



Laporan Praktikum Biologi Molekular

## **PROYEK SAINS: HASIL PROYEK DNA, RNA & PROTEIN**

**Bimo Hadi Permana\***, M. F. M. Hasibuan, N. K. N. Iman, S. A. P. Talitha

Universitas Indonesia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Departemen Biologi

Desember 2024

### **Abstrak**

Isolasi DNA dapat dilakukan pada berbagai jenis makhluk hidup, baik prokariotik seperti bakteri maupun eukariotik seperti hewan dan tumbuhan. Proyek sains ini dilakukan untuk memahami dan mempraktikkan secara langsung tahap-tahap yang dilakukan selama proses isolasi DNA, proses kuantifikasi, amplifikasi, sampai tahap elektroforesis. Kelompok D4 mendapat bagian untuk melakukan isolasi menggunakan metode boiling dengan sampel bakteri gram positif. Hasil kuantifikasi menunjukkan hasil konsentrasi dan kemurnian tidak dapat terbaca. Salah satu faktor penyebab hal ini adalah konsentrasi yang terlalu rendah. Elektroforesis yang telah dilakukan memperlihatkan hasil pita DNA yang sangat samar pada kelima sampel kelas paralel pagi. Pita samar yang terbentuk dapat terjadi akibat beberapa faktor seperti kurangnya sampel yang dimasukkan ke dalam well dan konsentrasi DNA sampel yang terlalu rendah.

Kata kunci: elektroforesis, isolasi, kemurnian, kuantifikasi

## 1. Pendahuluan

Latar belakang pembuatan laporan praktikum proyek sains ini adalah untuk dapat melihat keberadaan DNA, RNA dan protein dalam sel dan untuk menunjukkan serta membahas hasil dan metode yang dilakukan oleh kelompok D4 pada praktikum isolasi DNA, RNA dan protein, kuantifikasi DNA & RNA, hasil qPCR serta hasil elektroforesis DNA, RNA dan protein.

Ekstraksi biomolekul DNA, RNA dan protein, merupakan metode yang paling penting dalam biologi molekular. Hal ini adalah titik awal untuk proses hilir dan pengembangan produk termasuk kit diagnostik, DNA, RNA dan protein dapat diisolasi dari bahan biologis apapun seperti jaringan hidup atau dikonservasi, sel, partikel virus atau sampel lain untuk tujuan analisis atau preparasi (Tan & Yiap, 2009: 1).

Ekstraksi asam deoksiribonukleat (DNA) adalah proses dimana DNA dipisahkan dari protein, membran, dan bahan seluler lainnya yang terkandung dalam sel dimana ia ditemukan. Proses ekstraksi DNA membutuhkan penanganan material biologis yang cermat untuk mencegah kontaminasi sampel dan tertukar. Tabung harus diberi label dengan hati-hati, terutama saat transfer diperlukan. Ekstraksi pada DNA dengan sampel bakteri bisa dengan menggunakan metode penggunaan kit komersial seperti Kit Wizard (Promega), penggunaan kit ini akan dihasilkan fase padatan dari sampel DNA yang akan diisolasi, yaitu bakteri gram negatif (Tan & Yiap, 2009: 4).

Ekstraksi atau isolasi RNA adalah proses untuk memisahkan semua jenis RNA dari sel. Hal ini berguna untuk studi ekspresi gen. Prinsipnya ialah memisahkan RNA dari komponen lain yang berada di dalam sel. RNA bersifat lebih labil dibandingkan dengan

DNA, terutama pada suhu tinggi (di atas 65oC) dan jika terpapar alkali. Selain itu, di dalam sel juga terdapat RNase (endogenous RNase) yang menyebabkan RNA rentan mengalami degradasi, sehingga proses pengisolasian RNA menjadi tidak mudah (Farrel 2010: 45). Proses pengisolasian RNA harus dilakukan pada kondisi dingin dan sangat penting untuk menambahkan inhibitor RNase pada extraction buffer tepat sebelum digunakan. B-mercaptoethanol seringkali digunakan untuk meningkatkan efisiensi pendenaturasian RNase (Farrel 2010: 49). Ekstraksi pada RNA dengan sampel tumbuhan Asteraceae dari spesies *Tridax procumbens* bisa dengan menggunakan metode penggunaan silica technology seperti Kit Qiagen, penggunaan kit ini akan

dihasilkan fase padatan dari sampel RNA yang akan diisolasi setelah melewati membran kolom (Tan & Yiap, 2009: 6).

Ekstraksi protein adalah proses untuk memisahkan sampel protein pada sel. Hal ini berguna untuk mengetahui protein yang berperan dalam sel. Prinsipnya adalah Untuk mempelajari suatu protein secara detail, peneliti harus dapat memisahkannya dari protein lain dalam bentuk murni dan harus memiliki teknik untuk menentukan sifat-sifatnya. Metode klasik untuk memisahkan protein memanfaatkan sifat yang bervariasi dari satu protein ke protein berikutnya, termasuk ukuran, muatan, dan sifat pengikatan. Sumber protein umumnya adalah jaringan atau sel mikroba. Tahapan isolasi protein terdiri dari Ekstraksi dan Presipitasi. Ekstraksi pada protein dengan sampel *E. coli* bisa dengan menggunakan metode penggunaan lisis fisik pada sonikator bertujuan untuk melisiskan membran sel (Tan & Yiap, 2009: 6), penggunaan kit ini akan dihasilkan fase cairan (supernatan) dari sampel protein yang akan diisolasi.

Kuantifikasi adalah proses perhitungan konsentrasi dan kemurnian isolat dengan beberapa metode, metode yang akan dilakukan menggunakan spektrofotometri dan mengukur absorbansi UV. Berdasarkan hasil penelitian Iswahyudi dkk. (2018), nilai rata-rata kemurnian RNA rata-rata sebesar 2 menggunakan spektrofotometer nanodrop, sedangkan hasil penelitian Amanda dan Cartealy (2015) menunjukan bahwa kemurnian RNA rata-rata 2,21 menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Dewanata dan Mushlih (2021), menyatakan bahwa terdapat perbedaan hasil dari pengujian konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan Nanodrop pada sampel DNA (Kusumawati dkk., 2023: 63).

PCR (Polymerase Chain Reaction) ) merupakan metode dasar untuk amplifikasi asam nukleat (DNA dan RNA) di bidang biologi molekuler. Saat ini, PCR merupakan teknik molekuler yang paling banyak digunakan di laboratorium riset karena PCR memiliki kelebihan yakni sangat sensitif dan hanya memerlukan sedikit template untuk mendeteksi dan mengamplifikasi urutan tertentu. Tahap dibagi menjadi 3 tahap utama, yaitu denaturasi (90–95oC), penempelan primer (55–60oC) dan ekstensi (72oC). Praktikum ini mengamplifikasi sampel DNA pada hasil kelompok.

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan biomolekul (RNA, DNA, dan protein) melalui aliran listrik menggunakan matriks gel sebagai tempat migrasinya dan buffer sebagai tempat elektron (arus listrik) mengalir. Prinsip kerja elektroforesis adalah

memisahkan biomolekul berdasarkan muatannya, ukuran fragmennya, dan kerapatan matriks gel; sehingga terdapat perbedaan kecepatan migrasi fragmen pada matriks gel (Sheehan, 2000). Elektroforesis perlu dilakukan untuk menganalisis hasil amplifikasi PCR (polymerase chain reaction), mengetahui ukuran fragmen DNA yang diisolasi, hingga persiapan sekuensing, dll.

Tujuan dari pembuatan laporan praktikum proyek sains ini yaitu mahasiswa mampu memilih alat dan bahan yang sesuai dengan proyek sains, mahasiswa mampu melakukan isolasi, karakterisasi, dan kuantifikasi DNA, RNA, dan protein, mahasiswa mampu menginterpretasikan data molekuler, mahasiswa mampu menyusun proyek sains di bidang biologi molekuler dan mahasiswa mampu menghubungkan proyek sains di bidang biologi molekuler yang dikerjakan dengan konsep dan aplikasi berdasar teknik-teknik dasar dalam biologi molekuler dengan menggunakan sarana laboratorium.

## **2. Alat, Bahan & Metode Praktikum**

### **2.1. Alat, Bahan & Metode Ekstraksi DNA Bakteri Gram Negatif Kit Promega**

Alat-alat untuk metode ekstraksi DNA dengan kit Promega adalah Mesin sentrifugasi dengan rotor untuk tabung 1.5ml, Hotplate, Freezer -20oC, Mikropipet ukuran 1-10ul, Mikropipet ukuran 10-100ul, Mikropipet ukuran 100-1000ul, Heater, Vortex, Water Bath, Timbangan, Mortar, Heatblock, Pisau silet, Jarum ose. Bahan-bahan yang digunakan adalah Kultur bakteri E.coli, Tabung ukuran 1.5ml, Mikrotips ukuran 1-10ul, Mikrotips ukuran 10-100ul, Mikrotips ukuran 100-1000ul, Etanol 96% atau Isopropanol, Etanol 70%, Kloroform, Proteinase K, Buffer TE, Sarung tangan lateks, Plastik limbah, Kit Isolasi DNA.

Metode yang dilakukan untuk ekstraksi DNA bakteri gram negatif dengan kit adalah Tabung ukuran 1.5 ml diisi dengan nuclease free water (NFW) sebanyak 600uL. Kultur bakteri dicuplik sebanyak satu koloni dengan loop steril dan dipindahkan ke dalam tabung ukuran 1,5 mL yang sudah berisi 600 µL NFW. Campuran kemudian divorteks, untuk mendapatkan suspensi keruh sel bakteri dan melisiskan sel, kemudian di sentrifugasi 13.000 rpm, 2 menit. Buang supernatan, dan pelet (endapannya) ditambahkan dengan 600 uL Nuclei Lysis Solution dan di pippeting agar endapan larut,

kemudian inkubasi di suhu 80°C selama 5 menit dan dinginkan di suhu ruang. Tambahkan 3 uL RNase Solution, dicampur (flicker) dan diinkubasi at 37°C selama 30 menit, kemudian didinginkan di suhu ruang. Setelah dingin, tambahkan 200 uL Protein Precipitation Solution, divortex, kemudian diinkubasi di atas es selama 5 menit, dan selanjutnya disentrifugasi 13.000 rpm selama 3 menit. Supernatannya diambil dan dipindahkan ke mikrotube baru, kemudian ditambahkan 600 uL Isopropanol, di campur, selanjutnya disentrifugasi 13.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan menambahkan 500 uL Alkohol 70% dan diaduk, kemudian disentrifugasi 13.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang, pelet dikering-anginkan dengan cara meletakkan mikrotube yang dibuka terbalik di atas tisu, tunggu sampai kering. Pelet dilarutkan kembali dengan menambahkan 30 uL Rehydration Solution (bisa TE/ NFW), simpan suhu 4°C, sampai siap digunakan selanjutnya.

## **2.2. Alat, Bahan & Metode Ekstraksi RNA *Tridax procumbens* dengan Qiagen RNeasy Mini Kit**

Alat-alat untuk metode ekstraksi DNA dengan kit Promega adalah Mesin sentrifugasi dengan rotor untuk tabung 1.5ml atau 2 ml, Heatblock, Freezer -80oC, Mikropipet ukuran 1-10ul, Mikropipet ukuran 10-100ul, Mikropipet ukuran 100-1000ul, Vortex, Cooler box (Dry Ice/ Es Batu halus), Mortar dan pestle (sudah didinginkan terlebih dahulu, Spatula dan Gunting bedah. Bahan-bahan yang digunakan adalah Daun Asteraceae / petal Hibiscus, Tabung Eppendorf ukuran 1.5ml, Mikrotips ukuran 1-10ul, 10-100ul, 100-1000ul, Sarung tangan lateks dan Plastik limbah serta bahan kimia yang digunakan adalah extraction buffer (terdiri dari: 2% CTAB, 2% PVP, 100 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, atau 2 M KCl, 2%  $\beta$  mercaptoethanol (ditambahkan saat akan digunakan, tidak dicampur dengan yang lainnya)), chloroform-isoamylalcohol (24:1), 8 M LiCl atau Isopropanol, etanol 75% dan RNase-free water (NFW).

Sebelum memulai praktikum, bersihkan Meja kerja dan semua bahan yang akan Anda gunakan dengan alkohol 70%. Sebaiknya Gunakan tip dengan filter. Tambahkan etanol 100% ke dalam buffer RPE (volume 1 : 1). Untuk melisiskan sampel Anda, gunakan  $\beta$ -mercaptoethanol atau dithiothreitol 2 M. Untuk  $\beta$ -mercaptoethanol, gunakan

10 µl untuk setiap 1 ml buffer RLT. Untuk dithiothreitol 2 M, gunakan 20 µl untuk setiap 1 ml buffer RLT.

Metode yang dilakukan untuk ekstraksi RNA tumbuhan *Tridax procumbens* dengan kit Qiagen adalah jangan gunakan lebih dari 30 mg jaringan. Jika menggunakan kurang dari 20 mg, tambahkan 300 µl buffer RLT yang telah disiapkan sebelumnya. Jika massa lebih besar dari ini, gunakan 600 µl. Untuk menghancurkan/ homogenasi jaringan gunakan mortar dan alu (pestle) yang sudah didinginkan. Tambahkan 1 volume 600 µl etanol 70 % ke dalam lisat dan homogenkan dengan pipet. Pindahkan hingga 700 µl sampel, termasuk endapan apa pun, ke kolom spin RNeasy Mini yang ditempatkan dalam tabung koleksi 2 ml. Sentrifus selama 15 detik pada 10000 rpm. Buang cairannya. Tambahkan 700 µl buffer RW1 ke dalam kolom dan sentrifugasi selama 15 detik pada 10.000 rpm. Kemudian buang cairannya. Tambahkan 500 µl buffer RPE ke kolom dan sentrifugasi selama 2menit pada 12.000 rpm. Kemudian buang cairannya. Tambahkan 500 µl buffer RPE ke kolom dan sentrifugasi selama 2 menit pada 12.000 rpm. Tempatkan kolom dalam tabung koleksi 2 mL yang baru dan sentrifugasi dengan kecepatan penuh selama 1 menit untuk mengeringkan membran (Langkah ini opsional). Tempatkan kolom dalam tabung pengumpul baru 1,5 mL dan tambahkan 30 µl NFW, Sentrifus selama 1 menit hingga 10.000 rpm untuk melulusi RNA. Simpan sampel pada suhu -80°C.

### **2.3. Alat, Bahan & Metode Ekstraksi Protein Bakteri *E. coli* dengan Sonikator**

Alat-alat untuk metode ekstraksi protein bakteri dengan sonikator adalah Sonikator, Mikropipet ukuran 1-10ul, Mikropipet ukuran 10-100ul, Mikropipet ukuran 100-1000ul, Centrifuge 4o C (lab instrumentasi terpadu), Ice box, Gabus pengapung dan Ose. Bahan-bahan yang digunakan adalah Buffer fosfat pH 7, Kultur agar *E. coli*, Microtube 1.5ml, Tips putih, Tips kuning, Sarung tangan lateks, Plastik limbah, Es batu, RNase & DNase (optional).

Metode yang dilakukan untuk ekstraksi protein bakteri dengan sonikator adalah dimasukkan pellet bakteri ke dalam microtube 1.5 sebanyak kurang lebih 100µg. Pellet disuspensikan dengan menambahkan 200µl buffer fosfat, kemudian dihomogenisasi. Tabung diletakkan pada gabus pengapung kemudian dimasukkan ke dalam sonikator. Sonikator dinyalakan selama 30 menit. Apabila terbentuk gelembung pada suspensi, alat dimatikan sebentar hingga gelembung hilang, kemudian dinyalakan lagi hingga

total waktu kerja 30 menit. Setelah disonikasi, tabung dipindahkan ke centrifuge 4o C dan disentrifugasi pada 12.000 g selama 1 jam. Supernatant didekantasi ke microtube baru dan disimpan pada -20o C.

Supernatant yang diperoleh belum merupakan protein murni, masih berupa ekstrak kasar protein, sehingga selanjutnya harus dilakukan proses presipitasi protein.

\*Kelompok tidak melakukan metode presipitasi protein.

#### **2.4. Alat, Bahan & Metode Kuantifikasi DNA & RNA**

Alat-alat untuk metode kuantifikasi DNA & RNA adalah Mikropipet Spektrofotometer UV-VisKuvet (Kuarsa / plastic). Bahan-bahan yang digunakan adalah Sampel DNA/RNA yang akan di ukur.

Metode yang dilakukan untuk kuantifikasi DNA & RNA adalah Nyalakan spektrofotometer dan atur panjang gelombang 260 nM. Untuk mensuspensikan DNA/RNA dan protein dalam PBS, gunakan H<sub>2</sub>O atau 1X TE sebagai pelarut. Nol spektrofotometer dengan sampel pelarut. Bilas kuvet dengan dengas akuades sebelum menggunakan pelarut TE atau non-akuades diisi sampel DNA, RNA, atau protein yang akan diukur. Ukur dan catat absorbansi sampel pada 230 nm, 260 nm, dan 280 nm untuk pembacaan yang lebih akurat dari sampel asam nukleat yang diinginkan. Encerkan sampel untuk memberikan pembacaan antara 0,1 dan 1,0. Hitung kemurnian dan konsentrasi sampel DNA dengan faktor pengenceran.

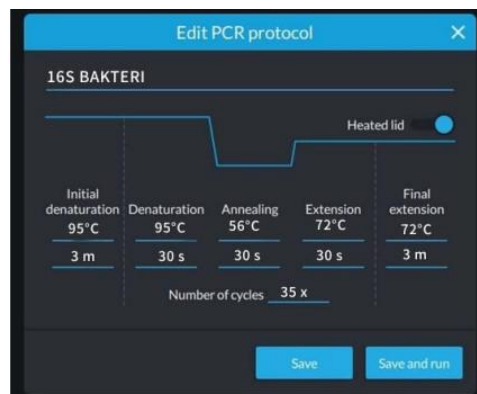
#### **2.5. Alat, Bahan & Metode PCR DNA**

Alat-alat untuk metode kuantifikasi DNA & RNA adalah Mesin thermal cycler MiniPCR 16, Mesin spin down, Laptop, Mikropipet ukuran 0.5-10 µl, Mikropipet ukuran 10-100 µl, Isofreeze, Mikropipet ukuran 100- 1000 µl, PCR tube 0,2 ml, Rak tabung 2 ml dan PCR tube rack. Bahan-bahan yang digunakan adalah Sampel DNA, Master mix PCR (Gotaq GreenMastermix), Primer forward 10 rM 16S (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), Primer reverse 10 rM 16S (1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3), Nuclease free water, Tube 0,2 ml, Tips ukuran 0,5-10 µl, Tips ukuran 10-100 µl, Tips ukuran 100-1000 µl, Tube 1,5ml dan Plastik limbah.

Metode yang dilakukan untuk kuantifikasi DNA & RNA adalah Sampel DNA, master mix, nuclease free water, dan primer disimpan dalam cooler box. Sampel DNA, master mix, & primer dihomogenisasi dengan spindown selama 30 detik. Campuran mastermix (@25uL) disiapkan dengan primer dan nuclease free water sebelum ditambahkan sampel DNA dengan komposisi sebagai berikut:

Amplifikasi Gen 16S pada Bakteri			
No	Komponen	Jumlah (ul)	Konsentrasi
1	Master mix	12,5	1X
2	Primer forward	1	0,2pM
3	Primer reverse	1	0,2up
4	Nuclease free water	5,5	-
5	Sampel DNA	5	1-250ng/ul

Lalu, Sampel DNA ditambahkan di tahapan paling akhir dan dipastikan tidak ada gelembung di dalam master mix. Campuran sampel DNA dan master mix dihomogenisasi di spindown selama 30 detik. Profil reaksi PCR diatur pada perangkat lunak MiniPCR 16 dengan tahapan reaksi seperti berikut:



Reaksi PCR akan berlangsung sekitar 1 jam 30 menit untuk total 35 siklus. Setelah selesai, angkat tube dari mesin dan disimpan ke dalam cooler box untuk disimpan kembali ke freezer -20oC.

## 2.6. Alat, Bahan & Metode Elektroforesis DNA

Alat-alat untuk metode elektroforesis DNA adalah Labu Erlenmeyer, Gelas ukur, Timbangan digital, Microwave, Micropipet, Tabung Sentrifugasi, Aparatus



elektroforesis (tray, comb, chamber) dan Gel Doc System. Bahan-bahan yang digunakan adalah Sampel DNA, Bubuk agarose, Loading buffer: 1x TAE, Running buffer; 1x TAE, Loading dye, Gel red, Marka DNA 1 kb, Parafilm, Mikrotips ukuran 1-10 $\mu$ L dan Sarung tangan latex.

Metode yang dilakukan untuk elektroforesis DNA adalah tahap pembuatan gel agarosa 1,5%. Timbang 0,75g bubuk gel agarosa, masukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Tambahkan loading buffer (TAE buffer) sebanyak 50ml, aduk sedikit. Panaskan di dalam microwave selama 60—90 detik dan tambahkan 2 $\mu$ L Gel Red. Siapkan tray dan pasang comb di atas tray. Tuang gel ke dalam cetakan/tray. Tunggu gel mengeras, gel siap digunakan.

Tahap loading sampel ke dalam Well pada Gel Elektroforesis, masukkan gel ke dalam chamber, tambahkan running buffer (TAE buffer) hingga gel terendam. Loading dye, marka DNA, dan parafilm disiapkan. Sebanyak 2 $\mu$ L loading dye dicampur dengan 5 $\mu$ L DNA (di atas parafilm). Masukkan campuran dan sampel DNA ke dalam well yang berbeda pada gel elektroforesis.

Tahap running elektroforesis, penutup chamber dipasang, sambungkan aparatus elektroforesis ke power supply 100V. Tunggu hingga 30—40 menit sampai sampel DNA dan marka mencapai ujung gel. Matikan powersupply, lepas powersupply dari stopkontak, keluarkan gel dari chamber.

Tahap dokumentasi gel, pindahkan gel secara perlahan ke dalam Gel Doc System. Pastikan Gel Doc System tertutup rapat lalu nyalakan lampu sinar UV pada mesin Gel Doc System. Amati dan simpan foto hasil elektroforesis ke dalam komputer.

## **2.7. Alat, Bahan & Metode SDS-PAGE Protein**

Alat-alat untuk metode elektroforesis DNA adalah Apparatus set SDS PAGE (Biorad), Drybath/Waterbath, Mikropipet ukuran 1-10 $\mu$ L, Mikropipet ukuran 10-100 $\mu$ L. Bahan-bahan yang digunakan adalah Gel akrilamid, TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine), Ammonium persulfate, Tris base, Glycine,  $\beta$ -mercaptoethanol, Mikrotips ukuran 10-100 $\mu$ L, Mikrotips ukuran 100-1000 $\mu$ L, Ethanol 96%, Sampel protein, Sarung tangan lateks, Plastik limbah dan Kontainer limbah gel.

Metode yang dilakukan untuk SDS-PAGE Protein hasil isolasi adalah tahap Loading dan Running sampel, Loading dan running sampel membutuhkan larutan buffer. Larutan buffer (1000ml) dapat dibuat dengan komposisi sebagai berikut.

Komposisi	Jumlah
Glicyne	14,2 gr
Tris Base	3,03 gr
Aquades steril	1000 ml
SDS	1 gr

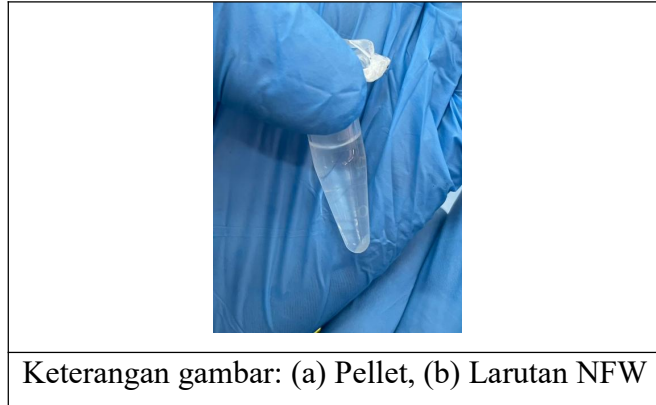
Sampel sebelum dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis harus melalui beberapa tahapan, yaitu sampel protein harus dicampurkan dengan loading buffer berupa RSB tracking dye atau loading dye yang terdiri atas 30% glycerol, stacking buffer, 6mM EDTA, 10% SDS, 60mM  $\beta$ -mercaptoethanol, dan bromphenol blue. Sampel protein sebanyak 10ul dan 10ul loading dye dicampur di dalam tabung 1.5ml. Kemudian dipanaskan pada suhu 95oC selama 10 menit dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13000rpm. Diamkan selama 5 menit dalam suhu kamar. Sampel sebanyak 10ul dimasukkan ke sumur gel. Jangan lupa memasukkan marker sebanyak 5ul ke dalam sumur gel. Nyalakan power supply, atur tegangan listrik 120 V, jalankan program selama 60-90 menit. Setelah selesai, matikan aliran listrik dan angkat frame gel dan lepaskan bagian frame kaca kecil.

Tahap Visualisasi gel, gel direndam dalam staining solution Coomasie Brilliant Blue. Selama perendaman, gel dibiarkan terendam dan digoyangkan dengan konstan selama 30 menit. Setelah direndam, gel dapat difoto menggunakan geldoc atau bias langsung dengan kamera.

Tahap analisis data gel, pastikan posisi loading dye setelah sampel selesai dielektroforesis tetapi sebelum diberi pewarnaan Coomasie Brilliant Blue. Setelah pewarnaan, ukur jarak migrasi protein yang terlihat pada gel. Hitung Rf dengan rumus,  $Rf = \text{jarak migrasi protein} / \text{jarak migrasi loading dye}$ .

### 3. Hasil dan Pembahasan

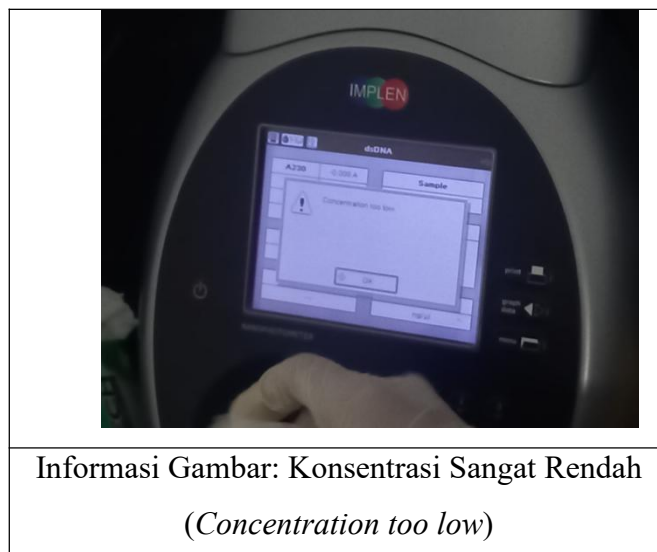
#### 3.1. Hasil dan Pembahasan Ekstraksi, Kuantifikasi, Elektroforesis & Amplifikasi PCR DNA Bakteri Gram Negatif



Gambar 1. Tabung 2 ml berisi Sampel Hasil Isolasi DNA Bakteri Gram Negatif

Hasil isolasi kelompok D4, pada ekstraksi DNA dari bakteri gram negatif dengan menggunakan Kit Wizard (Promega) adalah berupa pellet yang dilarutkan dengan NFW dan disimpan pada suhu 4°C, dan akan digunakan pada proses kuantifikasi, PCR dan elektroforesis.

Setelah didapatkan isolasi DNA bakteri, maka dilakukan kuantifikasi berikut adalah hasilnya:

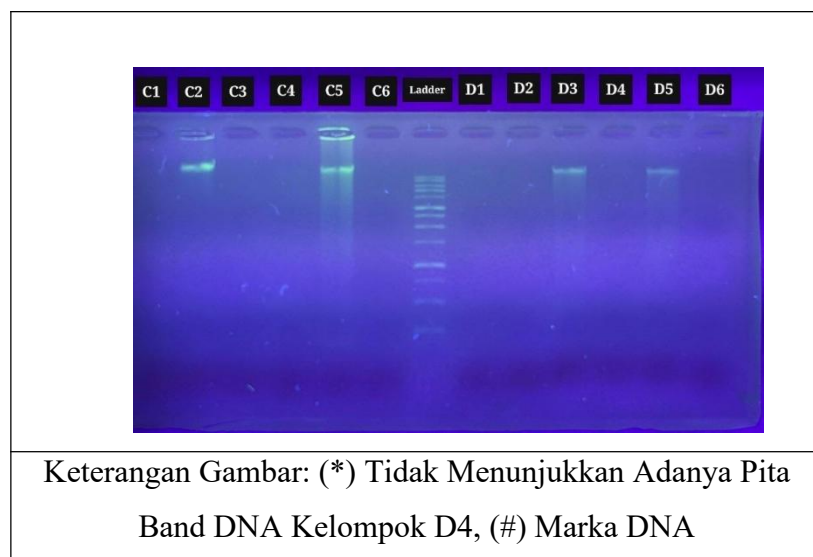


Gambar 2. Informasi Kuantifikasi DNA Hasil Isolasi Bakteri

Pada hasil yang digunakan pada alat kuantifikasi spektrofotometri Nanodrop, kelompok D4 mendapatkan hasil berupa konsentrasi yang sangat rendah, sehingga nilai kemurnian yang diperoleh tidak keluar hasilnya.

Hal ini dapat disebabkan karena pada saat isolasi dapat saja penambahan durasi waktu saat sentrifugasi, kelompok D4 penambahan waktu sentrifugasi yang seharusnya 2 menit menjadi 5 menit. DNA bisa saja sudah terdegradasi diakibatkan hal tersebut. Faktor lain yang menyebabkan hasil kuantifikasi DNA adalah saat pengambilan sampel dengan menggunakan pipetman, tidak mengenai sampel DNA, sehingga saat dikuantifikasi tidak terhitung oleh sistem. Hal lain dapat pula seperti preparasi yang kurang baik hingga kontaminasi sampel.

Lalu, setelah dilakukan kuantifikasi, tahap selanjutnya adalah elektroforesis dengan gel agarosa agar dapat melihat hasil dari sampel DNA Bakteri. Berikut adalah hasil dari elektroforesis kelompok siang praktikum biologi molekular.



Gambar 3. Elektroforesis DNA Hasil Isolasi Seluruh Kelompok Siang

Hasil elektroforesis yang tidak menunjukkan hasil pada elektroforesis, dapat saja terjadi karena pada hasil kuantifikasi sebelumnya diperoleh hasil konsentrasi DNA yang sangat rendah, sehingga percobaan elektroforesis untuk deteksi sampel DNA tidak ada pita band.

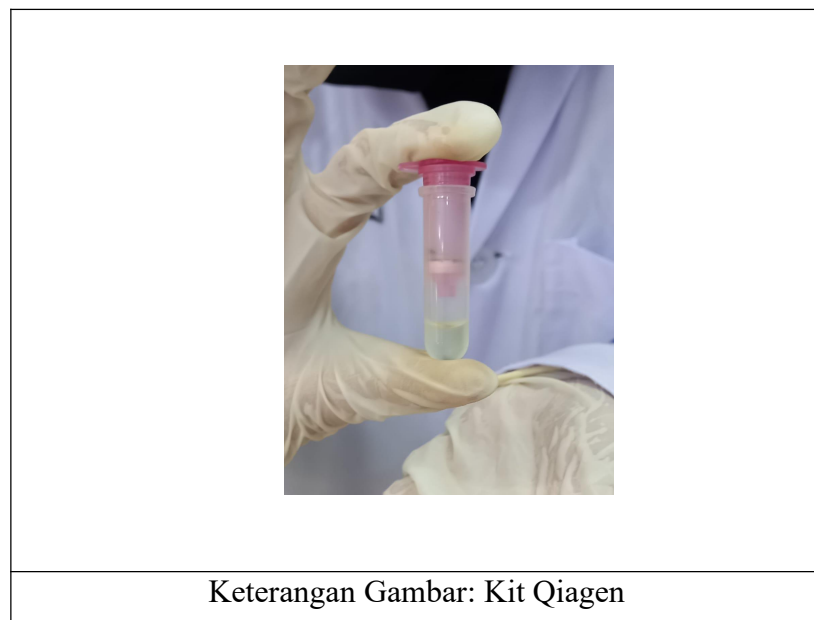
Setelah itu, dilakukan amplifikasi DNA dengan teknik PCR, berikut adalah hasil dari amplifikasi PCR.



Gambar 4. Hasil PCR DNA Seluruh Kelompok Siang

Pada hasil PCR DNA, terdapat DNA hasil isolasi bakteri gram negatif dengan menggunakan kit Promega. Dari hasil yang didapatkan oleh kelompok D4, diasumsikan bahwa ketidakberadaan sampel sebelumnya pada saat elektroforesis, karena sampel yang terlalu rendah konsentrasinya, namun pada saat PCR, hasil sampel diamplifikasi sedemikian rupa sehingga hasilnya dapat terlihat.

### 3.2. Hasil dan Pembahasan Ekstraksi & Kuantifikasi PCR RNA Spesies *Tridax procumbens*



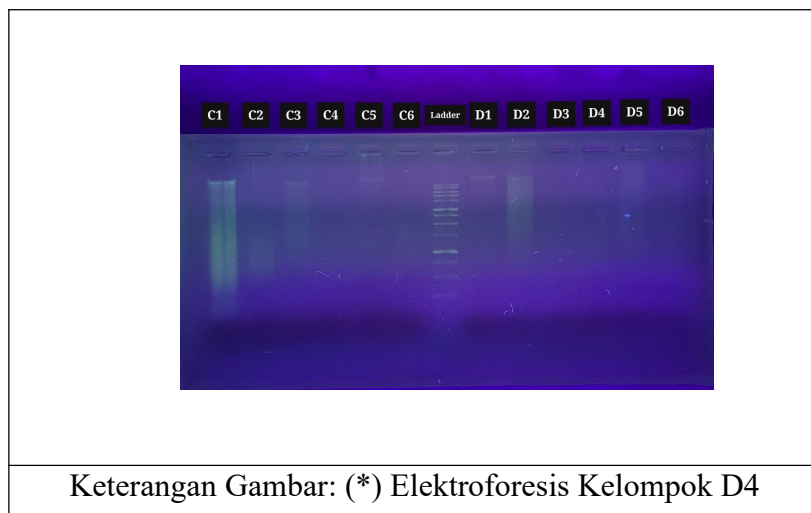
Gambar 5. Hasil Penggunaan Kit Kolom Silika untuk Isolasi RNA *Tridax procumbens*

Hasil pada kelompok D4, setelah menggunakan kit Qiagen untuk mendapatkan hasil ialah RNA pada kolom dan setelah itu dielusi dengan NFW. Lalu penggunaan Qiagen RNeasy Mini Kit, dinilai lebih baik dalam melakukan isolasi RNA dibandingkan CTAB (konvensional), karena penggunaan kit yang menggunakan metode kolom silika.



Gambar 6. Hasil Kuantifikasi RNA Tridax procumbens Kelompok D4

Pada hasil kuantifikasi kelompok D4, didapatkan jumlah konsentrasi ialah 19,6 ng/μL dan kemurnian 2,227. Hasil konsentrasi yang didapatkan dapat dikatakan sangat sedikit, dibandingkan hasil yang seharusnya dipakai untuk RT-PCR, elektroforesis dan teknik molekular lainnya yaitu 30-50 ng/μL. Lalu untuk konsentrasi yang didapatkan cukup baik, dengan hasil kemurnian RNA yang baik adalah (>2,0).



Gambar 7. Hasil Elektroforesis RNA Kelompok Siang

Pada hasil elektroforesis RNA, kelompok D4 tidak mendapatkan hasil pada pita band. Hasil ini dapat terjadi karena pada saat kuantifikasi, memiliki nilai konsentrasi yang cukup sedikit dibandingkan yang seharusnya (30-50 ng/ $\mu$ ). Lalu, dapat saja terjadi masalah pada saat preparasi, kontaminasi dan isolasi RNA gagal karena tidak hati-hati, pada dasarnya RNA memiliki struktur yang lebih sensitif dibandingkan dengan DNA, hal ini mungkin dilakukan tidak hati-hati sehingga hasil RNA elektroforesis tidak ada.

### 3.3. Hasil dan Pembahasan Ekstraksi & SDS-PAGE Deteksi Protein Sampel Bakteri *E. coli* dengan Metode Sonikator



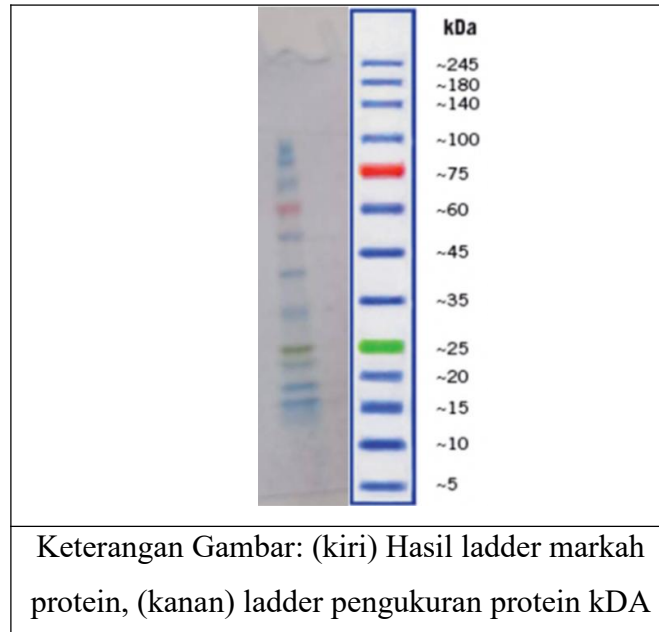
Gambar 8. Hasil Elektroforesis RNA Kelompok Siang

Hasil Gambar 8 adalah hasil kelompok D4 dalam melakukan ekstraksi protein bakteri *E. coli*. Lalu didapatkan hasil pada ekstraksi protein yaitu pellet ekstrak protein kasar dan supernatan hasil isolasi yang disimpan untuk langkah selanjutnya yaitu SDS-PAGE, dengan pemurnian protein tidak dilakukan oleh kelompok.



Keterangan Gambar: (\*)  
Menunjukkan Adanya Pita Band  
DNA Kelompok D4, (#) Marka DNA

Gambar 9. Hasil SDS-PAGE Protein Bakteri *E. coli* Kelompok D4



Gambar 10. Hasil SDS-PAGE Marka Protein Bakteri *E. coli* Kelompok D4

Pada hasil yang didapatkan pada SDS-PAGE, kelompok D4 dan seluruh kelompok siang tidak mendapatkan hasil sama sekali pada hasil SDS-PAGE mereka. Hal ini dapat disebabkan karena pada isolasi protein dengan supernatan dan pellet, hanya didapatkan ekstrak protein kasar. Hasil sebelumnya dari isolasi didapatkan inilah hasil protein yang belum murni (tidak dilakukan pemurnian protein) sehingga masih terdapat banyak sekali kontaminan, seperti membran sel dan banyak protein menumpuk. Oleh karena itu, pada hasil SDS-PAGE, protein tidak menunjukkan band pada kelompok, melainkan pada markah protein.

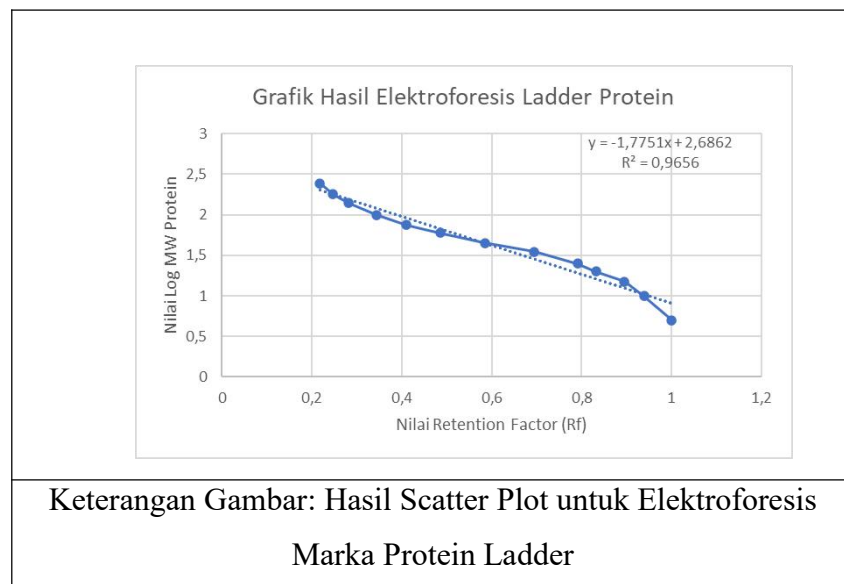
Marka protein yang dipakai adalah markah protein ExactPro Broad Range (5-245kDa). Marka menggunakan larutan lain yang mengandung protein yang sudah disediakan, sehingga pada hasil SDS-PAGE, mendapatkan hasil dengan banyak pita band dan disertakan pengukurannya.



No.	Rf	MW (kDa)	Log MW
1	0,217999	245	2,389166
2	0,247112	180	2,255273
3	0,28198	140	2,146128
4	0,343002	100	2
5	0,409965	75	1,875061
6	0,485504	60	1,778151
7	0,584298	45	1,653213
8	0,694775	35	1,544068
9	0,790726	25	1,39794
10	0,831407	20	1,30103
11	0,895333	15	1,176091
12	0,938981	10	1
13	1	5	0,69897

Keterangan Gambar: Tabel Perhitungan Marka Protein

Gambar 11. Hasil Perhitungan RF dan LogMW Protein



Keterangan Gambar: Hasil Scatter Plot untuk Elektroforesis Marka Protein Ladder

Gambar 12. Hasil Perhitungan RF dan LogMW Protein

Perhitungan yang dilakukan adalah pada hasil protein ladder yang disediakan. Seperti soal nomor 1, hasil protein yang dilakukan isolasi oleh praktikan tidak berhasil. Perhitungan menggunakan prinsip Retention factor (Rf) pada sumbu-X dan Log MW protein pada sumbu-Y. Nilai Rf didapatkan dengan membagi hasil jarak migrasi protein target dengan jarak protein keseluruhan. Lalu untuk berat molekul protein didapatkan dengan mengikuti marka protein 5-245kDa yang sudah tersedia (1st Base, 2023: 2). Hasil grafik hasil R2 yang mendekati 1, menandakan bahwa hasil grafik sudah sesuai dan representatif, lalu kemampuan variabel bebas dalam menimbulkan keberadaan variabel terikat semakin kuat sehingga dapat dihitung untuk membuat prediksi (Walpole dkk., 2012: 390).

#### 4. Kesimpulan

Isolasi DNA dan RNA dapat dilakukan dengan cara boiling, CTAB, chelex dan juga penggunaan kit komersial. Isolasi protein dapat menggunakan teknik lisis fisik seperti sonikator, dan teknik enzimatik seperti salting-out. Hasil kuantifikasi yang baik, akan terlihat pada hasil pita band elektroforesis untuk DNA dan SDS-PAGE untuk protein.

Hasil isolasi DNA dengan menggunakan teknik kit kelompok D4, tidak didapatkan hasil pada hasil kuantifikasi karena konsentrasi yang terlalu rendah, namun, saat dilakukan PCR, DNA yang diamplifikasi mendapatkan hasil pada pita bandnya. Hasil isolasi RNA tumbuhan dengan menggunakan teknik Qiagen, yaitu teknik kolom silika, kelompok D4 mendapatkan hasil konsentrasi 19,6 ng/ $\mu$ L dan kemurnian 2,227 pada hasil kuantifikasinya. Konsentrasi tersebut dapat dikatakan tidak cukup untuk uji elektroforesis, dan terlihat pada hasil pita band RNA tidak timbul pada hasil elektroforesis. Hasil ekstraksi protein bakteri *E. coli* didapatkan ekstrak protein kasar, dengan tidak ada hasil pada SDS-PAGE, karena pada ekstraksi protein, tidak dilakukan pemurnian, sehingga hasil terdapat kontaminasi dan tidak murni.

#### Daftar Pustaka

- 1st Base. 2023. Product Information ExactPro Broad Range (5-245kDa) Prestained Protein Ladder, 250 $\mu$ l. Singapore Science Park II: 1-4 hlm.
- Amanda, U. D dan I. C. Cartealy. 2015. Isolasi RNA total dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *Tenera*). *Proseding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* **1**: 171-176.
- Farrell, R.E. 2010. RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization 4th edition. Elsevier, London: xxiii + 693 hlm.
- Iswahyudi, A. V. Purba and S. Setyahadi. 2018. Pengaruh interaksi ekstrak etanol meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dengan glibenklamid terhadap ekspresi gen CYP3A4 pada kultur sel HepG2. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis* **5**(3): 147–153.
- Kusumawati, S. D., I. Hadiananto, N. Nurlatifah, A. A. Pracoyo & N. A. Handayani. 2023. Perbandingan Nilai Pengukuran Kuantitatif Isolat Asam Ribonukleat (RNA)

- Menggunakan Spektrofotometer Nanodrop dan Mikrodrip pada Sampel Hepar Ayam (*Gallus gallus domesticus*). *Indonesian Journal of Laboratory* **6**: 62-71.
- Sheehan, D. 2009. Physical biochemistry : principles and applications. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, New Delhi: xv + 433hlm.
- Tan, S. C., & B. Chin Yiap. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biochemistry* **2009**: 1-10.
- Walpole, R. E., R. H. Myers, S. L. Myers & K. Ye. 2012. Probability & Statistics for Engineers & Scientists. 9th ed. Prentice Hall, USA: xv + 785 hlm.