



**UNIVERSITAS
MULAWARMAN**
Pusat Unggulan Studi Tropis

MODUL PRAKTIKUM BIOTEKNOLOGI PERTANIAN



**Program Studi Agroekoteknologi
Fakultas Pertanian**

**Disusun Oleh:
Tim Pengasuh Praktikum**

**MODUL PRAKTIKUM
BIOTEKNOLOGI PERTANIAN**



**OLEH:
Tim Pengasuh Praktikum**

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS MULAWARMAN
2026**

**LEMBAR PENGESAHAN
MODUL PRAKTIKUM
BIOTEKNOLOGI PERTANIAN**

Disusun Oleh :

Prof. Dr.sc.agr. Nurhasanah, S.P., M.Si.
NIP. 19751027 200501 2 002

Prof. Widi Sunaroyo, SP. M.Si., Ph.D.
NIP. 19730402 199903 1 002

Dr. Ir. Syakhril, M.Si.
NIP. 19620206 198803 1 003

Dr. Ir. Hj. Ellok Dwi Sulichantini, M.Si.
NIP. 19631226 198903 2 001

Dr. Rabiatul Jannah, S.P., M.P.
NIP. 19740609 200212 2 001

Dr. Nurul Puspita Palupi, S.P., M.Si.
NIP. 19750829 200604 2 003

Ananda Nuryadi Pratama, S.P., Ph.D.
NIP. 19910118 202506 1 005

Indah Sriwahyuni, B.Sc, M.P.
NIP. 19930614 202203 2 017

Roro Kesumaningwati, S.P., M.Sc.
NIP. 19810831 200312 2 003

Lusiyanto, S.P., M.P
NIP. 19900616 202421 1 001

Desy Norfary Yanti, S.P
NIP. 19801221 202421 2 001

*Modul ini disusun sebagai pedoman dan acuan dalam pelaksanaan
Praktikum Bioteknologi Pertanian, Jurusan Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas
Mulawarman*

Dinyatakan dapat digunakan

Disahkan pada tanggal 20 April 2026

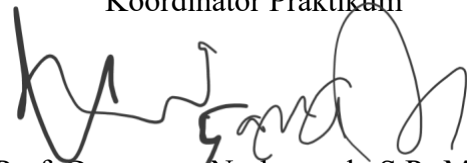
Mengetahui,

Ketua Jurusan Agroekoteknologi



Kadis Mujiono, S.P., M.Sc., Ph.D.
19810323 200604 1 002

Koordinator Praktikum



Prof. Dr. sc. agr. Nurhasanah, S.P., M.Si.
NIP. 19751027 200501 2 002



KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan YME atas terselesaikannya penulisan Modul Praktikum Bioteknologi Pertanian ini. Modul ini disusun sebagai pedoman bagi mahasiswa dalam melaksanakan praktikum pada mata kuliah Bioteknologi Pertanian di Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Mulawarman. Praktikum ini dirancang untuk memberikan pemahaman praktis mengenai teknik-teknik dasar dalam bioteknologi yang sangat penting dalam bidang pertanian, seperti isolasi DNA, uji kualitas dan kuantitas DNA, amplifikasi gen menggunakan PCR, dan analisis hasil PCR melalui elektroforesis gel agarosa.

Kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam penyusunan modul ini, khususnya kepada rekan-rekan di program studi Agroekoteknologi yang telah memberikan masukan, referensi, dan dukungan teknis dalam proses penyusunan. Semoga modul ini dapat memberikan manfaat yang besar, khususnya bagi mahasiswa yang akan mengikuti praktikum ini, serta dapat memperdalam pemahaman mereka dalam penerapan bioteknologi di bidang pertanian.

Kami berharap modul ini dapat digunakan secara efektif sebagai sumber pembelajaran praktis dan teoretis, dan dapat memperkaya wawasan mahasiswa dalam mengembangkan keterampilan teknis yang diperlukan untuk mengaplikasikan bioteknologi dalam bidang pertanian yang lebih luas.

Samarinda, April 2026

Penulis



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	1
DAFTAR ISI	2
TATA TERTIB PRAKTIKUM	3
ACARA 1. ISOLASI DNA TUMBUHAN	5
Tujuan Praktikum.....	6
Bahan	6
Alat.....	6
Prosedur Isolasi DNA Tumbuhan	7
ACARA 2. UJI KUALITAS DAN KUANTITAS DNA	8
Tujuan Praktikum.....	9
Bahan	9
Alat.....	9
Prosedur Uji Kualitas dan Kuantitas DNA	9
ACARA 3. AMPLIFIKASI GEN <i>ARTI</i> MENGGUNAKAN PCR	11
Tujuan Praktikum.....	12
Bahan	12
Alat.....	12
Prosedur Amplifikasi Gen <i>ARTI</i> Menggunakan PCR	12
ACARA 4. ELEKTROFORESIS DAN INTERPRETASI HASIL	14
Tujuan Praktikum.....	17
Bahan	17
Alat.....	17
Prosedur Elektroforesis dan Interpretasi Hasil	17
DAFTAR PUSTAKA	19



TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Praktikum

- a) Praktikum Bioteknologi wajib diikuti oleh semua mahasiswa yang mengambil mata kuliah Kultur jaringan dan bioteknologi
- b) Penilaian praktikum terdiri atas penilaian kehadiran, *pre-test*, *post-test*, laporan akhir.
- c) Pelaksanaan praktikum terdiri dari keaktifan praktikan dalam melaksanakan praktikum (Keterampilan, kerjasama, dan kecekatan)
- d) Praktikan wajib mengenakan jas lab. Jika tidak mengenakan jas lab maka tidak diperkenankan mengikuti praktikum

2. Presensi

- a) Praktikan wajib hadir pada semua percobaan yang dilaksanakan dalam rangkaian praktikum, jika praktikan tidak mengikuti salah satu dari percobaan praktikum, praktikan di anggap tidak lulus praktikum
- b) Praktikan wajib datang 5 menit sebelum praktikum dimulai, sehingga praktikum bisa terlaksana tepat waktu.
- c) Keterlambatan praktikan lebih dari 15 menit dari jadwal praktikum tanpa alasan yang jelas mengakibatkan mahasiswa yang bersangkutan tidak diperkenankan mengikuti seluruh rangkaian praktikum hari itu.

3. Data pengamatan praktikum

- a) Semua data dari praktikum harus dicatat dan disimpan buat laporan akhir praktikum yang akan dikumpul sebelum ujian akhir semester.

4. Laporan praktikum

- b) Setiap kelompok membuat laporan akhir diketik pada kertas A4, format text times new roman font 12 dan disampul dengan warna sampul hijau dan dijilid rapi
- c) Susunan praktikum meliputi:
 - 1) Cover/sampul laporan, dicantumkan kelompok dan identitas praktikan anggota kelompok (nama, NIM, prodi)
 - 2) Isi laporan (harus sesuai format dibawah ini)



JUDUL PERCOBAAN

I. PENDAHULUAN

- 1.1. Dasar Teori
- 1.2. Tujuan percobaan

II. METODE PRAKTIKUM

- 2.1. Alat dan Bahan
- 2.2. Prosedur kerja

III. HASIL PENGAMATAN

Hasil pengamatan berisi data hasil pengamatan, foto, perhitungan jika ada

IV. PEMBAHASAN

Pembahasan berisi uraian yang membahas data dan hasil percobaan dikaitkan dengan teori, pelaksanaan percobaan, serta hal-hal yang dianggap perlu.

V. KESIMPULAN

Ditulis singkat merupakan jawaban dari tujuan

DAFTAR PUSTAKA

Bersumber dari buku, jurnal atau website resmi (tidak boleh dari blog atau website lain yang tidak resmi)

LAMPIRAN

Data percobaan /hasil pengamatan setiap kelompok



ACARA I

ISOLASI DNA TUMBUHAN

Asam deoksiribonukleat (DNA) merupakan molekul utama yang menyimpan dan mengatur informasi genetik pada seluruh organisme hidup. DNA berperan dalam mengendalikan berbagai proses biologis, mulai dari pertumbuhan, perkembangan, hingga pewarisan sifat. Pada sel tumbuhan, DNA tidak hanya terdapat di dalam nukleus, tetapi juga pada organel seperti mitokondria dan kloroplas yang memiliki genom tersendiri.

Perkembangan bioteknologi pertanian yang pesat, termasuk dalam bidang pemuliaan molekuler dan rekayasa genetika, menjadikan pemahaman terhadap DNA sebagai kompetensi dasar yang esensial. Berbagai aplikasi seperti pengembangan tanaman transgenik, analisis keragaman genetik, serta deteksi patogen berbasis DNA, seluruhnya bergantung pada keberhasilan isolasi DNA sebagai tahap awal. Oleh karena itu, keterampilan dalam mengisolasi DNA menjadi fondasi penting sebelum mempelajari teknik lanjutan seperti *polymerase chain reaction* (PCR) dan elektroforesis gel.

Isolasi DNA merupakan proses pemisahan DNA dari komponen seluler lainnya seperti protein, lipid, dan polisakarida. Secara umum, proses ini melibatkan tiga tahapan utama, yaitu: (1) penghancuran atau lisis sel untuk melepaskan DNA, (2) pemisahan DNA dari komponen non-genetik, dan (3) pemurnian DNA melalui presipitasi menggunakan alkohol seperti etanol atau isopropanol (Corkill dan Rapley, 2008; Gupta, 2019).

Metode yang digunakan dalam praktikum ini merupakan metode isolasi DNA sederhana yang dimodifikasi dari protokol yang dikembangkan oleh Edwards *et al.* (1991). Metode ini dikenal luas karena prosedurnya yang cepat, efisien, dan tidak memerlukan bahan kimia berbahaya seperti fenol–kloroform, sehingga sangat sesuai untuk kegiatan praktikum skala laboratorium pendidikan. Modifikasi dilakukan untuk menyesuaikan dengan ketersediaan bahan, waktu praktikum, serta jumlah sampel yang ditangani.

Meskipun metode ini menghasilkan DNA dengan tingkat kemurnian yang relatif lebih rendah dibandingkan metode berbasis CTAB atau fenol–kloroform, DNA yang diperoleh umumnya masih memadai untuk analisis dasar seperti PCR. Oleh karena itu, pendekatan ini lebih menekankan pada pemahaman prinsip dasar isolasi DNA dan keterampilan teknis mahasiswa dalam melakukan tahapan-tahapan utama isolasi.

Pada praktikum ini, mahasiswa akan melakukan isolasi DNA dari jaringan daun tanaman melalui tahapan lisis jaringan, pemisahan komponen seluler, presipitasi, dan resuspensi DNA.

Melalui kegiatan ini, diharapkan mahasiswa mampu memahami hubungan antara prinsip molekuler dan teknik laboratorium, serta mengevaluasi kualitas DNA hasil isolasi sebagai dasar untuk aplikasi bioteknologi pertanian selanjutnya.

Tujuan

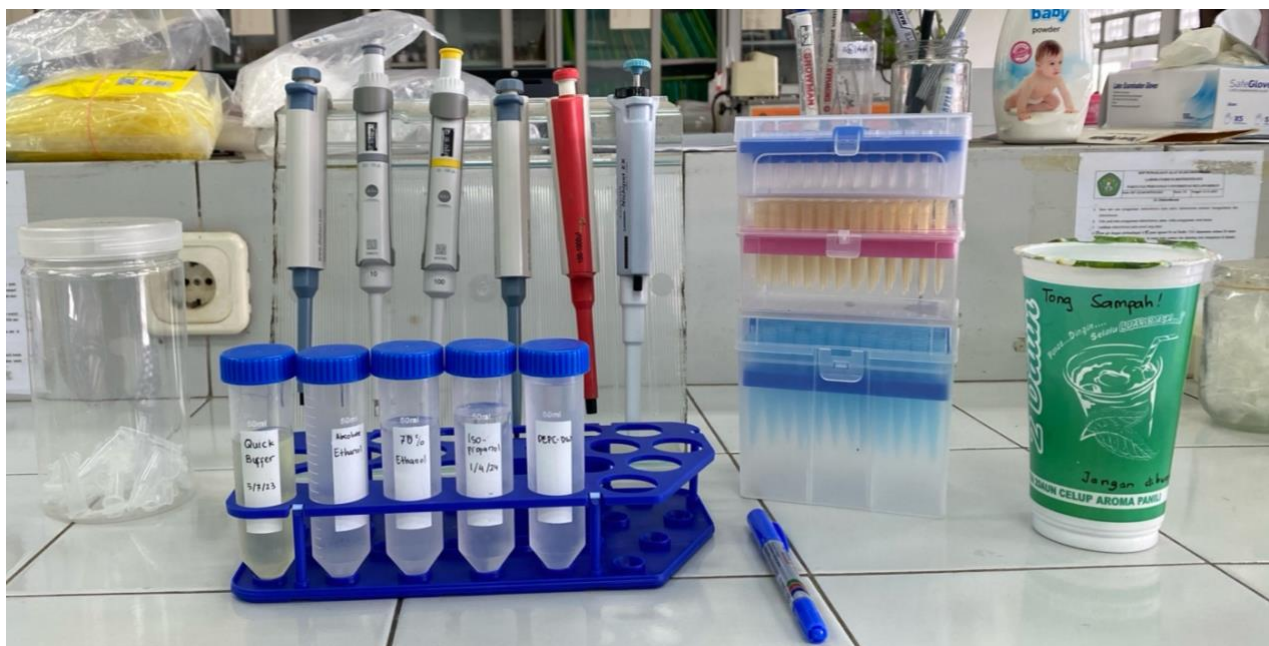
Agar mahasiswa memahami cara isolasi DNA dengan metode yang dimodifikasi dari Edwards *et al*, (1991).

Bahan

- Daun muda (padi, keladi, atau daun muda tanaman lainnya)
- Buffer ekstraksi “Edwards” (200 mM Tris-HCL at pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, dan 0,5% SDS),
- Isopropanol (dingin)
- 70% Etanol
- DNase-Free H₂O

Alat

- Mesin Centrifuge
- Mikropipet dan tip
- Tabung mikro ukuran 1.5 ml
- Rak tabung mikro
- Sarung tangan karet
- Spidol permanen
- Tempat sampah



Gambar 1. Alat dan Bahan untuk isolasi DNA tumbuhan



Prosedur Isolasi DNA Tanaman

1. Persiapan sampel
Potong daun muda dengan ukuran $\pm 1 \text{ cm}^2$, kemudian masukkan ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 mL dan beri label sampel menggunakan spidol permanen.
2. Lisis jaringan
Tambahkan 250 μL buffer ekstraksi ke dalam tabung, lalu gerus jaringan daun menggunakan ujung mikropipet (tip biru) hingga larutan berubah warna menjadi kehijauan, menandakan sel telah terdisrupsi.
3. Pemisahan debris sel
Buang sisa jaringan daun yang masih berukuran besar menggunakan tip, kemudian sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu 25°C .
4. Pengambilan supernatan
Pindahkan seluruh supernatan secara hati-hati ke dalam tabung mikro 1,5 mL yang baru, tanpa mengambil endapan (debris) di dasar tabung.
5. Presipitasi DNA
Tambahkan 200 μL isopropanol dingin ke dalam supernatan.
6. Homogenisasi
Campurkan larutan secara perlahan dengan cara membolak-balik tabung (inversi), kemudian inkubasi selama ± 2 menit pada suhu ruang.
7. Pengendapan DNA
Sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu 25°C . Buang supernatan secara hati-hati, sehingga tersisa pelet DNA di dasar tabung.
8. Pencucian DNA
Tambahkan 200 μL etanol 70%, kemudian campurkan kembali secara perlahan dengan metode inversi.
9. Sentrifugasi ulang
Sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu 25°C , lalu buang supernatan hingga benar-benar bersih. Jika masih tersisa cairan, gunakan mikropipet untuk menghilangkannya.
10. Pengeringan pelet DNA
Keringkan pelet DNA dengan cara membalikkan tabung terbuka di atas kertas tisu bersih selama 5–10 menit hingga sisa etanol menguap.
11. Resuspensi DNA
Tambahkan 20 μL air bebas DNase (*DNase-free H₂O*), kemudian homogenkan dengan pipet hingga pelet DNA larut sempurna.
12. Penyimpanan DNA
Simpan larutan DNA pada suhu -20°C hingga digunakan untuk analisis selanjutnya.

Video tutorial Isolasi DNA tumbuhan dapat diakses pada tautan berikut : [\[Link\]](#).



ACARA II

UJI KUALITAS DAN KUANTITAS DNA

Setelah proses isolasi DNA dilakukan, tahap berikutnya yang tidak kalah penting adalah mengevaluasi kualitas DNA yang dihasilkan. Evaluasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa DNA yang diperoleh memiliki konsentrasi dan tingkat kemurnian yang baik serta cukup layak digunakan untuk analisis molekuler lanjutan, seperti *polymerase chain reaction* (PCR) atau teknik berbasis DNA lainnya. Untuk mengetahui konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA yang didapatkan dari proses ekstraksi DNA, dilakukan uji kuantitatif dan kualitatif DNA dengan menggunakan spektrofotometri (*Ultraviolet Visible*) UV-Vis dan elektroforesis gel agarose.

Spektrofotometri merupakan suatu metode analisis untuk mengukur konsentrasi suatu senyawa berdasarkan kemampuan senyawa tersebut mengabsorpsi berkas sinar atau cahaya. Alat ini terdiri dari spektrofotometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu, sementara fotometer adalah pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Uji kuantitatif DNA dengan spektrofotometri UV-Vis. DNA murni dapat menyerap cahaya ultraviolet karena keberadaan basa-basa purin dan pirimidin. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada panjang gelombang λ_{260} nm, sedang kontaminan protein atau fenol akan menyerap cahaya pada λ_{280} nm. Dengan adanya perbedaan penyerapan cahaya UV ini, tingkat kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi λ_{260} nm dibagi dengan nilai absorbansi pada λ_{280} ($\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$). Nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8–2,0. DNA dengan rasio pada kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan kemurnian yang dibutuhkan dalam analisis molekuler. Jika nilai kurang dari 1,8 maka larutan yang diuji masih mengandung kontaminan dari protein membran atau senyawa lainnya sehingga kadar DNA yang didapat belum murni. Jika lebih dari 2,0 berarti DNA masih terkontaminasi oleh RNA.

Untuk mengukur konsentrasi DNA, digunakan rumus sebagai berikut:

Rumus hasil uji kuantitatif DNA

$$[\text{DNA}] = \text{A}_{260} \times 50 \times \text{faktor}$$

Keterangan :

A_{260} = nilai absorbansi pada 260 nm

50 = ketetapan (larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 μg untai ganda DNA per mL) (Fatchiyah *et al.*, 2011)



Selain spektrofotometer konvensional, ada juga Nanodrop, yang merupakan spektrofotometer miniatur yang lebih sederhana dan sangat efisien untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA dalam volume sampel yang sangat kecil (sekitar 1–2 μL). Nanodrop bekerja dengan prinsip yang sama dengan spektrofotometer UV-Vis, yaitu mengukur absorbansi pada panjang gelombang 260 nm (untuk DNA) dan 280 nm (untuk protein atau RNA). Namun, Nanodrop memiliki keunggulan karena tidak memerlukan volume sampel yang besar, serta lebih cepat dan mudah digunakan dibandingkan spektrofotometer konvensional.

Tujuan

Agar mahasiswa mampu mengukur konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA.

Bahan

- Sampel DNA
- Aquadest

Alat

- Mikropipet dan tip
- Rak tabung mikro
- [Spektrofotometer](#) atau [Nanodrop](#)

Prosedur Uji Kualitas dan Kuantitas DNA

Menggunakan Spektrofotometer

1. Persiapan Alat dan Blanko

- Nyalakan spektrofotometer dan atur panjang gelombang pada 260 nm.
- Isi kuvet dengan 1 mL akuades (air bebas ion) sebagai larutan blanko.
- Masukkan kuvet ke dalam spektrofotometer, kemudian lakukan pengaturan blanko (zeroing) sesuai petunjuk alat.

2. Persiapan Sampel DNA

- Ambil 4 μL sampel DNA hasil ekstraksi menggunakan mikropipet.
- Masukkan sampel tersebut ke dalam kuvet yang telah berisi 996 μL akuades, sehingga total volume menjadi 1000 μL .
- Homogenkan larutan dengan cara pipet naik-turun secara perlahan hingga tercampur merata.

3. Pengukuran Absorbansi

- Ukur nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}) untuk menentukan konsentrasi DNA.
- Lanjutkan pengukuran pada panjang gelombang 280 nm (A_{280}) untuk mengevaluasi tingkat kemurnian DNA.



4. Analisis Data

- Hitung rasio A260/A280 untuk menilai kemurnian DNA.
- Nilai rasio sekitar 1,8–2,0 menunjukkan DNA relatif murni.
- Hitung konsentrasi DNA menggunakan nilai absorbansi pada 260 nm dan memperhitungkan faktor pengenceran.

5. Perhitungan Faktor Pengenceran

- Faktor pengenceran dihitung sebagai:
Faktor pengenceran = volume total / volume sampel = $1000 \mu\text{L} / 4 \mu\text{L} = 250$
- Nilai ini digunakan dalam perhitungan konsentrasi akhir DNA.

Video tutorial penggunaan spektrofotometer dapat dilihat pada tautan berikut : [[Link](#)]

Menggunakan Nanodrop

1. Persiapan Alat

- Nyalakan perangkat Nanodrop dan jalankan program pengukuran sesuai dengan jenis sampel (DNA).
- Pastikan permukaan pedestal (area pengukuran) dalam kondisi bersih.

2. Proses Blanko (Kalibrasi Awal)

- Bersihkan permukaan pedestal atas dan bawah menggunakan kertas tisu bebas serat yang dibasahi dengan etanol, kemudian keringkan.
- Teteskan $1 \mu\text{L}$ larutan blanko (buffer elusi atau pelarut DNA) pada pedestal bawah.
- Tutup pedestal dengan menurunkan lengan alat.
- Tekan tombol “Blank” untuk melakukan kalibrasi.
- Setelah proses selesai, bersihkan kembali pedestal dengan tisu.

3. Pengukuran Sampel DNA

- Teteskan $1 \mu\text{L}$ sampel DNA pada pedestal bawah.
- Turunkan lengan pedestal hingga menutup sampel.
- Tekan tombol “Measure” untuk memulai pengukuran.
- Tunggu hingga hasil konsentrasi dan rasio kemurnian (A260/A280) ditampilkan.

4. Penyimpanan Data

- Simpan hasil pengukuran sesuai dengan format yang tersedia pada perangkat atau perangkat lunak yang digunakan.

5. Pembersihan Akhir

- Setelah seluruh pengukuran selesai, bersihkan kembali pedestal menggunakan tisu yang dibasahi etanol, kemudian keringkan.
- Pastikan tidak ada sisa sampel yang tertinggal pada permukaan alat.

Video tutorial penggunaan Nanodrop dapat diakses pada tautan berikut : [[Link](#)].



ACARA III

AMPLIFIKASI GEN *ART1* MENGGUNAKAN PCR

Setelah DNA berhasil diisolasi dan dievaluasi integritasnya, tahap selanjutnya dalam analisis molekuler adalah amplifikasi gen spesifik. Tahap ini penting karena analisis genetik tidak hanya membutuhkan DNA dalam jumlah yang cukup, tetapi juga memerlukan fragmen DNA target yang spesifik dan relevan secara fungsional.

Pada praktikum ini, amplifikasi dilakukan menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan target gen *ART1* pada tanaman padi. Gen *ART1* (*Aluminum Resistance Transcription Factor 1*) berperan dalam mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman aluminium, khususnya pada kondisi tanah masam (Arbelaez *et al.*, 2017). Oleh karena itu, gen ini banyak digunakan dalam studi ketahanan tanaman serta seleksi varietas padi yang adaptif terhadap lingkungan marginal.

PCR merupakan teknik *in vitro* dan enzimatik untuk memperbanyak fragmen DNA spesifik secara eksponensial melalui reaksi berulang yang dikendalikan oleh perubahan suhu. Spesifisitas PCR ditentukan oleh pasangan primer yang dirancang komplementer terhadap sekuens target gen (pada praktikum ini adalah *ART1*), sehingga hanya daerah DNA yang diapit oleh primer yang akan diamplifikasi.

Proses PCR berlangsung dalam thermal cycler melalui tiga tahap utama dalam setiap siklus, yaitu:

1. Denaturasi ($\pm 95^{\circ}\text{C}$). DNA untai ganda dipisahkan menjadi dua untai tunggal dengan memutus ikatan hidrogen antar basa.
2. Annealing ($\pm 50\text{--}60^{\circ}\text{C}$). Primer menempel (hibridisasi) pada sekuens target DNA secara spesifik. Suhu tahap ini sangat menentukan keberhasilan karena memengaruhi spesifisitas ikatan primer.
3. Ekstensi (72°C). Enzim DNA polimerase mensintesis untai DNA baru dengan menambahkan nukleotida dari arah 5' ke 3', dimulai dari primer.

Ketiga tahap ini membentuk satu siklus PCR dan diulang sebanyak 35 kali. Pada setiap siklus, jumlah DNA target meningkat dua kali lipat, sehingga menghasilkan amplifikasi DNA secara eksponensial.

Oleh karena itu, praktikum ini bertujuan untuk membekali mahasiswa dengan pemahaman dan keterampilan dalam melakukan amplifikasi gen spesifik menggunakan teknik PCR sebagai dasar analisis molekuler.



Tujuan :

Agar mahasiswa mampu memahami prinsip PCR dan melakukan amplifikasi gen *ART1* pada tanaman padi dengan benar.

Bahan

- Sampel DNA
- *DNase-Free H2O*
- [One PCR](#)
- Primer *ART1* Forward : ATCCTGTGCGTGAAGAACCACT
- Primer *ART1* Reverse : TGCCCGAATCCGAAATCC

Alat

- [Mesin PCR](#)
- [Vortex Mixer](#)
- Micropipet dan tip
- Tabung PCR dan tabung mikro 1.5 ml
- Sarung tangan karet
- Spidol permanen
- Tisu dan alkohol spray
- Tempat sampah

Prosedur Amplifikasi Gen *ART1* Menggunakan PCR

Pembuatan Master Mix

1. Tentukan volume total reaksi PCR
Volume total untuk setiap reaksi PCR adalah 10 μ L.
2. Perhitungan komposisi master mix
Jika terdapat 5 kelompok dalam praktikum, maka komposisi PCR mix (kecuali DNA sampel) harus dikalikan dengan faktor 6,5.
 - 5 \times untuk jumlah sampel
 - 1 \times untuk kontrol negatif
 - 0,5 \times untuk cadangan mengantisipasi kesalahan pipet (*pipetting error*)
3. Pencampuran komponen PCR
Campurkan semua komponen PCR (kecuali DNA) sesuai dengan perhitungan di bawah dalam satu tabung PCR untuk membuat master mix total.
4. Pembagian master mix
Setelah master mix tercampur rata, distribusikan 9,5 μ L master mix ke dalam 5 tabung PCR terpisah. Master mix yang tersisa digunakan sebagai negatif kontrol.
5. Penambahan DNA sampel
Tambahkan 0,5 μ L DNA sampel ke dalam setiap tabung PCR yang sudah berisi master mix.



Komposisi bahan dalam pembuatan PCR master mix dijabarkan pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Komposisi PCR mix dan total master mix

No	Komposisi PCR mix	Volume (μ l)/reaksi	Jumlah reaksi (5)	Volume komposisi master mix (μ l)
1	<i>DNase-Free</i> H ₂ O	4,1	x 5,5	22,55
2	One PCR mix	5	x 5,5	27,5
3	Primer <i>ART1</i> (forward)	0,2	x 5,5	1,1
4	Primer <i>ART1</i> (reverse)	0,2	x 5,5	1,1
5	Sampel DNA *)	0,5	x 5,5	**
Total Volume		10		9,5

Amplifikasi menggunakan PCR

Proses amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR, dengan kondisi PCR yang dijabarkan pada tabel di bawah ini. Setelah proses PCR selesai, hasil amplifikasi divisualisasikan menggunakan teknik Elektroforesis.

Tabel 2. Pengaturan parameter mesin PCR

No	Tahapan	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Waktu	Siklus
1	Pre-denaturasi	94	3 m	1
2	Denaturasi	94	30 s	35
3	Annealing	60	1 m	35
4	Extention	72	1 m	35
5	Final Extention	72	5 m	1

Seluruh rangkaian proses amplifikasi gen *ART1* dapat dipelajari melalui video tutorial yang tersedia pada tautan berikut: [\[Link\]](#). Selain itu, penjelasan tentang konsep PCR dan visualisasi reaksi yang berlangsung selama proses PCR dapat diakses melalui tautan berikut: [\[Link\]](#).



ACARA IV

ELEKTROFORESIS DAN INTERPRETASI HASIL

Elektroforesis DNA merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan antara lain agarosa. Dengan gel agarosa dapat dilakukan pemisahan sampel DNA dengan ukuran dari beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa (pb). Molekul DNA bermuatan negatif sehingga di dalam medan listrik akan bermigrasi melalui matriks gel menuju kutub positif (anode). Makin besar ukuran molekulnya, makin rendah laju migrasinya. Berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen molekul DNA standar (marker) yang telah diketahui ukurannya. Visualisasi DNA selanjutnya dilakukan di bawah paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dulu gel direndam di dalam larutan etidium bromid.

Elektroforesis gel merupakan salah satu teknik utama dalam biologi molekular. Prinsip dasar teknik ini adalah bahwa DNA, RNA, atau protein dapat dipisahkan oleh medan listrik. Dalam hal ini, molekul-molekul tersebut dipisahkan berdasarkan laju perpindahannya oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekul bersangkutan. Elektroforesis gel biasanya dilakukan untuk tujuan analisis, namun dapat pula digunakan sebagai teknik preparatif untuk memurnikan molekul sebelum digunakan dalam metode-metode lain seperti spektrometer massa, PCR, kloning, sekuensing DNA, atau immuno-blotting yang merupakan metode-metode karakterisasi lebih lanjut. Gel yang digunakan biasanya merupakan polimer bertautan silang (crosslinked) yang porositasnya dapat diatur sesuai dengan kebutuhan.

Dalam proses elektroforesis, sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur (well) padagel yang ditempatkan di dalam larutan penyangga, dan listrik dialirkan kepadanya. Molekul-molekul sampel tersebut akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai dengan muatannya. Dalam hal asam nukleat, arah pergerakan adalah menuju elektroda positif, disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya.

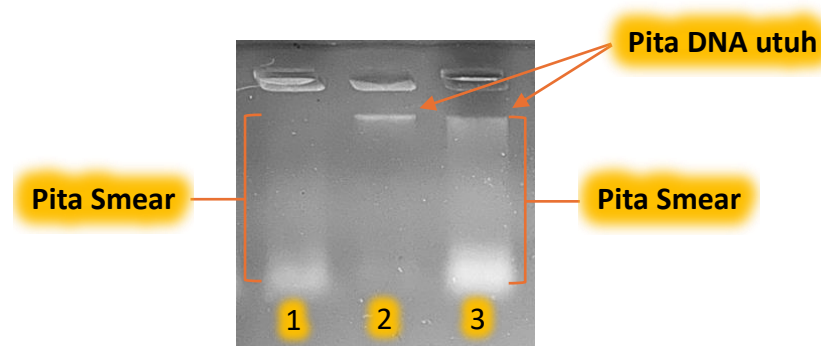
Setelah proses elektroforesis selesai, langkah berikutnya adalah proses pewarnaan (staining) agar molekul sampel yang telah terpisah dapat terlihat. Pada masa lalu, etidium bromida (EtBr) sering digunakan sebagai pewarna, yang kemudian ditambahkan secara terpisah setelah elektroforesis dan divisualisasikan menggunakan sinar ultraviolet (UV). Namun, dalam praktikum kali ini, kita menggunakan RedSafe, sebuah pewarna yang lebih aman, yang dicampurkan

langsung ke dalam gel agarosa sebelum proses elektroforesis. RedSafe memiliki keuntungan karena tidak bersifat toksik seperti EtBr dan memungkinkan visualisasi dengan menggunakan sistem pencahayaan LED biru/putih pada *Blue Light Transluminator*, bukan sinar UV. Dengan metode ini, molekul sampel akan berpendar di bawah cahaya biru, memudahkan visualisasi tanpa risiko paparan UV yang berbahaya. Metode ini lebih aman dan tetap efektif untuk melihat hasil amplifikasi DNA.

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

1. Hasil isolasi DNA dan/atau RNA
2. Hasil PCR
3. Hasil restriksi pemotongan pita DNA

Dalam konteks isolasi DNA, elektroforesis digunakan untuk mengevaluasi integritas DNA. DNA yang terisolasi dengan baik akan membentuk pita tegas yang terlokalisasi di bagian atas gel, menandakan bahwa DNA tersebut masih utuh dan tidak terdegradasi (gambar 2). Sebaliknya, jika DNA mengalami degradasi atau kontaminasi, hasil elektroforesis akan menunjukkan smear, yaitu sebaran pita yang tidak terdefinisi, yang mengindikasikan kerusakan atau pemecahan fragmen DNA.

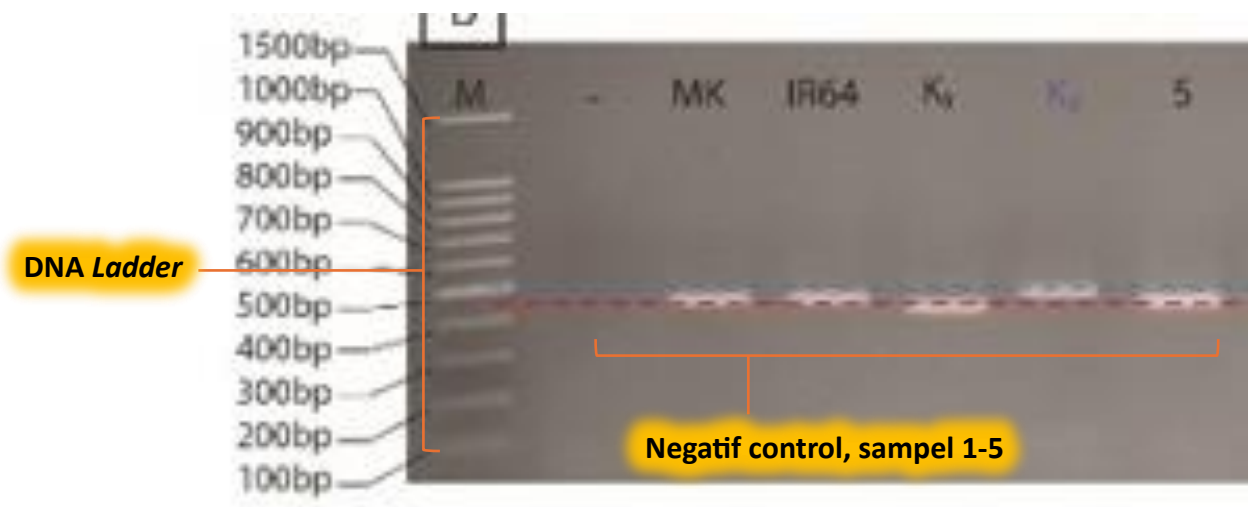


Gambar 2. Pola pita hasil uji integritas DNA

Di sisi lain, elektroforesis gel agarosa digunakan untuk menganalisis hasil amplifikasi DNA yang dilakukan dengan PCR. Setelah amplifikasi, elektroforesis memungkinkan visualisasi pita amplifikasi yang terbentuk. Pita yang jelas dan terlokalisasi dengan baik menunjukkan bahwa amplifikasi berhasil, dan DNA target ada dalam jumlah yang cukup. Sebaliknya, jika pita tidak terbentuk atau muncul *smear* (sebaran pita yang tidak terdefinisi), ini mengindikasikan masalah seperti kegagalan amplifikasi, kontaminasi, atau rendahnya spesifisitas primer.

Pita yang terbentuk kemudian dibandingkan dengan DNA ladder (*marker*) yang memiliki ukuran fragmen yang sudah diketahui. Dengan membandingkan pita amplifikasi terhadap *marker*, kita dapat memperkirakan ukuran fragmen DNA yang teramplifikasi dan memastikan bahwa ukuran tersebut sesuai dengan target yang diinginkan.

Dalam praktikum ini, amplifikasi gen *ART1* akan dievaluasi melalui elektroforesis gel agarosa. Fragmen DNA hasil PCR diharapkan membentuk pita dengan ukuran sekitar 400–500 bp, yang tergantung pada genotipe atau varietas padi yang diuji. Varietas padi yang toleran terhadap aluminium umumnya menunjukkan pita dengan ukuran lebih besar (mendekati batas atas kisaran), sementara varietas yang sensitif terhadap aluminium menunjukkan pita yang lebih kecil.



Gambar 3. Pola pita hasil amplifikasi gen *ART1*

Dengan demikian, keberadaan dan ukuran pita DNA tidak hanya mengindikasikan keberhasilan amplifikasi, tetapi juga dapat memberikan informasi awal mengenai karakter genetik ketahanan tanaman terhadap cekaman aluminium. Ketiadaan pita atau munculnya pita non-spesifik menunjukkan adanya kendala dalam proses PCR, seperti masalah pada kualitas DNA template, spesifisitas primer, atau kondisi reaksi yang belum optimal.

Dengan demikian, teknik elektroforesis gel agarosa berfungsi ganda dalam praktikum ini: pertama, sebagai alat untuk memastikan kualitas DNA yang diisolasi, dan kedua, sebagai metode untuk menginterpretasikan hasil amplifikasi PCR. Keduanya sangat bergantung pada kemampuan elektroforesis untuk memberikan gambaran visual tentang kondisi DNA yang digunakan, baik itu DNA yang baru diisolasi maupun DNA yang telah diperbanyak melalui PCR.



Tujuan Praktikum

Agar mahasiswa memahami prinsip kerja dan kegunaan teknik elektroforesis.

Bahan

- Sampel DNA/hasil PCR
- [Bubuk Agarosa](#)
- [Buffer TAE 1X](#)
- [RedSafe](#)
- [Loading dye](#)
- [DNA ladder](#) (Marker)
- *DNase-Free* H₂O
- Plastik Parafilm

Alat

- Microwave
- Timbangan analitik/digital
- Labu Erlenmeyer
- Mikropipet dan tip
- Rak tabung mikro
- [Perangkat elektroforesis](#) (cetakan gel, sisir gel, tangki elektroforesis, *power supply*)
- [Blue Light Transluminator](#)

Prosedur Elektroforesis

1. Persiapan gel agarosa

- Untuk mempersiapkan 70 ml gel dengan konsentrasi 1% agarosa.
- Timbang 0,7 g bubuk agarosa lalu masukkan ke dalam labu erlenmeyer.
- Tambahkan 70 mL buffer TAE 1X ke dalam labu erlenmeyer lalu aduk hingga homogen.
- Panaskan campuran menggunakan microwave hingga agarosa larut sempurna dan larutan menjadi jernih.
- Dinginkan larutan hingga suhu hangat suam-suam kuku.
- Tambahkan 0,7 μ L RedSafe, lalu aduk hingga homogen.
- Tuangkan larutan gel ke dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir pembentuk sumur.
- Biarkan gel memadat pada suhu ruang hingga terbentuk gel yang kokoh (\pm 30-40 menit)

2. Persiapan alat elektroforesis

- Lepaskan sisir secara hati-hati setelah gel memadat.
- Letakkan gel ke dalam tangki elektroforesis.
- Tambahkan buffer TAE 1X hingga seluruh permukaan gel terendam.



3. Persiapan sampel DNA/hasil PCR

- Siapkan sampel DNA hasil isolasi/hasil PCR.
- Campurkan 2 μL sampel DNA + 3 μL *DNase-Free* H₂O + 1 μL *loading dye* 6X. (Untuk hasil PCR hal ini tidak diperlukan)
- *Siapkan juga DNA *ladder* sebagai pembanding ukuran fragmen DNA (Hanya untuk uji hasil PCR), pastikan mencatat nama DNA *ladder* yang digunakan untuk mencari informasi ukuran DNA *ladder*

4. Pengisian sampel ke dalam gel

- *Masukkan 2-5 μL DNA *ladder* ke dalam sumur pertama secara perlahan menggunakan mikropipet (volume disesuaikan ukuran sumur).
- Masukkan 6 μL sampel DNA / 4-5 μL hasil PCR yang tadi telah dipersiapkan ke sumur-sumur berikutnya secara hati-hati agar sampel tidak tumpah atau bercampur antar sumur.
- Pastikan sampel yang dimasukkan ke dalam sumur dicatat dengan jelas sesuai nomor sampel.

5. Proses migrasi DNA

- Tutup tangki elektroforesis dan hubungkan dengan sumber listrik.
- Jalankan elektroforesis dengan waktu yang disesuaikan dengan sampel yang di uji. Gunakan tegangan 70 volt selama 30 menit untuk sampel DNA dan 60 menit untuk sampel hasil PCR.
- Pastikan terdapat gelembung pada kawat katoda dan anoda, serta pastikan arah migrasi DNA menuju kutub positif (anoda).

6. Visualisasi dan interpretasi DNA

- Setelah elektroforesis selesai, matikan sumber listrik dan keluarkan gel secara hati-hati.
- Letakkan agarosa gel pada *Blue Light Transluminator*, pastikan tidak ada gelembung yang terperangkap di bawah gel.
- Dokumentasikan hasil elektroforesis dalam bentuk foto menggunakan handphone atau kamera saku.
- Amati pola pita DNA yang terbentuk dan nilai integritas DNA pada masing-masing sampel.

Video tutorial teknik elektroforesis dapat diakses pada tautan berikut : [[Link](#)].



DAFTAR PUSTAKA

- Arbelaez, J. D., et al. (2017). Aluminum Resistance Transcription Factor 1 (ART1) contributes to natural variation in aluminum resistance in rice. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6508803/>
- Corkill, G., & Rapley, R. (2008). *The manipulation of nucleic acids: Basic tools & techniques*. Humana Press.
- Gupta, N. (2019). *DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction*. *Journal of Cytology*, 36(2), 116–117. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
- Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, 19(6), 1349. <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>
- Fatchiyah, T., Hudiyono, R., & Raharjo, A. (2011). Teknik dasar dalam biologi molekuler. Universitas Indonesia. <https://ejournal.unma.ac.id/index.php/agrivet/article/download/10618/5531>