

GENETIKA MOLEKULER DAN APLIKASINYA

Dr. Rini Puspitaningrum, S.Si, M.Biomed

Chris Adhiyanto, M.Biomed, Ph.D

Solihin, S.Pd



GENETIKA MOLEKULER DAN APLIKASINYA

Dr. Rini Puspitaningrum, S.Si, M.Biomed

Chris Adhiyanto, M.Biomed, PhD.

Solihin, S.Pd

GENETIKA MOLEKULER DAN APLIKASINYA

Penyusun:

Dr. Rini Puspitaningrum, S.Si, M.Biomed
Chris Adhiyanto, M.Biomed, PhD.
Solihin, S.Pd

Editor:

Dr. Siti Gomo Attas, M.Hum

Desain Isi:

Zahra Muthmainnah

Desain Sampul:

Zahra Muthmainnah

Solihin, S.Pd

(diadopsi dari freepik.com)

Desain sampul dan isi buku ini menggunakan program Adobe Illustrator Cs4 dan Corel Draw Graphic Suite X4, font Arial dan Myriad Pro.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Perkembangan ilmu pengetahuan yang sangat pesat di abad 20-an ini, terutama perkembangan ilmu pengetahuan dasar, sudah harus diimbangi oleh ketersediaan sejumlah literatur ilmu dasar sebagai acuan. Hingga saat ini, masih sedikit sekali buku mengenai ilmu dasar berbahasa Indonesia yang digunakan sebagai literatur acuan bagi para mahasiswa biologi, kimia, kedokteran, kesehatan, dan lainnya.

Oleh karena itu, buku Genetika Molekuler dan Aplikasinya ini disusun untuk memenuhi untuk kebutuhan tersebut. Melalui buku ini, Penulis ingin mengajak para pembaca untuk memahami mengenai seluk beluk genetika molekuler. Seperti yang telah diketahui, bahwa gen merupakan komponen yang sangat penting dalam kehidupan.

Puji syukur kepada Allah SWT karena buku ini dapat diselesaikan berkat rahmat-Nya. Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah terlibat dalam penyusunan buku ini. Semoga amal yang ikhlas tersebut akan mendapatkan imbalan pahala dari Allah SWT. Penulis berharap, buku ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang ingin menekuni bidang genetika molekuler.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Jakarta, Februari 2018

Rini Puspitaningrum
Chris Adhiyanto

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
	1
BAB I ISOLASI GENOM.....	1
A. Pendahuluan.....	2
B. Persiapan Genom Manusia.....	5
C. Isolasi Genom dari Liur.....	7
D. Elektroforesis dan Identifikasi Genom Sederhana.....	8
E. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	
	17
BAB II ISOLASI PROTEIN.....	19
A. Pemurnian Protein.....	20
B. SDS Page.....	20
C. Protokol Sederhana Purifikasi Protein dan Analisisnya.....	
BAB III ISOLASI DNA GENOM (TUMBUHAN DAN HEWAN).....	27
BAB IV ISOLASI DNA BUAH.....	33
BAB V ISOLASI DNA GENOM DARI BULBUS AKAR RAMBUT/ BULU.....	37
BAB VI DETEKSI DNA.....	39
A. Teknik Spektrofotometri.....	40
B. Teknik Elektroforesis.....	43
BAB VII GEN ALAD.....	
Research Project: Analysis of ALAD Gene.....	45
Daftar Pustaka.....	69
Tentang Penulis.....	73

ISOLASI GENOM

Pendahuluan

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

Beberapa metode telah banyak dikembangkan dengan tingkat kesukaran, kemurnian hasil, dan konsentrasi hasil yang berbeda-beda. Namun, teknik konvensional masih merupakan teknik yang terbaik. Permasalahannya adalah produk buangan atau limbah bahan pada teknik konvensional. Teknik konvensional biasa menggunakan fenol-kloroform sebagai proses menghilangkan materi lain selain nukleotida, seperti protein. Namun, perlu diketahui bahwa fenol merupakan bahan yang sangat korosif sehingga pembuangan limbah yang tidak tepat akan mencemari lingkungan sekitarnya.

Pada teknik dasar bio-molekuler, Penulis akan memaparkan beberapa teknik yang dapat digunakan untuk isolasi genom dari bahan cairan tubuh. Pemilihan sumber cairan tubuh, bukan jaringan hanya pada kemudahan dalam penggerjaan isolasi. Perbedaan isolasi dari jaringan

adalah pada langkah bagaimana teknik menghancurkan jaringan tersebut. Dengan menguasai teknik dasar isolasi genom dari bahan cairan tubuh, akan memudahkan kita dalam mempelajari teknik isolasi genom dari sumber jaringan.

Persiapan Genom Manusia

Tujuan dari percobaan ini adalah mengisolasi dan mempurifikasi dalam jumlah banyak genom manusia. Sumber yang paling mudah dan tidak korosif adalah saliva ataupun usapan mulut pipi bagian dalam. Telah kita ketahui bahwa konsentrasi jumlah DNA dalam sel hanya sedikit, ditemukan sebagian besar di inti sel (90%). Karena jumlah yang sangat sedikit, maka diperlukan keterampilan dalam memisahkan DNA dengan komponen sel lainnya. Ada banyak metoda memurnikan atau purifikasi DNA dengan komponen lain, terutama protein. Namun, semua proses akan memiliki prinsip dasar yang sama, yaitu

1. Menghancurkan sel

Menghancurkan sel merupakan salah satu langkah penting dalam pemurnian DNA. Sel dapat dihancurkan atau dipecah menggunakan teknik sonikasi, *grinding*/ giling, cacah atau dengan tekanan tinggi agar sel hancur. Namun, langkah ini sering mengakibatkan DNA terpotong-potong jika metode yang digunakan kurang baik sehingga kemurnian DNA akan turun. Langkah yang terbaik adalah menggunakan bahan kimia seperti pemberian deterjen/sabun atau menggunakan teknik enzimatik. Sabun akan melarutkan lipid membrane sel. Sabun juga akan memiliki peran sebagai inhibitor DNase dan dapat mendenaturasi protein sehingga membantu dalam membuang protein dari larutan uji. Deterjen yang biasanya digunakan sebagai pelarut lisis sel hewan adalah deterjen yang bersifat anionik seperti SDS (Sodium Deodesil Sulfat) atau sarkosil (sodium deodesil sarkosinat).

2. Membuang protein

Langkah selanjutnya dalam proses isolasi dan pemurnian genom adalah membuang semua materi atau komponen protein, dikenal

sebagai deproteinasi. Prinsip dasar pada proses ini adalah membuang kemampuan kelarutan protein, sehingga protein akan menjadi tidak larut (mengendap) sedangkan asam nukleat tetap larut. Banyak pelarut organik yang dapat digunakan untuk pelarut organik yang dapat digunakan untuk mengendapkan protein. Metode fenol dan kloroform, umumnya digunakan dalam mengendapkan protein. Metode fenol mempunyai prinsip sebagai berikut: Fenol adalah kristal pada suhu kamar, namun dengan adanya 20 persen air, ia membentuk suspensi berair yang mengandung misel fenol yang dikelilingi oleh molekul air. Molekul protein banyak mengandung residu asam amino hidrofobik yang terpusat di pusat molekul. Ketika larutan yang mengandung protein terlarut dicampurkan dengan fenol yang bersifat lebih hidrofobik akan menyebabkan fenol akan berdifusi ke dalam inti protein, sehingga protein membengkak dan protein menjadi terbuka (*unfold*) dan terdenaturasi. Protein yang terdenaturasi dengan kelompok hidrofobik yang terpapar dan dikelilingi oleh misel fenol, jauh lebih mudah larut dalam fase fenol daripada fasa berair. Akibatnya, protein dipartisi ke fasa fenol yang meninggalkan asam nukleat dalam fasa berair. Asam nukleat tidak memiliki gugus hidrofobik sama sekali dan tidak dapat larut dalam fase fenol. Selain itu, fenol juga berperan dalam membuang fraksi lipid dalam larutan sampel DNA tersebut.

Metode kloroform digunakan karena kloroform tidak larut dalam air sehingga mencegah hilangnya DNA ke fase organik. Deproteinisasi oleh kloroform didasarkan atas terdenaturasi rantai polipeptida pada interfase air-kloroform. Konsentrasi protein yang tinggi pada interfase akan menyebabkan protein mengendap. Namun deproteinisasi ini sangat tergantung pada pembentukan daerah interfase yang besar sehingga membutuhkan bantuan mekanik yang besar yaitu pengocokan/penggoyangan yang kuat. Selain itu, metode ini hanya cocok untuk mendapatkan DNA dengan total ukuran 20 ribu – 50 ribu pasang basa (umumnya DNA virus). Metode fenol dan kloroform memiliki keburukan dalam hal limbah. Sifat toksin yang tinggi,

Metode lain adalah menggunakan enzim. Protein dapat dibuang dalam larutan sampel genom menggunakan enzim protease. Enzim ini akan memecah atau mencerna semua protein. Ada dua macam enzim yang sering digunakan yaitu proteinase K dan pronase. Kedua enzim ini sangat stabil dan diperoleh dari jamur. Enzim ini akan bekerja aktif pada larutan yang rendah deterjen anionik, tinggi konsentrasi garam EDTA, pH 6 – 10 dan suhu antara 50°-60°C. Perbedaan antar kedua enzim ini hanya pronase bersifat self-digesting, sehingga harus selalu ditambahkan pada saat proses berlangsung. Metode lain adalah dengan penggunaan asam. Prinsip dasarnya adalah penambahan larutan asam seperti asam cuka yang akan menyebabkan koagulasi protein sehingga protein akan mudah diendapkan. Proses ini terjadi karena asam dapat mengacaukan jembatan garam dengan adanya muatan ionik.

3. Membuang RNA

Untuk membuang RNA saat isolasi DNA, digunakan metode enzimatik. Namun, tidak semua RNA akan hilang, sejumlah kecil RNA akan tetap ditemukan pada proses pemurnian DNA. Ada dua enzim yang digunakan, yaitu RNase A dan RNase T1. Mekanisme keduanya didasarkan pada posisi pemotongan basa nukleotida urasil, sitosin, dan guanin.

4. Memekatkan DNA

Pengendapan dan pemekatan DNA telah dimulai pada tahap deproteinisasi menggunakan campuran fenol-klorofrom-alkohol. Prinsip pengendapan pada akohol didasarkan pada kemampuan penurunan kelarutan asam nukleat dalam air. Molekul air yang polar yang mengelilingi molekul DNA akan mempengaruhi kelarutan DNA. Etanol akan mengubah potensial ion dari DNA sehingga akan membuang molekul air yang berinteraksi dengan DNA. Akibatnya, DNA akan mengendap. Penambahan etanol 95% dalam larutan sampel DNA akan menarik molekul air-DNA sehingga DNA akan mengendap. Penggunaan etanol 95% atau 100% murni, akan mempengaruhi dalam

hal pembiayaan. Untuk itu, digunakan etanol dengan konsentrasi lebih rendah. Namun, proses ini memerlukan penambahan larutan senyawa garam dalam larutan DNA agar menetralkan muatan fosfat-DNA sehingga mengeliminasi interaksi air-DNA. Senyawa larutan garam yang sering digunakan adalah natrium atau ammonium. Namun perlu diingat, pengeliminasi materi garam dari larutan DNA yang tidak sempurna akan mempengaruhi proses PCR karena senyawa garam ini akan mengganggu proses enzimatik pada proses PCR. Agar memeroleh DNA yang murni, sangat dianjurkan penggunaan ammonium asetat yang memiliki kelarutan tinggi dalam etanol. Setelah larutan DNA diendapkan, garam ammonium akan mudah dilarutkan dengan penambahan etanol 70% sedangkan untuk menghilangkan fraksi etanol pada DNA dapat digunakan pemanasan. Dalam temperatur 60°C, etanol akan mudah dan cepat menguap.

Isolasi Genom dari Liur

Isolasi genom dari liur atau saliva merupakan salah satu teknik yang sederhana, tidak berbahaya, dan mudah penggerjaannya. Bahan dan alat yang dibutuhkan adalah liur, tabung reaksi 30 mL, etanol, *buffer saline* (PBS), larutan lisi, PCI, dan ammonium asetat serta alat sentrifuse dan tabungnya. Kadang teknik dikombinasikan dengan pemberian asam cuka encer. Prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut:

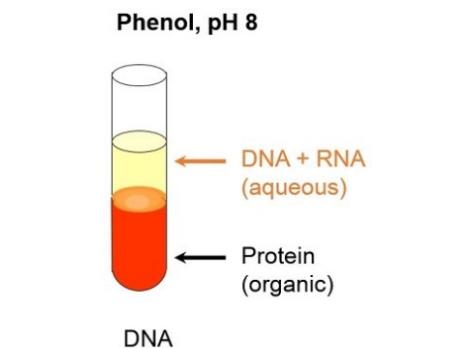
1. 10 mL larutan NaCl fisiologis (*buffer saline*) digunakan untuk berkumur selama 60 detik.
2. Ludahkan dalam tabung sentrifuse 25 mL, ulangi hingga 2 kali.
3. Tabung kemudian disentrifuse pada kecepatan maksimum (5000 rpm) selama 20 menit. Lebih baik jika menggunakan sentrifuse dingin.
4. Hati-hati dalam membuang supernatant, jangan sampai pellet sel terlepas dari dinding tabung.
5. Tambahkan 1 mL larutan lisis buffer yang terdiri dari campuran 0.5% SDS, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris-HCl.
6. Tambahkan 50 uL Proteinase K lalu kocok perlahan, jangan berbuih,

- sampai pellet terlepas dari dinding tabung. Kemudian inkubasi 56°C selama 3 jam atau biarkan dalam suhu kamar selama 1 malam.
7. Setelah 3 jam atau dibiarkan satu malam, tambahkan larutan 1 mL PCI (fenol-8OH-TE) dengan perbandingan volume yang sama. Kocok kuat-kuat selama 30 detik, lalu sentrifugasi dengan kecepatan maksimum selama 10 menit. (gambar 1)
 8. Ambil lapisan atas dan pindahkan ke tabung baru yang berisi kloroform dengan volume yang sama. Hati-hati dalam memindahkan DNA yang terlarut dalam fase cair (larutan bening), jangan sampai tercampur dengan daerah interfase yang berwarna putih, dan lapisan bawah yang merupakan fase fenol (larutan kuning). Tabung baru yang telah berisi hasil sentrifuse no 8 dan kloroform, kemudian dikocok dan disentrifuse kecepatan maksimum selama 10 menit. Pindahkan larutan atas ke tabung baru. Fungsi kloroform dalam percobaan ini untuk membersihkan fenol dari sampel.
 9. Tambahkan setengah volume (kira-kira 1 mL) 7.5 M ammonium asetat kemudian tabung dibolak-balik 10 kali.
 10. Tambahkan etanol 95% dingin sebanyak 2 x jumlah volume larutan sebelumnya, misalkan jumlah volume total DNA dan ammonium asetat 3 mL maka tambahkan etanol 6 mL. Bolak-balikkan dengan pelan, maka akan muncul helaian DNA seperti kapas. Ambil helaian DNA secara hati-hati dengan menggunakan batang kaca dan pindahkan ke tabung yang sudah mengandung 3 etanol 70% dingin.
 11. Sentrifuse pada kecepatan maksimum selama 5 menit. DNA akan mengendap di bagian bawah tabung seperti lapisan atau butiran putih.
 12. Buang hati-hati etanol tersebut, buang sebanyak mungkin, kemudian keringkan di oven dengan tutup tabung terbuka, pada suhu 70°C.
 13. Setelah kering, pellet DNA dapat dilarutkan dengan 100 uL buffer TE (Tris EDTA). Biarkan semalam dalam temperatur 4°C hingga larut.
 14. Untuk memeriksa keberhasilan penelitian, dapat digunakan uji elektroforesis dan nanodrop untuk menghitung kemurnian-konsentrasi DNA.

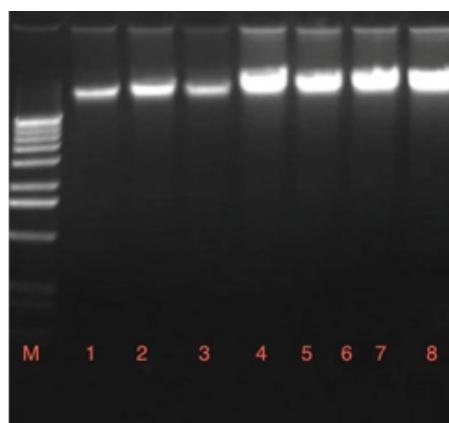
Elektroforesis dan Identifikasi Genom Sederhana

Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Siapkan agarose 1 % dan buffer elektroforesis.
2. Tuang larutan agarose cair yang sudah mengandung etidium bromide ke dalam cetakan agarose kemudian tunggu sampai kering.
3. Pindahkan agarose bersama cetakannya ke dalam bak elektroforesis yang sudah berisi larutan elektroforesis.
4. Masukkan 1 uL genom DNA hasil isolasi kita.
5. Jalankan elektroforesis (ingat DNA berjalan dari kutub negatif ke positif).
6. Setelah 1 jam, hasil elektroforesis dapat dilihat pada lampu UV. (gambar 2)



Gambar 1. Isolasi DNA pada pemisahan fenol
(www.genetargetsolutions.com.au/product/5prime-phase-lock-gel/)



Gambar 2. Elektroforesis genom DNA
(dokumen pribadi)

Prinsip protokol isolasi genom ini dapat diterapkan baik menggunakan darah, sel maupun jaringan. Perbedaan pada jaringan, seperti jaringan tumbuhan, organ, dan sebagainya, terletak pada bagaimana cara memecah jaringan tersebut. Misalnya, isolasi genom DNA dari jaringan hati dilakukan dengan menggerus jaringan tersebut menggunakan teknik penggerusan dengan lumping. Ekstrak gerusan tersebut akan digunakan pada metode isolasi seperti di atas.

Saat ini, telah banyak dikembangkan teknik isolasi genom DNA menggunakan KIT dari berbagai manufaktori. Masing-masing KIT memiliki kelebihan dan kekurangan, sebagai contoh KIT isolasi DNA genom menggunakan *miniprep column* memiliki kelebihan dalam memangkas waktu kerja, tidak menggunakan bahan fenol yang berbahaya dan mudah dalam penggerasannya, namun kekurangannya adalah dalam harga yang lebih mahal.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Hibridisasai atau *aneling* (penempelan) merupakan dasar dari kemampuan untai tunggal asam nukleat untuk melakukan pengikatan spesifik dengan untai komplementernya (atau pasangannya). Ketika untai ganda DNA mengalami denaturasi atau dipanaskan, maka untai akan terpisah, jika pemanasan dihilangkan atau dilakukan penurunan temperatur, maka untai yang terpisah akan bergabung kembali. Prinsip dasar ini yang menjadi dasar pada proses PCR, dimana saat terjadi penurunan suhu pada proses PCR, akan terjadi proses penempelan untai oligonukleotida. Proses penempelan ini dipengaruhi oleh faktor yang mempengaruhi proses pembentukan ikatan hidrogen antara basa nukleotida pasangannya, yaitu temperatur, pH, larutan garam dan sebagainya. Telah diketahui bahwa basa nukleotida G akan berpasangan dengan basa nukleotida C dengan bantuan tiga (3) jembatan hidrogen, sedangkan basa nukleotida A akan berpasangan dengan T melalui dua jembatan hidrogen. Untuk memutuskan jembatan yang menghubungkan basa-basa tersebut diperlukan energi (untuk laboratorium dalam hal ini

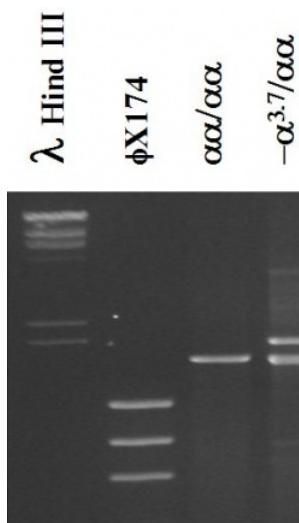
adalah pemanasan yang tinggi).

PCR merupakan suatu metode *in vitro* dalam sintesis DNA. Prinsip dasar metode ini adalah perbanyak fragmen DNA menggunakan enzim polymerase pada temperatur yang tinggi yang dilakukan secara berulang. Pada proses PCR dibutuhkan oligonukleotida pendek (primer DNA) yang berperan dalam mengawali proses ini. Primer akan menempel atau hybrid pada untai tunggal DNA saat temperatur diturunkan setelah terjadi pemisahan untai ganda DNA. Produk hasil PCR dapat diamati menggunakan teknik eletroforesis agarose.

Hingga saat ini, metode PCR telah berkembang dari metode PCR yang umum hingga metode PCR yang dapat digunakan langsung untuk melihat apakah sampel tersebut memiliki mutasi atau tidak, tergantung aplikasi apa yang akan dipakai apakah untuk identifikasi molekuler, sekuensing atau rekayasa genetika. Beberapa PCR yang telah dikembangkan saat ini adalah sebagai berikut:

1. PCR standar, metode dasar PCR dan hasil produk PCR dapat digunakan untuk tahap selanjutnya seperti kloning, sekuensing, restriksi enzim.
2. ARMS PCR, atau *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS) adalah aplikasi PCR dimana menggunakan primer spesifik. Metode ini yang sangat berguna untuk identifikasi mutasi titik atau polimorfisme.
3. GAP-PCR, mutasi delesi pada gen cluster seperti b-globin, dapat dideteksi oleh PCR standar menggunakan sepasang primer yang komplemen dengan untai DNA yang di dalamnya ada area delesi. Untuk delesi yang kecil, kurang dari 1 kb, maka akan dihasilkan dua buah produk fragmen, satu fragmen besar dan satu fragmen kecil (fragmen yang ada delesi kurang dari 1 kb). Untuk delesi yang lebih besar (2 kb), jarak antara kedua primer yang mengapit produk PCR (amplikon) terlalu besar, sehingga sukar didapatkan dua fragmen produk (hanya yang terbentuk fragmen yang delesi/fragmen kecil, sedang fragmen normal tidak terbentuk). Oleh karena itu, diperlukan teknik khusus untuk memperoleh kedua fragmen tersebut, yaitu

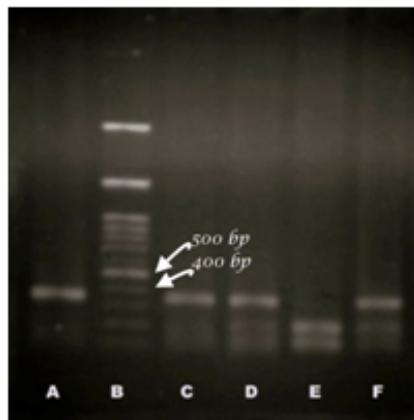
- teknik GAP-PCR. Teknik ini banyak digunakan untuk deteksi alfa talassemia, di mana delesi yang terjadi sangat besar (gambar 3).
4. RFLP PCR, metode ini digunakan jika ada area pemotongan enzim restriksi. Pada alel homozigot/mutan yang memiliki situs pemotongan, maka produk PCR akan dapat dipotong oleh enzim restriksi tertentu (atau sebaliknya). Untuk alel hetero, maka produk PCR yang diamati adalah kombinasi antara pita yang terpotong dan yang tidak terpotong (gambar 4).
5. Kuantitatif-PCR, metode ini digunakan untuk menghitung kuantitas atau jumlah produk spesifik hasil PCR, biasanya dikenal dengan sebutan *Real-Time PCR* (“RT-PCR”). RT PCR di sini, berbeda dengan *Reverse Transcription* (RT) PCR. *Reverse Transcription* PCR (RT-PCR) didesain untuk amplifikasi DNA dari RNA. Jumlah amplifikasi DNA dari RNA dapat diamati dengan menggunakan “RT-PCR”.
6. Multipleks tandem PCR, metode untuk mendeteksi banyak target pada satu sampel. Pada metode ini, satu sampel akan menggunakan banyak primer spesifik dan proses PCR dijalankan serentak. Karena menggunakan banyak primer, maka akan dihasilkan banyak amplikon (produk PCR) dengan ukuran yang beragam (gambar 5).



Gambar 3. Gap-PCR

(<http://www.ithanet.eu/ithapedia/index.php/Protokol:Gap-PCR>)

Masih banyak lagi jenis PCR, tetapi yang dijelaskan di atas adalah PCR yang sering digunakan untuk identifikasi penyakit. Semua metode ini dikembangkan untuk memudahkan peneliti atau pekerja laboratorium dalam mengidentifikasi sampel DNA seperti bidang forensik, mikrobiologi, dan sebagainya.



Gambar 4. ARMS PCR (koleksi pribadi CYP1A1*2A)

Aplikasi PCR atau teknologi amplifikasi telah banyak digunakan, biasanya di klinik/rumah sakit hingga membuat area spesifik dari DNA dan diperbanyak untuk digunakan dalam kloning teknologi. Kelebihan teknologi amplifikasi adalah sebagai berikut:

1. hasil cepat diperoleh (namun tergantung metode ataupun kit PCR yang digunakan dan dikembangkan oleh pihak developer);
2. lebih sensitif dan spesifik dibandingkan metode deteksi konvensional;
3. reproducibilitinya sangat baik (kembali tergantung jenis kit PCR dari berbagai developer);
4. hasil amplifikasi dapat dihitung secara kuantitatif atau semi kuantitatif, biasanya untuk teknik “RT-PCR”;
5. mudah dikembangkan teknologi terbaru untuk dalam pemeriksaan penanda kelainan genetik.

Kekurangan teknologi amplifikasi adalah sebagai berikut:

1. memerlukan ruangan dengan alur proses kerja satu arah (untuk mencegah kontaminasi);

2. mudah terkontaminasi dalam melakukan pekerjaannya;
3. target sekuensing DNA sasaran harus diketahui terlebih dahulu, dan harus melakukan perancangan primer serta kondisi alat yang sesuai dengan tujuan target yang diinginkan;
4. biaya alat dan bahan untuk metode "RT PCR" yang mahal.

Prinsip dasar prosedur kerja PCR semua adalah sama, yaitu harus ada primer, dNTP, Taq polimerase enzim, dH₂O, bufer PCR dengan atau tanpa MgCl₂, dan DNA *template* (sampel DNA genom). Setiap teknik, pada dasarnya yang berbeda adalah:

1. prosedur temperatur hibridisasi (penempelan) dan elongasi (pemanjangan) produk PCR serta siklus dan waktu; desain primer (metode ARMS akan berbeda dengan metode PCR standar);
2. ada tidaknya area restriksi;
3. perlu tidaknya menggunakan probe (primer yang berpendar).

APLIKASI

PCR Standar b-Globin

1. Bahan
 - a. Primer :
Forward primer F5'-TAGCAATTGTACTGATG GTATGG-3' dan
Reverse Primer R 5'-TTTCCCAAGGTTGAAGTAGCTCTT-3'.
 - b. 10X PCR bufer
 - c. Tag Polimerase
 - d. dNTP
 - e. DNA template
2. Cara Kerja
 - a. Siapkan semua bahan dalam tabung PCR
 - b. Untuk program PCR gunakan:
 - 1) Denaturasi awal 95°C selama 3 menit
 - 2) Denaturasi PCR 98°C selama 20 detik
 - 3) Hibridisasi PCR 60°C selama 15 detik
 - 4) Elongasi PCR 72°C selama 60 detik
 - 5) Ulangi no 2 – 4 untuk 35 siklus

- 6) Elongasi akhir 72°C selama 60 detik
 - 7) Pendinginan 24°C
3. Hasil: akan didapatkan produk PCR atau amplikon dengan ukuran 1200 bp.



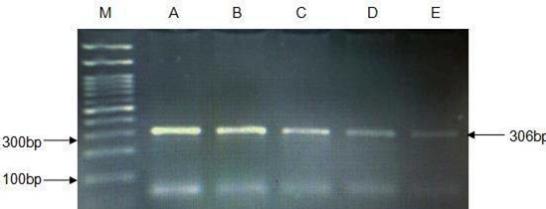
Gambar 5. Hasil PCR gene b-globin (dokumentasi pribadi)

APLIKASI

PCR ARMS gen ALAD

1. Bahan
 - a. ALAD F 5'-GCCTCAGTCTTCCCTCCTATTAGT-3'
 - b. ALAD R 5'-TCCCTTCTTAGCCCTTCCTTGATT-3'
 - c. ALAD C 5'-TTCTGTCTGGGGGCTTGAG-3'
 - d. ALAD N 5'-TCAGCATCTCTCCAGCCGC-3'
 - e. ALAD M 5'-TCAGCATCTCTCCAGCCGG-3'
 - f. bahan lain sama dengan PCR standar
2. Cara Kerja
 - a. PCR tahap 1
 - 1) Campur semua bahan kecuali primer CNM
 - 2) Denaturasi awal 94°C selama 3 menit
 - 3) Denaturasi PCR 94°C selama 30 detik
 - 4) Hibridisasi PCR 60°C selama 30 detik
 - 5) Elongasi PCR 72°C selama 30 detik
 - 6) Ulangi no 2 – 4 untuk 40 siklus

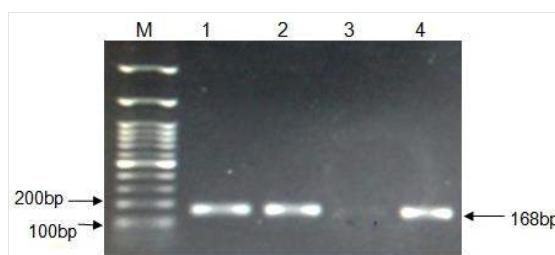
- 7) Elongasi akhir 72°C selama 60 detik
- 8) Pendinginan 24°C
3. Hasil: akan didapatkan produk PCR atau amplikon dengan ukuran 306 bp.



Gambar 6. Hasil PCR Tahap 1 (dokumen pribadi)

a. PCR tahap 2

- 1) Campur semua bahan ditambah primer CN untuk pengecekan sampel normal dan CM untuk sampel mutan
- 2) Denaturasi awal 94°C selama 3 menit
- 3) Denaturasi PCR 94°C selama 30 detik
- 4) Hibridisasi PCR 60°C selama 30 detik
- 5) Elongasi PCR 72°C selama 10 detik
- 6) Ulangi no 2 – 4 untuk 40 siklus
- 7) Elongasi akhir 72°C selama 60 detik
- 8) Pendinginan 24°C



Gambar 7. Hasil PCR Tahap 2. Lajur 1 dan 3 (sampel PCR A dan B) menggunakan primer mutan, sedangkan lajur 2 dan 4 (sampel PCR A dan B) menggunakan primer normal. Hasil menunjukkan sampel A genotip GG (ALAD – 1) dan sampel B genotip GC (ALAD – $\frac{1}{2}$) (dokumen pribadi)



Genetika Molekuler dan Aplikasinya

APLIKASI

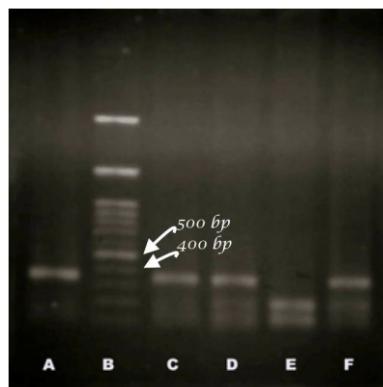
PCR RFLP CYP1A1*2A

1. Bahan

- Primer A 5'-TAGGA GTCTT GTCTC ATGCC T-3'
- Primer B 5'-CAGTG AAGAG GTGTA GCCGC T-3'
- Enzim restriksi Msp I
- bahan lain sama dengan PCR standar

2. Cara Kerja

- Campurkan semua bahan kecuali enzim restriksi Mspl
- Ambil 24 uL larutan campuran, masukkan ke dalam tabung PCR, tambahkan 1 uL sampel DNA. Kemudian dimasukkan ke dalam alat PCR
- Program PCR untuk restriksi Mspl:
 - Denaturasi awal, 95°C 3 menit
 - Denaturasi PCR, 95°C 3 menit
 - Hibridisasi PCR, 60°C 15 detik
 - Elongasi PCR, 72°C 2 detik
 - Ulangi no 2 – 4 sebanyak 35 siklus
 - Elongasi akhir 72°C 5 detik
- Periksa hasil PCR menggunakan agarose elektroforesis. Jika didapatkan hasil produk PCR 340 bp, proses PCR telah sukses
- Ambil 5 uL produk PCR di atas, masukkan dalam tabung PCR yang telah ada larutan campuran Mspl dan bufer-nya (masing-masing tergantung dari Kit perusahaan yang menjual)
- Inkubasi pada mesin PCR untuk suhu 37°C selama 4 – 24 jam
- Hasil pemotongan diamati menggunakan 1.5 % agarosa elektroforesis



Gambar 6. Hasil PCR (Dokumen pribadi)

A) Band with 340 bp; B) DNA Marker size 100 bp; C,D, F)

ISOLASI PROTEIN

Pendahuluan

Studi tentang protein dalam suatu organisme hidup merupakan bagian terintegrasi dari penelitian ilmu hayati atau biologi. Protein adalah kelompok molekul biologis yang paling beragam dan sangat penting untuk struktur dan fungsi seluler. Langkah pertama dalam analisis protein adalah ekstraksi seluler. Karena protein begitu heterogen, tidak ada satu metode atau reagen yang optimal untuk isolasi protein secara umum. Selain itu, teknik ekstraksi protein bervariasi tergantung pada sumber bahan awal, lokasi di dalam sel protein yang diminati dan aplikasi di hilir. Banyak teknik telah dikembangkan untuk mendapatkan hasil dan kemurnian protein terbaik untuk berbagai jenis sel dan jaringan, dengan mempertimbangkan di mana sesuai, lokasi subselular protein dan kompatibilitas ekstrak protein dengan langkah selanjutnya dalam percobaan.

Pada penelitian ilmu hayati, protein biasanya diekstraksi dari sel mamalia yang dibudidayakan atau dikultur. Saat mengeluarkan protein dari jaringan mamalia, gangguan mekanis diperlukan untuk mengisolasi sel dari matriks jaringan mereka. Untuk sel mamalia dan primer kultur, yang hanya memiliki membran plasma yang memisahkan isi sel dari lingkungan, pelarut pereaksi yang mengandung deterjen dan komponen lainnya dapat dengan mudah mengganggu lapisan bilayer membran protein-lipid, dengan demikian ekstraksi protein relatif mudah. Organisme lain yang juga umum digunakan dalam penelitian protein, termasuk bakteri (sebagai alat untuk ekspresi protein), ragi (sebagai model untuk biologi sel), dan tanaman (untuk bioteknologi pertanian) mengandung dinding sel, yang secara tradisional memerlukan lisis mekanis.

Namun, solusi berbasis deterjen telah dikembangkan untuk secara efisien melisiskan sel-sel ini tanpa menggunakan gangguan fisik.

Penggunaan lisis sel dapat mengganggu selaput sel dan organel yang menghasilkan aktivitas proteolitik dan dapat mengurangi hasil dan fungsi protein. Untuk mencegah degradasi protein yang diekstraksi dan dapatkan hasil dan aktivitas protein terbaik diperlukan penghambat lisis, protease dan fosfatase dapat ditambahkan ke pereaksi lisis. Sejumlah senyawa telah diidentifikasi dan digunakan untuk menghambat aktivitas protease dan fosfatase dengan mengikat secara reversibel atau tidak. Karena beberapa deterjen yang digunakan dalam formulasi ekstraksi protein dapat menonaktifkan fungsi enzim yang diminati atau mempengaruhi stabilitas jangka panjangnya, maka sangat penting untuk menghilangkan deterjen setelah lisis sel. Selain itu, konsentrasi tinggi deterjen atau garam dapat mengganggu metode penelitian umum seperti tes protein, pemurnian protein, imunopresipitasi, elektroforesis gel dan spektrometri massa (MS). Dalam beberapa kasus, zat yang mengganggu dapat dikurangi hanya dengan pengenceran atau dialisis.

Secara historis, pelisiran fisik merupakan metode terbaik untuk ekstraksi protein. Namun dalam beberapa tahun terakhir, metode lisis berbasis detergen telah menjadi standar. Telah banyak vendor atau perusahaan yang telah mengembangkan kit yang baik dan lengkap serta siap pakai untuk isolasi sel dan ekstraksi protein yang efisien. Reagen ekstraksi protein dioptimalkan untuk jenis sel dan jaringan tertentu, lokasi seluler dari protein yang diminati, dan pada kebanyakan kasus, tidak memerlukan lisis fisik. Selain itu, produk ini kompatibel dengan aplikasi biologi protein hilir yang paling umum digunakan.

Protein membran memainkan peran kunci dalam proses biologis mendasar, seperti pengangkutan molekul, pensinyalan, pemanfaatan energi, dan pemeliharaan struktur sel dan jaringan. Sekitar 30% gen ditentukan oleh protein membran, dan lebih dari 50 %-nya merupakan target obat saat ini. Meskipun penting, pengetahuan kita tentang struktur dan fungsi protein membran pada tingkat molekuler tertinggal jauh

di belakang untuk protein terlarut.

Protein membran terintegral di lingkungan lipid membran biologis. Untuk mendapatkan protein membran, maka diperlukan teknik pemurnian, penanganan, dan analisis untuk protein larut di lingkungan lipid tersebut. Hal ini biasanya dilakukan dengan menambahkan deterjen yang melarutkan biomembran dan membentuk kompleks yang mudah larut dengan protein lipid dan membran. Solubilisasi di sini harus dioptimalkan secara hati-hati untuk menghindari kehilangan protein dan inaktivasi, dimana denaturasi protein dan / atau agregasi sering dijumpai. Oleh karena itu, solubilisasi adalah salah satu aspek yang paling penting dalam penanganan protein membran.

Pada isolasi protein, langkah pertama yang harus dipikirkan adalah bagaimana membuang bagian dari sel yang bukan protein, sehingga kita akan memperoleh protein murni. Secara umum, sel hewan lebih mudah dalam isolasinya dibandingkan sel bakteri, jamur maupun tumbuhan. Ada beberapa metode di bawah ini, tetapi bukan menjadi metode mutlak:

1. Metode dengan pencacahan menggunakan “*blender*” dapat digunakan untuk homogenisasi sel hewan, akan memecah dan mencacah jaringan sehingga dinding sel akan hancur.
2. Metode lisis, menggunakan larutan EDTA-Lisozim, dapat digunakan untuk melarutkan dinding sel bakteri gram negatif, sedangkan jika menggunakan pelarut organik seperti toluen dapat melarutkan bakteri dan *yeast/jamur*.

Semua metode yang paling umum untuk ekstraksi protein, memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing metode.

Pemurnian Protein

Teknik isolasi dan pemurnian yang akan diterangkan dalam buku ini adalah dalam bidang biologi molekular di mana akan mengisolasi protein dari suatu mikroorganisme. Teknik ini tetap dapat digunakan untuk isolasi protein pada organisme lain dengan melakukan modifikasi.

SDS-Page

Elektroforesis gel poliakrilamid adalah salah satu teknik yang paling sering digunakan untuk memisahkan makromolekul (DNA, RNA dan protein). Banyak digunakan untuk menampilkan dan untuk memisahkan protein maupun asam nukleat yang berbeda panjangnya. Untuk memperoleh hasil pemisahan makromolekul, khususnya polipeptida atau protein, diperlukan kondisi yang tepat meliputi konsentrasi poliakrilamid, ketebalan gel dan sebagainya. Elektroforesis secara umum merupakan proses pemisahan makromolekul yang didasarkan pada muatan molekul tersebut dalam suatu larutan dan resistansinya. Pada gel matriks poliakrilamid atau agarose, resistansi yang diberikan oleh matriks berkaitan dengan ukuran molekul dan bentuk molekul saat melewati. Untuk ukuran pori tertentu, molekul yang besar akan mengalami hambatan yang lebih besar sehingga bergerak lebih lambat saat melewati matriks dari pada molekul yang kecil.

Protokol Sederhana Purifikasi Protein dan Analisisnya

1. Homogenisasi jaringan mamalia

Untuk memurnikan atau mengkarakterisasi protein intraselular, penting untuk memilih metode yang efisien untuk mengganggu sel atau jaringan yang secara cepat melepaskan protein dari kompartemen intraselnya ke dalam penyangga yang tidak berbahaya bagi aktivitas biologis protein yang diminati. Salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk mengacaukan jaringan lunak adalah homogenisasi. Dalam protokol ini, cara untuk homogenisasi jaringan dengan menggunakan pencacah dan pemotong mekanis seperti homogenizer kaca Potter-Elvhjem-Teflon, homogenizer Dounce, atau Waring. Metode ini cepat dan berisiko kecil terhadap protein dibandingkan metode lain untuk isolasi protein dari kompartemen seluler. Pada metode ini, kadang digunakan bahan penghambat aktivasi enzim protease untuk mencegah terjadinya degradasi proteolitik.

2. Isolasi protein penyusun sel darah merah (*ghost red blood cells*)

Isolasi protein sel darah merah merupakan salah satu teknik isolasi protein yang sederhana. Kegunaan analisis protein di sini untuk analisis ada tidaknya kerusakan membran protein dan sitoskeleton sel darah merah. Adanya kelainan genetik pada komponen penyusun membran sel darah merah akan menyebabkan individu mengalami anemia seperti pada kasus yang umum adalah pada ovalositosis, eliptosisis, sferositosis.

3. Teknik SDS-PAGE protein penyusun sel darah merah

APLIKASI

Homogenisasi Jaringan Mamalia

1. Bahan

- a. Jaringan mamalia
- b. Larutan stok DTT 0.5 M (Dithiothreitol) : harap diingat DTT sangat berbahaya, gunakan pelindung diri saat membuatnya seperti masker, sarung tangan dan dilakukan di lemari asam.
- c. Bufer A homogenisasi
 - 1) 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 - 2) 2 mM EDTA
 - 3) 150 mM NaCl
 - 4) 0.5 mM DTT
- d. Bufer B homogenisasi
 - 1) 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 - 2) 10 % (v/v) gliserol atau 0.25 M sukrosa
 - 3) 5 mM Mg-asetat
 - 4) 0.2 mM EDTA
 - 5) 0.5 mM DTT
 - 6) 1.0 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). Bahan ini berbahaya, gunakan pelindung diri.

2. Alat

- a. Sentrifuse
- b. corong berfilter
- c. pisau
- d. alat teflon homogenasi dan tabung Potter-Elvehjem

3. Cara Kerja

- a. Jaringan mamalia dibersihkan dari lemak dan jaringan pembungkusnya, rendam dalam buffer A kondisi dingin.
- b. Potong kecil-kecil agar memudahkan dalam penggilingan.
- c. Masukan 4 volume bufer B yang dingin ke dalam tabung kaca Potter, letakkan tabung kaca tersebut dalam wadah berisi air dingin atau es.
- d. Masukkan jaringan yang dipotong kecil-kecil (jangan langsung banyak).
- e. Masukkan alat giling teflon, nyalakan mesin homogenasi, dimulai dengan kecepatan 500 rpm, ditingkatkan hingga 1500 rpm.
- f. Gerakan tabung sehingga jaringan tergerus rata.
- g. Tuangkan hasil gerusan ke tabung sentrifuse, sentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm suhu dingin selama 10 menit untuk membuang sisa bahan potongan tak berguna.
- h. Tuangkan supernatan ke corong berfilter untuk membuang lapisan lemak.
- i. Supernatan yang telah disaring siap digunakan.

APLIKASI

Isolasi *Ghost Red Blood Cells*

1. Bahan

- a. Darah
- b. NaCl fisiologis
- c. Bufer hipotonus lisis 15 mM
- d. Bufer hipotonus lisis 10 mM

2. Alat

- a. Sentrifuse
- b. Tabung sentrifuse
- c. Tabung darah EDTA

3. Cara Kerja

- a. Ambil 5 mL darah, pisahkan sel darah merah dari plasma dengan teknik sentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit suhu 4°C.

- b. Sel darah merah kemudian dicuci menggunakan larutan NaCl fisiologis dan mensentrifugasinya selama 5 menit pada kecepatan 3.000 rpm suhu 4°C.
- c. Pindahkan sel darah merah yang telah dicuci ke tabung sentrifus yang berisi bufer lisis 15 mM dingin, dengan jumlah volume perbandingan sel darah merah dan bufer 1:3. Sentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Buang supernatan.
- d. Lakukan pelisiran bufer 15 mM sebanyak 3-4 X yang akan didapatkan endapan merah muda tua.
- e. Tambahkan pada tabung sentrifuse yang berisi endapan pink tersebut dengan bufer lisis 10 mM.
- f. Diamkan 30 – 60 menit pada lemari pendingin -20°C untuk mempercepat proses pelisiran.
- g. Sentrifuse pada kecepatan maksimal (13.000 rpm – 14.000 rpm) selama 20 menit. Ulangi proses ini 2 – 3 x, maka akan diperoleh endapan merah muda samar – putih.
- h. Endapan yang diperoleh dapat digunakan untuk tahap selanjutnya.

APLIKASI

SDS-PAGE

1. Bahan
 - a. 1.5 M tris (pH 8.8)
 - b. 30 % akril/ 0.8 % bis-akrilamid
 - c. 10 % SDS
 - d. 10 % APS
 - e. TEMED
 - f. 2x sampel bufer terdiri dari 100 mM tris-HCl ph 6.8; 20 % gliserol; 4 % SDS; 0.2 % BPB (bromfenol biru); 20 mM DTT atau 10 % BME
 - g. *running buffer* terdiri dari 25 mM Tris; 250 mM glisin dan 0.1 % SDS
2. Cara Kerja
 - a. Buatlah gel pemisah konsentrasi 12 % (*resolving gels/separating gels*) dengan rincian bahan pada tabel 1.
 - b. Buatlah gel penumpuk (*stacking gels*) dengan rincian bahan pada tabel 2.

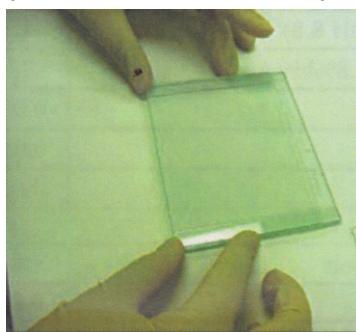
Tabel 1. Bahan gel pemisah

Bahan	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL
Air steril	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2
1.5 M Tris	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3
Akril/bis-akril	2	4	6	8	10
SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01

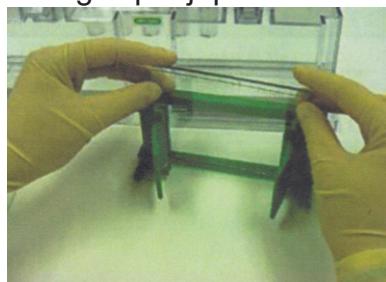
Tabel 2. Bahan gel penumpuk

Bahan	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL
Air steril	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4
1.0 M Tris	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63
Akril/bis-akril	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83
SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
APS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005

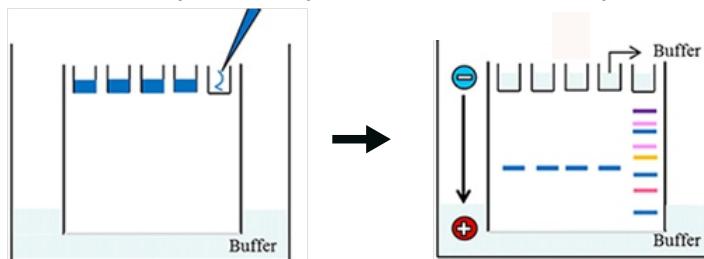
- c. Bersihkan lempeng kaca dan plastik pembatas dengan alkohol untuk menghindari lemak. Gunakan sarung tangan agar bercak lemak tangan tidak menempel di lempeng kaca.
- d. Taruh lempeng kaca 1 (lempeng yang besar), kemudian pembatas terakhir lempeng kaca 2.



- e. Jepit kanan kiri dengan penjepit kertas atau penjepit lainnya.



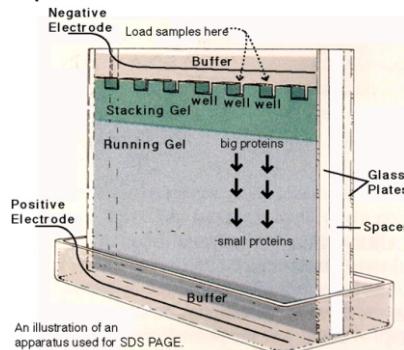
- f. Tuang campuran air isopropanol, kira-kira setengah dari luas lempeng kaca, lihat ada kebocoran atau tidak.
g. Buang cairan tersebut lalu baliklah untuk mengeringkan. Setelah kering, tuang gel pemisah sampai 3.4 luas lempeng kaca 2.
h. Biarkan 15 – 20 menit sampai mengeras/membeku, posisi harus tegak berdiri tidak miring. Untuk mengetahui sudah mengeras, ambil sedikit gel pemisah, taruh dalam tabung 1.5 mL diamkan sampai mengeras. Jika gel dalam tabung mengeras, ini berarti gel dalam lempeng juga sudah mengeras. Tuang butanol di atasnya agar gel tidak kering saat kita menyiapkan gel penumpuk. Setelah gel penumpuk siap dituang, buang larutan butanol tersebut.
i. Tuang gel penumpuk hingga melewati bibir lempeng kaca, taruh lempeng sisir untuk membuat sumur sampel.
j. Biarkan sampai mengeras/membeku lalu bukalah penjepitnya.
k. Gel SDS-PAGE siap digunakan.
l. Letakkan gel dan lempengannya dalam kotak elektroforesis, jepit agar bufer SDS tidak tumpah saat dituang, tuang bufer SDS (running buffer) dalam bak bufer atas bawah. Buka lempeng sisir.
m. Ambil 100 μ L sampel isolat protein dalam 2x sampel buffer.



(<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sds-page.html>)

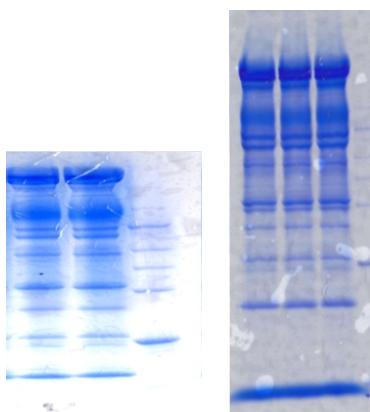
- n. Masukkan ke dalam sumur (kira-kira 10 μ L)

- o. Nyalakan sumber listrik dengan arus yang diatur. Biarkan proses pemisahan terjadi dengan bergeraknya sampel hingga batas 1/3 lempengan (harap ditandai batas 1/3 dari bawah lempengan).

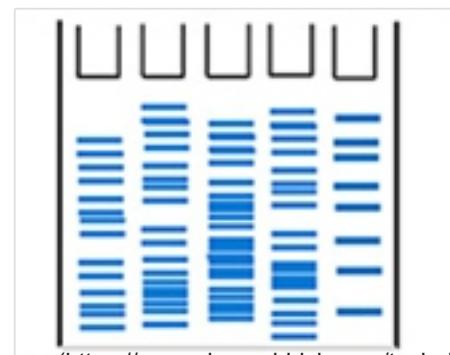


(https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/course_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html)

- p. Gel siap diwarnai dan dicuci untuk tahap lanjutannya. Cuci lempengan tersebut dalam air mengalir untuk menghilangkan bekas buffer.
- q. Lepaskan gel dari lempengannya (harap hati-hati), taruh dan rendam gel tersebut dalam larutan biru Coomassie. Biarkan selama 3 – 4 jam, gunakan mesin penggoyang (shaker) dalam gerakan pelan.
- r. Setelah selesai perendaman, pendahkan gel ke dalam wadah yang berisi larutan pencuci. Cuci selama 1 – 2 jam, setiap 30 menit, ganti larutan pencuci yang sudah berubah warna.



Hasil pencucian



(<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sds-page.html>)

ISOLASI DNA GENOM (TUMBUHAN DAN HEWAN)



DNA (*DeoxyriboNucleic Acid*) merupakan asam nukleat pembawa pesan genetik dalam kehidupan. Informasi genetik terletak di dalam inti sel dan tersusun rapi membentuk kromosom. Pola DNA penyusun kromosom inilah yang menentukan karakteristik sifat/jenis rambut, warna kulit dan sifat-sifat khusus yang berbeda antara satu individu dengan lainnya.

DNA ditemukan pertama kali pada tahun 1869. Melalui teknologi X-ray diketahui bahwa DNA memiliki struktur yang tertata secara rapi dan memiliki model rantai ganda DNA yang dipublikasikan oleh Watson dan Crick di jurnal Nature pada tahun 1953. Sejak itu, teknik pemurnian DNA mengalami perkembangan yang pesat dan menjadi prosedur rutin yang dilakukan didalam penelitian molekuler diberbagai bidang.

DNA terletak didalam sel. Oleh karena itu untuk mendapatkan DNA diperlukan tahap khusus yang biasanya dilakukan di laboratorium tertentu. Untuk mengeluarkan DNA dari sel maka teknik pemurnian DNA secara biokimia dilakukan dengan cara merusak dinding sel menggunakan larutan bufer tententu dan campuran berbagai jenis deterjen. Dengan terbukanya lapisan membran sel maka DNA dapat dikeluarkan dan diendapkan dengan penambahan alkohol.

Isolasi DNA merupakan serangkaian proses yang dilakukan untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel seperti lipid, protein, dan RNA (Surzycki, 2003). Prinsip kerja isolasi dan purifikasi DNA terdiri atas 5 tahap yaitu: pemecahan membran sel, penghilangan protein, penghilangan RNA, presipitasi DNA, pengukuran kemurnian dan kuantitas DNA (Surzycki, 2003).

Pemecahan membran sel merupakan proses pertama dalam melakukan isolasi DNA. Proses pemecahan membran sel yang paling terbaik dilakukan dengan menggunakan bahan-bahan kimia seperti detergen atau dengan menggunakan enzim (Surzycki, 2003). Bahan yang digunakan di antaranya mengandung detergen anionik yaitu berupa SDS (Sodium Deodecyl Sulfate) yang mampu mendegradasi membran sel (Sharpe, 2005). Selanjutnya, DNA diinkubasi pada suhu 37° C untuk mempercepat pelisisan sel. Inkubasi DNA pada suhu yang lebih tinggi bisa menyebabkan DNA terdegradasi (Chen et al., 2010).

Tahap kedua dalam proses isolasi DNA adalah proses penghilangan protein. Protein dan asam nukleat (DNA) berbeda kelarutannya dalam pelarut organik. Asam nukleat bersifat hidrofilik sehingga mudah larut dalam air, sedangkan protein mengandung banyak residu hidrofobik pada pusat molekulnya sehingga membuatnya larut dalam pelarut organik (Surzycki, 2003). Prinsip itulah yang digunakan untuk memisahkan protein dari DNA. Tahap ketiga adalah penghilangan RNA. Penghilangan RNA dapat dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan RNase (Surzycki, 2003).

Tahap keempat adalah presipitasi DNA. Pada tahap ini digunakan dua jenis alkohol yaitu isopropanol dan etanol. Prinsip presipitasi DNA oleh alkohol yaitu sebagai berikut. Molekul air bersifat polar (bermuatan positif) sehingga dapat berikatan kuat dengan DNA yang juga bersifat polar (bermuatan negatif) karena adanya kelompok fosfodiester pada tulang punggung DNA (Surzycki, 2003). Akan tetapi, asam nukleat (DNA) tidak berdisosiasi dalam air karena gaya intramolekul yang menghubungkan antar nukleotida lebih kuat daripada gaya antarmolekul antara asam nukleat dan air. Namun demikian, molekul air mengelilingi asam nukleat melalui interaksi dipol-dipol dengan asam nukleat. Interaksi ini meningkatkan kelarutan DNA dalam air (Zumbo, 2013).

Isopropanol dan etanol bersifat kurang polar jika dibandingkan air sehingga tidak dapat berikatan kuat dengan DNA. Jadi isopropanol dan ethanol akan mempresipitasi DNA pada fase *aquoeus* sehingga DNA

menggumpal membentuk struktur fiber dan terbentuk pelet setelah dilakukan sentrifugasi. Isopropanol kurang polar dibandingkan etanol. Oleh karena itu, isopropanol lebih efektif dalam melakukan presipitasi DNA dibandingkan etanol. Akan tetapi, tidak hanya DNA, residu berupa garam juga kurang larut dalam isopropanol, akibatnya garam-garam yang terlibat dalam proses ekstraksi akan terpresipitasi bersama DNA. Oleh sebab itu dibutuhkan presipitasi kembali dengan etanol untuk menghilangkan residu garam. Proses presipitasi kembali dengan etanol dapat meningkatkan derajat kemurnian DNA yang diisolasi (Zumbo, 2013).

Semakin berkembangnya teknik ini, maka saat ini kita bisa membeli kit pengisolasikan DNA. Namun, kit tersebut memiliki harga yang tidak murah dan memerlukan alat-alat tambahan untuk menjamin akurasi tahap pemurnian DNA, misalnya pipet mikro, filter dan sentrifuge, maka proses pemurnian DNA kini belum bisa dilakukan pada sembarang laboratorium apalagi dijadikan mata praktikum bagi mahasiswa dan juga siswa SMA. Sementara itu tuntutan ketrampilan untuk melakukan isolasi atau pemurnian DNA sebagai penunjang pemahaman teori DNA menjadi suatu keniscayaan.

Kondisi tersebut mendorong kreatifitas para ilmuwan untuk merancang teknik pemurnian DNA dengan alat dan bahan yang murah dan sederhana. Bahkan isolasi DNA genom dapat dilakukan dengan alat dan bahan yang biasa tersedia di dapur rumah kita. Inovasi ini membuka peluang untuk memperkenalkan teknik pemurnian DNA kepada siswa secara dini, bahkan bisa dilakukan bagi mereka yang masih duduk di bangku sekolah dasar sekalipun dengan dipandu oleh anggota keluarga yang sudah pernah melakukannya.

Beberapa bahan yang diperlukan untuk pemurnian DNA secara sederhana terdiri dari bahan sumber DNA, air, deterjen cair, jus nanas, isopropanol 95% dingin. Selain bahan sederhana tersebut, alat yang diperlukan juga sangat sederhana yaitu sendok makan, sendok teh, sendok atau tusuk es krim dari kayu, botol transparan dan termometer. Bahan sumber DNA yang akan dimurnikan bisa berasal dari apa saja

karena semua bagian makhluk hidup mengandung DNA sehingga bisa menggunakan apa saja misalnya daging, hati ayam, kedelai, kacang hijau, brokoli, buah-buahan berdaging lunak dan lain-lain.

Berikut adalah langkah dan bahan yang bisa dilakukan dalam isolasi DNA buah atau sel hewan. Alat dan bahan yang biasa digunakan cukup mudah ditemukan. Alat-alat yang biasa digunakan adalah Sendok makan, sendok teh, lumpang dan alu/blender, sendok atau tusuk es krim dari kayu, botol, transparan, mikropipet, tips, rak tabung mikro, sentrifugasi mikro, inkubator, lemari es dan termometer. Adapun bahan yang digunakan Sampel sumber DNA adalah buah dan sayur berdaging lunak, hati ayam, deterjen cair, jus nanas, isopropanol absolut dingin. Adapun langkah kerja yang harus dilakukan di antaranya:

1. Haluskan daging buah atau sayur lunak masing-masing atau hati ayam dengan menggunakan lumpang (ditumbuk/haluskan).
2. Setelah tampak tercampur dan sebagian larut, tambahkan setengah sendok teh deterjen cair. Campurkan deterjen itu dengan cara membolak-balikan botol secara perlahan tapi sempurna, setiap setengah menit sekali selama 5 menit. Hilangkan busa dengan cara menghisapnya dengan tisu. Bila sumber DNA adalah hati atau daging maka setelah penambahan deterjen juga dilakukan penambahan jus nanas setengah sendok makan, kemudian dicampur secara perlahan dan merata.
3. Siapkan alkohol 95% dingin dengan volume kira-kira sama dengan larutan pada tahap 2 dan juga dalam botol yang kira-kira ukurannya sama.
4. Miringkan botol berisi campuran yang sudah tercampur lalu secara perlahan tambahkan alkohol 95% dengan cara mengalirkannya pada dinding botol tersebut sampai kira-kira total volumenya menjadi 2 kali. Pada tahap ini tidak dibolehkan mencampur secara keras dan tidak boleh diaduk.
5. Setelah semua alkohol dituang ke dalam botol yang berisi campuran bahan DNA, air dan deterjen, akan terbentuk lapisan antara alkohol

dengan lainnya yang tidak bercampur. Perhatikan secara seksama pada batas kedua lapisan cairan tersebut. Lapisan putih yang terbentuk adalah DNA.

Berbicara tentang inovasi baru terkait pengembangan potensi guru dalam meningkatkan pengetahuan siswa dengan berbasis praktikum, tentunya dibutukan kreatifitas yang tinggi, berlebih dengan kondisi sekolah yang kurang dalam fasilitas. Ini merupakan tantangan yang berat dilakukan, jika sikap profesional guru masih rendah. Praktikum adalah salah satu metode pembelajaran yang sesuai dengan tuntutan dari tujuan pembelajaran Nasional di antaranya adalah metode praktikum mampu membentuk sikap dan kepribadian serta kreativitas siswa yang sesuai dengan tujuan pendidikan pemerintah. Dengan metode praktik karakter tersebut dapat tercapai karena nilai yang ditekankan pada kegiatan praktikum adalah ulet, tekun, jujur, teliti, kreatif, terbuka, dan kritis, tentunya dengan sendirinya akan membuka dalam Ketaqwaan pada Tuhan yang Maha Esa (Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan 2013).

Salah satu inovasi baru dalam pembelajaran Biologi adalah dikembangkannya praktikum DNA, selama ini guru disekolah dalam praktikum khususnya pada sub materi Hereditas (DNA) hanya menggunakan kancing genetika. Karena praktikum DNA merupakan salah satu materi masih dianggap sulit dan abstrak. (Panigoran Sihombing, 2007). Sehingga guru kesulitan dalam mencari cara bagaimana dalam menyajikan materi secara nyata. (Adji Doyan Tri Rahmawan dan Sukarmin, 2013). Berikut adalah salah satu metode dalam meminimalisasi dari kesulitan dalam praktikum DNA.



Genetika Molekuler dan Aplikasinya

ISOLASI DNA BUAH



Dalam mengisolasi DNA Buah (Pisang) secara sederhana tanpa peralatan laboratorium alat yang dibutuhkan adalah 1). Botol kecil bekas dari plastik transparan. (Gambar a) 2). Mortal dan alu (bisa digunakan dengan alat rumah tangga yang terbuat dari batu) (gambar b) 3). Penyaring (kain bersih) 4). Sendok dapur. Adapun bahan yang dibutuhkan adalah: 1). Pisang yang masak 2). Etanol/ alkohol 3). Garam dapur 4). Dan detergen (soklin cair) 5). Air aqua.



Gambar 7. botol (kiri) dan munthu (kanan)

<http://munthu.com/20140914/cobek-lonjong-oval-batu->

Adapun langkah-langkah yang harus dilakukan adalah:

1. Tumbuklah pisang dengan menggunakan munthu sampai benar- benar halus, kurang lebih 50 gram. Usahakan munthu dalam keadaan benar- benar bersih. Dan masukkan air aqua sebanyak 100 ML.
2. Saringlah hasil tumbukan tersebut dengan menggunakan kain, lebih baik menggunakan kain yang bersih dan mampu menyaring dengan lebih akurat. Hasil saringan masukkan ke dalam botol sebanyak 3 sendok dapur.

3. Masukkan garam dapur pada botol sebanyak 1/6 sendok dapur dan dikocok, kemudian biarkan selama 5 menit.
4. Masukkan detergen cair sebanyak 3 tetes, dan di kocok lalu diamkan selama 5 menit.
5. Masukkan etanol/alkohol dingin pada botol hingga 1/3 dari volume botol.
6. Diamkan dan amati perubahan yang terjadi.

APLIKASI

Praktikum Isolasi DNA Buah di Sekolah

1. Alat

- a. Tabung reaksi dan raknya
- b. Mortal dan alu
- c. Pipet tetes
- d. Gelas ukur
- e. Kertas saring
- f. Botol semprot

2. Bahan

- a. Pisang masak
- b. Etanol/ alkohol
- c. Garam dapur
- d. Deterjen cair
- e. Aquades

3. Cara Kerja

- a. Sterilkan seluruh alat yang akan digunakan.
- b. Tumbuklah pisang dengan menggunakan mortal dan alu sampai benar- benar halus, kurang lebih 50 gram. Dan masukkan air aqua sebanyak 100 mL.
- c. Saringlah hasil tumbukan tersebut dengan menggunakan kain kasta, Hasil saringan masukkan 10 mL ke dalam gelas tabung reaksi.
- d. Masukkan garam dapur pada botol sebanyak 1/3 sendok spatula dan dikocok, kemudian biarkan selama 5 menit.
- e. Masukkan detergen cair sebanyak 3 tetes, dan di kocok lalu diamkan selama 5 menit.
- f. Masukkan etanol/alkohol dingin pada tabung reaksi melewati bibir tabung reaksi dengan perlahan hingga 1/3 dari volume volume tabung reaksi.
- g. Diamkan dan amati perubahan yang terjadi



Genetika Molekuler dan Aplikasinya

ISOLASI DNA GENOM DARI BULBUS AKAR RAMBUT/ BULU



Sel mengandung dua asam nukleat yaitu DNA dan RNA. DNA terletak pada kromosom, dijumpai di nukleus, mitokondria dan kloroplas. Sedangkan RNA dijumpai di nukleus, sitoplasma, dan ribosom. DNA ada dalam setiap sel makhluk hidup. Zat ini disebut cetak biru kehidupan karena memiliki peranan yang sangat penting, yaitu sebagai pembawa informasi hereditas yang menentukan struktur protein dan proses metabolisme lain. Untuk mendapatkan DNA murni dari suatu sel dalam jaringan tubuh makhluk hidup dapat dilakukan suatu teknik isolasi DNA.

DNA terdapat pada seluruh jaringan dan cairan tubuh. Oleh karena itu DNA genom dapat diisolasi dari semua bahan biologis yang mengandung sel berinti, seperti darah, semen, akar rambut, tulang, liur dan lain-lain. Bahan yang paling sering digunakan untuk tujuan isolasi DNA adalah darah dan rambut beserta akarnya, karena kedua bahan tersebut relatif mudah diperoleh. Folikel rambut kaya akan DNA. Folikel rambut merupakan bagian dari rambut yang menghubungkan antara rambut dan kulit kepala. Folikel rambut menyediakan objek tes DNA yang terbaik ketika folikel ini didapatkan dalam keadaan masih segar, hal ini berarti ketika rambut ditarik dari kulit kepala. Pengambilan sampel bulbus akar rambut perlu memperhatikan beberapa hal. Pengambilan sampel bulbus akar rambut menggunakan pinset steril dan praktikan diwajibkan menggunakan sarung tangan agar DNA yang nanti diisolasi adalah murni DNA objek. Agar dapat diperoleh sampel rambut beserta akarnya maka rambut diambil posisi tegak lurus serta tidak menimbulkan *invasif* pada objek yang akan diambil DNA-nya. Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan

untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam proses isolasi DNA antara lain harus menghasilkan DNA tanpa adanya kontaminan seperti protein dan RNA; metodenya harus efektif dan bisa dilakukan untuk semua spesies; metode yang dilakukan tidak boleh mengubah struktur dan fungsi molekul DNA; dan metodenya harus sederhana serta cepat. Alat yang digunakan dalam mengisolasi DNA Genom dari Bulbus Akar Rambut/ Bulu adalah tabung mikro, pipet mikro dan tip, sentrifugasi mikro, vorteks, water bath, spektrofotometer dan kuvet. Bahan yang dibutuhkan dalam menghasilkan Isolasi DNA rambut adalah, bulbus akar rambut/bulu, larutan buffer 10x , aquabidestilata. Langkah yang harus dilakukan adalah measukkan minimal 6 helai bulbus akar rambut/bulu yang sama asalnya dan dipotong sekitar 0,5-1cm dari bawah termasuk akarnya kemudian tempatkan pada tabung mikro 1,5mL yang telah berisi 50uL larutan buffer 10x untuk isolasi DNA. Kemudian menginkubasikan dalam penangas air 55 C selama 1 jam. Kemudian inkubasikan dalam penangas air 95 C selama 10 menit.

DETEKSI DNA

Teknik Spektrofotometri

Konsentrasi DNA dalam larutan dihitung dengan menggunakan spektrofotometer, dengan mengingat, bahwa 50 µg/mL DNA untai ganda mempunyai kerapatan optik 1,0 pada 260 nm. Penghitungan sebaiknya dilakukan *in duplo* pada OD 260 nm dan 280 nm, untuk mengetahui indeks purifikasi, yaitu $OD\ 260/280 = 1,75 - 1,80$. Bila pada penghitungan didapatkan nilai kurang dari 1,75, maka proses ekstraksi dengan fenol harus diulang. Sebagai contoh, dari 10 mL darah akan dapat diperoleh 100-700 µg DNA. Konsentrasi DNA dapat ditentukan dengan cara mengukur nilai serapan cahaya (A) dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. Nilai perkiraan konsentrasi DNA dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$DNA_{\mu\text{g/mL}} = A_{260} \times 50_{\mu\text{g/mL}} : C$$

Keterangan :

- A_{260} = Serapan cahaya pada panjang gelombang 260 nm
50 = 50 µL/mL DNA untai ganda yang mempunyai kerapatan optik (*Optical Density OD*) 1,0 pada panjang gelombang 260 nm.
C= Konsentrasi DNA yang ada dalam kuvet

Untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA harus dilakukan pengukuran nilai serapan cahaya protein pada panjang gelombang 280nm. Selanjutnya, tingkat kemurnian DNA dapat ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kemurnian DNA} = A_{260} : A_{280}$$

Keterangan :

A_{260} = Serapan cahaya pada panjang gelombang 260 nm

A_{280} = Serapan cahaya pada panjang gelombang 280 nm

APLIKASI

Spektrofotometri

1. Bahan
 - a. Sampel DNA
 - b. Aquabidest
2. Alat
 - a. Spektrofotometer
3. Cara Kerja
 - a. Isi kuvet dengan 1 mL aquabidest.
 - b. Masukkan 1 – 5 μ L DNA yang akan dihitung ke dalam kuvet. Kocok perlahan.
 - c. Ukur serapan DNA pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}) dan konsentrasi DNA adalah 50 μ g/mL pada $A_{260} = 1$, dengan rumus berikut:

$$\frac{\text{Konsentrasi DNA (ug/mL)} \ (A_{260} \times 50\text{ug/mL})}{\text{jumlah pengenceran DNA (ug) yang ditambahkan (mL)}}$$

- d. Hitunglah kemurnian DNA dengan indeks kemurnian = A_{260} / A_{280} . DNA dikatakan murni bila indeks kemurnian > 1,75.

Teknik Elektroforesis

Prinsip teknik elektroforesis adalah berdasarkan migrasi partikel bermuatan di bawah pengaruh medan elektronik pada kondisi yang konstan. Oleh karena setiap nukleotida dalam molekul DNA memiliki muatan negatif, maka panjang suatu molekul DNA dapat ditetapkan dengan teliti menggunakan teknik elektroforesis yang memisahkan molekul berdasarkan berat molekul. Panjang suatu molekul DNA yang sedang diteliti dapat diketahui dengan cara membandingkannya dengan standar berat molekul DNA tertentu. Metode pemisahan DNA dengan

elektroforesi ini secara luas digunakan untuk tujuan analitik dan preparatif. Untuk analisis pemisahan molekul DNA dengan ukuran kurang dari 500 nukleotida umumnya dilakukan dengan menggunakan gel poliakrilamid, karena pori-pori gel poliakrilamid lebih kecil dari molekul DNA yang melewatinya. Sedangkan pori-pori yang lebih besar dimiliki oleh gel agarose yang dapat digunakan untuk analisis molekul DNA yang lebih besar.

Ukuran pori-pori gel poliakrilamid sangat dipengaruhi oleh konsentrasi akrilamid total pada saat polimerisasi. Keefektifan ukuran pori-pori akan menurun sesuai dengan rendahnya konsentrasi akrilamid. Konsentrasi gel yang digunakan dapat disesuaikan dengan ukuran bahan uji yang akan dianalisis melalui pengukuran mobilitas sampel. Misalnya, konsentrasi gel akrilamid 2,5% dapat digunakan untuk berat molekul sekitar 10^6 , kira-kira untuk agarose adalah sebesar 5%. Gel poliakrilamid 30% dapat digunakan untuk berat molekul kurang dari 2000 Dalton. Gel poliakrilamid dibuat dengan cara mereaksikan monomer akrilamid ke dalam rantai panjang dan ikatan silang senyawa bifungsional NN methylene bisakrilamid, bereaksi dengan gugus fungsional bebas pada rantai termini. Polimerisasi akrilamid diinisiasi oleh penambahan ammonium persulfat (APS). Penambahan N,N,N,N-tetrametiletilendiamida (TEMED) dilakukan untuk mempercepat proses polimerisasi. Peningkatan TEMED akan meningkatkan laju polimerisasi.

Molekul DNA pada gel agarose atau gel poliakrilamid tidak tampak sebelum DNA ditandai dengan pewarna. Satu metode sensitif pewarnaan DNA adalah dengan mereaksikan dengan pewarna etidium bromida, yang dapat berfluoresensi di bawah sinar ultra violet pada saat mengikat DNA. Metode lain yang lebih sensitif adalah menggunakan radioisotop P^{32} yang diikorrasikan ke dalam molekul DNA sebelum di elektroforesis. Radiosiotop ini digunakan sebagai petanda yang masuk ke fosfat DNA dan energi emisi partikel beta dapat secara mudah dideteksi secara autoradiografi.

Elektroforesis

1. Bahan

- a. Bubuk gel agarose
- b. Larutan etidium bromida 10mg/mL
- c. Penanda DNA/ *DNA Ladder*
- d. Larutan elektroforesis TAE
- e. Larutan zat pewarna/*Loading buffer*

2. Alat

- a. Alat elektroforesis horizontal dan sisir pembentuk sumur pada gel
- b. Pemasok daya
- c. Transiluminator dan sinar ultra violet

3. Cara Kerja

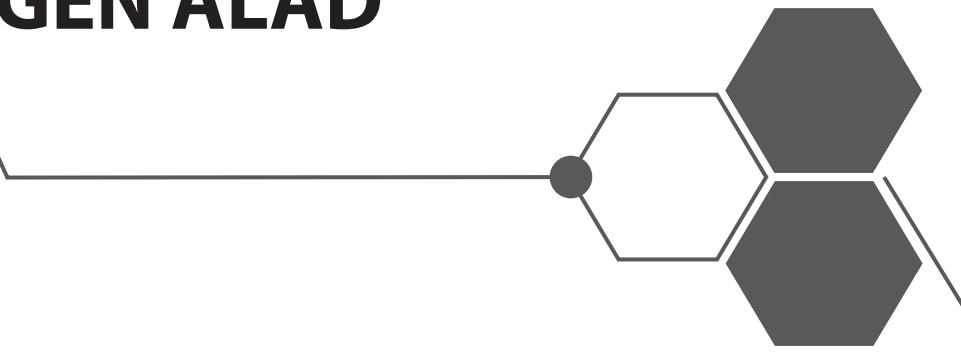
a. Pembuatan gel agarose 1%

Seratus mililiter larutan dapar TAE 1X (50mM Tris-HCl, 20mM Na-asetat, 2 mM EDTA pH 7,2) yang mengandung 1 gram bubuk gel agarose dipanaskan hingga larut. Setelah agak dingin, tuang larutan gel agarose tersebut ke dalam cetakan. Letakkan sisir kedalam cetakan gen berisi larutan gel agarose tersebut. Diamkan beberapa saat hingga larutan gel agarose tersebut dingin dan mengeras.

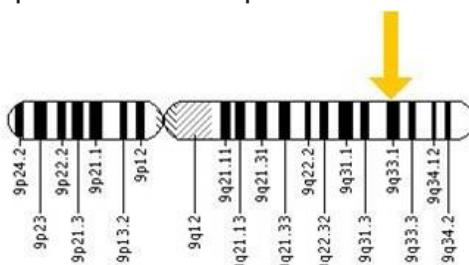
b. Elektroforesis

Setelah terbentuk gel dan sumur-sumurnya. Masukkan gel agarose tersebut ke dalam eletroforesis. Kemudian isi wadah kiri dan kanan dengan larutan dapar TAE 1x sebagai larutan elektrolit. Masukkan ke dalam sumur sebanyak 5uL sampel DNA dicampur larutan zat pewarna/*Loading buffer* 1x (2% sukrosa, 0,01% biru bromfenol dalam 10mL dapar TAE 1x pH 7,2). Hubungkan ke pemasok daya dan nyalakan pada tegangan 100 volt selama 2 jam. Setelah selesai, gel agarose direndam dalam larutan etidium bromida 0.5ug/mL selama 15 menit dan rendam sebanyak 2 kali dengan akuades sampai bersih. DNA genom dianalisis di atas transiluminator- sinar ultra violet .

GEN ALAD



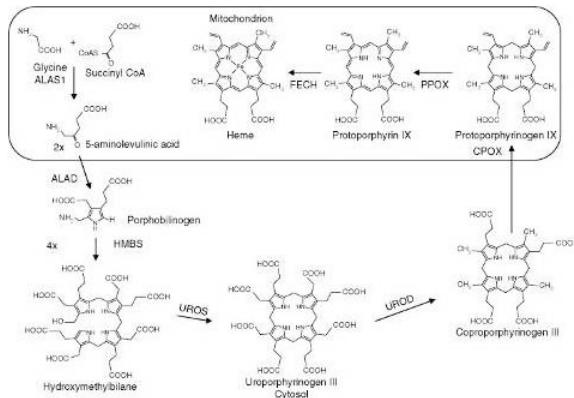
Salah satu gen polimorfik yang diasumsikan dapat memodifikasi distribusi farmakokinetik pengkode Pb adalah gen dengan alel pengkode produksi enzim Asam Amino Levulinat Dehidratase (ALAD). Enzim ini merupakan enzim kedua pada alur biosintesis heme (Wetmur, 1994). Gen ALAD terletak di kromosom 9 pada urutan nukleotida nomor 116148591 base pairs (bp), sampai 116163617 bp.



Gambar 8. Struktur gen ALAD (Genetic Home Reference 2010)

Jalur sintesis heme telah banyak diteliti. Sintesis heme berasal dari molekul suksinil-KoA, hasil siklus asam sitrat di mitokondria dan asam amino glisin. Produk reaksi penggabungan antara suksinil-KoA dan glisin adalah asam α -amino- β -ketoadipat, yang selanjutnya diderkaboksilasi untuk membentuk α -aminolevulinat (ALA) melalui enzim ALA sintase (Murray, 2009). Rangkaian reaksi sintesis ALA dikatalis oleh ALA sintase, yaitu enzim yang bertanggung jawab sebagai penentu kecepatan biosintesis porfirin dalam hepar mammalia. Sintesis ALA terjadi di mitokondria. Di sitosol, dua molekul ALA disatukan oleh ALA Dehidratase untuk membentuk 2 molekul air dan satu porfobilinogen (PBG)ALA.

Dehidratase merupakan suatu enzim yang mengandung seng (Zn) dan peka terhadap inhibisi oleh plumbum(Pb), seperti yang dapat terjadi pada keracunan plumbum di lingkungan. Enzim ALA Sintase terdapat di mitokondria sedangkan ALA Dehidratase terdapat di sitosol (Murray, 2009).



Gambar 9. Delapan tahapan sintesis heme (Fishbein, 2009)

Molekul ALAD 1-1, 1-2, dan 2-2, adalah tiga isozim yang berasal dari dua macam alel yaitu ALAD¹ dan ALAD². Keberadaan gen ALAD polimorfik dalam patogenesis toksitas Pb telah mengimplikasikan bahwa secara genetik sangat potensial untuk menyebabkan terjadinya perbedaan suseptabilitas terhadap Pb.

Penyebab polimorfisme pada protein enzim ALAD adalah karena adanya *transversion* dari G-ke-C pada nukleotida yang ada dalam region kodon 59 sehingga menyebabkan terjadinya substitusi asam amino lisin oleh asparagin (Wetmur, 1991). Adanya substitusi ini akan menyebabkan terjadinya perbedaan afinitas Pb terhadap gen polimorfik tersebut (Wetmur, 1991).

RESEARCH PROJECT: ANALYSIS OF ALAD GENE

The Small Research Project, in this chapter is Analysis of ALAD Gene, the date of the research on November-Desember in 2014 at Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology - FMIPA Universitas Negeri Jakarta (UNJ), Jakarta Indonesia, by Dr. Rini Puspitaningrum, M.Biomed a **Lecturer Supervisor**, Amien Ramadhan, S.Si Universitas Negeri Jakarta , Wiena Futy, S.Si. - Universitas Negeri Jakarta, and Isrina Febianti, S.Si. - Universitas Negeri Jakarta, they are is **Supporters Laboratory assistance**. And the purposes of this research is:

1. how to DNA extraction from wholeblood;
2. how Delta-aminolevulinic acid dehydratase (*ALAD*) gene amplification by PCR;
3. how Amplification-Refractory Mutation System (ARMS).

DNA Extraction From Whole Blood

1. Reagents

- a. SDW (Sterilized Distilled Water)
- b. Saline (0.8%NaCl)
- c. Lysing solution

NH ₄ Cl	7.0g
NH ₄ HCO ₃	0.07g
Add water up	to1000mL

- d. Proteinase K(1mg/mL)

- e. 10%SDS

- f. STE pH 7.4

NaCl	2.92g
------	-------

Trizma base	3.03g
-------------	-------

EDTA-2Na	0.19g
----------	-------

H ₂ O	400mL
------------------	-------

Adjust pH at 7.4 with 1N HCl

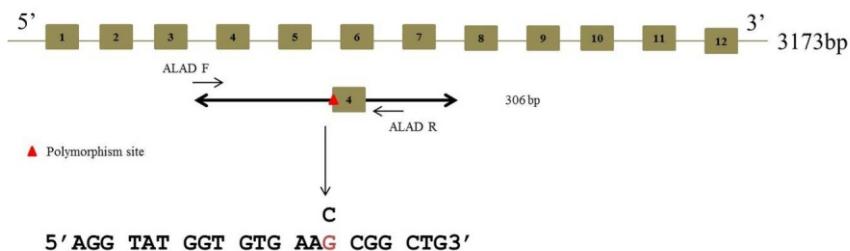
Add water up to 500mL

- g. TE-Saturated Phenol (pH8.0)(with 0.1% 8-hydroxyquinoline)
 - h. Chloroform
 - i. 99.5% Ethanol
 - j. 3M sodium acetate
 - k. 70% Ethanol
 - l. TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-2Na), pH 8.0
 - Trizma base 1.21g
 - EDTA-2Na 0.37g
 - H₂O 900mL
 - Adjust to pH8.0 (with 1N HCl)
 - Add water up to 1000mL
 - Autoclave
2. Procedure
- 1) Whole blood (about 2mL) was centrifuged at 5,000 rpm for 5 minutes at room temperature.
 - 2) Three layers are separated (Plasma, Buffy coat and RBC)
 - 3) Remove the serum (If you need the serum, separate it in another tube).
 - 4) Add the saline to wash the pellet and centrifuge at 5,000 rpm for 5 minutes at room temperature.
 - 5) Remove the top layer and transfer the Buffy coat to the new 1.5mL-micro tube.
 - 6) Repeat the step 4 and 5 to get a large amount of the buffy coat (WBC).
 - 7) Add the **lysing solution** (maximum volume) to the tube contain buffy coat, invert and mix well about 5 minutes. *Lysing solution selectively hemolyzes red blood cells to spare white blood cells.*
 - 8) Centrifuge at 15,000 rpm for 5 minutes at room temperature.
 - 9) Remove the supernatant and repeat the step 7 and 8 three times, and make sure no RBCs remain (only buffy coat).
 - 10) Remove the supernatant completely by pipette.

- 11) Add 400l **STE**, and mix well until the WBC is completely re-suspended. *The WBC pellet may be compacted. In order to disperse the WBC vortexing is available.*
- 12) Add 20 l **10%SDS**, and mix well. *SDS breaks the membrane of WBC.*
- 13) Add 4l **proteinase K**, and Gentry mix. *Proteinase K potently hydrolyzes any protein. It breaks here proteins constituting the cell and also remaining plasma, if any.*
- 14) Keep it at 60°C for 1-2hours(or at 37°C for overnight). *Since proteinase K is an enzyme, it has optimal temperature. It works more effectively at 60°C than 37°C. Thus, in the latter it takes longer time.*
- 15) Add 400 l **TE-saturated phenol** then invert and shake for 5 minutes. *The main purpose of the phenol is to inactivate DNase and RNase remaining in the sample. If minute amount of them remain, you may lose all DNA extracted here.*
- 16) Centrifuged at 15,000 rpm for 5 minutes. *Phenol layer comes lower, and DNA layer upper. Phenol doesn't mix with water because of the extremely different polarity. However, very small amounts are still dissolved in water.*
- 17) Transfer the supernatant (DNA layer) into a new 1.5 mL-microtube by large-pore pipette. Add 400ul **Chloroform** and mix well (invert) for 5 minutes and centrifuge at 15000 rpm for 5 minutes. *The purpose of the chloroform treatment is to get rid of the phenol completely. Even race amount of contaminated phenol leads the following PCR into failure. (DNA polymerase is inactivated)*
- 18) Transfer the supernatant (DNA layer, ca 400l) into another new 1.5mL-microtube by pipetting.
- 19) Repeat the steps 18 and 19 to completely remove the phenol.
- 20) Add 40l **3M sodium acetate** and 1.0mL **Ethanol**.
- 21) Mix well, and DNA is visible.

- 22) Centrifuge at 15,000 for 5minutes. Discard the supernatant (ethanol). *Ethanol solution contains many contaminants, which are discarded in this step. Thus, relatively purified DNA is obtained in a precipitated form.*
- 23) Add 1mL of the **70% ethanol**, and centrifuge at 15,000 for 5 minutes.
- 24) Get rid of the ethanol completely.
- 25) DNA was dried up in vacuum centrifugation for 5 minutes until no ethanol remains. (If you don't have vacuum centrifuges, place in the block incubator at 60°C until it is completely dried up)
- 26) Redissolve the dried DNA pellet with 100l **TE** (50l per 1mL initial whole blood). Store at 4°C.
- 27) Redissolve the dried DNA pellet with 100l **TE** (50l per 1mL initial whole blood). Store at 4°C.

ALAD Gene



ef: Wesmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ. Molecular Characterization of the Human 8-Aminolevulinate Dehydratase 2 (ALAD2) Allele: Implications for Molecular Screening of Individuals for Genetic Susceptibility to Lead Poisoning. Am. J. Hum. Genet. 49:757-763, 1991.

agacgtcgtggcagaggctgtcagaaggagctgaactgcagatggagttcaaaaaga
 gggcctcgaaggagccctccacagccgaattccggagctctgtctactcagg **GCCTCAGT**
CTTCCCTCCTATTAGTggatgcatccctgcccctctgtcctggggctgagccctc
 ctggtgccatatgcagctggttctaacagaggcacacagtgtgggggt **ccgg**aggaccg
 ttgcctgggacacctgccttcctcaacccctctacccacacccacacag **GTATGGTGTGA**
AGCGGCTGGAAGAGATGCTGAGGCCCTGGTGGAAAGAGGGCC
TACGCTGTGTTGATCTTGCGTCCCCAGCAGAGTTCCCAA

Ggtgaag**AATCAAAGGAAGGGCTAAGAAGGGA**ggttgcgctcacgcccgt
aatcccaagcacttggaggccaaagtgggtggatcacttgagcccaggattttagaccagc
ctggacaacatggcaaaacccatctctacaaaaatacaa

PCR Primer

Forward primer ALAD F: 5'-GCCTCAGTCTTCCTCCTATTAGT-3'

Reverse Primer ALAD R: 5'-TCCCTTCTTAGCCCTTCCTTGATT-3'

PCR product size: 306 bp

Amplification ALAD gene by PCR

1. PCR

- 1) Make PCR mixture as presented in Table 3.
- 2) Mix well.
- 3) Put on the thermal cycler.
- 4) Set up the PCR condition (Table 4).

Table 3. PCR mixture

Solution	×1
SDW	11.3µl
10×Buffer	2.0µl
2.5mM dNTP	1.6µl
5pmol Primer ALAD F	2.0µl
5pmol Primer ALAD R	2.0µl
Ex Taq	0.1µl
DNA	1.0µl
Total	20µl

Table 4. PCR condition

Initial denaturation	94°C	3min
Denaturation	94°C	30sec
Annealing	60°C	30sec
Extension	72°C	30sec
Final extension	72°C	1min

2. DNA Electrophoresis

a. Reagent

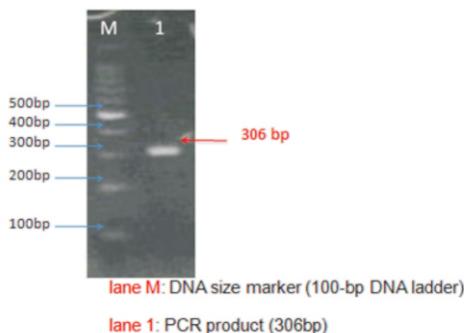
- 1) Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer
- 2) 2% Agarose gel (with Ethidium bromide)
- 3) Size marker (100 bp DNA ladder)
- 4) Loading dye (Mixture of BPB and xylencyanol FF)
- 5) Ethidium bromide

b. Procedure

- 1) Add 1 μ l of loading dye to the 5 μ l of PCR product.
- 2) Mix well then load the all mixture into the well of the agarose gel.
- 3) Do electrophoresis at 100V until dye markers have migrated in an appropriate distance (ca 20min).
- 4) DNA is visible under the UV light.

c. Results

If PCR is successful, you can see the band at 306bp.



3. ARMS



GCCTCAGTCTCCCTCCTATTTAGTggatgcacccctgcccc**TTCTGTCC**
TGGGGGCTTGAGccctcctggtgccatatgcagctggttctaacaaggcacacagt
 gtgggtgggtccggaggaccgtgcctggacacgccttcataacccttacccacaccca
 cacag**GTATGGTGTGAAGCGGCTGGAAGAGATGCTGAGGCCCTT**
GGTGGAAAGAGGGCCTACGCTGTCTGATCTTGGCGTCCCC
AGCAGAGTTCCCAAGgtgaag**AATCAAAGGAAGGGCTAAGAAGGG**
A

ARMS primer

Forward primer (Common): 5'-TTCTGTCTGGGGGCTTGAG-3'

Reverse Primer (Normal): 5'-TCAGCATCTTCCAGCCGC-3'

(Mutant) : 5'-TCAGCATCTTCCAGCCGG-3'

PCR product size: 168 bp

a. DNA template Preparation

PCR product is diluted by SDW for ARMS DNA template. Ex. 1.0 μ l PCR product + 99.0 μ l SDW (100X dilution)

b. PCR

- 1) Make PCR mixture as written above in table 5.
- 2) Mix well.
- 3) Put on the thermal cycler.
- 4) Set up the PCR condition (Table 6).

Table 5. PCR mixture

Tube 1 (for Normal)		Tube 2 (for Mutant)	
Solution	1X	Solution	1X
SDW	11.3 μ l	SDW	11.3 μ l
10 \times Buffer	2.0 μ l	10 \times Buffer	2.0 μ l
2.5mM dNTP	1.6 μ l	2.5mM dNTP	1.6 μ l
5pmol ALAD C primer	2.0 μ l	5pmol ALAD C primer	2.0 μ l
5pmol ALAD N primer	2.0 μ l	5pmol ALAD M primer	2.0 μ l
Ex Taq	0.1 μ l	Ex Taq	0.1 μ l
DNA*	1.0 μ l	DNA*	1.0 μ l

Table 6. PCR condition

Initial denaturation	94°C	3min
Denaturation	94°C	30sec
Annealing	60°C	30sec
Extension	72°C	30sec
Final extension	72°C	1min

c. Electrophoresis

Reagent

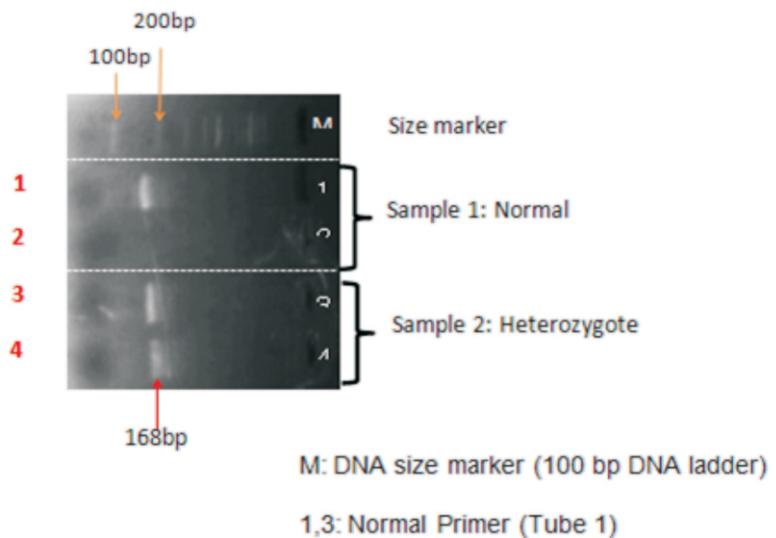
- 1) TAE buffer
- 2) 2% Agarose gel (with Ethidium bromide)
- 3) Size marker (100 bp DNA ladder)
- 4) Loading dye

Procedure

- 1) Add 1µl of loading dye for every 1µl of PCR product.
- 2) Mix well then load the all mixture into the well of the agarose gel.
- 3) Electrophoresis at 100V until dye markers have migrated in an appropriate distance (20min).
- 4) DNA is visible under the UV light.

d. Diagnosis

If you have only normal allele, you can see the only normal band(tube1), like a Sample 1. If you have ALAD mutant allele in heterozygote, you can see the bands in both normal (tube 1) and mutant (tube 2) lanes. (Sample 2).



DATA SEQUENCE OF HUMAN ALAD GENES

Source :

http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=OTTHUMG00000020522;r=9:116148597-116163613
>chromosome:VEGA51:9:116147997:116164213:-1
TCCATAAAGACCTTGATCGGATCTATCATTGTACCTATCATAGGTCT
GATGCCCTATC
AAGACTTGGAGTTTCCTAAACGCCATGTCTTCACATCACATCTC
TCAACTCATAGCA
TTGCCGTACCCTGAGAAATAATGAAGCTGGTACAAATTCTCTGA
AAACTTGGAAAGCC
TGGCGCTGAACTCAACAACCTTAGCTTAGTCCGAAAAATGGACTTA
GCTAATACTGTGT
TAGGCATAATGGTGCTGTTAACGGCTTGACATCCAATTATTCTTT
CACCAAGCCATT
AACCAGAGCCAAGTTGCCCTAGGCTGGCAAAGGAATGCTGTGA
AGTGAAACCTGGGCT
GTAACCGCCTCCGAGGCCGGCTCACACCCAGGGACCCTCCAAAGC
GGTCCCTGCGCCCCC
TCGTGGCCTCCCTCCTGCAGTCGCTGCACAAGCGCAGGGCCCGG
AGCGGGGACGGGCGG
GCCCTCCAGGCCCTCGACACACCCAATTGCCAGGCCTCGTTGCG
TGTGGCGGGGCGC
GGCTGGAGCGGAGGGAGACACAGCGGTGACAGGAGCAGCGGCC
TGGCCTGGACTGTGGA
GGGGCGGACCGTGGGAAGCTGCTTCCGGGTGAGCCCCCCC
GCTCTTACGCGGTCTGT
GGGAGACCGGAGCGGGAGACAGCGGTGACAGGAGCAGCGGCC
GGGAGCCCTAGGGAGGC
AGGTGAGCGGGGCTGGATGCGGGAGATAGCGGCCCTGGAGGG
CGGCTCCAGGGCGAGG
CGGGGACTGTGGCACCAAGAGTCCTGCGTCCCCAGATTGTGCTGT
GCGCCTGAAGCCCTG
GCGGTGCAGCCGTGCACGGAGTCCGGAGCGTTGTTGGCT
GGATTATCCCGCTGC
AGCCGAGGTTGGGGCCGGGTTCGGGCTCCGCACCTCTTC
TGGGGTTCACCCCTC
GGATACCGCCTGGGCAGACTCCATCGATGCAGAACCGAGGTGCG
GGTGGTGGTTGGTGG

GGGGGTAGGGAGGTGAAAACAATAACAGCCGTTTGTACTAAGCGT
TGCCTGCATTGACC
ATTCATTATTTATTATTTATTATTTGAGACGGAGTTCGCTCTT
GTTGCCAGG
CTGGAGTGCAATGGCGCGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTC
CCGGGTTCAAGCGAT
TCTCCTGCCTCAGCCTGCCAACTAGCTGGATTACAGGCGTGTGCC
ACCACGCCTGCTAA
TTTTGTATTTTAGTAGAGATGGGGTTCTCCCTGTTGGTCAGGCTA
GTCTCGAACTCC
CGAGCTCAGGTGATTGCCACCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGA
TTACAGGCGTGAGCC
ACCACGCCCGGCCTGACCCATTCAATTCTACAACAAACCCATTGAG
GTCGGTTCTAGTCC
CCATTTACTAAACGAAGAAACTGAGGTACACAACTAGAAAGCTACA
GAACTAGGATTG
TACCCACATCTATCAGACTCCAGAGCCCACATACTTAACCATCCTGC
TACCAACAGCAGC
CAGGCCAGAGTCTGGCTACCCAAAGCTCTCCACAAGCCCCAAC
TGCTGGGAAACAGAT
TTGATATCTATCCTAAAGTATGGAGGTGTCATGGTGGGACTGAGG
ACTGGGCTGCTGG
AGACCTCCCCCAGATCTGCCGCTGACCCACTGCGTGATCCTGGG
CCTGTGTCTACCCCT
CTCTGAGCCCAGTTCACCCCTGTTCACTGATACAATCAGCAAAC
TTAAGAAGACTCT
TAGCCAAGATATTCTAGGATTCTGGGAATGGCAGCTCTCCTACGTC
TAAATGGCTAAC
CCAGAGGCGATCAGGCTCTCAAAGCCCCAGGGCAAGGCTGGGGT
CTCATTCTCTCTT
AATCCCTGTGTCTAGCACTTCAGCAGGCCATAGTAGATATTCAAGA
AATGTGGGTTGGC
TGAATAAACACTTCATCTCTTTCAGAACTGCATGACAGCTGCTCTC
CTGGGCCTTGTG
GGGCTTGGATTCTCAGTTCTGCCACCTCTATCTAGCTGGCTCT
CCTGACTGCCCTCC
TCCCTGGCCAGTGGCAGAGCCTGCCAGGGCTGGCAGCAGGTCTA
AGCCTCTGTGCGAAG
ACCCACAGCCTCTGGAATCCTCAGCATAGTACAACCTGCAGGGGTG
GGGGGTGGCACATG
AAGCTCATAGCCCCCTGGTAGCAGTGCTCAGGGCCAACTTCAG
TTACTCCCAGTTG

GGGATGTTGCCCTCCATGGGAGGAGATACTTCATATTAAATCTGAA
ACACTTCTTATCC
TTCACTGTCCCCTCTCCATGAAACCACCCCTGACTCAGAGACACA
GTCCCTCTGACAGC
ACCTGGTCCACCCCTCTACTCTGGCAGCCCGGTGGTGATTATTTG
TTTTCCCTCACCA
CATAACCTGCTGGAAGGCAGGGACTCCACTTCAGAAATCTGGAAA
ACCCTGTGGCCCAC
AAGGGTTGAGCTCATATTCCCATCTGGTGAGGTGCAGAAGGCACA
GAGCTGTGCCAGGA
CATCTCGTTCCAACCCAGCCCCACTCCTAATAGTAATAAAAGTAGCT
ACATGTTTACTGT
GCAGCTACTTGGTGCCAGACACCTACCTTATCCCTATCAATAATCTC
CACAGCCTTGCAA
GTTAGAGATATCATGCCTATTTGTAGATTATGAAATGAACACTGAAA
GGTCAATTACTT
TGCCCCAAATTACACAGCAGAGCATAGACCAAAACCTGGGACTGTCT
GACCCTGAAACATG
GATCTTCTGCACCGCCCTATACTCTGCGTCCCAGCAAAGCTAACCT
GTCTGATGTGGTT
GGGCAGAGGTGCTGGACCTCCTGGCGGCTCGCTCCTGTCTCAGT
GTGGTAATGTCACAG
GCATTTAAATTGTGGTTGCAAGCTCGCTTGATTGGGAGAAGTGCC
CTCCCAGTCTGTG
AAATTCTCCAAACTCTAAGGGCCTTTGCAAAGCAAAGCAAAACCCACCC
TGCATTTGGCTCT
GCCAATATGTGATTCAAGGGGTCTTCCACTCACAGAATGGAGT
GGGAAACTCCACTT
ATTAAGTACCTCTTACAATGGAATGACTCTATGGTAGGTATCAGGG
CACTGAAATAGA
AGCCAGGAGCTGCAGGGTCAGTTATAGCTCTGTATGTCACTCACT
GTGATCTCCAAAAG
TCCCGTTGCCTCTTATACCCATTTCACATTAAAGTGTAAAGGAT
TAAACAGGATTG
GCAATTTCAAGCTTTAATATTTCAGCACTGACAGCCGTTCTCAA
ATCAAATCTGTC
TCTGAATCTAAAATTCAAAAACAGATCAAAGTGGACTGCTGTAGTG
AGACTGTTCCCTT
TACTCTAACCCCTGCCCGGTCTCAGGCTCCTAGGCAGTCCTGCC
AGGGTTCTGCTAA
GCAGGGAGCCAGTTGTTCCCTCAGCCTCCTAAAGCGATGGGGAGT
TGAGGCCAGTGGAAAT

GCAGCTTGGATT CAGAAGCCAGAAAACAACAGAGATTGTTGTGG
GAAGTGAGTCAGAG
AGATTAGACCTCTCTCAACATCTGACTAGACTCTAGAACATGGCATTAA
GCAAGTCACTGA
ACCGCTCAGAGCCTCTGTTCTTACTAAAGTTAGGACAATTCTGCAATGAAATG
AGATACTACTACCAAGTACTTCAGTGCTGTGCCAGCACAGAACGAA
TACACTCAGTATG
TTTTCTTTGTTCTGTCTCTCCAG**CACCCAAAGCAGAAACA**
GTATGGGCAGAGAG
ACGCCTACTGAATCAG GTGTTATCAGTATTATGAAATACAGTATATA
AAACCCAGCATT
TGGAGTCCAGAACAAATTCAAATTCTGGCTCAGTCACTAAGTAGCTA
TGTGGTCTTGGC
AACTGGCTTACATTTGTAATTCTCTCAATATGCAAAATATTCTCTC
GGCCAGGTGCG
GTGGCTCACGCCCTGTAATCCCAGCAGTTGGAGGCAGAGGCGGG
CGGATCACTTGAAGT
CAGGAGTTGAGACCAGCCTGGCCAACATGGCGAAACCCGTCTCT
ACTAAAAATACAAA
AATTAGCCAAGCATGGTCATGCATGCCTGTAGTCCCATCTATTGGG
AGGCTGAGGCAGG
AGAACACTGAACCCAGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGAT
CGAACCACTGCAC
CAGCTGGGTGACAGAGCCAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAGAAAAGG
AAAAAAACTCCTGGCAGACATGAGAGCAAAATCGAGTACGAAATG
GGCAGCTGGGACCT
CATATCTACTGAATAATTGTCTGTTGGAGGTTGAGACATGACTGG
GAGGCCTGGCCTG
CCCCGTGTTAGGTGATGGGCTGGCCCACCCAGGGGTGTCAG
CAGGGCTGGCCCCCTG
TGTGACTTGTGATAACCCACCCCTACCAAGG**AGGAAGACTGGATAA**
AATGGGCCCCCTGAG
ATGGCTGAAGGCAGCTAAAGGGCCTAAGAGACTATGGGAGAA
GGGCAGCCAGTCCCTA
GGCAGCCCTGCCCACTGTTCTGATAAGCAGGAGGCAGTTGTC
CCTCAGCCTCCTGAA
AGCAATGAGGAGTTGAGGCCACGGGAATGCAGCTTGGATTCCA
GAAGCCAAGGACCTGT
TACAAAGGTGGTTCTGGGAAGCAAATTAGAGGGATTAGACCTG
GCTTCGACATCTGAC

**TTGACTCCAACCTACCAAAGGATCTCCCAGTTCACCTGGGAGTTA
ACACACCAGGGTTCT**
AGTCCTTGTGCGCTGTGGCTTGGTAAGTCCTGCCCTCT
CTGGACCTTGAGGT
CCCATTACAAAAAGCAGTTGGACTCAGGCCTGCCAGCCCCAT
TTTGTGGCTCTTC
CCCGCCCCCTCCCCATCCTTGGCTATGGGATAGTCTCCCAGGCACC
TCCAAAAGGAAGTG
TCTAAAACAGAGCTCTCC**ACCTCCTCTCCAAGCCCAGCTCCCCACT**
GCCCTCTCCTGCC
CTGTCCCTGTCTCCGCTGCCCTTAGATCAGGCAGGCAGGCAGGC
CTAGAGCATCCGCC
TGAGACACTGCCTGTTGGCTGCCTTAAGACGCCCTCCTCTTG
CCCGCAGCCTCCCC
AGCCTCTGCATT CCTCTGCTCCTGTCTGCTCTGCTCAGCCTGCAG
GATTGATCTTCCA
AAGCCAGGTGTCAACCAGGCCACTAACCTACCCACTGCTCAGAA
ATCTTCCCACAGCCT
CAGCCTGGCCCCCTTTATCCATCCCCTCCATACACACTTGCTCA
GCTCCTCAAAACAG
TCCACAGCCATCCTCCTCCCCACCTTGCCCTTCTCCCTCCT
AAGGAAATATTGG
CCCCCTCTCCACCAGGCTGAACCCACTCATCCTGCAAAACCA
AGTTCAACGCCCTGT
CATTTCTTTTTTTTTTTTGAGATGGAGTCTCACACTGTCGC
CCAGGCTAGAGT
GCAATGGGTGCACTCTCGGCTACTGCAACCTCTGCCTCTAGGT
TCAATCGATTCTTCT
GCCTCAGCCTCCAGAGGAACTCTGACTACAG GTGCACACCAC
ACCCAGCTAATTTT
GTATTTTATTTTATTTCTATTATTATTATTGTGAGATGGAGTTCT
CTCTTGTG
CCCATGCTGGAGTGCAATGGCACGATCTCGGCTCATTGCAACCTCC
GCCTCCCAAGTTCA
AAGGATTCTCCTATCTCAGCTCTGAAGTAGCTGGGATTACAGGCAT
GTGCCACCACACC
CGGCTAATTTTTTTATTTTAGTAGAGATGGGTTTACCATGTTG
GTCAGGCTGGTC
TCAAACCTGACCTCAAGTGATCCACCCACCTCGGCCTCCAAAG
TGCTGGGATTACAG
GCGTGAGCCACCGTGCCTGGCTAATTTGTATTTAGTAGAGAC
GGAGTTTACCCAC

ATGGCCAGCCTGGTCTAAACTCCAGACCTCAAGTGATCCACCCG
CCTCAGCCTCCCAA
AGTGCAGGGTTACAGGTGTGAGCCACTACGCCTGGCGCCTGTCT
TCTTCTAATATGCCT
CTTCTGACCTCCTCACTCCCATTGGAGCCATGGCTCACTTCTGGTC
AGGCTCCATGCACT
CAATCAGCCCTGCCAGGACTGTAGTGCCCACTTGATGAGAAA
TCACCTGTGAAAAT
GCCAGGCATGGTCTGGCACACAGTAGGTGCTCAAGAAACAAATGTT
AATGCCCCAGCTTC
CTTCTGTCTTGTGCCACTAATTGGCATTGGAGCATATTTGTAC
TTCACGTAATTA
AATTTACTGTGTGCCAAGGTCAAGTGTGACAGAGCACTGTAGG
GGAGGCAAAATGA
ACCAACTCTGGACCTGCCCTGCAGAACGCTCTGTCTACTGGCATGA
GGTAAGACAGGTCC
ACAGATAACTACATAAGAGAGACTGCAATCTGGACAAGACAGCCTC
AGTGGGAGAGGGA
AGGAGAACCTGTAGATTGGTAGCGGGGAGGCTGTGGGAGAG
CACAGCCTTCAGGTA
AAGGGACAAGGTTAGGAAAGCAAGAACGGTAGCTTGCTCGTG
GAGCCCAGGAAACTC
CTTGGGCTAGAAAAGATTGGTGGCACTCTACAGTGTATGTGTCT
GTCTGTCTATCTA
ACATGAATGGTACTATTTCTCCTATTGGTGTGCATTGTACCTAACAA
AAAATCCATGTC
CCAAGTACTTTCTCTTCTTTCTTCTTTCTTTTTGGAAATGAAGT
CTTGCTCTGTC
GCCAGGCTGGAGTGAAGTGGCGCTATCTGGCTACTGCAACCT
CCTCCTCCTGGATT
AAGCAGTTCTCCTGCCTCAGCCTCCCCAGTAGCTGGATTACAGGC
ACGCACCACACGC
CCAGCTAATTTTTGTATTTAGTAGAGGTGGGGTTAACTGTGT
TGGCCAGGCTGG
TCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGATCTGCCATCTCAGCCTCCCAA
AGTGCAGGATTAT
AGGTGTGAGCCGCCATGCCCGGCCAACAGTACTTTCTAGAGGT
AGAATTGCAGGGGA
TTTTCTCTTTGCTTATCTGCACCTTCTAAAGTTCTGCCATGAA
CACGGGCATTT
TTGTGGAATAAACAAAGTTAAATGTTGGCTAGATCAGTGCTTCTTA
TGCATAAGGAAG

GATTAGTTCTTTTTCTATTCCAATTATTGATTCTTGATAAAATG
CAATGCAATA
AAATTATTATTTTTTAGAGAGACGTCTCCCTCTCACCCAGGCTGG
AGTCAGTGGTG
CAATCATAGCTTACTGCAACCTGAACTCCTGGGCTCAAGCGATCCT
CTTGCTTAGCCT
CCTGAGTAGCTGGGACTACAGGTGTGGACCACACACTGGCTGA
TTTTAAACTTTTG
TAGATACAGGGTCTGCCATGTTGCCAGGCTGGTCTCGAACTCTT
GGGCTCAAGCCATC
CTGCCACCTCAGCCTCCCAAAGTGCCGGATTACAGGCGTGAGCC
ACCATGCCAGCTAG
AAAATTACTTTTGCTAGGCACCGTGGCTCACGCCTGTAATCCCG
GCACTTGAGGAGG
CTGAGGCAGGCAGATTGCTTGAGCCCAGGAGTTCGAGACCACCT
GGGAAGCATGGCAAG
ACCTCCATCTCTACAAAAAATTGAAATTAGCTGGATGTTGTGGTG
CACACCTGCAGTC
CCAGCTACTTGGGAGGCTGAGTTGGAGAACAGTTGAGCCCCGGG
AGGTCAAGGCTGCAG
TGAGTCGAGATTGCACCACTGCACTCCAGCCTGGCGACAGAGAC
CCTGTGTGAAAAAAA
AAAAAAGAAGAGAATTTTTAAACAGTCATTGCTTGCTCAGATGTT
TACTTTAAAGA
TAATAATGAACAAGAAGCAGTCACATAAAATACAAGCCCCAAATTTATA
TCATTAGATT
TGATTGTCATGAAAGTTCTAAAGACTTACTTCATTCTCAACTTAC
CTTGTGACCAG
CAGGGATTGGTGAACCATGCTGTGAGTAGCATTGGCTAGAGAGAG
GGGAGGCAGGAATC
TAGAAGAGCTGTTTCCAGATGTGACCATCTCCTGAGGACAGGGAC
CATGTCTCATGTGC
CACCCATCACCCCCCACAG**ACAGAGCCTGCAGCCAATGCCAG**
GAGCCCTCGGTTCAA
CCAACTGATGCCCTGTGCCACTGGCCCACGCCATGCAGCCCC
AGTCCGTTCTGCACAG
CGGCTACTCCACCCACTACTTCGGGCCTGGCAGACAGCCACCAC
CACCCCTCAATGCCTC
CAACCTCATCTACCCCATCTTGTACGTGAGTCTCCAAGAATGGG
CCAGGCCTCTGCTC
TGCTGGTTGGGTTGGGGTGGGAGGGAGTGTGACTGGAGCG
GGCATCAGTATGGCTG

GGGGTGGCAAAGTGAGCTGTCAGCTGAAATTCAAGGCAGTGGA
AGCAGGCTACTTGGAT
TAAGGACAGGAATCTTAGGAACAAAACAAACTTGAAAGAACTCA
TTCATCCCATTGGA
AAATTAGAAGAATAACCCTGCCATCCTGAGCTCTGCAGTA
AGACAGAAGCTGAG
AAGGTGCTCTGTACATTGTAAGTGCTATGTACCTGTAAGAGATGGC
AGTCATTGAGGCT
GGGCACGGTGGCTACGCCCTGTAATCCCAGCAGCTTGGGAGGCTG
AGGCAGGGCGATCAC
GAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCTGGCTAATATGGTAAACCCCTG
TCTCTACTAAAAAC
ACAAAGAAATTAGCCAGGCGTGGTGGCGGGTGCCCTGAGTCCCAG
CTACTTGGGAGGCTG
AGGCAGGAGAAATGGCGTGAACCCGGGAGGCAGCTGCAGTGA
GCCGAGATTGCACCAC
TTCACTCCAGCCTGGCGACGGAGCCAGACTCCATCTCAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAGA
GATGGCAATCGTATTGTTAATAATAATGCAGACATTACTGAGTACT
TACTATCTACCA
GGTACTATGCTAACGACCTACACACATTATCTCATTCAATTCTGAGAG
CATTGTATGAA
GAAGGGAGTAGCTATCCTCTAGAACATCAGCTCCATGAGGGCAGGGA
TGTGTTGTCTATTTT
GTTCACTGTTGATCATCAGGGCTAGAACAGTACTTGGCACATAAT
AAGTACTCAATAA
ATATTGTTGAATGAATG**ATTAACCACGCATGATATAGATGAAGGC**
CTAAGGCTCAAAG
AGATGATAGAACTGGCACGGTCACCCAGGCAGTAAGTGGCTGG
GATAGAAAGCAAGGA
CCTGCCAAATTCAAGGTCCAAGTTCTAACCACTTAATTCCCTCCT
GTAATTACCGTTCT
TTTAGTACAGTTGCTAGTGTGCACTGTTATTCTGTTGTCCTATT
ATTATTCAGGC
CCTGGGCTTGGCCAGGCAGGGAAAGCCAGACACTGGATCCCATCC
TCCTCCCCACCATCTCC
ACTTCCATATTCTTCCCTGCTTCCCAACCATCCCTCTCAGTCGCC
CCGCACCACTGGC
CCTCCCCACAGCTACCAATCCATATCCCACCCCGCTTGCAGG
GATGTTCTGATGAC
ATACAGCCTATCACCCAGCCTCCAGGAGTGGCCAG GTAGGAGACG
TGGAGTTGGGGGCC

AGCGGGTGGTGGAGGGAGAGATTCCACAGGTGGAAGTGCTGGGA
GGCAGAACGACACCA
GGAAGTAGAAGATGCGGACAGACAGACATTAGCTCAGTAGAGGAAA
GGGTTCCCCGGGG
CCAGAGCTGTTCCACAGTGGAGGGCAGCCCCATAAAGTAAAGA
GCTACCCATCACCCG
AGACGTCGTGGCAGAGGCTGTTGCAGAAGGGAGCTGAACGCAGA
TGGGAGTTCAAAAAG
AGGGCCTCGAAGGAGCCTCCACAGCCGAATTCCGGAGCTCTGCT
ACTCAGGGCCTCAGT
CTTCCCTCCTATTAGTGGATGCATCCCTGCCCTTCTGTCCTGGGG
GCTTGAGCCCTCC
TGGTGCCATATGCAGCTGGTTCTAACAGAGGCACACAGTGTGGT
GGGGTCCGGAGGAC
CGTTGCCTGGGACCTGCCTCCTCAACCCCTCTACCCACACCCAC
ACAG**GTATGGTGTG**
AAGCGGCTGGAAGAGATGCTGAGGCCCTGGTGGAAAGAGGCC
ACGCTGTGCTTGATC
TTTGGCGTCCCCAGCAGAGTTCCAAGGTGAAGAATCAAAGGAAG
GGCTAAGAAGGGAGG
TTGCGCTCACGCCGTAATCCCAGCACTTGGGAGGCCAAAGTGG
GTGGATCACTTGAGC
CCAGGATTTGAGACCAGCCTGGACAACATGGCAAAACCCATCTCT
ACAAAAAAATACAAA
AGTTAGCTGGGTGTGGGGTATGTGCCTGTAGTCCCAGCTACTCGG
GAGGTGGAGAGGTG
GGAGGATTGCTTGAGCCCAGAAAGTCGAGGCTGCAGTGAGCCAAA
ATCGCGCCAGTGCAC
TCTAGCCTGGGTGACAGAGCAAGACCCCTGTCTCCAATACAAACAGA
AAAAGGAAGGGAGG
TTGGGCAAAGGTGGACTGAGGGTCCACACTGACTGCACCCTCACT
CCCACATTGTGCTGG
CCCTGGGCCACAGGTGAATGGACGTGGCTTGCCTTAAGTCA
GCACCCATGTAGGGT
CAGTCCTCTGTGCTCCTTATCCAGGGCTGTGATGATGAAGGAAG
GAGAAGGCCAGGGC
TATGCTCTGTGATGGCTGTACCTGCCTCAAAGCTACATGTAATA
GACACACTGCTT
TGTCCCTCCCCCTGCCCTAG**GACGAGCGGGTCCGCAGCTGACT**
CCGAGGAGTCCCCAG
CTATTGAGGCAATCCATCTGTTGAGGAAGACCTCCCCAACCTCCT
GGTGGCCTGTGATG

TCTGCCTGTGCCCTACACCTCCATGGTCAGTCGGTGAGTTCC
CTCCCTCCCACCAGC
CCTGCTGCCACCCACACTCCTACTGCCCACTTCTCAACAGGGTGG
GGACAGGCCAGGGCC
CAAGGTGCTCCCCAAAACCCAGTCATCTGTCTGAAGGGCTCCTG
AGTAAAACGGAGCA
TTCCGGGCTGAGGAGAGGCCAGCGGCTGGCTGAGGTGGCATT
GGCGTATGCCAAGGCA
GGTGAGTGAACCACCAGCAGGGATGGGCACCTCTGGGTAGGAG
GTGGCAGAGTGGCTAG
GAGGGCCCCAGAGTTCTGAAGGCCACCCTCTGCCCCCAG**GATGT**
CAGGTGGTAGCCCCG
TCGGACATGATGGATGGACGCGTGGAAAGCCATCAAAGAGGCCCT
GATGGCACATGGACTT
GGCAACAGG GTAAAGGGCAGGGATGCAGCACAGGGCTGGCAGGA
GATAGTCTGCACCAGC
CCTGCCCCCGTGTCTGCTAAGAACATCACAGAACTGCCGGCGTGT
GGCTCACACCTGTAG
TCCCAGCACTTGGGAGGCTGAGGCAGGTAGATCACTTGAGGTCA
GGGGTTCAAGACCAG
CCTGGCCAACATGGTAAACCCATCTCTACTAAAAACACAAAAATT
AGCTGGCGTGGT
GGCAGGCGCCTGTAATCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCAGGA
GAATCGCTGAACCCA
CGAGGCAGTGAGCTGAGATCATGCCACTGCACCTCAGCCTGGATG
ACAGAGCTAGACTCC
ATCTAAAAAAAAAGAACATCACAGAACTGAAGACAGTGCTGGATGA
GGCTTGGGAAAC
CATTAAACCTCTGGCCTCTGCAGGGAAATCAAGCCCAGCACTCC
AACAGGACCAGAAC
ACAGGCAGTCTCCTTCCCAGCCTAGGTTCTCTCCCTGCCACA
TCACCCCTGGGATAC
CTGGCAAGGGCCGAATAAGCCAAGACCTCCATTGTCTCCCCATAG**G**
TATCGGTGATGAGC
TACAGTGCAAATTGCTTCTGTTCTATGGCCCTTCCGGT GAG
CAGGGTGGGCAGG
GGTCTGCTGTGAATCCCTGGCCCTTGGCCCAAAGCTGGAGCCA
CCCTGATGACTCTGC
TTTGCAG**GGATGCAGCTAAGTCAAGCCCAGCTTGGGACGCC**
GCTGCTACCGAGCTGC
CCCCCTGGAGCACGAGGCCCTGGCTCTCCGAGCTGTG GTGAGTGAC
TAGGACTTGAGCCCCA

CCCTCAGCCCCCTCCTAGGCACCACCCACATTATACCCTCATCCCTT
AG**GACCGGGATGT**
ACGGGAAGGAGCTGACATGCTCATGGTGAAGCCGGGAATGCCCT
ACCTGGACATCGTCG
GGAGGTAAAGGACAAG GTGAGCACAGGTACGAGGCAAAGGGGGC
TCAGGGGGCTGGGACA
GAGTTTCCACAGACTCTGGAATCTCAGAGTTGGAAGCAGTTGCC
CTTAAGCATGCATC
CTCTCCTCCCCTTCCCTGCCAGGAACCATCGTGGCCTTATGTC
GGGGCTTGCACGAG
CCTCAAACAGCCCTGCTTAACAGTTCAAGAGTGGGCCAGGCTGCC
AGCCGCAGTAACCC
AGGACACGGGGCTCAAGATGGTCACAGATTGAGCAGGGGGAAAG
GGACGCTTCCAGAGCC
ACATCCACCCCTCCATTCAGCCTGCTCCCTGTCTGCTTCCCTGCA
GCACCCCTGACCTCC
CTCTGCCGTGTACACGTCTCTGGAGAGTTGCCATGCTGTGGC
ATGGAGCCCAGGGCG
GGGCATTTGATCTCAAGGCTGCCGTACTGGAGGCCATGACTGCCT
TCCGCAGAGCAG GTA
GGCAGGCAAGGGGGGGGTTTGACCTGCGCCACAGGGACTGAT
AAGCACTCTGCCTAG
ATTGGGAAACGACGTCTGAGAGCTTGGGATCTTATTCCGGGAATT
ACTAGTGATCTAAA
CAGACACACACTGAGGAAGAGATATGGAACACTGCAGCATAGAACACG
GCCCGGTGAAGCAA
GCAGAGCCCTCATTTGGTTGTGAGAACGTGGCAAGCCACTTC
TCTGAACCTCAGTG
TCCTCACCCATAACTGGATAACTGGGATAAGATAACCTGGTGCCTG
GTTGTCCTGAGGAT
TAAATGAAGTAATATCACTCCATAAAGGGACTCATTGTTAGAATT
GCACACCAGCAT
GGGAAGGAACCTGCCTCTTACCTATTCCTACTGTGCATTATT
TTTGGTAAACTG
AGGCCCCAAAAGAGGAAATGACTTGCCTAACAGAAATAGAGTTCCA
AAGCTGGGCTCCGT
CTCATGTGGTGTGCCACAGGCTGTGCTTCTCATGGTAGCCTTCT
TCCCCGCCTGGCCT
TCCCATCGAGAAGGTGTGCTCAGAGCTGATCAGCGTCCCCCAG
CAACTTCTGCATCT
CTCCCAACACAG**GTGCTGACATCATCACCTACTACACACCGCA**
GCTGCTGCAGTGGC

TGAAGGAGGAATGATGGAGACAGTGCCAGGCCAAGAACTAGAA
CTTAAAACGTTCCCG
GGGCCTCAGACAAGTGAAAACCAAAGTAAATGCTGCTTTAGAAC
TGTGCCCTCATGCC
TCTTCCTGCTCACATGCTAGCGGGGCCAGCAGCCCTGGTGGTT
TTGCCAGCATGCTAA
CTCTTGTAACTCGCAGCTGCATCCTATGAGCTCTCCAAGCTTCCC
CGCCCCCTCCCCTGG
GTCAGCCGTGAGGCCACCTTGCCACCCCTAGCTCTTCCCTCTG
GTGGCTTCAGCTT
GAAAGCAACCTGGAGTCGGGGCACAGCCTTGGGCCTGGCTG
GGAGAGGGTCTGGAG
CATTAGGGGAAGAAGAGAGCAGTGGATCTGGGCCTGAGAAG
CCTTGGAACGCTTCTG
GCAGCAGAGCTGGGTGTGGAATGAGGCCTAGATCGATATCCCTG
GGTTAGAGTTGAAAT
TTGCCGCAATTCCACTGGAAGGCATTCCCACGAGGCCAGAGGTT
GCCAGGCTGCCTGAG
GTCTCCTATTCTACTCTGAACCATAAACCCAGAGAAGAATTACTCA
TTAACCAAGCATAAA
TACTGCCTGAGGATCAAAACTCAGAGGCAAAGAGGGAGTTCTG
ACTGCTAGAGGTGCCA
CCACCAACAAACACTTTTATTCAAGGAGATACTTTGAGAATCTCTG
CTCTGTTCTTAGG
TTCAGTGCTGGTCCTGGGAATACAGCAGGACAGACCTCAGCTTA
TCTCTCATAGAAAT
TATACAAAGAGAATTGGGGAGACAGCTAAGAAGAAAACAAGAAA
TAAAGCAGTTACAAA
TTGTGATAAGTGCTTGAAGGAAAGAAGGGTCTGAGACAACAAAC
AGGGAAAGGGGCCTCT
CTTGAACACAGTAGTTGGGAAGGAGGCAGACATGCACCAAGTGATGT
GGTGACAGGTGCTCT
GAAGGAGGTCACCAAGGACCTGACCTCTTGAAGGATCAGAAAATA
CTTCCCTGAAGGACT
GACATTGAGCCTAGACCTGAAGGGTGAGCCATCAAGCTAAGACA
ATTGGGAAAGAGCAT
TCCAGGGAGAGGGAGGAGTTGTGCAAAGGCCCTGGGCTCCTC
TAGCTGGAGGAATGCA
AGGCTAGCTTGTCTGGAGCAGACTGAGAGGATGGCCTGAAGT
GGAGAGAGACAGACCA
GGACCAAACCATGCAGAGGTCAAGGGCACATTCACCTTCAGA
GTGACTCAATCAAAT

TTGTAGTTGTAAGTATTTAACAGCTCTGC GG CAA AGTGCAAA
TGAAAAGTCTTGAT
GGCATGGACTGGAGCGGGGACAGTGGGGATGGAGAAAGGGAA
TGGATTGTGGATGTGTT
TAGAAGGTAGATTGATGTGAAGGATGAATCTGGCTTGACCTCTG
GGTGGCTGATGGGC
CATTACTGAGATGGGGCAGCCTGGAAGAGGAACAGAACAGCAGGG
TCGGGGTGGAGGGAGA
ATACTAAACTTAGCTTGAGACATTGCAATAAGGAAGCTATATCTA
GAGTGCTTATGTG
ACTCACCTAACGCCACTCAACAAGTTGTGGCAGAACTGGATTAG
AACTGCACAGAAAAC
AGCCAAGCTGGATTGAAACCCATGTAGTCCAACCTCAAGGCCTC
TGCCCCCTAACCACTG
TGCCATACCACCTCCCATAATCAACAGCAAATTAGGTCTAAC
AATGTTTATAGAC
ACCCCTCCATTATGTGATGGGTTGCATCCTGATAAACCCATCATA
AGTTGAAAATATG
ATCATAAGTTGAAAATATGATCATAAGTCAAAAATGTATTAATATAC
CTAACCTACCAA
ACATCATAGCTTAGCCTAGCCTGCCTTAAACATGCTCAGAACACTT
ACATTAGCCTACAG
TGGGCAAAACTATCCAACACACAAATCTATATTGTAATAAGTTGAA
AGAATTGGATA
AAAATTCAATATTCGAA GTACAGTTCTACTGAATGTCTGTTCTA
CTGTTGAAAGT
CAAAAATTGTGAATTGAATGATCACAGTTGGGGACCATCTGCAATT
AGCCCCAGTTATA
CGGGGAGACCAAGGAGACCAGGCACCTACTTGGTTGCAAGTGATG
GAAATCCAGTTCAAT
AGCAAAGAAGGACATGATTGGTTCTAAACTGGATTGAGATAAGGA
CAGGTGTGGTTGG

GCCCAGGGTCAAACCCATGGAGGTCTCTGCCCTTCTAACTCTC
GTCTGTGTTGCC
CAGCTTATACTCAGGTGGGTTTGCCACTGCCAGAACATGATC
CTCAATAATTCTA
GGCTTAAATAGTCGTTAAGATTGTAATCCCAGAGAAAGAGCCTTCC
TGTCCCCTCACTC
ACATAGCAAATCTCTGGAGGTCTCTGATTGGGCCTGTTCAGGCCAC
ATGGTCCACTCTG
GCTCAGTCACTGTAACAAATGGGATGGGAGATGGCGCCACAATTGA
CCAGGTAGGCCTCA
TTACACAGAACGCTGTCTGGACTGAGCTTTGCACCAGTGGCCTC
CTTGGCTTCCAATG CTTTCCCCCTAAATCTA

Note : Red for exon area; black for intron area.



Genetika Molekuler dan Aplikasinya

DAFTAR PUSTAKA

- Barril, Patricia and Silvia Nates. 2012. *Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities*. Argentina: Instituto de Virología, Universidad Nacional de Córdoba.
- Chen, Hong, Murugesan Rangasamy, Sek Yee Tan, Haichuan Wang, Blair D. Siegfrie. 2010. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *PLoS ONE*, 5 (8): e11963.
- Dell'Anno, A, M. Fabiano, G. C. A. Duineveld, A. Kok and R. Danovaro. 1998. Nucleic Acid (DNA, RNA) Quantification and RNA/DNA Ratio Determination in Marine Sediments: Comparison of Spectrophotometric, Fluorometric and High Performance Liquid Chromatography Methods and Estimation of Detrital DNA. *Applied Environmental Microbiology*, 64 (9): 3238-3245.
- Fan, Hongxin and Margaret L. Gulley. 2001. *DNA Extraction from Fresh or Frozen Tissues*. New York: Humana Press.
- Lewis, M. 2011. *Agarose Gel Electrophoresis (Basic Method)*. Biological Protocols. England: University of Liverpool.
- McConaughy, B. L., C. D. Laird, and B. J. McCarthy. 1969. Nucleic Acid Reassociation in Formamide. *Cell Biology*, 8 (8): 3289-3294.
- McPherson, Michael J. and Simon Geir Møller. 2006. *PCR Second Edition*. New York: Taylor & Francis Group.
- Mohammadi, Godratollah, and Adel Saberivand. 2009. Simple Method to Extract DNA from Mammalian Whole Blood. *Medwell Journals. Journal of Molecular Genetics*, 1 (1): 7-10.
- Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit. 2010. *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*. Madison, WI: Promega Corporation.
- Roche. 2007. *Nucleic Acid Isolation and Purification*. Germany: Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science.
- Sharpe, Nadine. 2005. *Recipes for Buffers and Other Laboratory Solutions Used in Electrophoresis, PCR and DNA Extraction*. Canada: Department of Biology, Queen's University.

- Surzycki, Stefan. 2003. *Human Molecular Biology*. United Kingdom: Blackwell Science Publishing Company.
- Yilmaz, Muhittin, Cem Ozic, and İlhami Gok. 2012. *Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis*. Turkey: University of Kafkas, Department of Biology, Faculty of Sciences, Kars.
- Zumbo, P. 2013. *Ethanol Precipitation*. USA: Weill Cornell Medical College
- Panigoran Sihombing, Pembelajaran Genetika pada Pokok Pembelahan Sel, Materi Genetika Sintesis Protein dan Rekayasa Genetika dengan Menggunakan Animasi komputer, *Jurnal Pendidikan Matematika dan Sains*, Vol 2, No 2, 2007, h.42-47
- Adji Dovan Tri Rahmawan dan Sukarmin, Pengaruh Penerapan Media Animasi Terhadap Pergeseran Konsep Siswa pada ke Tiga Level Representatif Kimia (Makroskopis, Submakroskopis, dan Simbolik) pada Materi Poko Larutan Penyangga untuk Siswa Kelas X1 SMAN 1 Kertasono Nganjuk, Vol.2, 2013, h. 96
- Chris Adhiyanto, Yasuhiro Yamashiro, Yukio Hattori, et al. A New β 0-Thalassemia Mutation (codon 102, AAC>ATCAC) in Coexistence with a Heterozygous P4.2 Nippon Gene. *Hemoglobin*, vol. 37, pp 227 -240, Apr 2013.
- Richard J Simpson. Preparation of cellular and subcellular extracts, in. *Basic Methods in Protein Purification and analysis*, Ed. RJ Simpson. Cold Spring Harbor Lab Press. 2008, pp 38.
- Chris Adhiyanto. Severe phenotype of a new mutant of α -thalassemia complicated with P4.2Nippon may have developed based on the oxidative state of the α -thalassemia. Disertasi. Yamaguchi University. 2013.
- Stefan Surzycki. Laboratory Manual. Human molecular biology. Blackwell Publishing. UK. 2003.
- Siun Chee Tn, Beow Chin Yiap. Review article. DNA, RNA and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol 2009, pp 1-10, Nov 2009.

G-Biosciences, Protein Electrophoresis. www.GBiosciences.com

Tools and reagents form optimal protein extraction. Thermo Scientific.
thermofisher.com/proteinbiology

<http://www.ithanet.eu/ithapedia/index.php/Protocol:Gap-PCR>

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sds-page.html>

https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/course_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html



TENTANG PENULIS

Dr. Rini Puspitaningrum. S.Si, M. Biomed

Lahir pada tahun 1968 di Kota Jakarta. Lulus S1 dari Fakultas Biologi UNAS pada tahun 1993. Kemudian melanjutkan ke pascasarjana Bidang Biomedik & Biologi Molekuler di FKUI. Setelah lulus bekerja mengajar di FMIPA Universitas Negeri Jakarta (UNJ) mulai tahun 2011 hingga sekarang. Pada tahun 2005, melanjutkan pendidikan S3 di bidang yang sama di Biomedik FKUI dan Universitas Liverpool Inggris untuk Program Sandwich like DIKTI tahun 2009. menyelesaikan pendidikannya tersebut pada tahun 2010. Karya ilmiah hasil risetnya di bidang Biokimia dan Biologi Molekuler telah dipublikasikan dalam beberapa jurnal sains nasional maupun internasional. Pada tahun 2011-2012 mengikuti program *Research Postdoc* bidang Proteomic di Universitas JLU Gessen, Jerman menggunakan bantuan pemerintah Indonesia PAR C dan beasiswa DAAD dari pemerintah Jerman. Selain bekerja sebagai staf pengajar di Fakultas MIPA UNJ Jakarta, juga menjadi Koordinator Pusat SAINTEK dan Olahraga di Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) UNJ

Chris Adhiyanto, S.Si., M.Biomed, Ph.D

Lahir di Semarang pada tahun 1969. Lulus S1 dari Fakultas Biologi Unas pada tahun 1994. dan langsung melanjutkan studi ke pascasarjana bidang Biomedik FKUI. Setelah lulus, bekerja sebagai staf dosen kontrak FKUI dari tahun 2000-2004. kemudian pindah ke FKIK UIN Syarif Hidayatullah Jakarta pada tahun 2004 hingga sekarang. Tahun 2008, melanjutkan pendidikan S3 di Yamaguchi University. *Faculty of Medicine and Health Sciences.* program *Medical Technologies.* Selesai pendidikan, kembali bekerja di UIN Syarif Hidayatullah Jakarta sebagai dosen tetap FKIK dan Kepala Laboratorium FKIK. Beberapa hasil penelitian telah dipublikasikan di jurnal internasional.

Solihin, S.Pd

Lahir di Sukabumi, Kabupaten Sukabumi, Jawa Barat. Berasal dari keluarga petani yang berkultur campuran antara abangan dan santri. Namun, beruntung, dapat mengenyam pendidikan formal di MI Cioray, yang cukup kental dengan nilai-nilai keagamaan Islam. Sekolah MTs Al-Ma'arif Bojonggenteng. Kemudian Pada tahun 2009 lulus dari MAN Cibadak yang kini menjadi MAN 1 Sukabumi. Lagi-lagi keberuntungan menaunginya, karena selepas dari MAN 1 diterima di Jurusan Pendidikan Biologi di Fakultas Tarbiyah dan Keguruan UIN Jakarta, melalui jalur PMDK. Semasa perkuliahan S1 ia menekuni menjadi Asisten Praktikum hampir semua mata kuliah Biologi, serta ikut dalam kegiatan UKM di kropsukarelawan dan Pojok Seni Tarbiyah (Postar). Selepas meraih Sarjana Pendidikan Biologi, aktivitas **Solihin** lebih banyak dihabiskan untuk mengajar di Madrasah Aliyah Pondok Modern Assalam. Selama proses mengajar di sekolah tersebut, ia mendapatkan beberapa sertifikat perlombaan dimulai peringkat ke-2 Lomba Media Pembelajaran tingkat kabupaten , peringkat ke-2 LKS tingkat kabupaten, dan peringkat ke-2 Video kreatif Pembelajaran Kurtiles tingkat kabupaten, serta giat dalam membimbing dan penanggung jawab pada kegiatan KIR di sekolah tersebut sehingga meraih penghargaan guru teladan. Saat ini **Solihin** sedang menempuh Magister Pendidikan Biologi di Universitas Negeri Jakarta, serta menekuni dan belajar menjadi Asisten dosen pada bidang Biomolekuler dan di LPPM UNJ.



Buku ini memberikan gambaran yang memudahkan para pembaca memahami konsep dan teori genetika molekuler dan aplikasinya. Penulis mengintegrasikan antara teori dan praktik serta pengalaman risetnya selama beberapa tahun yang dituangkan pada buku ini dimulai dari tingkat paling sederhana sampai pada tingkat lanjut. Buku ini baik digunakan sebagai bahan referensi dalam memahami konsep dan teori Genetika Molekuler. Sajian teori dalam buku ini dapat diaplikasikan ke dalam berbagai bidang, misalnya uji identitas atau marka molekuler, biodiversitas untuk uji kekerabatan, analisis resiko lingkungan, uji makanan, prediksi kapasitas energi seorang atlet, bahkan untuk uji kedokteran kehakiman sehingga sangat representatif digunakan sebagai bahan pembelajaran dalam bidang ilmu pendidikan biologi, ilmu biologi, dan ilmu kesehatan.