



www.esaunggul.ac.id

BIOTEKNOLOGI DASAR

Program studi Bloteknologi

By Seprianto S.Pi, M.Si



Pertemuan 6

TEKNIK DASAR LABORATORIUM BIOTEKNOLOGI

Teknik Dasar Laboratorium Bioteknologi



Teknik Dasar Laboratorium Bioteknologi

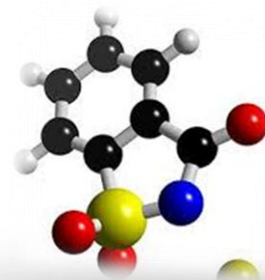
Adalah teknik-teknik pekerjaan di laboratorium yang harus dikuasai meliputi

- Alat – Alat Laboratorium Pendukung
- Alat – Alat Laboratorium Utama
- Metode Pratek yang Sesuai dengan topik Praktikum dan penelitian



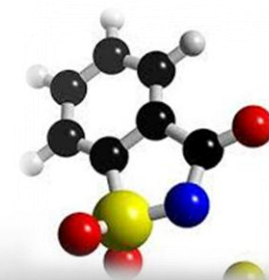
Metode Praktik Bioteknologi

- Teknik dasar dalam bioteknologi ada beberapa macam
 - ✓ Teknik Biologi molekuler
 - ✓ Teknik Kultur sel
 - ✓ Teknik kultur mikroba
 - ✓ Teknik Fermentasi
 - ✓ Teknik Uji In Vivo (Hewan Coba)
 - ✓ dll



Laboratory Tools

- Beaker glass (Gelas Kimia)
- Erlenmeyer Flask (Labu Erlenmeyer)
- Test Tube Reaction (Tabung Reaksi)
- Measuring glass (Gelas Ukur)
- Burette (Buret)
- Porcelain disk (Cawan Forselin)
- Petri Disk (Cawan Petri)
- Volumetric flask (Labu Ukur)



Beaker Glass

Berupa gelas tinggi, berdiameter besar dengan skala sepanjang dindingnya. Terbuat dari kaca borosilikat yang tahan terhadap panas hingga suhu 200°C (pyrex). Ukuran alat ini ada yang 50 mL, 100 mL, 1L dan 2 L sampai 10L.

Fungsi :

- Untuk mengukur volume larutan yang tidak memerlukan tingkat ketelitian yang tinggi
- Menampung zat kimia/membuat larutan
- Memanaskan cairan
- Wadah penampungan



Labu Erlenmeyer

Berupa gelas yang diameternya semakin ke atas semakin kecil dengan skala sepanjang dindingnya. Ukurannya mulai dari 10 mL-2 L.

Fungsi :

- Untuk menyimpan dan memanaskan larutan
- Menampung filtrat hasil penyaringan
- Menampung titran (larutan yang dititrasi) pada proses titrasi



Test Tube Reaction (Tabung Reaksi)



berupa tabung yang kadang dilengkapi dengan tutup. Terbuat dari kaca borosilikat tahan panas terdiri dari berbagai ukuran.

Fungsi :

- Sebagai tempat untuk mereaksikan bahan kimia
- Sebagai tempat penyimpanan isolat bakteri
- Sebagai tempat media kultur baik cair maupun padat

Measuring glass (Gelas Ukur)



Berupa gelas tinggi dengan skala di sepanjang dindingnya. Terbuat dari kaca atau plastik yang tidak tahan panas. Ukurannya mulai dari 10 mL sampai 2 L.

jenis

- Tahan panas (pyrex)
- Tidak tahan panas (gelas biasa)
- Plastik

Fungsi : Untuk mengukur volume larutan tidak memerlukan tingkat ketelitian yang tinggi dalam jumlah tertentu

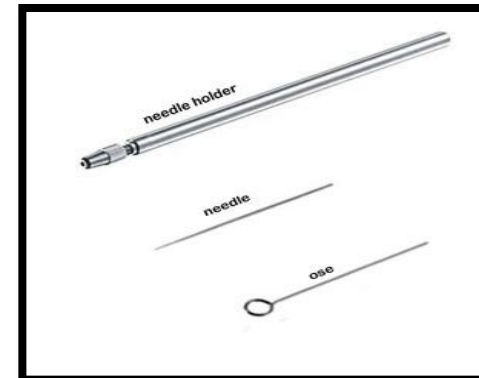
Petri Disk (Cawan Petri)



Cawan Petri adalah sebuah wadah yang bentuknya bundar dan terbuat dari plastik atau kaca Cawan Petri selalu berpasangan, yang ukurannya agak kecil sebagai wadah dan yang lebih besar merupakan tutupnya

Jarum inokulum adalah Bentuk ujung jarum dapat berbentuk lingkaran (loop) dan disebut ose dan berbentuk lurus disebut inoculating needle/Transfer needle

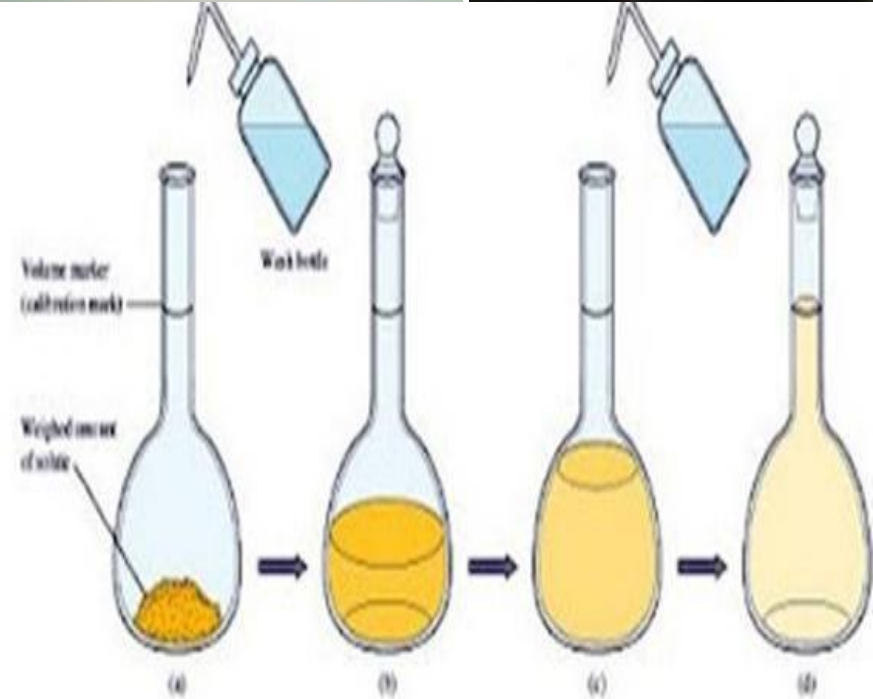
Batang Penyebar batang kaca segitiga kecil.



Volumetric Flask (Labu Ukur)

Berupa labu dengan leher yang panjang dan bertutup; terbuat dari kaca tahan panas dan tidak tahan panas karena dapat memuai. Ukurannya mulai dari 1 mL sampai 5 L.

Fungsi : Untuk membuat larutan dengan konsentrasi tertentu dengan akurasi pengukuran serta mengencerkan larutan



Porcelain disk (Cawan Porselen)

Cawan yang terbuat dari porselen yang tahan panas dan biasa digunakan untuk menguapkan larutan dan menghancurkan sampel

- **Mortar dan pestle** : terbuat dari porselen, kaca atau batu granit yang dapat digunakan untuk menghancurkan dan mencampurkan padatan kimia.

Spatula





Batang pengaduk



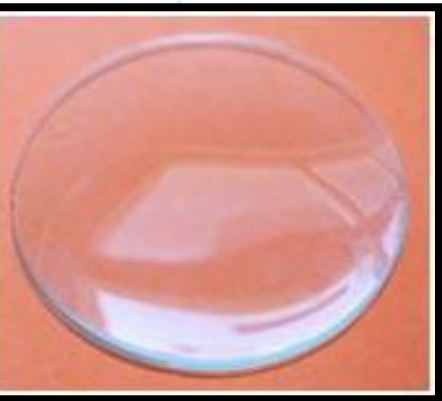
Kaki tiga



Bunsen



Corong



Kaca Arloji



Desikator



Botol cuci



Gunting dan pinset

Alat Pendukung Spesifik



Vortexs mixer



Centrifuges



Mikropipet

Alat Laboratorium Bioteknologi



Minispin Down



Timbangan analitik



Sanikator



Waterbath



Hotplate



Inkubator

Alat Laboratorium Bioteknologi



Biosafety Cabinet



Oven



Autoclaf



Laminar



Thermo Block

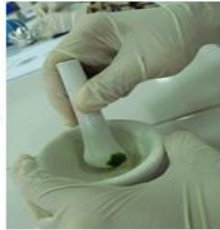
Teknik Biologi Molekuler

- Isolasi DNA dan RNA
- *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
- Elektroforesis DNA
- Visualisasi DNA
- Kloning gen
- Sekuensing DNA
- Analisis Data dengan Bioinformatika

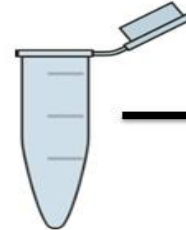
Isolasi DNA



0,3 gr daun melon
ditambah 500 μ l reagen I



Daun digerus



Dimasukkan ke
dalam tube 1,5 mL
dan ditambah 100 μ l
reagen II



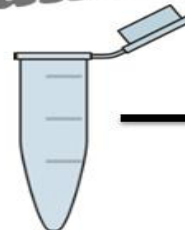
Diresuspensi
selama 5 menit



Dipanaskan di
waterbath pada
suhu 65°C
selama 10 menit



Diletakkan di
freezer selama
20 menit



Ditambah
kloroform dingin
500 μ l



Ditambah resin
50 μ l

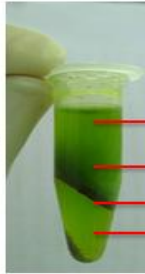


biology-community.blogspot.com

Isolasi DNA

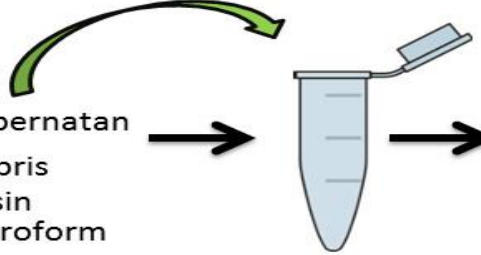


Disentrifuse
3000 rpm
selama 10 menit



Supernatan
Debris
Resin
Kloroform

Supernatan diambil (200 μ l) dan dipindahkan ke tube yang baru



Ditambah isopropanol dingin sesuai dengan jumlah supernatan (200 μ l) dan kemudian diresuspensi

www.biology-community.blogspot.com

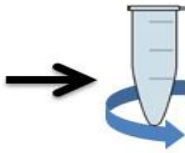


Disentrifuse
10.000 rpm
selama 10 menit



Supernatan
DNA

Supernatan dibuang dan ditambah etanol 70% sebanyak 100 μ l



Disentrifuse
10.000 rpm
selama 10 menit

Supernatan dibuang dan di oven (50°C) selama 5 menit

Ditambah TE 50 μ l dan disimpan



Pellet



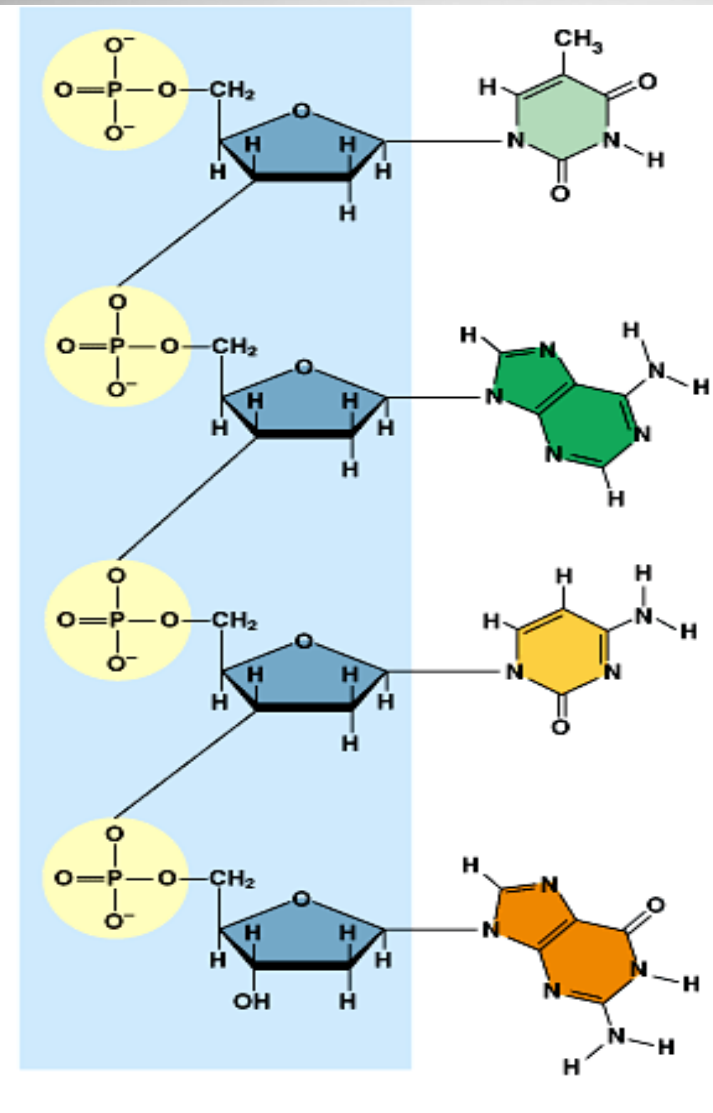
Structure of DNA

- ▣ Double Stranded Helix
- ▣ Strands run Anti-Parallel
- ▣ Strands Held Together by H-Bonds
- ▣ Bases Read 5' to 3'
- ▣ Strands have Complementary Sequence

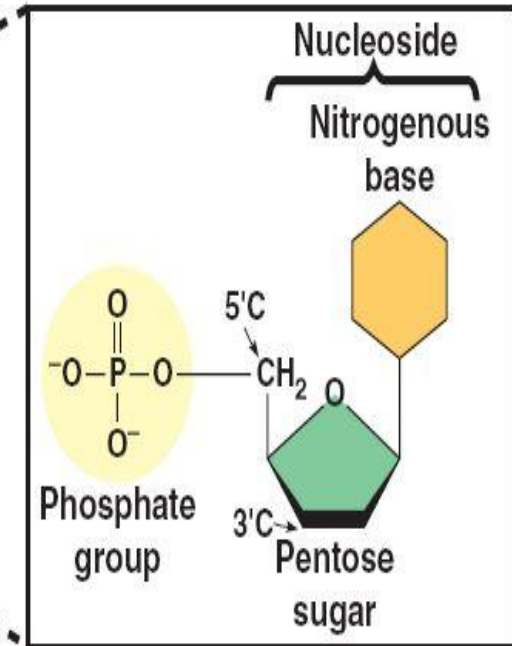
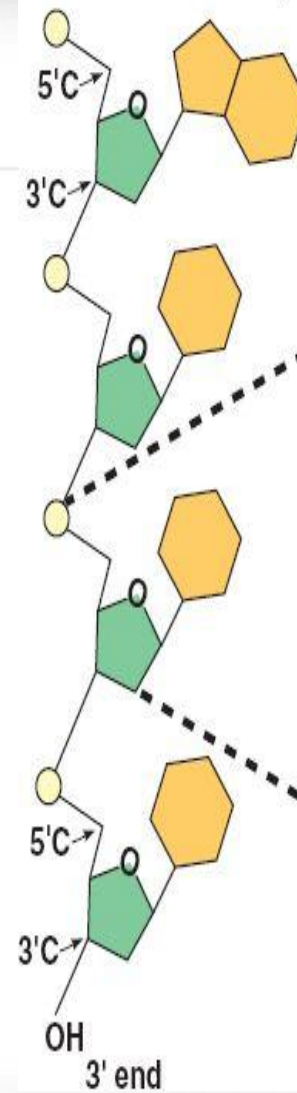


Composition of DNA

- ❑ Consists of 4 Nucleotides
- ❑ Each Nucleotide Contains a Phosphate, a sugar and a nitrogenous base.
- ❑ The sugar is deoxyribose (ribose in RNA)
- ❑ The 4 bases are **A**denine, **C**ytosine, **G**uanine and **T**hymine (**U**racil in RNA)



5' end (a) Polynucleotide, or nucleic acid



(b) Nucleotide

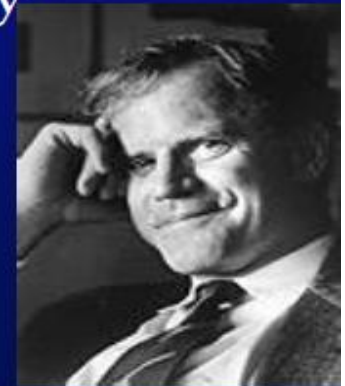
Physical Characteristics of DNA

- ▣ DNA is water soluble
- ▣ DNA precipitates in alcohols
- ▣ DNA absorbs UV light at 260 nm
- ▣ DNA subject to shear forces
- ▣ DNA has characteristic melting & annealing temperatures
- ▣ DNA carries a net negative charge

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Making DNA without a cell Techniques of DNA Amplification (PCR)

- ❑ **PCR**: Polymerase Chain Reaction
- ❑ **Purpose of PCR**: to make large number of copies of a piece of DNA (amplification = exponential)
- ❑ The PCR process was invented by Dr. Kary Mullis, while working at Cetus in 1983.
- ❑ Dr. Mullis was given the Nobel Prize in Chemistry in 1993 for his contribution to science.



Dr. Kary Mullis

Thermocycler (Mesin PCR)

- *Thermocyclers*, or thermal cyclers, are instruments used to amplify DNA and RNA samples by the polymerase chain reaction
- The thermocycler raises and lowers the temperature of the samples in a holding block in discrete.
- Amplified genetic material can be used
 - ✓ Cloning
 - ✓ Sequencing
 - ✓ Expression analysis
 - ✓ Food Pathogen detection,
 - ✓ And genotyping



PCR

- Merupakan metode perbanyakan gen (DNA) menggunakan reaksi berantai
- Dibantu oleh enzim DNA polimerase
- Memerlukan primer → DNA spesifik dengan panjang 18-24 pb
- Terdiri dari 3 tahap :
 - Denaturasi → pemisahan untai ganda DNA
 - Annealing* → penempelan primer pada DNA
 - Elongasi → pembentukan DNA/gen baru

PCR

GEN TARGET

P1 →



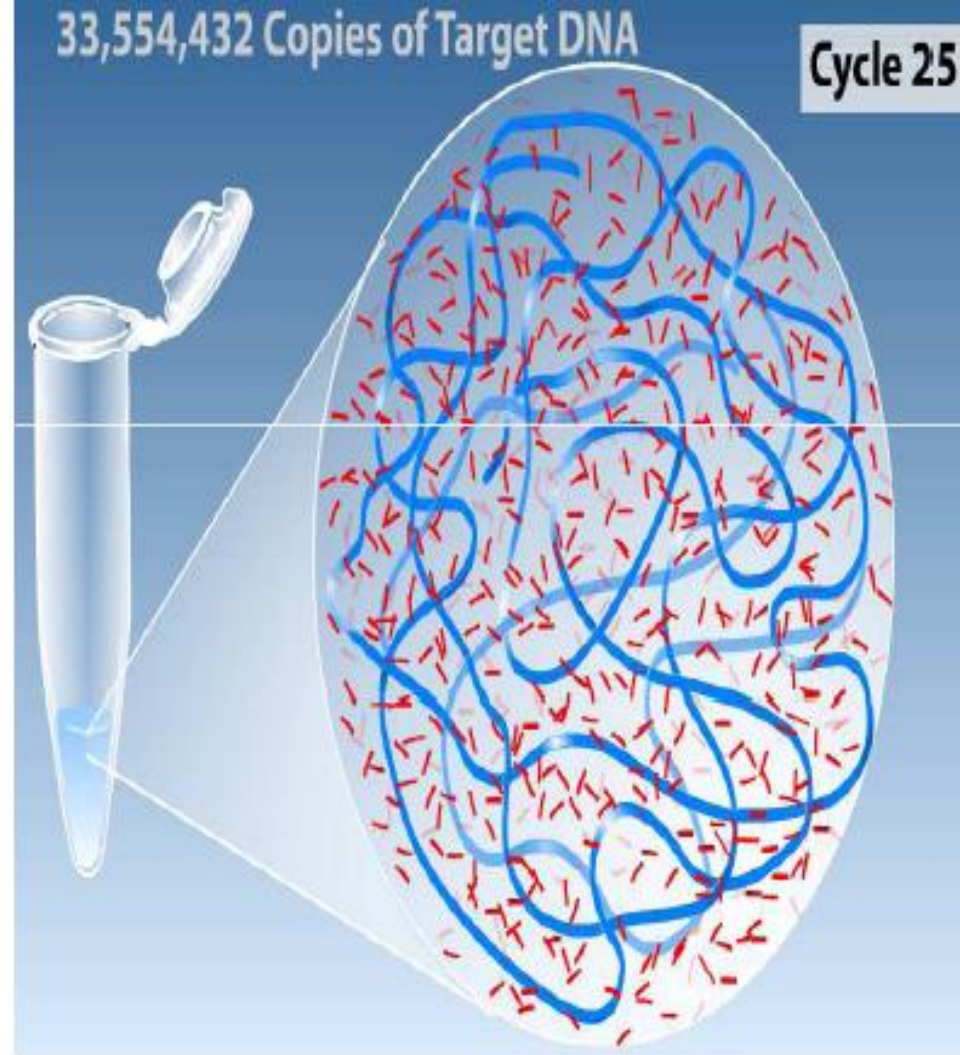
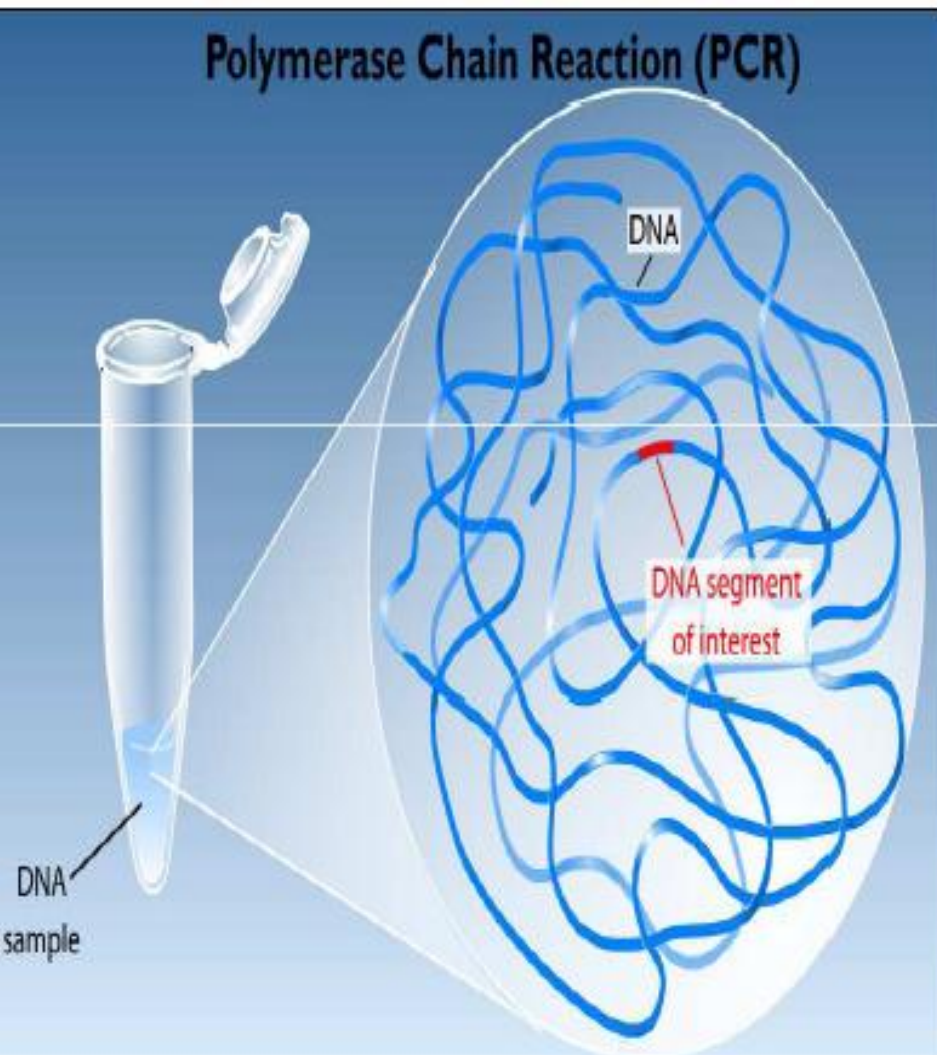
← P2



PRODUK PCR: 490 pb

TARGET HARUS SPESIFIK PATOGEN

Prinsip Kerja PCR

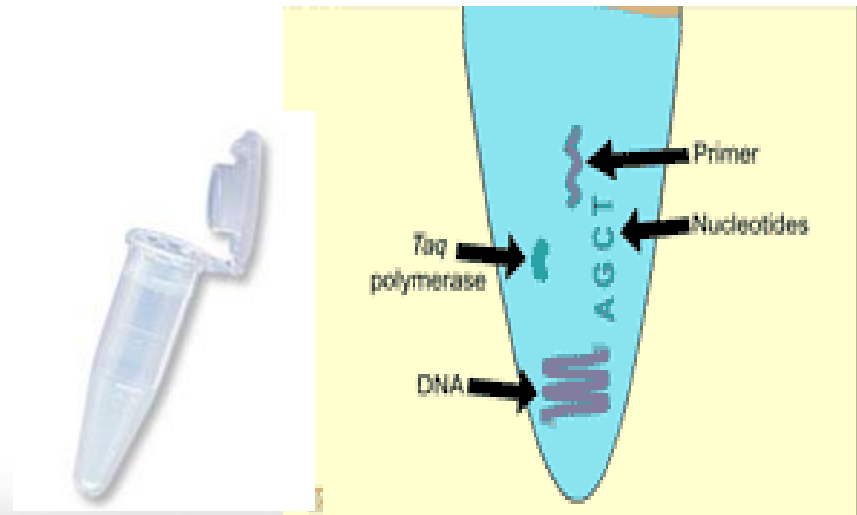


Tujuan PCR

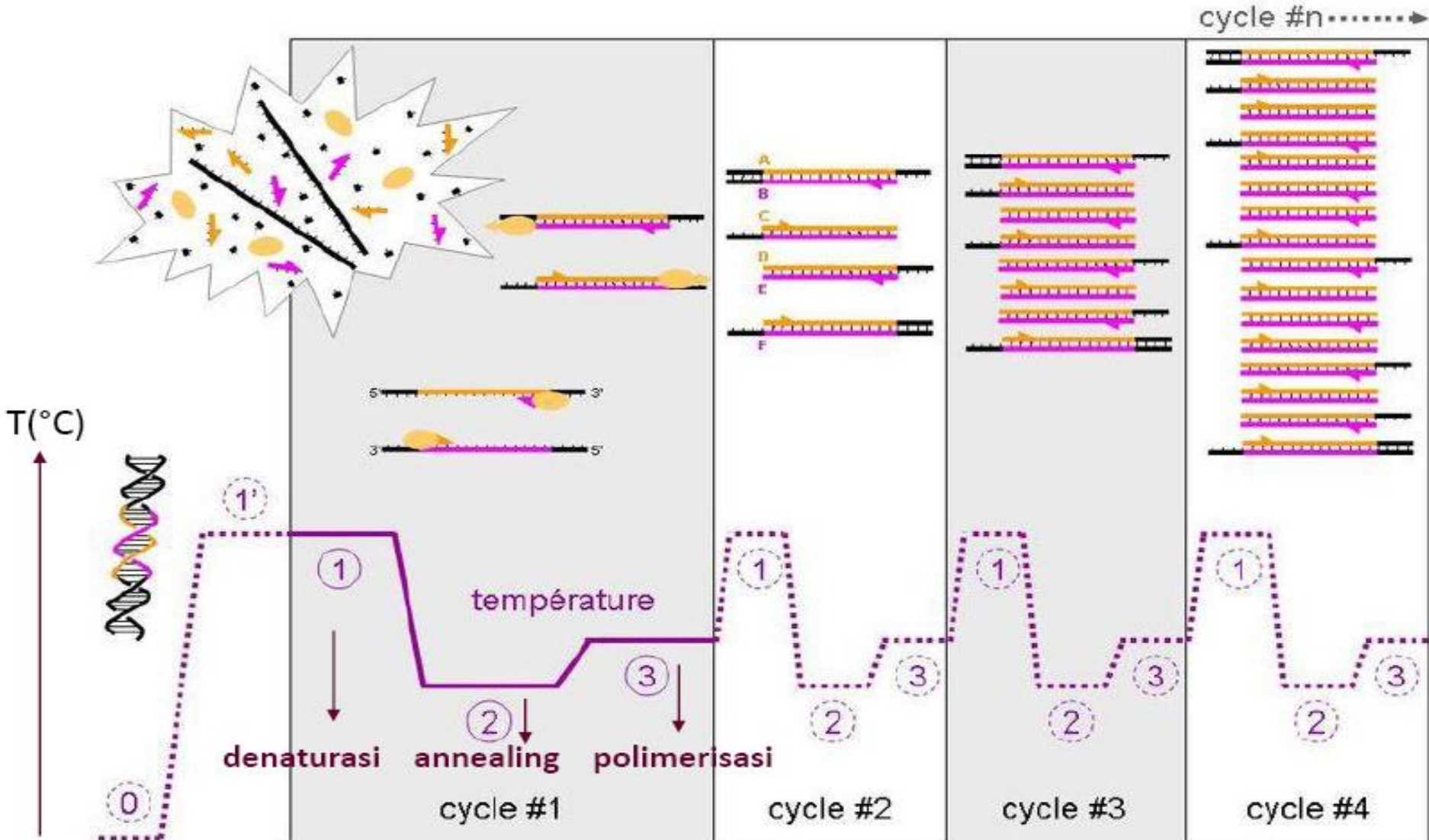
- Amplifikasi fragmen DNA
- Isolasi fragmen DNA / gen
- Deteksi organisme/fragmen DNA/gen
- Kuantifikasi jumlah DNA/RNA
- Studi level ekspresi gen (Real time-PCR)

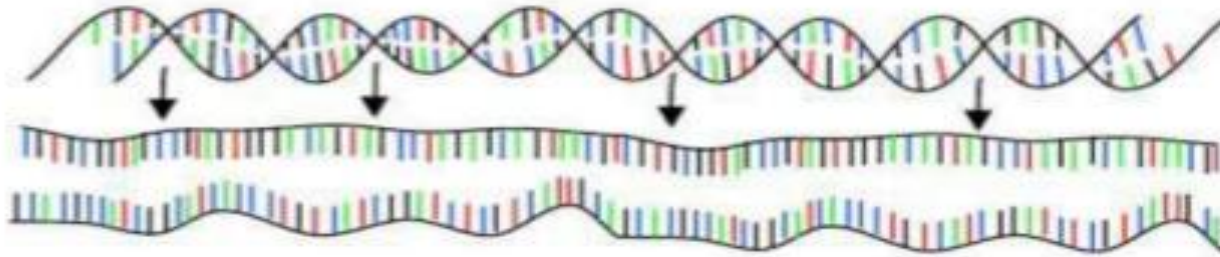
Komponen-Komponen PCR

- DNA Template
- Primer
- DNA Polimerase (Taq Polimerase)
- Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)
- Larutan buffer
- Kation divalen (misal: Mg^{2+})



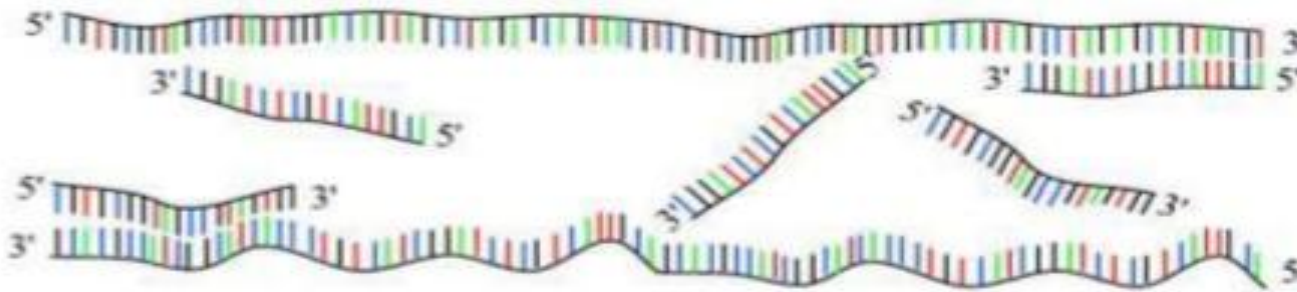
Siklus PCR





Step 1 : denaturation

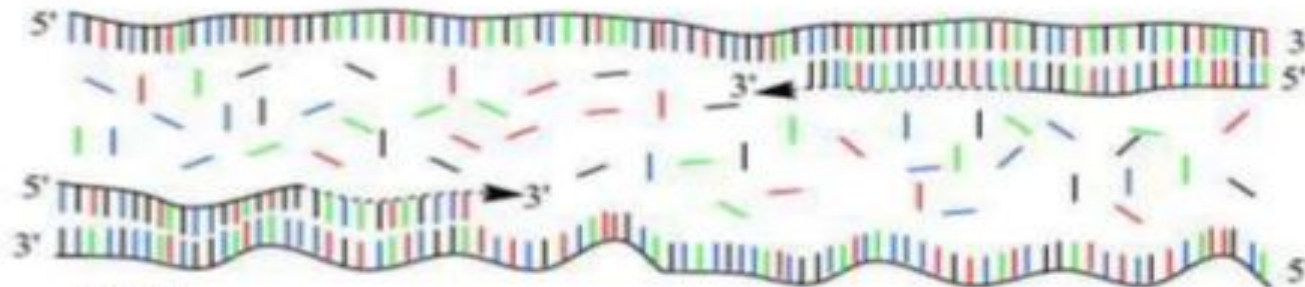
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

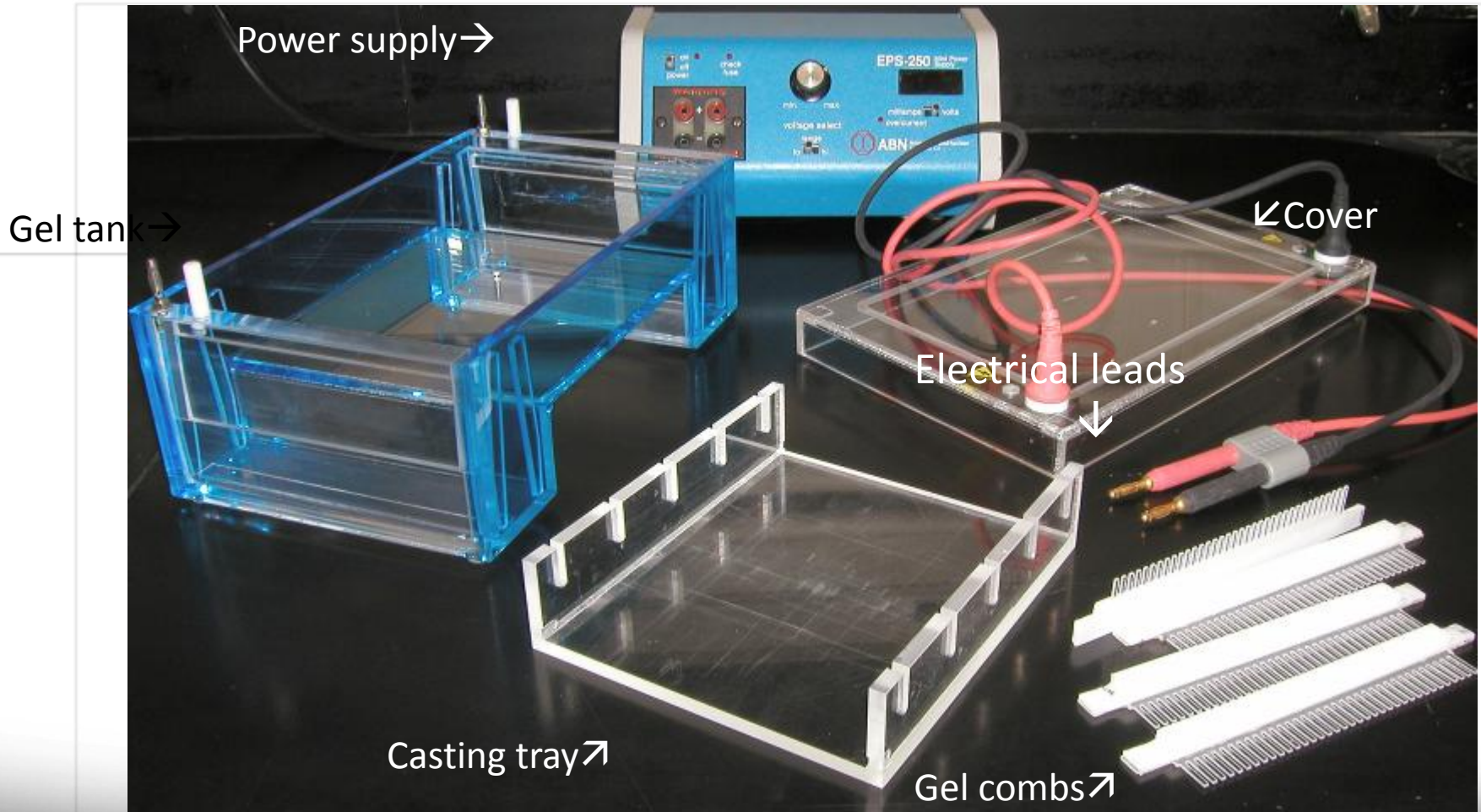
2 minutes 72 °C

only dNTP's

Elektroforesis

- Adalah suatu metode untuk melihat DNA atau protein berdasarkan panjang basa (DNA) atau berat molekulnya (protein)
- Pergerakan molekul DNA melalui pori-pori gel dibawah pengaruh medan listrik dengan kekuatan tertentu.
- Memanfaatkan muatan negatif pada DNA atau protein
- Pada DNA menggunakan *Agarose Gel Electrophoresis*
- Pada protein dinamakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Electrophoresis Equipment

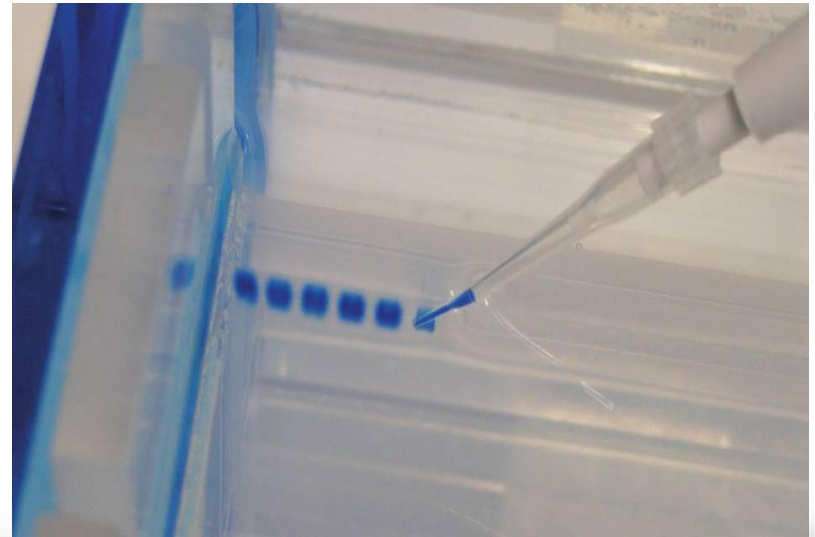


Langkah Kerja Elektroforesis



Carefully place the pipette tip over a well and gently expel the sample. The sample should sink into the well. Be careful not to puncture the gel with the pipette tip.

The DNA samples are mixed with a dense loading dye so they sink into their wells and can be seen

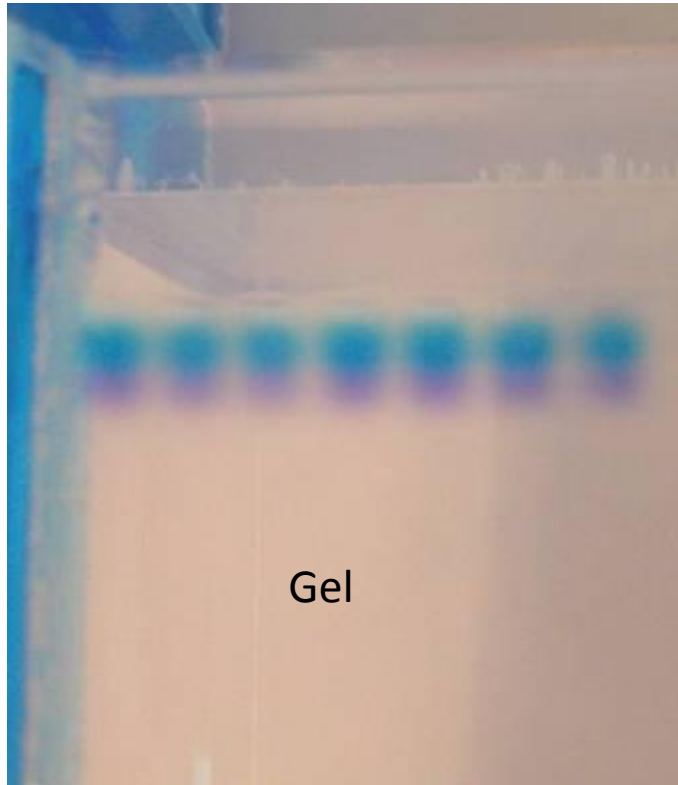


Prinsip Kerja Elektroforesis

Cathode
(-)

DNA
(-)
↓

Anode
(+)

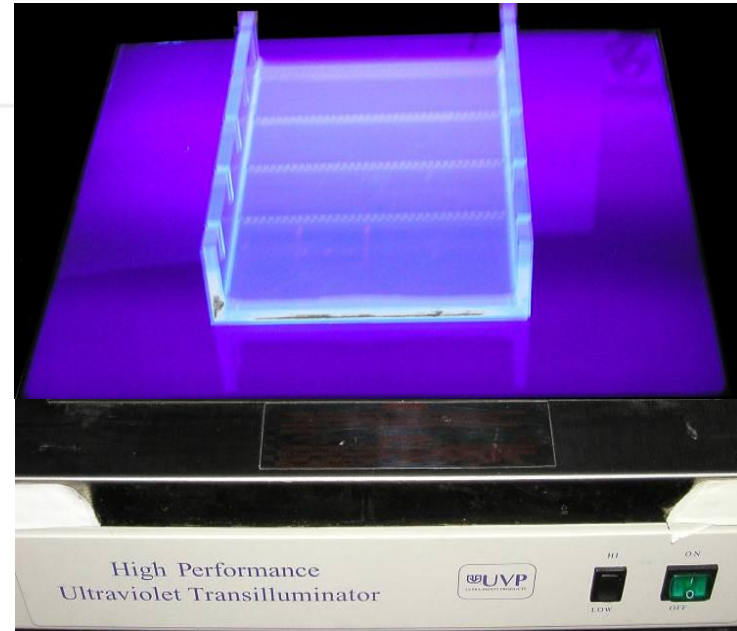


← wells

← Bromophenol Blue



Staining the Gel Allow
the gel to stain for 25-30
minutes.



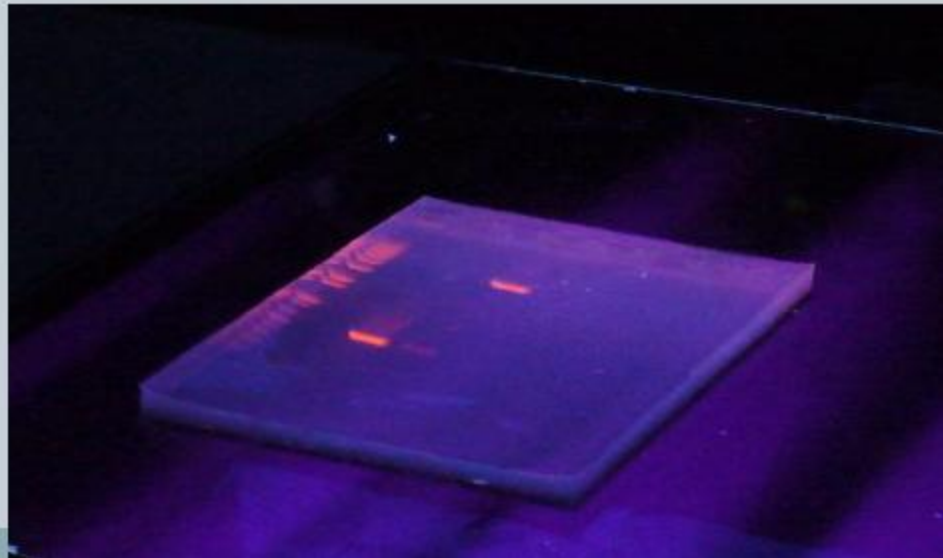
Ethidium Bromide requires an
ultraviolet light source to
visualize with GelDoc

Visualisasi DNA

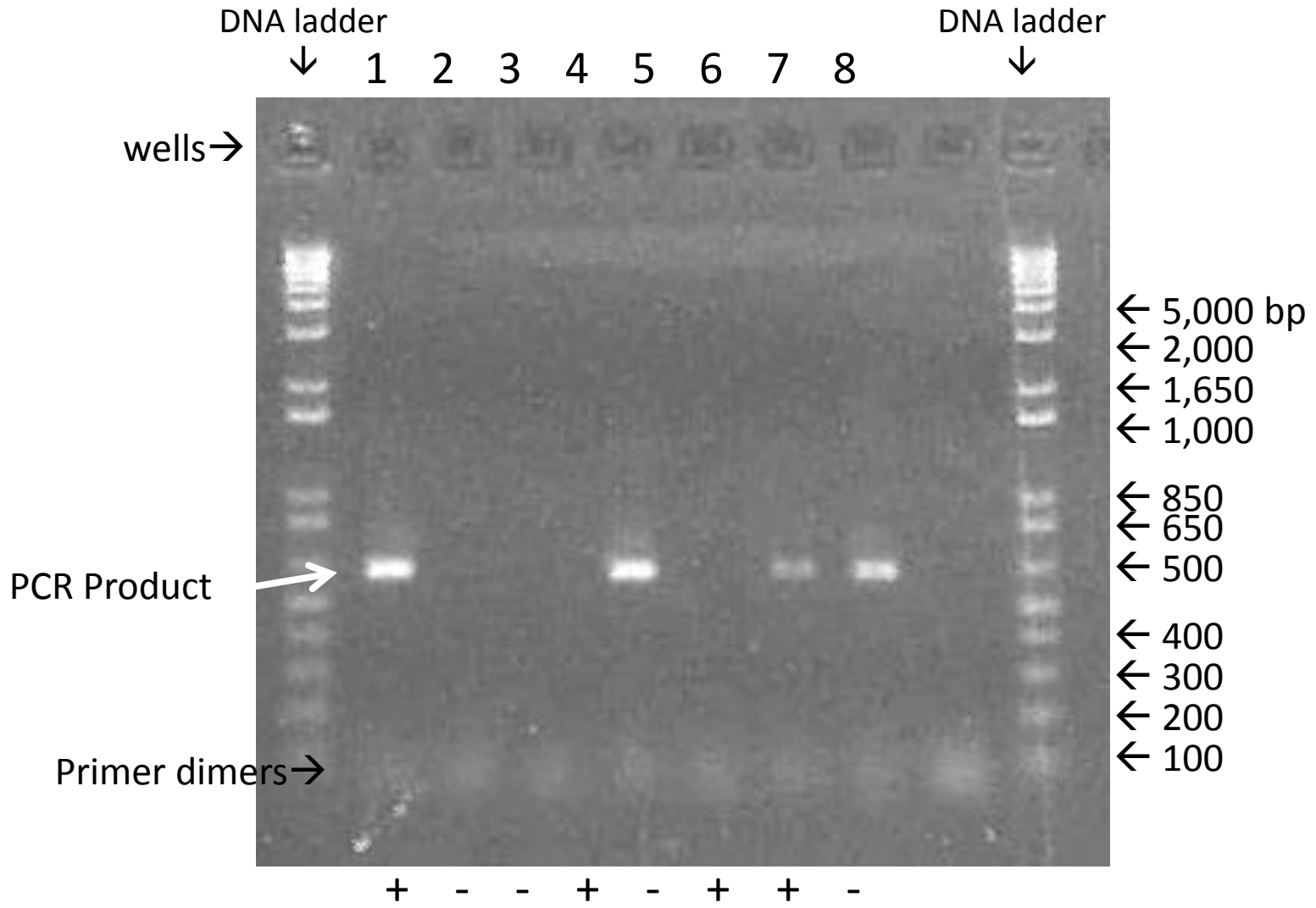
Sebelum



Sesudah



Visualizing the DNA (ethidium bromide)



Samples # 1, 4, 6 & 7 were positive for Wolbachia DNA

Restriksi DNA

- Adalah pemotongan DNA menggunakan enzim DNA restriksi
- Ada beberapa macam enzim DNA restriksi endonuklease, contohnya *BamHI*, *Sall*, *XhoI* dll
- Tiap enzim spesifik terhadap kode genetik DNA → misal *BamHI* hanya akan memotong DNA dengan kode GGATCC

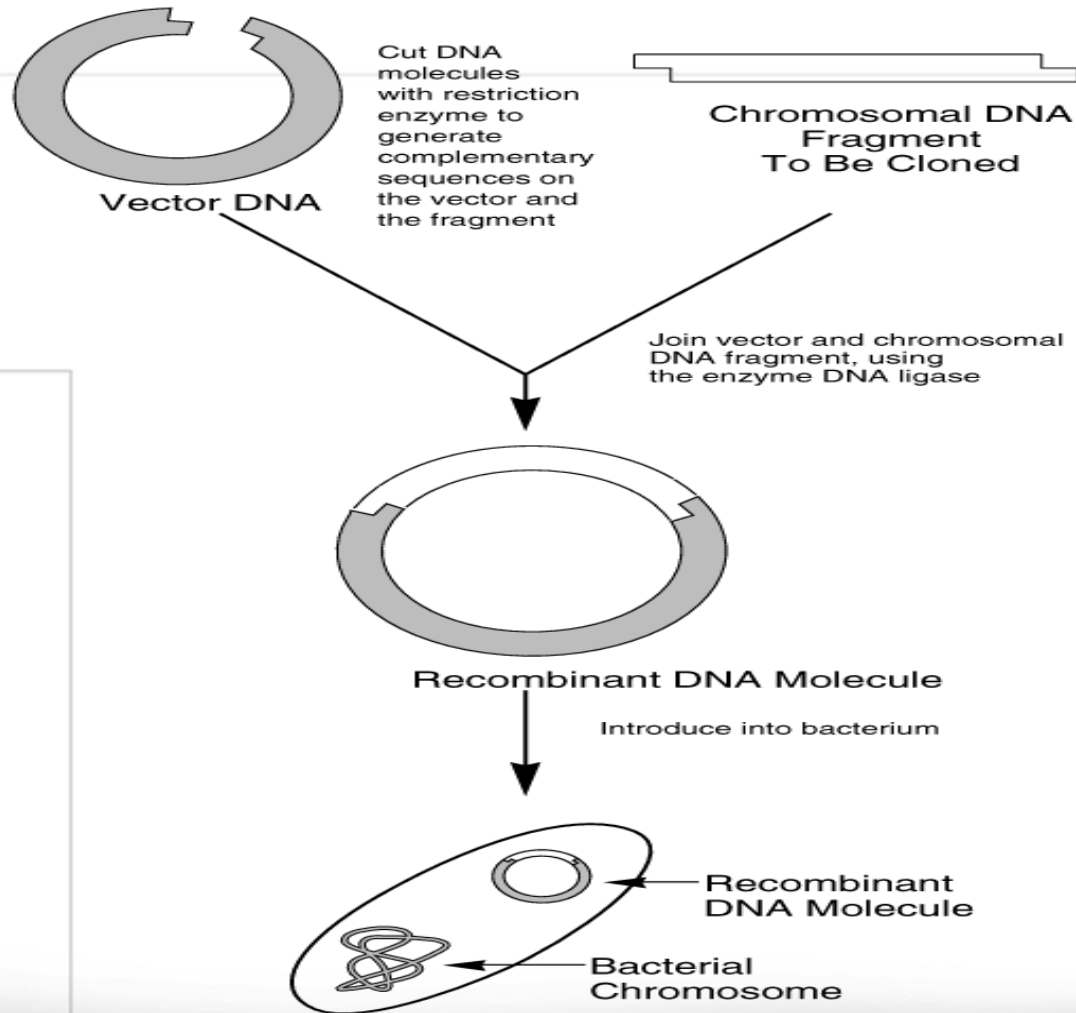
Ligasi DNA

- Penggabungan DNA menggunakan enzim DNA ligase
- Proses ini memerlukan kode genetik yang sesuai antara kedua DNA yang digabungkan
- Bersama dengan restriksi DNA, proses ini berperan dalam kloning gen

Kloning DNA

- DNA cloning is a technique for reproducing DNA fragments.
- A vector is required to carry the DNA fragment of interest into the host cell
- This technique is the first stage of most of the genetic engineering experiments:
 - production of DNA libraries
 - PCR
 - DNA sequencing

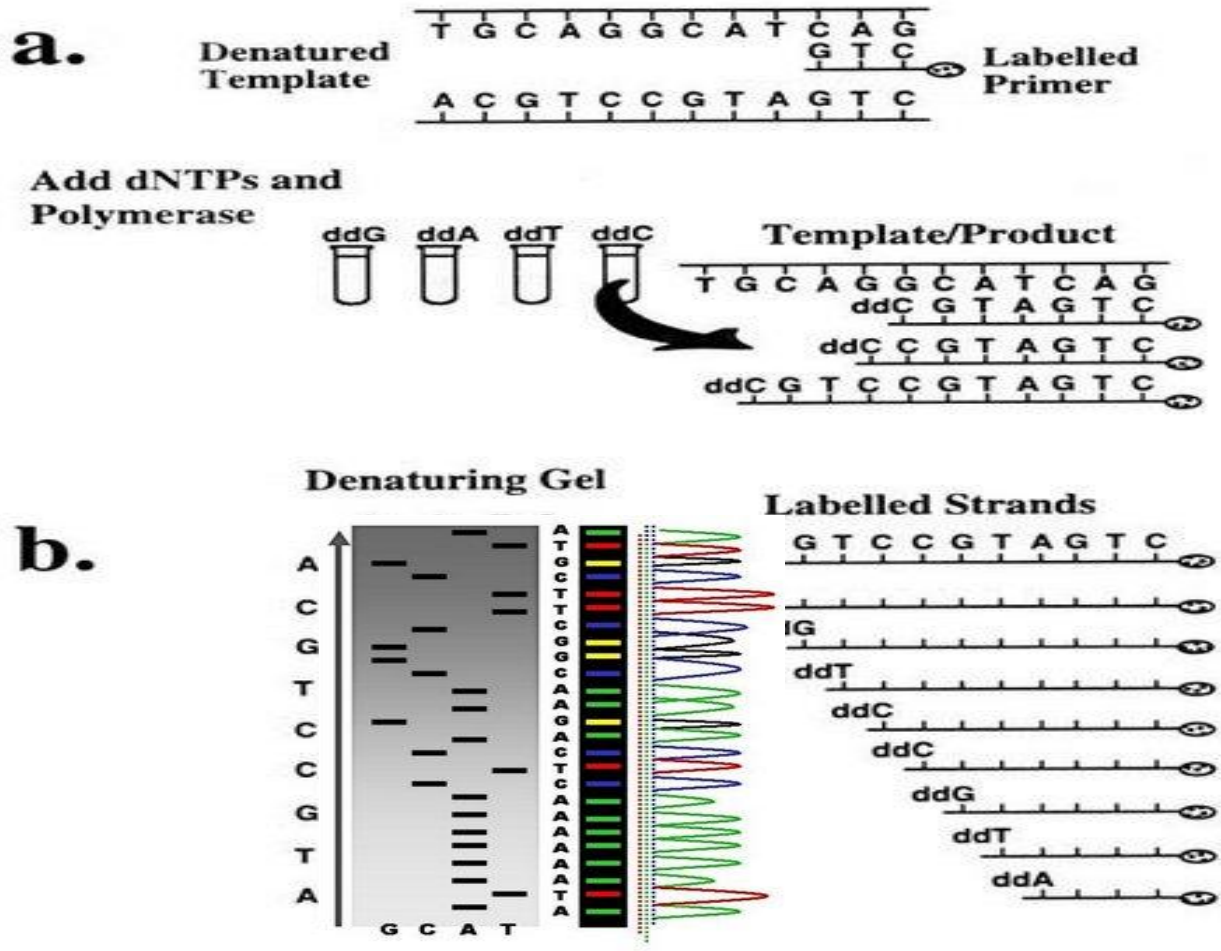
Kloning DNA



Sekuensing DNA

- Sekuensing DNA adalah metode penentuan urutan basa nukleotida suatu fragmen DNA
- Metode sekuensing yang umum dilakukan adalah metode Sanger yang dapat dilakukan melalui metode radioaktif dan metode fluoresens dan Maxam-Gilbert chemical cleavage method
- Teknologi Terkini untuk sekuensing DNA di kenal dengan NGS (Next Generation Sequencing)

Sekuensing DNA



Kultur Sel

- Proses perkembangbiakan sel di dalam laboratorium
- Menggunakan medium khusus yang mengandung nutrisi untuk pertumbuhan sel
- Menggunakan kondisi tertentu seperti suhu 37^o C dan CO₂ 5%
- Bisa ditambahkan antibiotik dan antifungal untuk menghindari kontaminasi mikroba
- Contoh Kultur Sel
 - ✓ Kultur Jaringan Sel Tumbuhan
 - ✓ Kultur Jaringan Sel Hewan (Stem Sel)

A word cloud featuring various expressions of gratitude in multiple languages and scripts. The most prominent words are 'THANK YOU' in large, bold, black capital letters. Other visible words include 'GRACIAS', 'ARIGATO', 'SHUKURIA', 'DANKSCHEEN', 'TASHAKKUR ATU', 'SUKSAMA', 'BIYAN', 'SHUKRIA', 'GRAZIE', 'MEHRBANI', 'PALMES', 'BOLZİN', 'MERCİ', 'JUSPAXAR', 'GODHARSHITA', 'SPHARSHITA', 'KOSAPUSPANA', 'HAARE', 'YAQRANYELAY', and 'TINGGI'.