

**PETUNJUK PRAKTIKUM  
BIOLOGI SEL DAN MOLEKULER**

Oleh: Ixora Sartika M  
[ixomerc@uny.ac.id](mailto:ixomerc@uny.ac.id)

**ISOLASI DNA PLASMID**

Plasmid adalah DNA ekstrakromosom yang berbentuk sirkuler dan berukuran kecil (1 – 200 kb). Sebagian besar organisme prokaryot, pada umumnya bakteri, memiliki plasmid. Plasmid mampu bereplikasi secara otonom, tidak tergantung pada replikasi kromosom. Namun demikian, ada beberapa plasmid yang replikasinya mengikuti replikasi DNA kromosom. Plasmid biasanya tidak mengandung gen-gen esensial yang dibutuhkan organisme untuk kelangsungan hidupnya (*housekeeping genes*), tetapi mengandung gen-gen penting yang dibutuhkan organisme dalam kondisi khusus (misal: gen penyandi ketahanan terhadap antibiotik). Berdasarkan jumlah plasmid di dalam sel, plasmid dibedakan menjadi 2, yaitu: *low copy number plasmids* (dalam satu sel hanya mengandung satu atau beberapa plasmid saja) dan *high copy number plasmids* (dalam satu sel mengandung banyak plasmid, hingga ribuan).

Seperti tersebut diatas, plasmid mengandung gen-gen yang dibutuhkan organisme dalam kondisi khusus. Gen-gen tersebut pada umumnya mempunyai fungsi biologi yang penting. Ada beberapa jenis plasmid berdasarkan fungsi biologinya, yaitu:

- **R plasmid** (resistance plasmid).  
Plasmid ini berperan dalam sistem resistensi bakteri terhadap antibiotik ataupun inhibitor pertumbuhan lainnya.
- **F plasmid** (transfer/mobilize plasmid).  
Plasmid ini mempunyai kemampuan untuk mentransfer DNA atau gen baik yang terdapat di dalam plasmid ataupun dalam kromosom.
- **Plasmid penyandi bacteriocins**  
Bacteriocins adalah senyawa yang diproduksi oleh bakteri untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri lain yang spesies ataupun strain/galurnya berbeda. Plasmid ini mengandung gen struktural bacteriocins ataupun gen yang mengkode protein yang berperan dalam pemrosesan dan transport bacteriocins. Penamaan plasmid ini tergantung pada organisme yang memproduksinya,

misalnya: **plasmid Col** pada bakteri *Escherichia coli* yang mengkode colicins (bacteriocins pada *E. coli*)

Sifat-sifat plasmid dan spesifikasi gen yang dibawanya, memungkinkan plasmid dapat dimanfaatkan sebagai vektor kloning dalam rekayasa genetika. Saat ini, plasmid artifisial sudah banyak dikembangkan. Desain plasmid yang mengandung berbagai gen yang berasal dari berbagai organisme (sebagai sumber gen) memungkinkan terjadinya transfer genetik lintas spesies organisme.

Teknik isolasi plasmid yang baik sangat dibutuhkan terutama untuk studi genetik terhadap gen-gen yang terdapat pada plasmid dan pengembangan teknologi DNA rekombinan. Dalam isolasi DNA plasmid biasanya diperoleh plasmid dalam 3 topologi, yaitu: covalently closed circular (ccc), open circular (oc), dan linier (l). Isolasi plasmid bertujuan untuk mengisolasi atau memisahkan plasmid dari molekul-molekul lain yang terdapat di dalam sel.

## **BAHAN DAN ALAT**

### **Bahan**

- Bakteri yang mengandung plasmid
- Media pertumbuhan bakteri cair (LB/NA)
- Larutan suspensi sel (A: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA)
- Larutan lisis (B: 0,2 M NaOH, 1% SDS)
- Larutan Netralisasi (C: 1,32 M Kalium Asetat pH 4,8)
- Phenol : Chloroform : Isoamilalkohol = 25 : 24 : 1
- Sodium asetat 3 M
- Ethanol absolut
- Ethanol 70%
- Aquadest steril

### **Alat**

- Micropipet dan tip
- Tabung 15 ml dan 1.5 µl
- Centrifuge
- Vortex

- oven

## **PROSEDUR**

1. Satu koloni bakteri ditumbuhkan pada 2 ml media cair, inkubasi pada suhu 37°C semalam
2. 100 µl kultur bakteri (1) disubkultur dalam 10 ml media kultur, inkubasi 37°C semalam
3. Ambil 6 ml bakteri dalam kultur cair dan masukkan dalam tabung 15 ml
4. Endapkan bakteri dengan microcentrifuge berkecepatan 3500 rpm pada suhu selama 10 menit
5. Buang supernatan, kemudian tambahkan 2 ml larutan suspensi pada pelet dan divortex
6. Tambahkan 2 ml larutan lisis dan dibolak-balik 4-5 kali
7. Tambahkan 2 ml buffer netralisasi dingin dan dibolak-balik 4-5 kali
8. Larutan diendapkan menggunakan microcentrifuge 3500 rpm selama 20 menit.
9. Ambil supernatan (4 ml) dan masukkan ke dalam tabung yang baru kemudian tambahkan 300 µl larutan 3 M Natrium Asetat pH 5,2; suspensikan (dibolak balik 4-5 kali)
10. Tambahkan ethanol absolut dingin sebanyak 6 ml (2 x vol ) dan simpan pada suhu -20°C selama 2 jam)
11. Endapkan DNA plasmid menggunakan mimrocentrifuge 3500 rpm selama 20 menit
12. Buang supernatan; bilas dengan ethanol 70% (4 ml); dan keringkan pelet DNA plasmid
13. Suspensikan pelet DNA plasmid dalam 50 µl aquadest
14. Hitung konsentrasi DNA dalam larutan dengan rumus:

**Absorbansi DNA pada  $\lambda 260$  X 50 µg/ml X faktor pengenceran**

## ELEKTROFORESIS PADA GEL AGAROSE

### A. Pendahuluan

DNA dapat ditentukan ukurannya dengan melakukan migrasi di dalam gel agarose atau gel poliakrilamid. Migrasi DNA di dalam gel ini biasa disebut dengan elektroforesis. Untuk dapat divisualisasikan, maka DNA yang ada di gel harus diwarnai dengan ethidium bromida, kemudian dilihat di atas sinar ultra violet. Ethidium ini akan mengikat molekul DNA, molekul ethidium bromida ini dapat menangkap sinar UV sehingga pendaran dari UV ini dapat terlihat. Sinar UV berenergi tinggi sehingga dapat merusak sel.

Elektroforesis gel agarosa biasanya digunakan untuk pemisahan asam-asam nukleat:

1. Hasil isolasi DNA
2. Hasil restriksi pengguntingan pita DNA
3. Hasil PCR (Polymerase Chain Reaction) baik DNA dan/atau RNA

DNA merupakan molekul bermuatan negatif, sehingga bila diletakkan di medan listrik, DNA akan bergerak (bermigrasi) dari kutub negatif ke kutub positif. Pergerakan ini kecepatannya tergantung dari: (1) ukuran molekul DNA, (2) kerapatan media (gel) yang dilalui oleh DNA, dan (3) arus listrik yang diberikan untuk memigrasikan molekul DNA. Semakin kecil ukurannya, DNA akan bermigrasi semakin cepat. Semakin rapat media yang digunakan, yang dicerminkan dari konsentrasi media, semakin lambat DNA bermigrasi. Semakin besar arus yang digunakan, semakin cepat DNA bermigrasi..

Sebelum dilakukan elektroforesis, suspensi DNA harus dicampur dengan penyangga muatan pewarna= loading buffer/dye, yang berfungsi untuk: (1) menambah densitas, sehingga DNA berada di bagian bawah dari sumur (well), (2) memudahkan meletakkan contoh DNA ke dalam sumur, (3) penanda laju migrasi DNA.

Pewarna yang biasa digunakan adalah: (1) bromofenol biru (Blue bromophenol), dan xylene cyanol. Kecepatan laju bromofenol biru di dalam gel agarosa 2x lebih cepat dibandingkan dengan laju xylene cyanol. Laju migrasi bromofenol biru di dalam gel agarosa (0,5 – 1,4%) di dalam larutan penyangga 0,5 X

TBE kira-kira sebanding dengan laju migrasi DNA utas ganda linier sebesar 300 pb (pasangan basa).

## **B. Tujuan Praktikum**

1. Agar mahasiswa memahami prinsip kerja dan kegunaan teknik elektroforesis
2. Agar mahasiswa memahami pembuatan gel agarosa
3. Agar mahasiswa memahami cara memisahkan asam-asam nukleat dan molekul protein dengan menggunakan peralatan elektroforesis

## **C. Alat dan Bahan**

### **Alat**

1. Pemanas (hot plate/ kompor)
2. Alat/perangkat elektroforesis (cetakan gel dan tanki larutan penyangga elektroda)
3. Water pass
4. Catu listrik (power supply)
5. erlemeyer
6. Micropipet dan tip (P10/P20)
7. Timbangan elektrik
8. Transilluminator UV

### **Bahan**

1. Sampel DNA
2. Larutan penyangga/buffer elektroforesis: 1xTAE atau 1xTBE

#### TAE 50X (stok):

Tris-HCl; pH 8,3	2 M
Asam asetat pekat	0,99 M
EDTA	50 mM

Catatan: Sebelum digunakan harus diencerkan 50X, sehingga konsentrasi akhirnya menjadi 1X

TBE 10X (stok):

Tris-HCl; pH 8,3	1 M
Asam borat	0,83 M
EDTA	10 mM

Catatan: Sebelum digunakan harus diencerkan 10X, sehingga konsentrasi akhirnya menjadi 1X

3. Loading buffer/dye

Terdapat bermacam-macam loading dye. Penggunaan masing-masing loading dye sangat ditentukan oleh kesenangan masing-masing pengguna. Di bawah ini diberikan beberapa macam loading dye berdasarkan komposisinya. Semua komponen dilarutkan dalam air destilata steril.

Loading dye I

Bromofenol biru (BB)	0,25%
Xylene cyanol FF	0,25%
Sukrosa	40%

Disimpan pada suhu 4°C

**Loading dye II**

Bromofenol biru (BB)	0,25%
Xylene cyanol FF	0,25%
Ficoll (tipe 400, Pharmacia)	15%

Simpan pada suhu ruang

**Loading dye III**

Bromofenol biru (BB)	0,25%
Xylene cyanol FF	0,25%
Glycerol	30%

Simpan pada suhu 4°C

### **Loading dye IV**

Sukrosa	40%
Bromofenol biru (BB)	0,25%
Simpan pada suhu 4°C	

4. Penanda Molekuler/DNA marker (contoh: 1 kb DNA ladder)

### **Prosedur**

1. Suspensikan agarosa di dalam larutan penyangga yang sesuai (TAE 1x atau TBE 1x) dengan konsentrasi tertentu sesuai kebutuhan (pada umumnya 0,8%) dalam erlemeyer.
2. Panaskan hingga tidak terlihat lagi butiran agarosa dan larutan menjadi jernih/transparan (atau sampai mendidih).
3. Setelah suhu larutan agarosa turun (60-70°C untuk mengurangi penguapan berlebih), tuang agarosa ke dalam cetakan yang sudah disiapkan (sisir sudah terpasang dan cetakan ditempatkan pada daerah yang datar/rata). Hindari terjadinya gelembung udara krn bisa mengganggu migrasi DNA.
4. Setelah agarosa beku, tempatkan gel pada tanki elektroforesis yang sudah diisi dengan buffer TAE 1x atau TBE 1x. Gel diletakkan pada posisi sumur mendekati kutub negatif, sehingga DNA akan bermigrasi ke kutub positif.
5. DNA yang akan dimigrasikan dicampur dengan larutan pewarna (loading dye). Masukkan larutan DNA ke dalam sumur pada gel dengan menggunakan micropipet (P10/P20). Selain sampel DNA hasil isolasi, migrasikan juga penanda ukuran molekuler (DNA marker).
6. Hubungkan alat elektroforesis dengan alat catu listrik (power supply), kemudian hidupkan catu listrik pada 30-150 volt (tergantung dari besarnya molekul DNA, dan larutan penyangga yang digunakan). Larutan penyangga TBE bisa digunakan pada tegangan yang lebih tinggi dibandingkan dengan larutan TAE.
7. Setelah migrasi DNA berjalan cukup jauh ( $\pm 2/3$  panjang gel agarosa), matikan alat catu listrik.

8. Visualisasi DNA:

- Staining: rendam gel pada larutan Ethidium bromida (EtBr) 0,5 µg/ml selama ± 15 menit
- Destaining: rendam gel pada aquadest selama ± 15 menit
- Visualisasi pada transilluminator UV
- Dokumentasikan