

INSTRUMENTASI

**BUKU PETUNJUK
PRAKTIKUM BIOLOGI**

**Laboratorium Biologi
Fakultas Kedokteran
Universitas Islam Sultan Agung
2018**

BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM

INSTRUMENTASI

*Untuk mahasiswa Program Studi Magister Ilmu Biomedik
FK UNISSULA*

Penulis:

Dina Fatmawati, S.Si., M.Sc.

Suparmi, S.Si., M.Si

dr. Iwang Yusuf, M.Si

Dr. Drs. Israhnanto, M.Si

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang

Hak Cipta dilindungi undang-undang © 2019, pada Penulis

Hak publikasi pada Penerbit Fakultas Kedokteran UNISSULA

Dilarang memperbanyak, memperbanyak sebagian atau seluruh isi dari buku ini dalam bentuk apapun, tanpa izin tertulis dari penulis.

Tahun 2019

Penerbit FAKULTAS KEDOKTERAN UNISSULA

Jl. Raya Kaligawe km. 4 Semarang 50112

PO BOX 1054/SM,

Telp. (024) 6583584, Fax. (024) 6594366

ISBN: xxxxxxxxxxxxxx

KATA PENGANTAR

Buku petunjuk ini digunakan untuk menunjang kegiatan pembelajaran Matakuliah Instrumentasi bagi mahasiswa Program Studi Magister Ilmu Biomedik. Isi buku petunjuk ini disusun oleh sebagian dosen bagian biologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung dengan menyitasi berbagai sumber referensi. Buku petunjuk ini dilengkapi dengan format laporan sementara yang dapat digunakan oleh praktikan sebagai tuntunan dalam membuat laporan resmi praktikum penanganan hewan coba, ELISA, Isolasi DNA, dan PCR. Melalui buku petunjuk ini diharapkan mahasiswa dapat mendemostrasikan teknik-teknik yang digunakan untuk penelitian dan dapat memberikan gambaran teknik-teknik penelitian yang dapat digunakan dalam penelitian tesis. Akhir kata, buku petunjuk ini masih sangat sederhana sehingga kritikan dan masukan untuk pengembangan buku ini kami akan terima dengan senang hati.

Mei, 2019

Tim Penulis

DAFTAR ISI

BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM BIOLOGI	0
KATA PENGANTAR	2
DAFTAR ISI	3
TATA TERTIB PRAKTIKUM	4
BIOHAZARD	5
RENCANA PEMBELAJARAN	6
PENANGANAN HEWAN COBA	7
PENGENALAN HEWAN COBA	7
ELISA	16
Alat dan bahan	18
Cara kerja	18
ISOLASI DNA	21
Tujuan Praktikum	21
Dasar Teori	21
Alat dan bahan	24
Cara kerja	25
Daftar Pustaka	26
LEMBAR HASIL PENGAMATAN	27
PCR dan ELEKTROFORESIS	28
Bahan :	32
Cara Kerja:	32

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Saat praktikum berlangsung praktikan diwajibkan mengenakan jas praktikum dan membawa pensil warna.
2. Praktikan diwajibkan datang 10 menit sebelum praktikum dimulai untuk mengikuti pretest
3. Praktikan diwajibkan menguasai cara kerja dari materi yang akan dipraktikumkan
4. Praktikan berhak bertanya tentang hasil pengamatan kepada asisten mahasiswa
5. Praktikan tidak diperkenankan meninggalkan ruang praktikum saat praktikum berlangsung tanpa seijin asisten atau dosen yang berwenang.
6. Praktikan tidak diperkenankan membuat keonaran saat praktikum berlangsung
7. Setelah praktikum selesai, praktikan diwajibkan mengembalikan alat yang telah dipinjamkan oleh pihak laboratorium sesuai dengan keadaan awalnya.
8. Setelah selesai praktikum tiap kelompok diwajibkan membuat laporan sementara sesuai dengan format yang ada dan mendapatkan tanda asistensi oleh asisten atau dosen, dan dilampirkan pada laporan resmi.
9. Pembuatan laporan resmi dilakukan pada buku laporan yang telah disediakan oleh pihak laboratorium dan paling lambat dikumpulkan satu minggu setelah praktikum berlangsung.

BIOHAZARD

Pada praktikum isolasi dan uji daya fagosit makrofag digunakan hewan uji berupa mencit. Bangkai mencit harus dikumpulkan menjadi satu wadah untuk kemudian dimusnahkan oleh teknisi laboratorium, sedangkan cairan yang berasal dari hewan coba wajib dikumpulkan menjadi satu dalam wadah kaca, sehingga mudah untuk disterilkan terlebih dahulu sebelum dibuang ke saluran pembuangan.

Limbah cairan berupa urin maupun feses tikus yang secara tidak sengaja keluar dan terjatuh pada meja praktikum wajib dibersihkan dengan menggunakan desinfektan.

Bahan yang digunakan pada praktikum isolasi makrofag terdapat bahan yang bersifat karsinogen seperti metanol, sehingga praktikan maupun pelaksana praktikum lainnya wajib mengenakan alat pelindung diri berupa jas praktikum yang terkancing dengan rapi, masker dan handscoon.

Seluruh pelaksana praktikum wajib mengenali menaati peraturan didalam laboratorium biologi untuk menghindari resiko kecelakaan kerja dan menjaga keselamatan lingkungan.

RENCANA PEMBELAJARAN

Jadwal pelaksanaan :

Sabtu, 31 Maret 2018 jam 11.20 – 13.00 : Penanganan Hewan coba

Jum'at, 20 April 2018 jam 13.00 – 15,00 : ELISA

Jum'at, 04 Mei 2018 jam 13.00 – 15.00 : Isolasi DNA

Sabtu, 12 Mei 2018 Jam 13.00 – 15.00 : PCR dan elektroforesis

Penanggung jawab kegiatan praktikum :

Kepala Laboratorium Biologi (Dina Fatmawati, M.Sc)

Tim Pelaksana kegiatan :

1. Teknisi (Sumardi)
2. Mahasiswa S2 PSMIB (praktikan)

Time table pelaksanaan praktikum

Waktu pelaksanaan	Materi	Durasi	Sarana penunjang pembelajaran	Pelaksana kegiatan
13.00 – 13.15	Pengarahan teknis praktikum	15 menit	Komputer dan LCD	Dina Fatmawati, M.Sc dr. Iwang Yusuf, M.Si Dr. Drs. Israhnanto, M.Si Anggari Linda D., S.Si., M.Sc
13.15 – 13.30	Preparasi alat dan bahan	15 menit	Alat dan bahan praktikum	Teknisi, Dosen bagian dan praktikan
13.30 – 15.00	Pelaksanaan praktikum:	90 menit	Alat dan bahan praktikum	Teknisi, Dosen bagian dan praktikan

PENANGANAN HEWAN COBA

PENGENALAN HEWAN COBA

Hewan coba atau sering disebut hewan laboratorium adalah hewan yang khusus diternakkan untuk keperluan penelitian biologik. Hewan laboratorium tersebut digunakan sebagai model untuk penelitian pengaruh bahan kimia atau obat pada manusia. Beberapa jenis hewan dari yang ukurannya terkecil dan sederhana ke ukuran yang besar dan lebih kompleks digunakan untuk keperluan penelitian ini, yaitu: Mencit, tikus, kelinci, dan kerbau.

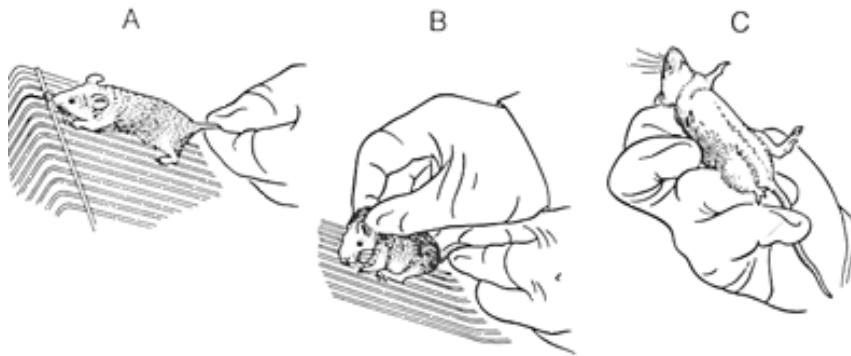
1. Mencit

a) Data biologik normal

- Konsumsi pakan per hari	5 g (umur 8 minggu)
- Konsumsi air minum per hari	6,7 ml (umur 8 minggu)
- Diet protein	20-25%
- Ekskresi urine per hari	0,5-1 ml
- lama hidup	1,5 tahun
- Bobot badan dewasa	
- Jantan	25-40 g
- Betina	20-40 g
- Bobot lahir	1-1,5 g
- Dewasa kelamin (jantan=betina)	28-49 hari
- Siklus estrus (menstruasi)	4-5 hari (polyestrus)
- Umur sapih	21 hari
- Mulai makan pakan kering	10 hari
- Rasio kawin	1 jantan – 3 betina
- Jumlah kromosom	40
- Suhu rektal	37,5°C
- Laju respirasi	163 x/mn
- Denyut jantung	310 – 840 x/mn
- Pengambilan darah maksimum	7,7 ml/Kg
- Jumlah sel darah merah (Erythrocyt)	8,7 – 10,5 X 10 ⁶ / μ l
- Kadar haemoglobin(Hb)	13,4 g/dl
- Pack Cell Volume (PCV)	44%
- Jumlah sel darah putih (Leucocyte)	8,4 X 10 ³ / μ l

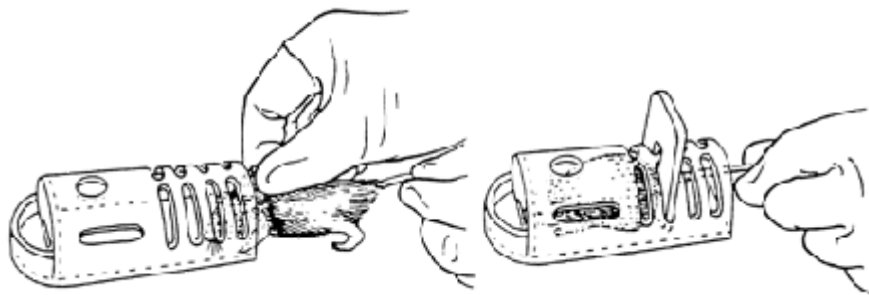
b) Cara handling

Untuk memegang mencit yang akan diperlakukan (baik pemberian obat maupun pengambilan darah) maka diperlukan cara-cara yang khusus sehingga mempermudah cara perlakuannya. Secara alamiah mencit cenderung menggigit bila mendapat sedikit perlakuan kasar. Pengambilan mencit dari kandang dilakukan dengan mengambil ekornya kemudian mencit ditaruh pada kawat kasa dan ekornya sedikit ditarik. Cubit kulit bagian belakang kepala dan jepit ekornya (Lihat gambar 1)



Gambar 1. Cara menghandel mencit untuk pemberian obat baik injeksi maupun peroral

Disamping itu secara komersial telah diproduksi sebuah alat untuk menghandel hewan laboratorium (mencit/tikus) dengan berbagai ukuran, sehingga memudahkan peneliti untuk mengambil darah atau perlakuan lainnya (gambar 2).



Gambar 2. Alat untuk penghandel hewan laboratorium khusus hewan pengerat (rodensia)

c) Penandaan (identifikasi) hewan laboratorium.

Beberapa cara penandaan hewan lab. Dilakukan untuk mengetahui kelompok hewan yang diperlakukan berbeda dengan kelompok lain. Penandaan ini dapat dilakukan secara permanen untuk penelitian jangka panjang (kronis), sehingga tanda tersebut tidak mudah hilang. Yaitu : dengan ear tag (anting bernomor), tato pada ekor, melubangi daun telinga dan elektronik transponder.

d) Pengambilan darah

Pada umumnya pengambilan darah terlalu banyak pada hewan kecil dapat menyebabkan shock hipovolemik, stress dan bahkan dapat menyebabkan kematian. Tetapi bila dilakukan pengambilan sedikit darah tetapi sering, juga dapat menyebabkan anemia. Pada umumnya pengambilan darah dilakukan sekitar 10% dari total volume darah dalam tubuh dan dalam selang waktu 2-4 minggu. Atau sekitar 1% dengan interval 24 jam. Total darah yang diambil sekitar 7,5% dari bobot badan. Diperkirakan pemberian darah tambahan (exsanguination) sekitar setengah dari total volume darah. Contohnya: Bobot 25g, total volume darah 1,875 ml, maksimum pengambilan darah 0,1875 ml, maka pemberian exsanguination 0,9375 ml.

Pengambilan darah dapat dilakukan pada lokasi tertentu dari tubuh, yaitu:

- vena lateral dari ekor
- sinus orbitalis mata
- vena saphena (kaki)
- langsung dari jantung.

Sedangkan tempat atau lokasi untuk injeksi, volume sediaan dan ukuran jarum adalah sebagai berikut:

	IV	IP	IM	SC	Oral
Lokasi	Lateral ekor		Tidak direkomendasi	Belakang leher	
Volume	0,2 ml	2-3 ml		2-3 ml	5-10 ml/Kg
Ukuran jarum	<25 guage	<21 guage		<20 guage	Jarum tumpul 22-24 guage

e) Euthanasia:

Dengan beberapa cara yaitu euthanasia dengan CO₂, injeksi barbiturat over dosis (200mg/Kg) IP atau dengan dislokasi maupun dekapitasi. Yang terakhir perlu keahlian khusus dan bergantung pada tujuan dilakukan euthanasia.

2. Tikus.

a) Data biologik

- Konsumsi pakan per hari	5 g/100 g bb
---------------------------	--------------

- Konsumsi air minum per hari	8-11 ml/100 g bb
- Diet protein	12%
- Ekskresi urine per hari	5,5 ml/100 g bb
- lama hidup	2,5- 3 tahun
- Bobot badan dewasa	
- Jantan	300-400 g
- Betina	250-300 g
- Bobot lahir	5-6 g
- Dewasa kelamin (jantan=betina)	50±10 hari
- Siklus estrus (menstruasi)	5 hari (polyestrus)
- Umur sapih	21 hari, 40-50 g
- Mulai makan pakan kering	12 hari
- Rasio kawin	1 jantan – 3 atau 4 betina
- Jumlah kromosom	42
- Suhu rektal	37,5°C
- Laju respirasi	85 x/mn
- Denyut jantung	300 – 500 x/mn
- Pengambilan darah maksimum	5,5 ml/Kg
- Jumlah sel darah merah (Erythrocyt)	7,2-9,6 X 10 ⁶ / µl
- Kadar haemoglobin(Hb)	15,6 g/dl
- Pack Cell Volume (PCV)	46%
- Jumlah sel darah putih (Leucocyte)	14 X 10 ³ /µl

b) Cara handling

Pertama ekor dipegang sampai pangkal ekor. Kemudian telapak tangan menggenggam melalui bagian belakang tubuh dengan jari telunjuk dan jempol secara perlahan diletakkan disamping kiri dan kanan leher. Tangan yang lainnya membantu dengan menyangga dibawahnya, atau tangan lainnya dapat digunakan untuk menyuntik.



Gambar 3. Cara memegang tikus untuk dilakukan injeksi ip.



Gambar 4. cara memegang tikus

f) Penandaan (identifikasi) hewan laboratorium.

Beberapa cara penandaan hewan lab. Dilakukan untuk mengetahui kelompok hewan yang diperlakukan berbeda dengan kelompok lain. Penandaan ini dapat dilakukan secara permanen untuk penelitian jangka panjang (kronis), sehingga tanda tersebut tidak mudah hilang. Yaitu : dengan ear tag (anting bernomor), tato pada ekor, melubangi daun telinga dan elektronik transponder.

g) Pengambilan darah

Pada umumnya pengambilan darah terlalu banyak pada hewan kecil dapat menyebabkan shock hipovolemik, stress dan bahkan dapat menyebabkan kematian. Tetapi bila dilakukan pengambilan sedikit darah tetapi sering, juga dapat menyebabkan anemia. Pada umumnya pengambilan darah dilakukan sekitar 10% dari total volume darah dalam tubuh dan dalam selang waktu 2-4 minggu. Atau sekitar 1% dengan interval 24 jam. Total darah yang diambil sekitar 7,5% dari bobot badan. Diperkirakan pemberian darah tambahan (exsanguination) sekitar setengah dari total volume darah. Contohnya: Bobot 300g, total volume darah 22,5 ml, maksimum pengambilan darah 2,25 ml, maka pemberian exsanguination 11,25 ml.

Pengambilan darah harus menggunakan alat seaseptik mungkin. Untuk meningkatkan vasodilatasi, perlu diberi kehangatan pada hewan tersebut, misalnya taruh dalam ruangan dengan suhu 40°C selama 10-15 menit, dengan memasang lampu pemanas dalam ruangan tersebut.

Pengambilan darah dapat dilakukan pada lokasi tertentu dari tubuh, yaitu:

- vena lateral dari ekor
- bagian ventral arteri ekor
- sinus orbitalis mata
- vena saphena (kaki)

- anterior vena cava
- langsung dari jantung.

Sedangkan tempat atau lokasi untuk injeksi, volume sediaan dan ukuran jarum adalah sebagai berikut:

	IV	IP	IM	SC	Oral
Lokasi	Lateral ekor dan vena saphena		Otot quadricep, bag. Belakang paha	Belakang leher	
Volume	0,5 ml	5-10 ml	0,1 ml	5-10 ml	5-10 ml/Kg
Ukuran jarum	<23 guage	<21gauge	<21gauge	<20 gauge	Jarum tumpul 18-20 guage

h) Euthanasia:

Dengan beberapa cara yaitu euthanasia dengan CO₂, injeksi pentobarbital over dosis (40-60mg/Kg) IP atau dengan ketamin/medetomidin, 60-75 mg/Kg ip. Atau dengan obat anasthetika lainnya.

3. Kelinci

a) Data biologik:

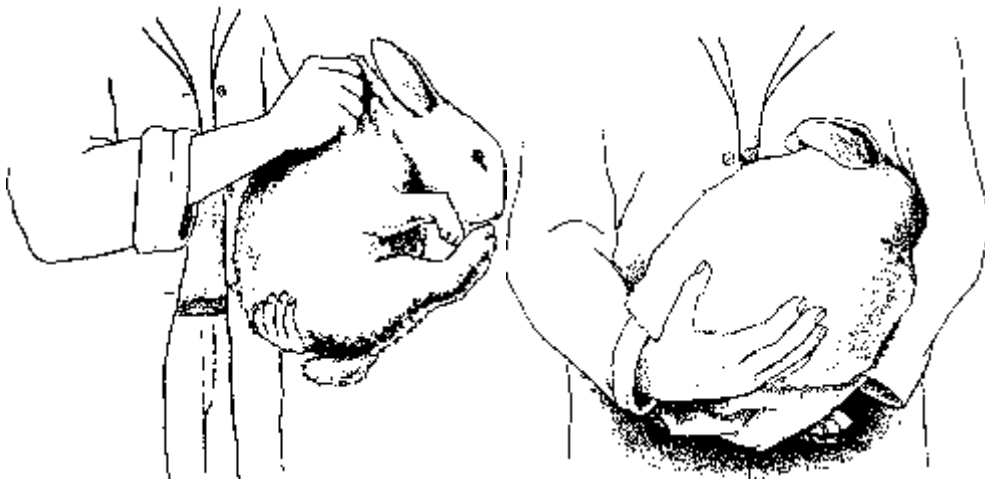
- Konsumsi pakan per hari	100-200 g
- Konsumsi air minum per hari	200-500ml
- Diet protein	14%
- Ekskresi urine per hari	30- 35 ml
- lama hidup	5-7 tahun
- Bobot badan dewasa	
- Jantan	4-5,5 Kg
- Betina	4,5-6,5 Kg (NZ)
- Bobot lahir	30-100 g
- Dewasa kelamin:	
- Jantan	5-6 bulan (4,5Kg)
- Betina	6-7 bulan 4Kg
- Siklus estrus (menstruasi)	polyestrus (diinduce)
- Umur sapih	8 minggu. 1,8 Kg
- Mulai makan pakan kering	16-18 hari
- waktu untuk kawin kembali setelah	35-42 hari
- Rasio kawin	1 jantan – 6-10 betina
- Jumlah kromosom	44

- Suhu rektal	39,5°C
- Laju respirasi	51 x/mn
- Denyut jantung	200 – 300 x/mn
- volume darah	55-65 ml/Kg
- Pengambilan darah maksimum	7,7 ml/Kg
- Jumlah sel darah merah (Erythrocyt)	4-7 X 10 ⁶ / μl
- Kadar haemoglobin(Hb)	10-15 g/dl
- Pack Cell Volume (PCV)	33-48 %
- Jumlah sel darah putih (Leucocyte)	5-12 X 10 ³ /μl

b) Cara handling

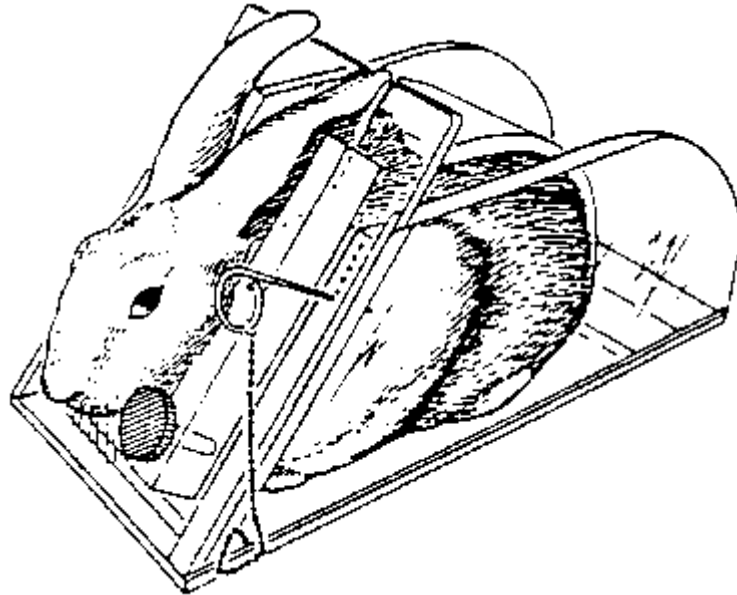
Kadang kelinci mempunyai kebiasaan untuk mencakar atau menggigit. Bila penanganan kurang baik, kelinci sering berontak dan mencakarkan kuku dari kaki belakang dengan sangat kuat yang kadang dapat menyakiti dirinya sendiri. Kadang kondisi tersebut dapat menyebabkan patahnya tulang belakang kelinci yang bersangkutan.

Cara menghandel adalah dengan menggenggam bagian belakang kelinci sedikit kedepan dari bagian tubuh, dimana bagian tersebut kulitnya agak longgar. Kemudian angkat kelinci dan bagian bawahnya disangga.



Gambar 5. Cara menghandel kelinci

Sedangkan cara menangani kelinci perlakuan baik untuk diinjeksi ataupun untuk pengambilan darah diperlukan peralatan khusus dimana kelinci tidak dapat banyak bergerak.



Gambar 6. cara menangani kelinci untuk perlakuan pengambilan darah ataupun untuk pemberian obat.

c) Penandaan

Penandaan kelinci dapat dilakukan secara individu hewan ataupun kelompok. Penandaan banyak dilakukan pada daerah telinga yang berupa “ear tag” (anting telinga yang dapat diberi nomor). Dapat juga dengan tato pada telinga.

d) Pengambilan darah

Terlalu banyak mengambil darah dalam waktu satu kali akan dapat menyebabkan shock hypovolemik, stress fisiologik dan kematian. Sedangkan pengambilan darah yang sedikit dan dalam frekwensi waktu yang sering dapat menyebabkan anemia.

Pada umumnya pengambilan darah 10% dari total volume darah dalam selang waktu 2-4 minggu cukup baik dilakukan, atau 1% dalam interval 24 jam. Total volume darah dapat dihitung sekitar 7,5% dari bobot tubuh.

Perkiraan volume exsanguinasion (pemberian volume cairan/darah) sekitar setengah dari total volume darah.. misalnya bobot kelinci 3 Kg, maka total volume darah 225 ml, sampel pengambilan darah maksimum 22,5 ml dalam interval 2-4 minggu, jadi volume exsanguinasion 112,5 ml.

Pengambilan darah dilakukan dari beberapa lokasi tubuh yaitu:

- Arteri sentral di telinga
- Bagian lateral vena saphena
- Vena jugularis
- Vena cava anterior

- Jantung

Sedangkan tempat atau lokasi untuk injeksi, volume sediaan dan ukuran jarum adalah sebagai berikut:

	IV	IP	IM	SC	Oral
Lokasi	Vena marginal telinga		Otot quadricep, bag. Belakang paha, otot lumbal	Belakang leher	
Volume	1-5 ml	50-100 ml	0,5-1 ml	50-100 ml	5-10 ml/Kg
Ukuran jarum	<21 guage	<2gauge	<20gauge	<20 gauge	Jarum tumpul 18-20 guage

e) Anasthesia

Anasthesia dapat dilakukan secara inhalant maupun injeksi. Anasthesia inhalant dilakukan dengan inhalan "isofluran", sedangkan untuk injeksi dapat diberikan pentobarbital 20-60 mg/Kg iv dan terjadi efek setelah 1-3 jam. Beberapa obat anasthesia umum dpat juga diberikan sesuai dengan anjuran. Sedangkan euthanasia (pembunuhan) pada hewan kelinci jarang dilakukan.

ELISA

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) merupakan uji serologis yang umum digunakan di berbagai laboratorium imunologi. ELISA diperkenalkan pada tahun 1971 oleh Peter Perlmann dan Eva Engvall untuk menganalisis adanya interaksi antigen dengan antibodi di dalam suatu sampel dengan menggunakan enzim sebagai pelapor (reporter label).

ELISA merupakan metode immunoassay yang menggunakan enzim sebagai label. Metode ELISA dibagi 2 jenis teknik yaitu teknik kompetitif dan non kompetitif. Teknik non kompetitif ini dibagi menjadi dua yaitu sandwich dan indirek. Pemeriksaan hormon menggunakan teknik kompetitif dan *sandwich*. Metode kompetitif mempunyai prinsip sampel ditambahkan antigen yang berlabel dan tidak berlabel dan terjadi kompetisi membentuk kompleks yang terbatas dengan antibodi spesifik pada fase padat. Prinsip dasar dari *sandwich assay* adalah sampel yang mengandung antigen direaksikan dengan antibodi spesifik pertama yang terikat dengan fase padat. Selanjutnya ditambahkan antibodi spesifik kedua yang berlabel enzim dan ditambahkan substrat dari enzim tersebut.

Keuntungan metode ELISA yaitu:

- Cukup sensitive
- Reagen relatif murah dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama
- Dapat memeriksa beberapa parameter sekaligus
- Peralatan mudah didapat
- Tidak menggunakan zat radiasi

Kerugian metode ELISA:

- Pemeriksaan menggunakan enzim sebagai label cukup kompleks karena aktivitas enzim dipengaruhi oleh berbagai faktor

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah suatu teknik biokimia yang terutama digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Dalam pengertian sederhana, sejumlah antigen yang tidak dikenal ditempelkan pada suatu permukaan, kemudian antibodi spesifik dicucikan pada permukaan tersebut, sehingga akan berikatan dengan antigennya. Antibodi ini terikat dengan suatu

enzim, dan pada tahap terakhir, ditambahkan substansi yang dapat diubah oleh enzim menjadi sinyal yang dapat dideteksi. Dalam ELISA fluoresensi, saat cahaya dengan panjang gelombang tertentu disinarkan pada suatu sampel, kompleks antigen/antibodi akan berfluoresensi sehingga jumlah antigen pada sampel dapat disimpulkan berdasarkan besarnya fluoresensi dengan menggunakan spektrofotometer. Umumnya ELISA dibedakan menjadi dua jenis, yaitu competitive assay yang menggunakan konjugat antigen-enzim atau konjugat antibodi-enzim, dan non-competitive assay yang menggunakan dua antibodi. Pada ELISA non-competitive assay, antibodi kedua akan dikonjugasikan dengan enzim sebagai indikator. Teknik kedua ini seringkali disebut sebagai "Sandwich" ELISA. Uji ini memiliki beberapa kerugian, salah satu di antaranya adalah kemungkinan yang besar terjadinya hasil false positive karena adanya reaksi silang antara antigen yang satu dengan antigen lain. Hasil berupa false negative dapat terjadi apabila uji ini dilakukan pada window period, yaitu waktu pembentukan antibodi terhadap suatu virus baru dimulai sehingga jumlah antibodi tersebut masih sedikit dan kemungkinan tidak dapat terdeteksi.

Pada elisa ada beberapa metoda antara lain :

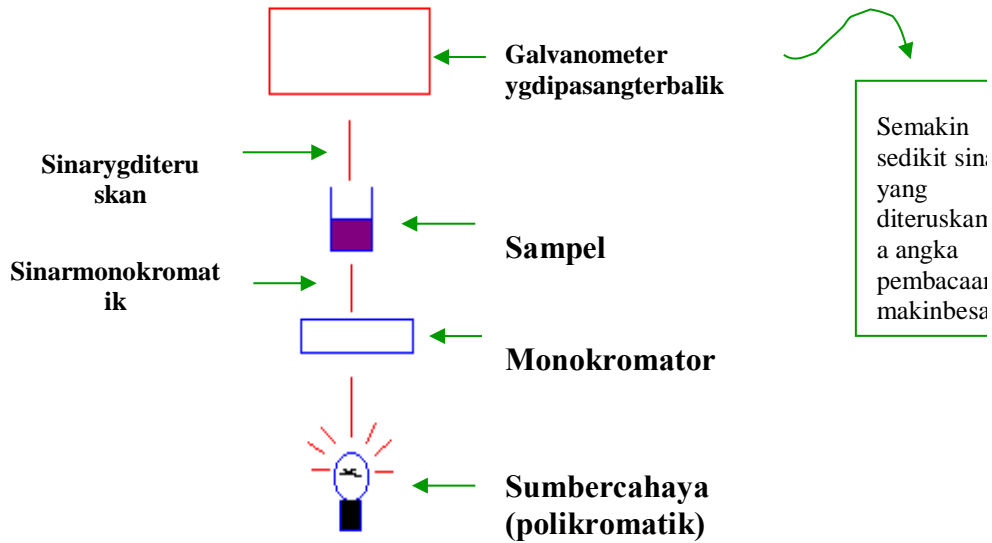
1. Direct elisa
2. Indirect elisa
3. Sandwich elisa
4. Competitive elisa

Pada elisa bahan yang dideteksi sebelumnya harus ditempelkan pada fase padat (pada microtiter well). Bahan (ag / ab) dapat menempel pada microtiter wells, karena wells ini telah dilapisi dengan polysterine/ polyvinylchloride.

Prinsip dasar elisa terdiri dari :

- A. Fase coating
- B. Fase reaksi ag-ab
- C. Fase reaksi kimiawi

Prinsip kerja elisa reader



Alat dan bahan

Dengan menggunakan wel elisa yang jumlahnya 96 lubang. Pada dinding wel terdapat bahan yang disebut poli fenil klorida/ poli bromida sehingga bahan uji dapat menempel. Proses penempelan berlangsung semalam pada suhu 4°C. Setelah itu baru dilakukan pemeriksaan elisa.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
500	A	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
250	B	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
125	C	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
62	D	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
32	E	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
16	F	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8	G	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Cara kerja

1. Preparasi sampel
 - Plasma dengan EDTA di sentrifuge pada 3400 rpm selama 15 menit.
 - Simpan pada suhu -20 °C
 - Diambil 10 µL plasma + 190 µL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) (didapatkan pengenceran 200x)

- Diambil kembali 10 μL plasma yang telah diencerkan 200x + 190 μL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) (didapatkan pengenceran 400x)
 - Sampel plasma yang telah diencerkan 400x ini yang nantinya akan dihitung konsentrasi Mannan Binding Lectin-nya menggunakan teknik ELISA.
2. Preparasi MBL Standar
- Pada tabung pertama diisi dengan 900 μL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) dan 100 μL larutan MBL standar (konsentrasi 100 ng/mL) sehingga didapatkan konsentrasi pada tabung pertama sebesar 10 ng/mL.
 - Pada tabung kedua sampai tujuh dilakukan doubling dilution berturut-turut mulai dari tabung pertama dengan pelarut menggunakan 500 μL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) sehingga didapatkan konsentrasi pada tabung kedua sampai tujuh.
3. Ukur absorbansi dengan ELISA reader.
- Buatlah kurva dan regresi linear dimana x adalah nilai konsentrasi (yang didapat) dan y adalah nilai absorbansi .
 - Persamaan regresi linier yang didapat ini akan digunakan untuk menghitung konsentrasi MBL pada tiap-tiap sampel plasma darah (pengenceran 400x) dari masing-masing mahasiswa yang telah dipersiapkan sebelumnya (Tabel 2)
 - Buatlah grafik konsentrasi MBL sampel Plasma (ng/mL) pada masing-masing praktikan.

HASIL PENGAMATAN

Tabel 1

Tabung	Konsentrasi yang dihitung (ng/mL)	Konsentrasi yang didapat (ng/mL)	Nilai Absorbansi

Kurva Standart 1**Tabel 2.**

Sampel Plasma	Nilai Absorbansi Sampel Plasma	Konsentrasi MBL Sampel Plasma (Pengenceran 400x) (ngmL)	Konsentrasi M Sampel Plasma (ngmL)

Grafik Rata-rata Konsentrasi MBL Sampel Plasma Masing-Masing Praktikan

Referensi:

<http://www.ebioscience.com/media/pdf/best-protocols/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa.pdf>

ISOLASI DNA

Tujuan Praktikum

Mampu melakukan isolasi DNA dari sampel darah vena dengan metode berbasis silika (Silica-based methods)

Dasar Teori

Banyak metode dan teknologi yang berbeda yang tersedia untuk isolasi DNA genomik. Secara umum, semua metode melibatkan perusakan dan lisis dari sampel diikuti dengan penghilangan protein dan kontaminan lainnya untuk menghasilkan DNA murni. Protein dihilangkan dengan enzim proteinase K, diikuti dengan penggaraman-out, ekstraksi organik, atau mengikat DNA untuk ke fase padat (baik pertukaran anion atau teknologi silika). DNA dipresipitasi menggunakan etanol atau isopropanol. Pemilihan metode tergantung pada banyak faktor: kuantitas DNA yang dibutuhkan dan berat molekul, kemurnian DNA yang diinginkan untuk aplikasi selanjutnya, waktu dan biaya.

Pemisahan DNA dari komponen seluler dapat dibagi menjadi empat tahap:

1. Preparasi sampel untuk mengumpulkan panen sel-sel (cell harvest)
2. Cell Lysis
3. Pencernaan protein agar asam nukleat dilepaskan (protein digestion)
4. Pengendapan DNA (DNA precipitation)

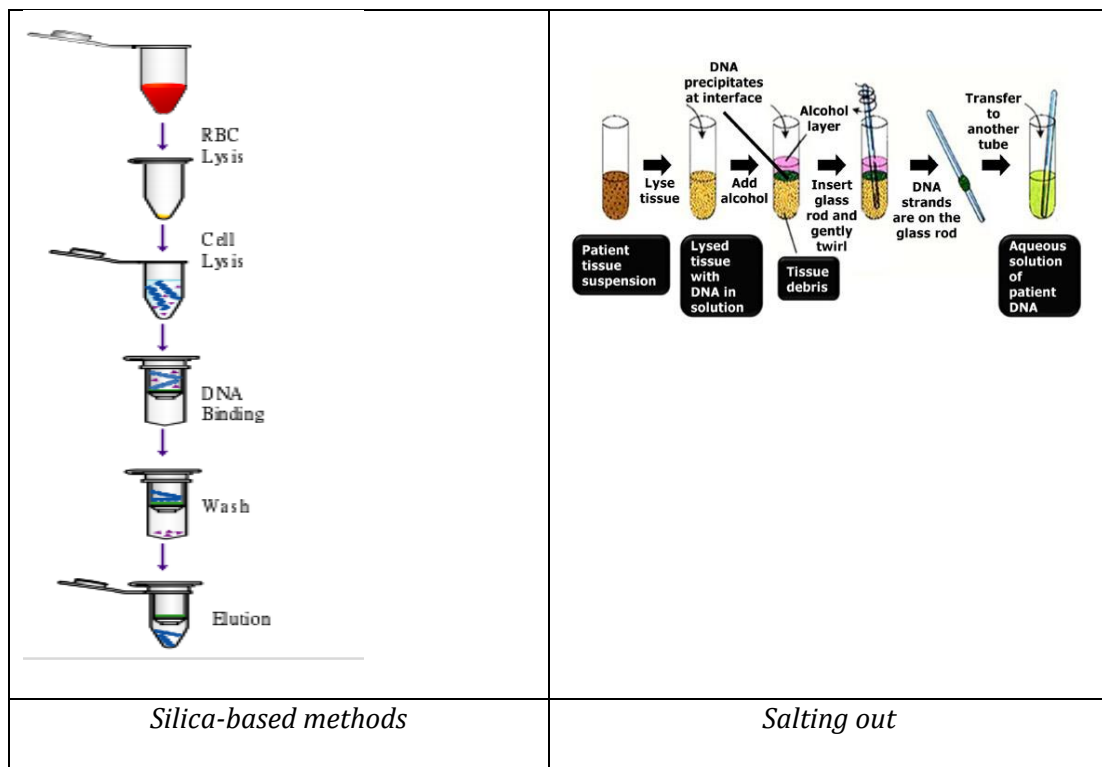
Silica-based methods

The Genomic DNA Mini Kit (Blood / Cultured Cell) menyediakan metode yang efisien untuk memurnikan DNA total (termasuk genomik, mitokondria dan DNA virus) dari darah utuh segar, sel-sel hewan yang dikultur, *buffy coat*, ragi dan lainnya. Garam chaotropic digunakan untuk melisis sel dan mencerna protein, yang memungkinkan DNA untuk mengikat glass fiber matrix dari spin (1). Kontaminan dihilangkan menggunakan Wash Buffer yang mengandung etanol. Pemurnian DNA genomik dengan cara dilusi dengan Buffer Elusi rendah garam. Seluruh prosedur dapat diselesaikan dalam waktu 25 menit tanpa fenol / ekstraksi kloroform atau pengendapan alkohol. DNA dimurnikan, dengan sekitar 20-30 kb, cocok untuk digunakan di PCR atau reaksi enzimatik lainnya (Gambar 1). Kemurnian DNA hasil isolasi dianalisis secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer dan dicek dengan elektroforesis. Dari 200 ml seluruh

darah manusia segar dapat dihasilkan DNA murni 4-6 mg dengan rasio A260 / A280 dari 1,6-1,8.

Metode Salting out

Dimulai dengan lisis membran sel. Salting out merupakan teknik konvensional dimana protein dan kontaminan yang diendapkan melalui lisis membran sel menggunakan garam konsentrasi tinggi seperti kalium asetat atau ammonium asetat. Endapan dihilangkan melalui sentrifugasi, dan presipitasi alcohol dilakukan dengan tujuan agar DNA terlihat. Penggunaan metode ini untuk penghilangan senyawa pengotor seperti protein dan RNA dinilai kemungkinan kurang efisien. Kemurnian DNA yang diperoleh dengan metode ini sangat bervariasi. Perbedaan tahapan *Silica-based methods* dan *salting out* disajikan pada Gambar berikut:



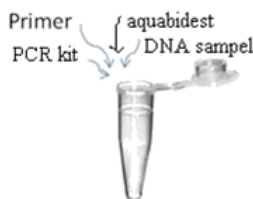
Teknik analisis biologi molekuler adalah salah satu kunci dalam memahami dogma sentral dalam biologi. Keberadaan teknik ini akan membantu kita memahami proses replikasi, transkripsi, translasi, dan lain-lain. Teknik ini memungkinkan kita mengenal organisme sampai pada tingkatan molekuler yaitu tingkatan DNA, RNA, asam amino, dan protein. Teknik yang akan dibahas pada praktikum ini adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

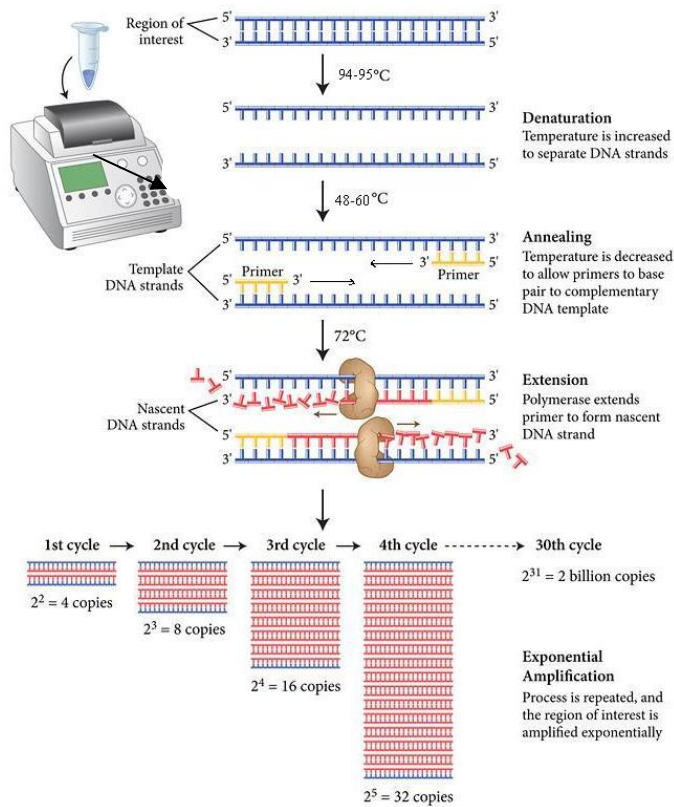
PCR adalah teknik sintesis dan penggandaan DNA dan RNA secara in vitro. PCR pertama kali dikembangkan oleh Karl Mullis pada pertengahan tahun 1980an. PCR

didasarkan pada pemanfaatan kemampuan DNA polymerase untuk mensintesis untai baru DNA komplementer dari DNA template. Mekanisme yang terjadi saat PCR, sama dengan replikasi DNA secara *in vivo*. Proses PCR terjadi selama beberapa siklus. Metoda PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 - 10^7 kali.

Komponen-komponen yang dibutuhkan dalam reaksi PCR, yaitu DNA template, primer (oligonukleotida), dan PCR mix. DNA template merupakan sejumlah DNA sampel yang akan menjadi cetakan untuk pembentukan untai DNA baru saat proses amplifikasi dengan teknik PCR berlangsung. Primer adalah sekuen pendek DNA atau RNA (oligonukleotida) yang komplementer terhadap untai DNA template yang digunakan untuk menginisiasi amplifikasi DNA. PCR mix berisi buffer PCR, Mg^{2+} , dNTP, dan enzim polymerase.

Prinsip kerja PCR adalah reaksi berulang yang dilakukan oleh enzim polymerase, yaitu enzim yang mampu merangkai DNA building block menjadi untai molekular yang panjang (Degen et al., 2006). Proses PCR melibatkan beberapa tahap, yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat pada suhu 94-95°C; (2) denaturasi (pemisahan untai ganda) DNA templat pada suhu 94-95°C; (3) penempelan primer pada templat (annealing) pada suhu 48-60°C; (4) pemanjangan primer (extension) dan (5) pemantapan (final-extension) pada suhu 72°C. Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi amplifikasi jumlah DNA. Untai ganda DNA templat (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberikan waktu pada primer untuk menempel (anneal primers) pada daerah tertentu dari target DNA. Tahap pemanjangan primer selalu berjalan dari ujung 5' ke 3'. Tahapan proses PCR dapat dilihat pada Gambar 1.





Gambar 1. Tahapan Proses PCR

Alat dan bahan

Bahan :

1. Darah dari vena yang sudah diberi antikoagulan (EDTA/Ethylenediaminetetraacetic acid)
2. Larutan sel epitel mukosa mulut

Alat :

1. Mikropipet
2. microcentrifuge tube ukuran 1.5 ml
3. Blue tip, yellow tip dan white tip
4. Centrifuge tube
5. Sentrifuse
6. Spektrofotometer
7. Inkubator yang disetting suhu 60°C
8. Waterbath yang disetting suhu 37°C

Reagen

1. Genomic DNA Mini Kit
2. Absolute ethanol

Cara kerja

Step I. Preparasi sampel

1. Ambil 300 μ l sampel darah dan masukkan ke dalam *microcentrifuge tube* ukuran 1.5 ml.
2. Tambahkan RBC lysis buffer sebanyak 900 μ l kemudian campurkan dengan cara inversi (bolak-balik).
3. Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan.
4. Kemudian lakukan sentrifuse selama 5 menit kecepatan 3000 g, kemudian buang supernatan.
5. Tambahkan 100 μ l RBC lysis buffer pada pelet untuk kemudian lakukan resuspensi sampai homogen

STEP II. Lisis Sel

1. Tambahkan 200 μ l buffer GB ke dalam *microcentrifuge tube* dan kocok perlahan.
2. Inkubasi pada inkubator suhu 60°C selama 10 menit, untuk memastikan pellet benar-benar bersih. Selama inkubasi, kocok perlahan tiap 3 menit.
(pada tahap ini lakukan inkubasi Elution Buffer (100 μ l per sampel) pada suhu 60°C.

STEP III. DNA BINDING

1. Tambahkan 200 μ l ethanol absolute ke dalam pelet kemudian kocok perlahan selama 10 detik
Catatan: Jika muncul presipitat, hilangkan dengan pipet
2. Tempatkan GD Column dalam 2 ml Collection Tube
3. Pindahkan semua campuran (termasuk presipitat) ke dalam GD Column.
4. Lakukan sentrifuse Pada kecepatan 10.000 g selama 5 menit, kemudian buang supernatan pada *collection tube*. Cuci *collection tube* dengan ethanol absolut kemudian tempatkan GD Column di atasnya.

STEP IV WASH

1. Tambahkan 400 μ l W1 Buffer ke dalam GD Column kemudian sentrifuse pada 10.000 g selama 1 menit.
2. Buang supernatan kemudian cuci *collection tube* dengan ethanol absolut dan tempatkan GD Column di atasnya

3. Tambahkan 600 µl Wash Buffer (pastikan sudah ditambah etanol) ke dalam GD Column, selanjutnya sentrifuse pada kecepatan 10.000 g selama 1 menit kemudian buang supernatan kemudian tempatkan GD Column di atasnya kembali.
4. Sentrifuse lagi selama 3 menit pada kecepatan 10.000 g untuk mengeringkan *column matrix*

STEP V. DNA Elution

1. Pindahkan GD Column yang sudah kering di atas *collection tube* yang sudah bersih, kemudian tambahkan 100 µl Elution Buffer yang sudah diinkubasi tepat di tengah *column matrix*.
2. Diamkan selama 3 menit untuk memastikan Elution Buffer terabsorpsi sempurna
3. Sentrifuse pada kecepatan 10.000 g selama 30 detik untuk elusi DNA yang sudah terpurifikasi.

Pengujian Kemurnian DNA hasil Isolasi

Ukur absorbansi supernatan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Tuliskan hasil absorbansinya untuk menghitung kemurnian DNA.

Daftar Pustaka

1. Yuniar Mulyani, Agus Purwanto, Isni Nurruhwati PERBANDINGAN BEBERAPA METODE ISOLASI DNA UNTUK DETEKSI DINI KOI HERPES VIRUS (KHV) PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L.). Jurnal Akuatika. [Vol 2, No 1 \(2011\)](#): 507-977
2. Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) Protocol For research use only

LEMBAR HASIL PENGAMATAN**Materi Praktikum**

.....

A. Foto hasil presipitasi yang memperlihatkan benang-benang DNA

B. Hasil pengukuran kemurnian DNA

Panjang Gelombang (nm) **Absorbansi**

260	
280	
Rasio A pada 260/280	

Kesimpulan:

PCR dan ELEKTROFORESIS

Teknik analisis biologi molekuler adalah salah satu kunci dalam memahami dogma sentral dalam biologi. Keberadaan teknik ini akan membantu kita memahami proses replikasi, transkripsi, translasi, dan lain-lain. Teknik ini memungkinkan kita mengenal organisme sampai pada tingkatan molekuler yaitu tingkatan DNA, RNA, asam amino, dan protein. Teknik yang akan dibahas pada praktikum ini adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

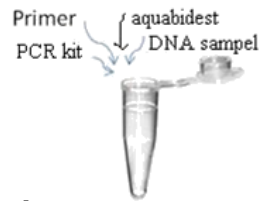
PCR adalah teknik sintesis dan penggandaan DNA dan RNA secara *in vitro*. PCR pertama kali dikembangkan oleh Karl Mullis pada pertengahan tahun 1980an. PCR didasarkan pada pemanfaatan kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis untai baru DNA komplementer dari DNA template. Mekanisme yang terjadi saat PCR, sama dengan replikasi DNA secara *in vivo*. Proses PCR terjadi selama beberapa siklus. Metoda PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 - 10^7 kali.

Komponen-komponen yang dibutuhkan dalam reaksi PCR, yaitu DNA template, primer (oligonukleotida), dan PCR mix. DNA template merupakan sejumlah DNA sampel yang akan menjadi cetakan untuk pembentukan untai DNA baru saat proses amplifikasi dengan teknik PCR berlangsung. Primer adalah sekuen pendek DNA atau RNA (oligonukleotida) yang komplementer terhadap untai DNA template yang digunakan untuk menginisiasi amplifikasi DNA. PCR mix berisi buffer PCR, Mg^{2+} , dNTP, dan enzim polimerase.

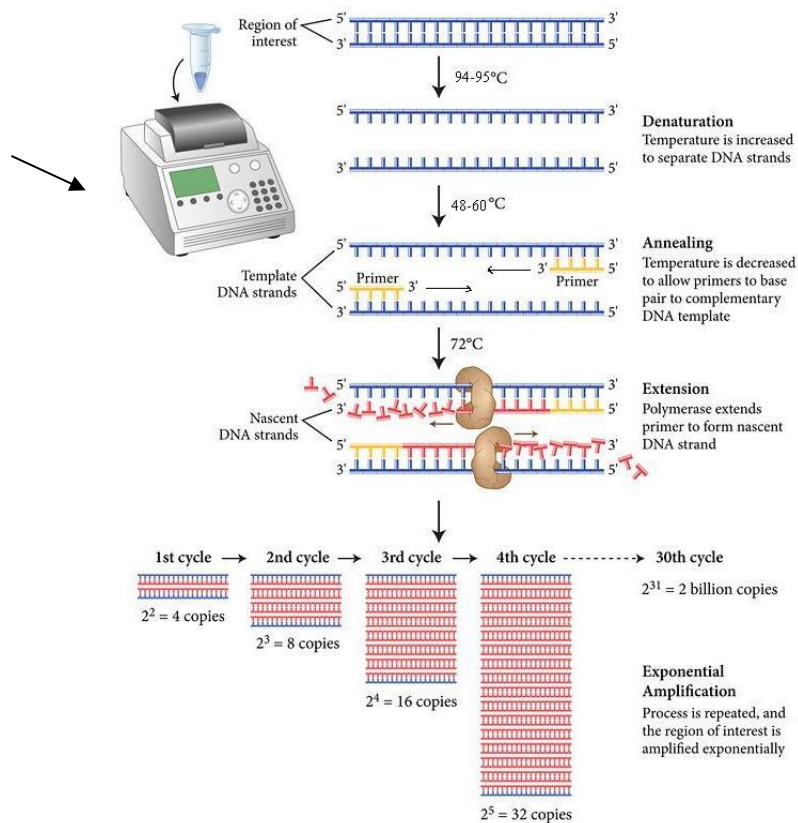
1. Prinsip Kerja PCR

Prinsip kerja PCR adalah reaksi berulang yang dilakukan oleh enzim polimerase, yaitu enzim yang mampu merangkai DNA *building block* menjadi untai molekuler yang panjang (Degen *et al.*, 2006). Proses PCR melibatkan beberapa tahap, yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat pada suhu 94-95°C; (2) denaturasi (pemisahan untai ganda) DNA templat pada suhu 94-95°C; (3) penempelan primer pada templat (annealing) pada suhu 48-60°C; (4) pemanjangan primer (extension) dan (5) pemantapan (final-extension) pada suhu 72°C. Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi amplifikasi jumlah DNA. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian

didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberikan waktu pada primer untuk menempel (*anneal primers*) pada daerah



tertentu dari target DNA. Tahap pemanjangan primer selalu berjalan dari ujung 5' ke 3'. Tahapan proses PCR dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tahapan Proses PCR

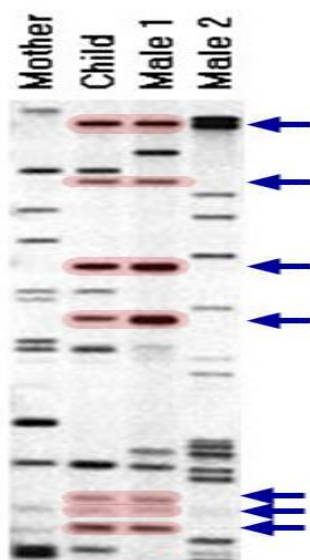
2. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan PCR

Keberhasilan amplifikasi primer menggunakan DNA genom hasil isolasi sebagai templat sangat ditentukan oleh kesesuaian primer (komposisi dan ukuran primer) terhadap DNA templat dan optimasi kondisi PCR. Optimasi PCR meliputi pengaturan suhu denaturasi dan suhu serta waktu penempelan primer (*annealing*) pada DNA templat. Suhu denaturasi perlu dioptimasi, karena jika tidak terjadi denaturasi maka proses selanjutnya akan mengalami kesalahan, baik kesalahan penempelan primer sampai kesalahan amplifikasi target yang diinginkan. Selain denaturasi, suhu penempelan primer juga merupakan penentu

keberhasilan amplifikasi. Penentuan suhu *annealing* dapat didasarkan atas nilai *melting temperature* (T_m) atau temperature leleh primer yang digunakan untuk amplifikasi (Novendri dan Fawzya, 2007).

3. Analisis Hasil PCR

Hasil PCR dapat dianalisis setelah dielektroforesis. Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan molekul yang menggunakan medan listrik (elektro). Metode ini sangat umum digunakan untuk memisahkan molekul yang bermuatan atau dibuat bermuatan (Fatchiyah *et al.*, 2011). Teknik ini dapat digunakan untuk memanfaatkan muatan listrik yang ada pada molekul misalnya DNA yang bersifat negatif. Molekul yang dapat dipisahkan antara lain DNA, RNA, atau protein. Jika suatu molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, misalnya gel agarosa, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Yuwono, 2005). Hasil dari elektroforesis dapat diamati dengan sinar ultraviolet, yang nantinya akan tampak seperti pita-pita pada gel. Pita-pita tersebut adalah molekul DNA yang bergerak sepanjang gel setelah dielektroforesis (Wilson & Walker, 2010). Berikut adalah contoh hasil elektroforesis DNA untuk penentuan ayah kandung bayi A:



Seorang ibu memiliki bayi yang belum diketahui secara pasti ayahnya kandungnya. Ada dua orang pria yang diambil DNANYA untuk memastikan siapa ayah kandung sang bayi. Gambar 2 memberikan hasil sidik DNA ibu, bayiA, laki-laki 1, dan laki-laki 2.

Hasil analisis sidik DNA menunjukkan bahwa bayi A memiliki banyak kesamaan fragmen DNA dengan laki-laki 1. Jadi, ayah sang bayi adalah laki-laki 1.

Gambar 2. Hasil Sidik DNA

4. Aplikasi PCR

Teknik PCR sudah banyak diaplikasikan, di antaranya untuk:

- amplifikasi urutan nukleotida,

- deteksi patogen infeksius dan identifikasi mutasi pada gen yang berkaitan dengan faktor resiko penyakit, seperti screening thalassemia menggunakan PCR-SSCP
- bidang kedokteran forensic,
- melacak asal-usul seseorang dengan membandingkan DNA finger print.

5. Aspek Biosafety

Pelaksanaan proses PCR harus selalu memperhatikan aspek biosafety, karena beberapa alat dan bahan yang digunakan dalam proses PCR bersifat karsinogenik. Penggunaan alat pelindung diri (APD), seperti jas laboratorium dan handscoon akan memperkecil resiko terkena paparan alat dan bahan karsinogenik serta terjadinya kontaminasi. Jas laboratorium dirancang untuk melindungi kulit dan pakaian dari bahan kimia yang mungkin tumpah. Penggunaan handscoon melindungi tangan dari percikan atau tumpahan bahan kimia dan melindungi sampel dari kontaminan yang ada di tangan. Cuci tangan sesegera mungkin setelah pelepasan handscoon. Contoh alat dan bahan berbahaya yang perlu diperhatikan penggunaannya:

- UV transiluminator menghasilkan radiasi sinar UV (biasanya dengan panjang gelombang 302-365 nm) yang dapat menyebabkan kerusakan sel mata dan kulit jika terpapar secara langsung.
- Etidium Bromida (EtBr) merupakan bahan kimia untuk pewarnaan DNA. Etidium mengikat dengan cara menyisip di antara ikatan basa pada untai ganda DNA. Molekul etidium akan berpendar ketika diiluminasi dengan cahaya ultraviolet (UV) pada kisaran visible UV. EtBr merupakan senyawa mutagenik dan sangat berbahaya.

Bahan :

- Agarose
- TBE/ TAE 0,5x
- Sampel DNA
- Marker
- Loading dye 6x
- PCR kit
- Aquabidest
- Primer
- Etidium bromide

Alat :

- Mesin PCR (Thermocycler)
- Mikropipet (1-10 uL, 2-20 uL, 20-100uL, 100-1000uL)
- Tip (white, yellow, blue)
- tabung mikrosentrifuga ukuran 0,2 mL dan 1,5 mL
- Elektroforator
- UV transiluminator
- Handscoon
- Kamera

Cara Kerja:

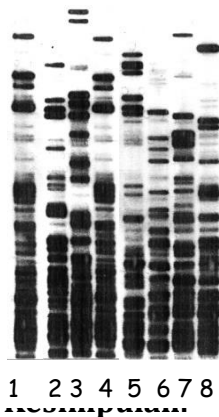
1. Siapkan bahan untuk PCR mastermix (DNA sampel, PCR kit, primer, dan aquabidest).
2. Masukkan bahan-bahan PCR mastermix ke dalam tube 0,2 ml (2 μ l DNA, 10 μ l PCR kit, 1 μ l primer, dan aquabidest hingga volume akhir campuran mencapai 20 μ l).
3. Tutup rapat tube dan masukkan ke dalam mesin PCR.
4. Atur suhu, waktu, dan siklus pada mesin PCR.
5. Jalankan mesin PCR.
6. Produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa.
7. Bacalah hasil gel elektroforesis produk PCR.
8. Laporkan hasil yang saudara dapat dalam praktikum tersebut.

Hasil Pengamatan:

No.	Nama Alat	Gambar	Fungsi	Keterangan

Tugas I

Dua hari yang lalu telah terjadi suatu tindak kriminal. Korban dibunuh oleh pelaku X. Ada 7 orang yang diduga membunuh korban. Pihak kepolisian telah melakukan analisis sidik jari DNA dari bercak darah pelaku yang tertinggal di tubuh korban dan hasilnya adalah sebagai berikut:



Keterangan:

- 1= darah pelaku
- 2= tersangka 1
- 3= tersangka 2
- 4= tersangka 3
- 5= tersangka 4

1. Tentukan pelaku kejahatan!
2. Berikan alasan atas jawaban Saudara!