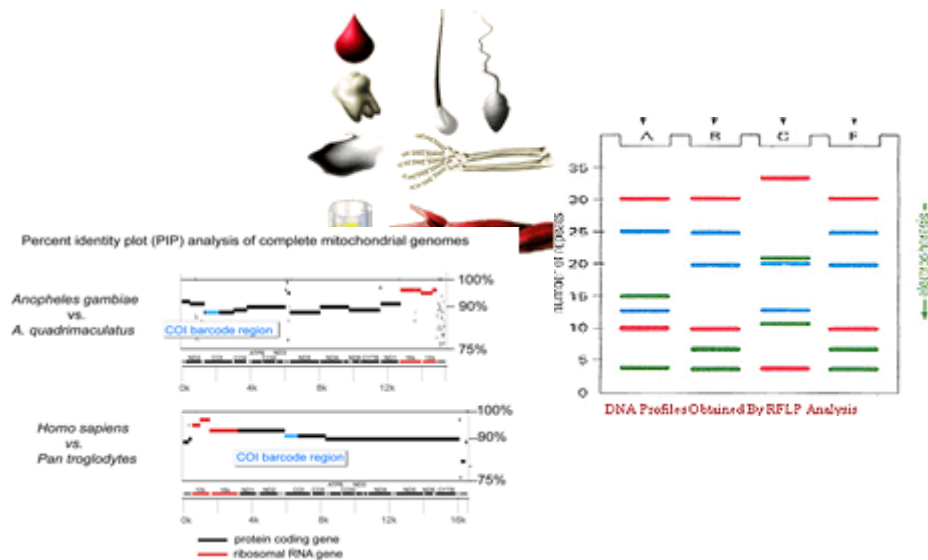


# Modul Praktikum

## Sidik Jari Molekuler & Barcoding



Oleh:  
Prof. Dra. Fatchiyah, M.Kes.Ph.D  
Prof. Dr.Ir. Estri Laras Arumingtyas MSc.St.  
Dr Suharjono, MS.  
Nia Kurniawan, MP, PhD

**LABORATORIUM BIOLOGI MOLEKULER DAN SELULER  
JURUSAN BIOLOGI FAKULTAS MIPA  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alaamin, puji syukur kepada Allah SWT yang telah mengijinkan penulis untuk menyelesaikan penulisan buku praktikum Sidik Jari Molekuler & Barcoding ini dengan baik. Mata kuliah ini adalah mata kuliah lama yang telah diperlukan sebagai mata kuliah lanjutan Biologi Molekuler pada semester sebelumnya.

Tujuan dari mata kuliah ini adalah mahasiswa mempelajari teknik-teknik dasar analisis sidik jari molekuler & barcoding dan dapat mengembangkannya dalam bidang penelitian dengan dasar kajian molekuler.

Demikian, semoga diktat praktikum ini bisa bermanfaat dan insyallah akan terus dikembangkan untuk teknik-teknik dasar biologi molkeler yang lebih lanjut. Saran dan kritik dari pembaca sangat diharapkan untuk perbaikan dikemudian hari.

Malang, 12 Februari 2018

Koordinator MK SJM  
Prof Dra. Fatchiyah, M.Kes.Ph.D.

## DAFTAR ISI

Praktikum	Halaman
Kata Pengantar	2
Daftar Isi	3
Pendahuluan Isolasi DNA	4
I. Isolasi DNA organ dan darah	6
II. Isolasi DNA dengan bahan terbatas	9
III. MiniPrep isolasi DNA plasmid bakteri	10
IV. Isolasi DNA Tanaman	12
V. Pengukuran kualitatif dan kuantitatif molekul DNA	13
VI. Amplifikasi DNA dengan PCR	15
VII. Uji polimorfisme dengan teknik RFLP	18

## **PERATURAN DAN TATA TERTIB KEGIATAN PRAKTIKUM SIDIK JARI MOLEKULER**

1. Setiap praktikan diwajibkan hadir tepat pada waktunya. Praktikan yang terlambat lebih dari 15 menit, tidak diperkenankan mengikuti praktikum, kecuali seizin kordinator topik praktikum yang sedang dilaksanakan.
2. Praktikan yang tidak hadir sampai 3 kali, tanpa ada alasan yang jelas dan dapat diterima, tidak diperkenankan untuk mengikuti kegiatan praktikum selanjutnya
3. Praktikan wajib menyerahkan laporan praktikum minggu sebelumnya sesuai topik yang akan dilaksanakan
4. Selama diadakan pre/mid/post test, praktikan tidak diperkenankan meminta/memberikan jawaban kepada praktikan lain. Jika hal tersebut terjadi, maka dilakukan pengurangan 5 point/kejadian contekan dari nilai seluruh kelas. Bagi yang terlambat pre-test, tidak diberikan waktu kompensasi (pre-test tetap berlangsung dan praktikan mengerjakan sesuai nomor pre-test yang dibacakan asisten)
5. Selama praktikum, praktikan tidak diperkenankan makan, minum dan melakukan kegiatan diluar kegiatan praktikum.
6. Setelah melakukan praktikum, diwajibkan membersihkan alat-alat yang dipakai dan disimpan kembali pada tempat semula dalam keadaan bersih. Sampah harus dibuang ditempat sampah dan praktikan wajib menjaga kebersihan laboratorium
7. Laporan praktikum dikumpulkan pada praktikum selanjutnya atau dapat dikumpulkan 1 minggu setelah laporan sementara dibagikan oleh asisten
8. Keterlambatan pengumpulan laporan dikenakan pengurangan nilai (per jam minus 10)

### **SANKSI**

1. Bagi praktikan yang tidak mengumpulkan laporan praktikum, *tidak diperkenankan* mengikuti ujian akhir praktikum (UAP).
2. Bagi praktikan yang terlambat mengumpulkan laporan praktikum, nilai laporan dikurangi 10 per jam
3. Kesamaan dalam pembuatan Laporan praktikum akan dikenakan nilai NOL (0)

## I. Praktikum Isolasi DNA Organ dan Darah

### *Bahan yang digunakan*

1. Ery lysis buffer :

155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM Na<sub>2</sub>EDTA

2. Cell Lysis Solution :

10mM Tris-Cl pH 8.0; 25mM EDTA pH 8.0; 20% SDS

NH<sub>4</sub>COOH solution: untuk 10 ml ambil 3.854g tambah 10ml H<sub>2</sub>O

3. Tris-EDTA (TE) 0,01 M pH 8.0

10 mM Tris-HCl (pH 8.0) ditambah 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O pH 8.0

4. Tris-EDTA (TE) 0,01 M pH 7.6

10 mM Tris-HCl (pH 7.6) ditambah 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O pH 8.0

### 1.1 Isolasi DNA Limfosit Metode Salting-out

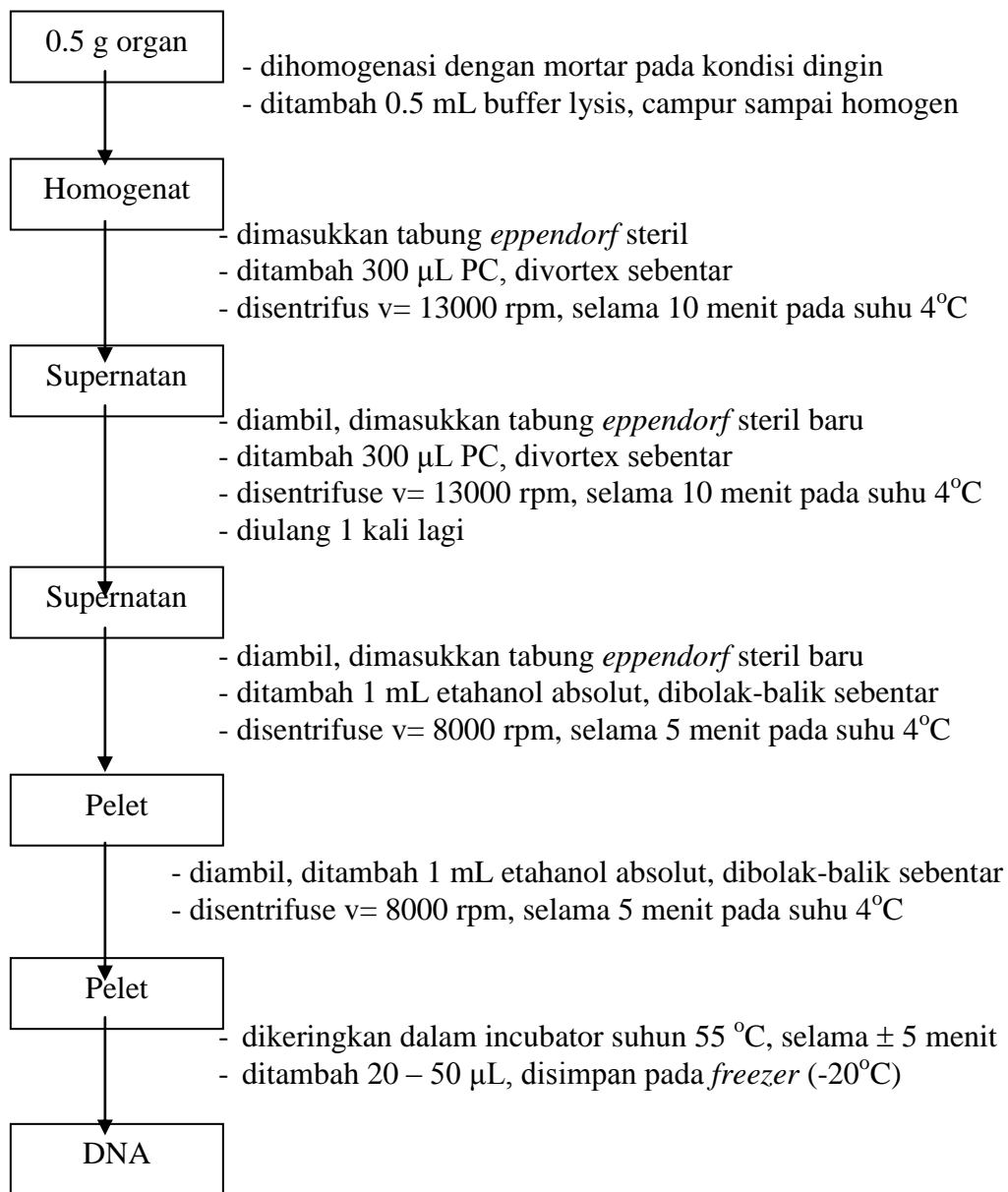
1. Dua (2) ml darah dimasukkan ke dalam *Heparin tube*, kemudian digoyangkan secara perlahan membentuk angka delapan.
2. Darah dari *Heparin tube* dipindah ke tabung sentrifus (tabung polipropilen), kemudian ditambah 6 ml *RBC lysis solution* 1x, diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit
3. Sentrifus 1500 rpm 10 menit dalam suhu ruangan, supernatan (larutan bagian atas) diambil. Jika pelet masih berwarna merah, prosedur nomor 2 diulangi lagi sampai pelet berwarna putih. Pelet yang berwarna putih menandakan adanya sel limfosit. Pelet yang berwarna merah menandakan masih adanya sel darah merah.
4. Pelet ditambah 750 µL *cell lysis solution*, kemudian dihomogenkan dengan cara *pipetting*.
5. Kemudian ditambah 2 µL Rnase A (10 mg/ml), dikocok kurang lebih 25 kali dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.
6. Setelah ditambah 500 µL *protein precipitation*, divortex.
7. Kemudian disentrifugasi kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit.

8. Presipitat protein berwarna coklat muda, jika presipitat belum terbentuk maka prosedur nomor 6 diulangi.
9. Supernatan (mengandung DNA) yang diperoleh dipindah ke tabung Eppendorf steril yang sudah berisi 1,5 ml ethanol absolut
10. Tabung dikocok perlahan sampai benang-benang DNA (berwarna bening) tampak melayang.
11. Untuk mengendapkan DNA, tabung disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit.
12. Supernatan dibuang, pelet ditambah ethanol 70%, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit.
13. Supernatan dibuang, pelet dikeringkan dalam inkubator suhu 57°C.
14. Rehidrasi DNA dalam 50-100 buffer TE (pH 7.6), kemudian tempatkan pada suhu 37°C selama 2 jam untuk memperoleh DNA terlarut. Pastikan larutan homogen.
15. Simpan pada suhu -20°C (freezer).
16. Analisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada OD260 dan OD280.

## 1.2 Isolasi DNA dari Organ Hewan

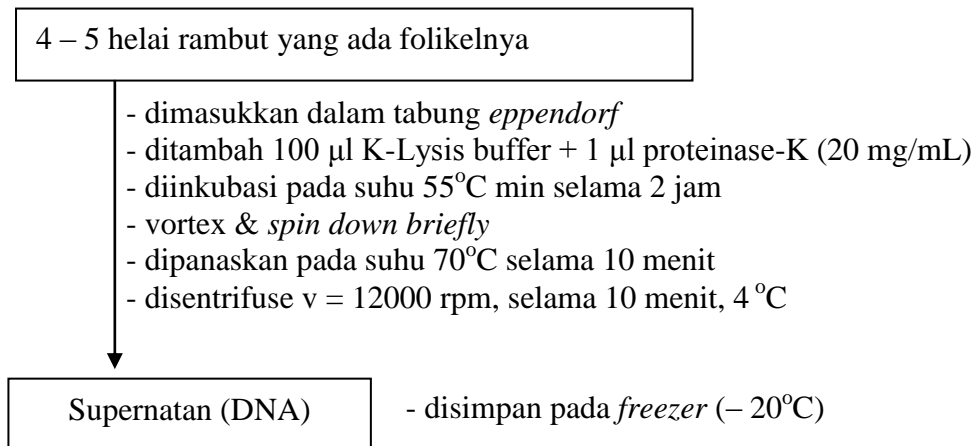
Bahan :

1. Buffer Lysis (untuk 100 mL)  
100 mM Tris-Cl (pH 8) ; 2 mM EDTA (pH 8); Nonidet-P40 2.5%  
10mg/ml Proteinase-Kditambahkan sebelum digunakan
2. Phenol Chloroform (PC)  
Phenol : Chloroform = 25 : 24  
(diletakkan dalam botol stock gelap dan ditutup rapat)
5. Phosphate Buffer Saline (PBS) 0,15 M pH 7,4  
137 mM NaCl, ditambahkan 2,7mM KCl; 8,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O dan 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; kemudian dilarutkan dalam akuades steril hingga 1 L



## II. Isolasi DNA dengan bahan terbatas

### 2.1 Isolasi DNA Folikel Rambut Manusia (modifikasi dari metode Kotsimbos et al, 1994)

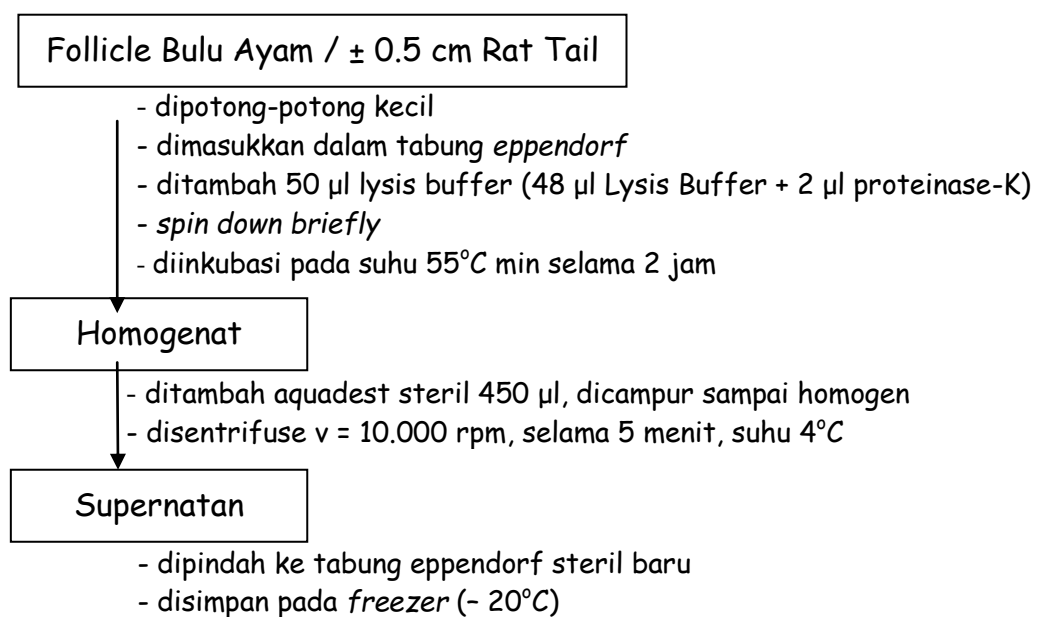


### 2.2 Isolasi DNA dari Folikel Bulu Ayam atau Rat Tail Cut

Komposisi Buffer Lysis:

1. 10 mM Tris-Cl pH 8
2. 20 mM EDTA
3. 0.1 % SDS
4. 20 mM NaCl

Note: per 50 µl (48 µl Lysis buffer + 2 µl 10mg/ml proteinase-K)



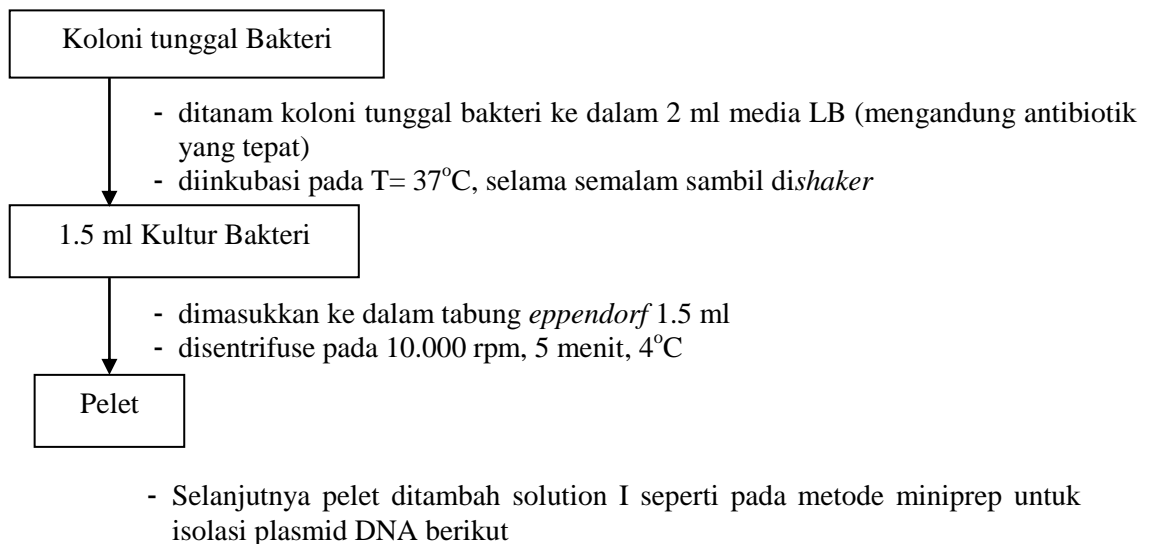


### III. MINI-PREPARATION OF PLASMID DNA

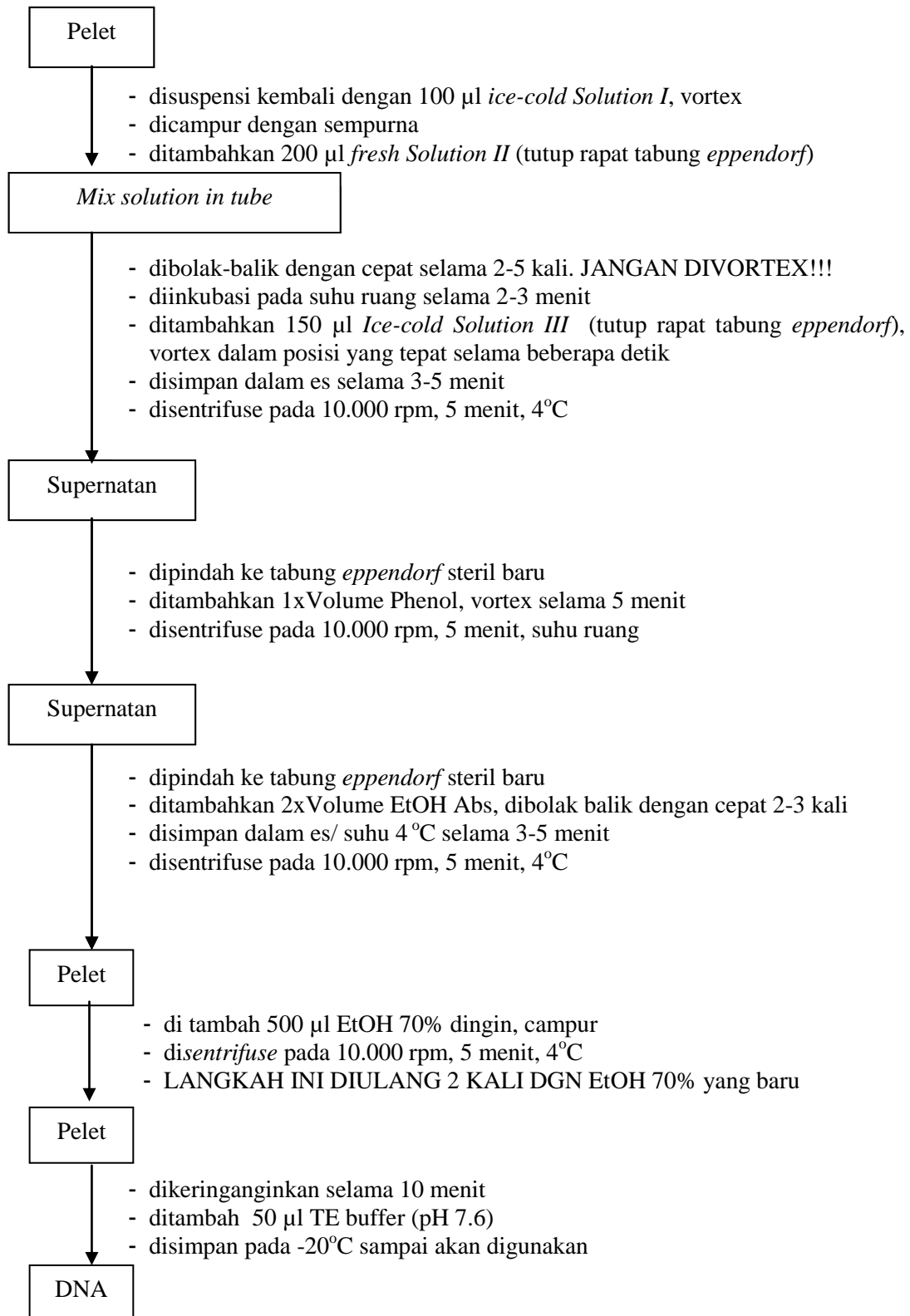
Bahan:

- a. Koloni Bakteri
- b. Media LB
- c. Solution I
  - 50 mM glucose
  - 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)
  - 10 mM EDTA (pH 8.0)
- d. Solution II
  - 5 M NaOH
  - 10 % SDS
  - dH<sub>2</sub>O
- e. Solution III
  - 5 M Pottasium Acetate
  - Glacial Acetate Acid
  - dH<sub>2</sub>O
- f. Phenol
- g. EtOH Absolut
- h. EtOH 70%
- i. TE Buffer pH7.6

#### 3.1 Inokulasi dan Pemanenan Bakteri



### 3.2 Miniprep Alkali Lisis untuk isolasi DNA plasmid bakteri



## IV. ISOLASI DNA TANAMAN

Bahan kimia:

1. CTAB buffer ekstrak

2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA (pH 8), 1,4 M NaCl, disterilkan dengan autoclave, disimpan dalam suhu ruang, kemudian tambahkan 2%  $\beta$ -merkaptoethanol, 0,1 mg/ml proteinase K sesaat sebelum digunakan.

2. PCI (Fenol : kloroform : isoamilalkohol = 25 : 24 : 1)

3. Nitrogen Cair (N<sub>2</sub>-Liquid)

4. 7.5M Ammonium sulfat

5. EtOH 70%

6. TE Buffer pH7.6

7. Larutan Etanol:Kloroform

Diambil 1 mL etanol 96% p.a. dan dicampurkan dengan 24 mL kloroform.

### Cara Kerja

- 1. Daun muda sebanyak 0,1 g yang telah dibekukan, digerus dalam nitrogen cair, kemudian ditambah 700  $\mu$ l bufer ekstrak, dipindah ke Eppendorf dan divorteks.**
2. Tabung Eppendorf yang berisi homogenat diinkubasi dalam water bath suhu 65<sup>0</sup>C selama 30 menit.
3. Kemudian disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke tabung Eppendorf baru kemudian ditambah PCI dengan volume sama dan divorteks.
4. Sentrifugasi 13000 rpm selama 5 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke tabung Eppendorf baru kemudian ditambah CI dengan volume sama dan divorteks.
5. Sentrifugasi 13000 rpm selama 5 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke tabung Eppendorf baru kemudian ditambah ammonium asetat 7,5 M (0,1 vol) dan divorteks.
6. Inkubasikan pada suhu -20<sup>0</sup>C selama 1 jam.
7. Sentrifugasi 13000 rpm selama 15 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Supernatan dibuang, kemudian pelet ditambah ethanol 70% sebanyak 500  $\mu$ l dan homogenkan secara perlahan.
8. Setelah sentrifugasi, supernatan dibuang, pelet dikeringkan dalam inkubator suhu 55<sup>0</sup>C.
9. DNA yang berupa pelet dilarutkan dalam 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. DNA dapat disimpan pada suhu -20<sup>0</sup>C untuk jangka panjang.

## V. UJI KUANTITATIF DAN KUALITATIF DNA

Untuk menguji kuantitatif dan kualitatif isolat DNA, maka dapat dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan elektroforesis gel agarosa.

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  $\lambda$  260 nm, sedang kontaminan protein atau phenol akan menyerap cahaya pada  $\lambda$  280 nm. Sehingga kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi  $\lambda$  260 nm dibagi dengan nilai absorbansi  $\lambda$  280 ( $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ ), dan nilai kemurnian DNA berkisar antara 1.8-2.0. Serta untuk mengukur konsentrasi DNA digunakan rumus sebagai berikut:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

$A_{260}$  = Nilai absorbansi pada  $\lambda$  260 nm

50 = larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50 ug untai ganda DNA per mL

Metoda standar yang digunakan untuk identifikasi, separasi dan purifikasi fragmen DNA adalah menggunakan *elektroforesis gel agarosa*. Migrasi elektroforesis DNA melalui gel agarosa dipengaruhi oleh faktor *ukuran dan konformasi molekul DNA, konsentrasi agarosa, arus listrik dan temperatur*. Pewarna *Ethidium Bromide* (EtBr) digunakan untuk alat identifikasi dan mengukur semi-kualitatif fragmen DNA yang terseparasi dalam gel. EtBr ini akan terikat diantara dua untai ganda DNA, sehingga band/pita DNA dalam gel agarosa akan berpendar, karena pewarna ini mengandung zat fluoresence. EtBr dapat diberikan pada setiap sampel yang akan dimasukkan ke sumuran gel atau dicampurkan ke gel agarosa sebelum gel dicetak dalam cetakan gel. Intensitas fluoresence dapat diukur dengan menggunakan *DNA marker standar*, sehingga dapat diperkirakan kuantitas DNANYA, misal antara 0.50 sampai 20 ug/mL.

Bahan kemikalia

1. Agarose
2. Tris-Borac Acid (TBE): 89 mM Tris-Cl, 89 mM Borate, and 2 mM EDTA solution.

### Elektroforesis Gel Agarosa

1. Siapkan gel agarosa 1% dengan memanaskan bubuk agarosa dengan TBE hingga mendidih.
2. Setelah mendidih, dinginkan hingga temperatur sekitar 80°C dan ditambahkan 1-2 µL EtBr, kemudian tuangkan agarosa + EtBr dicetakan yang telah dipasang sisir.
3. Bila telah mengeras, gel dan cetakannya dimasukkan ke dalam chamber dan dituang TBE buffer sampai gel terendam. Kemudian masukkan DNA dan loading dye (1:1) pada masing-masing sumuran.
4. Hubungkan elektroda dengan power supply dan nyalakan hingga 1-2 jam lamanya.
5. Setelah selesai, matikan dan ambil gel, pindah ke uv-transilluminator dan amati hasilnya. Hasil didokumentasikan dengan kamera polaroid khusus.

## VI. AMPLIFIKASI DNA DGN POLYMERASE CHAIN REACTION

Reaksi Polimerase Berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatis untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro*. Metoda PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar  $10^6$ - $10^7$  kali. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap  $n$  siklus PCR akan diperoleh  $2^n$  kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target.

Tabel 1. Amplifikasi Geometrik ( $X=2^n$ )

Siklus PCR	Jumlah Relatif Molekul
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
10	1.024
20	1.048.576
30	1.073.741.824

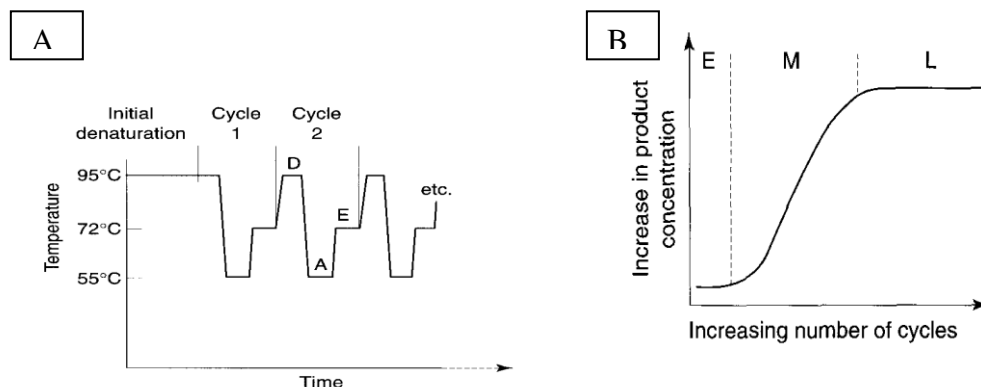
Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang meliputi denaturasi, annealing dan ekstensi oleh *enzim DNA polimerase*. *Taq DNA polymerase* diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* (*Taq*) dikembangkan pada tahun 1988. Enzim ini tahan sampai temperature mendidih  $100^{\circ}\text{C}$ , dan aktifitas maksimal pada temperatur  $70$ - $72^{\circ}\text{C}$ . Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hibrid dengan ujung-5' menuju ujung-3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan.

Dasar siklus PCR yang utama merupakan siklus berulang 30-35 siklus meliputi:

- a. Denaturation ( $95^{\circ}\text{C}$ ), 30 detik  $\rightarrow$  denaturasi dua untai DNA template menjadi untai tunggal

- b. annealing (55–60°C), 30 detik → pengenalan/penempelan primer DNA template, suhu annealing ditentukan oleh susunan primer. Optimalisasi temperatur *annealing* dimulai dengan menghitung *Melting Temperature* ( $T_m$ ) dari ikatan primer dan DNA template. Cara termudah menghitung untuk mendapatkan melting-temperatur yang tepat menggunakan rumus  $T_m = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$ . Sedang temperatur annealing biasanya 5°C dibawah  $T_m$  primer yang sebenarnya.
- c. extension (72°C), waktu tergantung panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi.

Peningkatan jumlah siklus PCR diatas 35 siklus tidak memberikan efek yang positif, seperti yang terlihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 1. Siklus dasar PCR. A. Sistem tiga temperatur yang berbeda. B. Kenaikan hasil amplifikasi menunjukkan pertumbuhan sigmoid.

**Sampel DNA yang dipakai bisa dari semua organisme, pilih salah satu, dan primer yang digunakan disesuaikan dengan uji sidik jari molekulernya**

### Amplifikasi Gen target

Pada reaksi PCR diperlukan DNA template, primer spesifik, enzim DNA polimerase yang thermostabil, buffer PCR, ion  $Mg^{2+}$ , dan thermal cycler.

Cara Kerja:

PCR mix solution, untuk 10ul solution maka campurkan:

1. Aquadest steril = 2  $\mu$ L
2. PCR mix = 5  $\mu$ L
3. Primer 1(10pmole) = 1  $\mu$ L
4. Primer 2 (10pmole) = 1  $\mu$ L

5. Sampel DNA = 1  $\mu$ L

Primer yang digunakan:

1. Gen Growth Hormone E: GHE-5F(5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3') dan GHE-5R(5'-GACACCTACTCAGACAATGCG-3')

Program:

☞ hot start (denaturasi awal) 94 °C selama 2 menit

☞ Siklus amplifikasi diulang 31 kali terdiri dari

☞ Denaturasi 94 °C selama 60 detik

☞ Annealing 58 °C selama 45 detik

☞ Ekstensi 72 °C selama 60 detik

☞ periode ekstensi pada suhu 72 °C selama 5 menit

2. Gen SR-Y, primer1 (5'-GAGCCTGGACTTTCTTGTGC-3') dan primer2 (5'-AGGGAGCTTCCATCCAAGT-3')

☞ hot start (denaturasi awal) 95 °C selama 5 menit

☞ Siklus amplifikasi diulang 35 kali terdiri dari

☞ Denaturasi 95°C selama 60 detik

☞ Annealing 55 °C selama 60 detik

☞ Ekstensi 72 °C selama 60 detik

☞ periode ekstensi pada suhu 72 °C selama 7 menit

3. Primer GH 28/GH 29 HLA DQB1, program

Hot Start Denaturation (1x): 92 °C, 5 menit

Siklus utama 30x:

- denaturasi 92 °C, 30 sec
- annealing 58 °C, 30 sec
- extention 72 °C, 1 menit

Post extention (1x): 72 °C, 7menit

4. Primer Aux1-F/Aux1-R, program

Hot Start denaturation (1x): 93 °C, 1 menit

Siklus utama 35x:

- denaturasi 93 °C, 1 min
- annealing 56 °C, 30 sec
- extention 72 °C, 1 min

Post extention (1x) 72 °C, 10 menit

**Catatan; bila primer diganti program PCR menyesuaikan susunan primer dan panjang DNA produk amplifikasi yang diinginkan**



## VII. UJI POLIMORFISME DENGAN TEKNIK RFLP

Sejak penemuan *E. coli* K12 dan *Haemophylus influenzae* yang mempunyai sifat restriksi endonuklease secara khusus setelah tahun 1970. Pada saat ini telah banyak dikenal berbagai macam enzim restriksi sebagai salah satu bahan rekayasa genetika untuk memodifikasi DNA atau gen secara khusus. Hampir semua teknik manipulasi DNA menggunakan enzim yang telah dimurnikan. Enzim-enzim ini berperan dalam proses penting di dalam sel, seperti replikasi dan transkripsi DNA, DNA proofreading terhadap mutasi DNA, degradasi DNA/RNA asing (dari infeksi virus) serta rekombinasi antara molekul-molekul DNA yang berbeda.

Enzim-enzim untuk manipulasi ini dapat dikelompokkan menjadi lima golongan besar tergantung pada jenis reaksi yang dikatalis:

1. Nuclease, kelompok enzim ini dapat memotong, memendekkan atau mendegradasi molekul DNA. Enzim kelompok ini mempunyai sifat eksonuklease (menghilangkan nukleotid satu persatu dari ujung bebas molekul DNA); dan endonuklease (memecah ikatan fosfodiester internal pada molekul DNA. Misal: S1-Nuclease, DNaseI. Enzim restriksi.
2. Ligase, menyambung potongan DNA menjadi satu. Hanya satu yaitu DNA ligase.
3. Polymerase, mampu mensintesis untai DNA baru yang komplementer dari cetakan atau template DNA. Misal: Fragmen Klenow, T4-DNA polymerase, dan Reverse transcriptase.
4. Enzim modifikasi, berperan untuk menghilangkan atau mengubah gugus kiwiawi. Misal: Alkali-fosfatase (memotong gugus fosfat pada ujung-5' molekul DNA); Polinukleoid kinase (menambah gugus fosfat pada ujung-5' yang bebas); dan Deoxinukleotidil transferase terminal (menambah satu atau lebih deoxinukleotid pada ujung-3' molekul DNA.
5. Topoisomerase, membuat atau mengubah DNA-supercoiled yang tertutup secara kovalen.

Kloning gena didasarkan atas peran enzim-enzim modifikasi tersebut, dalam memotong vector, DNA target, memasukkan DNA target, maupun menggandakannya. Salah satu ensim restriksi endonuklease yang berperan penting dalam kloning gena adalah RE tipe II (RE). Ciri utama RE ini adalah tiap enzim mengenal urutan spesifik pada

molekul DNA yang akan dipotong. ER tertentu akan memotong pada urutan pengenalan tidak memotong daerah urutan lainnya.

Beberapa enzim mengenali urutan heksanukleotid –*BamHI* yaitu GGATCC-, tetranukleotida –*AluI* yaitu AGTC-, atau pentanukleotida dengan basa pengenalan umum – misal *HinfI* yaitu GANTC-. Hasil pemotong enzim RE ini dapat menghasilkan ujung tumpul (*blund end*) maupun ujung lengket (*sticky-end*). Hal ini yang perlu diketahui, bahwa aktivitas enzim akan maksimum pada komposisi bufer yang spesifik, terkadang bagi enzim yang aktivitasnya rendah bisa dimaksimalkan dengan menambah BSA sebagai aktivator. Tetapi untuk RE yang mempunyai aktivitas tinggi seperti *EcoRI*, penambahan BSA akan menurunkan aktivitas enzim ini secara tajam.

Tabel 2. Urutan pengenalan untuk beberapa enzim restriksi endonuklease

Enzim	Organisme	Urutan Pengenal	Ujung Potongan
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G↓AATTC	<i>sticky-end</i>
<i>HindIII</i>	<i>Haemophylus influenzae</i> Rd	A↓AGCTT	<i>sticky-end</i>
<i>HinfI</i>	<i>Haemophylus influenzae</i> Rf	GA↓NTC	<i>sticky-end</i>
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG↓CC	<i>blund end</i>
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AG↓CT	<i>blund end</i>
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	CCC↓GGG	<i>blund end</i>
<i>XbaI</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>	T↓CTAGA	<i>sticky-end</i>

**Sampel DNA genome atau DNA target yang dianalisis RFLP bisa pilih salah satu organisme atau gen target tertentu**

### RFLP analisis:

1. Isolat DNA genom yang murni dan/atau hasil PCR sebagai bahan dasar pemotongan DNA dengan enzim restriksi.
2. untuk setiap 10ul keseluruhan larutan digest, diperlukan 1ul buffer digest. Double digest dilakukan pada buffer yang sesuai. Salah satu prosedur pemotongan adalah

√ Untuk 50 ul solution, diisi sesuai urutan:

H2O	30-33ul (tergantung jumlah keseluruhan)
Digest Buffer	5ul
DNA/hasil PCR	2-5ul (tergantung konsentrasi DNA)
Enzimrestriksi	0.5-1ul

dan mix gentle kemudian spindown sebentar

3. Inkubasi pada temperatur 37 °C, minimal 1 jam sampai semalaman
4. Stop aktivitas ER pada temperatur 70 °C

5. Tambahkan Loading dye pada hasil restriksi, dan running dalam gel agarose dengan konsentrasi antara 1-2%, tergantung pada potongan pita DNA yang diinginkan.
- 
-

## DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B, Johnson A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. Molecular Biology of The Cell, 4th Edition. Garland Science. USA.
- Arnheim, N. And Levenson, C.H. 1990. Special Report: Polymerase Chain reaction. C & EN. Washington pp:36-47.
- Brown TA. 1991. Gene Cloning an Introduction. Van Nostrand Reinhold, UK.
- Fatchiyah, 2000, Polymerase Chain reaction. Brawijaya University. Malang.
- Innis MA., gelfand DH., Sninsky JJ. 1999. PCR Applications Protocol for functional Genomics. Academic Press. New York.
- Klug WS. & Cummings MR. 2002. Essentials of Genetics. 4th Ed. Prentice Hall. New Jersey.
- Watson JD. Hopkins NH, Robert JW., Steitz JA., Weiner AM, 1987. Molecular Biology of the Gene. Benjamin Cumming Publ. Co. California.