

MODUL PRAKTIKUM BIOLOGI SEL DAN MOLEKULER

Disusun oleh:
Annisa
Madiah
Sri Rejeki Rahayuningsih



Nama :

NPM :

Program Studi Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Padjadjaran
2021

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT atas perkenan Nya modul praktikum Biologi Sel dan Molekuler ini dapat diselesaikan. Modul ini dibuat untuk meningkatkan pemahaman terhadap materi kuliah Biologi Sel dan molekuler.

Modul ini diharapkan dapat menunjang teori yang diberikan pada perkuliahan sehingga mahasiswa dapat lebih mengerti dan memahami mata kuliah melalui pelaksanaan praktikum. Mahasiswa diharapkan untuk berpartisipasi aktif dengan melakukan percobaan-percobaan agar mahasiswa dapat memahami bagaimana proses isolasi dari berbagai makhluk hidup, dan juga teknik-teknik yang umum digunakan pada biologi sel dan molekuler.

Semoga modul ini dapat bermanfaat khususnya bagi mahasiswa biologi FMIPA UNPAD dan pembaca pada umumnya. Kritik dan saran untuk perbaikan modul ini sangat penyusun harapkan.

Jatinangor, Juli 2021

Penyusun,

Tim Dosen Biologi Sel dan Molekuler

MODUL I

PENGUKURAN MIKROSKOPIS

I. Pendahuluan

Objek penelitian dalam Biologi Sel dan Molekuler merupakan objek yang sangat kecil, oleh karena itu dalam pengamatan dan penelitian di bidang ini, terutama Biologi Sel, diperlukan alat bantu ukur besaran mikroskop. Seringkali pengamatan mikroskopis baik jasad renik ataupun struktur anatomi dan histologis memerlukan pengukuran yang akurat sehingga diperlukan alat bantu ukur mikroskopik untuk mengetahui ukuran yang sesungguhnya. Pada umumnya ukuran sel hewan dan tumbuhan sekitar 10-100 μm , walaupun biasanya ukuran sel tumbuhan lebih besar daripada sel hewan, sedangkan ukuran mikroba, terutama bakteri sekitar 1-10 μm .

Mikrometri adalah pengukuran benda-benda mikroskopis yang telah diamati dengan menggunakan mikroskop. Satuan pengukuran yang dipakai mikroskop cahaya adalah **mikron**. Bila dihubungkan dengan satuan lainnya, maka satu mikron sama dengan satu perseribu milimeter, atau sama dengan seribu nanometer, atau sama dengan 10 ribu angstrom. Alat yang digunakan untuk mengetahui ukuran benda-benda mikroskopis disebut mikrometer. Mikrometer merupakan kaca berskala yang dalam penggunaannya ada 2 jenis mikrometer yaitu mikrometer okuler dan mikrometer objektif. Mikrometer okuler dipasang pada lensa okuler mikroskop, sedangkan mikrometer objektif berbentuk slide yang ditempatkan pada meja preparat mikroskop. Pada prinsipnya skala okuler adalah skala yang terdiri dari 1-100 dengan jarak antara garis sama tetapi tidak diketahui nilainya, sedangkan pada skala objektif adalah skala yang terdiri dari 1-100 dengan jarak antara garis memiliki nilai 0,01 mm atau 10 μm . Skala okuler tidak berubah ukurannya walaupun pembesaran diubah, sedangkan skala objektif akan berubah ukurannya apabila pembesaran diubah. Oleh karena itu, kalibrasi dilakukan agar skala okuler memiliki nilai dari perbandingan skala objektif dengan skala okuler di setiap pembesaran. Mikrometer okuler sekarang *dikalibrasi* dengan standar dan dapat dipakai untuk mengetahui ukuran sebuah spesimen secara teliti dan tepat. Nilai kalibrasi dari mikrometer okuler ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Ukuran Skala Kalibrasi Mikrometer Okuler pada Mikroskop

PEMBESARAN (OKULER x OBJRKTIF)	SKALA	KALIBRASI
4 X 10	1	25 μm
10 X 10	1	10 μm
40 X 10	1	2,5 μm
100 X 10	1	1 μm

II. Tujuan Praktikum

1. Untuk mengetahui ukuran sel dengan alat bantu mikroskop berupa micrometer okuler.
2. Untuk membandingkan ukuran sel hewan, sel tumbuhan dan sel bakteri.

III. Alat dan Bahan

Alat:

- Mikroskop cahaya binokuler
- Micrometer okuler
- Preparat hati tikus
- Preparat akar bawang
- Preparat bakteri

IV. Tata Kerja

Luring

1. Ambillah preparat hati Tikus dan letakkan di meja specimen pada mikroskop di hadapan Anda.
2. Nyalakan mikroskop dan amatilah struktur histologis hati mula-mula dengan lensa objektif 4X atau 10X, lalu putarlah revolver pada objektif 40X.
3. Tentukanlah sel yang memiliki batas yang jelas, lalu ukurlah panjang sel berdasarkan jumlah skala dari micrometer okuler. Hitung panjang sebenarnya dari sel hepatosit berdasarkan tabel kalibrasi pada pembesaran 40 x 10 (Lembar Kerja I.1A). Ambillah gambar sel dengan menggunakan kamera yang diletakkan di atas lensa okuler (Lembar Kerja I.1B).
4. Lakukan pengukuran panjang sel dari 10 sel hepatosit yang berbeda, lalu buatlah rata-rata panjangnya.

5. Lakukan pengukuran sel dengan cara yang sama pada preparat akar bawang (Lembar Kerja I.2A dan 2B) dan preparat bakteri (Lembar Kerja I.3A dan 3B).
6. Bandingkan ukuran sel hepatosit dari hati tikus, sel meristem dari akar bawang, dan sel bakteri yang telah diperoleh (Lembar Kerja I.4).

Daring

1. Praktikum dilakukan secara virtual menggunakan link berikut:

<https://us02web.zoom.us/j/84773274082?pwd=ZmZFM2tKd0JEb2c2dFIMSlQySU5XZz09>

<https://www.ncbionetwork.org/iet/microscope/>

2. Pelajari materi tambahan pada link berikut:

<https://youtu.be/bFrTBCfQ8O8>

3. Buatlah alur kerja berdasarkan link berikut:

<https://www.microscopyu.com/tutorials/reticlecalibration>

4. Hasil praktikum dilaporkan adalah hasil pekerjaan dengan virtual mikroskop dalam bentuk screenshoot dari hasil pekerjaan. Untuk pengukuran mikroskopis saudara harap menjawab soal setelah saudara menyaksikan link materi tambahan pada chanel youtube.

*catatan: lembar kerja akan diberikan saat praktikum virtual dimulai.

V. HASIL PENGAMATAN -- Lembar Kerja I

<p>1A. Panjang sel hepatosit</p> <p>Ulangan ke-:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. <p>Rata-rata:</p>	<p>1B. Gambaran sel hepatosit dari preparat hati Tikus</p>
--	--

<p>2A. Panjang sel meristem pada akar bawang</p> <p>Ulangan ke-:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. <p>Rata-rata:</p>	<p>2B. Gambaran sel meristem dari preparat akar bawang</p>
<p>3A. Panjang sel hepatosit</p> <p>Ulangan ke-:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. <p>Rata-rata:</p>	<p>3B. Gambaran sel bakteri</p>
<p>4. Perbandingan rerata ukuran sel hewan : sel tumbuhan : sel bakteri</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	

MODUL II

Penggunaan Mikropipet

I. Pendahuluan

Mikropipet adalah peralatan laboratorium standard untuk mengukur dan memindahkan larutan bervolume kecil (< 1 ml). Skala yang digunakan adalah mikroliter ($1000 \mu\text{l} = 1$ ml). Harga mikropipet bervariasi dari \$75-\$350. Saudara akan menggunakan alat ini selama praktikum biologi sel dan molekuler berlangsung.

II. Tujuan dan fungsi praktikum

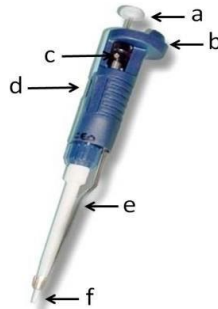
Tujuan: Mempelajari cara penggunaan mikropipet

Fungsi mikropipet di laboratorium:

- a. Mengetahui bagian-bagaian dari mikropipet
- b. Volume yang dapat digunakan dengan mikropipet P10, P20, P200 dan P1000
- c. Mampu membaca indicator volume pada mikropipet P10, P20, P200 dan P1000

A. Bagian-bagian dari mikropipet

- a. “Plunger”
- b. Tombol ejektor
- c. Penyesuai volume
- d. Indikator volume
- e. Batang mikropipete
- f. Daerah penempelan tips



B. Ukuran mikropipet

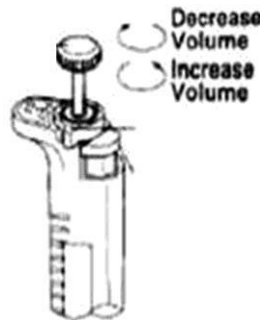
Pada praktikum ini digunakan 4 ukuran mikropipet mengukur berbagai volume larutan. Keempat ukuran ini adalah : P10, P20, P200, dan P1000. Ukuran mikropipet dan rentang volume yang diukur:

- P10 : 0,5-10 μl
P20 : 2,0 - 20 μl
P200 : 20 - 200 μl
P1000 : 100 -1000 μl

Angka yang tertera setelah huruf P adalah volume maksimum yang dapat ditransfer oleh mikropipet. Penggunaan mikropipet bersamaan dengan tips. Pastikan untuk menggunakan mikropipet sesuai dengan kapasitasnya.

***Penggunaan volume yang melebihi kapasitas merusak mikropipet dan menyebabkannya tidak dapat dikalibrasi!**

Contoh pembacaan volume pada mikropipet



<http://www.dragon-lab.com/>

Penggunaan mikropipet dengan ukuran terkecil memungkinkan pemindahan volume larutan yang akurat. ***Tingkat akurasi menurun apabila menggunakan mikropipet ukuran besar untuk memindahkan larutan dalam jumlah kecil.**

C. Warna dan ukuran tips

Tips bening berwarna biru (atau putih ukuran besar) digunakan untuk P1000.

Tips bening berwarna kuning digunakan untuk P20 dan P200.

Tips bening berukuran kecil digunakan untuk P10.

Cara memasukan tips:

1. Pilih tips ukuran yang benar.
2. Buka kotak tanpa menyentuh tips dengan tangan saudara (apalagi jika tanpa sarung tangan).
3. Masukkan poros mikropipet ke ujung dan tekan dengan kuat. Ini akan melampirkan ujung ke poros.
4. Lepaskan mikropipet dengan ujung yang melekat.
5. Tutup kotak tanpa menyentuh tips dengan tangan Anda.

D. Pengambilan larutan

Tombol “plunger” akan berhenti di dua “stop”. Stop 1 dan stop 2. Stop 1 dari titik-titik berhenti adalah titik resistance awal dan penekanan yang akan menghasilkan volume yang diinginkan dari solusi yang ditransfer. Stop 2 adalah ketika “plunger” tertekan luar perlawanan awal sampai bersentuhan dengan tubuh pipettor. Pada titik ini, “plunger” tidak dapat ditekan lebih lanjut. Stop 2 dipakai jika saudara memindahkan larutan dengan viskositas yang tinggi.

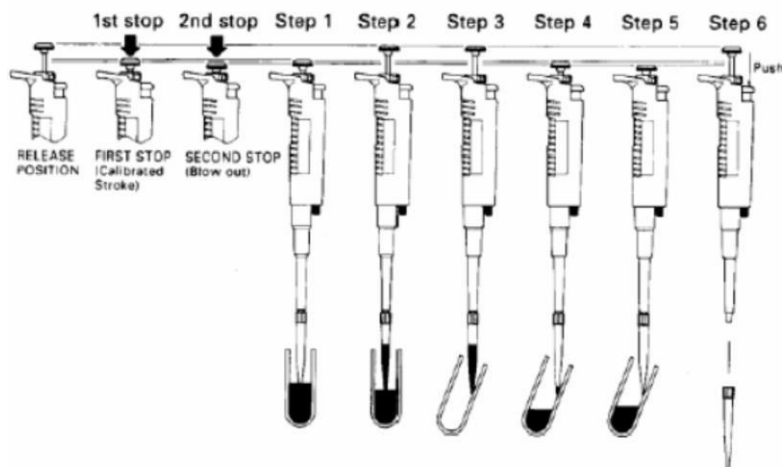
Mengukur dan mentransfer cairan

Gambar di bawah menunjukkan cara yang benar untuk penggunaan mikropipet.

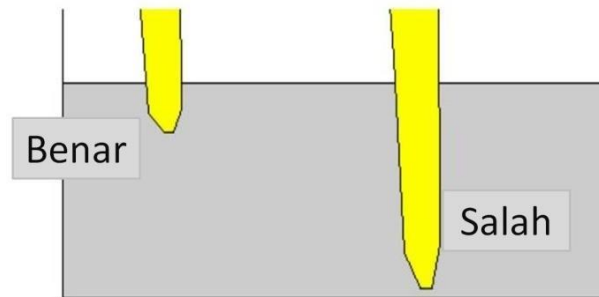
Penting: perhatikan “plunger” berhenti pertama digunakan dalam langkah 1 sampai 4.

“Plunger” berhenti kedua hanya digunakan pada langkah 5.

- Tekan ibu jari tombol untuk pemberhentian pertama.
- Benamkan ujung sekitar 3 mm ke dalam sampel larutan (langkah 1).
- Perlahan-lahan melepaskan jempol knob ke posisi awal (langkah 2). Perhatikan larutan ditarik perlahan-lahan ke ujung. Jangan lepaskan “plunger” terlalu cepat. Pelepasan cepat akan menyebabkan dalam larutan sehingga larutan pada poros yang tidak steril serta dapat mengurangi volume.
- Tarik ujung dari larutan sampel. Tempatkan ujung dinding sisi wadah penerima (langkah 3).
- Secara perlahan tekan “plunger” untuk pemberhentian pertama (langkah 4), jeda, kemudian tekan tombol untuk perhentian kedua (langkah 5).
- Lepaskan tips, dan kembalikan “plunger” tombol kembali ke posisi awal.
- Lepaskan tips dengan menekan tombol ejektor (langkah 6).
- Tambahkan tips baru dan ulangi langkah sebelumnya.

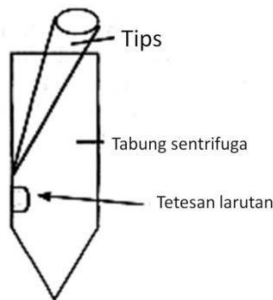


<http://www.biotech.wisc.edu/>



E. Teknik untuk memindahkan larutan dengan volume yang sangat kecil

Apabila saudara memerlukan rentang volume larutan yang sangat kecil (1-10 μ l), saudara perlu memperhatikan setiap tetes. Keluarkan larutan dengan cara menempelkan tips pada dinding tabung sentrifuga sebelum melepaskan “plunger”. Selanjutnya saudara perlu melakukan sentrifugasi.



Diadopsi dari:

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Bio111/Bio111LabMan/Preface%20D.html>

F. Penyimpanan mikropipet

Mikropipet sebaiknya disimpan dalam keadaan tegak dengan menggunakan rak khusus mikropipet. Volume harus dikembalikan ke volume maksimum saat penyimpanan.

G. Pemeriksaan sederhana untuk kalibrasi

Kalibrasi mikropipet dilakukan dengan melakukan penghitungan bahwa 1 ml (1000 μ l) deionisasi (atau suling) air memiliki massa 1 g. Pipet berbagai rentang volume dan disesuaikan dengan beratnya. Mikropipet yang baik memiliki tingkat akurasi 3 desimal. Pipet yang memiliki rentang pengambilan volume lebih dari 5% kesalahan harus dikalibrasi ulang.

III. Alat dan Bahan

Alat:

Tabung sentrifugasi 15 ml

Tabung sentrifugasi 1,5 ml

Mikropipet 100-1000 μl

Labtip biru, kuning, putih

Mikropipet 20-200 μl

Mikropipet 2-20 μl

Mikropipet 0,5-10 μl

Alat timbang

Bahan:

Cairan berwarna

IV. Tata Kerja

1. Persiapkan tips, mikropipet dan cairan berwarna.
2. Lakukan kalibrasi dengan ketentuan G. Lakukan kalibrasi pada mikropipet P1000, P200, P20, dan P10. Timbanglah berat tabung mikrosentrifuga kosong sebagai awal nilai (N0). Selanjutnya lakukan pengambilan larutan sebanyak 3 kali pada masing-masing volume (volume maksimal dan volume minimal). Setiap kali saudara melakukan pengambilan cairan, lakukan penimbangan secara terpisah. Tuliskan hasil pada tabel **Hasil pengamatan**.
3. Hitunglah rata-rata dan standard deviasi dari masing-masing volume mikropipet.

V. HASIL PENGAMATAN

Lembar kerja

	Ukuran mikropipet (nilai maksimum) \rightarrow Nx-N0			
	P1000	P200	P20	P10
Ulangan	1. g	1. g	1. g	1. g
	2.	2.	2.	2.
	3.	3.	3.	3.
Total				
Rata-rata				
STD				
SE				

	Ukuran mikropipet (nilai minimum) →Nx-N0			
	P1000	P200	P20	P10
Ulangan	1. g	1. g	1. g	1. g
	2.	2.	2.	2.
	3.	3.	3.	3.
Total				
Rata-rata				
STD				
SE				

Rumus standard deviasi:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}{n - 1}}$$

s = standard deviation
 \bar{V} = mean volume
 n = number of measurements
 V_i = single measurement result (i = 1...n)

Rumus standard error:

$$SE_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

S = standard deviasi

n = jumlah sampel atau ulangan

Pertanyaan:

Bagaimana kesimpulan dari hasil kalibrasi saudara

Nilai:

Nama dan Tanda tangan Asisten:

MODUL III

PEMISAHAN KOMPONEN SEL

DENGAN TEKNIK FRAKSINASI SEL

I. Pendahuluan

Sel merupakan unit struktural dan fungsional terkecil dari makhluk hidup, yang disusun oleh inti, organel dan sitoplasma, serta dibatasi oleh membran sel terhadap lingkungan eksternal. Masing-masing komponen penyusun sel tersebut dapat dipisahkan dan diisolasi untuk kemudian dipelajari struktur dan fungsinya. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk memisahkan komponen penyusun sel adalah fraksinasi dengan sentrifugasi diferensial sehingga diperoleh fraksi murni dari masing-masing komponen sel.

Setiap organel memiliki karakteristik yang unik (misalnya ukuran, bentuk dan densitas) sehingga setiap organel di dalam sel yang sama akan berbeda satu sama lain. Jika sel dapat dilisiskan dengan cara yang tepat dan perlahan, maka setiap organel di dalam sel tersebut dapat diisolasi secara bertahap. Proses melisiskan sel disebut homogenisasi, sedangkan proses isolasi bertahap organel-organel sel disebut fraksinasi. Proses mengisolasi organel memerlukan teknik tertentu secara kimiawi atau fisik, misalnya dengan menggunakan saringan dengan diameter pori tertentu, sedimentasi gravitasi atau presipitasi diferensial, hingga teknik ultrasentrifugasi organel yang telah diberi penanda fluoresens dengan memanfaatkan perangkat computer yang dapat menghasilkan gradient densitas.

Pada praktikum ini akan dilakukan isolasi komponen sel dengan menggunakan teknik sentrifugasi diferensial, yang akan memisahkan komponen-komponen sel berdasarkan pada adanya perbedaan berat molekul. Pada saat dilakukan sentrifugasi diferensial, pelarut yang digunakan seringkali mengandung senyawa yang sifatnya isotonis terhadap objek yang disentrifugasi. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kerusakan pada objek yang diamati. Sentrifugasi diferensial atau gradient dapat dilakukan dengan dua cara yaitu:

- Sentrifugasi dilakukan secara bertahap dengan kecepatan yang berbeda. Penentuan kecepatan sentrifugasi didasarkan pada berat molekul dari objek yang akan dipisahkan.
- Sentrifugasi dilakukan satu kali dengan kecepatan tertentu, akan tetapi pelarut yang digunakan diatur sedemikian rupa sehingga terjadi gradasi dari kecepatan (densitas) pelarut dalam tabung sentrifugasi.

II. Tujuan praktikum

1. Untuk mempelajari teknik fraksinasi sel dengan menggunakan metode sentrifugasi diferensial
2. Untuk mengamati morfologi dari komponen sel (inti sel, mitokondria dan lisosom) hasil fraksinasi sel secara mikroskopis.
3. Untuk membandingkan ukuran inti sel, mitokondria, dan lisosom dengan alat bantu micrometer okuler.

III. Alat dan bahan

Alat:

Sentifugal

Mikrosentrifugal

Homogenator (tabung sentrifugasi 10 mL dan *tissue grinder*)

Syringes 1 ml

Tabung sentrifugasi 15 ml

Microtube 2 ml

Pipet pasteur

Mikropipet 100-1000 μ l

Labtip biru

Mikroskop cahaya Olympus CX22 dengan micrometer okuler

Bahan:

Hati tikus (*Rattus norvegicus*)

NaCl fisiologis (0,9%)

Buffer homogenisasi (larutan sukrosa 0,25 M dalam buffer fosfat 0,2 M, pH 7,5)

PBS (phosphate buffer saline)

Methylene blue 1,5%

Janus green 0,01%

Es batu

IV. Tata kerja

1. Persiapkan tikus yang telah dipuasakan sebelumnya selama sekitar 24 jam.
2. Bius tikus dengan menggunakan eter, lalu bedah mulai dari bagian kaudal hingga ke abdomen hingga tampak organ hati.
3. Perfusi hati dengan NaCl 0,9% melalui vena porta hepatica sampai semua darah keluar atau hati berwarna pucat.
4. Isolasi hati tikus, buang jaringan ikatnya, lalu potong-potong hingga berukuran kecil.
5. Ambillah \pm 1 gram potongan organ hati dan masukkan ke dalam homogenator, kemudian tambahkan larutan buffer homogenisasi sebanyak 9 ml. Homogenisasikan potongan organ

hati dengan larutan buffer homogenisasi dalam kondisi dingin (di dalam wadah dengan es). Homogenat dinamakan *Brei* 10%.

Tahap I:

6. Ambillah 1,5 ml *Breidan* dimasukkan pada mikrotube baru, lalu disentrifugasi pada 600 g selama 10 menit. Hasil sentrifugasi adalah pellet berisi inti sel dan supernatant pascainti.
7. Pisahkan supernatan menggunakan mikropipet secara perlahan-lahan agar tidak mengganggu lapisan inti yang sudah mengendap dan pindahkan ke mikrotube yang baru.
8. Encerkanlah endapan/pellet dengan menambahkan 200 μ L PBS, kemudian tambahkan methylene blue 1,5% dengan perbandingan 1:1.
9. Teteskan pada kaca objek dan periksalah di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40, perhatikan dan amati komponen sel yang terwarnai.
10. Gambarlah komponen sel yang teramati pada Lembar Kerja II.1A.
11. Ukurlah panjang dari lima inti sel yang teramati pada pembesaran 100 x 10 (Lembar Kerja III.1B).

Tahap II:

12. Sentrifugasi supernatant pascainti yang diperoleh sebelumnya pada kecepatan 12.000 g selama 10 menit. Setelah selesai, diamkan sejenak kemudian ulangi sentrifugasi dengan kecepatan sama selama 5 menit. Hasil sentrifugasi adalah pellet berisi mitokondria dan supernatant pascamitokondria.
13. Buang bagian supernatant menggunakan mikropipet secara perlahan-lahan agar tidak mengganggu lapisan mitokondria yang sudah mengendap.
14. Encerkan bagian endapan/pellet dengan menambahkan 100 μ L larutan Janus green dengan perbandingan 1:1.
15. Teteskan pada kaca objek dan periksalah di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x100, perhatikan dan amati komponen sel yang terwarnai.
16. Gambarlah komponen sel yang teramati pada Lembar Kerja II.2A.
17. Ukurlah panjang dari lima mitokondria yang teramati (Lembar Kerja III.2B).

Tahap III:

18. Sentrifugasi supernatant pascamitokondria yang telah diperoleh sebelumnya pada kecepatan 20.000 g selama 10 menit. Setelah, diamkan sejenak kemudian ulangi

sentrifugasi dengan kecepatan sama selama 5 menit. Hasil sentrifugasi adalah pellet berisi lisosom, peroksisom, badan Golgi dan supernatan.

19. Buang bagian supernatan menggunakan mikropipet secara perlahan-lahan agar tidak mengganggu lapisan lisosom yang sudah mengendap.
20. Teteskan pada kaca objek dan periksalah di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 100, perhatikan dan amati komponen sel yang terwarnai.
21. Gambarlah komponen sel yang teramati pada Lembar Kerja III.3A.
22. Ukurlah panjang dari lima lisosom yang teramati (Lembar Kerja III.3B).

Referensi:

Heidcamp, W.H. *Cell Biology Laboratory Manual*.
<http://homepages.gac.edu/~cellab/contents.html>

V HASIL PENGAMATAN

Lembar Kerja III

1A. Gambaran morfologis inti sel	1B. Panjang inti sel hepatosit Ulangan ke-: 11. 12. 13. 14. 15. Rata-rata:
2A. Gambaran morfologis mitokondria	2B. Panjang mitokondria Ulangan ke-: 11. 12. 13. 14. 15. Rata-rata:
3A. Gambaran morfologis lisosom	3B. Panjang lisosom Ulangan ke-: 1. 2. 3. 4. 5. Rata-rata:
Pertanyaan: Jelaskan (a) mengapa komponen sel dapat dipisahkan dengan menggunakan sentrifugasi diferensial dan (b) bagaimana perbandingan ukuran tiap komponen sel yang telah berhasil dipisahkan?	

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Nilai:

Nama dan Tanda tangan Asisten:

MODUL IV

ISOLASI KLOOROPLAS

I. Pendahuluan

Kloroplas merupakan organel yang terutama banyak dikandung di dalam sel-sel mesofil daun dan termasuk ke dalam sistem endomembran. Kloroplas dikelilingi oleh membran ganda, yang terdiri atas membran luar dan membran dalam. Membran dalam dikemas dalam bentuk tilakoid yang berlipat. Pada beberapa tempat tilakoid tampak tersusun secara bertumpuk, yang dinamakan grana. Kloroplas merupakan tempat fotosintesis karena mengandung pigmen fotosintetik, yaitu klorofil, karoten, dan xantofil yang terdapat di membran tilakoid. Ada dua macam klorofil, yaitu klorofil a dan klorofil b, yang merupakan senyawa utama penyerap energi matahari. Klorofil a berwarna hijau kebiruan dengan rumus kimia $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, sedangkan klorofil b berwarna hijau kekuningan dengan rumus kimia $C_{55}H_{72}O_6N_4Mg$. Membran dalam berfungsi sebagai mesin fotosintetik untuk menghasilkan ATP dan NADPH. Membran luar bersifat permeable untuk memudahkan keluar masuknya produk fotosintesis.

II. Tujuan Praktikum

1. Untuk mengisolasi kloroplas dari sel-sel mesofil daun.
2. Untuk membandingkan jumlah kloroplas hasil isolasi dari daun bayam hijau, bayam merah, umbi wortel, dan petsai.
3. Untuk membedakan plastida yang berasal dari daun bayam hijau, bayam merah, umbi wortel, dan petsai.

III. Alat dan Bahan

Alat:

- Timbangan
- Tissue
- Pasir kuarsa
- Pestel dan mortar
- Corong kaca
- Kain kasa

Bahan:

- Bayam hijau
- Bayam merah
- Umbi wortel
- Petsai
- Buffer Tris-NaCl
- Es batu

- Tabung sentrifus 10 ml
- Sentrifugal
- Pipet pasteur
- Hemasitometer
- *Counter*
- Tissue
- Kertas lensa
- Alkohol 70%

IV. Tata Kerja

Luring

1. Petiklah daun bayam dari tangkainya dan pisahkan dari ibu tulang daun.
2. Cucilah daun bayam, umbi wortel dan petsai hingga bersih, lalu keringkan dengan tissue, dan ditimbang sebanyak 4g. Untuk wortel dan petsai sebelum ditimbang, dipotong-potong kecil terlebih dahulu.
3. Letakkan masing-masing sampel sayuran pada mortar dingin yang ditambah sedikit pasir kuarsa dan 15 mL buffer Tris-NaCl dingin, lalu haluskan menggunakan pestle selama 2 menit.
4. Saringlah suspensi yang diperoleh dari penggerusan tersebut dengan menggunakan kain kasa dan filtratnya ditampung ke dalam tabung sentrifus dingin.
5. Filtrat disentrifus pada kecepatan 200 rpm selama 1 menit. Supernatan yang dihasilkan dari sentrifugasi dipindahkan ke tabung sentrifus dingin yang baru dan dilakukan lagi sentrifus pada kecepatan 1300 rpm selama 5 menit.
6. Supernatan pada tabung sentrifus kemudian dibuang secara perlahan-lahan dengan menggunakan mikropipet.
7. Pada pelet ditambah 10 ml buffer Tris-NaCl dingin dan diresuspensi dengan Pipet Pasteur.
8. Tabung sentrifus ditutup, dibolak-balik beberapa kali, dan ditempatkan pada es batu
9. Suspensi kloroplas diambil dengan menggunakan Pipet Pasteur, lalu sebanyak satu tetes diletakkan di atas obyek glass dan ditutup dengan cover glass.
10. Apabila ada kelebihan cairan di sekitar *cover glass*, diserap menggunakan tisu.
11. Amatilah morfologi kloroplas dengan menggunakan perbesaran mikroskop 100x, 400x, dan 1000x (Lembar Kerja IV. 1A – 4A) dari masing-masing sampel sayuran hingga diperoleh gambaran yang jelas.
12. Hitunglah jumlah kloroplas (Lembar Kerja IV. 1B – 4B) dari masing-masing sampel sayuran dengan menggunakan haemasitometer. Pertama-tama permukaan haemasitometer dibersihkan dengan kertas lensa yang telah dibasahi dengan alkohol 70%. Lalu ambillah

suspensi kloroplas sebanyak $\pm 0,5$ ml dengan menggunakan pipet, dan sentuhkan ujung pipet di area atas kaca penutup haemasitometer hingga suspensi memenuhi keseluruhan area kamar hitung. Hitunglah jumlah kloroplas dari 5 wilayah R dari dua kamar hitung pada haemasitometer (Cat.: kloroplas yang dihitung hanya yang berada di area tengah dan yang di perbatasan kiri dan atas, sedangkan yang berada di perbatasan kanan dan bawah tidak dihitung). Jumlah kloroplas diperoleh dengan menggunakan rumus: $(\sum 5R \times FP) / (0,25 \times 10^{-6})$ ml

13. Bandingkan morfologi dan jumlah kloroplas dari masing-masing sampel sayuran (Lembar Kerja IV.5)

Referensi:

Heidcamp, W.H. *Cell Biology Laboratory Manual*.

<http://homepages.gac.edu/~cellab/contents.html>

Daring

1. Pelajari materi tambahan berdasarkan link berikut:
<https://youtu.be/6JJBvh-NQZA>
2. Buatlah alur kerja berdasarkan link tersebut.
3. Jawablah pertanyaan berikut ini:
 - a. Tujuan praktikum ini adalah
 - b. Tanaman yang biasa digunakan untuk isolasi kloroplas adalah
 - c. Kloroplas ditemukan pada
 - d. Kloroplas terbagi menjadi 3 kompartemen, sebutkan!
 - e. Jelaskan pengertian dan fungsi dari kloroplas
 - f. Apa saja pigmen yang dikandung dalam kloroplas dan letaknya
 - g. Jika nilai absorbansi pada panjang gelombang 650 nm dari sampel kloroplas yang telah diisolasi adalah 16,25, hitung konsentrasi klorofilnya.
 - h. Apa fungsi $MgCl_2$ pada prosedur isolasi kloroplas?
 - i. Apa fungsi dari penggunaan aseton pada isolasi kloroplas?

V. HASIL PENGAMATAN

Lembar Kerja IV.

1A. Gambaran morfologis kloroplas dari daun bayam hijau	1B. Jumlah kloroplas Kamar hitung 1: Kamar hitung 2: Rata-rata:
2A. Gambaran morfologis kloroplas dari daun bayam merah	2B. Jumlah kloroplas Kamar hitung 1: Kamar hitung 2: Rata-rata:
3A. Gambaran morfologis kloroplas dari umbi wortel	3B. Jumlah kloroplas Kamar hitung 1: Kamar hitung 2: Rata-rata:
4A. Gambaran morfologis kloroplas dari daun petsai	4B. Jumlah kloroplas Kamar hitung 1: Kamar hitung 2: Rata-rata:

MODUL V
PENGAMATAN MAKROMOLEKUL
KARBOHIDRAT DAN LIPID

I. Pendahuluan

Biomolekul adalah molekul organik yang pada umumnya terdapat pada sel hidup, seperti makromolekul dan penyusun makromolekul, metabolit dan molekul-molekul yang lain (vitamin, ATP, AMP, urea, dsb). Makromolekul dapat dibagi menjadi 4 kategori, yaitu: protein, asam nukleat, karbohidrat, dan lipid. Makromolekul sering disebut sebagai polimer (kecuali lipid) yang tersusun dari monomer-monomer dengan berat molekul yang lebih kecil.

1. Karbohidrat (CH_2O)_n

Karbohidrat merupakan sekelompok senyawa organik yang dapat mengalami reaksi kimia yang khas, seperti reaksi senyawaan aldehyd, keton, dan alkohol. Pembentuk karbohidrat dapat berupa monosakarida, disakarida, dan polisakarida. Contoh polisakarida adalah glikogen (penyimpan energi kimia pada hewan) dan pati (sumber energi pada tanaman). Molekul glikogen merupakan polimer glukosa bercabang dengan ikatan 1,4- α -glikosidik dan 1,6- α -glikosidik pada percabangan. Glikogen sebagai cadangan makanan tubuh tersimpan di dalam sel dengan bentuk terkonsentrasi dan apabila dilihat pada elektron mikrograf setelah pengecatan akan nampak sebagai granula berwarna hitam.

Pati terdiri dari amilosa (polimer glukosa dengan ikatan 1,4- α -glikosidik tanpa percabangan) dan amilopektin (polimer glukosa dengan ikatan 1,4- α -glikosidik dan 1,6- α -glikosidik pada percabangan). Granula pati bila diberi Iod akan berwarna biru. Pati yang diberi air dan dipanaskan akan menyerap air dan setelah mencapai suhu dan waktu tertentu maka granula pati akan pecah dan pati mengalami gelatinisasi. Pati yang mengalami gelatinisasi dapat didegradasi menjadi gula sederhana (glukosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, oligosakarida, dekstrin) oleh enzim amilase.

Tape adalah produk makanan fermentasi tradisional yang berasal dari ketelapohon maupun beras ketan. Kultur starter yang berisi jamur dan cendawan amilolitik akan memecah polisakarida menjadi gula sederhana yang dapat digunakan oleh cendawan untuk metabolisme menghasilkan alkohol. Adanya gula sederhana akan menjadikan tape berasa manis disertai dengan aroma alkohol.

2. Lipid

Lemak pada susu sapi berada sebagai suatu emulsi globula berukuran 1–5 mikron dalam suatu fase berair. Saat susu dihomogenisasi ukuran semua globula lemak diperkecil menjadi sekitar

1 mikron. Ini akan meningkatkan stabilitas emulsi dan mencegah pemisahan lemak sebagai lapisan krim. Globula lemak tersusun dari trigliserida, dengan bagian paling tidak jenuh berada di pusat globula dan bagian yang lebih jenuh (bertitik lebur lebih tinggi) di bagian luar. Globula tertutup oleh dua selubung, membran globula, yang terbuat dari lapisan fosfolipida dan protein dengan gugus hidrofobik terorientasi ke sisi dalam dan gugus hidrofilik terorientasi ke sisi luar globula.

Susu fermentasi/yogurt adalah bahan makanan dari susu hewani yang telah mengalami fermentasi oleh bakteri asam laktat sehingga memiliki kandungan asam yang cukup tinggi, sedikit atau tidak mengandung alkohol sama sekali, mempunyai tekstur semi padat, kompak serta rasa asam. Selama proses pembuatan yogurt, laktosa diubah menjadi asam laktat dengan bantuan mikroorganisme. Asam laktat yang dihasilkan sangat penting dalam pembuatan yogurt, karena selain dapat menurunkan pH susu, asam laktat yang dihasilkan juga berperan dalam menentukan tekstur, bentuk, maupun cita rasa flavour yogurt. Fermentasi karbohidrat akan menghasilkan senyawa yang memberi cita rasa pada yogurt antara lain asetaldehid, aseton, diasetil, asam format, asam asetat, dan asam propionat.

Lipid merupakan salah satu komponen penyusun membran sel. Lipid di membran bersifat hidrofobik dan larut pada pelarut nonpolar seperti alkohol. Dengan melarutkan lipid yang terdapat di membran sel, maka membran sel menjadi lisis dan komponen sel lain seperti protein, lipid, dan karbohidrat dapat dianalisis.

II. Tujuan Praktikum

1. Untuk membedakan granula pati segar, pati tergelatinisasi maupun pati yang telah terdegradasi oleh enzim.
2. Untuk membedakan globula lemak pada susu segar, susu pasteurisasi, susu UHT dan susu fermentasi.
3. Untuk mempelajari sifat kelarutan lipid di membran sel pada pelarut nonpolar.

III. Alat dan bahan

Alat:

- Mikroskop cahaya Olympus CX22 dengan micrometer
- Pisau / skapel stainless
- *Beaker glass*
- Ose
- Gelas preparat
- Penutup preparat
- Silet
- Kaca objek kultur
- *Stopwatch*

Bahan:

- Ketela pohon (*Manihot esculenta*)
- Tape ketela
- Susu sapi segar
- Susu UHT
- Susu fermentasi / yogurt
- Cat Iod (larutan Lugol)
- Buah bit segar
- 22 M methanol
- 8,5 M ethanol
- 3,0 M n-Propanol
- 1,1 M n-Butanol

IV. Cara kerja

1. Pembuatan pati dan gelatinisasi

- a) Ketela pohon dikupas dan diparut
- b) Ambillah 5 g parutan, diletakkan dalam beaker glass dan diberi air 10 mL
- c) Saringlah suspensi untuk memisahkan ampas dan pati yang larut air
- d) Panaskan larutan pati selama 2 menit sambil diaduk–aduk sampai terjadigelatinisasi (mengental).

2. Pembuatan preparat pati segar

- a) Ketela pohon, kentang dikupas dan digores lembut bagian dalamnya dengan pisau
- b) Goresannya diletakkan pada gelas preparat, ditetesi air dan diberi penutup
- c) Amati granula pati menggunakan mikroskop pada pembesaran 40 x 10 (Lembar Kerja V. 1A)
- d) Untuk memperjelas pengamatan tambahkan cat Iod dengan perbandingan 1:1 ((Lembar Kerja V. 1B)

3. Pembuatan preparat pati tergelatinisasi

- a) Ambillah 1 ose pati yang telah tergelatinisasi
- b) Letakkan pada gelas preparat, ditetesi air, dan diberi penutup
- c) Amatilah pati tergelatinisasi menggunakan mikroskop pada pembesaran 40 x 10 (Lembar Kerja V. 2A)
- d) Untuk memperjelas pengamatan tambahkan cat Iod dengan perbandingan 1:1 ((Lembar Kerja V. 2B)

4. Pembuatan preparat tape ketela

- a) Ambillah 1 ose tape ketela bagian tengah
- b) Letakkan pada gelas preparat, ditetesi air dan diberi penutup
- c) Amatilah granula pati dan komponen serat.menggunakan mikroskop pada pembesaran 40 x 10 (Lembar Kerja V. 3A)
- d) Untuk memperjelas pengamatan tambahkan cat Iod dengan perbandingan 1:1 ((Lembar Kerja V. 3B)
- e) Bandingkanlah struktur granula pati yang berasal dari ketela pohon, pati tergelatinisasi, dan pati dari tape ketela (Lembar Kerja V. 4)

5. Pembuatan preparat susu segar, susu pasteurisasi, susu UHT dan susu fermentasi

(yogurt)

- a) Ambillah satu tetes susu segar/pasteurisasi/UHT/fermentasi dengan pipetpasteur
- b) Letakkan pada gelas preparat kemudian diberi penutup
- c) Amatilah globula lemak menggunakan mikroskop pada pembesaran 40 x 10 (Lembar Kerja V. 5A-D)
- d) Bandingkan struktur globula lemak yang berasal dari susu segar, susu hasil pasteurisasi, susu UHT, dan susu fermentasi (yogurt) (Lembar Kerja V.6).

6. Pengujian Kelarutan Lipid dari membrane sel

- a) Potonglah tipis buah bit dan simpan potongannya pada kaca objek kultur
- b) Tambahkan 1 ml masing-masing larutan alcohol yang tersedia pada potongan buah bit yang berbeda atau hingga potongan buah bit terendam. Buah bit mengandung pigmen antosianin dan jika membrane sel mengalami lisis, maka antosianin akan keluar dari sel dan warna merah dapat diamati pada medium alkohol.

- c) Catatlah waktu yang diperlukan mulai dari waktu penetesan alkohol hingga warna medium di sekitar buah bit menjadi merah yang menandakan lipid pada membrane telah larut.
- d) Hitunglah koefisien penetrasi yaitu dengan membagi waktu yang diperlukan untuk melarutkan lipid pada membrane hingga pigmen keluar sel dengan molaritas larutan alkohol yang digunakan (Lembar Kerja V. 7A-D).
- e) Bandingkanlah koefisien kelarutan lipid berdasarkan perbedaan pelarut alkohol yang digunakan (Lembar Kerja V.8)

Referensi:

Heidcamp, W.H. *Cell Biology Laboratory Manual*.
<http://homepages.gac.edu/~cellab/contents.html>

V. Hasil Pengamatan

Lembar Kerja V

1A. Gambaran granula pati dari ketela pohon tanpa pengecatan	1B. Gambaran granula pati dari ketela pohon dengan pengecatan Iod
2A. Gambaran granula pati tergelatinisasi tanpa pengecatan	1B. Gambaran granula pati tergelatinisasi dengan pengecatan Iod

<p>7C. Kelarutan lipid oleh n-Propanol</p> <p>Waktu yang diperlukan untuk melarutkan lipid hingga tampak warna merah:</p> <p>Koefisien penetrasi:</p>	<p>7D. Kelarutan lipid oleh n-Butanol</p> <p>Waktu yang diperlukan untuk melarutkan lipid hingga tampak warna merah:</p> <p>Koefisien penetrasi:</p>
<p>8. Berdasarkan nilai koefisien penetrasi, manakah pelarut alcohol yang paling cepat melarutkan lipid di membrane sel?Jelaskan!</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	

Nilai:

Nama dan Tanda tangan Asisten:

MODUL VI
PENGUKURAN KADAR PROTEIN
SECARA KUANTITATIF

I. Pendahuluan

Protein adalah senyawa organik kompleks yang tersusun atas unsur Karbon(C), Hidrogen(H), Oksigen(O), Nitrogen(N) dan kadang-kadang mengandung zat Belerang(S), dan Fosfor(P). Protein juga merupakan polimer yang disusun oleh berbagai asam amino yang saling berhubungan dengan rantai amida/peptida dan membentuk polipeptida yang mempunyai berat molekul yang sangat bervariasi, dari 5000 hingga satu juta dalton. Ada empat tingkat struktur dasar protein, yaitu struktur primer, sekunder, tersier, dan kuarternner. Struktur primer menunjukkan jumlah, jenis, dan urutan asama amino dalam molekul protein.

Adanya protein dalam larutan dapat diketahui dengan uji kualitatif dan kuantitatif. Uji kuantitatif protein dapat dilakukan dengan metode Lowry, Bradford, atau Biuret. Uji protein yang paling mudah dan cepat adalah menggunakan larutan Biuret dan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar, lalu pengukuran kadar protein ditentukan menggunakan spektrofotometer. Spektrofotometri merupakan pengukuran jumlah cahaya yang diserap sampel. Alat spektrofotometer beroperasi dengan melewatkan gelombang cahaya melalui sampel dan mengukur intensitas cahaya yang mencapai detektor. Data yang ditampilkan dapat dalam bentuk %T (persentase transmisi) atau A (absorbansi). %T menunjukkan fraksi gelombang cahaya yang melalui sampel dan mencapai detektor. A menunjukkan jumlah gelombang cahaya yang diserap oleh sampel. Jumlah gelombang cahaya yang diabsorbsi sampel (A) berkaitan dengan konsentrasi molekul pada sampel yang menyerap cahaya tersebut.

II. Tujuan Praktikum

- Untuk menentukan kadar protein dari beberapa sampel sumber protein hewani dan nabati

III. Alat dan Bahan

Alat:

- Kuvet plastic 4 ml
- Mikropipet 100-1000 μ l
- Tips biru
- Spektrofotometer

Bahan:

- Putih telur atau 2% albumin
- Susu UHT 10%
- Susu kedelai 10%
- Reagen Bovine Serum Albumin (BSA)
- Larutan Biuret
- Akuades

IV. Prosedur Kerja Uji Kuantitatif Protein menggunakan Biuret dan BSA

Luring

- Larutan yang akan diuji adalah putih telur atau 2% albumin, susu UHT dan susu kedelai
- Buatlah larutan standar BSA dengan mencampurkan bahan-bahan di bawah ini dalam kuvet plastik 4 ml.

No.	Reagent	Tabung					
		1	2	3	4	5	6
1	Aquadest (μ l)	400	320	240	160	80	0
2	Standar BSA 10mg/ml(μ L)	0	80	160	240	320	400
3	Sampel	-	-	-	-	-	-
4	Biuret (μ L)	1600	1600	1600	1600	1600	1600

- Homogenisasikan campuran larutan dengan menggunakan mikropipet.
- Inkubasi pada 37°C selama 20 menit.
- Masukkan kuvet ke dalam spektrofotometer visual dengan panjang gelombang 540 nm dan dicatat nilai absorbaninya untuk masing-masing larutan (Lembar Kerja VI. 1)
- Buatlah kurva standar protein dengan memplotkan konsentrasi BSA dengan nilai absorbansinya (Lembar Kerja VI. 2).
- Untuk mengukur sampel, ambillah 400 μ l sampel dan dimasukkan kedalam kuvet.
- Tambahkandengan 1600 μ l pereaksi Biuret, lalu homogenisasikan perlahan dengan mikropipet.
- Inkubasi pada 37°C selama 20 menit.

- Masukkan kuvet ke dalam spektrofotometer visual dengan panjang gelombang 540 nm dan dicatat nilai absorbaninya untuk masing-masing larutan sampel ((Lembar Kerja VI. 3).
- Tentukan konsentrasi dari masing-masing sampel berdasarkan kurva standar yang telah dibuat (Lembar Kerja VI. 4)

Referensi:

Heidcamp, W.H. *Cell Biology Laboratory Manual*.

<http://homepages.gac.edu/~cellab/contents.html>

Daring

1. Pelajari materi tambahan berdasarkan link berikut:
<https://youtu.be/vfY3mVOIGBU> dan <https://youtu.be/IofKa-3L1iQ>
2. Praktikum virtual dilakukan dengan menggunakan link berikut:
<http://biomodel.uah.es/en/lab/abs/espectro.htm>
3. Buatlah alur kerja berdasarkan link pada poin 2.
4. Hasil praktikum berupa screenshoot semua aktivitas pada praktikum virtual pada poin 2 serta melampirkan hasil kurva standarnya. Pelaporan hasil praktikum virtual dilaporkan dalam format PDF.

V. Hasil Pengamatan

Lembar Kerja VI

1. Nilai Absorbansi standar BSA

Konsentrasi BSA	Jumlah BSA yang digunakan (µl)	Volume total (ml)	Konsentrasi BSA (µg/ml)	Nilai absorbans (A)
10 mg/ml	0	2		
	80	2		
	160	2		
	240	2		
	320	2		
	400	2		

2. Kurva Standar BSA

3. Nilai absorbansi sampel

- a) Putih telur =
- b) Susu UHT =
- c) Susu kedelai =

4. Konsentrasi sampel

- a) Putih telur =
- b) Susu UHT =
- c) Susu kedelai =

Nilai:

Nama dan Tanda tangan Asisten:

MODUL VII

ISOLASI DNA

I. Pendahuluan

Langkah-langkah dasar isolasi DNA adalah mengganggu struktur selular untuk membuat sebuah lisat, pemisahan DNA dari sel dan bahan tidak larut lainnya serta pemurnian DNA dari protein larut dan asam nukleat lainnya. Proses ini dilakukan dengan menggunakan ekstraksi organik (misalnya, fenol: kloroform) diikuti oleh presipitasi etanol (Sambrook and Russell, 2006).

Pemecahan sel dilakukan dengan garam chaotropik, deterjen atau denaturasi alkali (Wilkie, 1997). Lisat yang dihasilkan kemudian dibersihkan dengan sentrifugasi, filtrasi atau pembersihan magnetik. DNA dimurnikan dari bagian larut lisat tersebut. DNA dilarutkan dalam buffer berair seperti TE atau deion bebas nuklease. DNA yang sudah dimurnikan siap digunakan untuk berbagai macam aplikasi seperti multipleks PCR, ditambah dalam sistem transkripsi / terjemahan vitro, transfeksi dan reaksi sekuensing. Penyimpanan DNA di TE buffer membantu jika EDTA tidak mempengaruhi aplikasi hilir. Kelat EDTA atau pengikatan magnesium pada DNA dapat membantu menghambat kemungkinan kontaminasi oleh aktivitas nuclease.

(<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>, diunduh 26 Agustus 2015).

II. Tujuan praktikum

4. Untuk mempelajari teknik isolasi DNA dari berbagai sampel.
5. Untuk mengamati proses pemisahan DNA dari komponen sel lain

III. Alat dan bahan

Alat:

Sentifugasi

Waterbath 80° C, 37° C dan 65° C
(opsional)

Tabung sentrifuga 1,5 ml.

Micropestle

Syringes 1 ml

Bahan:

Ikan salmon

Daun bayam

Kultur sel bakteri *Escherichia coli*

Kit Wizard ® Genomic DNA Purification Kit:

-Cell lysis Solution (PROMEGA)

-Protein precipitation solution (PROMEGA)

Mikropipet 100-1000 μ l	-Nuclei lysis solution (PROMEGA)
Labtip biru	-DNA Rehydration solution (PROMEGA)
Mikropipet 20-200 μ l	-RNase A Solution (PROMEGA)
Labtip kuning	Proteinase K 10 mg
Mikropipet 0,5-10 μ l	1 KB DNA ladder
Labtip putih	Isopropanol (T ^o ruangan)
Vortex	Etanol 70% (T ^o ruangan)
Sarung tangan (S,M,L)	Es
Bolpoint marker	Tissue paseo
	Etanol absolute
	EDTA
	Tris-Cl 1 M : 1 g Tris Base dan HCl

IV. Tata kerja

Luring

4.1 Isolasi DNA dari tanaman

1. Beri keterangan sampel pada tabung sentrifuga dengan spidol marker.
2. Gunakan tutup tabung sentrifuga untuk mencetak ukuran sampel daun agar seragam berbentuk bulat dengan menjepit daun dengan penutup tabung mikrosentrifugasi. Buatlah 2 sampel.
3. Tambahkan 600 μ l *Nuclei Lysis Solution* (NLS) ke dalam tabung sentrifuga.
4. Geruslah sampel dan larutan dengan menggunakan micropestle, homogenisasi selama 1-2 menit.
5. Inkubasi sampel pada suhu 65°C selama 15 menit sambil di bolak balik.
6. Tambahkan 3 μ l larutan RNase kemudian di homogenisasi. Inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Dinginkan pada suhu ruangan selama 5 menit.
7. Tambahkan 200 μ l Larutan Presipitasi Protein (LPP) kemudian di vortex.
8. Sentrifugasilah pada 13.000 g selama 3 menit.
9. Pindahkan supernatant ke dalam tabung sentrifugasi baru yang telah diberi nama.
10. Tambahkan 600 μ l etanol absolut suhu ruang, homogenisasi sampai terlihat benang-benang putih selama 1 menit.
11. Sentrifugasi 14.000 g selama 1 menit.
12. Buang supernatant. Kemudian tambahkan 600 μ l etanol 70% suhu ruang. Homogenisasi.

13. Sentrifugasi 14.000 g selama 1 menit.
14. Buang etanol, biarkan etanol menguap dan kering anginkan pellet selama 10 menit-15 menit.
15. Tambahkan 75 µl larutan *DNA rehydration* dan biarkan overnight pada 4°C.

4.2 Isolasi DNA dari hewan

1. Beri keterangan sampel pada tabung sentrifuga dengan spidol marker.
2. Sampel hewandipotong berukuran 0,3 x 0,3 x 0,3 cm dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga. Tambahkan 600 µl *Nuclei Lysis Solution*(NLS) dingin dan gerus dengan micropestle selama 1-2 menit.
3. Inkubasi sampel pada suhu 65°C selama 15 menit, sambil di bolak balik.
4. Tambahkan 3 µl larutan RNase kemudian di homogenisasi. Inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Dinginkan pada suhu ruangan selama 1 menit.
5. Tambahkan 200 µl Larutan Presipitasi Protein (LPP). Vortex, kemudian didinginkan pada es selama 5 menit.
6. Sentrifugasilah pada 13.000 g selama 4 menit.
7. Pindahkan supernatant ke dalam tabung sentrifugasi baru yang telah diberi nama.
8. Tambahkan 600 µl etanol absolut suhu ruang, homogenisasi sampai terlihat benang-benang putih.
9. Sentrifugasi 14.000 g selama 1 menit.
10. Buang supernatant. Kemudian tambahkan 600 µl etanol 70% suhu ruang. Homogenisasi.
11. Sentrifugasi 14.000 g selama 1 menit.
12. Buang etanol, biarkan etanol menguap dan kering anginkan pellet selama 10 menit-15 menit.
13. Tambahkan 75 µl larutan *DNA rehydration* dan biarkan overnight pada 4°C.

4.3 Isolasi DNA dari Kultur Bakteri gram negatif

1. Tambahkan 1 ml kultur bakteri usia semalam ke dalam tabung mikrosentrifugasi.
2. Sentrifugasi pada 13000-16000 x g , selama 2 menit → buang supernatan
3. Tambahkan 600 µl *Nuclei Lysis Solution* (NLS) pada pellet. Pipet dengan hati-hati berkali-kali sampai tercampur rata.
4. Inkubasi selama 5 menit pada 80°C, kemudian dinginkan pada suhu ruang.
5. Tambahkan 3 µl larutan RNase , kemudian mix.

6. Inkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit kemudian dinginkan pada suhu ruang selama 1 menit
7. Tambahkan 200 µl *Protein Precipitation Solution* (PPS), kemudian vorteks
8. Inkubasi sampel dalam es selama 5 menit.
9. Sentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 13.000 g.
10. Pindahkan supernatan ke tabung mikrosentrifugasi baru yang berisi 600 µl etanol absolut, suhu ruangan. Kemudian campurkan merata.
11. Selanjutnya disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13.000 g.
12. Buang supernatant, hati-hati dengan pellet jangan sampai hilang. Kemudian tambahkan 600 µl etanol 70% (suhu ruangan) dan dibalik-balik berkali-kali sampai tercampur rata.
13. Sentrifugasi selama selama 2 menit pada 14.0000 g.
14. Buang supernatant dengan hati-hati, jangan sampai pellet hilang. Kering anginkan pellet selama 10-15 menit.
15. Tambahkan 100 µl *Rehydration solution*, biarkan overnight pada 4° C

Referensi

- Sambrook J. and Russell D. W. (2006) Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols* 3, pdb.prot4455.
- Wilkie S. (1997) Isolation of Total Genomic DNA. In *Plant Molecular Biology- A laboratory Manual* (Edited by Clark M. S.), p. 3-14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Daring

1. Pelajari materi tambahan berdasarkan link berikut:
<https://youtu.be/h5Wb8O9Q7ZM>
2. Buatlah alur kerja berdasarkan link pada poin 1 dan dibuat dalam format PDF.
3. Pelaksanaan praktikum virtual dapat menggunakan link berikut:
<https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/>
4. Setiap siswa diharapkan dapat melaksanakan praktikum "kitchen DNA" secara mandiri dan melaporkan proses kerja dan hasil berupa foto-foto. Link yang digunakan sebagai berikut:
<https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/howto/>

V. HASIL PENGAMATAN

Lembar Kerja

1. Gambarkan/ fotokondisi larutan setelah diberi etanol absolute.	2. Gambarkan kondisi larutan setelah diberi ethanol 70%.
3. Foto hasil Isolasi (pellet)	
<p>Pertanyaan:</p> <p>Jelaskan</p> <p>(a) Mengapa perlu proses perusakan sel?</p> <p>(b). Untuk apa ditambahkan RNase pada praktikum ini?</p> <p>(c). Apakah bedanya sel hewan, sel tumbuhan, dan sel prokariot?</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

MODUL VIII

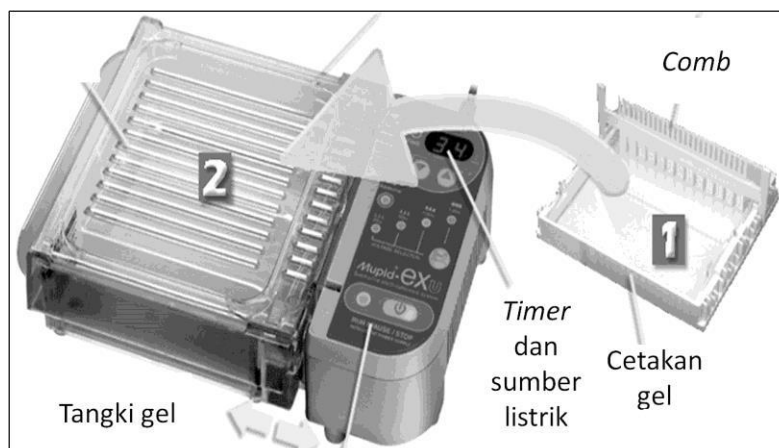
ELEKTROFORESIS

I. Pendahuluan

Elektroforesis gel adalah teknik yang banyak digunakan untuk menganalisis protein dan asam nukleat. Laboratorium penelitian secara rutin menggunakan elektroforesis gel agarosa untuk memisahkan dan analisis DNA.

Elektroforesis adalah metoda memisahkan molekul berdasarkan tingkat pergerakan saat dilalukan dengan medan listrik. Ada banyak jenis elektroforesis, tetapi unit elektroforesis horizontal paling umum digunakan untuk memisahkan molekul DNA pada agarosa gel. Agarosa adalah polisakarida yang berasal dari rumput laut dan dimurnikan. Agarosa berasal dari sumber yang sama dengan agar-agar produk makanan sehingga tidak bersifat toksik. Namun, gel mengandung penyangga untuk konduktivitas dan bahan laboratorium lain, sehingga **tidak untuk dikonsumsi**.

Gel agarosa dibuat dengan melarutkan bubuk agarosa dalam larutan buffer dan dituangkan ke elektroforesis apparatus dan didinginkan. Selama elektroforesis berlangsung, gel direndam pada tangki elektroforesis yang berisi larutan buffer yang membawa elektroda positif dan negatif. DNA akan “dipaksa” melalui pori-pori gel oleh arus medan listrik. DNA akan bergerak ke elektroda positif (merah) dan menjauhi elektroda negatif (hitam). Beberapa faktor mempengaruhi seberapa cepay DNA bergerak, diantaranya kekuatan medan listrik, konsentrasi gel agarosa dan ukuran molekul DNA. Molekul DNA yang lebih kecul bergerak melalui gel agarose lebih cepat dibandingkan molekul yang lebih besar. DNA sendiri tidak terlihat dalam gel agarosa. DNA akan divisualisasikan dengan menggunakan pewarna yang mengikat DNA.



Gambar 8.1. Alat elektroforesis (Modifikasi dari:

http://www.helixxtec.com/images/Helixx/C/MupidexU/exU_main.gif)

II. Tujuan praktikum

Untuk menentukan ada tidaknya hasil Isolasi DNA dan melakukan quantifikasi produk isolasi DNA.

III. Alat dan bahan

Alat:

Parafilm

Mikropipet 0,5-10 μ l

Labtip putih

Vortex

Sarung tangan

Alat elektroforesis

UV transiluminator

Kamera

Bahan:

Sampel DNA

Loading dye

Pewarna Gel

Es

Bubuk gel agarosa

TAE buffer

Marker/ladder

IV. Tata kerja

Luring

4.1 Membuat Agarose 0,7% untuk pemeriksaan DNA

1. Ukur 0,8 g bubuk agarosa
2. Tuang bubuk agarosa ke dalam beaker glass/ erlenmeyer. Tuangkan 1x buffer TAE, panaskan dengan microwave/ kompor elektrik/ *waterbath*. Larutkan bubuk agarosa sampai seluruhnya larut.
3. Biarkan larutan agarosa pada suhu kamar selama 3-5 menit.

Perhatian: Larutkan secara perlahan. Jauhkan dari sumber panas apabila mendidih.

4. Taruh *comb* pada cetakan gel dan tuangkan larutan agarosa.

Catatan: Tuangkan perlahan untuk menghindari gelembung yang akan mengganggu gel.

Gelembung dapat mengganggu proses pemisahan sampel.

5. Tempatkan gel pada suhu 4 °C selama 10-15 menit atau diamkan pada suhu kamar selama 20-30 menit, sampai telah benar-benar padat.

6. Tambahkan 3 μ l larutan RNase. Inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Dinginkan sampel pada suhu ruang selama 5 menit.

4.2. Loading sampel dan elektroforesis

1. Angkat *comb* setelah gel memadat.
2. Tambahkan 1x TAE buffer pada tangki gel dan masukkan gel yang telah memadat.
3. Rentangkan parafilm.
4. Tambahkan 1 μ l *loading dye* di atas parafilm. Jumlah *loading dye* disesuaikan dengan jumlah sampel. Tambahkan sampel DNA sebanyak 2 μ l. Campurkan *loading dye* dan sampel dengan baik. Siapkan marker atau ladder.
5. Masukkan marker atau ladder pada sumur pertama. Lakukan perlahan untuk mencegah terbentuknya gelembung.
6. Masukkan sampel DNA
7. Jalankan proses elektroforesis pada 80-100V sampai *loading dye* mencapai 75-80% gel.
Catatan: Warna Hitam negatif, merah positif. (DNA selalu bergerak ke arah elektroda positif)
8. Waktu *run* kurang lebih 1-1,5 jam, tergantung pada konsentrasi gel dan tegangan.
9. Matikan listrik, lepaskan elektroda dari sumber listrik, dan kemudian dengan hati-hati pindahkan gel dari kotak gel.
10. Menggunakan perangkat yang memiliki sinar UV, visualisasikan fragmen DNA saudara.
Catatan: Bila menggunakan sinar UV, melindungi kulit Anda dengan memakai kacamata keselamatan atau pelindung wajah, sarung tangan dan jas lab.

Referensi

- Ogden R. C. and Adams D. A. (1987) [8] Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. In *Methods in Enzymology* (Edited by Colowick S. P. and Kaplan N. O.), Vol. 152, p. 61-87. Academic Press, New York.
- Sambrook J. and Russell D. W. (2006) Agarose Gel Electrophoresis. Cold Spring Harbor Protocols **3**, pdb. prot4455.

Daring

1. Praktikum ini menggunakan 2 situs dan salah satunya meminta anda melakukan register.

Situs pertama yang digunakan dalam praktikum ini adalah
: <https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

Situs tersebut ada dapat akses secara bebas tanpa perlu melakukan registrasi. Ini adalah praktikum pertama anda.

Situs yang kedua (link di bawah), ada dapat melakukan register for free dengan mengisi data yang diinginkan, harap mengunjungi situs di bawah ini dan melakukan registrasi free. Masuklah ke dalam situs dengan menggunakan Google dan gunakan email unpad.

www.labxchange.org

2. Silahkan anda membuat alur kerja berdasarkan atas video pembelajaran pada link berikut ini :

<https://youtu.be/vq759wKCCUQ>

HASIL PENGAMATAN

Lembar Kerja

1. Gambarkan gel hasil elektroforesis.

.....
.....
.....
.....
.....

Nilai:

Nama dan TTD Asisten:

MODUL IX

ENZIM RESTRIKSI

I. Pendahuluan

Enzim khusus disebut enzim restriksi telah ditemukan di banyak bakteri yang berbeda dan organisme bersel tunggal lainnya. Enzim ini mampu mengenali panjang DNA dengan urutan tertentu. Sisi pengenalan umumnya 4-6 pasang basa. Enzim akan melekat pada molekul DNA dan memotong DNA double helix. Enzim restriksi akan terus melakukan hal ini sepanjang ari molekul DNA yang dikenali menjadi fragmen-fragmen. Ukuran fragmen ini diukur dalam pasangan basa atau kilobasa (1000 basa) pasang.

Urutan basa yang dikenali oleh enzim restriksi berbeda-beda. Jika hendak menggunakan enzim restriksi untuk proses kloning (perbanyak gen), maka perlu diperhatikan sisi pengenalan enzim yang digunakan. Pada percobaan kali ini akan dipergunakan enzim restriksi *Eco RI*. Enzim ini adalah enzim endonuklease diisolasi dari strain *E. coli*. Sisi pengenalan enzim ini adalah sebagai berikut:



II. Tujuan praktikum

1. Memahami apa enzim restriksi DNA dan bagaimana cara kerjanya.
2. Membandingkan sampel DNA utuh dan sampel DNA yang telah di restriksi

III. Alat dan bahan

Alat:

Parafilm

Mikropipet 0,5-10 μ l

Labtip putih

Mikropipet P20

Labtip kuning

Vortex

Tabung sentrifugasi 1,5 ml

Sarung tangan

Alat elektroforesis

Bahan:

Sampel DNA

Enzim EcoRI (Thermofisher Scientific)

Buffer restriksi EcoRI (Thermofisher Scientific)

Loading dye

Pewarna Gel

Es

1% gel agarosa

TAE buffer

UV transiluminator

Marker/ladder

Kamera

Nuclease-free water

Waterbath bersuhu 37 °C

IV. Tata kerja

Membuat larutan restriksi

1. Tambahkan secara berurutan: 16 μ l *nuclease-free water*; 2 μ l 10x Buffer EcoRI; dan 1 μ l DNA (0,5 - 1 μ g/ μ l) ke dalam tabung sentrifuga 1,5 μ l.
2. Tambahkan enzim EcoRI sebanyak 1 μ l.
3. Campurkan perlahan dan setrifugasi cepat selama beberapa detik.
4. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C.
5. Cek hasil restriksi dengan gel agarosa 1% dan pergunakan marker atau ladder.

Referensi

http://ceprap.ucdavis.edu/Equipment/Protocols/restriction_enzyme_analysis-methylene_blue_stain_03.pdf

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012089_EcoRI_10_UuL_5000U_UG.pdf

Greene, J.J. and V.B.R. Rao (eds). 1998. Recombinant DNA Principles and Methodologies. 1st ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

HASIL PENGAMATAN

Lembar Kerja

1. Gambarkan gel hasil elektroforesis.

2. Foto hasil elektroforesis

Pertanyaan:

1. Apakah terdapat perbedaan antara DNA utuh dan DNA hasil restriksi?
2. Apakah yang akan terjadi jika waktu restriksi lebih dari 1 jam?

3.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

MODUL X

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

I. Pendahuluan

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik yang digunakan secara luas dalam biologi molekuler. Proses ini digunakan untuk memperbanyak DNA menjadi banyak salinan identik. PCR dapat menghasilkan jutaan salinan dari satu untai template DNA dalam beberapa jam. Nama PCR berasal dari komponen utama yang digunakan dalam proses, DNA polimerase, yang dapat digunakan karena dapat bekerja pada suhu tinggi (Brown, 2010).

Proses pertama dalam PCR adalah *denaturasi*, melibatkan pemanasan sampai suhu tinggi mengakibatkan DNA menjadi terdenaturasi, ini menyebabkan molekul DNA terpisah menjadi 2 helai tunggal yang bertindak sebagai template dimana kopi DNA dapat dibuat. Tahap kedua adalah *annealing*, memerlukan penggunaan oligonukleotida yang disebut DNA primers, yang merupakan bagian pendek dari DNA beruntai tunggal. Primer menempel pada nukleotida spesifik yang komplementari kedua rantai DNA dan menjadi titik awal proses replikasi. Tahap akhir dari PCR adalah *extension* di nukleotida akan ditambahkan dengan bantuan DNA polimerase sehingga akan terjadi penambahan panjang rantai nukleotida. Proses ini terjadi untuk kedua untai tunggal *template*.

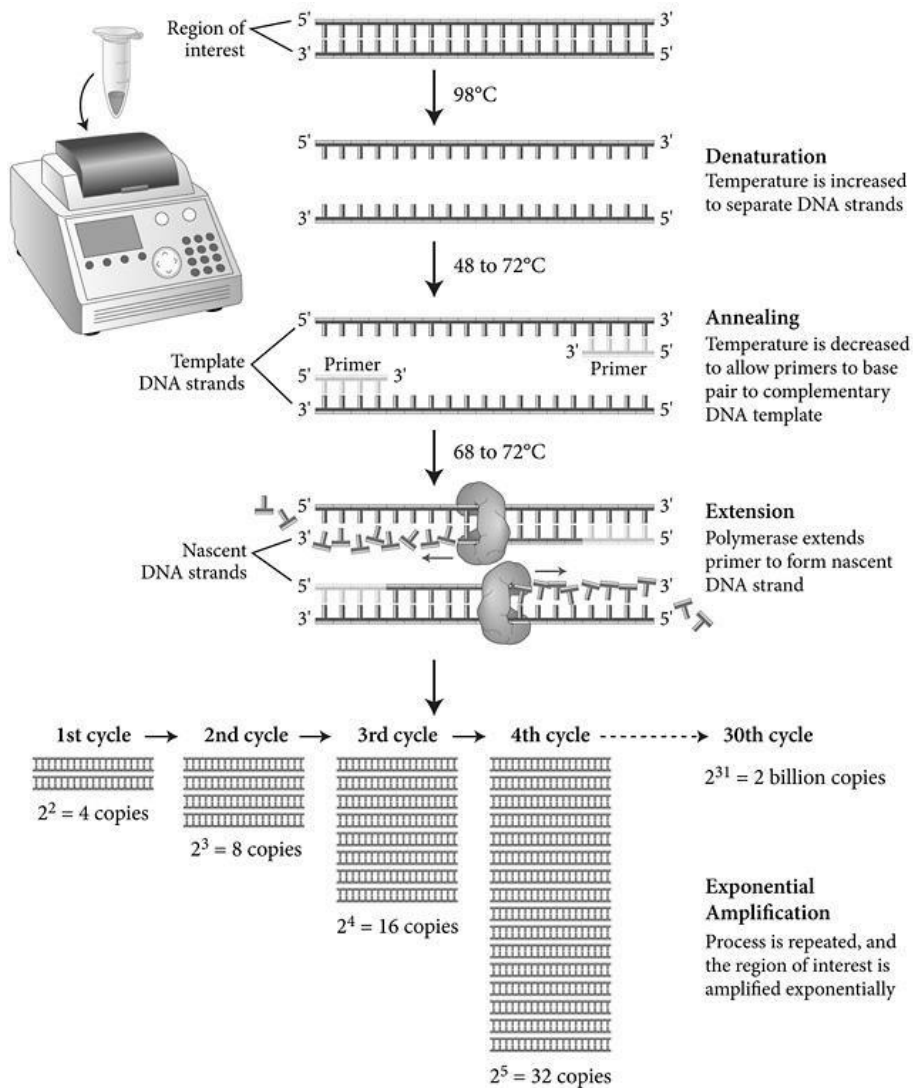
Ketiga tahap di atas disebut sebagai siklus. Setiap siklus akan menggandakan jumlah cetakan DNA. Dua salinan DNA akan dihasilkan setelah siklus 1; 4 salinan DNA akan diproduksi pada siklus 2, 8 kopi dihasilkan pada siklus 3, dan seterusnya, sehingga pada saat siklus 30 telah akan dihasilkan 1.073.741.824 kopi DNA yang identik!

PCR dapat diterapkan untuk berbagai aplikasi, seperti genetika, pertanian, peternakan, ekologi, forensik dan medis

diadopsi dari

www.strath.ac.uk/media/faculties/hass/knowledgeexchange/biolab/PCR_lab_manual.PDF.

Diunduh 26 Agustus 2015



Gambar X.1 Siklus PCR (<https://www.neb.com/products/pcr-polymerases-and-amplification-technologies/master-mixes/master-mixes>)

II. Tujuan praktikum

1. Untuk mempelajari tahapan persiapan PCR
2. Untuk mengamati proses PCR
3. Untuk mempelajari hasil PCR

CATATAN: PRAKTIKUM INI AKAN BERLANGSUNG SELAMA 2 HARI.

III. Alat dan bahan

Alat:

Sentifuga

Tabung sentrifuga 1,5 ml.

Mikropipet 20-200 μ l

Labtip kuning

Mikropipet 0,5-10 μ l

Labtip putih

Vortex

Sarung tangan

Tabung PCR 0,2 ml

Mesin PCR

Perlengkapan elektroforesis.

Bahan:

DNA hasil isolasi yang telah diencerkan

PCR Green master (DNA polymerase, PCR buffer, MgCl₂, dan dNTPS).

Nuclease-free water

Primer RAPD

100 bp DNA ladder

Es

Gel agarosa 1,5%

1 X TAE buffer

IV. Tata kerja

Luring

1. Masing-masing menyiapkan 2 tabung PCR, untuk control negatif dan sampel. Beri nama dengan marker
2. *Thawing* Green master PCR, kemudian vortex perlahan dan sentrifugasi.
3. Letakkan tabung PCR di atas es. Pada tabung masukkan larutan sebagai berikut secara berurutan:

Green master PCR Master Mix (2X)	12,5 μ l
Primer forward	0,1-1,0 μ M
Primer Reverse	0,1-1,0 μ M
DNA template	10 pg- 1 μ g
Nuclease-free water	Hingga 25 μ l
Volume total	25 μ l

4. Vortex sample perlahan dan sentrifugasi cepat.

5. Lakukan PCR dengan siklus sebagai berikut:

Tahap	Suhu, °C	Waktu	Jumlah siklus
Pre- denaturasi	95	1-3 menit	1
Denaturasi	95	30 detik	25-40
<i>Annealing</i>	Tm-5	30 detik	

<i>Extention</i>	72	1 menit	
Final extention	72	5 menit	1

6. Setelah proses PCR selesai, pindahkan sampel saudara ke dalam es dan masukkan sampel PCR ke dalam freezer sampai pengecekan.

7. Periksa hasil PCR saudara dengag gel agarosa 1,5%

8. Hitung nilai *relative mobility (Rf)* dari larik-larik DNA yang dihasilkan dengan rumus :

$$Rf = \frac{\text{jarak fragment DNA yang bermigrasi dari sumur}}{\text{Jarak dari sumur ke titik referensi (loading dye)}}$$

Referensi

Brown T. A. (2010) *Gene Cloning and DNA analysis*. Wiley-Blackwell, West Sussex.

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012702_DreamTaq_K1071_UG.pdf

Daring

1. Silahkan Saudara membuat tugas alur kerja berdasarkan atas video berikut ini :

<https://youtu.be/NYIT3f-MZ5o>

Laporan praktikum dibuat berdasarkan simulasi dari Polymerase Chain Reaction.

2. Praktikum ini menggunakan 1 situs yaitu :

https://media.hhmi.org/biointeractive/vlabs/bacterial_id/index.html

Setelah Saudara mengerjakan simulasi ini buatlah laporan praktikum dengan melakukan screenshot hasil PCR dan jelaskan pengertian angka-angka yang dihasilkan dalam proses tersebut.

V. HASIL PENGAMATAN

Lembar Kerja

1. Gambarkan Hasil PCR saudara

2. Foto hasil Isolasi (pellet)

3. Buatlah tabel Rf saudara.

4. Jelaskan hasil PCR saudara.

LAMPIRAN
PEMBUATAN LARUTAN

<ul style="list-style-type: none"> • Larutan NaCl Fisiologis <p>Larutkan 9 gr NaCl dengan akuades hingga volume akhir 1 L.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Buffer Fosfat 0,2 M pH 7,5 <p>Larutkan 24,14 gr Na₂HPO₄ dan 4,08 gr KH₂PO₄ dalam 800 ml akuades, lalu tambahkan akuades hingga volume akhir 1 L.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Larutan Sukrosa 0,25 M <p>Larutkan 8,55 gr sukrosa dengan lautan buffer hingga volume akhir 100 ml.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Phosphate buffered saline - 10X (10X PBS) <p>Larutkan 80 gr NaCl, 2 gr KCl, 15 gr Na₂HPO₄ dan 2 gr KH₂PO₄ dengan 1 L akuades. ini adalah larutan PBS 10X. encerkan dengan perbandingan 1:10 dengan akuades sebelum digunakan. Simpan dalam lemari es.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Methylene blue 1,5% <p>Larutkan 1,5 gr Methylene blue pada 2-3 ml ethanol absolute. Tambahkan akuades hingga volume akhir 100 ml</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Janus Green B 0,01% <p>Larutkan 10 mg Janus Green B pada 2-3 ml ethanol absolute. Tambahkan akuades hingga volume akhir 100 ml</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Buffer Tris-NaCl <p>Larutkan 6,05 gr Tris dan 8,76 gr NaCl dengan 800 ml akuades. Tentukan ph hingga 7,5 dengan menambahkan larutan HCl 1 M (9 ml HCl 35% yang dilarutkan dengan akuades hingga volume akhir 100 ml) dan tambahkan kembali akuades hingga volume akhir 1 L. Buffer Tris-NaCl stabil hingga 3 bulan pada suhu 4°C.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Metanol 22 M (densitas= 0,7914 g/ml; BM= 32,04) <p>Larutkan 890,7 ml methanol absolute dengan akuades hingga volume akhir 1 L</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Etanol 8,5 M (densitas= 0,7893 g/ml; BM= 46,07) <p>Larutkan 522,2 ml etanol absolute dengan akuades hingga volume akhir 1 L</p>
<ul style="list-style-type: none"> • n-Propanol 3 M (densitas 0,8035 g/ml; BM= 60,11) <p>Larutkan 224,4 ml n-Propanol dengan akuades hingga volume akhir 1 L</p>
<ul style="list-style-type: none"> • n-Butanol 1,1 M (densitas= 0,8098 g/ml; BM= 74,12)

Larutkan 100,7 ml n-Butanol dengan akuades hingga volume akhir 1 L

- **1 M Tris -Cl**

121.1 gram Tris base (berat molekul = 121.1

Larutkan dengan 800 ml ddH₂O menggunakan magnetic stirrer.

Sesuaikan pH hingga mencapai 8, 0 dengan HCl (\pm 45 ml).

Sesuaikan hingga volume total 1000 ml.

Autoclave.

- **0,5 M EDTA**

186.12 gram EDTA.Na₂.2H₂O dilarutkan dalam 700 ml ddH₂O menggunakan magnetic stirrer.

Sesuaikan pH hingga mencapai 8,0 dengan pellet NaOH atau 10 N NaOH.

Sesuaikan hingga mencapai volume total 1000 ml.

Autoclave.

- **50X TAE larutan Stok**

242 g Tris Base (MW=121.1)

57.1 mL Asam asetat glacial

100 mL 0.5 M EDTA

Larutkan Tris dengan bantuan magnetic stirrer dalam 600 mL of ddH₂O. Tambahkan

EDTA and asam asetat. Sesuaikan hingga volume total 1000 ml dengan ddH₂O. Simpan dalam suhu kamar.