidup yang mengandung inti dan materi genetik. Prosedur dimulai dengan pemilihan rambut yang memiliki folikel yang utuh, karena rambut yang hanya terdiri dari batang (tanpa folikel) tidak mengandung DNA. Folikel akar rambut kemudian dipisahkan dengan hati-hati menggunakan pinset atau alat steril lainnya untuk menghindari kontaminasi. Setelah itu, rambut yang telah disiapkan direndam dalam larutan buffer yang mengandung agen pemecah sel (seperti lisozim atau proteinase K) untuk memecah dinding sel dan memisahkan DNA dari komponen seluler lainnya.

Setelah pemecahan sel, DNA diekstraksi menggunakan metode seperti kit ekstraksi DNA atau prosedur manual yang melibatkan penggunaan bahan kimia seperti fenol-kloroform atau CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*). DNA yang telah terisolasi kemudian diukur kualitas dan kuantitasnya dengan spektrofotometer atau menggunakan alat yang lebih sensitif seperti fluorometer. Preparasi sampel yang baik sangat penting agar DNA yang diperoleh memiliki kualitas tinggi dan bebas dari kontaminasi yang dapat mengganggu hasil analisis genetik selanjutnya, baik untuk identifikasi individu, penelitian genetik, atau aplikasi forensik.

Metode :

Alat dan Bahan : **Alat**

1. Biosafety Cabinet
2. Tabung Eppendorf
3. Refrigerated Centrifuge
4. Vortex
5. Mikropipet
6. Inkubator

Bahan

1. Sampel rambut
2. Larutan A (200mM NaOH):
 - 1M NaOH = 2 ml

- MilliQ = 8 ml
3. Larutan B (200mM HCl, 100mM Tris HCl, pH 8,5):
 - 1 M Tris HCl pH 8,5 = 1 ml
 - Concentrated HCl = 167 μ l
 - MilliQ = 8,843 ml
 4. Buffer H
 - 1x buffer PCR (ambil 10 ml)
 - Proteinase K, dengan konsentrasi 100 μ g/ml (ambil 1 ml proteinase 10 mg/ml)
 - Tween 20 0,5% (ambil 0,5 ml)
 - Tambahkan MilliQ hingga volume mencapai 100 ml dan simpan di freezer (suhu -20°C).
 5. 3M Sodium Acetat (pH 4,8-5,2)
 6. Etanol Absolut
 7. Larutan TE

Cara Kerja :

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

- Cara 2
 1. Potong 10-20 folikel rambut 3-5mm dengan menggunakan gunting steril dan masukkan ke dalam eppendorf 1,5 ml.
 2. Tambahkan 50 μ l buffer H ke dalam tabung eppendorf.
 3. Sentrifugasi sebentar agar folikel mengumpul di dalam buffer H.
 4. Inkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit.
 5. Inkubasi pada suhu 95-100°C selama 10 menit agar proteinase K inaktif.
 6. Sentrifugasi sebentar agar larutan yang menguap dan menempel di dinding atau tutup eppendorf turun ke bawah.
 7. Simpan pada suhu -20°C.

Evaluasi

1. Apakah ada perbedaan hasil dari preparasi sampel rambut antara cara 1 dan cara 2?
2. Sebutkan dan jelaskan fungsi Proteinase K pada tahap preparasi sampel!
3. Apa yang terjadi jika tahap sentrifugasi terlalu lama pada tahap preparasi sampel?
4. Mengapa pada cara 2 pada akhir perlakuan proteinase K di inaktifkan?

Jawaban

**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Jannah, M., Sari, N. K., Mushlih, M., Rifqi, M., Priyambodo, Pratiwi, R. H., Priyono, D. S., Rubiyana, Y., Praningrum, P., Rahayu, D. A., Andriyono, S., & Awwanah, M. (2021). Metode Biologi Molekuler. In *Widina Bhakti Persada Bandung*.
- Mushlih, M. (2019). Buku Ajar Mata Kuliah Biologi Molekuler “Aplikasi Dasar Di Dunia Kesehatan.” *Buku Ajar Mata Kuliah Biologi Molekuler “Aplikasi Dasar Di Dunia Kesehatan.”* <https://doi.org/10.21070/2019/978-623-6081-07-5>
- Puspitaningrum, R., Adhiyanto, C., & Solihin. (2018). Genetika Molekuler dan Aplikasinya. *Genetika Molekuler Dan Aplikasinya*, 75.
- Bruce, B.(Eds.). 1997.Genome Analysis, a laboratory manual.vol 1 (Analyzing DNA). USA:Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Amtarina R .2009. Organisasi genom dan varian molekuler human Papillomavirus tipe 16 sebagai penyebab karsinoma serviks.
- Ahmad, A. 2014. Bioteknologi dasar. Makassar: Universitas Hasanuddin. "Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities," Gel Electrophoresis Principles and Basics.
- Hasdianah, dkk. 2014. Imunologi: Diagnosis dan teknik biologi molekuler. Yogyakarta: Nuha Medika.
- <https://ejournal.unhi.ac.id/index.php/widyabiologi/article/view/2143>
- <http://repo.uinsatu.ac.id/id/eprint/15776> \
- <https://juke.kedokteran.unila.ac.id/index.php/JK/article/view/1645>

BAB II

MACAM-MACAM INSTRUMEN LABORATORIUM

Kompetensi dasar : Mahasiswa mampu memahami instrument laboratorium pada pemeriksaan biologi molekuler

Indikator Capaian : Mahasiswa berhasil mengoperasikan instrument laboratorium pada pemeriksaan biologi molekuler

A. Instrumen Laboratorium

1. Biosafety Cabinet level 2



Gambar 2.1 Biological Safety Cabinet level 2

Fungsi dari biosafety cabinet level 2 adalah memberikan perlindungan bagi pengguna, lingkungan, dan produk yang sedang dikerjakan. Perlindungan dapat dicapai dengan cara mempertahankan aliran udara ke dalam melalui *front opening* dan mencegah kontaminasi keluar. Udara yang ada di dalam akan disaring melalui filter HEPA sebelum disirkulasi ulang dan dibuang, serta memastikan lingkungan yang steril (Kruse *et al.*, 1991).

Prinsip kerja dari alat ini adalah aliran udara ke dalam, filtrasi HEPA, aliran udara laminar ke bawah, penyaringan udara buang, tekanan negatif, dan perlindungan untuk pengguna, lingkungan, dan produk. Aliran udara ke dalam yang dimaksud adalah udara ruangan ditarik ke dalam cabinet melalui *front opening*, menciptakan penghalang yang mencegah kontaminasi keluar. Filtrasi HEPA (*High-Efficiency Particulate Air*) yang dimaksud adalah semua udara baik

udara yang masuk maupun udara yang disirkulasi ulang, disaring melalui filter HEPA, yang menghilangkan 99,97% partikel, termasuk pathogen. Aliran udara laminar ke bawah adalah sebagian udara yang disaring HEPA disirkulasi ulang ke area kerja sebagai aliran udara laminar ke bawah, melindungi sampel dari kontaminasi. Udara buang akan disaring dengan HEPA sebelum dilepaskan ke luar atau kembali ke ruangan sehingga melindungi lingkungan. BSC level 2 dirancang untuk mempertahankan tekanan negative, yang berarti tekanan udara di dalam lebih rendah daripada udara ruangan di sekitarnya, sehingga mencegah kontaminasi masuk ke dalam cabinet. Desain pada BSC memastikan bahwa pengguna terlindungi dari bahaya biologis, lingkungan terlindungi dari kontaminasi, dan produk yang sedang dikerjakan akan tetap steril (Ta *et al.*, 2018).

2. Laminar air flow



Gambar 2.2 Laminar Air Flow

Laminar aif Flow (LAF) adalah meja kerja steril yang mengalirkan udara bersih secara terus menerus. LAF digunakan untuk menjaga kebersihan dan keamanan dalam proses dan percobaan. Prinsip kerja dari LAF adalah menciptakan aliran udara yang teratur dan searah, tanpa pencampuran antara udara bersih dan kotor (KAN, 2025).

3. PCR Konvensional



Gambar 2.3. Thermocycler

Alat ini sering disebut sebagai thermocycler. Alat ini berfungsi untuk menggandakan DNA yang spesifik menggunakan aktifitas enzim. Prinsip dari thermocycler adalah metode untuk amplifikasi potongan secara in vitro pada bagian spesifik yang dibatasi oleh dua primer oligonukleotida yaitu primer Forward dan Reverse. Proses dari thermocycler mirip dengan replikasi DNA yang bersifat semi konservatif. Tahapan dari alat thermocycler seperti denaturasi, annealing, dan ekstensi dilakukan pengulangan sesuai dengan jumlah siklusnya. Jumlah siklus pada alat ini berkisar antara 30-40. Alat ini digunakan setelah proses ekstraksi DNA dan uji konsentrasi serta kemurnian DNA.

4. Refrigerated centrifuge

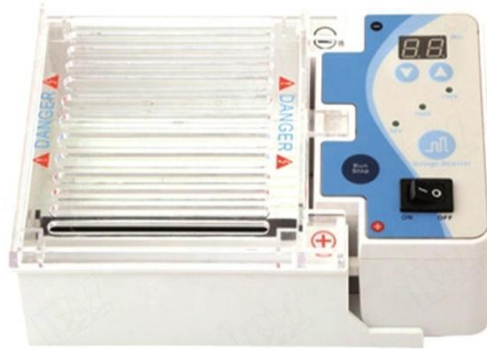


Gambar 2.4. Refrigerated centrifuge

Alat ini berfungsi untuk memisahkan suatu senyawa yang memiliki berat molekul yang berbeda dengan memanfaatkan gaya sentrifugal yang dilengkapi dengan system suhu. Suhu dingin diperlukan

untuk menjaga stabilitas sampel seperti darah atau urine. Alat ini penting untuk proses ekstraksi DNA dan protein karena proses tersebut banyak melibatkan pemisahan untuk memperoleh DNA murni.

5. Elektroforesis gel agarose



Gambar 2.5. Elektroforesis gel agarosa

Elektroforesis gel agarose merupakan alat yang berfungsi untuk memisahkan DNA berdasarkan panjang pasang basa. Prinsip kerja dari alat ini adalah pergerakan molekul atau ion bermuatan dalam media semi padat di bawah pengaruh medan listrik. DNA yang bermuatan negatif akan menuju ke kutub positif, sehingga dapat dipisahkan DNA berdasarkan panjangnya. Elektroforesis dapat digunakan untuk menentukan ukuran DNA menggunakan DNA marker yang ukurannya sudah diketahui sebelumnya (Yuwono, 2006).

6. Microvolume spektrofotometer



Gambar 2.6. Micovolume Spektrofotometer

Alat ini memiliki fungsi untuk menghitung konsentrasi DNA, RNA dan protein serta mengetahui kemurniannya berdasarkan nilai absorbansi dari sinar UV. Prinsip kerja alat ini adalah DNA murni mampu menyerap cahaya UV karena adanya basa purin dan pirimidin (Fatchiyah et al,

2011). Nanodrop menghitung kebanyakan asam amino triptofan dan fenilalanin, dan membuat estimasi untuk frekuensi rata-rata pada asam amino yang ada dalam protein. DNA dan RNA memiliki kualitas yang baik berdasarkan uji menggunakan nanodrop yang memiliki nilai absorbansi sekitar 1,8-2,0 pada rasio panjang gelombang 260/280 dan konsentrasi diatas 100 ng/ μ L. Pada A260 yang terserap adalah asam nukleat (DNA dan RNA) dan A280 nm yang terserap adalah protein (Hikmatyar et al, 2015). Nilai yang menunjukkan absorbansi dibawah 1,8 menunjukkan kontaminasi protein dan polisakarida. Sedangkan nilai lebih dari 2,0 menunjukkan kontaminasi asam nukleat (DNA apabila yang dicek protein, RNA apabila yang dicek DNA) (Fatchiyah et al., 2016).

7. UV transilluminator



Gambar 2.7. UV transilluminator

Alat ini berfungsi untuk memvisualisasikan DNA setelah dirunning dalam DNA elektroforesis dengan bantuan sinar UV. Prinsip dari alat ini adalah sinar UV akan membuat pita DNA berpendar sehingga akan terlihat dengan mata dan dapat diamati hasilnya.

8. Sonikator



Gambar 2.8. Sonikator

Sonikator adalah perangkat yang menggunakan energi gelombang ultrasonik atau ultrasound untuk mengganggu sel, memecah bahan, mencampur komponen, dan mempercepat reaksi kimia. Prinsip kerja sonikator adalah menggunakan energi gelombang ultrasonik yang menciptakan perubahan tekanan cepat di dalam cairan, yang mengakibatkan pembentukan dan runtuhnya

gelembung kecil (kavitasi). Kavitasi akan menghasilkan gaya mekanis yang dapat memecah sel, menghancurkan sel, atau menghomogenkan campuran.

Kegiatan Praktikum:

Pemeriksaan : Pengenalan Alat Biologi Molekuler

Metode :

Alat dan Bahan : Alat

1. Biosafety Cabinet level 2
2. Laminar Air Flow
3. PCR Konvensional
4. Refrigerated Centrifuge
5. Elektroforesis Gel Agarose
6. Microvolume Spektrofotometer
7. UV transilluminator
8. Sonikator

Bahan

1. Jas Laboratorium
2. Handscone
3. Masker
4. Tissue

Cara Kerja

1. Alat dikenalkan fungsi dan prinsip kerjanya
2. Cara kerja alat dijelaskan semuanya

Evaluasi

1. Apa prinsip dari alat elektroforesis agarose?
2. Alat apa saja yang digunakan untuk proses ekstraksi DNA?
3. Apa alat yang digunakan untuk proses elektroforesis DNA

Jawaban

**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Böhmer, D., Repiská, V., & Danišovi, L. (2010). *Introduction To Medical And Molecular Biology*.
- Kruse, R.H., Pucket, W.H., and Richardson, J.H. 1991. Biological Safety Cabinetry. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 207-241.
- Pei, R., Vicente-Venegas, G., Tomaszewska-Porada, A., Van Loosdrecht, M. C. M., Kleerebezem, R., & Werker, A. (2023). Visualization of Polyhydroxyalkanoate Accumulated in Waste Activated Sludge. *Environmental Science and Technology*, 57(30), 11108–11121. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c02381>
- Ta, L., Gosa, L, and Nathanson, D.A. 2018. Biosafety and Biohazards: Understanding Biosafety Levels and Meeting Safety Requirements of a Biobank. [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8935-5_19 diakses tanggal 12 April 2025]
- Hikmatyar, M.F., Royani, J.I., Dasumiati. 2015. Isolasi dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) Untuk identifikasi Keragaman Genetik, *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 2(2), 42-48
- Fatchiyah, E.L., Suhartanto, M.R., Santosa, E. 2016. Biologi Molekuler: Prinsip dasar analisis. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- KAN, 2025. Laminar air Flow. [<https://www.biosafetycabinet.co.id/laminar-air-flow/#:~:text=Laminar%20Air%20Flow%20adalah%20meja,lain%20dalam%20kultur%20in%20vitro>. Diakses tanggal 12 April 2025]

BAB III

SOLASI DNA METODE LIQUID PHASE (FENOL KLOOROFORM)

- Kompetensi Dasar** : Mahasiswa mampu melakukan ekstraksi DNA dari sampel biologis
- Indikator capaian** : Mahasiswa berhasil mengisolasi DNA dengan kemurnian dan kuantitas yang memadai untuk analisis lebih lanjut

A. Konsep Isolasi Asam Nukleat

Isolasi asam nukleat merupakan langkah yang sangat penting dalam Biologi Molekuler, Bioteknologi, Biokimia, Kedokteran laboratorium, dan pemeriksaan lainnya karena hasil diagnostik molekuler tergantung pada kualitas asam nukleat yang dihasilkan dari proses isolasi. Selain itu, penting untuk memperhatikan teknik pengerjaan metode isolasi agar proses isolasi DNA dilakukan secara efektif dari berbagai spesimen seperti darah, jaringan hewan, sel kultur, jaringan tanaman serta spesimen biologis (Shin, 2013).

Secara umum proses isolasi asam nukleat memiliki tiga prinsip utama yang harus dilewati, yaitu pemecahan dinding sel (lisis), ekstraksi DNA, dan purifikasi/pemurnian DNA. Prinsip isolasi DNA dapat dibagi menjadi 3 tahapan utama (Chomczynski & Sacchi, 2006), yaitu:

1. Pemecahan sel atau jaringan (lisis)

Tahapan ini bertujuan untuk mengeluarkan isi sel. Tahap pemecahan sel atau jaringan memiliki beberapa cara yakni dengan cara fisik, kimiawi, dan enzimatis, pertama pelisisan sel secara fisik seperti menggerus sampel dengan menggunakan *mortar* dan *pestle* dalam nitrogen cair atau dengan menggunakan metode *freezing-thawing*. Kedua pelisisan sel dengan cara kimiawi yaitu dengan memanfaatkan senyawa kimia atau *buffer* lisis yang dapat merusak integritas dinding sel. Bahan yang dapat digunakan untuk pelisisan sel yakni detergen yang dapat melarutkan lipid pada membran sel sehingga terjadi destabilisasi membran sel. Ketiga cara enzimatis seperti proteinase K dan prosedur enzimatis lainnya dapat melisiskan membran sel darah dan memecah protein globular dan rantai polipeptida (Nurhayati & Darmawati, 2018).

2. Pemisahan DNA/DNA Separation

Tahap ekstraksi pada uji molekular PCR dinilai sangat penting, dimana tahap tersebut dilakukan untuk mendapatkan DNA dengan konsentrasi dan kemurnian yang tinggi (Wulansari, N, et al., 2015). Tahap ini bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen penyusun sel lainnya. Ekstraksi dapat dilakukan menggunakan reagen yang mengandung detergen (misalnya SDS atau sarkosil), larutan yang mengandung NaCl dan berbagai buffer (biasanya Tris acetate EDTA buffer (TAE buffer) atau buffer fosfat pH 7/8).

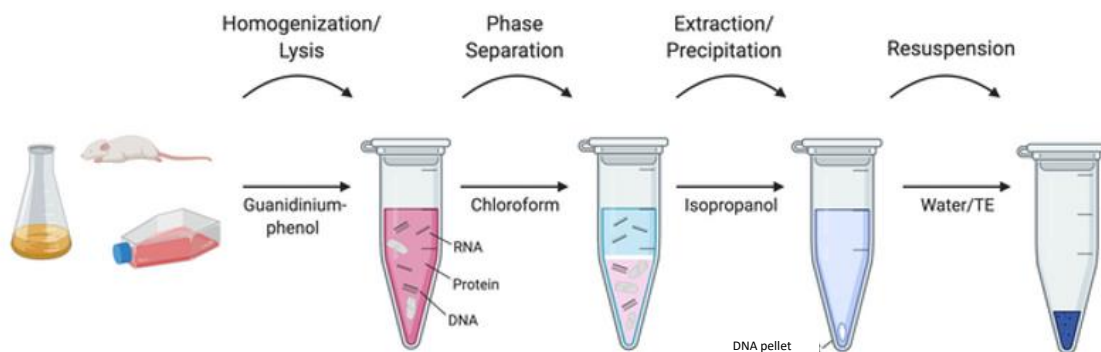
3. Purifikasi/pemurnian DNA

Tahap purifikasi DNA bertujuan untuk membuang komponen-komponen sel lainnya dari DNA. Tahap ini dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu bahan kimia, seperti fenol, kloroform, isoamilalkohol, dan isopropanol. Selain bahan-bahan tersebut dalam proses pemurnian, enzim proteolitik (proteinase K) dan RNase digunakan untuk menghilangkan kontaminasi sisa-sisa protein dan RNA dari DNA (Puspitaningrum et al., 2018).

B. Metode Isolasi DNA (Liquid phase)

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk mengisolasi asam nukleat yaitu metode liquid phase, metode mekanik dan metode solid phase. Ekstraksi metode liquid phase dapat dilakukan dengan teknik *osmotic shock*, *enzymatic digestion*, deterjen dan *alkali treatment*, sedangkan untuk ekstraksi metode mekanik dapat dilakukan dengan cara homogenisasi (mata pisau atau alu), ultrasonikasi atau sonikasi, *pressure cell* (“*French press*”) dan *Ball mill*. Metode solid phase dapat dilakukan dengan menggunakan teknik kolumn dan *magnetic beads* (Ali dkk, 2017).

Metode Liquid phase (metode ini menggunakan larutan untuk memisahkan DNA). Salah satu metode yang umum digunakan untuk ekstraksi DNA adalah Fenol kloroform/Trizol. Metode fenol kloroform saat ini masih digunakan. Proses pemisahan DNA meliputi penggojokan kuat dengan larutan fenol-kloroform dan sampel diikuti dengan sentrifugasi. Fenol tidak sepenuhnya menghalangi aktivitas dan dapat mengisolasi DNA dengan kombinasi kloroform dan alkohol (Farchiyah dkk., 2016). Setelah sentrifugasi, akan terpisah menjadi tiga bagian yaitu bagian atas (aqueous) terdiri dari DNA dan RNA, bagian tengah (interphase) berisi sisa dari fenol, bagian bawah (organic) terdiri dari protein, debris sel, dan lemak. DNA dapat dipisahkan dengan menggunakan etanol absolut atau isopropanol dengan konsentrasi garam tinggi. Setelah itu dicuci dengan etanol 70% untuk menghilangkan etanol absolut atau isopropanol. Proses terakhir adalah mengoleksi dengan cara melarutkan DNA dengan TE buffer atau akuades (Buckingham & Flaws, 2007).



Gambar 2.1. Tahapan Ekstraksi DNA (fenol-kloroform) (Geneaid, 2020)

Kegiatan Praktikum:

Pemeriksaan : Isolasi DNA Kromosom Bakteri

Metode : Fenol Kloroform

Alat dan Bahan : Alat

1. Tabung reaksi
2. Sentrifuge dingin
3. Tabung conical
4. Vortex
5. Rotator
6. Mikrotube (tabung ependorf)
7. Waterbath
8. Mikropipet

Bahan

1. Koloni bakteri pada media plate
2. Media BHI
3. Buffer lysis Bakteri
 - 100 mM Tris HCl pH 8
 - 100 mM NaCl
 - 50 mM EDTA
 - 2% SDS
4. Proteinase K (10 mg/ml)
5. Phenol / Phenol CIAA (Chloroform Iso Amyl Alcohol)
6. Ethanol 96%
7. Ethanol 70%
8. TE (Tris EDTA)
 - 10 mM Tris HCl pH 7,4
 - 1 mM EDTA

Cara Kerja

1. Tumbuhkan satu koloni bakteri dalam 15 ml BHI, diinkubasi pada suhu 37°C semalam.
2. 15 ml suspensi bakteri disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm, 15 menit pada suhu 4°C.
 - a. **Untuk Gram Positif**

1. Sel disuspensi dalam 480 µl 50 mM EDTA.
2. Ditambahkan 120 µl enzim lyzozim.
3. Diinkubasi 37°C selama 30-60 menit.
4. Disentrifuge selama 2 menit percepatan 13000-16000 rpm dan supernatant dibuang.
5. Lanjut ke step lisis sel.

b. Untuk Gram Negatif

Lanjut ke step lisis sel

c. Step Lisis Sel

1. Supernatant dibuang, pellet ditambah 750 µl buffer lysis, di vortex.
2. Tambahkan 20 µl (10 mg/ml) proteinase K.
3. Gojog kuat-kuat selama 15 menit.
4. Inkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit (setiap 10 menit dihomogenkan/di gojog).
5. Sentrifuge pada kecepatan 3000 rpm, selama 15 menit pada suhu 4°C.
6. Pindahkan supernatant pada mikrotube 1,5 ml.
7. Tambahkan phenol 700 µl.
8. Gojog pelan-pelan selama 30 menit.
9. Sentrifuge 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.
10. Pindahkan lapisan atas ke dalam mikrotube 1,5 ml.
11. Tambahkan ethanol 96% dingin, 1:1 atau 1:2.
12. Campur pelan-pelan hingga timbul benang-benang halus (benang-benang DNA).
13. Ambil benang-benang DNA, pindahkan ke mikrotube lain.
14. Cuci dengan 500 µl ethanol 70%, dengan cara di sentrifuge 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C sebanyak 2-3 kali.
15. Supernatant dibuang, pellet dikering anginkan
16. Tambahkan TE, 200 µl untuk melarutkan DNA
17. Ukur konsentrasi dan kemurnian DNA.
18. DNA dapat digunakan untuk PCR dsb, atau disimpan pada freezer.

**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

Kegiatan Praktikum:

Pemeriksaan : Isolasi DNA Darah

Metode : Fenol Kloroform

Alat dan Bahan : Alat

1. Tabung reaksi
2. Sentrifuge
3. Sentrifuge dingin
4. Tabung conical ukuran 15 mL
5. Pipet tetes
6. Mikropipet
7. Rotator
8. Mikrotube ukuran 1,5 mL (tabung ependorf)

Bahan

1. Darah (Whole Blood dan Darah EDTA)
2. EDTA
3. Buffer lysis Darah
 - 10 mM Tris HCl pH 8
 - 100 mM NaCl
 - 1 mM EDTA pH 8
 - 0,5% SDS
4. Proteinase K (10 mg/ml)
5. Phenol
6. Ethanol 96%
7. Ethanol 70%
8. TE (Tris EDTA)

Cara Kerja

A. Sampel Darah EDTA

1. Sebanyak 10-20 ml darah perifer ditambah antikoagulan heparin atau EDTA, di sentrifuge pada 3000 rpm selama 15 menit.
2. Pisahkan plasma, ambil buffycoat dengan hati-hati menggunakan pipet tetes atau mikropipet, letakkan pada tabung konikal 15 ml.
3. Tambahkan buffer lysis hingga 2 ml dan Proteinase K sebanyak 20 µl, gojog kuat-kuat selama 60 menit.

4. Tambahkan phenol sebanyak 1:1, gojog kuat-kuat selama 10-15 menit.
5. Sentrifuge dengan kecepatan 2800-3000 rpm selama 20 menit.
6. Ambil supernatant dengan mikropipet, pindahkan ke mikrotube.
7. Tambahkan ethanol 96% dingin, 1:1 atau 1:2.
8. Campur pelan-pelan hingga timbul benang-benang halus (benang-benang DNA).
9. Ambil benang-benang DNA, pindahkan ke mikrotube lain.
10. Cuci dengan 500 µl ethanol 70%, dengan cara di sentrifuge 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C sebanyak 2-3 kali.
11. Supernatant dibuang, pellet dikering anginkan
12. Tambahkan TE, 200 µl untuk melarutkan DNA
13. DNA dapat digunakan untuk PCR dsb, atau disimpan pada freezer.

B. Sampel Whole Blood

1. Diambil darah perifer sebanyak 10-20 ml.
2. Tambahkan buffer lysis sebanyak 1:1 dan Proteinase K sebanyak 20 µl, gojog kuat-kuat selama 60 menit.
3. Tambahkan phenol sebanyak 1:1, gojog kuat-kuat selama 10-15 menit.
4. Sentrifuge dengan kecepatan 2800-3000 rpm selama 20 menit.
5. Ambil supernatant dengan mikropipet, pindahkan ke mikrotube.
6. Tambahkan ethanol 96% dingin, 1:1 atau 1:2.
7. Campur pelan-pelan hingga timbul benang-benang halus (benang-benang DNA).
8. Ambil benang-benang DNA, pindahkan ke mikrotube lain.
9. Cuci dengan 500 µl ethanol 70%, dengan cara di sentrifuge 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C sebanyak 2-3 kali.
10. Supernatant dibuang, pellet dikering anginkan
11. Tambahkan TE, 200 µl untuk melarutkan DNA
12. Ukur konsentrasi dan kemurnian DNA.
13. DNA dapat digunakan untuk PCR dsb, atau disimpan pada freezer.

LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

Kegiatan Praktikum:

Pemeriksaan : Isolasi DNA Jaringan

Metode : Fenol Kloroform

Alat dan Bahan : Alat

1. Mortar
2. Sentrifuge
3. Sentrifuge dingin
4. Vortex
5. Rotator
6. Mikrotube, tabung conical
7. Waterbath
8. Mikropipet

Bahan

1. Sampel jaringan (daging sapi, daging ayam, daging ikan dll)
2. Buffer lysis Jaringan
 - 50 mM Tris HCl pH 8
 - 100 mM NaCl
 - 100 mM EDTA
 - 1% SDS
3. Proteinase K (10 mg/ml)
4. Phenol CIAA (Chloroform Iso Amyl Alcohol)
5. Ethanol 70% dan 96%
6. TE (Tris EDTA)

Cara Kerja

1. Haluskan 2-3 gram jaringan dengan mortar.
2. Pindahkan jaringan ke dalam tabung conical 15 ml.
3. Tambahkan buffer lysis 2 ml.
4. Tambahkan 20 µl (10 mg/ml) proteinase K.
5. Vortex, Inkubasi pada suhu 55°C selama 60 menit (setiap 10 menit dihomogenkan / digojog).
6. Tambahkan phenol CIAA sebanyak 1:1.
7. Gojog selama 15-30 menit.
8. Sentrifuge 3000 rpm selama 20 menit pada suhu ruang.

9. Pindahkan lapisan atas ke dalam mikrotube 1,5 ml.
10. Tambahkan ethanol 96% dingin, 1:1 atau 1:2.
11. Campur pelan-pelan hingga timbul benang-benang halus (benang-benang DNA).
12. Ambil benang-benang DNA, pindahkan ke mikrotube lain.
13. Cuci dengan 500 µl ethanol 70%, dengan cara di sentrifuge 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C sebanyak 2-3 kali.
14. Supernatant dibuang, pellet dikering anginkan.
15. Tambahkan TE, 200 µl untuk melarutkan DNA.

**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, N., Rampazzo, R, D, C, P., Costa, A, D, T., & Krieger, M, A, (2017), Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics, *BioMed research international*
- Buckingham L, Flaws MI (2007) Molecular diagnostics; fundamentals, methods, & clinical applications. F.A. Davis, Philadelphia, PA
- Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1:581–585
- Darmawati, S., Kartika, AI., Fitria, M.S., Ernanto, AR. 2018. Modul Praktikum Biologi Molekuler. Unimus.
- Farchiyah, E.L., Arumingtyas, S., Widyarti., Rahayu S. (2016). Biologi Molekuler: Prinsip dasar analisis. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- [Geneaid, \(2020\), Viral Nucleic Acid Extraction Kit II, www.geneaid.com](http://www.geneaid.com), dikutip tanggal 31 Agustus 2023.
- Nurhayati, B., Darmawati, S., & Kesehatan, P, P, S, (2018), Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medis (TLM): Biologi Sel dan Molekuler.
- Puspitaningrum, R, Adhiyanto, C & Solihin, C, 2018, *Genetika Molekuler dan Aplikasinya*, Jakarta
- Shin, J, H, (2013), Nucleic acid extraction techniques, *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, 209-225.

BAB IV

ISOLASI DNA METODE LIQUID PHASE (BOILING METHOD)

- Kompetensi Dasar** : Mahasiswa mampu melakukan ekstraksi DNA dari sampel biologis
- Indikator capaian** : Mahasiswa berhasil mengisolasi DNA dengan kemurnian dan kuantitas yang memadai untuk analisis lebih lanjut

A. Metode Isolasi DNA

Isolasi Deoxyribonucleic Acid (DNA) adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. Umumnya DNA terdapat di dalam inti sel, dan beberapa organel lain di dalam sel seperti mitokondria (DNA mitokondria) dan kloroplas. Saat ini kita dapat menemukan berbagai macam metode ekstraksi DNA. Para peneliti selalu berusaha menyederhanakan tahapan yang digunakan atau mengurangi jumlah perlakuan. Tahapan atau perlakuan yang terlalu panjang dan terlalu kompleks sering meningkatkan resiko kegagalan, terutama bagi pemula. Tahapan atau perlakuan dalam ekstraksi DNA juga dipengaruhi asal sel/jaringan target. Metode isolasi boiling paling banyak digunakan, karena relatif mudah, sederhana dan keberhasilan untuk memperoleh isolat DNA cukup tinggi (Gupta, N. 2019).

B. Prinsip Isolasi DNA dengan Metode Boiling

Metode *boiling* merupakan salah satu metode ekstraksi DNA sederhana dengan memberikan gangguan fisik terhadap sel bakteri berupa pemanasan dengan suhu tinggi (95-100 °C) dalam proses pelepasan untai materi genetik dari inti sel sehingga diperoleh DNA. Pemanasan dengan suhu tinggi dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel sehingga mengakibatkan masuknya cairan dan molekul di sekitar sel dan keluarnya materi-materi genetik dari dalam sel. Kemudian DNA dipisahkan untuk selanjutnya digunakan sebagai DNA template PCR (Afif, R & Putri, D. H., 2019; Sunarno, 2013). Walaupun saat ini pengerjaan isolasi DNA dipermudah dengan adanya kit komersial, penggunaan metode tersebut membutuhkan biaya yang cukup mahal. Maka dari itu teknik *Boiling* dapat menjadi pilihan metode isolasi yang mudah dan ekonomis (Shehata & hershan, 2016).

Selain keberhasilan untuk memperoleh isolat DNA yang cukup tinggi, metode ini paling banyak digunakan karena relatif lebih murah dan sederhana. Pada metode *boiling* setelah sampel diputar dalam alat sentrifuge, supernatannya dibuang, kemudian pellet sel dibekukan dan dipanaskan kemudian disimpan pada suhu -20°C atau digunakan langsung untuk proses PCR (Nurhayati & Darmawati, 2017).

Pada metode *boiling* tidak terdapat tahap purifikasi/pemurnian DNA, akibatnya masih terdapat kontaminan berupa protein yang mampu menyerap sinyal UV secara maksimal pada panjang gelombang 280 nm dan RNA pada panjang gelombang 260 nm (Ni'mah, D, et al., 2021). Kegagalan hasil PCR dapat disebabkan kontaminasi reaksi PCR seperti protein atau RNA tersebut yang dapat menutupi DNA target sehingga menghambat proses amplifikasi (Afif, R. & Putri, D. H., 2019).

Kegiatan Praktikum:

Pemeriksaan : Isolasi DNA

Metode : Boiling

Alat dan Bahan : Alat

1. Biosafety Cabinet
2. Refrigerated Centrifuge
3. Waterbath
4. Freezer
5. Microtube 1,5 mL
6. Mikropipet

Bahan

1. Sampel (contoh air)
2. PCR buffer/TE buffer 1x
3. Proteinase K

Cara Kerja :

1. Ambil sebanyak 250 μ L sampel dan masukkan ke dalam microtube 1,5 mL
2. Sentrifuge 3000 rpm selama 5 menit, buang supernatan
3. Tambahkan 50 μ L 1x PCR buffer/TE buffer
4. Tambahkan 1 μ L Proteinase K (10 mg/mL)
5. Bekukan minimal 1 jam pada -80°C agar jaringan sel rusak
6. Panaskan selama 1 jam pada 60°C dan didihkan selama 15 menit pada 95°C
7. Simpan suspensi DNA yang terbentuk pada -20°C atau dapat digunakan langsung untuk amplifikasi menggunakan PCR

Evaluasi

1. Apakah hasil yang terjadi jika pemanasan dilakukan terlalu lama?
2. Apa yang terjadi jika Proteinase K tidak ditambahkan dalam proses isolasi?
3. Sebutkan kekurangan dan kelebihan metode Boiling!

Jawaban

**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Gupta, N. 2019, 'DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction', *Jurnal of Cytology*, Vol. 36, No. 2, hh. 116-117
- Afif, R & Putri, D. H., 2019, *16S rRNA Gene Amplification Of Endophytic Bacteria Which Produces Antimicrobial Compounds*, *Bio Sains Journal*, Vol.4, no.1, hh.48-53
- Sunarno, et al., 2013, 'Metode Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae* Untuk Pemeriksaan PCR', *Bulletin Penelitian Kesehatan*, Vol. 42, No.2, hh. 85-92.
- Nurhayati, B, & Darmawati, S, 2017, *Biologi Sel dan Molekuler*, BPPSDMK Kementrian Kesehatan RI, Indonesia.
- Shehata, A, & Hershan, A, 2016, 'Boiling,freezing-thawing and simple chemical extraction methods are comparable to cosly Kit-basedbacterial DNA extraction method as evidenced by conventional and real-time PCR', *Egyptian journal of medical microbiology*, Vol. 25, no.1, hh. 45-51.
- Ni'mah, D, et al., 2021, 'The Quantity and Quality Comparison of *Bacillus* sp. DNA between Heat Treatment and Filter Based Kit', *e-Jurnal Ilmiah Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*, Vol.6, no.2, hh.86-95

BAB V

ISOLASI DNA METODE MEKANIK (SONIKASI)

- Kompetensi Dasar** : Mahasiswa mampu melakukan ekstraksi DNA dari sampel biologis
- Indikator capaian** : Mahasiswa berhasil mengisolasi DNA dengan kemurnian dan kuantitas yang memadai untuk analisis lebih lanjut

A. Metode Isolasi Asam Nukleat

Ekstraksi DNA dapat dibagi menjadi metode kimia, metode mekanik dan metode fase padat. Untuk ekstraksi metode kimia dapat dilakukan dengan teknik *osmotic shock*, *enzymatic digestion*, deterjen dan *alkali treatment*, sedangkan untuk ekstraksi metode mekanik dapat dilakukan dengan cara homogenisasi (mata pisau atau alu), ultrasonikasi atau sonikasi, *pressure cell* (“*French press*”) dan *Ball mill* (Ali dkk, 2017).

B. Prinsip Isolasi DNA dengan Metode Mekanik (Sonikasi)

Sonikasi merupakan salah satu contoh penggunaan metode mekanik untuk ekstraksi DNA. Sonikasi memanfaatkan penggunaan energi suara untuk menggerakkan partikel yang berada dalam suatu sampel dan dapat mempercepat proses pelarutan suatu materi dengan prinsip pemecahan reaksi intermolekuler, sehingga terbentuk suatu partikel yang berukuran nano. Prosesnya dengan menggunakan gelombang ultrasonik pada rentang frekuensi 20 KHz - 10 MHz atau yang dikenal dengan istilah ultrasonikasi. Gelombang ultrasonik memiliki frekuensi tinggi yang tidak dapat didengar oleh manusia. Gelombang ini dihasilkan oleh sebuah transducer yang berada di dalam sonikator. *Transducer* ini mengubah energi listrik menjadi gelombang ultrasonik yang kemudian dipancarkan ke dalam larutan yang berisi bahan yang akan dipecahkan atau dicampur (Candani dkk, 2018).

Pada proses sonikasi, gelombang suara menciptakan perubahan tekanan pada cairan di sekitarnya dan menyebabkan gelembung-gelembung kecil terbentuk yang dikenal sebagai proses kavitasi akustik, yaitu pembentukan dan peledakan gelembung-gelembung mikroskopis dalam zat tersebut. Gelembung-gelembung ini akan menghasilkan tekanan, suhu, dan gaya geser yang tinggi, sehingga dapat memecah partikel, sel, atau molekul dalam zat tersebut sehingga sel-sel akan melepaskan isinya ke dalam larutan di sekitarnya (Hielscher, 2022).

Lama metode sonikasi tergantung pada beberapa faktor, seperti jenis dan jumlah zat yang diolah, frekuensi dan intensitas gelombang ultrasonik, suhu dan tekanan medium cair, serta tujuan

dan hasil yang diinginkan. Secara umum, metode sonikasi dapat berlangsung dari beberapa detik hingga beberapa menit (Mubarok, 2023).

Kegiatan Praktikum

Pemeriksaan : Isolasi DNA

Metode : Sonikasi

Alat dan Bahan : Alat

1. Biosafety Cabinet
2. Sonikator
3. Waterbath
4. vortex
5. Microtube 1,5 mL
6. Mikropipet

Bahan

1. Sampel (sputum)
2. NaOH 4%
3. Parafilm
4. *phosphat buffer saline* (PBS) pH 7,4

Cara Kerja :

1. Sebanyak 200 μ L sampel sputum didekontaminasi dengan 200 μ L natrium hidroksida (NaOH) 4% (perbandingan 1:1).
2. Kemudian dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL dan dilakukan homogenisasi dengan *vortex*.
3. Selanjutnya bagian atas *microtube* dilapisi dengan *parafilm* lalu sampel diinkubasi di *waterbath* pada suhu 37°C selama 15 menit dan disentrifugasi selama 15 menit pada 3000g lalu supernatan dibuang.
4. Pelet tersebut diresuspensi dalam 200 μ L larutan *phosphat buffer saline* (PBS) pH 7,4 dan dihomogenisasi dengan *vortex*, lalu *microtube* dilapisi kembali dengan *parafilm*.
5. Sampel yang sudah diresuspensi dalam buffer PBS dimasukkan ke dalam *waterbath* 95°C selama 20 menit.
6. Alat sonikator yang digunakan disiapkan dengan cara diletakkan di tempat yang datar dan kering lalu kabel dipasang ke *port* daya alat.
7. Dimasukkan *distilled water* ke dalam tangki hingga batas maksimum. Lalu hubungkan steker ke stopkontak.
8. Kemudian layar pada alat akan menyala, menampilkan arus dan suhu. Suhu pengaturan secara *default* adalah 0°C, waktu 3 menit.
9. Waktu pengoperasian disesuaikan: dikondisikan selama 15 menit.
10. Suhu pengoperasian disesuaikan: 22°C.
11. Setelah itu sampel yang berada di *microtube* dimasukkan kedalam rak tabung. Lalu rak tabung beserta *microtube* dimasukkan ke dalam tangki yang sudah berisi *distilled water*.
12. Waktu dan suhu sudah selesai diatur, maka tombol “ON/OFF” ditekan pada bagian suhu serta bagian waktu untuk mulai pengoperasian.

13. Selama proses tersebut akan terjadi kenaikan suhu sehingga diperlukan penambahan *ice pack*. Suhu dipertahankan di angka 22 - 25°C.
14. Setelah selesai, tekan kembali tombol ON/OFF di kedua bagian untuk menghentikan pengoperasian.
15. Lalu sampel disentrifugasi selama 5 menit pada 3000 g.
16. Kemudian 100 µL supernatant dipindahkan kedalam *microtube*.

**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, N,, Rampazzo, R, D, C, P,, Costa, A, D, T,, & Krieger, M, A, (2017), Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics, *BioMed research international*.
- Candani, D,, Ulfah, M,, Noviana, W,, & Zainul, R, (2018), A Review Pemanfaatan Teknologi Sonikasi.
- Hielscher, (2022), Sonication for Lysis: Cell Disruption and Extraction, dalam <https://www.hielscher.com/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction,htm>
- Mubarok, F,, M, (2023), Mengenal Sonikator, dalam <https://farmasiindustri.com/cpob/sonikator-laboratorium,html>.

BAB VI

SOLASI ASAM NUKLEAT METODE SPIN COLUMN

- Kompetensi Dasar** : Mahasiswa mampu melakukan ekstraksi DNA/ RNA dari sampel biologis
- Indikator capaian** : Mahasiswa berhasil mengisolasi DNA/RNA dengan kemurnian dan kuantitas yang memadai untuk analisis lebih lanjut

A. Metode Isolasi Asam Nukleat

Metode isolasi asam nukleat secara umum terbagi menjadi dua pendekatan utama, yaitu metode fase cair (liquid phase) dan fase padat (solid phase). Pada metode fase padat, digunakan media seperti kolom silika (spin column) dan magnetic beads. Di antara metode tersebut, metode spin column adalah salah satu yang paling umum digunakan dalam praktik laboratorium karena efisien dan praktis (Ali et al., 2017).

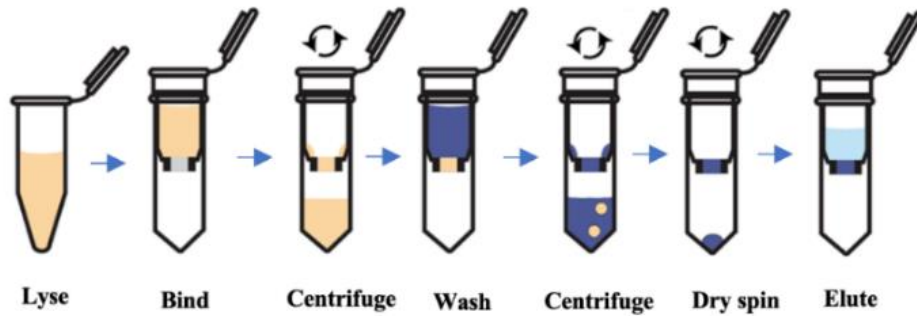
B. Prinsip Isolasi Asam Nukleat dengan Metode *Spin Column*

Teknik isolasi DNA menggunakan silika/*spin column* bergantung pada reaksi kimia antara silika dan DNA. Untuk mengisolasi DNA, gaya sentrifugal digunakan untuk mendorong sampel lisat melalui membran silika, dan DNA berikatan dengan gel pada pH yang tepat. Membran yang meliputi sisa protein dan garam, kemudian dicuci untuk menghilangkan bahan kimia penghambat, dan filtrat yang dihasilkan dibuang. Terakhir, DNA dielusi dengan etanol 70% (Samant et al., 2020).

Spin column-Based extraction DNA adalah salah satu metode ekstraksi DNA yang terdiri dari empat fase yaitu lisis sel, pengikatan asam nukleat ke membran gel, pencucian pengikatan asam nukleat ke membran silika gel, dan elusi DNA (Gambar 6.1). Pertama, membran sel akan pecah karena larutan lisis sehingga asam nukleat dalam sel akan bebas. Larutan pengikat yang mengandung larutan buffer dan etanol ditambahkan pada spin column, kemudian disentrifuge. Sampel akan lisis dan terhomogenisasi karena adanya guanidinium isothiocyanate, yang merupakan jenis dari garam katropik yang dapat melindungi DNA dari endogenous DNase. Sentrifugasi akan membuat larutan pengikat dapat melewati membran silika gel dari spin column (Sunarno et al., 2013; Ni'mah et al., 2021).

Asam nukleat akan berikatan dengan membran silika gel dan larutan dapat melewatinya apabila pH dan konsentrasi garam dari larutan pengikatnya optimal. Kemudian disentrifuge kembali, sehingga wash buffer untuk melewati membran yang akan menghilangkan kontaminan yang tersisa dari membran, yang tersisa hanya asam nukleat yang terikat pada membran silica gel. Tahap terakhir

column dimasukkan ke sentrifuge. Hal ini berfungsi agar elusi buffer dapat melalui membran silika gel dan isolat DNA dapat terkumpul dalam microtube (Zavala-Alvarado, Crispin, Benaroudj, 2020; Hidayat & Prasetyo, 2021).



Gambar 6.1. Skema isolasi DNA dengan metode *spin column*

(Sumber: Samant et al., 2020)

C. Kegiatan Praktikum

1. Isolasi DNA Total dengan FavorPrep™ Mini Kit

a. Alat dan Bahan

Alat

1. Mikropipet
2. Pipet tip sesuai volume mikropipet
3. *Refrigated centrifuge*
4. Inkubator
5. Dry bath
6. Tabung konikal
7. Mikrotube

Bahan

1. FATG1 Buffer
2. FATG2 Buffer
3. Proteinase K
4. W1 Buffer
5. Wash Buffer
6. Elution Buffer
7. FATG Mini Column
8. Collection tube
9. Micropestle
10. ddH₂O
11. Etanol absolut

b. Cara Kerja

Jaringan Hewan

1. Siapkan waterbath atau dry bath dengan suhu 60°C untuk step 4 dan suhu 70°C untuk step 6.
2. Potong jaringan sebanyak 25 mg ke microtube. Gunakan mikropestle untuk menggiling sampel jaringan. Jaringan dapat digiling atau dihancurkan dengan nitrogen cair dengan mortar dan pestle lalu pindahkan serbuknya ke microtube. Apabila DNA diambil dari jaringan limpa, serbuk digunakan tidak lebih dari 10 mg.
3. Tambahkan 200 µL FATG1 Buffer dan dihomogenkan dengan mikropipet.

4. Tambahkan 20 μ L Proteinase K (10mg/mL) ke campuran sampel. Homogenkan dengan vortex.
5. Inkubasi pada suhu 60°C sampai jaringan benar-benar lisis (1-3 jam). Vortex sesekali selama inkubasi. Sampel dapat diinkubasi semalaman untuk lisis sepenuhnya.
6. (*Optional*) Apabila ada RNA-free genomic DNA. Tambahkan 4 μ L dari 100 mg/mL RNase A. Homogenkan dengan vortex dan inkubasi di suhu ruang selama 2 menit.
7. Tambahkan FATG2 Buffer ke campuran sampel, homogenkan dengan vortex dan inkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit.
8. Tambahkan 200 μ L etanol (96-100%) ke campuran sampel, homogenkan dengan vortex.
9. Lakukan spin down untuk menghilangkan cairan yang ada di dinding tube.
10. Tempatkan FATG Mini Column pada collection tube. Pindahkan campuran secara hati-hati ke FATG mini column. Sentrifuge dengan kecepatan penuh 12.000 rpm selama 1 menit lalu tempatkan FATG mini column ke collection tube baru.
11. Tambahkan 400 μ L W1 Buffer ke campuran sampel. Sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit, buang supernatannya (ada di collection tube). Pastikan etanol sudah ditambahkan ke W1 buffer ketika pertama kali dibuka.
12. Tambahkan 750 μ L Wash Buffer ke FATG mini column. Sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm, buang supernatannya. Pastikan etanol sudah ditambahkan ke Wash Buffer ketika pertama kali dibuka.
13. Sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit supaya column kering. Ini adalah step penting, step ini akan menghilangkan cairan residu.
14. Tambahkan 100 μ L elution buffer yang sudah dipanaskan dengan suhu 37°C (untuk mempermudah pelarutan DNA) atau ddH₂O (pH 7,5-9,0) ke membran FATG mini column. Diamkan di FATG mini column untuk 3 menit. Step penting untuk elusi yang efektif, pastikan elution solution tersalurkan ke membran column pada bagian tengah dan terserap sepenuhnya. Apabila sampel yang digunakan sedikit, kurangi penambahan elution solution menjadi volume 50 μ L untuk meningkatkan konsentrasi DNA dan jangan gunakan elution solution kurang dari 50 μ L karena akan mengurangi hasil/ isolat DNA.

15. Sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit untuk mengelusi DNA.

Bakteri gram negatif

1. Pindahkan 1 mL kultur bakteri yang sudah ditumbuhkan ke microtube.
2. Sentrifuge microtube dengan kultur bakteri selama 2 menit dengan kecepatan 12.000rpm, pisahkan supernatan dan pellet-nya.
3. Ikuti prosedur ekstraksi jaringan hewan mulai step 3

Bakteri Gram Positif

1. Siapkan dry bath dengan suhu 37°C, 60°C, dan 95°C.
2. Pindahkan 1 mL kultur bakteri yang sudah ditumbuhkan ke microtube
3. Sentrifuge microtube dengan kultur bakteri selama 2 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, pisahkan supernatant dan pelletnya.
4. Resuspensi pellet dengan 200 µL lysozyme (20 mg/ml lysozyme; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1,2% Triton).
5. Inkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit.
6. (*Optional*) Apabila ada RNA-free genomic DNA. Tambahkan 4 µL dari 100 mg/mL RNase A. Homogenkan dengan vortex dan inkubasi di suhu ruang selama 2 menit.
7. Tambahkan 20 µL Proteinase K ke sampel, dan tambahkan 200 µL FATG2 Buffer ke sampel. Homogenkan dengan vortex. Inkubasi di suhu 60°C selama 30 menit dan vortex sesekali saat inkubasi.
8. Inkubasi lagi pada suhu 95°C selama 15 menit.
9. Ikuti tahapan ekstraksi jaringan hewan mulai step 8

Darah

1. Siapkan waterbath atau dry bath dengan suhu 60°C untuk step 3 dan suhu 70°C untuk step 4.
2. Pindahkan 200 µL sampel (whole blood, plasma, cairan tubuh, buffy coat) ke microtube. Apabila sampel kurang dari 200 µL, tambahkan PBS sesuaikan volumenya.

3. (*Optional*) Apabila ada RNA-free genomic DNA. Tambahkan 4 μ L dari 100 mg/mL RNase A. Homogenkan dengan vortex dan inkubasi di suhu ruang selama 2 menit.
4. Tambahkan 20 μ L proteinase K ke sampel, dan tambahkan 200 μ L FATG2 Buffer ke sampel. Homogenkan dengan vortex. Inkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Vortek sesekali selama inkubasi.
5. Inkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit.
6. Ikuti prosedur jaringan hewan mulai step 8.

2. Isolasi RNA Total dengan FavorPrep™ Mini Kit

a. Alat dan Bahan

Alat

1. Mikropipet
2. Tip
3. Refrigerated Sentrifuge
4. Inkubator
5. Dry bath
6. Tabung konikal
7. Mikrotube
8. RNA Column
9. Collection Tube

Bahan

1. Lysis Buffer
2. 2 M NaOAc, pH 5.2
3. Wash Buffer Concentrate
4. Release Buffer
5. 96-100% ethanol
6. Water saturated phenol
7. Kloroform

b. Cara Kerja

1. Panaskan Release buffer di suhu 65° C untuk tahap 13.
2. Tambahkan lisis buffer ke dalam tub yang sudah diisi dengan 100 mg jaringan atau pellet sel kultur.
3. Homogenkan kuat dengan vortex. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
4. Tambahkan 20 µL 2 M NaOAc, pH 5,2.
5. Tambahkan 180 µL water saturated phenol dan 40 µL kloroform ke dalam tube, vortex selama 2 menit.
6. Sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Pindahkan supernatant pada mikrotub bersih.
7. Tambahkan 96-100% ethanol ke supernatan dan gojok dengan kuat.

- Apabila supernatant memiliki volume 220 μ L maka tambahkan 513 μ L 96-100% ethanol pada supernatant. Konsentrasi akhir etanol adalah 70%.
 - Catatan: pemisahan akan terlihat setelah penambahan etanol 96-100%. Homogenkan hasil pemisahan dengan kuat.
8. Pindahkan campuran ke RNA kolum di Collection tube. Inkubasi selama 1 menit
 9. Sentrifuge selama 12.000 rpm selama 30 menit
 10. Tambahkan 650 μ L wash buffer (sudah ditambahkan etanol). Inkubasi selama 1 menit. Pastikan etanol sudah ditambahkan pada awal tutup dibuka.
 11. Sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit kemudian buang sisa larutan.
 12. Masukkan RNA kolum ke microtube 1,5 mL yang bersih.
 13. Tambahkan 30-50 μ L elution buffer yang sudah dipanaskan ke tengah-tengah RNA column, inkubasi selama 3 menit
 14. Sentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit untuk mendapatkan RNA.

**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/ PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, N., Rampazzo, R. D. C. P., Costa, A. D. T., & Krieger, M. A. (2017). Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics, *BioMed research international*.
- Hidayat, M.T., & Prasetyo, E.N. (2021). Modified Spin Column-Based RNA Extraction Methods of *Staphylococcus aureus* using PureLink® RNA Mini Kit and Basic Laboratory Instrument. *Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology* 3(2): 73-80.
- Ni'mah, D, et al. (2021). The Quantity and Quality Comparison of *Bacillus* sp. DNA between Heat Treatment and Filter Based Kit, *e-Jurnal Ilmiah Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*, Vol.6, no.2, hh.86-95
- Samant, P.P., Niedzwiecki, M.M., Raviele, N., Tran, V., Mena-Lapaix, J. Walker, D.I., Felner, E.I., Jones, D.O., Miller, G.W., and Prausnitz, M.R. 2020. Sampling Interstitial Fluid From Human Skin using Microneedle Patch. *Science Translational Medicine*. 12(571). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw0285>
- Sunarno, et al. (2013). Metode Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae* Untuk Pemeriksaan PCR, *Bulletin Penelitian Kesehatan*, Vol. 42, No.2, hh. 85-92.
- Zavala-Alvarado, C., & Benaroudj, N. (2020) The Single-Step Method of RNA Purification Applied to *Leptospira*. *Leptospira spp*, New York: *Humana*; 2020, p. 41–51.

BAB VII

ISOLASI RNA METODE SOLID PHASE (MAGNETIC BEADS)

Kompetensi Dasar : Mahasiswa mampu melakukan ekstraksi DNA/ RNA dari sampel biologis

Indikator capaian : Mahasiswa berhasil mengisolasi DNA/RNA dengan kemurnian dan kuantitas yang memadai untuk analisis lebih lanjut

A. Isolasi Asam Nukleat

Pada dasarnya prinsip isolasi adalah dengan pemecahan sel dan memisahkan materi genetik yang ada di dalam sel, baik berupa DNA maupun RNA dari komponen seluler lain berupa lemak, protein, karbohidrat dan zat lain. Salah satu metode isolasi RNA yang saat ini dilakukan di laboratorium adalah metode isolasi otomatis dengan menggunakan metode *Magnetic beads*

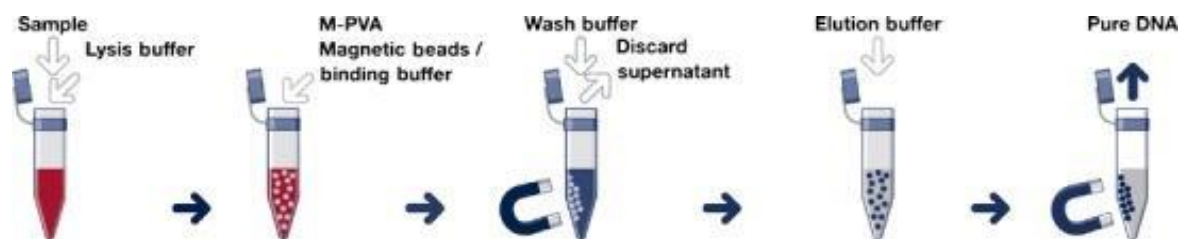
B. Prinsip Isolasi RNA Metode Solid Phase (Magnetic Beads)

Modifikasi ekstraksi fase padat yang paling terbaru yaitu penggunaan *magnetic bead*/ manik magnetik. Manik magnetik adalah partikel mikroskopis yang terbuat dari bahan magnetik, seperti besi, kobalt, atau nikel, yang dilapisi dengan polimer, silika, atau karbon. Manik magnetik dapat diberi ligan, yaitu molekul yang dapat berikatan dengan molekul lain secara spesifik, seperti asam nukleat. Ligan dapat berupa antibodi, oligonukleotida, peptida, atau molekul organik lainnya. Manik magnetik yang telah diberi ligan dapat dicampurkan dengan sampel yang mengandung asam nukleat. Ligan pada manik magnetik akan berikatan dengan asam nukleat yang sesuai dengan spesifisitasnya, sehingga terbentuk kompleks manik magnetik-asam nukleat. Kompleks manik magnetik-asam nukleat dapat dipisahkan dari larutan dengan menggunakan magnet. Magnet akan menarik manik magnetik beserta asam nukleat yang terikat padanya, sedangkan larutan yang tidak mengandung manik magnetik akan tertinggal. Asam nukleat yang terikat pada manik magnetik dapat dilepaskan dengan cara mengubah kondisi larutan, misalnya dengan menambahkan garam, alkohol, atau deterjen, yang dapat mengganggu ikatan antara ligan dan asam nukleat. Asam nukleat yang telah dilepaskan dapat dikoleksi dan dianalisis lebih lanjut.

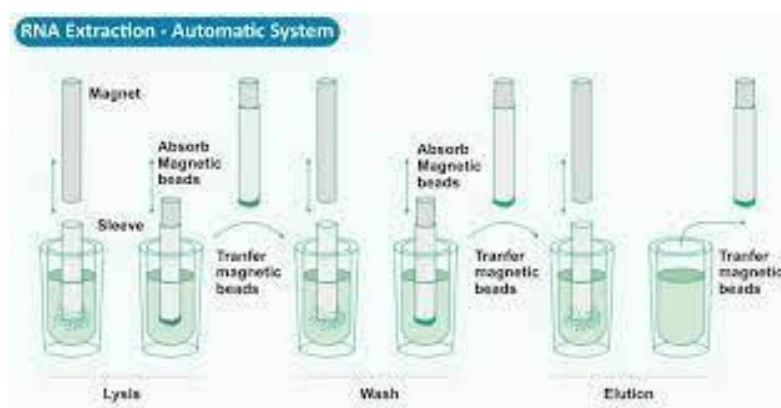
Protokol ekstraksi RNA manik magnetik dibuat dalam format pelat sumur sebagai bagian dari alur kerja deteksi. Alur kerja lengkap mulai dari ekstraksi RNA hingga deteksi RNA dapat dilakukan dalam waktu kurang dari 2-3 jam. Isolasi RNA sebelum deteksi merupakan langkah penting untuk

memastikan tingginya spesifisitas dan sensitivitas metode deteksi. Untuk tujuan ini, asam nukleat yang kuat dan throughput tinggi metode isolasi dengan kapasitas produksi dan distribusi yang tinggi harus tersedia. Karena kapasitas pengikatan permukaan yang besar dan pemisahan yang cepat dalam larutan berdasarkan medan magnet, manik-manik magnetik berlapis silika kompatibel dengan berbagai peralatan plastik dan mereka dapat digunakan dalam format multiwell throughput tinggi serta dalam pengujian skala kecil. Selain itu, manik-manik magnetik dapat dibuat dari bahan kimia yang tersedia secara luas di laboratorium peralatan dasar. Perhatian khusus harus diberikan terkait penanganan sampel sebelum isolasi RNA, dan sampel harus disimpan pada suhu 4 °C dan diproses pada hari pengumpulan.

Gambaran mengenai proses ekstraksi metode magnetic beads disajikan pada gambar berikut: (Berensmeier, 2006).



Gambar 7.1 Proses Ekstraksi magnetic Beads (Berensmeier, 2006)



Gambar 7.2 Isolasi RNA dengan Reagen Kit berbasis Magnet (Zybio, 2020)

Kegiatan Praktikum:

Pemeriksaan : Isolasi RNA

Metode : Magna Bind

Prinsip : Dalam kondisi *hypersaline* sel atau virus dalam sampel dilisiskan oleh Proteinase K, sehingga asam nukleat dilepaskan dan diserap oleh manik-manik magnet. Protein dan bahan biologis lainnya terlarut dalam Guanidin Isotianat. Sisa sisa kotoran dan zat pengganggu di cuci pada tahapan *washing*. Kemudian Asam nukleat dielusi dan dipisahkan dari manik-manik magnet oleh *separator* magnet. akhirnya asam nukleat akan terpisah dari magnet dan didapatkan asam nukleat yang murni

Alat dan Bahan : **Alat**

1. Biosafety Cabinet
2. Mesin Ekstraksi
3. Microtube 1,5 mL
4. Filter tip
5. Mikropipet
6. Spindown
7. Vortex

Bahan

1. Sampel: serum, swab naso/orofaring
2. Kit ekstraksi Tianlong

Cara Kerja :

1. Siapkan alat dan kit ekstraksi otomatis
2. Lakukan homogenisasi pada kartrid reagen.
3. Masukkan spesimen sebanyak 200 μ L ke dalam *well plate* ekstraksi otomatis (pada *well plate* ke-1 dan ke-7)
4. Dinyalakan alat ekstraksi dan dipasang sisir ekstraksi pada alat ekstraksi
5. Dimasukkan *plate* ke dalam alat ekstraksi otomatis
6. Dipilih program ekstraksi dan Ditekan RUN pada alat

7. Setelah proses ekstraksi selesai, diambil kartrid dan disimpan dalam BSC level 2
8. Dilakukan UV pada alat ekstraksi
9. Templat RNA yang sudah diekstraksi dapat diambil pada *well plate* ke-6 dan ke 12

Tabel 3.2 Pemetaan sampel pada *well plate* ekstraksi

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MLS	W1	W2	W3	E	T	MLS	W1	W2	W3	E	T
MLS	W1	W2	W3	E	T	MLS	W1	W2	W3	E	T
MLS	W1	W2	W3	E	T	MLS	W1	W2	W3	E	T
MLS	W1	W2	W3	E	T	MLS	W1	W2	W3	E	T
MLS	W1	W2	W3	E	T	MLS	W1	W2	W3	E	T
MLS	W1	W2	W3	E	T	MLS	W1	W2	W3	E	T
MLS	W1	W2	W3	E	T	MLS	W1	W2	W3	E	T
MLS	W1	W2	W3	E	T	MLS	W1	W2	W3	E	T

Keterangan :

MLS : *Magnetic, lysis buffer*, Sampel (yang diisi pooled sample)

W1 : *Washing buffer 1*

W2 : *Washing buffer 2*

W3 : *Washing buffer 3*

E : *Elution buffer*

T : Templat RNA

Evaluasi

1. Jelaskan prinsip isolasi asam nukleat metode magna bind?
2. Pada well beberapa yang berisi magnetic bind?
3. Apa kemungkinan yang terjadi jika alat tidak dilakukan UV terlebih dahulu?
4. Pada well keberapakah tempat untuk memasukkan spesimen?

Jawaban

**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Zybio (2020) 'Nucleic Acid Extraction Kit (Magnetic Bead Method)', p. 2. Zybio-Viral-Nucleic-Acid-Extraction-Kit-Insert.
- Klein, S. dkk. 2020. SARS-CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT-qPCR and RT-LAMP. <http://www.mdpi.com/journal/viruses>

BAB VIII

KUANTIFIKASI DAN KEMURNIAN ASAM NUKLEAT

A. Konsentrasi dan Kemurnian Asam Nukleat

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian asam nukleat (DNA/RNA) merupakan tahapan esensial dalam pemeriksaan molekuler sebelum dilakukan analisis lanjutan seperti PCR, sequencing, atau teknik diagnostik berbasis asam nukleat lainnya. Konsentrasi DNA atau RNA yang tidak sesuai dapat memengaruhi keberhasilan reaksi, misalnya terlalu rendah menyebabkan amplifikasi gagal, sedangkan terlalu tinggi atau terkontaminasi dapat menghasilkan amplifikasi nonspesifik atau menghambat aktivitas enzim (Olson & Morrow, 2012). Evaluasi kemurnian sampel biasanya dilakukan melalui rasio absorbansi $A_{(260)}/A_{(280)}$ untuk mendeteksi kontaminasi protein serta $A_{(260)}/A_{(230)}$ untuk menilai adanya garam atau bahan kimia lain (García-Alegría et al., 2020; Qiagen, 2021). Dalam bidang Teknologi Laboratorium Medik, keterampilan dalam menyiapkan, mengukur, dan mengevaluasi kualitas DNA/RNA sangat penting, karena hasil yang tidak valid dapat berdampak pada diagnosis klinis dan keputusan terapi pasien. Dengan demikian, pemahaman konsep dasar serta keterampilan praktis dalam mengukur konsentrasi dan kemurnian asam nukleat menjadi kompetensi wajib bagi mahasiswa teknologi laboratorium medik.

Uji konsentrasi dan kemurnian asam nukleat dapat menggunakan microvolume spektrofotometer contohnya Nanodrop atau Nanopro. DNA murni dapat menyerap cahaya ultraviolet karena keberadaan basa-basa purin dan pirimidin yang dapat dibaca pada 260 nm , sedangkan kontaminan protein atau phenol akan menyerap cahaya pada 280 nm . Peralatan yang dibutuhkan untuk metode absorbansi adalah spektrofotometer yang dilengkapi dengan lampu UV, kuvet (tabung kaca atau plastik) transparan UV.

Pembacaan absorbansi dilakukan pada 260 nm yang mana DNA menyerap cahaya yang paling kuat, dan nilai yang dihasilkan memungkinkan seseorang untuk memperkirakan konsentrasi larutan. Panjang gelombang yang digunakan untuk memastikan bahwa jumlahnya cukup berguna, adalah 260 nm dan harus berada dalam jangkauan linier instrumen (umumnya nilai absorbansi antara 0,1 sampai 1,0). DNA untai tunggal mempunyai koefisien absorpsi 0,027; DNA untai ganda 0,02 dan RNA 0,025 $\mu\text{g per mL per cm}$ pada panjang gelombang 260 nm . Kontaminan protein atau fenol akan menyerap cahaya pada 280 nm . Kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm (A_{260}/A_{280}), dan nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-1,9; sedangkan sampel RNA yang murni sebesar 1,9-2,0. Apabila rasio tersebut dibawah 1,8 berarti ada ketidakmurnian yang signifikan yang masih tertinggal di dalam sampel (Ali et al., 2017).

Untuk mengukur konsentrasi untai ganda DNA, untai tunggal DNA dan RNA digunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{DNA} = \text{Å } 260 \text{ nm} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

$$\text{ssDNA} = \text{Å } 260 \text{ nm} \times 33 \times \text{faktor pengenceran}$$

$$\text{RNA} = \text{Å } 260 \text{ nm} \times 40 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan :

Å 260 : Nilai absorbansi pada λ260

50 : larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50 ug untai ganda DNA per mL

33 : larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 33 ug untai tunggal DNA per mL

40 : larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 40 ug RNA per mL



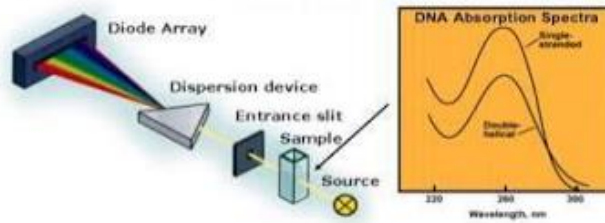
Alat pengukuran DNA Metode Spektrofotometri

Hubungan antara konsentrasi DNA, RNA, Protein dengan Absorpsivitas

Sample	Absorbance value	Quantity (approximate)
Double-stranded DNA	1 at 260 nm	50 µg/mL
Pure single-stranded DNA	1 at 260 nm	33 µg/mL
Pure RNA	1 at 260 nm	40 µg/mL
Pure protein (vary in general) Antibodies ¹	1 at 280 nm 1.2-1.35	1 mg/mL 1 mg/mL

(Harlow & Lane, 1988)

Nucleic Acid Analysis via UV Spectrophotometry



Prinsip pengukuran DNA secara kuantitatif (Nikmah dkk., 2021)

Kegiatan Praktikum:

Pemeriksaan : Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Alat dan Bahan : Alat

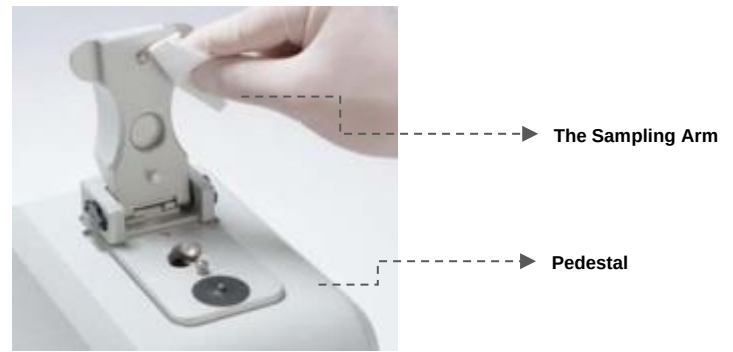
1. Nanopro maestrogen
2. Mikropipet
3. Tip
4. Tissue

Bahan

1. Nuclease Free Water
2. Sampel DNA

Cara Kerja

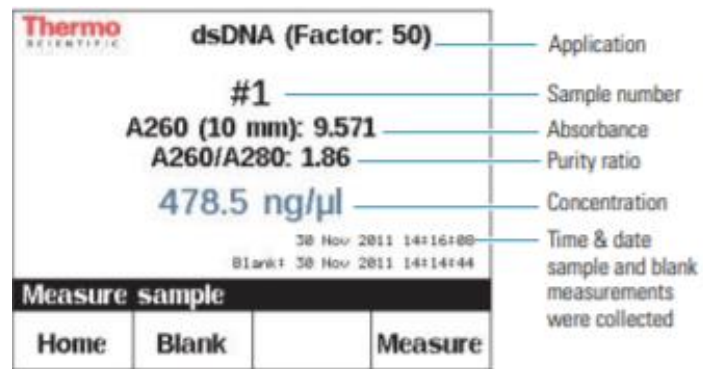
1. Sampel dilakukan thawing sebelum dilakukan pengukuran.
2. Aplikasi pada *home screen* alat Spektrofotometer *NanoDrop* dibuka dan dipilih program pengukuran “DNA”.
3. Diikuti tahapan selanjutnya yang tertera pada *home screen*, lalu dilakukan pengukuran *blanko* dengan cara ditetaskan 1-2 μL *Nuclease Free Water* ke bagian dasar tempat penetesan sampel (*pedestal*).



Gambar 3.1 Bagian-bagian alat Spektrofotometer NanoDrop

Sumber: (Thermo Fisher Scientific, 2024)

4. Bagian lengan alat (*the sampling arm*) Spektrofotometer *NanoDrop* diturunkan hingga mengenai sampel, kemudian diklik tombol “**Blank**”.
5. Setelah pengukuran *blanko* selesai, bagian lengan alat dinaikkan dan kedua sisi yang terkena tetesan NFW dibersihkan dengan lap pembersih yang kering dan tidak berserat.
6. Pengukuran sampel dilakukan dengan ditetaskan 1-2 μL sampel kebagian dasar tempat peneteskan sampel (*pedastal*) lalu bagian lengan alat diturunkan dan tombol “**Measure**” ditekan.
7. Dibersihkan kedua sisi yang terkena sampel dengan lap yang kering dan tidak berserat setelah selesai pengukuran tiap sampel.
8. Pengukuran dilanjutkan hingga semua sampel terukur sesuai dengan tahapan ke 6 hingga 7.
9. Setiap hasil pengukuran yang muncul seperti pada **Gambar 3.2** dicatat untuk nantinya diolah menggunakan uji statistik.



Gambar 3.2 Tampilan Hasil Pengukuran pada NanoDrop.

Sumber : (Thermo Fisher Scientific Inc, 2024)

**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Olson, N.D., Morrow, J.B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Res Notes* 5, 668 (2012). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-668>
- García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Guadalupe Corella-Madueño, M. A., Rascón-Durán, M. L., & Astiazaran-García, H. (2020). Quantification of DNA through the NanoDrop spectrophotometer: methodological validation using standard reference material and Sprague Dawley rat and human DNA. *International journal of analytical chemistry*, 2020(1), 8896738.
- Qiagen. (2021). Purity – Does my sample contain contaminants? *Qiagen Knowledge Hub*. Retrieved from <https://www.qiagen.com>
- Ali, N., Rampazzo, R, D, C, P., Costa, A, D, T., & Krieger, M, A, (2017), Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics, *BioMed research international*
- Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Academic Press
- Thermo Scientific. 2024. Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers: Nucleic Acid Measurements. <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/ts-nanodrop-nucleicacid-olv-r2.pdf>

BAB IX

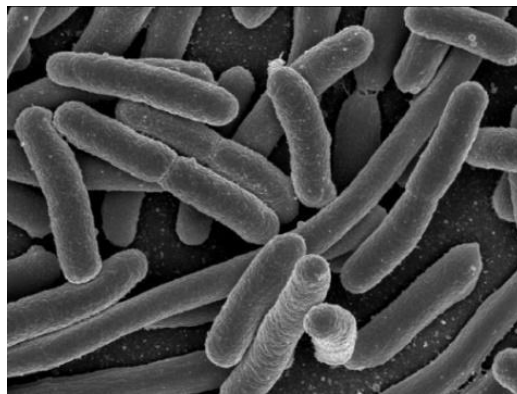
PEMERIKSAAN *Escherichia coli* DENGAN PCR KONVENSIONAL

Kompetensi Dasar : Mahasiswa dapat melakukan amplifikasi gen spesifik menggunakan teknik PCR

Indikator capaian : Mahasiswa menghasilkan band PCR yang spesifik dan bersih pada gel agarosa

A. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang dengan ukuran berkisar antara 2.0-6.0 μm x 1.0-1.5 μm , dan bergerak dengan menggunakan flagella. (Rahayu, W. P, et al., 2018). *E.coli* merupakan organisme penyebab banyak penyakit termasuk diare, disentri, dan infeksi saluran kemih (ISK) (Ismaun et al., 2021).



Gambar 9.1 *Escherichia coli*

E. coli merupakan bakteri anaerob fakultatif yang dapat hidup pada keadaan aerob maupun anaerob. Pada kondisi aerob, oksigen digunakan sebagai sumber karbon eksternal yang menyediakan energi untuk pertumbuhan oksidatif, sedangkan pada kondisi anaerob, bakteri ini menggunakan fermentasi sebagai sumber energi untuk bertahan hidup (Rahayu, W. P, et al., 2018). Molekul yang di isolasi dari *Escherichia coli* yakni berupa DNA. Molekul DNA di dalam sel selanjutnya diisolasi untuk keperluan amplifikasi PCR

B. Konsep Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik memperbanyak fragmen DNA tertentu secara eksponensial menggunakan enzim secara in vitro, yang dapat dilakukan secara cepat. Metode yang mengadopsi teknik replikasi DNA di dalam sel setiap organisme hidup (in vivo) ini ditemukan pertama kali pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis, semula metode ini hanya digunakan untuk

mengamplifikasi fragmen DNA tertentu, tetapi sekarang berkembang sehingga dapat digunakan pula untuk mengamplifikasi dan melakukan kuantitasi molekul mRNA. Kelebihan metode ini selain dapat digunakan untuk melipatgandakan fragmen DNA secara cepat, ternyata dapat juga untuk melipatgandakan DNA yang jumlahnya hanya sedikit, karena pada proses PCR dibutuhkan DNA cetakan cukup 5 µg. Selain itu, reaksi PCR biasa dilakukan pada volume kecil (25–50 µl) (Yadav & Lodhi, 2023).

PCR merupakan suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Primer yang digunakan sebagai pembatas daerah yang diperbanyak adalah DNA untai tunggal yang urutannya komplemen dengan DNA templatnya. Proses tersebut mirip dengan proses replikasi DNA secara *in vivo* yang bersifat semi konservatif (Han et al., 2023).

PCR memungkinkan adanya perbanyakan DNA antara dua primer, hanya di dalam tabung reaksi, tanpa perlu memasukkannya ke dalam sel (*in vivo*). Pada proses PCR dibutuhkan DNA untai ganda yang berfungsi sebagai cetakan (templat) yang mengandung DNA-target (yang akan di amplifikasi) untuk pembentukan molekul DNA baru, enzim DNA polimerase, deoksinukleosida trifosfat (dNTP), dan sepasang primer oligonukleotida. Pada tahap annealing, kedua primer akan mengenali dan berikatan dengan untaian DNA komplemennya yang terletak pada awal dan akhir fragmen DNA target, sehingga kedua primer tersebut akan menyediakan gugus hidroksil bebas pada karbon 3'. Setelah kedua primer menempel pada DNA templat, DNA polimerase mengkatalisis proses pemanjangan kedua primer dengan menambahkan nukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida templat. DNA polimerase mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara OH pada karbon 3' dengan gugus 5' fosfat dNTP yang ditambahkan. Sehingga proses penambahan dNTP yang dikatalisis oleh enzim DNA polimerase ini berlangsung dengan arah 5'→3' dan disebut reaksi polimerisasi. Enzim DNA polimerase hanya akan menambahkan dNTP yang komplemen dengan nukleotida yang terdapat pada rantai DNA templat (Porzucek et al., 2023).

PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan, yaitu pemisahan (denaturasi) rantai DNA templat, penempelan (annealing) pasangan primer pada DNA target dan pemanjangan (extension) primer atau reaksi polimerisasi yang dikatalisis oleh DNA polimerase (Dzaki et al., 2017).

Tahapan-Tahapan PCR

Menurut Dzaki et al., (2017) tahapan PCR sebagai berikut:

1) Denaturasi

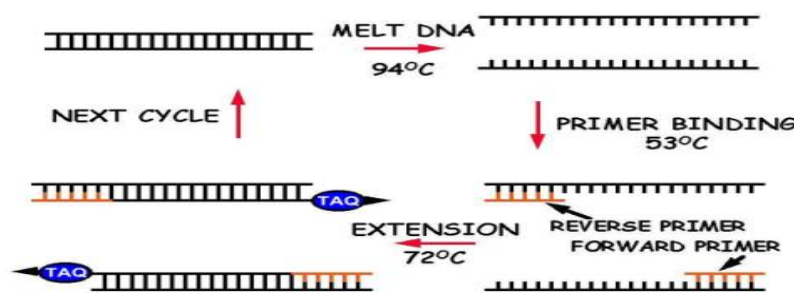
Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusnya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya. Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu 90°C–95°C.

2) Penempelan primer (annealing)

Pada tahap penempelan primer (annealing), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses annealing ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada templat. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 50°C–60°C. Selanjutnya, DNA polimerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada 72°C.

3) Reaksi polimerisasi (extension)

Umumnya, reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai ini, terjadi pada suhu 72°C. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'-nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat oleh DNA polimerase.

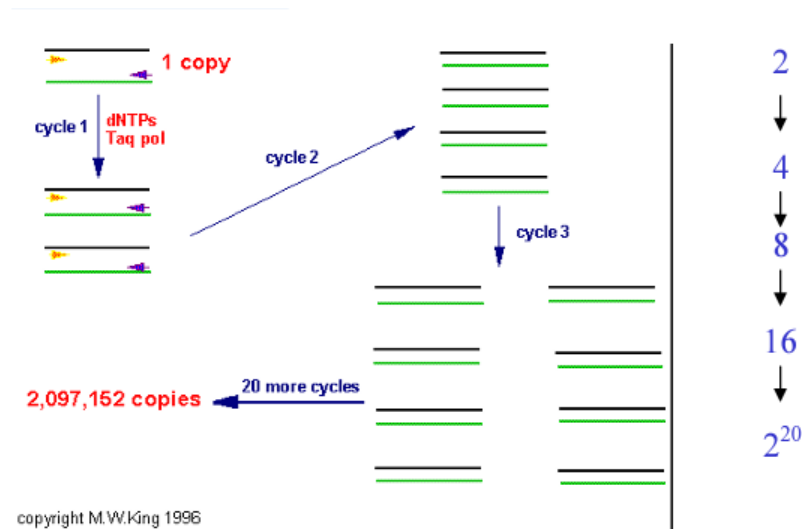


Gambar 9.2 Siklus PCR, yang terdiri dari denaturasi, penempelan primer (annealing) dan polimerisasinya

Sumber: (Gaffar & Shabarni, 2017)

Jika siklus dilakukan berulang-ulang maka daerah yang dibatasi oleh dua primer akan di amplifikasi secara eksponensial (disebut amplikon yang berupa untai ganda), sehingga mencapai jumlah copy yang dapat dirumuskan dengan $(2n)^x$. Dimana n adalah jumlah awal molekul dan x adalah jumlah siklus. Jadi, seandainya ada 1 copy DNA sebelum siklus berlangsung, setelah satu siklus, akan menjadi 2 copy, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 kopi dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial. PCR dengan menggunakan enzim Taq DNA polimerase pada akhir dari setiap siklus akan menyebabkan penambahan satu nukleotida A pada ujung 3' dari potongan DNA yang dihasilkan. Sehingga nantinya

produk PCR ini dapat di kloning dengan menggunakan vektor yang ditambahkan nukleotida T pada ujung-ujung 5'-nya. Proses PCR dilakukan menggunakan suatu alat yang disebut thermocycler (Gaffar & Shabarni, 2017).



Gambar 9.3 Jumlah copy fragmen DNA pada tahapan PCR
Sumber: (Gaffar & Shabarni, 2017)

Komponen PCR

Menurut Ali et al., (2023) komponen PCR terdiri dari beberapa yaitu diantaranya:

1) Enzim DNA Polymerase

PCR dilakukan dengan menggunakan Klenow fragment DNA Polimerase I selama reaksi polimerisasinya. Enzyme ini ternyata tidak aktif secara termal selama proses denaturasi, sehingga peneliti harus menambahkan enzim di setiap siklusnya. Selain itu, enzim ini hanya bisa dipakai untuk perpanjangan 200 bp dan hasilnya menjadi kurang spesifik. Untuk mengatasi kekurangan tersebut, dalam perkembangannya kemudian dipakai enzim Taq DNA polymerase yang memiliki keaktifan pada suhu tinggi. Oleh karenanya, penambahan enzim tidak perlu dilakukan di setiap siklusnya, dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin .

2) Primer

Primer merupakan oligonukleotida pendek rantai tunggal yang mempunyai urutan komplemen dengan DNA templat yang akan diperbanyak. Panjang primer berkisar antara 20-30 basa. Untuk

merancang urutan primer, perlu diketahui urutan nukleotida pada awal dan akhir DNA target. Primer oligonukleotida di sintesis menggunakan suatu alat yang disebut DNA synthesizer.

3) *Deoxynucleotide triphosphates* (dNTPs)

dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas *deoksiadenosin trifosfat* (dATP), *deoksitimidin trifosfat* (dTTP), *deoksisitidin trifosfat* (dCTP) dan *deoksiguanosin trifosfat* dGTP. Dalam proses PCR dNTPs bertindak sebagai building block DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus –OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA template (Handoyo & Rudiretna, 2000).

4) Reaksi PCR memerlukan buffer untuk menjaga kestabilan pH medium. Adanya ion Mg^{2+} dari $MgCl_2$ sebagai kofaktor yang menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Dengan adanya $MgCl_2$ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan templat yang membentuk kompleks larut dengan dNTP. Hal ini membantu pembentukan kompleks yang larut dengan dNTP selama proses PCR (Handoyo & Rudiretna, 2000).

5) Reverse Transkriptase

Reverse Transcriptase adalah suatu enzim yang dapat mensintesa molekul DNA secara in vitro menggunakan template RNA. Hal ini disebut dengan RT-PCR merupakan singkatan Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. Seperti namanya, proses RT-PCR merupakan bagian dari proses PCR biasa. Perbedaannya dengan PCR yang biasa, pada proses ini berlangsung satu siklus tambahan yaitu adanya perubahan RNA menjadi cDNA (complementary DNA) dengan menggunakan enzim Reverse Transkriptase. Seperti halnya PCR biasa, pada pengerjaan RT-PCR ini juga diperlukan DNA Polimerase, primer, buffer, dan dNTP. Namun berbeda dengan PCR, templat yang digunakan pada RT-PCR adalah RNA murni. Oleh karena primer juga dapat menempel pada DNA selain pada RNA, maka DNA yang mengkontaminasi proses ini harus dibuang. Untuk proses amplifikasi mRNA yang mempunyai poly(A) tail pada ujung 3', maka oligo dT, random heksamer, maupun primer spesifik untuk gen tertentu dapat dimanfaatkan untuk memulai sintesa cDNA.

Kegiatan Praktikum:

Pemeriksaan : Amplifikasi DNA 16srRNA *Escherichia coli*

Alat dan : Alat

Bahan

1. Biosafety Cabinet
2. PCR Cabinet
3. PCR Thermo Scientific / Thermal Cycler
4. Refrigerated centrifuge
5. Microtube 1,5 mL, dan 0,3 mL

6. Micropipet

Bahan

1. Sampel hasil isolasi DNA sebagai DNA template
2. Go Taq Green Master Mix
3. Primer Forward: 5'-GGG AGT AAA GTT AAT ACC TTT GCT C-3'
4. Primer Reverse: 5'-TTC CCG AAG GCA CAT TCT-3'
5. Nuclease Free Water/NFW

Cara Kerja :

1. Cairkan Go Taq Green Master Mix dengan cara menyimpannya pada suhu kamar.
2. Vortex 3-5 detik, lalu putar sebentar menggunakan microsentrifuge agar mendapatkan material yang terdapat pada bawah tube reagen.
3. Siapkan reagen master mix sesuai dengan jumlah reaksi yang akan dilakukan
4. Masing-masing reagen dimasukkan dalam satu microtube. Dimana komposisi master mixnya sebagai berikut:

Komponen	Volume 1x Reaksi (µL)	Volume 3x Reaksi (cth)	Kons. Akhir
Go Taq Green Master Mix, 2X	12.5	37.5	1X
Primer Forward	1.0	3.0	500 nM
Primer Reverse	1.0	3.0	500nM
Addkan dengan NFW menjadi 20.0 µL	5.5	16.5	-
Total	20	60	

5. Setelah semua reagen dimasukan, lalu divortex dan di spindown selama 10 detik.
6. Masing-masing dipipet 20 µL reagen mix ke tube PCR
7. Tube PCR yang berisi reagen dimasukan ke dalam coolbox untuk dibawa ke ruang penambahan DNA template.
8. DNA template hasil isolasi ditambahkan sebanyak 5 µL
9. Tube PCR ditutup, kemudian dispindown.

10. Microtube dimasukan ke thermal cycler, dan lakukan pengaturan alat sebagai berikut:

Tahapan	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Initial denaturasi	94	3 menit	1
Denaturasi	94	20 detik	35
Annealing	56	20 detik	
Extention	72	30 detik	
Final Extention	72	10 menit	1

11. Produk PCR siap dilanjut ke Elektroforesis

Evaluasi

1. Berapakah masing-masing reagen yang harus disiapkan jika seorang ATLM menerima 5 spesimen?
2. Apa kandungan dari Go Taq Green Master Mix?
3. Apa yang dimaksud dengan Master Mix?

Jawaban

LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Ismaun, Muzuni, & Hikmah, N., 2021, 'Molecular Detection of Escherichia coli Bacteria as A Cause Of Diarrhic Disease Using Techniques Of PCR', *Bioma Journal*, Vol.6, no.2, hh.1-9
- Rahayu, S & Gumilar, M., 2017, 'Uji Cemarkan Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung Dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*', *IJPST*, Vol. 4, no. 2, hh. 50-56.
- Yadav, P., & Lodhi, S. (2023). *Genomics: A complete genome sequence* (Issue June).
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2000). Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. In *Unitas* (Vol. 9, Issue 1).
- Han, Y., Wu, X., Jiang, G., Guo, A., Jin, Z., Ying, Y., Lai, J., Li, W., & Yan, F. (2023). Bronchoalveolar lavage fluid polymerase chain reaction for invasive pulmonary aspergillosis among high-risk patients: a diagnostic meta-analysis. *BMC Pulmonary Medicine*, 23(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12890-023-02343-5>
- Gaffar, & Shabarni. (2017). *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*.
- Calvert, C., Ronsmans, C., Chetty, T., Thorne, C., Coutoudis, A., M. Christopher, A. M. L. S., Prieto, L. M., McPhee, C. F., Rojas, P., Mazariegos, D., Muñoz, E., Mellado, M. J., Holguín, Á., Navarro, M. L., González–Tomé, M. I., Ramos, J. T., Norris, L. B., Pharm, D., Moodley, T., ... Haberl, A. (2016). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *PLoS ONE*, 16(1), 91–98. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1>
- Nurhayati, B., Darmawati, S., & Kesehatan, P, P, S, (2018), Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medis (TLM): Biologi Sel dan Molekuler.

BAB X

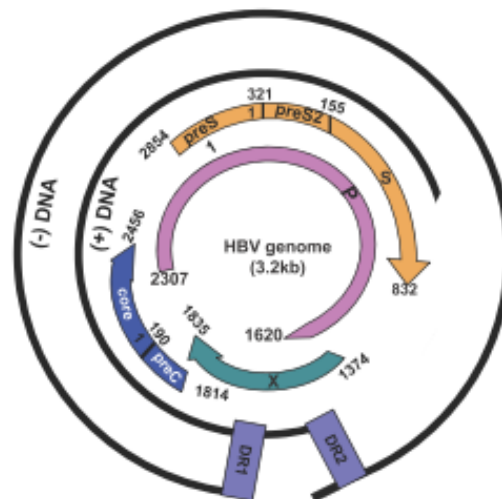
PEMERIKSAAN HEPATITIS B DENGAN METODE REAL TIME PCR

Kompetensi Dasar : Mahasiswa dapat melakukan amplifikasi gen spesifik menggunakan teknik Real Time PCR

Indikator capaian : Mahasiswa dapat melakukan analisis hasil kurva amplifikasi

A. Hepatitis B

Virus hepatitis B (VHB) merupakan virus dengan materi genetik asam deoksiribonukleat yang mempunyai selubung amplop dan bereplikasi melalui RNA. Virus ini tergolong dalam genus Orthohepadnavirus dan famili Hepadnaviridae (Zhang dan Cao, 2011; Torres dkk., 2013). Virion VHB terdiri dari nukleokapsid yang dikelilingi selubung amplop lipid yang mengandung protein permukaan kecil, sedang dan besar (Shuyu dkk., 2011).



Gambar 10.1 Genom untai ganda parsial VHB (Ezzikouri dkk., 2014). Genom VHB terdiri dari untai positif dan untai negatif serta mengandung 4 kerangka baca terbuka yang saling tumpang tindih yaitu s, c, p dan x

VHB mempunyai DNA genom untai ganda parsial rileks sirkuler (*relaxed circular*) yang terdiri dari untai positif dan negatif berukuran 3.2 kb (MariaKuttikan Jayalakshmi, 2013). Genom VHB mengandung 4 kerangka baca terbuka yang saling tumpang tindih yaitu s, c, p dan x. Kerangka baca terbuka s mengkode tiga protein permukaan yaitu S, pre S2/S dan pre S1/S2/S. Kerangka baca terbuka c mengkode protein Hepatitis Be Antigen (HBeAg) dan protein inti Antigen (HBcAg). Kerangka baca terbuka p mengkode polimerase virus yang terdiri dari domain C terminal RNase H (RH), domain transkriptase balik, dan domain N terminal. Kerangka baca terbuka x mengkode protein non struktural. Daerah preS terdiri dari preS1 dan preS2, tumpang tindih dengan daerah yang

mengkode polimerase virus. Daerah pre inti mengkode protein pre inti virus yang di proses di retikulum endoplasma untuk mensekresikan HBeAg. HBeAg secara klinis digunakan sebagai indikator bahwa virus aktif bereplikasi. (Shuyu dkk., 2011; Zhang dan Cao, 2011; Torres dkk., 2013)

B. Real-Time PCR

Real-Time PCR (qPCR) adalah suatu metoda analisa yang dikembangkan dari reaksi PCR. Dalam ilmu Biologi Molekular, *Real-Time* PCR (juga dikenal sebagai *quantitative real time polymerase chain reaction* (Q-PCR/qPCR) atau *kinetic polymerase chain reaction*), adalah suatu teknik pengerjaan PCR di laboratorium untuk mengamplifikasi (memperbanyak) sekaligus menghitung (kuantifikasi) jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi. *Real-Time* PCR memungkinkan dilakukannya deteksi dan kuantifikasi (sebagai nilai absolut dari hasil perbanyakan DNA atau jumlah relatif setelah dinormalisasi terhadap input DNA) sekaligus terhadap sekuens spesifik dari sampel DNA yang dianalisa.

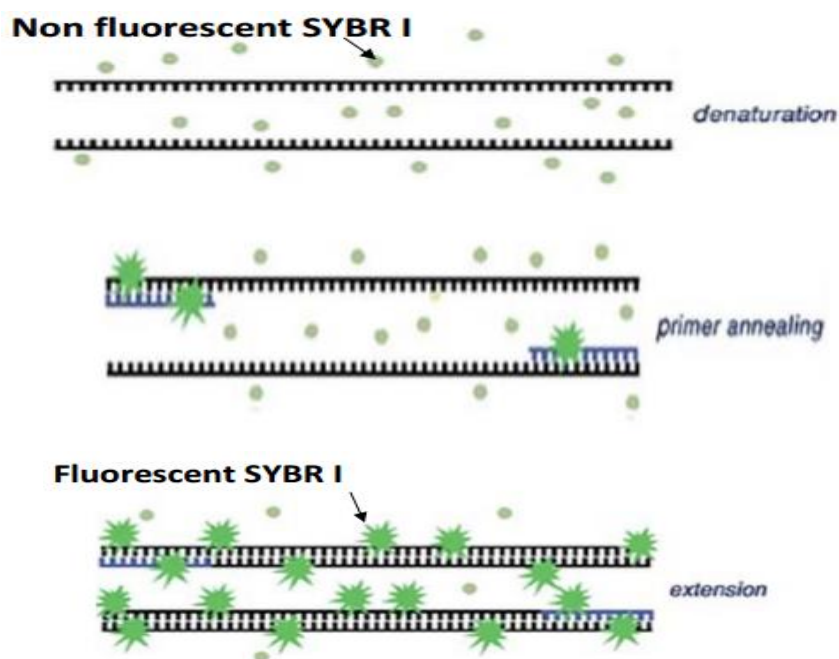
Pada analisa PCR konvensional deteksi keberadaan DNA dilakukan pada akhir reaksi (*end point*) dan pengamatan keberadaan DNA hasil amplifikasi dilakukan di gel agarose setelah dilakukan proses elektroforesis. Sedangkan analisa menggunakan *Real-Time* PCR memungkinkan untuk dilakukan pengamatan pada saat reaksi berlangsung, keberadaan DNA hasil amplifikasi dapat diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi pewarna fluoresen atau probe (penanda) spesifik yang menghasilkan sinyal fluoresensi. Pada *Real-Time* PCR pengamatan hasil tidak lagi membutuhkan tahap elektroforesis, sehingga tidak lagi dibutuhkan gel agarosa dan penggunaan Ethidium Bromide (EtBr) yang merupakan senyawa karsinogenik.

Proses dimulai dengan isolasi sampel. Selanjutnya, DNA diamplifikasi melalui siklus PCR yang terdiri dari denaturasi (pemutusan untai ganda DNA), annealing (penempelan primer pada template DNA), dan ekstensi (perpanjangan rantai DNA oleh DNA polimerase). Selama amplifikasi, pewarna fluoresen seperti SYBR Green yang berikatan dengan DNA untai ganda akan memancarkan sinyal yang dapat dipantau secara real-time oleh detektor kamera pada alat PCR. Intensitas fluoresensi ini sebanding dengan jumlah produk amplifikasi yang terbentuk (Artika et al., 2022). Metode pembacaan real-time PCR terdiri dari *Intercalating*, *Hydrolysis probe* dan *Hybridization probe* (Calvert et al., 2016). *Intercalating dye* (pewarna) yang paling sering digunakan yaitu *EvaGreen* dan *SYBR Green 1*.

Prinsip dari *intercalating dye* adalah pewarna yang akan berinterkalasi atau menyisip secara nonspesifik dengan DNA untai ganda, sehingga dapat menghasilkan fluoresensi. Pewarna yang tidak berikatan dengan untai ganda DNA, maka tidak akan menimbulkan fluoresensi sehingga tidak ada sinyal yang ditangkap oleh detektor alat (Ponchel et al., 2003).

SYBR Green adalah pewarna spesifik untuk *double strand-DNA* (dsDNA) yang paling sering digunakan pada qPCR. SYBR Green adalah pewarna sianin asimetris yang sebagian besar berikatan dengan dsDNA, tidak berikatan dengan *single stranded-DNA* (ssDNA), dan tidak bergantung pada urutan nukleotida. Selama PCR berlangsung, ketika urutan target nukleotida teramplifikasi, SYBR Green mengikat setiap salinan baru dsDNA pada langkah *extention*. SYBR Green dapat tereksitasi oleh cahaya biru dengan panjang gelombang 480 nm dan spektrum emisinya sebanding dengan fluoresens pada panjang gelombang maksimum 520 nm. Fluoresensi dari pewarna yang mengikat dsDNA 1000 kali lebih tinggi dibandingkan pewarna yang bebas sehingga menghasilkan peningkatan sinyal fluoresensi. Jika dipantau secara *real time*, hal ini menghasilkan peningkatan sinyal fluoresensi yang dapat diamati selama polimerasi berlangsung dan hilang ketika DNA didenaturasi.

Oleh karena itu, pengukuran fluoresensi harus dilakukan pada akhir langkah elongasi setiap siklus PCR. Metode ini lebih murah penggunaannya sebab tidak memerlukan probe qPCR. Kekurangan utamanya adalah spesifisitasnya ditentukan sepenuhnya oleh primer dan dengan demikian risiko produk amplifikasi non-spesifik harus dipertimbangkan (Marmioli N, Maestri E, 2007; Rodriguez-Làzaro D, Hernández M, 2014).

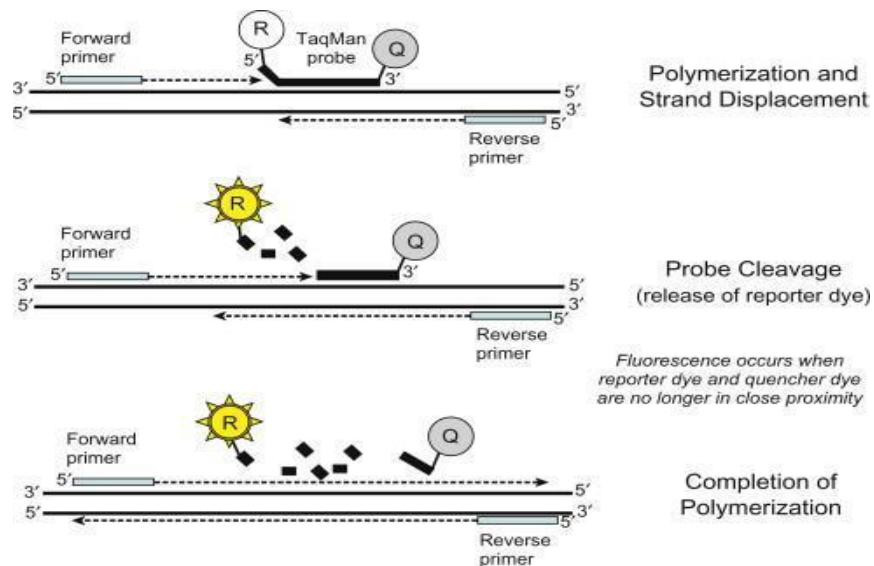


Gambar 10.1 Mekanisme SYBR Green dalam qPCR

Sumber : Introduction To Real-Time Quantitative PCR (qPCR). SABiosciences, A QIAGEN Company. (<http://sabiosciences.com/manuals/IntrotoqPCR.pdf>)

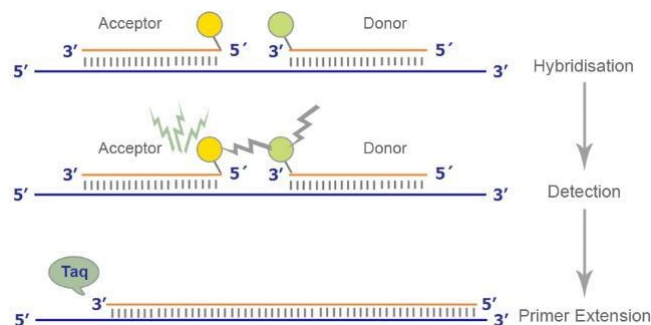
Hidrolisis Probe dikenal dengan Taqman Probe adalah probe yang terdiri 2 (dua) label yaitu fluorescence *reporter* dan fluorescence *quencher*. Pada kondisi sebelum terjadi amplifikasi *quencher* menahan sinyal fluoresensi *reporter*. Pada proses *extention*, aktivitas *exonuclease 5'* dari

DNA Polimerase memotong hidrolisis probe dan memisahkan *reporter* dan *quencher*. Hal ini menyebabkan sinyal fluoresensi reporter tidak lagi tertahan sehingga memancarkan sinyal fluoresensi. Peningkatan sinyal fluoresensi reporter berbanding langsung dengan produk PCR (Calvert et al., 2016).



Gambar 10.2 Skema Taqman Probe

Hybridization probe adalah yang 2 (dua) probe oligonukleotida sekuen spesifik dilabel dengan pewarna yang berbeda disebut donor dan aseptor. *Hybridization probe* merubah fluoresensi pada saat hibridisasi dengan fluorescen resonance energy transfer. Peningkatan fluoresensi dibaca secara kuantitatif sebanding dengan amplifikasi produk yang spesifik (Camara et al., 2021). Keunggulan dari hybridization probe adalah spesifisitas yang tinggi karena hanya berikatan dengan urutan target yang benar, sehingga meminimalkan sinyal latar belakang. Namun, hybridization probe juga memiliki beberapa kelemahan. Desain dan sintesis probe memerlukan biaya tinggi serta waktu yang lebih lama dibandingkan metode pewarna interkalasi seperti SYBR Green (Artika et al., 2022).



Gambar 10.3 Hybridization Probes (eurofins, 2023)

Keberadaan DNA hasil amplifikasi dapat diamati pada kurva yang muncul sebagai hasil akumulasi *fluorescence* dari pewarna atau probe. Perubahan *fluorescence* selama reaksi diukur

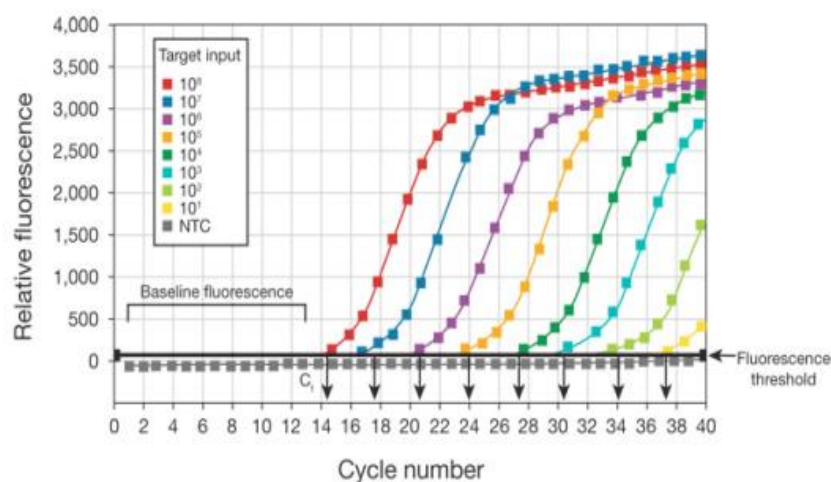
dengan instrumen yang menggabungkan siklus termal dengan kemampuan *scanning fluorescence dye*. Dengan memplot *fluorescence* terhadap jumlah siklus, *Real-time PCR* menghasilkan plot amplifikasi yang mewakili akumulasi produk selama seluruh reaksi PCR berlangsung.

Pemeriksaan dengan metode real-time PCR akan memberikan hasil berupa kurva, dimana sumbu x menggambarkan jumlah siklus amplifikasi dan sumbu y menggambarkan sinyal fluoresen dari reaksi real-time PCR. Selain itu terdapat juga sebuah garis yang dinamakan garis *threshold*, dimana garis tersebut memotong kurva pada saat sinyal fluoresen mengalami kenaikan yang signifikan. Titik potong antara kurva dengan garis *threshold* adalah nilai CT.

Dengan demikian, Nilai *Cycle Threshold* (Ct) didefinisikan sebagai jumlah siklus amplifikasi menggunakan qPCR yang diperlukan untuk fluoresensi produk PCR yaitu target/amplikon untuk dideteksi melewati garis *threshold* yang berada di atas sinyal noise. Garis *threshold* ini berada pada 10 standar deviasi (SD) dari sinyal *noise* (Public Health Ontario, 2020). Siklus Ct adalah prinsip dasar dari real-time PCR dan sebagai bagian yang sangat penting untuk memperoleh data yang akurat. Nilai Ct qPCR sangat berkorelasi dengan kuantitas urutan DNA target (Lazaro & Hernandez, 2013)

Menurut Lazaro dan Hernandez (2013). kurva amplifikasi terdiri dari 3 fase utama, yaitu fase linear ground, fase eksponensial dan fase plateau. Berikut adalah penjelasannya.

1. Fase linear ground, merupakan fase dimana real-time PCR baru saja dimulai dan sinyal fluoresen belum naik secara signifikan. Biasanya fase ini terjadi pada 10-15 siklus.
2. Fase eksponensial atau log-linear, merupakan fase dimana reaksi mencapai periode optimal dari proses amplifikasinya. Fase ini menggambarkan duplikasi produk real-time PCR dari setiap siklus reaksinya.
3. Fase plateau, merupakan fase dimana komponen reaksi menjadi terbatas dan intensitas fluoresen tidak lagi bertambah secara signifikan.



Gambar 10.4 Kurva Amplifikasi

Sumber : *Real-Time* PCR Handbook. 2012. Life Technologies Corporation Fluoresensi vs jumlah siklus Real-time PCR

Kegiatan Praktikum

Pemeriksaan : Amplifikasi DNA Hepatitis B dengan Real Time PCR (Berbasis TaqMan)

Alat dan : Alat

- Bahan**
1. Biosafety Cabinet
 2. PCR Cabinet
 3. Real Time PCR
 4. Refrigerated centrifuge
 5. Microtube 1,5 mL, dan 0,2 mL
 6. Micropipet

Bahan

1. Sampel hasil isolasi DNA sebagai DNA template
2. Norgen's Hepatitis B Virus (HBV) berisi:
 - a. MDx TaqMan 2X PCR Master Mix
 - b. HBV Primer & Probe Mix
 - c. HBV Positive Control
 - d. Nuclease-Free Water (Negative control)

Cara Kerja :

1. Cairkan Norgen's Hepatitis B Virus (HBV) dengan cara menyimpannya pada suhu kamar.
2. Vortex 3-5 detik, lalu putar sebentar menggunakan microsentrifuge agar mendapatkan material yang terdapat pada bawah tube reagen.
3. Siapkan reagen master mix sesuai dengan jumlah reaksi yang akan dilakukan
4. Berikut untuk preparasi kontrol negative, positif, dan sampel dalam 1x reaksi:

Komponen	Kontrol Negatif (µL)	Kontrol positif (µL)	Sampel (µL)
MDx TaqMan 2X PCR Master Mix	10	10	10
HBV Primer & Probe Mix	2	2	2
Nuclease-Free Water	8	-	5
Sample DNA*	-	-	3
HBV Positive Control (PosC)	-	8	-
Total	20	20	20

5. Setelah semua reagen dimasukan, lalu divortex dan di spindown selama 10 detik.

6. Tube PCR ditutup, kemudian dispindown.
7. Microtube dimasukan ke thermal cyclers, dan lakukan pengaturan alat sebagai berikut:

Tahapan	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Initial denaturasi	95	3 menit	1
Denaturasi	95	15 detik	40
Annealing-Extention	60	30 detik	

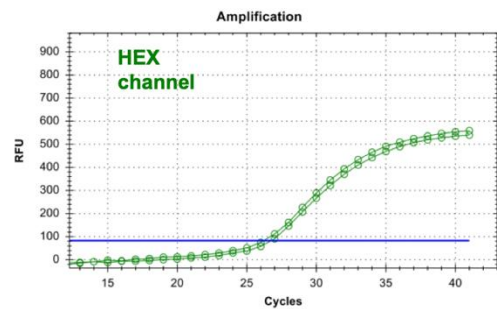
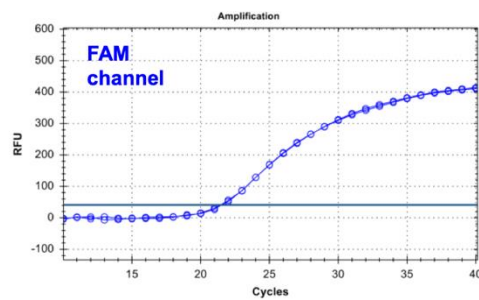
8. Setelah selesai baca kurva amplifikasi

Interpretasi

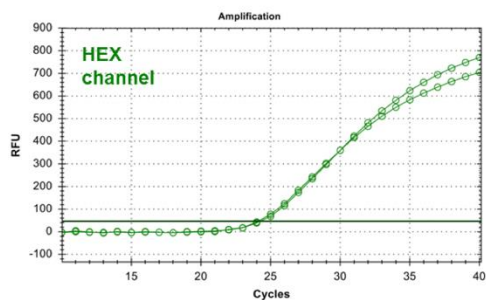
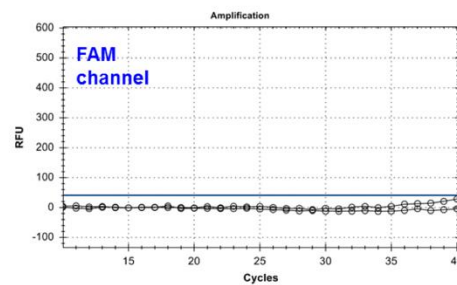
Hasil

FAM (Target Deteksi)	HEX (Validasi PCR)	Hasil
+	+	Positif
-	+	Negatif
-	-	Invalid

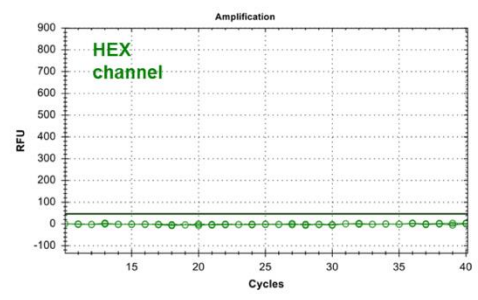
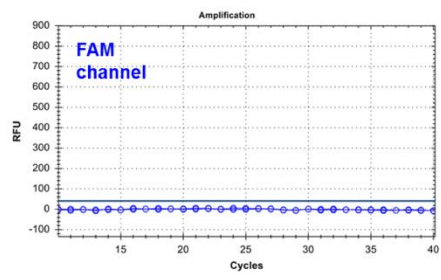
Contoh Kurva Amplifikasi Positif



Contoh Kurva Amplifikasi Negatif



Contoh Kurva Amplifikasi Invalid



**LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM**

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Zhang, Q. and Cao, G. (2011) 'Genotypes , mutations , and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma', *Hepatitis Moltlily*, 11(2), pp. 86–91.
- Torres, C. *et al.* (2013) 'In fl uence of overlapping genes on the evolution of human hepatitis B virus', 441, pp. 40–48. doi: 10.1016/j.virol.2013.02.027.
- Shuyu, L. I. U. *et al.* (2011) 'Three-dimensional structure of the hepatitis B core antigen particle truncated at residue 154', 54(2), pp. 171–174. doi: 10.1007/s11427-010-4098-x.
- Ezzikouri, S. *et al.* (2014) 'Recent insights into hepatitis B virus-host interactions', *Journal of Medical Virology*, 86(6), pp. 925–932. doi: 10.1002/jmv.23916.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., Robinson, P. A., Inglehearn, C. F., Isaacs, J. D., & Markham, A. F. (2003). *Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions* *Real-time PCRSYBR-greenrearrangementamplificationdeletion*. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/18>
- Calvert, C., Ronsmans, C., Chetty, T., Thorne, C., Coutsooudis, A., M. Christopher, A. M. L. S., Prieto, L. M., McPhee, C. F., Rojas, P., Mazariegos, D., Muñoz, E., Mellado, M. J., Holguín, Á., Navarro, M. L., González–Tomé, M. I., Ramos, J. T., Norris, L. B., Pharm, D., Moodley, T., … Haberl, A. (2016). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *PLoS ONE*, 16(1), 91–98. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1>
- Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. In *Genes* (Vol. 13, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes13122387>
- Lazaro, R. david, & Hernandez, M. (2013). *Real-time PCR in Food Science Introduction*. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*.
- Hepatitis B Virus (HBV) TaqMan PCR Kit

BAB XI

PEMERIKSAAN *Mycobacterium tuberculosis*

- Kompetensi Dasar** : Mahasiswa dapat melakukan amplifikasi gen spesifik menggunakan teknik PCR GenXpert
- Indikator capaian** : Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan amplifikasi gen spesifik *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan PCR GenXpert

A. *Mycobacterium tuberculosis*

Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) merupakan salah satu penyakit infeksi yang tinggi di negara Indonesia. Negara Indonesia telah menempati peringkat kedua 2 di dunia dalam angka kejadian Tuberkulosis setelah negara India. Penemuan kasus TBC di Indonesia pada tahun 2022, yaitu 724,304 kasus dengan jumlah temuan kasus TB sensitif obat sebesar 711,778 dan 12,531 kasus TB yang resisten obat. Cakupan penemuan kasus tuberkulosis sebesar 74.7% dari target 90%. Terjadi peningkatan sebesar 29% dibandingkan capaian tahun sebelumnya.

B. Pemeriksaan *Mycobacterium tuberculosis* GeneXpert®

Pemeriksaan MTb yang telah dilakukan adalah Rapid Diagnostics Test (RDT), Pewarnaan Ziehl-Neelsen, Tes Mantoux atau *tuberculin skin test*, Interferon-Gamma Release Assay (IGRA) dan Tes Cepat Molekuler (TCM) atau Genxpert. Pada saat ini pemerintah lewat Puskesmas telah melakukan pemeriksaan skrining untuk infeksi MTb dengan pemeriksaan tes cepat molekuler (TCM) atau alat GeneXpert. Alat GeneXpert mempunyai prinsip pemeriksaan Nested-Real Time PCR. Sejak tahun 2012, Program Nasional Penanggulangan TBC telah menggunakan pemeriksaan TCM GeneXpert® dengan kartrid Xpert MTB/RIF yang secara cepat dapat mengidentifikasi MTB serta resistensi terhadap rifampisin secara simultan. Oleh karena itu, inisiasi dini terapi yang akurat dapat diberikan. Hasil penelitian skala besar menunjukkan bahwa pemeriksaan TCM GeneXpert® dengan Xpert MTB/RIF Ultra memiliki sensitivitas dan spesifisitas untuk diagnosis TBC yang jauh lebih baik dibandingkan pemeriksaan mikroskopis serta mendekati kualitas diagnosis dengan pemeriksaan biakan. Selain mendeteksi resistensi rifampisin, alat TCM GeneXpert® dengan teknologi tipe 10 color juga dapat mendeteksi resistensi terhadap obat INH, golongan fluoroquinolon, obat injeksi lini dua dan ethionamide menggunakan kartrid Xpert MTB/XDR.

Pemeriksaan TCM GeneXpert® mampu mendeteksi DNA MTB kompleks secara semi kuantitatif serta resistensi Obat Anti Tuberkulosis (OAT) secara cepat dan akurat dari spesimen

sputum maupun non sputum. Pemeriksaan TCM tidak dapat digunakan sebagai pemeriksaan pemantauan pengobatan TBC. Pemeriksaan TCM dengan Xpert MTB/RIF merupakan metode deteksi molekuler berbasis *nested real-time* PCR untuk diagnosis TBC. Primer PCR yang digunakan mampu mengamplifikasi sekitar 81 bp daerah inti gen *rpoB* MTB kompleks. *Probe* dirancang untuk membedakan sekuens *wild type* dan mutasi pada daerah inti yang berhubungan dengan resistansi terhadap rifampisin.

Pemeriksaan tersebut dapat dilakukan dengan alat GeneXpert® tipe 6-Color dan 10- Color, menggunakan sistem otomatis yang mengintegrasikan proses purifikasi spesimen, amplifikasi asam nukleat, dan deteksi sekuens target. Sistem tersebut terdiri dari alat GeneXpert®, komputer dan perangkat lunak. Setiap pemeriksaan menggunakan kartrid sekali pakai dan dirancang untuk meminimalkan kontaminasi silang. Kartrid Xpert MTB/RIF juga memiliki *Sample Processing Control* (SPC) dan *Probe Check Control* (PCC). SPC berfungsi sebagai kontrol proses yang adekuat terhadap bakteri target untuk memonitor keberadaan penghambat reaksi PCR, sedangkan PCC berfungsi untuk memastikan proses rehidrasi reagen, pengisian tabung PCR pada kartrid, integritas *probe*, dan stabilitas *dye*.

Kegiatan Praktikum

Pemeriksaan : *Mycobacterium tuberculosis*

Tujuan : Mendeteksi adanya infeksi Mtb serta resistensi Rifampisin pada sputum

Prinsip : Pemeriksaan TCM dengan Xpert MTB/RIF merupakan metode deteksi molekuler berbasis *nested real-time* PCR untuk diagnosis TBC. Primer PCR yang digunakan mampu mengamplifikasi sekitar 81 bp daerah inti gen *rpoB* MTB kompleks. *Probe* dirancang untuk membedakan sekuens *wild type* dan mutasi pada daerah inti yang berhubungan dengan resistensi terhadap rifampisin.

Metode : GeneXpert

Alat dan Bahan : **Alat**

1. Pot specimen sputum
2. Label
3. Spidol
4. Cartridge GeneXpert
5. Alat GeneXpert

Bahan

1. Sputum purulent
2. Sample reagent
3. sarung tangan
4. masker

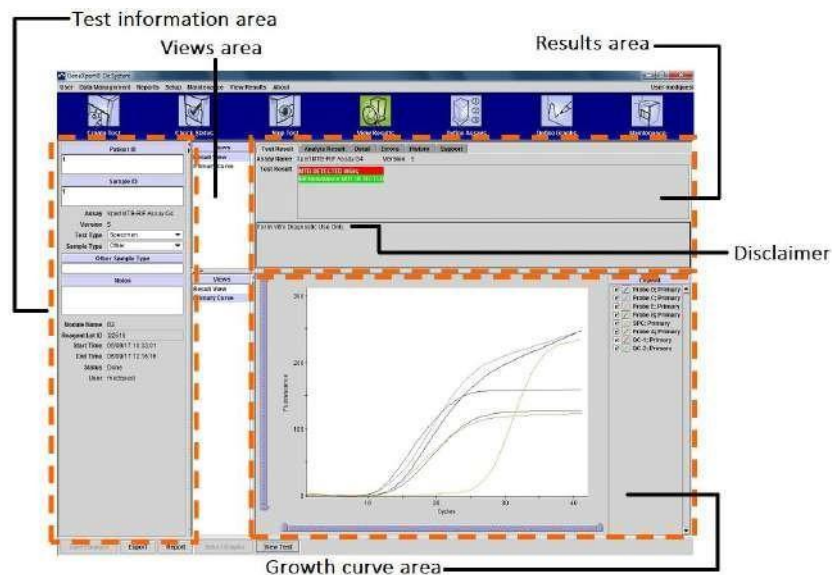
Cara Kerja

1. Pengambilan specimen sputum
 - a. Disediakan pot dahak bertutup ulir dan bermulut besar
 - b. Ditulis nama pasien dan nomor identitas (Hindari penulisan identitas pada tutup pot specimen)
 - c. Pengumpulan dahak atau sputum dilakukan di tempat khusus seperti sputum booth, atau ditempat terbuka yang muda dibersihkan
 - d. Tarik napas sebanyak 2-3 kali dan setiap kali hembuskan napas dengan kuat.
 - e. Diletakan pot dahak yang sudah dibuka berdekatan dengan mulut

- f. Batuk dan keluarkan dahak ke dalam pot. Tutup langsung pot spesimen dengan rapat. Hindari adanya tumpahan pada bagian luar pot specimen. Jumlah dahak yang terkumpul minimal sebanyak 1 ml.
 - g. Bersihkan mulut dengan tisu dan buang tisu di tempat sampah infeksius yang sudah disediakan
 - h. Cuci tangan dengan air mengalir dan sabun
2. Prosedur pengolahan specimen dahak
- a. Diberi label identitas pada setiap kartrid. Identitas specimen dapat ditempel atau ditulis pada bagian sisi kartrid dan tidak menutupi bagian barcode
 - b. Bukalah penutup pot dahak, kemudian tambahkan reagent buffer sebanyak 2 kali dari volume specimen(1:2)
 - c. Ditutup Kembali pot dahak, kemudian dikocok dengan kuat sampai specimen dahak dan sample reagent tercampur baik.
 - d. Kartrid didiamkan selama 10 menit pada suhu ruangan
 - e. Kartrid di kocok Kembali dan diamkan selama 5 menit
 - f. Bilah masih terdapat gumpala, dikocok Kembali agar menjadi homogen sempurna dan dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar.
 - g. Buka penutup kartrid, kemudian buka tempat penampung specimen. Gunakan pipet yang disediakan untuk memindahkan specimen dahak yang telah diolah sebanyak 2 ml ke dalam kartrid baru secara perlahan-lahan untuk mencegah adanya gelembung.
 - h. Tutuplah kartrid secara perlahan dan masukkan kartrid kedalam alat TCM GeneXpert*
- * Jika terdapat sisa specimen yang telah diolah, specimen tersebut dapat disimpan dengan syarat:
- 35⁰C selama 4 jam (untuk kartrid MTB/RIF)
 - 35⁰C selama 2,5 jam (untuk kartrid MTB/RIF Ultra dan MTB/XDR)
 - 2-8⁰C selama 4 jam (untuk kartrid MTB/RIF Ultra dan MTB/XDR)
3. Prosedur membuat pemeriksaan TCM GeneXper
- a. Pada halaman utama GeneXpert Dx System, Klik “Create Test”, maka akan muncul kotak dialog “Please scan cartridge barcode”.
 - b. Pindai barcode kartrid menggunakan barcode scanner atau pilih “manual entry” untuk memasukkan 16-digit nomor seri kartrid.

- c. Setelah nomor seri kartris masuk, input data berikut dengan ketentuan pengisian:
 1. Patient ID
 2. Patient ID2
 3. Sample ID
 4. Pasien nama
- d. Lampu warna hijau di alat TCM Genexpert akan berkedip pada modul yang terpilih otomatis. Buka pintu modul dan letakkan kartrid TCM GeneXpert
- e. Tutuplah pintu modul dengan sempurna hingga terdengar bunyi “klik”. Pemeriksaan akan dimulai dan lampu hijau akan tetap menyala tanpa berkedip. Pemeriksaan akan berlangsung kurang lebih 2 jam. Saat pemeriksaan selesai, lampu akan mati secara otomatis dan pintu modul akan terbuka secara otomatis.
- f. Buka pintu modul dan keluarkan kartrid. Kartrid yang telah dipakai dibuang ke tempat sampah infeksius.
4. Cara menampilkan hasil pemeriksaan
 - a. Klik menu “view result” pada alat GeneXpert untuk melihat hasil pemeriksaan semua sampel, untuk memilih hasil pemeriksaan, klik “View test”
 - b. Setelah mengklik “View Test”, maka akan muncul kotak dialog “Select test to be viewed”. Pilihlah pemeriksaan yang diinginkan, kemudian klik “ok”, maka hasil pemeriksaan akan muncul.

Interpretasi Hasil : TCM GeneXpert® memberikan hasil pemeriksaan melalui pengukuran sinyal fluoresensi dan algoritma perhitungan otomatis. Hasil pemeriksaan TCM GeneXpert® akan menunjukkan ada tidaknya DNA *Mycobacterium tuberculosis* kompleks dan ada tidaknya mutasi penyandi resistansi rifampisin, serta perhitungan semikuantitatif jumlah basil pada spesimen berdasarkan nilai Ct (*high*, <16; *medium*, 16–22; *low*, 22–28; *very low*, >28).



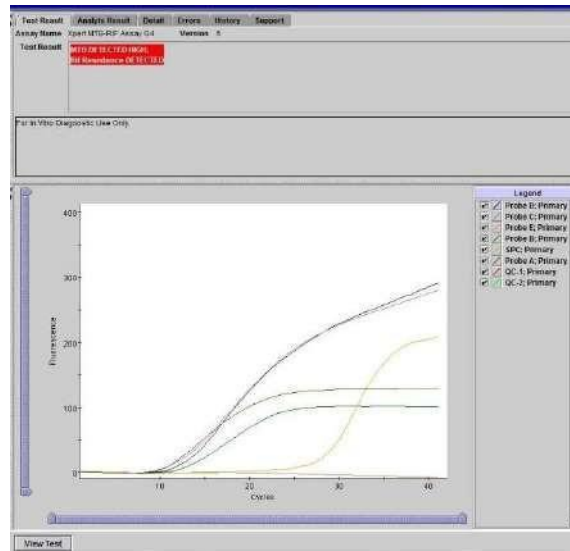
Gambar 11.1. Tampilan jendela pembacaan pada menu “View Result”.

Hasil	Interpretasi	Tindak lanjut
MTB DETECTED; Rif Resistance DETECTED	- DNA MTB terdeteksi - Mutasi gen <i>rpoB</i> terdeteksi, kemungkinan besar resistan terhadap rifampisin	Lanjutkan sesuai dengan alur diagnosis TBC resistan obat
MTB DETECTED; Rif Resistance NOT DETECTED	- DNA MTB terdeteksi - Mutasi gen <i>rpoB</i> tidak terdeteksi. Kemungkinan besar sensitif terhadap rifampisin	Lanjutkan sesuai dengan alur diagnosis TBC biasa
MTB DETECTED; Rif Resistance INDETERMINATE	- DNA MTB terdeteksi - Mutasi gen <i>rpoB</i> / resistansi rifampisin tidak dapat ditentukan karena sinyal penanda resistansi tidak cukup terdeteksi	Ulangi pemeriksaan*) secepatnya menggunakan spesimen dahak baru dengan kualitas yang baik

MTB Not Detected	DNA MTB tidak terdeteksi	Lanjutkan sesuai alur diagnosis TBC
INVALID	Keberadaan DNA MTB tidak dapat ditentukan karena kurva SPC tidak menunjukkan kenaikan jumlah amplikon, proses spesimen tidak benar, reaksi PCR terhambat	Ulangi pemeriksaan dengan kartrid dan spesimen dahak baru*), pastikan spesimen tidak terdapat bahan-bahan yang dapat menghambat PCR.
ERROR	Keberadaan DNA MTB tidak dapat ditentukan, <i>quality control internal</i> gagal atau terjadi kegagalan sistem	Ulangi pemeriksaan dengan kartrid baru*), pastikan pengolahan spesimen sudah benar.

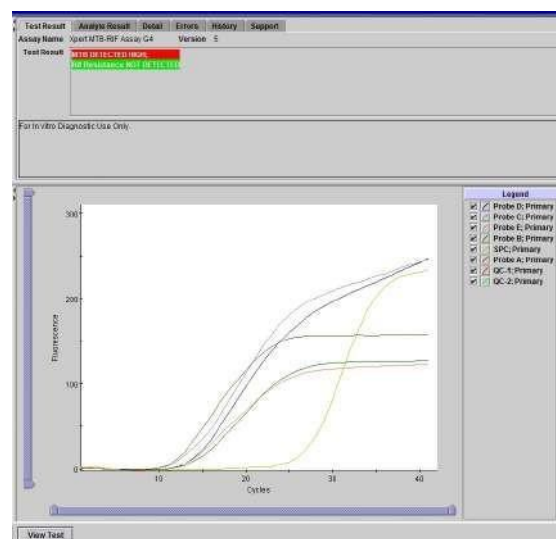
Keterangan: *): Apabila terjadi Indeterminate/Invalid/Error/No Result maka proses pemeriksaan dilakukan kembali.

Contoh gambar hasil di alat TCM GeneXpert:



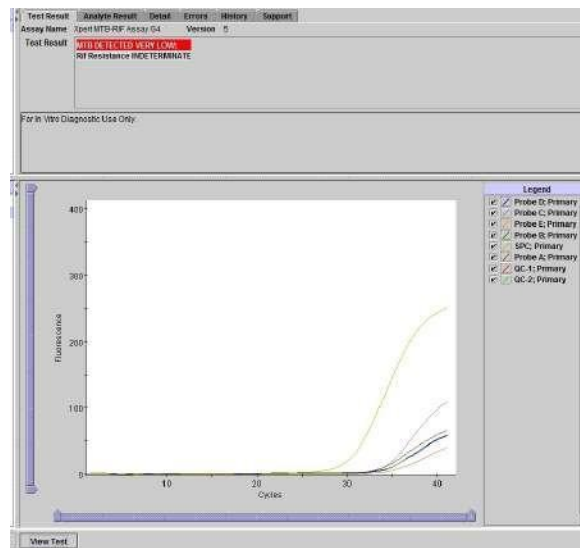
Gambar 11.2. Contoh Hasil MTB DETECTED; Rif Resistance DETECTED.

Keterangan: Kenaikan kurva mengindikasikan ada gen MTB yang teramplifikasi. Pada gambar di atas, ada satu kurva yang tidak mengalami kenaikan yaitu probe B. Hal tersebut mengindikasikan bahwa terdapat mutasi pada gen *rpoB* di daerah probe B, sehingga probe B tersebut tidak dapat mengamplifikasi gen. Hal yang sama dapat terjadi pada probe A-E.

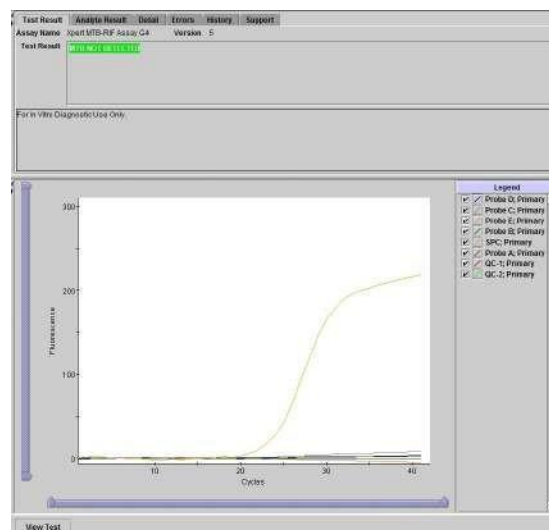


Gambar 11.3. Contoh Hasil MTB DETECTED; Rif Resistance NOT DETECTED.

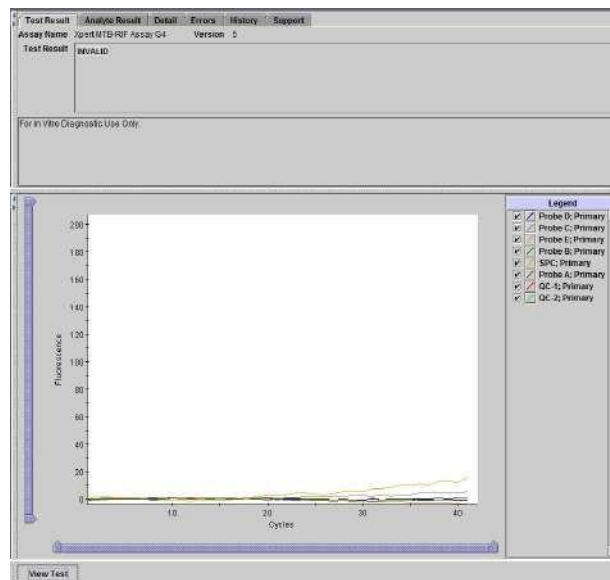
Keterangan: Semua kurva menunjukkan kenaikan, artinya semua gen MTB teramplifikasi dan tidak ada mutasi di daerah gen *rpoB*.



Gambar 11.4. Contoh hasil MTB DETECTED; Rif Resistance INDETERMINATE.
Keterangan: Kurva gen *rpoB* menunjukkan kenaikan yang tidak signifikan karena sinyal penanda resistansi tidak cukup terdeteksi dan resistansi rifampisin tidak dapat ditentukan.

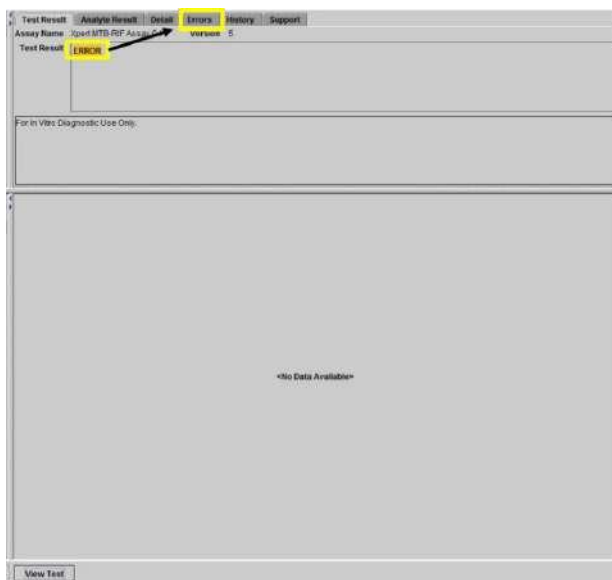


Gambar 11.5. Contoh hasil MTB NOT DETECTED.
Keterangan: Kurva SPC (kurva kuning) sebagai kontrol mengalami kenaikan yang menandakan reaksi PCR berjalan dengan baik. Probe A-E tidak mengalami kenaikan yang menandakan tidak terdapat DNA MTB di dalam specimen.

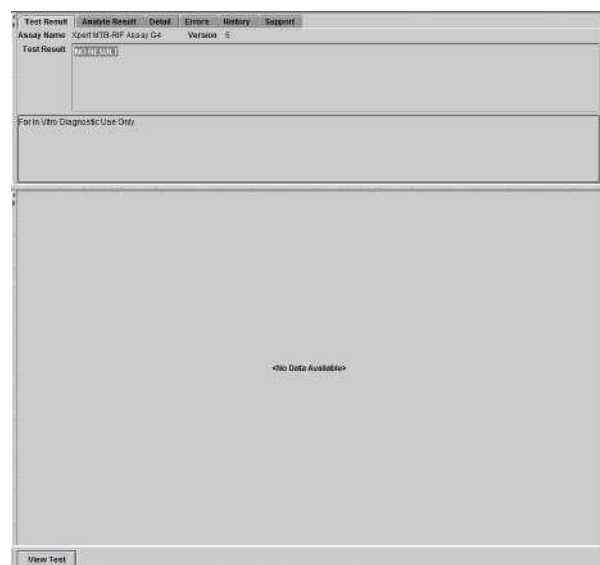


Gambar 11.6. Contoh hasil INVALID.

Keterangan: Tidak ada kurva yang mengalami kenaikan, baik probe A-E dan SPC sebagai kontrol. Hal tersebut menandakan proses PCR terganggu.



Gambar 11.7. Contoh hasil ERROR



Gambar 11.8. Contoh hasil No Result.

LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Cepheid. (2020). Package Insert.Xpert® MTB/RIF.
- Kementerian Kesehatan RI. (2023). Laporan Program Penanggulangan Tuberkulosis Tahun 2022.
- Kementerian Kesehatan RI. (2023). Petunjuk Teknis Pemeriksaan Tuberkulosis menggunakan Tes Cepat Molekuler GeneXpert.
- Susilawati, T. N., & Larasati, R. (2019). A recent update of the diagnostic methods for tuberculosis and their applicability in Indonesia: a narrative review. *Medical Journal of Indonesia*, 28(3), 284-91. <https://doi.org/10.13181/mji.v28i3.2589>
- Zaporojan N, Negrean RA, Hodişan R, Zaporojan C, Csep A, Zaha DC. Evolution of Laboratory Diagnosis of Tuberculosis. *Clinics and Practice*. 2024; 14(2):388-416. <https://doi.org/10.3390/clinpract14020030>

BAB XII

GEL ELEKTROFORESIS

- Kompetensi Dasar** : Mahasiswa mampu memahami dasar – dasar Elektroforesis gel
- Indikator capaian** : Mahasiswa dapat menyiapkan gel agarosa dan melakukan elektroforesis DNA dengan benar

A. Gel Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul yang bermuatan (dari kutub negative menuju ke kutub positif) di dalam gel yang direndam dalam larutan penyangga. Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang Bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Dengan demikian elektroforesis dapat digunakan untuk separasi makromolekul (seperti protein dan asam nukleat). Posisi molekul yang terseparasi pada gel dapat dideteksi dengan pewarnaan atau autoradiografi, ataupun dilakukan kuantifikasi dengan densitometer. Ada bermacam-macam zat kimia yang dapat digunakan sebagai gel di dalam proses elektroforesis. Penggunaan jenis gel disesuaikan dengan tujuan yang akan dicapai. Secara umum, ada dua jenis gel yang biasa digunakan, yaitu Agarose Gel Electrophoresis (AGE) yang divisualisasi menggunakan ethidium bromide untuk analisis DNA, dan Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) yang divisualisasi menggunakan silver staining atau Coomassie Brilliant Blue untuk analisis protein. Sementara AGE banyak digunakan untuk visualisasi produk PCR, PAGE lebih sering digunakan untuk analisis protein.

Prinsipnya alat elektroforesis dibagi menjadi 2 yaitu horizontal electrophoresis dan vertical electrophoresis. Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan matriks penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan. Gel poliakrilamid dan agarosa merupakan matriks penyangga yang banyak dipakai untuk separasi protein dan asam nukleat.

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul seluler berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Banyak molekul biologi bermuatan listrik yang besarnya tergantung pada pH dan komposisi medium dimana molekul biologi tersebut terlarut. Bila berada dalam suatu medan listrik, molekul biologi yang bermuatan positif akan bermigrasi ke elektroda negatif dan sebaliknya. Prinsip inilah yang dipakai dalam elektroforesis untuk memisahkan molekul molekul berdasarkan muatannya.

Teknik elektroforesis dapat digunakan dengan memanfaatkan muatan listrik yang ada pada makromolekul, misalnya DNA yang bermuatan negatif. Jika molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, misalnya gel agarose, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif.

Elektroforesis protein pada dasarnya dilakukan dengan prinsip serupa seperti yang digunakan dalam elektroforesis DNA, tetapi dengan menggunakan gel poliakrilamid. Seringkali dalam pembuatan gel akrilamid ditambahkan sodium dodecyl sulphate (SDS) yang merupakan senyawa untuk mendisosiasikan protein menjadi subunitnya. Metode elektroforesis yang demikian disebut SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gel electrophoresis).

Polyacrilamide Gel Electrophoreis (SDS-PAGE) adalah teknik untuk memisahkan rantai polipeptida pada protein berdasarkan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik, yang merupakan fungsi dari panjang rantai polipeptida atau berat molekulnya. Hal ini dicapai dengan menambahkan deterjen SDS dan pemanasan untuk merusak struktur tiga dimensi pada protein dengan terpecahnya ikatan disulfide yang selanjutnya direduksi menjadi gugus sulfhidril. SDS akan membentuk kompleks dengan protein dan kompleks ini bermuatan negatif karena gugus-gugus anionic dari SDS.

B. Visualisasi DNA dengan Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul seluler berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Teknik ini dapat digunakan dengan memanfaatkan muatan listrik yang ada pada makromolekul, misalnya DNA yang bermuatan negatif. Jika molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, misalnya gel agarose, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif.

Prinsip kerja elektroforesis gel adalah molekul-molekul tersebut akan bermigrasi menuju kutub positif atau kutub negatif berdasarkan muatan yang terkandung di dalamnya. Molekul-molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul-molekul yang bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda). DNA divisualisasi menjadi pita-pita yang masing-masing terdiri atas molekul DNA dengan panjang yang sama

Kecepatan laju migrasi suatu molekul dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu: arus listrik, semakin besar arus listrik yang digunakan maka laju migrasi akan semakin cepat; ukuran molekul, semakin kecil ukuran suatu molekul maka laju migrasinya akan semakin

cepat; bentuk molekul, molekul yang memiliki rasio axial tinggi memiliki laju migrasi yang lebih lama daripada molekul berbentuk spherical; konsentrasi gel, semakin rendah konsentrasi gel maka laju migrasi semakin cepat karena gesekan molekulnya berkurang; adanya pewarna Etidium Bromida di dalam gel dapat menyebabkan pengurangan kecepatan laju migrasi; dan komposisi larutan buffer, larutan buffer berkekuatan ion tinggi akan meningkatkan panas sehingga aliran listrik dan laju migrasi molekul pun meningkat.

Persentase agarose yang digunakan tergantung dari ukuran fragmen yang akan diperiksa. Konsentrasi gel agarose dilihat dari persentase agarose terhadap volume bufer (w/v), normalnya konsentrasi gel agarose berada pada range 0,2% - 3%. Gel agarose biasa digunakan untuk memisahkan molekul DNA yang berukuran ~100 bp hingga ~20 kbp di dalam medan magnet secara tidak langsung. Semakin rendah konsentrasi gel agarose, maka semakin cepat migrasi fragmen DNA. Jadi, jika tujuan kita adalah untuk memisahkan fragmen DNA berukuran besar, maka perlu dibuat gel agarose dengan konsentrasi rendah. Sebaliknya, jika fragmen DNA yang hendak dipisahkan berukuran kecil, maka perlu dibuat gel agarose dengan konsentrasi tinggi (Nurhayati & Sri, 2017)..

konsentrasi gel agarose untuk berbagai range ukuran DNA

SENTRASI AGAROSE (%)	RANGE UKURAN DNA (BP)
0,2	5000-40000
0,4	5000-30000
0,6	3000-10000
0,8	1000-7000
1	500-5000
1,5	300-3000
2	200-1500
3	100-1000

Dalam elektroforesis dilakukan pewarnaan DNA untuk visualisasi bahan yang biasa digunakan yaitu Etidium Bromida (EtBr) dan Brom Fenol Blue. Hal tersebut karena EtBr dapat meningkatkan daya fluoresensi dari DNA sehingga dapat terlihat jelas, sedangkan Brom Fenol Blue berfungsi sebagai pewarna untuk memantau kecepatan molekul DNA pada gel.

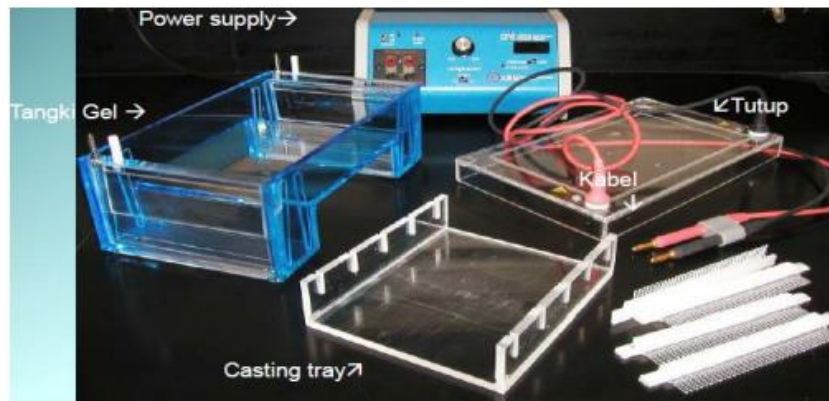
Dengan elektroforesis, dapat diketahui ukuran hasil PCR dengan membandingkan jarak pada pita yang terbentuk pada marka/ DNA ladder. Marka merupakan segmen DNA yang telah diketahui ukurannya. Marka berfungsi untuk mengetahui ukuran DNA hasil amplifikasi.

Loading dye merupakan senyawa yang memiliki massa jenis yang tinggi, sebagai pemberat untuk DNA sehingga DNA bisa tenggelam di dalam sumur.

Komponen Elektroforesis Agarose

Komponen Elektroforesis Agarose terdiri dari :

1. Comb atau sisir digunakan untuk membentuk well pada gel agarosa
2. Tray digunakan sebagai cetakan gel agarosa
3. Chamber digunakan sebagai wadah gel agarosa
4. Sumber listrik digunakan untuk memberikan arus pada saat proses elektroforesis
5. Marka merupakan segmen DNA yang telah diketahui ukurannya. Marka berfungsi untuk mengetahui ukuran DNA hasil amplifikasi.
6. Loading dye merupakan senyawa yang memiliki massa jenis yang tinggi, sebagai pemberat untuk DNA sehingga DNA bisa tenggelam di dalam sumur



Gambar 12.1 Seperangkat alat elektroforesis gel agarose

Kegiatan Praktikum:

Pemeriksaan : Elektroforesis Gel Agarose

Alat dan Bahan : Alat

1. Elektroforesis *apparatus*
2. Tray
3. Comb/sisir
4. Neraca analitik
5. Gelas ukur 100 mL
6. Erlenmeyer 250 mL
7. Micropipet
8. UV transilluminator

Bahan

1. Sampel hasil amplifikasi DNA
2. Kontrol negatif
3. Agarose powder
4. TAE buffer 1x

5. Ethidium Bromide (EtBr)/Gel Red/SYBR Green
6. *Loading dye*
7. *DNA Ladder*
8. *Nuclease Free Water*

Cara Kerja :

Pembuatan Gel Agarose 1,5%

1. Timbang agarose powder sebanyak 0,60 gram menggunakan neraca analitik
2. Agarose yang telah ditimbang, dilarutkan dalam 40 mL TAE Buffer 1X menggunakan Erlenmeyer 250 mL
3. Didihkan larutan tersebut menggunakan hotplate atau dapat juga menggunakan microwave sambil dihomogenkan
4. Setelah mendidih, diamkan dan tunggu hingga hangat-hangat kuku
5. Masukkan larutan tersebut kedalam Tray yang telah dipasang sisir/Comb secara perlahan dan usahakan tidak ada gelembung yang terbentuk
6. Tunggu hingga larutan mengeras membentuk Gel agarose, kira-kira 30 menit
7. Sisir dilepas, Gel agarose siap digunakan
8. Bila tidak langsung digunakan, dapat direndam dengan larutan TAE Buffer 1X

Running sampel

1. Siapkan elektroforesis apparatus
2. Masukkan gel agarose yang telah dibuat kedalam Tray
3. Genangi dengan TAE buffer 1x hingga menutup permukaan gel agarose
4. Masukkan 5 µl marker pada sumur 1
5. Masukkan 5 µl kontrol positif dan negatif pada sumur 2 dan 3.
6. Masukkan 5 µl sampel pada sumur 4 sampai hingga ke sumur kesekian (sesuai banyaknya sampel)*
7. Jalankan elektroforesis selama 60 menit pada 100 volt
8. Jika telah selesai, direndam dalam larutan pewarna selama 30 menit,
9. baca gel agarose pada UV Transluminator

* CATATAN : Bila dalam PCR mix tidak mengandung pemberat, maka perlu ditambahkan Loading dye sebelum dimasukkan kedalam sumur

LEMBAR KERJA
KEGIATAN PRAKTIKUM

A. PENGAMATAN/PERHITUNGAN

B. PEMBAHASAN

C. KESIMPULAN

Tanda tangan pembimbing

Tanda tangan mahasiswa

DAFTAR PUSTAKA

- Nurhayati, B., Darmawati, S., & Kesehatan, P, P, S, (2018), Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medis (TLM): Biologi Sel dan Molekuler.
- Fatchiyah, Sri Widyarti, Estri Laras Arumingtyas, Sofi Permana. 2012. Buku Praktikum Teknik Analisa Biologi Molekuler. Laboratorium Biologi Molekuler Dan Seluler Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang
- Febriana Dwi Wahyuni. 2019. Modul Praktikum Biologi Molekuler. Program Studi Bioteknologi Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Esa Unggul Jakarta
- Hanada, K. (2020). *Introduction and Perspectives of DNA Electrophoresis*.
- Harahap, M. R., Kimia, P. S., & Sains, F. (2018). Elektroforesis : Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1), 21–26.
- Khoirul Anam. 2022. Identifikasi Epitop Antigenic Protein Pili 49,8 Kda Shigella Flexneri, Imunogenitas Mukosa Usus, Protektivitas Sel Enterosit Mencit Balb/C Sebagai Kandidat Vaksin Shigellosis. Disertasi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Kholifah Holil. 2014. Buku Petunjuk Praktikum Teknik Analisis Biologi Molekuler. Jurusan Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
- Paul Menter, Bio-Rad Laboratories, 2000. Acrylamide Polymerization — A Practical Approach. Bio-Rad Laboratories, Inc.

BIODATA PENULIS



Fusvita Merdekawati S.ST, MM, M.Si lahir di Bandung, 17 Agustus 1985. Jenjang pendidikan penulis meliputi D3 dan D4 Teknologi Laboratorium Medis di Poltekkes Kemenkes Bandung, S2 di Universitas Winaya Mukti mengambil konsentrasi Manajemen Sumber Daya Manusia dan di Institut Teknologi Bandung dengan konsentrasi Bioteknologi Farmasi.

Saat ini penulis merupakan pengajar di Prodi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Poltekkes Kemenkes Bandung.

Email:

fusvita.tlm@staff.poltekkesbandung.ac.id



Meutia Srikandi Fitria, S.Si, M.Biotech lahir di Surakarta, 9 April 1991. Jenjang pendidikan penulis meliputi S1 Biologi di Universitas Sebelas Maret, S2 Bioteknologi di Universitas Gadjah Mada.

Saat ini penulis merupakan pengajar di Program studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medik Universitas Muhammadiyah Semarang.

Email: meutia@unimus.ac.id



Keving Giovani Pascoal, S.Si., M.Sc lahir di Kota Manado tanggal 28 Juli 1994. Jenjang pendidikan penulis meliputi D3 Analisis kesehatan di Poltekkes Kemenkes RI Manado, S1 Analisis Medis di Sekolah Tinggi Analisis Bakti Asih dan S2 Ilmu Kedokteran Tropis di Universitas Gadjah Mada.

Saat ini penulis merupakan pengajar di D3 Teknologi Laboratorium Medik di Poltekkes Kemenkes RI Manado.

Email : kevingpascoal@gmail.com



Dr. Khoirul Anam, S.Si., M.Biomed lahir di Banyuwangi, 10 Oktober 1984. Jenjang pendidikan penulis meliputi Sarjana Biologi di Universitas Mulawarman, pendidikan Magister Ilmu Biomedik dan Program Doktorat Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Saat ini penulis merupakan pengajar di Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medik Institut Teknologi Kesehatan dan Sains Wiyata Husada Samarinda.

Email: khoirulanam@itkeswhs.ac.id



Indah Sari, S.Si.T., M.Si lahir di Palembang, 19 April 1996. Jenjang pendidikan penulis meliputi DIV Teknologi Laboratorium Medis Universitas Katolik Musi Charitas Palembang, dan S2 Ilmu Forensik Universitas Airlangga Surabaya.

Saat ini penulis merupakan pengajar di Prodi DIV Teknologi Laboratorium Medis Universitas Muhammadiyah Ahmad Dahlan Palembang.

Email : iindahsari1917@gmail.com



Anita Dwi Anggraini lahir di Sidoarjo, 4 Agustus 1988. Jenjang pendidikan penulis meliputi D3 dan D4 Analisis Kesehatan di Poltekkes Kemenkes Surabaya, S2 Ilmu Biologi Peminatan Biologi Medik di Universitas Jendral Soedirman.

Saat ini penulis merupakan pengajar di Program studi Diploma Tiga Teknologi Laboratorium Medik Poltekkes Kemenkes Surabaya.

Email: anita.anggraini40@poltekkes-surabaya.ac.id



Reny Pratiwi, S.Si., M.Si., Ph.D. lahir di Pangkalanbun, 8 Maret 1985. Jenjang pendidikan penulis meliputi S1 Biologi Universitas Kristen Duta Wacana, dan S2 Biologi Terapan Universitas Kristen Satya Wacana, dan Ph.D. in Medical Laboratory Technology, Mahidol University, Thailand.

Saat ini penulis merupakan pengajar di Program Studi D4 Analisis Kesehatan, Universitas Setia Budi, Surakarta.

Email: reny.pratiwi@setiabudi.ac.id



**ASOSIASI INSTITUSI PENDIDIKAN TINGGI TEKNOLOGI
LABORATORIUM MEDIK INDONESIA (AIPTLMI)
2025**