

# TEKNIK DASAR LABORATORIUM BIOTEKNOLOGI

## A. Pendahuluan

Perkembangan penelitian Bioteknologi dewasa ini semakin menunjukkan peningkatan di berbagai bidang. Bioteknologi sebagai ilmu yang memanfaatkan berbagai penerapan ilmiah di dan rekayasa terhadap unsur hidup guna meningkatkan kualitas maupun hajat hidup manusia. Salah satu bidang bioteknologi yang memfokuskan diri pada bidang pertanian telah berperan dalam menghasilkan berbagai varietas tanaman tahan hama, bahan pangan dengan kandungan gizi tinggi serta tanaman yang berkhasiat untuk obat. Keberhasilan di bidang bioteknologi didukung oleh berbagai faktor diantaranya yaitu ketersediaan laboratorium yang lengkap dan memadai, keterampilan dari peneliti atau teknisi dalam menggunakan peralatan serta pengetahuan dari peneliti yang cukup mengenai hal mendasar terkait penelitian bioteknologi. Penerapan biologi dan biokimia sebagai ilmu yang mendasari bioteknologi molekuler dapat dilakukan dengan rekayasa genetic maupun DNA rekombinan. Sebagian besar prosedur analisis molekuler pada penelitian bioteknologi berbasis PCR (Polymerase Chain Reaction). Teknik PCR merupakan suatu cara perbanyakan (amplifikasi) potongan DNA secara in vitro pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Primer yang digunakan sebagai pembatas daerah yang diperbanyak adalah DNA untuk tunggal yang memiliki urutan komplemen sesuai DNA template (DNA cetakan). Proses tersebut mirip dengan proses replikasi DNA secara in vivo yang bersifat semi konsevatif. Keterampilan dalam melakukan proses PCR sangat diperlukan untuk aplikasi turunan selanjutnya dalam bioteknologi.

Hasil dari proses PCR dan metode turunannya secara umum akan menunjukkan informasi mengenai sekuens atau urutan DNA target. Lahirlah cabang ilmu terapan yaitu Bioinformatika sebagai perkembangan teknologi informasi di bidang molecular. Kemampuan untuk memahami dan memanipulasi kode genetic DNA ini sangat didukung oleh teknologi informasi melalui perkembangan hardware dan software. Metode pembacaan sekuens menggunakan bantuan bioinformatika sangat berguna untuk mempersingkat waktu penelitian bioteknologi. Kita akan mempelajari bagaimana informasi genetic dapat dimanipulasi. Gen dapat dimanipulasi untuk berbagai tujuan misalnya untuk terapi, meningkatkan hasil pertanian, menciptakan organisme yang dapat membersihkan limbah serta membuktikan tersangka

criminal melalui test DNA. Dalam setiap keperluan tersebut, terdapat beberapa Teknik reayasa genetika yang biasa dilakukan di laboratorium yaitu isolasi DNA, amplifikasi fragmen DNA, pemotongan DNA dengan enzim restriksi, cloning gen, penentuan urutan DNA, hibridisasi, dan produksi protein rekombinan.

## **B. Teknologi Biologi Molekuler**

### **1. Isolasi DNA**

Semua organisme disusun oleh sel yang mengandung materi genetic yang sama yaitu DNA yang terletak dalam kromosom. Kromosom eukariot berbentuk linier sedangkan pada prokariot berbentuk sirkular. Prokariot juga mengandung satu atau lebih plasmid, plasmid merupakan molekul DNA sirkular dangan ukuran yang jauh lebih kecil dibanding kromosom.

Isolasi DNA merupakan salah satu teknik dasar dalam biologi molekuler yang digunakan untuk mengekstraksi DNA dari sel atau jaringan. Proses isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya, seperti protein, lipid, dan karbohidrat, sehingga DNA dapat digunakan dalam berbagai analisis molekuler seperti PCR, kloning, dan sekuensing.

Teknik ini memerlukan beberapa langkah utama, yaitu lisis sel untuk melepaskan DNA, pemisahan DNA dari komponen sel lainnya, dan pemurnian DNA sehingga siap digunakan dalam aplikasi downstream.

#### **a. Prosedur Isolasi DNA**

##### **1) Lisis Sel**

Tahap pertama dalam isolasi DNA adalah melisiskan sel, yaitu memecah dinding dan membran sel untuk melepaskan isi sel. Proses ini dilakukan dengan bantuan deterjen atau enzim yang dapat menghancurkan membran lipid.

##### **2) Pengendapan Protein**

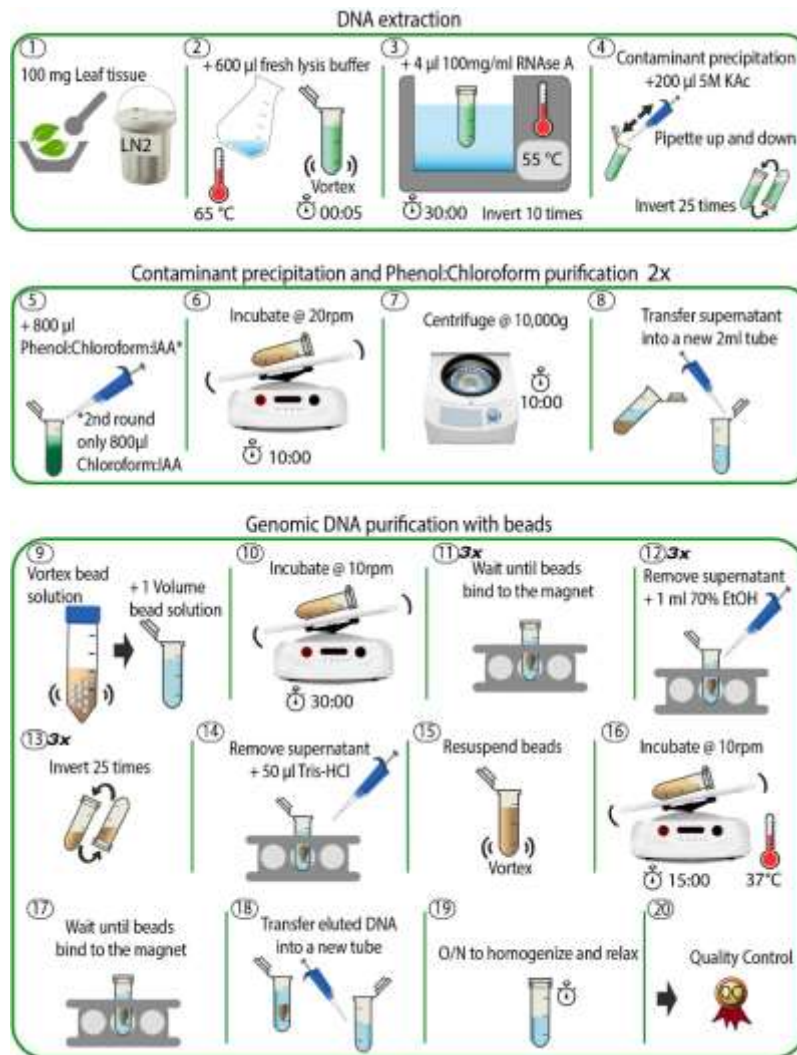
Setelah sel terdisrupsi, komponen-komponen yang tidak diinginkan, terutama protein, harus dipisahkan dari larutan DNA. Proses ini biasanya dilakukan dengan menambahkan agen pengendapan seperti fenol atau kloroform.

### 3) Pengendapan DNA

Setelah protein terpisah, DNA diendapkan dari larutan dengan menggunakan alkohol, seperti etanol atau isopropanol, yang memungkinkan DNA mengendap di luar larutan.

### 4) Pemurnian DNA

Setelah pengendapan, DNA harus dicuci dan dipurifikasi untuk menghilangkan sisa kontaminan. Biasanya, etanol 70% digunakan untuk mencuci DNA yang sudah diendapkan. Setelah itu, DNA dilarutkan kembali dalam larutan buffer atau air murni.



Gambar Proses Isolasi DNA

### b. Aplikasi Isolasi DNA

1) Isolasi DNA memiliki berbagai aplikasi penting dalam riset dan bioteknologi, di antaranya adalah:

- 2) Polymerase Chain Reaction (PCR): untuk mengamplifikasi segmen spesifik DNA.
- 3) Kloning Genetik: untuk menyalin dan menyisipkan gen tertentu ke dalam vektor.
- 4) Sekuen DNA: untuk menentukan urutan basa nukleotida dalam DNA.

## **2. Isolasi DNA Kromosom**

Pada prinsipnya, teknik ini memisahkan DNA kromosom atau DNA genom dari komponen-komponen sel lain. Sumber DNA bisa dari tanaman, kultur mikroorganisme atau bahkan sel manusia. Membrane sel dilisis dengan menambahkan detergen untuk membebaskan isinya kemudian pada ekstrak sel tersebut ditambahkan protease (yang berfungsi mendegradasi protein) dan RNase (yang berfungsi untuk mendegradasi RNA) sehingga yang tinggal adalah DNA. Selanjutnya ekstrak tersebut dipanaskan sampai suhu 90° C untuk menginaktivasi enzim yang mendegradasi DNA. Larutan DNA kemudian di presipitasi atau diendapkan dengan etanol dan bisa dilarutkan lagi dengan air.

## **3. Isolasi DNA Plasmid**

DNA plasmid merupakan wadah yang digunakan untuk cloning gen sehingga DNA plasmid harus dipisahkan dari DNA kromosom. DNA plasmid memiliki ukuran yang jauh lebih kecil dari DNA kromosom. Untuk memisahkan DNA plasmid, maka memerlukan perlakuan yang sedikit berbeda dengan prosedur di atas. Pertama, membrane sel dilisis dengan penambahan detergen. Proses ini membebaskan DNA kromosom, DNA plasmid, RNA, protein dan komponen lain. DNA kromosom dan protein diendapkan dengan penambahan potassium. Kompleks DNA, protein dan potassium yang mengendap dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Supernatant yang mengandung DNA plasmid, RNA dan protein yang tersisa dipisahkan. Kemudian ditambahkan RNase dan protease untuk mendegradasi RNA dan protein. Akhirnya DNA plasmid diendapkan atau dipresipitasi menggunakan etanol.

## **4. Isolasi RNA**

RNA, terutama mRNA merupakan materi genetik yang mengkode suatu protein. Jumlah populasi mRNA akan lebih banyak dibanding dengan DNA. mRNA eukariot dapat dipisahkan dari DNA dengan menggunakan oligonukleotida dT atau RNA total

juga dapat diisolasi dari sel dengan menambahkan enzim DNase yang berfungsi untuk mendegradasi DNA.

## 5. PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik biologi molekuler yang digunakan untuk memperbanyak (mengamplifikasi) fragmen DNA spesifik secara *in vitro*. Ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1983, PCR telah menjadi alat yang sangat penting dalam penelitian genetika, diagnosis penyakit, forensik, dan aplikasi bioteknologi lainnya.

PCR memperbanyak (amplifikasi) potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Primer yang digunakan sebagai pembatas daerah yang diperbanyak adalah DNA untai tunggal yang urutannya komplemen dengan DNA templatnya. Proses tersebut mirip dengan proses replikasi DNA secara *in vivo* yang bersifat semi konservatif. PCR memungkinkan adanya perbanyakan DNA antara dua primer, hanya di dalam tabung raksi, tanpa memasukkan ke dalam sel (*in vivo*). DNA untai ganda yang berfungsi sebagai cetakan (template) yang mengandung DNA-target (yang akan di amplifikasi) untuk pembentukan molekul DNA baru, enzim DNA polymerase, deoksinukleotida triphosphate (dNTP) dan sepasang primer oligonukleotida. Pada kondisi tertentu, kedua primer akan mengenai dan berkaitan dengan untaian DNA komplemennya yang terletak pada awal dan akhir fragmen DNA target, sehingga kedua primer tersebut akan menyediakan gugus hidroksil bebas pada karbon 3'. Setelah kedua primer menempel pada DNA template, DNA polymerase mengkatalisis proses pemanjangan kedua primer dengan menambahkan nukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida template.

DNA polymerase mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara OH pada karbon 3' dengan gugus 5' fosfat dNTP yang ditambahkan sehingga pada proses penambahan dNTP yang dikatalisis oleh enzim DNA polymerase berlangsung dengan arah 5' → 3' dan disebut reaksi polymerase. Enzim DNA polymerase hanya akan menambahkan dNTP yang komplemen dengan nukleotida yang terdapat pada rantai DNA cetakan. PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan yaitu pemisahan (denaturasi) rantai DNA template, penempelan

(annealing) pasangan primer pada DNA target dan pemanjangan (extension) primer atau reaksi polimerase yang dikatalisis oleh DNA polymerase.

Tahapan PCR melibatkan denaturasi DNA, penempelan primer (annealing), dan reaksi polimerasi (ekstensi) oleh enzim polymerase, secara rinci yaitu sebagai berikut:

1) Denaturasi

Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusannya ikatan hydrogen diantara basa-basa komplemen. Pada tahap ini seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi selanjutnya, biasanya pada suhu 90 °C – 95 °C.

2) Penempelan primer (annealing)

Pada tahap penempelan primer, primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses annealing ini, ikatan hydrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada DNA template. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 50-60 °C. selanjutnya DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hydrogen akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, biasanya pada suhu 72 °C.

3) Reaksi polimerasi (extension)

Reaksi ini terjadi pada suhu 72 °C. primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan template oleh DNA polimerase. Jika siklus ini dilakukan berulang-ulang maka daerah yang dibatasi oleh dua primer akan diamplifikasi secara eksponensial (disebut amplicon yang berupa untai ganda) sehingga mencapai copy sejumlah yang dirumuskan dengan  $2^n \times x$ . dimana n adalah jumlah siklus dan x adalah jumlah awal molekul DNA (template). Jadi, seandainya ada 1 copy DNA sebelum siklus berlangsung, setelah satu siklus akan menjadi 2 copy, dan sesudah 2 siklus akan menjadi 4 dan seterusnya. Perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial. PCR dengan menggunakan enzim Taq DNA polymerase pada akhir dari setiap siklus akan menyebabkan penambahan satu

nukleotida A pada ujung 3' dari potongan DNA yang dihasilkan sehingga nantinya produk PCR ini dapat di cloning dengan menggunakan vector yang ditambahkan nukleotida T pada ujung-ujung 5'-nya. Proses PCR dilakukan menggunakan suatu alat yang disebut thermocycler.

PCR memiliki banyak aplikasi penting di berbagai bidang:

1) Deteksi Penyakit

PCR digunakan untuk mendeteksi patogen yang menyebabkan penyakit, seperti HIV, hepatitis, dan SARS-CoV-2.

2) Forensik

Dalam bidang forensik, PCR digunakan untuk memperbanyak DNA dari sampel kecil seperti darah atau rambut untuk analisis sidik jari DNA.

3) Kloning Gen

PCR memungkinkan penggandaan gen spesifik yang kemudian dapat disisipkan ke dalam plasmid untuk kloning.

4) Penelitian Genetika

PCR digunakan dalam analisis variasi genetik, seperti penentuan genotipe dan analisis mutasi.

### **Keuntungan dan Keterbatasan PCR**

Keuntungan:

- 1) Sangat sensitif dan spesifik, mampu mendeteksi DNA dalam jumlah sangat kecil.
- 2) Cepat dan efisien, dengan hasil yang bisa diperoleh dalam beberapa jam.
- 3) Dapat digunakan untuk berbagai aplikasi di biologi molekuler, klinis, dan forensik.

Keterbatasan:

- 1) Rentan terhadap kontaminasi, yang dapat menyebabkan hasil positif palsu.
- 2) Hanya dapat memperbanyak segmen DNA yang telah diketahui urutan nukleotidanya (untuk mendesain primer).

## **6. Elektroforesis DNA**

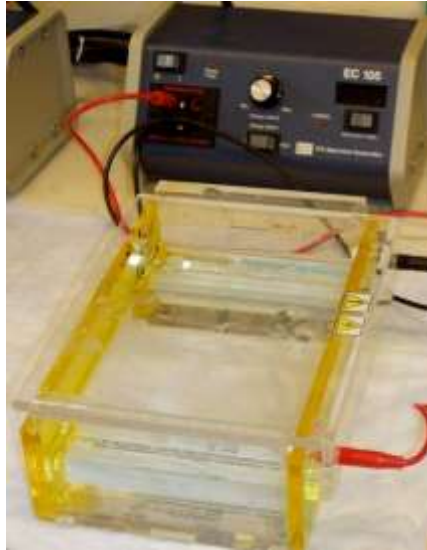
Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan molekul yang menggunakan medan listrik (elektro) sebagai penggerak molekul dari matriks penyangga berpori

(foresis). Metode elektroforesis telah digunakan dan dikembangkan di dalam teknik analisa untuk penelitian-penelitian di bidang biologi dan genetika. Metode tersebut berkembang sangat pesat sekali di zaman kemajuan teknologi, disebabkan karena pengerjaannya sangat sederhana dan sangat mudah. Di bidang ilmu biologi ataupun biologi molekuler, metode elektroforesis banyak digunakan untuk taksonomi, sistematik dan genetik dari hewan ataupun tumbuhan. Sebelum melakukan metode elektroforesis guna mengetahui suatu populasi ataupun sistematik dari suatu jenis hewan ataupun tumbuhan, sebaiknya didasari terlebih dulu dengan pengetahuan mengenai biokimia protein serta pengetahuan tentang metode elektroforesis.

Teknik ini dapat digunakan untuk memanfaatkan muatan listrik yang ada pada molekul misalnya DNA yang bersifat negative. Molekul yang dapat dipisahkan antara lain DNA, RNA atau protein. Jika suatu molekul bermuatan negative dilewatkan melalui suatu medium, misalnya gel agarose, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub negative ke positif.

Elektroforesis DNA umumnya menggunakan metode elektroforesis gel agarose. Teknik ini diterapkan misalnya dalam menganalisis fragmen DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi. Fragmen molekul DNA yang telah dipotong-potong dapat ditentukan ukurannya dengan cara membuat gel agarose ( bahan semi padat berupa polisakarida yang diekstraksi dari rumput laut). Gel agarose dibuat dengan melarutkannya dalam suatu larutan buffer (penyangga) dan dibantu dengan pemanasan hingga mencair dan mudah dituangkan ke atas lempeng. Sebelum mendingin, dibuat sumuran dengan Perspex menyerupai sisir yang ditancapkan pada salah satu ujung gel yang masih cair. Sumuran ini berfungsi sebagai tempat meletakkan DNA.

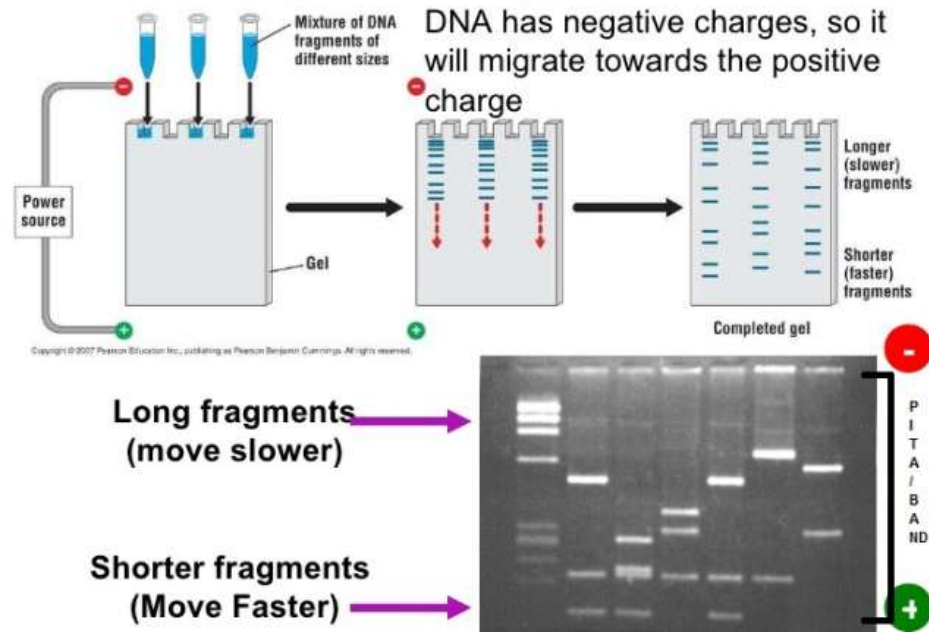




Gambar Alat Elektroforesis

Agarosa merupakan polisakarida yang terdiri dari unit agarobiosal. Konsentrasi agarose yang biasa digunakan sekitar 1-3%. Ukuran pori gel bergantung pada konsentrasi agarose. Semakin tinggi konsentrasi agarose semakin besar ukuran pori. Agarose juga mengandung sulfat, semakin rendah konsentrasi sulfat maka semakin murni agarose. Keuntungan menggunakan agarose adalah titik leleh yang rendah (62-65°C).

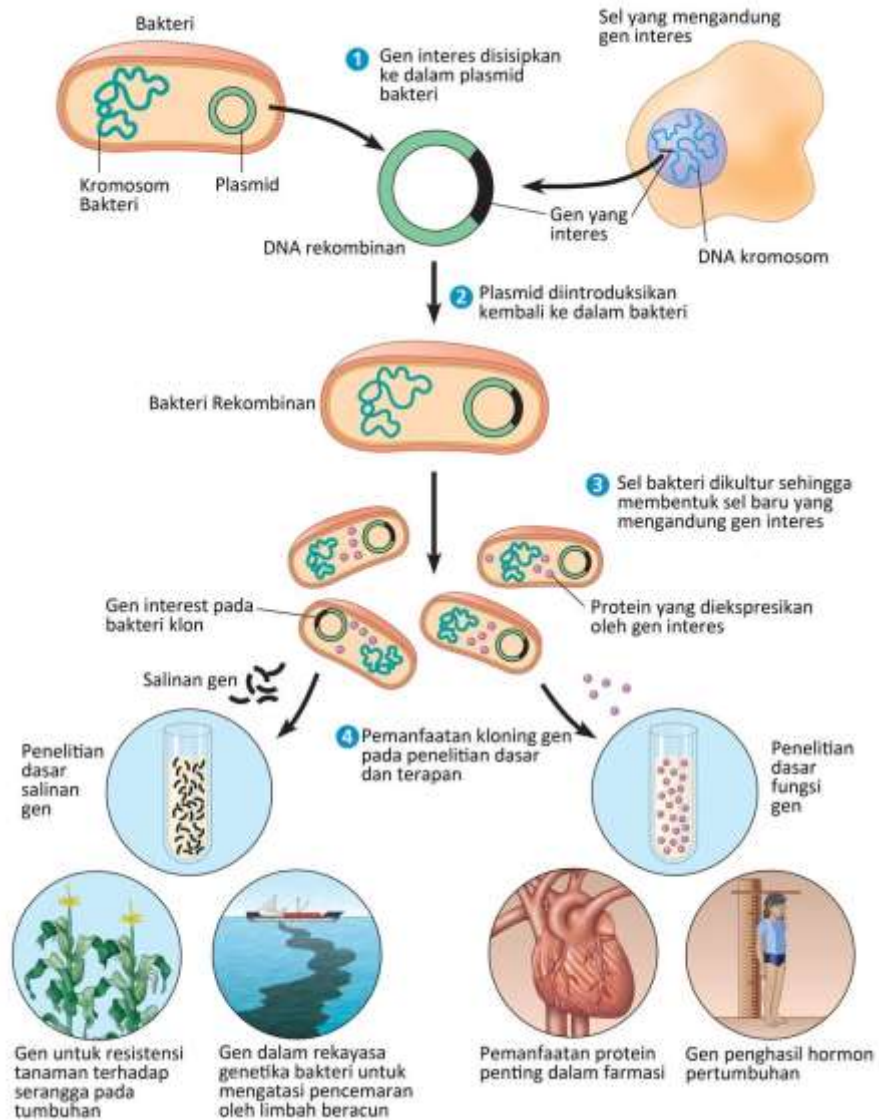
Larutan DNA yang bermuatan negative dimasukkan dalam sumur yang terdapat pada gel agarose dan diletakkan di kutub negative. Apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan buffer yang sesuai, DNA akan bergerak ke kutub positif. Laju migrasi DNA dalam medan listrik berbanding terbalik dengan massa DNA. Migrasi DNA terutama ditentukan oleh ukuran Panjang dan bentuk DNA. Fragmen DNA yang berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibanding yang berukuran besar, sehingga elektroforesis mampu memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran. Untuk mempermudah visualisasi DNA maka ditambahkan etium bromide yang akan masuk diantara ikatan hydrogen pada DNA, sehingga pita fragmen DNA akan kelihatan di bawah lampu UV, seperti disajikan dalam gambar berikut ini.



Gambar Cara Kerja Gel Elektroforesis dan Visualisasi DNA

## 7. Kloning Gen

Sejak diketemukannya enzim restriksi yang berfungsi untuk memotong DNA ada urutan yang spesifik serta enzim ligase yang berfungsi untuk menyambung potongan DNA, maka DNA dari suatu organisme dapat diisolasi, dipotong, disambung kembali dan dipindahkan ke organisme lainnya. Proses mengkombinasikan beberapa DNA akan memperbanyak DNA rekombinan tersebut di dalam sel yang selanjutnya disebut cloning. Proses memasukkan DNA ke dalam sel disebut transformasi dan sel yang dihasilkan disebut transforman. Agar suatu DNA dapat diperbanyak di dalam sel, maka DNA tersebut harus disisipkan ke dalam plasmid (yang berfungsi sebagai vector/pembawa) yang kemudian bereplikasi di dalam sel. Kumpulan sel yang mengandung plasmid rekombinan yang sama disebut sebagai **klon**. Pada cloning gen, suatu fragmen DNA yang mengandung gen yang akan di klon disisipkan pada molekul DNA vector untuk menghasilkan molekul DNA rekombinan. DNA rekombinan ini berfungsi untuk mentransformasi sel inang (biasanya bakteri). Dalam sel, vector mengadakan replikasi, menghasilkan banyak copy atau turunan yang identik, baik vektornya maupun gen yang dibawanya.



Gambar Proses Kloning Gen

Molekul plasmid yang digunakan sebagai vector harus dipotong untuk membuka DNA lingkaran sehingga molekul DNA asing bisa disisipkan. Enzim restriksi merupakan endonuclease yang mengenal urutan spesifik pada molekul DNA dan memotong pada urutan yang spesifik tersebut. Sisi pengenalan enzim restriksi umumnya merupakan suatu polindorm, dimana urutan nukleotida rantai atas sama dengan urutan nukleotida rantai bawah. Misalnya enzim restriksi hanya terdapat pada beberapa bakteri dan berfungsi untuk mempertahankan diri dari infeksi bakteriofag. Berikut ini enzim restriksi dan urutan pengenalannya

Tabel Hubungan Sumber Bakteri, Nama Enzim serta Urutan Pengenalan pada Pemotongan DNA

<b>Nama Enzim</b>	<b>Sumber Bakteri</b>	<b>Urutan Pengenalan</b>
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	AG↓CT
BamHI	<i>Bacillus</i>	G↓GATCC
Clal	<i>Caryophanon latum</i>	AT↓GCAT
EcoRI	<i>Escheria coli</i>	G↓AATTC
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG↓CC
HindIII	<i>Haemophylus influenzae</i>	A↓AGCTT
KpnI	<i>Klebsiella pneumonia</i>	GGTAC↓C

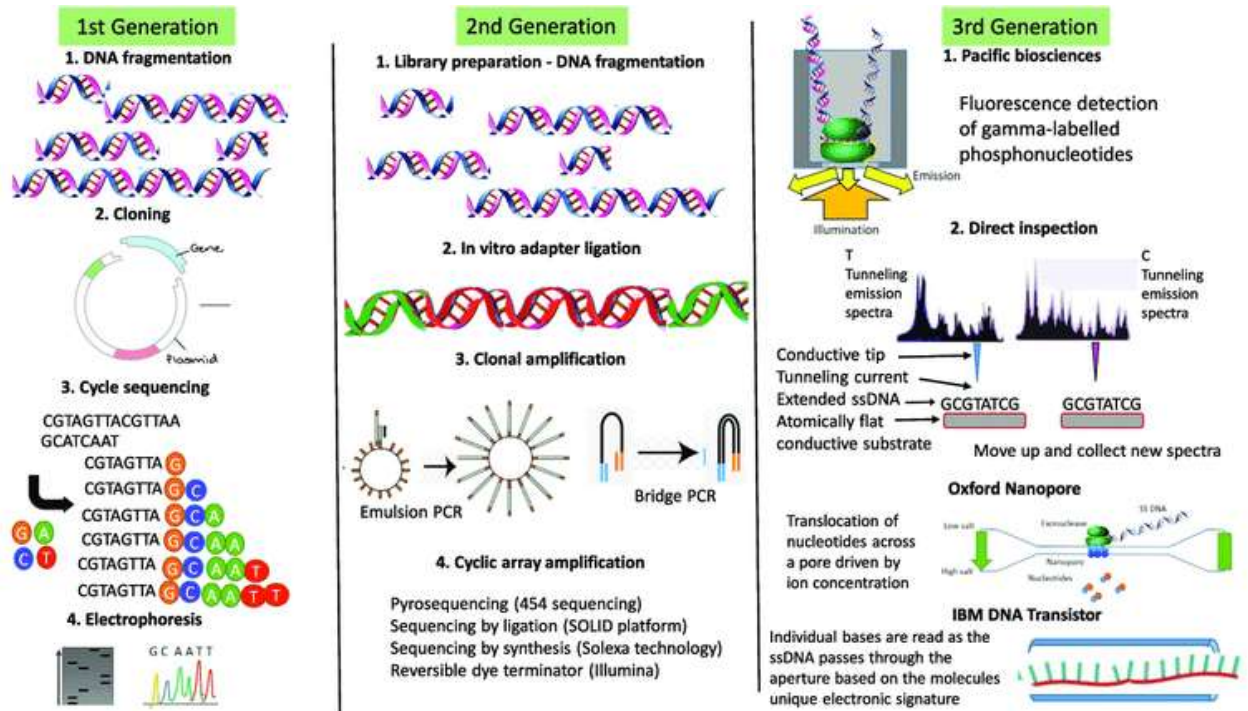
Penyambungan DNA dengan enzim ligase. Apabila dua molekul DNA memiliki ujung rantai tunggal yang komplementer, maka kedua ujung DNA tersebut dapat berpasangan kemudian enzim ligase dapat membentuk ikatan fosfodiester antara kedua molekul DNA tersebut. Reaksi enzimatik ini memerlukan energi dari ATP.

### 8. Sekuensing DNA

Metode sekuensing DNA digunakan untuk mengetahui urutan nukleotida atau basa dalam suatu fragmen DNA. Urutan nukleotida merupakan sebuah informasi genetic. Dengan mengetahui urutan nukleotida suatu gen, maka dapat ditentukan pula urutan asam amino yang dikodenya. Sebaliknya, urutan asam amino protein tidak dapat memberikan informasi lengkap mengenai nukleotida gen yang mengkodonya. Oleh sebab itu sekuensing DNA jauh lebih banyak digunakan dibanding sekuensing protein. Metode sekuensing DNA yang paling banyak digunakan adalah dideoksi Sanger. Reaksi sekuensing dimylai dengan reaksi PCR untuk memperbanyak fragmen DNA dan diikuti dengan elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE) untuk memisahkan basa-basa DNA. Seperti proses PCR, reaksi sekuensing juga meniru proses pembentukan leading strand pada replikasi DNA di alam. Tiga tahap penting pada sekuensing atau pembacaan urutan nukleotida pada molekul DNA yaitu:

- a. Pembentukan fragmen DNA untai tunggal dengan berbagai ukuran melalui proses PCR
- b. Pemisahan fragmen DNA dnegan gel elektroforesis polikrilamida

c. Pembacaan hasil elektroforesis.



Gambar Proses Sekuensing DNA

## DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, M., Roberts, A., & Patel, D. (2020). "Advances in PCR technology and applications in disease diagnosis." *Journal of Molecular Diagnostics*, 12(4), 233-240.
- Brown, R., Smith, T., & Collins, P. (2022). "PCR as a tool for pathogen detection in modern virology." *Virology Reports*, 39, 151-160.
- Brown, S. & Thompson, L. (2019). "Efficient extraction of nucleic acids: An overview of protocols and applications." *Journal of Molecular Biology*, 412(2), 150-165.
- Garcia, H., & Patel, S. (2021). "Key innovations in PCR methodology and enzyme optimization." *Biochemical Techniques Review*, 23(2), 115-124.
- Johnson, H., Lee, M., & Wang, Z. (2021). "Techniques for DNA isolation and purification: A comparative review." *Biotech Advances*, 38, 107-123.
- Johnson, L., & Lee, M. (2021). "Gene cloning and expression: PCR's central role." *Biotechnology Advances*, 44, 103-109.
- Miller, R. & Davis, P. (2020). "Modern DNA extraction methods and their applications in genomics." *Journal of Biological Techniques*, 15(3), 98-110.
- Patel, A., & Smith, G. (2020). "PCR in genetic studies: Methods and implications." *Genomics Research Journal*, 18(2), 75-89.
- Russo, A., Mayjonade, B., Frei, D., Potente, G., Kellenberger, R. T., Frachon, L., ... & Schlüter, P. M. (2022). Low-input high-molecular-weight DNA extraction for long-read sequencing from plants of diverse families. *Frontiers in Plant Science*, 13, 883897.
- Smith, D., Patel, K., & Roberts, A. (2020). "Cell lysis techniques in nucleic acid extraction." *Current Protocols in Molecular Biology*, 29(4), 320-332.
- Stewart, K., & Davis, M. (2020). "The application of PCR in forensic science: From theory to practice." *Forensic Science International*, 306, 110-118.
- Williams, B. & Carter, J. (2022). "DNA in biotechnology: A review of its role in modern research." *Biotechnology Journal*, 41(1), 25-45.
- Williams, D., & Kumar, S. (2019). "Primer design and optimization for PCR applications." *Molecular Biology Reports*, 36(3), 85-94.