

SURAT TUGAS

Nomor : 021/ST/F-01.4/UAI/IX/2018

Yang bertanda tangan dibawah ini Ketua Program Studi Biologi, Universitas Al Azhar Indonesia (UAI) memberikan tugas kepada :

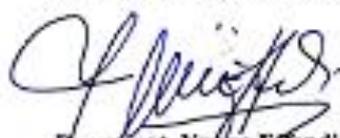
No.	Nama	Jabatan
1.	Dr.rer.nat Yunus Effendi, M.Sc.	Dosen Tetap Program Studi Biologi
2.	Arief Pambudi, S.Si., M.Si.	Dosen Tetap Program Studi Biologi

Untuk membuat Petunjuk Praktikum Biologi Molekuler di Universitas Al Azhar Indonesia, Jakarta, pada Semester Ganjil T.A 2018-2019.

Demikian surat tugas ini untuk dilaksanakan sebagai amanah dan ibadah kepada Allah swt.

Jakarta, 24 September 2018

Ketua Program Studi Biologi



Dr.rer.nat. Yunus Effendi, M.Sc.

Tembusan : Arsip
yoir

PEDOMAN PRAKTIKUM

BIOLOGI SEL DAN MOLEKULER II

Disusun Oleh:

(Tim Penyusun)

**LABORATORIUM BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AL AZHAR INDONESIA
JAKARTA**

2018

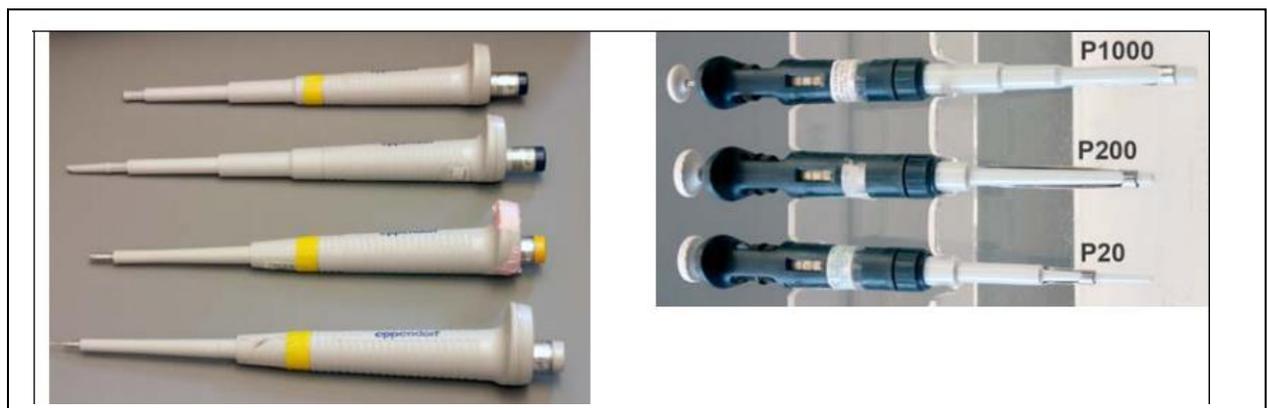
DAFTAR ISI

PENGGUNAAN MIKROPIPET	5
PEMBUATAN STOK LARUTAN	9
ISOLASI DAN VISUALISASI DNA GENOM TANAMAN	14
KUANTIFIKASI DNA DENGAN MENGGUNAKAN GEL ELEKTROFORESIS	19
PEMOTONGAN DNA DENGAN ENZIM RESTRIKSI	22
REPLIKASI IN-VITRO MENGGUNAKAN POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR) ..	24

PENGGUNAAN MIKROPIPET

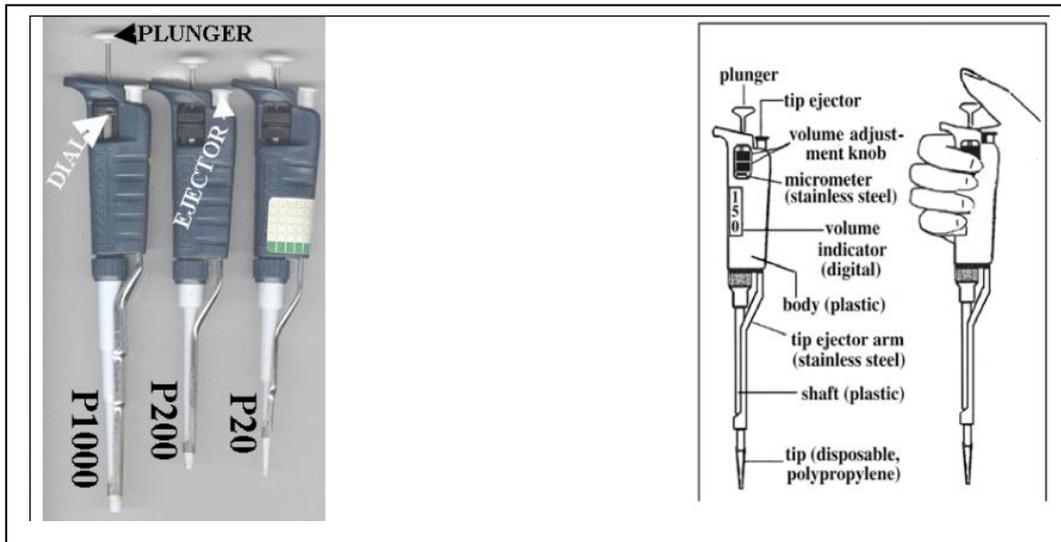
Mikropipet digunakan untuk mentransfer larutan dalam volume yang kecil (<1 ml). Skala dari mikropipet adalah mikroliter ($1000\mu\text{l} = 1 \text{ ml}$). Secara umum terdapat tiga ukuran mikropipet berdasarkan range volumenya, yakni P20= 0.5- 20 μl , P200= 20-200 μl , dan P1000= 200-1000 μl . Kemampuan menggunakan mikropipet secara benar merupakan syarat penting untuk bekerja dalam bidang molekuler biologi karena dalam teknik biologi molekuler, kita akan bersinggungan atau bekerja dengan larutan dalam ukuran volume sangat kecil (mikroliter). Selain itu mikropipet merupakan instrumen penting yang tergolong mahal harganya, sehingga kemampuan bekerja dengan benar dan memahami cara kerja dari mikropipet adalah skil yang harus dimiliki.

Saat ini terdapat bermacam-macam jenis mikropipet di pasaran, misalnya mikropipet merek Eppendorf, Gilson, Biorad, Pippetman, dan lain sebagainya. Walaupun mikropipet-mikropipet dari pabrik terlihat berbeda, namun dasar pengembangan dan penggunaan dari mikropipet berbeda produk tersebut adalah sama, sehingga dengan memahami secara benar penggunaan mikropipet dari salah satu jenis produk mikropipet tersebut, maka kita dapat pula menggunakan mikropipet dari produk lainnya. Gambar 1 menunjukkan dua produk mikropipet dari dua produser yang berbeda



Gambar 1 Dua produk mikropipet yang umum digunakan, gambar kanan adalah mikropipet produk Eppendorf dan gambar kiri adalah Rainin pippetman.

Tombol pluger pada bagian atas mikropipet umumnya menunjukkan ukuran dari mikropipet tersebut. Tiap mikropipet memiliki range volume dan hal ini merupakan hal penting diketahui dalam penggunaannya, karena mikropipet hanya akan bekerja dengan tepat pada range volumenya. Misalnya pada Pippetman, terdapat 3 ukuran mikropipet berdasarkan ukuran range volumenya yakni P20 (0,5 uL - 20 uL), P200 (20 uL-200 uL) dan P1000 (100 uL-1000 uL). Mikroopipet akan bekerja dengan akurat pada range volumenya dan pada batas atas dari range volumenya, sehingga misalnya untuk memipet volume 20 uL, sebaiknya digunakan P20 dari pada P200. Beberapa bagian penting dari mikropipet dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2 Beberapa bagian penting dari mikropipet.

Menggunakan mikropipet:

1. Jangan menggunakan atau memipet volume melebihi batas atas dari mikropipet. Batas tersebut adalah P20: 0.5 to 20.0 μ l; P200: 20 to 200 μ l; P1000: 200 to 1000 μ l
2. Atur volume yang dikehendaki dengan memutar tombol volume adjustment searah jarum jam untuk meningkatkan ukuran volume dan arah berlawanan jam untuk mengurangi ukuran volume. Keakuratan dari tiap ukuran mikropipet umumnya berada pada skala volume terendah yang ditunjukkan pada display volume indicator. Gambar 3 menunjukkan volume indicator dari ketiga ukuran mikropipet Pippetman.
3. Pasang sebuah tip secara pada ujung discharge dari mikropipet. Jika kondisi steril diperlukan, jangan memegang tip tersebut dengan menggunakan tangan secara langsung atau menyentuh ujung tip dengan obyek apapun.

Model	P20	P200	P1000
Volume range	1-20 μ L	20-200 μ L	200-1000 μ L
Smallest measurement increment	0.02 μ L	0.20 μ L	2.0 μ L

P-20	P-200	P-1000												
<table border="1"> <tr><td>1</td><td>← tens</td></tr> <tr><td>7</td><td>← ones</td></tr> </table>	1	← tens	7	← ones	<table border="1"> <tr><td>0</td><td>← hundreds</td></tr> <tr><td>5</td><td>← tens</td></tr> </table>	0	← hundreds	5	← tens	<table border="1"> <tr><td>0</td><td>← thousands</td></tr> <tr><td>9</td><td>← hundreds</td></tr> </table>	0	← thousands	9	← hundreds
1	← tens													
7	← ones													
0	← hundreds													
5	← tens													
0	← thousands													
9	← hundreds													

Gambar 3. Contoh pengaturan mikropipet

4. Tombol pluger akan memiliki 2 posisi stop ketika ditekan. **Titik stop pertama** adalah titik yang menandai batas jumlah volume yang dikehendaki yang hendak ditransfer. Oleh karena titik stop pertama ini tergantung pada volume yang akan ditransfer, jarak yang akan kita tekan pada tombol

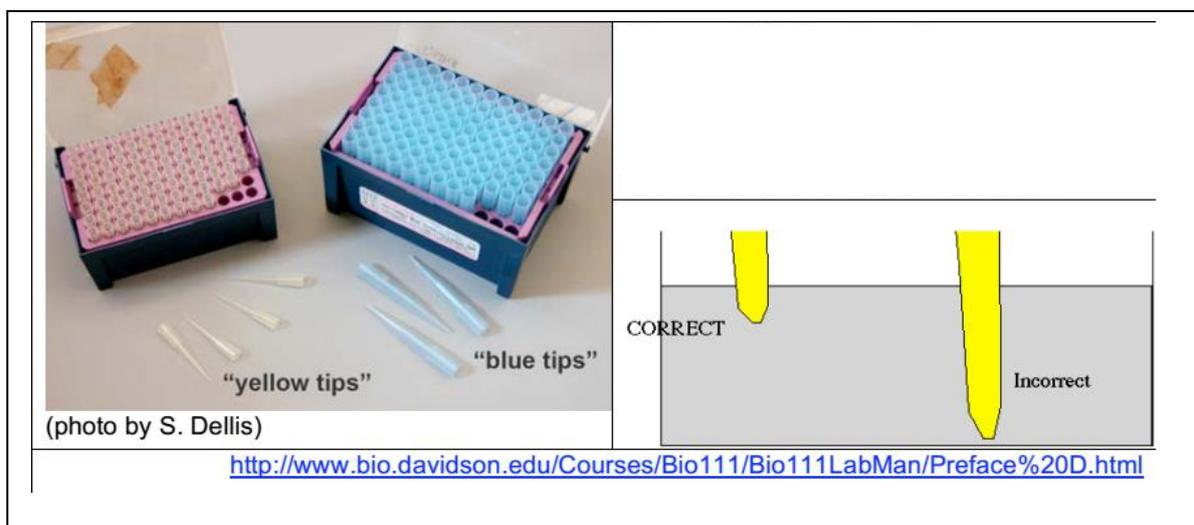
pluger ke titik stop awal ini, akan berubah tergantung pada volume yang akan dipipet. Dan volume ini sudah kita tentukan setelah mengatur tombol volume adjustment sesuai dengan volume yang kita kehendaki sebelumnya. **Titik batas stop kedua** adalah titik yang dapat ditemukan ketika pluger ditekan melewati batas titik stop pertama, sampai pluger menyentuh body utama dari mikropipet. Pada titik ini tombol pluger tidak dapat lagi ditekan lebih lanjut. Titik stop kedua digunakan ketika kita ingin mengeluarkan keseluruhan larutan dari tip. Oleh karena itu, pada saat memipet larutan (MEMASUKKAN larutan ke tip), jangan menekan titik stop kedua. Titik stop kedua hanya digunakan untuk MENGELUARKAN semua larutan dari tip.

5. Tekan tombol pluger sampai batas stop pertama dan masukkan ujung tip ke dalam larutan yang akan dipipet. Pastikan ujung tip tidak sampai menyentuh dasar dari wadah larutan yang akan dipipet atau usahakan tidak sedalam mungkin memasukan ujung tip pada larutan (Gamabar 4).

6. Secara perlahan lepaskan tombol pluger. Hal yang perlu diketahui, apabila larutan yang akan dipipet bersifat kental (Viscous), biarkan ujung tip terisi dengan larutan sampai batas volume yang dikehendaki untuk mencegah terbentuknya gelembung udara pada tip yang pada akhirnya akan mengurangi keakuratan volume yang dipipet.

7. Keluarkan larutan ke dalam tempat penampung larutan dengan cara menekan tombol pluger. Pada tahap ini tekan tombol pluger sampai TITIK STOP PERTAMA dan tunggu beberapa detik kemudian lanjutkan dengan menekan lebih lanjut tombol pluger sampai keseluruhan larutan keluar dari tip. Pada beberapa jenis mikropipet, penekanan sampai batas ujung tombol pluger akan menyebabkan tip terlepas dari ujung mikropipet, jadi pastikan penekanan tombol pluger sesuai dengan petunjuk manual mikropipet tersebut.

8. Lepaskan tip dengan menekan tombol TIP DISCARDER..



Gambar 4. Jenis tip dan posisi seharusnya ujung tip pada larutan yang akan dipipet.

Procedure:

You will use a variable micropipette to prepare seven different dye mixtures in the wells of a microtiter plate. You will then dispense 5 μ l of each diluted dye solution onto a pipet card in triplicate.

1. Label a microtiter plate with your initials and number seven of the wells as 1-7. Prepare solutions 1-7 using the ingredients shown in the following table.
2. After preparing the dye mixtures, pipet 10 μ l of each mixture onto the corresponding numbered row of circles on the Pipet Card. Pipet the dye mixture onto the center of each circle.
3. Compare the colors of your circles to those of your classmates. Tape your cards into your laboratory notebook.

PEMBUATAN STOK LARUTAN

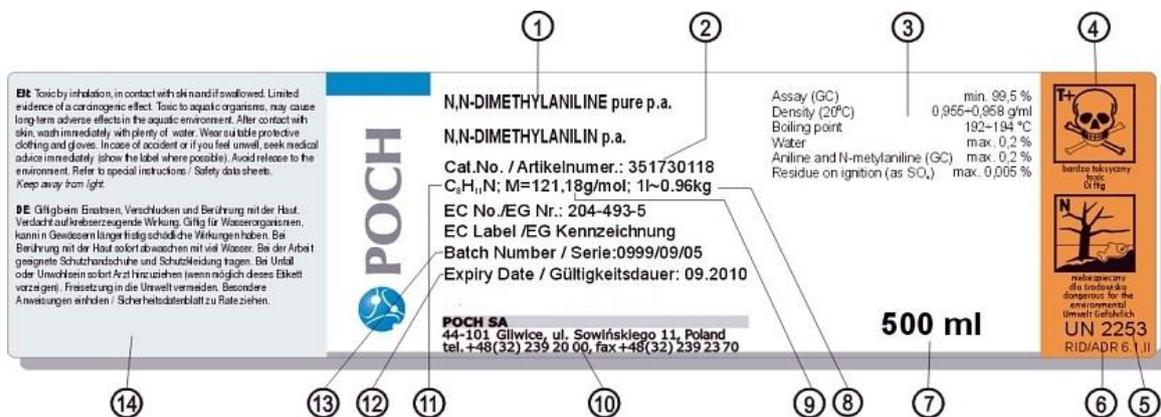
Tujuan: Membuat larutan dan menghitung perhitungan kimia dengan benar

Sebagian besar dari reagen yang digunakan dalam prosedur kerja laboratorium biologi sel molekuler khususnya dan kerja laboratorium pada umumnya, berada dalam bentuk larutan yang biasanya dapat dibeli atau dipersiapkan sendiri. Untuk prosedur kerja teknik molekuler, presisi adalah merupakan salah satu faktor penting yang harus dimiliki baik pada sisi faktor metode kerjanya (misalnya memipet larutan reagen, pemilihan reagen atau senyawa kimia yang tepat) maupun penentuan konsentrasi dari bahan kimia yang akan digunakan. Intinya, keakuratan dari pengukuran adalah salah satu kunci penting untuk mendapatkan hasil kerja yang baik pada teknik biologi molekuler.

Beberapa konsep penting dalam preparasi larutan antara lain:

1. Molaritas

Unit yang paling umum digunakan dalam menentukan konsentrasi larutan adalah Molaritas (M). Molaritas larutan didefinisikan sebagai jumlah mol zat terlarut per liter larutan. Unit volume yang digunakan dalam penghitungan molaritas umumnya adalah dalam liter bukan mililiter atau unit lainnya. Perlu diingat bahwa 1 liter larutan mengandung baik zat terlarut dan pelarutnya, sehingga molaritas dapat diartikan sebagai rasio antara zat terlarut dan liter dari larutan tersebut. Untuk menyiapkan suatu larutan umumnya sejumlah volume dan molaritas tertentu perlu diketahui. Untuk menentukan molaritas, berat molekul (BM) atau molecular weight (MW) dari zat yang akan dibuat larutannya harus diketahui. Hampir semua zat kimia, khususnya yang 'reagen grade' atau 'molecular grade' informasi tentang MW atau BM zat tersebut dapat ditemukan pada label kontainer zat tersebut (Gambar 1). Pada Gambar 1 selain tertera MW dari zat tersebut, juga tertera beberapa informasi penting tentang zat tersebut.



Gambar 1 Salah satu contoh label zat 'molecular grade' pada botol kemasan. Nomor 9 menunjukkan berat molekul (BM) atau Molecular Weight (MW) dari zat tersebut.

Terdapat perbedaan dalam mempersiapkan larutan dengan Molaritas tertentu untuk bahan yang berwujud padat dan berwujud cair. Berikut contoh menghitung dan mempersiapkan konsentrasi larutan dalam Molaritas.

Jika zat yang akan dibuat larutannya berbentuk **padat**, gunakan prosedur sebagai berikut. Tentukan berat dalam gram (atau miligram) dari 1 mol zat tersebut (misalnya kita beri label MW). Kemudian tentukan volume yang dikehendaki dalam liter (V). Tentukan konsentrasi molaritas

larutan yang dikehendaki (M). Ukur dalam gram zat tersebut menggunakan formula sebagai berikut.

$$M \text{ (dalam gr)} = MW \times V \times M$$

Contoh:

Siapkan 800 mL larutan 2M Sodium Klorida (NaCl). Diketahui MW NaCl = 58.45g/mol!

Maka berat bubuk NaCl yang harus ditimbang adalah:

$$\begin{aligned} M \text{ NaCl} &= 58.45 \text{ g/mol} \times 0.8 \text{ L} \times 2 \text{ mol/L} \\ &= 93.52 \text{ g NaCl} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan yang diinginkan, dilarutkan NaCl bubuk sebanyak 93.52 g kedalam 400 mL air destilasi kemudian tambahkan air destilasi sampai mencapai volume 800 mL.

Jika larutan yang akan dibuat berasal dari zat yang berbentuk **cair**, maka gunakan formula perhitungan sebagai berikut

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

M_1 = Molaritas dari zat yang akan diencerkan, jadi zat ini berada dalam bentuk konsentrat.

V_1 = Volume yang harus diambil untuk diencerkan dari zat tersebut.

M_2 = Molaritas atau konsentrasi yang diinginkan

V_2 = volume yang ingin dibuat. Pastikan bahwa V_1 dan V_2 memiliki unit yang sama.

Contoh:

Siapkan 100 mL 1.0 M asam klorida (HCl) dari HCl konsentrat (12.1 M)!

Maka, jumlah larutan konsentrat yang harus dipipet adalah:

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$(12.1M) \cdot (V_1) = (1.0M) \cdot (100\text{mL})$$

$$V_1 = 8.26 \text{ mL}$$

Jadi untuk membuat larutan yang diinginkan, diambil 8.26 mL HCl konsentrat dan tambahkan air destilasi sampai mencapai volume 100mL.

2. Persentase

Terdapat beberapa versi konsentrasi dalam bentuk persentase.

a. Persentase berat dari larutan (%w/w = %b/b)

Didefinisikan berdasarkan pada gram dari zat terlarut per 100 gr larutan. Contoh: 20 g NaCl dalam 100 g larutan adalah 20% dari berat larutan.

b. Persentase volume dari larutan (%v/v)

Diartikan sebagai mililiter zat terlarut per 100 mL dari larutan. Contoh: 10 mililiter Etil alkohol ditambah dengan 90 mL H₂O merupakan larutan Etil Alkohol berkonsentrasi 10% sebanyak 100 mL.

c. Persentase volume-berat (%w/v = %b/v)

Pada kasus pengenceran ini, diartikan sebagai gram zat terlarut dalam 100 mL larutan. Contoh: 1 g phenolphthalein dalam 100 mL 95% Etil alkohol adalah larutan 1 w/v%

3. Part per million (PPM) = Bagian per juta

Konsentrasi dalam unit PPM terkadang juga digunakan dalam pembuatan larutan. Konsep ppm mirip dengan % b/v, namun dengan satuan yang berbeda. 1 ppm diartikan sebagai 1 mg zat terlarut yang dilarutkan dalam 1 liter larutan.

Contoh: 50 ppm larutan IAA dibuat dengan melarutkan 50 mg bubuk IAA dalam 1 liter larutan.

4. Konversi antar satuan persen

Untuk mengkonversi antar satuan persen, diperlukan informasi mengenai densitas larutan murni dan densitas larutan yang akan dikonversi.

Contoh:

Berapakah nilai persentase 10% (b/b) etil alkohol dalam % v/v jika diketahui densitas etil alkohol 0.794 g/mL dan densitas etil alkohol 10% 0.983 g/mL?

10% (b/b) etil alkohol dalam air artinya terdapat 10 gram etil alkohol dalam 90 gram air.

Volume etil alkohol = bobot/densitas

Volume etil alkohol = 10 gram / 0.794 g/mL

Volume etil alkohol = 12.6 mL

Volume 10% etil alkohol = bobot/densitas

Volume 10% etil alkohol = 100/0.983 g/mL

Volume 10% etil alkohol = 101.8 mL

Sehingga, 10% b/b etil alkohol setara dengan = volume etil alkohol/volume 10% etil alkohol sebesar

= 12.6 ml/101.8 mL

= 12.4 % v/v

5. Menghitung Molaritas dari konsentrasi persen

Untuk mengkonversi nilai konsentrasi persen menjadi molaritas juga dibutuhkan nilai massa molar dan nilai densitas.

Contoh:

Konversi 37.2% asam klorida (HCl) menjadi molaritas jika diketahui densitas HCl adalah 1.19 g/mL dan Massa molarnya 36,4 g/mol

Massa larutan = volume x densitas

Massa larutan = 1000 mL x 1.19 g/mL

Massa larutan = 1190 g

Massa % HCl = 37.2 % = 0.372

Massa Molar HCl = 36.4 g/mol

Mol HCl = (massa larutan HCl x massa % HCl) / massa molar

Mol HCl = (1190 x 0.372) / 36.4

Mol HCl = 12.1

sehingga, nilai molaritas HCl = 12.1 mol/1 liter

= 12,1 M

Kegiatan Praktikum

1. Buatlah 250 mL larutan Tris-HCl 1M dengan pH = 8
2. Buatlah 250 mL larutan EDTA 0,5M dengan pH = 8
3. Buatlah 100 mL larutan SDS 10% (b/v)
4. Buatlah 100 mL larutan buffer Lisis SDS
5. Buatlah 1000 mL larutan buffer TAE 10x
6. Buatlah 50 mL larutan Sodium asetat 3M pH =5.2

Beberapa resep pembuatan larutan yang umum digunakan dalam biologi molekuler:

Tris HCl 1M pH 8

Komponen	Vol 100 ml	Vol 250 ml	Vol 500 ml	Vol 1000 ml
Tris base (MR 121,1 g/mol)	12,11 g			
ddH ₂ O	80 ml			
HCl pekat	4,2 ml			

Autoclaved

EDTA 0,5M pH 8

Komponen	Vol 100 ml	Vol 250 ml	Vol 500 ml	Vol 1000 ml
EDTA (MR 372,2 g/mol)	18,61 g			
ddH ₂ O	80 ml			
NaOH	2 g			

Autoclaved

NaCl 5M

Komponen	500 ml
NaCl	146,1 g
ddH ₂ O	350 ml, lalu setelah larut jadikan hingga 500 ml

Autoclaved

SDS 10%

Komponen	Vol 100 ml
SDS	10 g
ddH ₂ O	90 ml

Buffer Lisis SDS

Komponen	Vol 500 ml
Tris HCl 1M pH 8	5 ml
EDTA 0,5M pH 8	0,5 ml
10% SDS	5 ml
ddH ₂ O	Sampai 500 ml

Buffer Lisis CTAB

Komponen	500 ml
Tris HCl 1M pH 8	50 ml
EDTA 0,5M pH 8	20 ml
NaCl 5M	140 ml
CTAB	10 g
ddH ₂ O	Sampai 500 ml

Buffer TE

Komponen	100 ml	500 ml
Tris HCl 1M pH 8	1 ml	
EDTA 0,5M pH 8	0,2 ml	
ddH ₂ O	Sampai 100 ml	

TAE 50x

Komponen	1000 ml
Tris base	48,4 g
Asam asetat glacial	11,4 ml
0,5M EDTA pH 8	20 ml
ddH ₂ O	Sampai 1000 ml

Sodium Asetat 3M

Komponen	50 ml
Sodium asetat	20,4 g
ddH ₂ O	35 ml
Asam asetat glacial	Hingga pH 5.2

Setelah pH sesuai, tera hingga 50 ml

Soal Latihan

1. How much 2.0 M NaCl solution would you need to make 250 ml of 0.15 M NaCl solution?
2. What would be the concentration of a solution made by diluting 45.0 ml of 4.2 M KOH to 250 ml?
3. What would be the concentration of a solution made by adding 250 ml of water to 45.0 ml of 4.2 M KOH?
4. How much 2% glucose solution can be made from 50 ml of 35% glucose solution?
5. A stock solution of 1.00 M NaCl is available. how many millilitres are needed to make 100.0 ml of 0.750 M
6. What volume of 0.250 M KCl is needed to make 100.0 ml of 0.100 M solution?
7. Concentrated H₂SO₄ is 18.0 M. What volume is needed to make 2.00 l of 1.00 M solution?
8. Concentrated HCl is 12.0 M. What volume is needed to make 2.00 l of 1.00 M solution?
9. 0.500 M solution is to be diluted to 500.0 ml of a 0.150 M solution. how many ml of the 0.500 M solution are required?
10. A stock solution of 10.0 M NaOH is prepared. From this solution, you need to make 250.0 ml of 0.375 M solution. how many ml will be required?
11. 2.00 l of 0.800 M NaNO₃ must be prepared from a solution known to be 1.50 M in concentration. how many ml are required?

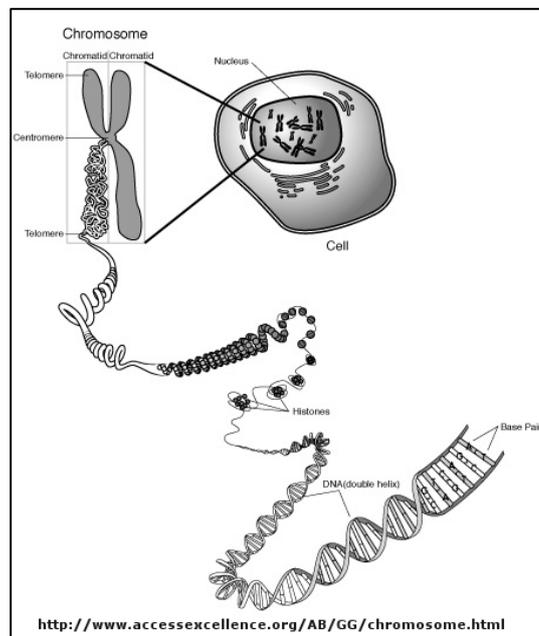
ISOLASI DAN VISUALISASI DNA GENOM TANAMAN

TUJUAN

Mengisolasi dan memvisualisasi DNA hasil isolasi melalui elektroforesis agarose

DASAR TEORI

Genom merupakan keseluruhan material genetik yang terdapat di dalam sel, namun lebih mengacu pada DNA kromosom. Isolasi DNA genom merupakan tahapan awal untuk melakukan rekayasa genetika. Proses isolasi DNA merupakan proses mengeluarkan DNA dari dalam sel. Karena letak kromosom terdapat pada inti sel, maka perlu dilakukan penghancuran dinding sel, membran sel, dan membran inti agar DNA dapat diperoleh. Namun proses penghancuran berbagai material sel ini tetap harus terkontrol agar DNA tidak ikut rusak.



Gambar 1 Lokasi DNA di dalam sel.

Tahapan pertama dalam proses isolasi DNA adalah pengancuran dinding sel. Proses ini biasanya dilakukan dengan perlakuan fisik seperti penggerusan. Untuk material yang jumlahnya sedikit, proses penggerusan dapat dilakukan menggunakan grinder (plastic pestle) langsung di dalam tabung 1,5 ml. Material yang lebih banyak, proses penggerusan dapat dilakukan menggunakan pestle porselen, sedangkan jika lebih besar lagi dapat menggunakan blender. Proses penggerusan lebih baik dilakukan dengan bantuan N_2 cair, yang membuat material menjadi beku, rapuh, dan mudah untuk dihancurkan tanpa banyak mempengaruhi proses seluler yang masih dapat terjadi selama proses berlangsung. Selain itu, hasil gerusan menggunakan bantuan N_2 cair akan menghasilkan sampel dalam bentuk bubuk sehingga mempermudah proses selanjutnya.

Material yang telah digerus dan dirusak dinding selnya kemudian diberi perlakuan lisis. Proses lisis berfungsi untuk menghancurkan membran sel dan membran inti. Bahan yang biasa digunakan dalam proses lisis adalah larutan deterjen seperti SDS maupun CTAB. Pemberian larutan deterjen dalam buffer lisis memberikan efek pada kerusakan membran sehingga sel terpecah. Untuk memaksimalkan proses lisis, dapat dilakukan inkubasi pada suhu 60-65°C. Pada tahap ini, cairan yang diperoleh sudah mengandung DNA terlarut. Untuk meningkatkan kemurnian DNA dan menghilangkan pengotor, dilakukan proses pembersihan menggunakan fenol, kloroform, dan isoamilalcohol pada supernatan yang diperoleh. Proses ini akan menghancurkan pengotor seperti protein maupun polisakarida.

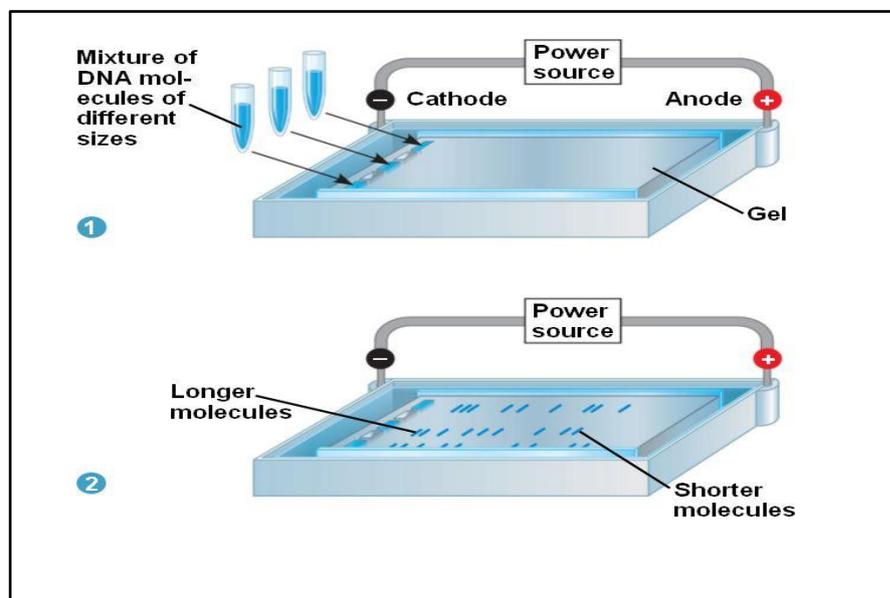


Gambar 2 Proses isolasi DNA skala besar menggunakan blender, skala menengah menggunakan mortar, dan skala kecil menggunakan grinder (plastic pestle) langsung di tabung 1,5 ml. Benang-benang putih merupakan DNA (Semagn *et al.* 2006).

Tahap selanjutnya setelah pemurnian, dilakukan proses presipitasi atau pengendapan DNA. Proses presipitasi dapat dilakukan dengan pemberian larutan isopropanol dingin atau etanol absolut dingin yang ditambahkan sedikit amonium asetat atau natrium asetat. DNA akan tertarik dari larutan dan mengendap membentuk massa kental seperti lendir. Setelah DNA diendapkan, dilakukan pencucian DNA untuk menghilangkan sisa pengotor menggunakan etanol 70%. Pelet DNA yang diperoleh kemudian dikeringkan dan dilarutkan menggunakan buffer TE ataupun ddH₂O steril. Pelarutan dengan TE akan menjaga DNA lebih tahan lama, namun jika DNA akan digunakan untuk reaksi PCR, terkadang TE justru dapat menjadi inhibitor reaksi PCR. Sehingga, pelarut DNA harus disesuaikan dengan keperluan kegiatan pasca isolasi DNA.

Pengecekan asam nukleat hasil isolasi, PCR, pemotongan, atau proses lainnya dapat dilakukan menggunakan elektroforesis pada gel agarose. Gel agarose merupakan partikel agar yang diisolasi dari alga merah. Partikel agar pada gel agarose akan menjadi matriks berpori. Besar-kecilnya pori disebabkan banyak-sedikitnya bubuk agarose yang digunakan. Sedangkan teknik elektroforesis adalah teknik pemisahan asam nukleat berdasarkan ukuran.

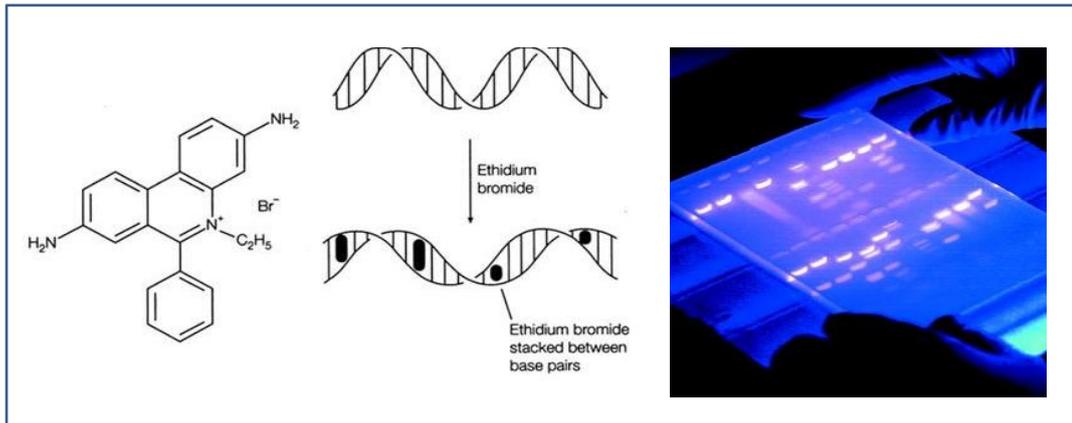
Melalui teknik elektroforesis, asam nukleat dimasukkan ke dalam matriks dan diberi muatan listrik. Muatan listrik akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif. Asam nukleat memiliki muatan negatif karena memiliki backbone berupa gugus fosfat yang muatannya negatif. Pergerakan asam nukleat dari kutub negatif ke positif akan berbeda-beda bergantung pada ukuran asam nukleat tersebut. Asam nukleat yang berukuran panjang akan memiliki laju migrasi yang lebih lambat dibandingkan yang berukuran pendek, begitu pula sebaliknya.



<http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch20/electrophoresis.html>

Gambar 3 Prinsip migrasi asam nukleat dalam proses elektroforesis.

Setelah DNA dimigrasikan pada gel agarose, maka perlu dilakukan proses pewarnaan agar DNA terlihat. Pewarnaan yang umum digunakan adalah pewarnaan menggunakan Ethidium bromida (EtBr). EtBr akan menyisip diantara basa nitrogen utas asam nukleat. Karena struktur dari EtBr memiliki gugus kromofor, maka saat dipaparkan pada sinar UV dari UV-Transluminator, EtBr dapat menghasilkan pendaran warna. Namun, penggunaan EtBr harus dilakukan dengan sangat hati-hati karena EtBr merupakan bahan yang sangat toksik, dan bersifat karsinogenik. Larutan buangan sisa EtBr juga harus diberi perlakuan detoksifikasi sebelum dibuang ke lingkungan. Saat ini, sudah banyak bahan substitusi EtBr yang lebih aman dan tidak bersifat toksik seperti SYBR Safe, SYBR green, Gel Red, Diamond nucleic acid dye, dsb. Kekurangan dari bahan-bahan substitusi EtBr adalah harganya yang jauh lebih mahal dibandingkan EtBr.



Gambar 4 Penyisipan EtBr pada basa nitrogen DNA dan hasil pendarannya saat diekspos pada UV-transluminator.

KEGIATAN PRAKTIKUM

Isolasi DNA Genom Tanaman

1. Ambil, bersihkan, dan timbang kira-kira 2 gram (mortar) atau 250 mg (tabung 1,5 ml) sampel daun, kelopak, mahkota bunga, atau material lain yang akan diisolasi DNA-nya, lalu potong-potong menggunakan gunting dan masukkan dalam mortar atau tabung 1,5 ml.
2. Beri perlakuan N₂ cair agar sampel beku dan rapuh untuk dihancurkan. Gerus hingga sampel menjadi seperti bubuk (Perhatikan, jangan sampai sampel mencair sebelum diberi buffer lisis. Jika terlihat mulai mencair, tambahkan kembali N₂ cair agar sampel kembali beku. Jika tidak ada N₂ cair, proses penggerusan harus dilakukan dengan langsung menambahkan 650-100 µl buffer lisis).
3. Tambahkan 650-1000 µl buffer lisis, kemudian vorteks selama 1 menit. Lalu, sentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 13.000g.
4. Pipet supernatan secara hati-hati ke tabung 1,5 ml baru. Perhatikan jangan sampai debris sel ikut terpipet
5. Murnikan supernatan dengan 1x vol larutan fenol: cloroform: isoamilalkohol = 25:24:1. Bolak-balik tabung secara perlahan selama 5 menit, kemudian sentrifugasi 13.000g selama 10 menit
6. Pipet supernatan secara hati-hati ke tabung 1,5 ml baru. Perhatikan jangan sampai fase bawah larutan ikut terpipet
7. Presipitasi supernatan yang sudah dipipet dengan 1x vol isopropanol dingin, bolak-balik tabung selama 5 menit, sentrifugasi pada 13.000g selama 5 menit. DNA akan mengendap sebagai pelet
8. Buang larutan supernatan, kemudian cuci pelet dengan etanol 70%, bolak-balik tabung selama 3-5 menit, sentrifugasi kembali pada 13.000 g selama 3 menit. Pelet DNA akan kembali mengendap

9. Buang larutan etanol 70%, keringangin-kan pelet DNA di dalam laminar dengan keadaan tutup terbuka selama kurang lebih 5 menit
10. Setelah pelet DNA kering, larutkan dengan 50 μ l TE atau ddH₂O. Simpan DNA hasil isolasi di freezer

Visualisasi DNA dengan elektroforesis

1. Buat gel agarose 0,8% menggunakan pelarut TAE 1x (2,4 gram dalam 300 ml TAE 1x).
2. Didihkan larutan gel, kemudian setelah hangat-hangat kuku tuang gel ke cetakan gel yang sudah diatur dan dipasang sisir gel
3. Setelah gel solid sempurna, gel siap digunakan untuk elektroforesis
4. Cabut sisir gel, kemudian letakkan gel ke dalam chamber elektroforesis
5. Tuangkan buffer TAE 1x pada chamber elektroforesis hingga gel terendam sempurna
6. Siapkan DNA, dan campurkan dengan loading dye (LD) dengan perbandingan 6:1 (6 μ l DNA hasil isolasi ditambahkan 1 μ l LD)
7. Injeksikan sampel DNA yang sudah diberi LD ke dalam sumur sampel gel. Lakukan hingga seluruh sampel terinjeksi, tambahkan marker berupa 1kb DNA Ladder pada salah 1 sumur sampel
8. Tutup casing chamber elektroforesis, sambungkan kabel ke power supply. Atur voltase sebesar 75 volt dengan waktu 20 menit, lalu mulai proses elektroforesis
9. Setelah proses running elektroforesis selesai, rendam gel ke dalam larutan pewarna gel (1x Diamond nucleic acid dye) selama 5 menit
10. Letakkan gel diatas UV transluminator, lalu nyalakan lampu UV. Dokumentasikan gel hasil elektroforesis
11. Analisis hasil pita yang muncul dari hasil elektroforesis

PERTANYAAN

1. Mengapa proses lisis dan elektroforesis selalu menggunakan larutan buffer?
2. Apa artinya jika DNA hasil isolasi menunjukkan hasil *smear* saat dielektroforesis?
3. Apa fungsi loading dye pada saat proses elektroforesis?

KUANTIFIKASI DNA DENGAN MENGGUNAKAN GEL ELEKTROFORESIS

Teori

Pengukuran konsentrasi DNA merupakan tahap penting dalam teknik molekuler biologi. Dengan mengetahui konsentrasi DNA secara tepat, maka tahap-tahap berikutnya dalam prosedur bekerja dengan DNA dapat dilakukan dengan lebih baik, misalnya tahap amplifikasi DNA menggunakan teknik Polimerase Chain Reaction (PCR), pemotongan DNA, cloning fragmen ke vektor plasmid tertentu dan banyak tahap lainnya yang mempersyaratkan adanya informasi konsentrasi DNA.

Cara umum yang dilakukan untuk mengukur konsentrasi DNA adalah dengan menggunakan teknik spektrofotometri. Pada teknik ini, digunakan alat spektrofotometer sebagai alat utamanya. Spektrofotometer selain dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi dari DNA, juga dapat digunakan untuk menentukan ada tidaknya kontaminasi pada DNA yang diukur, misalnya untuk DNA hasil ekstraksi, fenol, protein, dan RNA merupakan senyawa yang sering kali ditemukan sebagai kontaminan DNA.

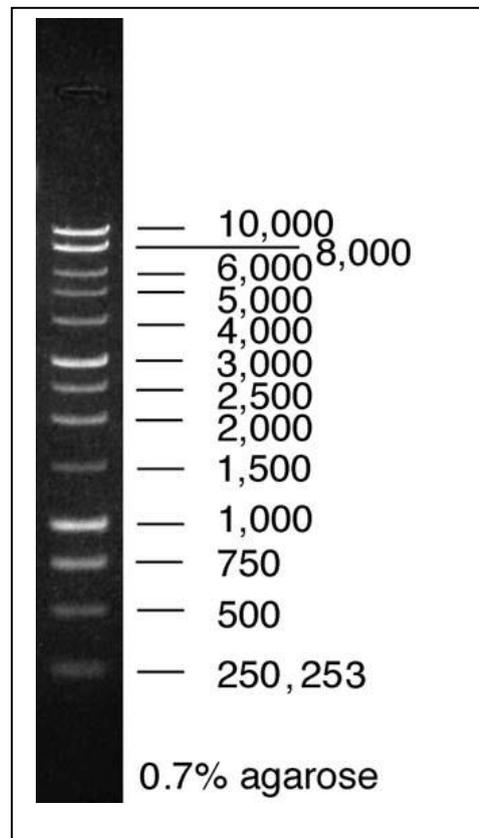
Penentuan konsentrasi DNA dilakukan dengan mengukur nilai absorbansi pada panjang gelombang 260nm (A_{260}). Untuk nilai akurasi yang tinggi, nilai pengukuran akan menunjukkan nilai antara 0.1 – 1.0. Nilai absorbansi 1 ekuivalen dengan kurang lebih 50 μg DNA genomik per ml ($(A_{260}=1 \text{ for } 50 \mu\text{g/ml})$). Namun nilai ini hanya akan valid pada kondisi pH netral, oleh karena itu sampel DNA yang akan diukur sebaiknya diencerkan pada bufer yang mengandung garam rendah dengan pH netral, misalnya Tris Cl, pH 7.0.

Prosedur

1. Buatlah gel agarosa 1% dengan cara menambahkan sekitar 0,3 gram agarosa ke dalam 30 ml 1X bufer TAE. Panaskan sampai mendidih dan tuangkan pada cetakan gel (tray) yang sudah dipersiapkan ketika gel tersebut sudah cukup dingin (bersuhu sekitar 50°C).
2. Untuk masing masing kelompok, masukan hasil pemotongan dengan enzim restriksi yang sudah dipersiapkan sebelumnya sebanyak 5-10 μl setelah ditambahkan dengan 1-2 μl loading dye. Masukkan pula DNA hasil isolasi sebanyak 5-10 μl sebagai kontrol.
3. Masukkan 1kb DNA ladder marker (Promega) sebanyak 5 -10 ul pada line pertama pada gel agarosanya
4. Nyalakan elektroforesis pada 100V selama kerang lebih 1 jam. Matikan alat elektroforesis dan warnai gel tersebut dengan menggunakan larutan pewarna gel yang sudah dipersiapkan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan staining selama 10-15 menit.
5. Letakkan gel agarosa pada UV desk untuk visualisasi gel dan ambil foto gel agarosa tersebut.
6. Analisis foto tersebut.
7. Perhatikan dan hitung konsentrasi dari tiap-tiap pita dari DNA marker yang dipergunakan untuk elektroforesis. Beberapa company menyediakan informasi ini pada petunjuk manual dari DNA ladder tersebut. Pastikan berapa μl DNA yang

digunakan pada petunjuk tersebut dan berapa μl DNA ladder yang ada gunakan pada elektroforesis.

8. Cara menghitung: untuk 1kb DNA Ladder (Promega)



Hitung total jumlah keseluruhan pita panjang DNA ladder

$$\text{Total panjang DNA Ladder} = 10.000 + 8.000 + 6.000 + \dots + 250 = X\%$$

Karena kuantitas total dari 1kb DNA ladder yang dielektroforesis sudah diketahui (10 μl misalnya ekuivalen dengan 5 μg , ini bisa dihitung dengan melihat berapa konsentrasi DNA ladder pada petunjuk manualnya), maka prosentase dari tiap tiap pita DNA ladder dapat diestimasi untuk dihitung.

$$10.000 / X = a\%$$

$$8.000 / X = b\%$$

Dan seterusnya sampai kesemua pita diestimasi.

Oleh karena kuantitas dari DNA ladder yang dielektroforesis juga sudah diketahui, maka kuantitas dari tiap pita juga dapat diestimasi. Misalnya: untuk pita 10.000 bp kita dapatkan 48% dari perhitungan, maka pada 10 μl sampel DNA ladder yang kita elektroforesis terdapat 48% X 5 μg = 2,4 μg .

9. Estimasi dapat dilakukan dengan cara membandingkan ketebalan pita hasil elektroforesis dari sampel (hasil pemotongan dengan enzim restriksi atau PCR atau

DNA hasil isolasi) dengan pita hasil elektroforesis DNA ladder yang sudah diketahui konsentrasinya dari hasil penghitungan yang sudah dilakukan. Jika ketebalan (ketajaman pita) hampir sama dengan ketebalan pita DNA ladder tertentu, maka estimasi mikrogram dari konsentrasi DNA tersebut dapat dihitung. Perhatikan juga jumlah mikroliter sampel dari DNA ladder dan sampel yang akan diukur pada elektroforesis.

Pertanyaan:

1. Jika sampel yang hendak diukur yang dielektroforesis adalah berjumlah 20 μ l, dan pita DNA yang terbentuk memiliki ketebalan hampir sama dengan ketebalan pita berukuran 3.000 bp pada 1kb DNA ladder (Promega), maka berapa estimasi mikrogram dari pita sampel tersebut? 1kb DNA ladder yang dielektroforesis adalah sebanyak 5 μ g.
2. Carilah jenis DNA ladder marker lainnya, dan hitung konsentrasi tiap pita elektroforesis DNA ladder tersebut (minimal 3).

PEMOTONGAN DNA DENGAN ENZIM RESTRIKSI

Pada teknik molekular biologi, banyak terdapat prosedur yang memerlukan konversi DNA genomik menjadi fragmen-fragmen DNA yang memiliki ukuran lebih kecil. Untuk itu, digunakan teknik pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi (restriction endonuclease digestion). Enzim restriksi adalah enzim yang diisolasi dari bakteri yang mampu menempel dan memotong DNA pada target sekuens yang spesifik. Enzim restriksi tipe II adalah enzim yang umum digunakan pada teknik molekular biologi. Lokasi pengenalan target sekuens oleh enzim restriksi ditandai dengan adanya recognition site yang tersusun atas sekuens pendek palindromik, misalnya AGCT (untuk enzim restriksi *AluI*), GAATTC (untuk enzim restriksi *EcoRI*). Isozimer merupakan enzim restriksi- enzim restriksi yang berbeda tetapi memiliki recognition site yang sama, sehingga dapat digunakan sebagai substitusi bagi enzim restriksi isozimernya. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam memilih enzim restriksi adalah:

- Ukuran fragmen yang diinginkan
- Sensitivitas terhadap metilasi
- Kondisi ujung dari pemotongan, apakah Blunt-ended atau sticky-ended
- Kompatibilitas dari kondisi reaksi (bila akan menggunakan beberapa jenis enzim restriksi untuk satu reaksi)

Enzim restriksi yang memiliki recognition site lebih pendek, misalnya 4 basa nukleotida, akan memiliki peluang untuk memotong DNA pada lebih banyak site dari pada enzim restriksi yang memiliki recognition site lebih panjang (misalnya 6 basa nukleotida). Sebagai ilustrasi, enzim restriksi dengan 4 basa recognition site akan memotong DNA pada setiap 4^4 (256) basa, sedangkan enzim dengan 6 basa recognition site akan memotong DNA pada tiap 4^6 (4096) basa.

Komponen yang digunakan dalam pemotongan DNA terdiri dari:

- Air (bides atau deionized H₂O) steril
- Buffer restriksi
- Enzim restriksi
- DNA

Jumlah dari DNA yang akan dipotong tergantung pada untuk keperluan apa fragmen hasil pemotongan itu akan digunakan serta ukuran genom dari organisme yang sedang dianalisis. Konsentrasi DNA yang umum digunakan adalah 10 µg untuk tiap reaksi untuk analisis Southern Blotting, dan sekitar 0.2–1 µg untuk tujuan kloning.

Satuan unit dari enzim restriksi adalah dalam ukuran Unit (U). Satu unit enzim restriksi didefinisikan sebagai jumlah enzim restriksi yang mampu memotong DNA sebanyak 1 µg secara sempurna dalam 1 jam. Meskipun untuk kasus DNA plasmid yang berbentuk supercoil, umumnya diperlukan lebih dari 1 unit/ µg untuk mendapatkan pemotongan secara sempurna.

Cara Kerja

1. Masing-masing kelompok akan memotong DNA genom hasil isolasi menggunakan *EcoRI*, *BamHI*, dan double digest *EcoRI*-*BamHI* masing-masing menggunakan buffer D dan

buffer multicore. Sediakan 4 tabung 1.5 ml yang baru, beri label perlakuan restriksi dan kelompok. Proses harus dilakukan dalam keadaan dingin (di dalam coolbox berisi serutan es). Gunakan glove dan pipet tips yang baru. Penambahan enzim harus dilakukan terakhir setelah semua komponen terhomogenisasi.

2. Reaksi digest dengan EcoRI dan BamHI mengikuti komposisi reaksi seperti berikut:

Komponen	Konsentrasi akhir	Volume (μ l)
10x buffer EcoRI (buffer H) atau 10x BamHI (buffer E)	1x	2
Acetylated BSA (10 μ g/ μ l)	0.1 μ g/ μ l	0.2
DNA genom hasil isolasi	1 μ g	10
ddH ₂ O	-	7.3
EcoRI 12u/ μ l / BamHI 10u/ μ l	6u / 5u	0.5
Total		20

3. Untuk reaksi double digest dilakukan dengan menggunakan 2 jenis buffer yang berbeda (buffer D dan buffer multicore). Berdasarkan protokol, penggunaan buffer multicore untuk double digest EcoRI dan BamHI dapat memicu terjadinya star activity. Sedangkan buffer D efektivitas reaksinya hanya 75%. Untuk itu perlu dilakukan perbandingan kedua reaksi. Buat komposisi reaksi double digest sebagai berikut:

Komponen	Konsentrasi akhir	Volume (μ l)
10x buffer Multicore atau 10x Buffer D	1x	2
Acetylated BSA (10 μ g/ μ l)	0.1 μ g/ μ l	0.2
DNA genom hasil isolasi	1 μ g	10
ddH ₂ O	-	6.8
EcoRI 12u/ μ l	6u	0.5
BamHI 10u/ μ l	5u	0.5
Total		20

4. Setelah reaksi selesai dibuat dan dihomogenisasi, dilakukan sentrifugasi untuk menurunkan semua larutan ke dasar tabung.
5. Inkubasi reaksi pada 37 °C selama 1 jam atau overnight
6. Inaktivasi reaksi pada pemanasan 65 °C selama 15 menit
7. Elektroforesis hasil restriksi pada 1.2% gel agarose menyertakan DNA yang utuh (tidak dipotong) sebagai pembanding.

Pertanyaan

1. Apa peran BSA dalam proses pemotongan DNA
2. Apa artinya jika hasil pemotongan DNA memberikan hasil pita smear? Apa penyebabnya?

REPLIKASI IN-VITRO MENGGUNAKAN POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Tujuan

Melakukan amplifikasi gen secara in-vitro dan mengetahui komponen dalam replikasi DNA

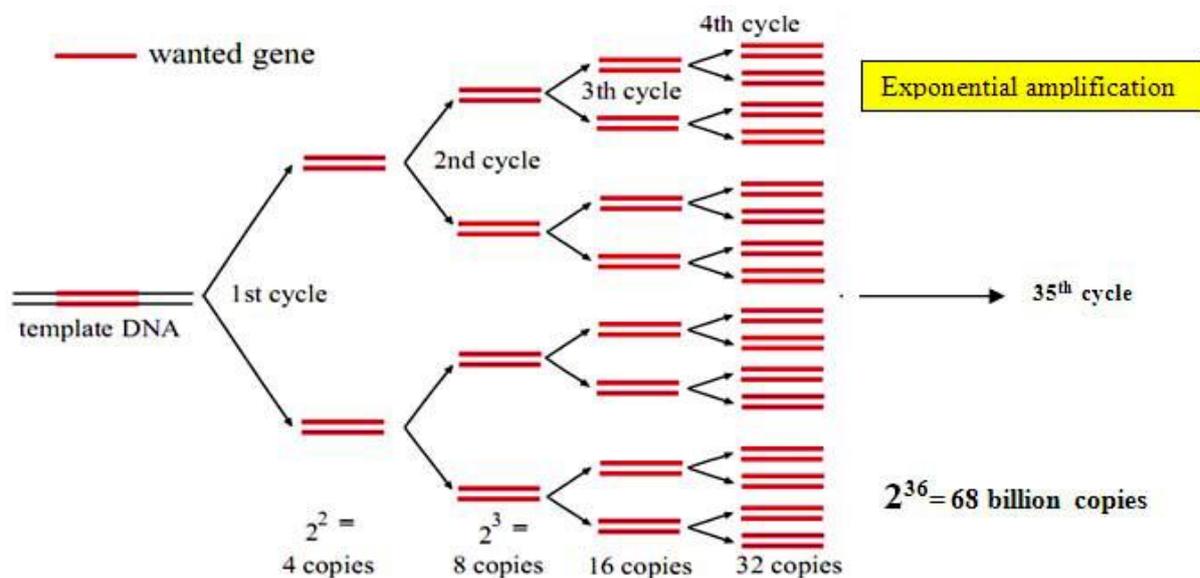
Dasar Teori

Replikasi DNA penting dalam proses pembelahan sel. Tahapan replikasi DNA ini merupakan awalan dalam proses pembelahan sel yaitu pada saat interfase di fase S. Sel akan menggandakan keseluruhan material genetik sehingga material genetik antara sel induk akan sama dengan sel anakan. Pada proses replikasi, diperlukan DNA template, kompleks enzim polimerase, dan nukleotida sebagai bahan baku penyusun DNA. Di dalam sel, kondisi internal sel mendukung proses replikasi ini. Pemahaman tentang proses replikasi, kemudian membuat peneliti mencoba merekayasa proses replikasi secara in-vitro yang kemudian dikenal sebagai amplifikasi DNA melalui Polimerase Chain Reaction (PCR). PCR ditemukan oleh Dr. Karry Mullis dengan meniru proses replikasi DNA di dalam sel. Pada dasarnya, reaksi PCR adalah mencampurkan ke dalam tabung bahan-bahan keperluan reaksi, antara lain:

1. DNA template (cetakan). DNA template harus utuh (tidak terfragmentasi) dan cukup bersih dari kontaminan berupa protein maupun polisakarida.
2. dNTPs (nukleotida). Merupakan campuran dari dATP, dGTP, dTTP, dan dCTP yang menjadi bahan baku dalam proses sintesis DNA.
3. 2 pasang primer (Forward dan Reverse). Primer forward berfungsi sebagai batas awal, sedangkan primer reverse sebagai batas akhir replikasi. Primer merupakan molekul awalan dalam pemanjangan utas DNA.
4. Enzim DNA polimerase. Merupakan enzim yang melakukan proses sintesis DNA berdasarkan DNA cetakan. Enzim Polimerase bervariasi tergantung fidelity (ketelitian) dan kemampuannya mensintesis utas DNA berukuran besar. Enzim polimerase untuk keperluan PCR rutin dan pengecekan umumnya menggunakan enzim *Taq* polimerase.
5. Buffer reaksi. Buffer penting untuk menjaga kondisi pH larutan. Karena proses PCR dilakukan di luar sel, maka kondisi tabung harus dibuat mirip dengan kondisi sel. Selain menjaga pH, buffer juga menyediakan ion-ion divalen Mg^{2+} atau Mn^{2+} dan terkadang juga ion monovalen seperti K^+ untuk membantu kerja enzim polimerase sebagai koenzim.
6. Air. Air merupakan komponen utama penyusun sel. Sehingga reaksi di dalam sel pasti akan membutuhkan air sebagai medium reaksi. Air yang digunakan dalam proses PCR adalah air steril bebas ion (*deionized water*, DW) atau air dengan rating *molecular grade*.

Setelah dicampur dalam satu tabung, campuran reaksi kemudian dimasukkan ke dalam alat thermocycler yang diatur pada 3 kondisi suhu dan waktu yang berbeda. Tiga suhu yang berbeda ini merupakan suhu optimum untuk masing-masing tahapan kerja dalam proses replikasi. Pertama, **denaturasi** yang dilakukan pada suhu tinggi (94-95°C) untuk mengudar utas ganda DNA agar dapat diakses oleh DNA Polimerase. Tahap kedua, **annealing** yang dilakukan pada suhu sekitar 50-60°C tergantung primer yang digunakan. Annealing merupakan tahap saat primer melakukan perpasangan pada utas DNA template akibat ikatan hidrogen. Primer dengan sekuen yang berbeda akan memiliki suhu annealing yang berbeda pula. Tahap ketiga, **elongasi** yang dilakukan pada suhu sekita 72°C (namun tergantung jenis enzim polimerasinya). Pada tahap elongasi, terjadi pemanjangan (sintesis) utas DNA menggunakan dNTP yang disediakan dalam reaksi. Ketiga tahap tersebut diulang sebanyak 30-35 siklus untuk memberikan efek amplifikasi.

Pada setiap siklus dalam PCR, dilakukan penggandaan secara eksponensial. Satu pasang akan menjadi dua pasang, dua pasang akan menjadi empat pasang, ...dst (Gambar 1). Sehingga, produk PCR akan mengikuti fungsi eksponensial 2^n dengan n merupakan jumlah siklusnya. Proses ini PCR disebut sebagai reaksi berantai, karena produk dari reaksi pertama akan menjadi reaktan reaksi berikutnya, begitu pula seterusnya.



Gambar 1 Skema amplifikasi DNA dalam proses PCR mengikuti fungsi eksponensial.

Prosedur Kerja

1. Sebelum bekerja pastikan anda sudah menggunakan sarung tangan dan menyiapkan es untuk meletakkan enzim dan komponen dari PCR yang akan digunakan.

- Cairan komponen PCR yang masih membeku dengan menghangatkan sebentar pada tangan anda beberapa saat. Kemudian letakkan kembali pada es.
- Buat campuran PCR sebagai berikut:

Komponen	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume yang ditambahkan (total)
PCR buffer	10X	1X	5 μ l
Primer forward	10 mM	1 μ M	5 μ l
Primer reverse	10 mM	1 μ M	5 μ l
dNTPs (each)	10mM	200 μ M	1 μ l
DNA polymerase	5U/ μ l	1 unit	0.2 μ l
DNA atau template			1-2 μ l
ddH ₂ O tambahkan sampai total volume			50 μ l

- Untuk menghindari kesalahan dalam pipetasi, dahulukan komponen yang memiliki volume terbanyak sebelum memasukkan komponen dengan volume kecil. Buat perhitungan dahulu sebelum anda melakukan pipetasi komponen-komponen tersebut di atas. DNA polymerase adalah komponen terakhir yang sebaiknya anda masukkan pada campuran tersebut. Apabila anda membuat reaksi PCR secara mandiri, maka untuk DNA polymerase akan ada kesulitan dalam pipetasi, karena pada sebagian DNA polymerase, konsentrasi 1U adalah setara dengan volume 0,2 μ l yang tidak dapat dijangkau oleh mikropipet. Untuk mengatasi hal tersebut, reaksi PCR dapat dibuat dengan cara bersama-sama **minus DNA/template**, kemudian baru dibagi ke tabung PCR 0,2 ml dan setelahnya DNA/template dapat ditambahkan.
- Setelah campuran reaksi PCR tersebut sudah siap dan sudah dimasukkan ke dalam tabung PCR 0,2 ml, sentrifuge sebentar (beberapa detik) untuk menurunkan semua komponen yang menempel pada dinding tabung PCR.
- Nyalakan mesin PCR dan pastikan sudah ada program PCR yang akan digunakan.
- Masukan tabung yang berisi reaksi PCR dan nyalakan program yang sudah dipilih.

Program PCR

Tahap	Suhu	waktu
Denaturasi	95°C	4 menit
Elongasi	95°C	34 siklus
	51°C	
	72°C	
Terminasi	72°C	6 menit
Inkubasi	4°C	Overnight

Pertanyaan:

- Jelaskan proses dan reaksi PCR pada masing masing tahap tersebut di atas!
- Apakah yang dimaksud dengan temperature annealing (T_a) dan temperature melting (T_m)? Dan apa fungsi dari kedua temperature tersebut pada reaksi PCR!