

1. METHODS

2. ESCHERICHIA COLI - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

KK  
TKD 32/00  
sur  
k

## TESIS

# KOMPARASI TEKNIK MINIPREPARASI DNA PLASMID ESCHERICHIA COLI ANTARA METODE MODIFIKASI LISIS ALKALI DAN METODE PEMANASAN

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

OLEH

IMAM SURYANTO  
NIM : 099612230 M  
IKD - BIOMEDIK

PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
1999

**KOMPARASI TEKNIK MINIPREPARASI DNA PLASMID  
ESCHERICHIA COLI ANTARA METODE MODIFIKASI LISIS  
ALKALI DAN METODE PEMANASAN**

**TESIS**

Untuk memperoleh Gelar Magister  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
pada Program Pascasarjana  
Universitas Airlangga

Oleh:

**IMAM SURYANTO**

**NIM. 099612230M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**SURABAYA**

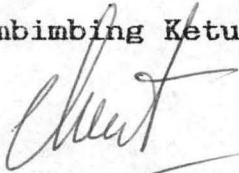
**1999**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 26 FEBRUARI 1999

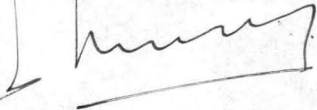
Oleh

Pembimbing Ketua



Prof. IGB Amitaba, Drh.  
NIP. 130 078 266

Pembimbing



Harry Cores de Vries, Drh. MS. MSc.  
NIP. 130 687 556

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Dr. Soetjipto, MS, PhD.  
NIP. 130 687 606

Telah diuji pada

Tanggal 26 Pebruari 1999

---

**PANITIA PENGUJI TESIS**

**Ketua** : Prof. Dr.Koentjoro Soehadi, dr

**Anggota** :1. Prof. IGB.Amitaba, drh.

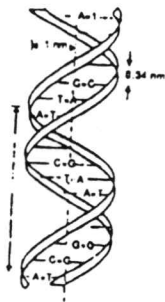
2. Garry Cores de Vries, drh, MS, MSc.

3. Dr.H.Sarmanu,drh, MS.

4. Ni Nyoman Tripuspaningsih,dra,MSi.

Dan Kami ciptakan segala sesuatu  
berpasang-pasangan supaya kamu  
mendapat pengajaran.

( Q. Adz Dzaariyaat, 49 )



Kenangan atas bunda tersayang,  
persembahan untuk ayah tercinta  
anak istri terkasih  
keluarga besar segenetis  
juga untuk para ilmuwan  
di bumi nusantara ataupun  
diseluruh mayapada.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur Alhadulillah saya panjatkan kepada Allah swt atas limpahan rahmat dan hidayahNya, sehingga penulisan tesis ini dapat terselesaikan

Saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat Prof.IGB Amitaba, drh selaku pembimbing ketua atas segala bimbingan, saran serta petunjuknya mulai dari semester awal hingga selesainya penulisan tesis ini.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada yang terhormat Garry Cores de Vries, drh, MS, MSc; sebagai pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan bimbingan dalam penelitian ini hingga terselesaikannya penulisan tesis.

Dengan selesainya tesis ini perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Kepada Rektor UNAIR Prof.Dr.Soedarto,dr, DTMH dan kepada Direktur Pascasarjana UNAIR Prof.Dr.Soedijono,dr atas kesempatan yang diberikannya untuk menjadi mahasiswa Pascasarjana UNAIR .

Kepada mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar terhormat Prof.Dr.Yuliati Hood A., dr,MS,DSPA,FIAC, serta Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dr. Soetjipto, MS, PhD, kepada Ketua Minat Studi Biologi Kedokteran; Prof.Dr.Koentjoro Soehadi,dr - atas saran dan masukan yang terkait dengan masalah penelitian ini sehingga dapat terselesaikan.

Kepada Dekan FMIPA UNAIR, Harjana,Drs,MS,Apt, dan Kepala Jurusan Kimia FMIPA UNAIR Faidur Rochman,Drs,MS; beserta

seluruh stafnya yang telah memberi fasilitas laboratorium dan peralatannya untuk digunakan dalam penelitian ini.

Kepada Ni Nyoman Tripuspaningsih, dra,MSi beserta staf, terima kasih yang tak terhingga atas segala bentuk bantuannya sehingga penelitian dapat berjalan lancar dan terselesaikan.

Kepada Dr.H.Sarmanu,drh saya ucapkan terima kasih atas saran dan bantuan dalam bidang Metodologi Penelitian dan Analisis Statistik sehingga penelitian ini bermakna dan dapat diselesaikan.

Kepada Kepala Pusat Veterinaria Farma Surabaya yang telah memberi izin dan bantuan materi untuk mengikuti Program Magister di Program Pascasarjana UNAIR; juga kepada teman-teman di PUSVETMA terutama Andre Heryanto,Drh, Indah M dan Ganis B.yang telah banyak membantu saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya.Demikian pula kepada semua pihak yang tak mungkin saya sebutkan satu persatu, terima kasih.

Kepada ayah serta almarhumah ibu tersayang terima kasih yang tak terhingga atas segala bimbingan sejak dari ayunan sampai dapat menyelesaikan Program Magister ini. Kepada Djarot,BN, SE spesial terima kasih atas segala bantuan dalam penulisan dengan komputer dan printernya.

Akhirnya, kepada istriku tercinta, Sri Endah R.,Ir serta anak-anakku M.Sungging dan A.Sekar Tejamaya, rasa sayang dan terima kasih atas pengorbanan dan pengertiannya didalam mendampingi lahir-bathin sampai terselesaikan penulisan tesis ini.

## KATA PENGANTAR

Penelitian dengan menggunakan plasmid DNA sebagai obyek merupakan permasalahan molekuler yang sangat menarik perhatian penulis sejak awal mengikuti Program Pasacasarjana UNAIR.

Perkembangan teknologi dibidang Biologi Molekuler dapat banyak menyingkap permasalahan yang berkaitan dengan bidang Biomedik, tetapi perangkat peralatan maupun bahannya dalam era krisis moneter menjadi amat mahal untuk ukuran peneliti Indonesia. Hal tersebut menimbulkan ide penulis untuk mencari modifikasi metode yang sudah ada dengan meramu formula dan menerapkannya dalam penelitian tingkat molekuler.

Menurut hemat penulis, berdasarkan pengalaman di laboratorium rekayasa molekuler, dapat dilakukan beberapa modifikasi dalam minipreparasi plasmid DNA. Peranan plasmid DNA dalam penelitian molekuler amatlah penting. Maka dengan bantuan literatur yang berhasil didapatkan dilakukanlah penelitian laboratorik eksperimental ini. Dalam penelitian tersebut penulis memperbandingkan minipreparasi metode modifikasi lisis alkali dengan metode pemanasan.

Harapan penulis adalah dengan menggunakan bahan yang sederhana dan seekonomis mungkin dapat terus mengadakan penelitian mengenai bioteknologi modern. Karena pada dasarnya keberhasilan bioteknologi modern tergantung pada tenaga terdidik yang mempunyai wawasan dan penalaran empirik laboratorik dengan berbekal rajin dan disiplin.



Menyadari bahwa penulisan tesis ini masih jauh dari sempurna maka masukan masukan berupa kritik dan saran sangatlah diharapkan demi sempurnanya tesis ini.

Akhirnya, semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu, khususnya Ilmu Biologi Molekuler Kedokteran dan dengan segala penerapannya untuk kesejahteraan umat manusia.

Surabaya, Pebruari 1999

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH .....	i
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1.Latar Belakang Masalah .....	1
1.2.Rumusan Masalah .....	3
1.3.Tujuan Penelitian .....	4
1.4.Manfaat Hasil Penelitian .....	4
<b>BAB II.TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1.Tinjauan Bioteknologi Modern .....	5
2.2.Plasmid .....	9
2.3.Plasmid Escherichia coli.....	12
2.4.DNA plasmid YCp50 .....	13
2.5.Teknik Isolasi Plasmid .....	14
2.6.Teknik Elektroforesis .....	18
<b>BAB III.KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1.Kerangka Konsepsual .....	21
3.2.Hipotesis .....	23
<b>BAB IV.METODE PENELITIAN</b>	
4.1.Rancangan Penelitian .....	24

4.2. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional .....	24
4.3. Bahan Penelitian .....	24
4.4. Alat Penelitian .....	25
4.5. Lokasi dan waktu Penelitian .....	25
4.6. Prosedur Penelitian .....	25
4.7. Analisis Data .....	27
<b>BAB V. HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN</b>	
5.1. Hasil Penelitian .....	28
5.2. Analisis Hasil Penelitian .....	32
<b>BAB VI. PEMBAHASAN</b>	
6.1. Minipreparasi metode modifikasi lisis alkali.	34
6.2. Minipreparasi dengan metode pemanasan.....	35
6.3. Komparasi hasil minipreparasi modifikasi lisis alkali dan pemanasan.....	35
<b>BAB VII. SIMPULAN DAN SARAN</b> .....	37
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	38

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Hasil spektrofotometri DNA plasmid YCp50 .....	31
Tabel 2. Hasil pemotongan DNA plasmid YCp50 .....	32

DAFTAR GAMBAR	Halaman
Gambar 1.a .Perbandingan hasil minipreparasi dengan teknik modifikasi lisis alkali dan pemanasan.....	28
Gambar 1.b .Hasil minipreparasi teknik modifikasi lisis alkali.....	29
Gambar 2 .Hasil minipreparasi teknik pemanasan.....	30
Gambar 3 .Hasil pemotongan DNA plasmid YCp50 dengan enzim restriksi endonuklease.....	33
Gambar 4 .Penyiapan gel agarosa.....	45
Gambar 5 .Peta restriksi DNA plasmid YCp50.....	43
Gambar 6. Struktur agarosa .....	44
Gambar 7. Alat elektroforesis.....	51
Gambar 8. Transiluminator dan photo pollaroid.....	52

DAFTAR LAMPIRAN	Halaman
Lampiran 1.Peta restriksi vektor kloning YCp50...	43
Lampiran 2.Agarosa.....	44
Lampiran 3.Penyiapan agarosa.....	45
Lampiran 4.Data ratio spektrophotometri.....	46
Lampiran 5.Hasil analisis statistik Wilcoxon s...	47
Lampiran 6.Data hasil DNA plasmid YCp50.....	48
Lampiran 7.Analisis T-test.....	49
Lampiran 8.Formula TENS dan STET.....	50
Lampiran 9.Alat elektroforesis .....	51
Lampiran 10.Transiluminator dan photo pollaroid...	52

## RINGKASAN

Penelitian ini bertujuan mempelajari perbandingan atau komparasi antara minipreparasi DNA plasmid dengan transforman *E.coli* dengan metode modifikasi lisis alkali dan metode pemanasan. Metode modifikasi lisis alkali yang digunakan mengacu pada Zhou dkk (1990) sedangkan metode pemanasan mengacu pada Ausubel dkk (1992). Reagen yang digunakan pada metode modifikasi lisis alkali adalah formula TENS, sedangkan pada metode pemanasan adalah formula STET.

Sampel penelitian yang dipergunakan adalah *E.coli* yang mengandung DNA plasmid YCp50. Jumlah sampel ada enam.

Metode penelitian yang dipergunakan adalah Post Test Only Group Design. Jenis penelitian: eksperimental laboratorik.

Teknik pemeriksaan dengan agarosa elektroforesis dan diteruskan penampakan di transiluminator UV. Analisis diteruskan dengan pemotongan hasil preparasi memakai enzim restriksi *BamHI*, *EcoRI* dan *EcoRV*.

Analisis statistik yang digunakan Wilcoxon's Rank Sum Test untuk tingkat kemurnian DNA plasmid. Untuk berat DNA plasmid digunakan T-test. Hasil analisis menunjukkan bahwa minipreparasi dengan metode modifikasi lisis alkali lebih baik daripada metode pemanasan ( $p < 0,05$ ).

X

## ABSTRACT

The aim of this study is to initialize the characterization of the DNA plasmid minipreparation method. We have addressed this problem to compare these both methods, the alkali lysis modified method and the boiling method.

Six different *E. coli* which contain of YCp50 plasmid were used in this laboratory experiment with a Post Test Only Control Group Design.

Purified DNA plasmid was demonstrated in both of these two methods and were measured for purity level by UV spectroscopy.

Determination of DNA fragment cleaved by *BamHI*, *EcoRI* and *EcoRV* was shown by running in gel electrophoresis and exposed by UV-transiluminator. Result were given as qualitative values. Wilcoxon's Rank Sum Test and unpaired T test were used for statistical evaluation of the data. The result show that the yield of DNA plasmid by Alkali lysis modified method is higher than boiling method with significancy ( $p < 0,05$ ).

-----  
**Key Words** : Plasmid minipreparation- Alkali lysis - boiling method



## BAB I

## PENDAHULUAN

## 1.1. Latar Belakang Masalah

Pencapaian tujuan Nasional antara lain didukung oleh pola kegiatan ilmu pengetahuan dan teknologi. Peran ilmu dasar perlu diperhatikan, karena dengan keterpaduan antara ilmu dasar, terapan dan teknologi diharapkan akan melancarkan proses industrialisasi. Keberhasilan industrialisasi diharapkan pemantapan kedudukan Indonesia ditengah pergaulan Internasional akan tercapai. Dengan pengembangan ilmu dasar langkah pembangkitan tradisi keilmuan untuk mendorong adaptasi dan alih teknologi secara selektif dapat terwujud ( Tsauri.1996).

Kemajuan perkembangan teknologi, termasuk Bioteknologi, telah dipercepat oleh teknologi pendukung antara lain: teknologi rekombinasi DNA, teknologi Antibodi dan teknologi kultur sel serta kultur jaringan. Rekayasa genetika erat kaitannya dengan teknologi rekombinasi DNA (Murdiyatmo.1997). Upaya agar tidak ketinggalan dalam pengembangan dan aplikasi bioteknologi modern perlu dilakukan perintisan dan pengembangan serta pengendalian dengan dukungan penelitian (Soehadji.1993).

Teknologi rekombinasi DNA dipandang sebagai terobosan baru dalam bidang Biologi Molekuler yang dapat mempercepat perkembangan pengetahuan tentang struktur, sifat dan fungsi molekul DNA . Protein yang bernilai tinggi dapat diciptakan dengan teknik rekombinasi DNA. Tujuan rekombinasi DNA adalah untuk memanfaatkan kemampuan dalam manipulasi, rekayasa,



pengubahan dan pemindahan gen gen untuk tujuan komersial. Teknik rekombinasi DNA dapat dikatakan sebagai penyusunan kembali materi genetik secara enzimatik. Hasil penyusunan tersebut paling sedikit mengandung dua fragmen DNA yang berbeda. Adapun fragmen DNA telah dapat diisolasi dari berbagai bakteri atau mikroorganisma, sehingga telah dapat dipelajari urutan nukleotida plasmid. Molekul DNA dari hasil rekayasa genetika maupun hasil isolasi dengan berbagai metoda dapat dipakai sebagai wahana atau vektor kloning (Shahib.1990; Watson.1980).

Transformasi genetik yang merupakan bagian teknologi rekombinasi DNA perannya sangat penting dalam bioteknologi kesehatan yang mencakup bidang farmasi dan kedokteran. Dengan mempergunakan transforman dapat menghasilkan suatu produk seperti senyawa terapeutik, vaksin rekombinan, atau pelacak DNA yang digunakan sebagai dasar diagnosis molekuler (Sofie.1998).

Bahan dasar yang diperlukan untuk rekombinasi DNA ialah plasmid. Plasmid adalah molekul yang dapat diturunkan secara stabil tanpa berkaitan dengan kromosom. Plasmid merupakan unsur genetik diluar kromosom yaitu ekstra kromosomal; yang dapat mengadakan replikasi secara autonom didalam sel bakteri. Plasmid berujud molekul DNA beruntai ganda dapat berperan sebagai vektor atau wahana kloning (Marx, . 1991, Sardjoko,1991; Smith, 1993).

Plasmid yang berupa DNA sirkuler ekstrakromosomal penting sebagai wahana kloning, maka pengisolasiannya memerlukan metoda dan teknologi yang mantap. Isolasi plasmid dapat dilakukan secara skala kecil maupun skala besar. Untuk penelitian biasanya cukup dengan skala kecil. Metoda yang telah dapat dipergunakan dan

berhasil baik antara lain: isolasi dengan metoda lisis alkali dan pemanasan. Tujuan utama isolasi skala kecil untuk mengetahui kandungan DNA plasmid dalam suatu transforman. Sedangkan isolasi skala besar untuk tujuan industri ( Ausubel, 1992; Tripuspaningsih, 1997 ).

Penelitian penelitian menggunakan DNA plasmid perlu dikembangkan untuk beradaptasi dengan teknologi dibidang biologi molekuler. Dalam keadaan bahan baku dan prosesing biologi molekuler yang mahal, perlu dicari terobosan untuk pemilihan metoda yang cepat, akurat dan murah.

Berdasarkan permasalahan tersebut diatas penulis akan mengadakan penelitian skala kecil cara isolasi DNA plasmid untuk mencari modifikasi metoda yang cepat, akurat dan relatif murah. Untuk keperluan penelitian tersebut penulis memperbandingkan metoda isolasi DNA plasmid dengan pemanasan dan modifikasi metoda mini preparasi DNA plasmid lisis alkali.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan beberapa permasalahan diatas maka dapat disusun rumusan masalah seperti tersebut dibawah ini:

1. Dengan metode yang mana dapat diperoleh isolat DNA plasmid yang paling baik ?

2. Dengan metode yang mana dapat diperoleh isolat DNA yang lebih murni?

### 1.3. Tujuan Penelitian

#### 1.3.1. Tujuan Umum

Memperbandingkan dua metoda yang berbeda dalam isolasi DNA plasmid *Escherichia coli* skala kecil. Metoda minipreparasi DNA plasmid dengan pemanasan dibandingkan dengan metoda modifikasi minipreparasi DNA plasmid lisis alkali. Analisis hasil dengan mempergunakan elektroporasi gel. Membuktikan metoda modifikasi masih mungkin didapatkan dalam penelitian lanjutan.

#### 1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan bahwa antara metode modifikasi lisis alkali dan metode pemanasan terdapat perbedaan jumlah isolat DNA plasmid yang dihasilkan.
2. Membuktikan bahwa hasil minipreparasi DNA plasmid dengan modifikasi metoda lisis alkali kemurniannya lebih baik dibandingkan metode pemanasan.

#### 1.4. Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi teknologi baru preparasi DNA plasmid terutama dalam modifikasi dari metode dan teknologi dibidang biologi molekuler.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tinjauan Bioteknologi Modern

Pada dasarnya bioteknologi dapat dikelompokkan menjadi bioteknologi konvensional dan bioteknologi modern atau mutakhir (Wiriyosuhanto.1993). Pengertian dasar bioteknologi menurut Lee (1983) adalah proses-proses biologi oleh organisme yang dimanfaatkan oleh dan untuk kepentingan manusia. Menurut sejarah dari beberapa literatur bioteknologi telah ada sejak dapat dihasilkannya minuman beralkohol, terciptanya roti, keju, yogurt, susu masam, tempe, kecap. Jasa mikroorganisme diketahui mewarnai bioteknologi sejak tahun 1857 Setelah Louis Pasteur menemukan proses fermentasi (Sardjoko.1983).

Keberadaan bioteknologi modern dinyatakan setelah mulai ditemukannya teknik rekombinasi DNA dan beberapa keberhasilan rekayasa genetika menghasilkan zat antibodi monoklonal, hormon insulin, hormon pertumbuhan ikan tuna. Era bioteknologi modern muncul setelah era antibiotika (Suharto.1995). Menurut Watson (1983) perintisan bioteknologi modern dimulai sejak ditemukannya DNA sperma ikan farel di sungai Rhine pada tahun 1871. Kemudian diketahui DNA merupakan suatu molekul genetik yang mampu mengubah hereditas bakteri. Dasar kuat pengembangan teknologi tentang DNA dimulai sejak diakuinya penetapan struktur heliks ganda komplementer untuk DNA oleh Watson dan Crick pada tahun 1953. Setelah penetapan struktur heliks ganda

komplementer DNA, diketahui pula kaidah konstitusional unsur DNA merupakan kaidah pasangan basa purin-pirimidin di alam. Pada tahun 1956, Pauling menunjukkan bahwa pasangan guanin-sitosin tertaut oleh tiga ikatan hidrogen (Hartomo.1994).

Bioteknologi modern merupakan suatu bidang penerapan biosains dan teknologi yang menyangkut penerapan praktis organisme hidup atau komponen selulernya pada industri jasa dan manufaktur. Penerapan bioteknologi adalah pengintegrasian berbagai disiplin ilmu. Beberapa ilmu pendukung bioteknologi antara lain ilmu pengetahuan alam dan teknologi, mikrobiologi, biokimia, genetika, biologi molekuler, kimia serta proses rekayasa dan teknik kimia. Dengan penerapan bioteknologi diharapkan biaya produksi lebih ekonomis (Smith.1993).

Keberhasilan program-program bioteknologi sangat tergantung pada tenaga-tenaga profesional ilmiah yang terdidik (Keating.1994).

Keterkaitan bioteknologi modern dengan biologi molekuler erat sekali, walaupun biologi molekuler termasuk cabang ilmu yang relatif masih muda. Para pakar dan pemerhati cabang ilmu biologi molekuler bersepakat bahwa awal Biologi Molekuler ditandai dengan penemuan struktur heliks ganda DNA oleh Watson dan Crick pada tahun 1953. Penemuan mekanisme suatu gen menentukan suatu protein yang berhasil dirumuskan oleh Crick pada tahun 1958, kemudian terkenal dengan konsep dasar atau disebut dogma sentral. Dogma sentral adalah: bahwa urutan nukleotida dalam DNA menentukan urutan nukleotida dalam RNA yang selanjutnya menentukan urutan asam amino dalam protein.

Percepatan perkembangan Biologi Molekuler lebih mantap lagi setelah munculnya rekayasa genetik (genetic engineering) yang memungkinkan penggandaan dan isolasi gen sehingga struktur dan fungsi gen dapat dipelajari (Suryohudoyo.1997)

Makna dan dampak Biologi Molekuler bagi perkembangan Ilmu Kedokteran sangat banyak, memberi dampak pada hampir semua Ilmu Pre-Klinik seperti: Genetika, Histologi, Embriologi, Fisiologi, Mikrobiologi, Immunologi, Patologi, Parasitologi, dan Farmakologi. Dengan demikian Ilmu Kedokteran Dasar pada perkembangannya perlu didasari oleh kemajauan Biologi Molekuler. Karena Ilmu Pre-Klinik mendasari Ilmu Klinik maka jelaslah bahwa peran Biologi Molekuler ini sangat besar pada perkembangan Ilmu Kedokteran. Pengertian dasar Biologi Molekuler menurut Suryohudoyo (1997) adalah cabang ilmu yang mempelajari struktur dan peran biomolekul dalam pelaksanaan segala aspek berbagai fungsi kehidupan . Karena Biologi Molekuler mempelajari organisma pada tingkat yang paling dasar ,pada tingkat molekul, maka Biologi Molekuler berdampak besar pada perkembangan semua cabang ilmu yang tergolong Ilmu Kehayatan baik yang termasuk Ilmu Dasar dan Ilmu Terapan (Suryohudoyo.1997).

Menurut Higgins (1985) hasil dari sejumlah besar penelitian biologi molekuler yang telah dilakukan selama lebih dari puluhan tahun adalah teknologi rekombinasi DNA. Teknologi rekombinasi DNA bermanfaat dalam perkembangan bidang Immunologi terutama dalam pembuatan antibodi monoklonal. Penerapan bioteknologi dapat memberikan kemungkinan kemanfaatan yang

luas. Dengan manipulasi gen memungkinkan suatu jasad mampu menghasilkan produk baru yang belum pernah ada sebelumnya (Hartika.1995). Penguasaan teknik dasar dalam manipulasi gen dapat mengantarkan para ilmuwan dan pemakai jasa bioteknologi untuk menerapkan teknik tinggi dalam bioteknologi modern. Dengan teknologi rekombinasi DNA, pemanfaatan radio isotop untuk pelabelan dan sekuensing, fusi protoplast, penggunaan PCR akan dapat lebih mempercepat pencapaian keberhasilan bioteknologi modern (Darnell.1990; Suryanto.1993; Watson.1983).

Prinsip bioteknologi dalam pengertiannya selalu berkaitan dengan reaksi reaksi yang diunjukkan (**performed**) oleh agen biologi seperti sel atau enzim bagian dari sel (Soedarsono.1991). Pada kenyataannya Bioteknologi Modern telah mampu menimbulkan dimensi baru dan peningkatan efisiensi pada ekonomi industri. Namun kalau diperbandingkan tentang skala prioritas antara Bioteknologi negara maju dengan negara berkembang berlainan. Di negara maju prioritas utama bioteknologi adalah: bioteknologi kesehatan, sedangkan di negara berkembang prioritas utama pertanian dan kemudian baru kesehatan (Soedarsono.1991).

Untuk pengembangan bioteknologi di Indonesia perlu dilakukan pilihan untuk penelitian-penelitian. Penelitian dan pengembangan diperlukan Sumber Daya Manusia yang cukup kuantitas dan kualitasnya. Makna kualitas disini adalah: penguasaan yang mendalam ilmu-ilmu dasar yang menunjang masing-masing bidang bioteknologi tersebut. Pendidikan lanjutan diperlukan untuk mendalami bioteknologi, dapat melalui



pascasarjana maupun pelatihan diluar negeri. Menurut Hattab (1994) untuk pengembangan bioteknologi perlu kepakaran lanjut, minimal S2 atau Pascasarjana. Sehingga dengan demikian pembentukan SDM Bioteknologi memerlukan waktu yang lama. Mengingat saat sekarang perkembangan Bioteknologi sangat pesat terutama di negara Barat, Amerika, Eropa dan Jepang. Maka di Indonesia perlu terus dikembangkan terutama bioteknologi generasi baru yang berdasarkan pada prinsip biologi molekuler dan rekayasa genetika (Wiriyosuhanto.1993).

Bioteknologi modern telah banyak membantu dalam bidang kedokteran dan kesehatan masyarakat, untuk produksi antibiotik, vaksin, **interferon**, dan untuk menanggulangi penyakit parasit. Sebagai contoh adalah: penggunaan teknologi molekuler untuk kepentingan diagnostik dan kajian pola epidemiologik serta patofisiologi malaria. Teknologi yang dipergunakan untuk hal tersebut: **RIA, ELISA, Genetic probe**, dan juga telah banyak dipergunakan PCR (Dachlan. 1997).

## 2.2. Plasmid

Plasmid adalah molekul DNA sirkuler yang terdapat dalam bakteri dan beberapa mikroorganisma lain. Plasmid mampu bereplikasi secara otonom, tidak tergantung DNA kromosom. Plasmid bersifat ekstrakromosomal. Ciri khas plasmid selain bebas, ekstrakromosomal; juga hampir selalu membawa satu gena atau lebih dan sering gena tersebut menyebabkan ciri-ciri penting yang ditunjukkan oleh bakteri tuan rumah. Plasmid dapat bertahan hidup di dalam sel tuan rumah dengan membawa sifat

resistensi terhadap antibiotik tertentu. Sebagai contoh adalah plasmid untuk vektor penelitian rekombinasi DNA. Semua vektor berasal dari plasmid dan virus alamiah yang telah diubah dengan berbagai cara sedemikian rupa sehingga sesuai dengan yang diharapkan. Semua plasmid memiliki paling sedikit satu urutan atau rangkaian DNA yang dapat bertindak sebagai asal replikasi, sehingga plasmid-plasmid tersebut mampu memperbanyak diri di dalam sel, dan sama sekali tidak tergantung pada kromosom bakteri. Pada plasmid-plasmid yang lebih kecil menggunakan enzim replikasi DNA sel tuan rumah untuk membuat kopi/salinan plasmid itu sendiri. Beberapa plasmid yang lebih besar membawa gena yang mengkode enzim yang spesifik untuk replikasi plasmid. (Brown.1991; Darnell.1990; Watson.1983).

Beberapa plasmid mampu mengadakan replikasi dengan cara melekatkan diri pada kromosom bakteri. Plasmid tersebut dinamakan episom atau plasmid integratif. Episom dapat dipertahankan dengan stabil melalui berkali-kali pembelahan sel, namun pada tahap tertentu juga akan berada sebagai unsur yang bebas. Ukuran plasmid berkisar antara 1.0 kb untuk yang terkecil sampai lebih dari 250 kb untuk yang besar. Untuk keperluan wahana kloning ukuran plasmid berkisar kurang dari 10 kb. Faktor-faktor yang mengatur jumlah kopi pada plasmid belum diketahui, namun tiap plasmid mempunyai jumlah **copy** yang khas antara 1 sampai 50 atau lebih. Dapat dikatakan bahwa wahana kloning diperlukan dalam sel dengan banyak kopi sehingga dapat dihasilkan molekul DNA rekombinan dalam jumlah besar (Brown.1991).

Berdasarkan atas sifat-sifat utama yang dikode oleh gena dalam plasmid, maka plasmid alamiah dapat diklasifikasikan sebagai berikut plasmid fertilitas atau plasmid F, plasmid resistensi atau plasmid R, plasmid col; plasmid degradatif, dan plasmid virulensi. Plasmid F hanya mampu membawa gena tra dan tidak mempunyai sifat lain kecuali kemampuan melakukan transfer plasmid dengan cara konyugasi, contohnya plasmid F pada E.coli. Plasmid R mampu membawa resistensi terhadap antibiotik tertentu. Plasmid col mengkode colisin. Plasmid degradatif mampu memungkinkan bakteri untuk mengadakan metabolisme molekul yang tidak biasa misalnya toluen dan asam salisilat. Plasmid virulensi menyebabkan patogenitas pada bakteri tuan rumah (Brown.1991).

Plasmid dapat berperan sebagai vektor atau wahana kloning yang dapat disisipi potongan DNA asing. Plasmid pada dasarnya dapat diturunkan secara stabil. Molekul plasmid tersebut dapat memberi resistensi antibiotik, dapat menyandi toksin dan protein lain, serta dapat menyandi kegiatan metabolisme. Plasmid berupa DNA beruntai ganda secara kovalen terdapat sebagai molekul lingkaran tertutup atau **Covalently Closed Circular (CCC)** didalam sel inang (Smith, 1989 dalam Sardjoko, 1991). Menurut Schegel (1994) plasmid pada bakteri berupa DNA ekstrakromosomal yang berbentuk cincin tertutup.

Beberapa plasmid ada dalam keadaan **stringent control** dapat dipindahkan ke sel inang melalui proses transformasi. Replikasi plasmid tersebut berhubungan dengan replikasi sel inang, maka hanya ada beberapa turunan plasmid terdapat dalam

sel bakteri. Plasmid rileks kontrol mempunyai jumlah turunan 10-200. Bila sintesis protein dihentikan maka plasmid rileks dapat naik jumlahnya beberapa ribu turunan tiap sel bakteri inang (Brown, 1991).

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

### 2.3. Plasmid *Escherichia Coli*

*Escherichia coli* adalah bakteri dengan ukuran 3 juta base pairs, termasuk kromosom sirkularnya. Bakteri ini dapat tumbuh cepat pada medium minimal dengan kandungan ikatan karbon, termasuk glukosa, garam, nitrogen, phosphor, dan trace metal. *E. coli* dapat tumbuh lebih cepat dalam media kaya dengan asam amino, prekursor nukleotida, vitamin, vitamin, dan lain-lain metabolit. Ukuran genom *E. coli* termasuk kromosomal dan ekstrakromosomal DNA bervariasi dari  $2.3 \times 10^9$  sampai dengan  $3 \times 10^9$  daltons. Isolat alam *E. coli* membawa sebagian besar plasmid dengan ukuran sebesar 7.5 atau 40 kb. (Ausubel. 1992. Selander. 1993).

Plasmid bakterial *E. coli* sering digunakan untuk kloning. Plasmid mampu berreplikasi autonom, sirkular, DNA ekstrakromosomal dapat ditemukan pada isolat *E. coli*. Kegunaan spesifik yang amat penting termasuk resistensi terhadap antibiotik dan produksi enzim restriksi. Sejak tahun 1970-an beberapa plasmid telah dikonstruksi dalam laboratorium dari plasmid alamiah. Plasmid plasmid artifisial dan beberapa derivatnya, amat penting dipergunakan sebagai vektor dalam pekerjaan rekombinasi DNA. Semua plasmid yang dipergunakan

sebagai vektor kloning mengandung : replikator, marker selektif, dan sisi kloning ( Ausubel. et al.1992).

### 2.3. Plasmid YCp50

Plasmid YCp 50 adalah salah satu plasmid turunan pBR322 yang merupakan plasmid di *S.cerevisiae* dan salah satu vektor DNA asing yang dapat disisipkan pada bakteri. Plasmid YCp 50 hasil pengembangan dari YRp (**Yeast Replicating Plasmid**), sedangkan YRp adalah hasil pengembangan dari pBR322. YCp 50 dapat dipergunakan sebagai **shuttle vector** pada ragi (Beggs,1978 dalam Sardjoko,1991).

YCp 50 sebagai vektor ulang-alik (**shuttle vector**) dapat dimasukkan kedalam sel inang *E.coli* dan ragi *S.cerevisiae*. Menurut Brown (1991) karena dapat dimasukkan serta dikenali keberadaannya pada ragi dan pada bakteri maka YCp 50 tersebut dikenal sebagai vektor ulang-alik. Pada awalnya vektor ini diperbanyak pada mikroorganisma (bakteri) lalu dimasukkan kedalam ragi untuk mendapatkan klon baru. Untuk kepentingan kombinasi genetik secara biokimia , rekayasa genetik atau manipulasi gen yang bertujuan pembentukan kombinasi baru materi yang dapat diturunkan dengan penyisipan molekul asam nukleat dari luar sel kedalam suatu virus atau plasmid bakteri diperlukan vektor yang dapat dipergunakan lebih dari satu macam organisma atau disebut vektor ulang-alik. Plasmid YCp 50 adalah salah satu vektor ulang-alik yang dapat dipergunakan untuk transformasi pada ragi dan bakteri (Old dan Primose,1989).

Menurut Old dan Primose (1989), YCp 50 adalah vektor yang dapat melakukan replikasi sendiri tanpa tergantung DNA kromosom

sel ragi karena mempunyai ARS marker dan susunan gen pengkode resisten terhadap antibiotik tertentu serta gen pengkode asam amino Leu 2, His 3, Ura 3, dan Trp I. Resistensi antibiotik yang dibawa YCp 50 adalah Ampisilin atau beta laktamase dan tetrasiklin sebagai penanda genetik pada bakteri. Plasmid YCp 50 bersifat auksotropi terhadap urasil yang merupakan penanda genetik pada ragi. Ukuran YCp 50 adalah 7950 pb. Berdasarkan asal replikasinya mempunyai urutan ARS dan CEN, dapat dilihat pada peta restriksi YCp 50.

Pada penyimpanan selama satu malam kultur bakteri yang mengandung YCp 50 akan menghasilkan 90-99% sel yang mengandung YCp dalam bentuk rekombinan ( Watson dkk.1989).

#### 2.4. Teknik isolasi plasmid

DNA plasmid dapat diisolasi skala kecil dengan metoda mini preparasi. Cara tersebut dipergunakan karena minipreparasi dapat dilakukan dengan cepat. DNA dari klon yang besar dapat dipreparasi dan dianalisis dengan baik. Ukuran besar dapat diisolasi dengan CsCL/ethidium bromid. Minipreparasi DNA plasmid dapat dilakukan dengan berbagai metoda. Prosedur lisis alkali adalah cara yang sering dipakai dalam minipreparasi. Metoda lisis alkali dalam 96-Well mikrotiter dish merupakan prosedur yang mungkin untuk preparasi cepat. Prosedur yang lain adalah minipreparasi dengan pemanasan. Metoda pemanasan dipergunakan untuk preparasi ukuran kecil dari satu atau 24 biakan. Walaupun dapat dilakukan dengan cepat tetapi kualitas DNANYA dibawah cara minipreparasi dengan lisis alkali.

Teknik lain minipreparasi DNA plasmid adalah dengan minipreparasi lithium. Cara tersebut dapat diandalkan cepat dan ekonomis. DNA plasmid yang dihasilkan baik untuk aplikasi biologi (Ausubel.1992).

Menurut Brown ( 1991 ) pada preparasi plasmid perlu pemisahan DNA plasmid dari DNA kromosom bakteri yang besar jumlahnya yang juga terdapat dalam sel. Dengan demikian teknik yang dapat memisahkan molekul DNA kecil dari molekul yang besar akan sangat efektif untuk memurnikan plasmid. Suatu cara yang dapat memisahkan molekul sirkuler dari molekul linear akan menghasilkan plasmid yang murni.

Menurut Sambrook dkk. ( 1989 ) preparasi DNA plasmid skala kecil pada dasarnya ada dua : memakai metoda lisis alkali dan metoda pemanasan. Modifikasi lisis alkali telah dilakukan oleh Birnboim dan Doly (1979) serta kemudian modifikasi dari Ish-Horowicz dan Burke (1981). Sedangkan metoda minipreparasi dengan pemanasan diadaptasi dari Holmes dan Quigley (1981).

Prosedur lisis alkali dapat dimodifikasi dan hasil isolat DNA plasmid yang didapat cukup memadai dalam kuantitas dan kualitasnya. Metode modifikasi lisis alkali menggunakan larutan TENS. Pada prinsipnya mengganti potasium asetat dengan sodium asetat, pengerjaannya dilakukan pada temperatur kamar. Metoda tersebut tidak menggunakan ekstraksi phenol - kloroform. Nama lain metoda tersebut adalah miniprep-dalam sepuluh menit. DNA plasmid yang dihasilkan dapat mencapai 2-3 ug dari 1.5 ml biakan sel, dan kualitasnya baik untuk keperluan manipulasi

selanjutnya. Sample dapat pula dipergunakan untuk analisis sekuensing DNA (Zhou,C. et al.1990).

Menurut Ausubel dkk. (1992) penguasaan teknologi mutakhir tentang DNA memerlukan latihan teknik-teknik dasar serta pemahaman yang matang tentang konsep-konsep Biologi Molekuler. Untuk keperluan pengenalan dan pendalaman manipulasi *E. coli*, phaga dan plasmid serta teknik pemasukan DNA kedalam sel lain memerlukan pengetahuan Biologi Molekuler yang mendalam. Sejak tahun 1960-an organisma, bakteri, phaga dan plasmid sudah sering dipergunakan. Strain bakteri *E. coli* yang sering dipergunakan untuk rekombinasi DNA adalah Strain K-12.

Ilmu pengetahuan mutakhir tentang biologi mengalami perkembangan cepat dengan beberapa seri teknik penelitian dalam belasan tahun terakhir. Teknik-teknik tersebut membuahkan definisi mekanisma molekuler dan struktur yang bertanggungjawab sedemikian rupa pada proses kompleks pertumbuhan dan pembelahan sel, metabolisme, dan proses selanjutnya. Arti penting mekanisma molekuler memberikan jalan manipulasi molekul-molekul, prosesnya dan observasi perubahan dalam sistem kehidupan dan perubahan molekul ( Davis. et al.1986).

Menurut Morelle(1989) prosedur ekstraksi plasmid DNA skala kecil-mini preparasi- modifikasi metoda ekstraksi alkali dapat dilakukan dengan sederhana dan cukup cepat. Untuk beberapa sampel kecil dan cukup murni dapat dipergunakan untuk perlakuan dengan enzim restriksi, transformasi, subkloning, sekuensing, dan proses translasi. Dalam modifikasi tahap ekstraksi phenol bertujuan untuk tidak mempergunakan phenol,



karena phenol bersifat toksik terhadap DNA plasmid dan dapat menimbulkan luka bakar pada penelitinya serta limbahnya bersifat toksik. Pada metoda tersebut ammonium asetat disubstitusi sodium atau potasium asetat untuk membuat efisiensi pemisahan protein-protein, membran, dan RNA dari DNA plasmid.

Macam-macam plasmid dan kosmid dapat diekstraksi menggunakan metoda tersebut dimuka dengan lebih dari 80 enzim restriksi yang berbeda fragment-fragment DNANYA. Hasil isolasi langsung dapat digunakan untuk sekuensing DNA untai ganda. Metoda cara ekstraksi hasil modifikasi sederhana tersebut mudah dilakukan dan terandalkan. Dengan minipreparasi tersebut dapat digunakan untuk DNA ukuran lebih dari 50 kb dari kultur E.coli. Metoda tersebut telah berhasil digunakan di beberapa laboratorium lain, dan hasil ekstraksi dan pemurnian DNA mempermudah analisis molekul DNA rekombinan (Morelle.1989).

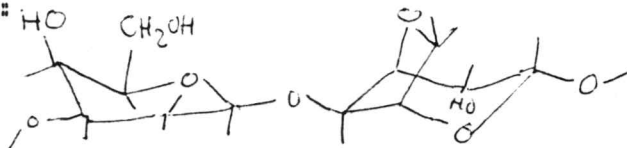
Ektraksi phenol biasanya digunakan selama pemurnian asam inti dari larutan encer, lisat sel atau campuran reaksi enzim, untuk menghilangkan protein-protein, lemak-lemak, dan molekul lainnya dari DNA yang diharapkan. Menurut penelitian Karger (1981) DNA sesudah diektraksi terlihat normal dalam gel agarose dan terlihat jelas hilangnya fragmen kecil DNA secara selektif. Bila kondisi phenol dibawah larutan penyangga DNA rusak. Phenol dan larutan penyangga dianjurkan untuk meminimalkan kerusakan DNA (Karger.1989).

## 2.5. Teknik elektroforesis

Menurut Irawan (1997) elektroforesis pada prinsipnya adalah migrasi partikel-partikel dibawah pengaruh medan listrik. Kecepatan dan arah migrasi partikel-partikel tersebut bergantung pada banyaknya muatan yang dikandung dan bentuk serta ukuran molekul-molekulnya. Asam Dioksi Ribonukleat (ADN atau DNA) selalu bergerak kearah anoda dengan berbagai kecepatan bergantung pada ukurannya. Dengan sistem elektroforesis dapat pula memisahkan molekul yang memiliki jumlah muatan sama tetapi ukuran berbeda, sehingga berarti pula dapat digunakan untuk memisahkan protein berdasar berat molekulnya. Media dalam sistem tersebut yang paling sering digunakan starch gel, acrylamid gel, agar gel dan selulosa gel.

Dalam elektroforesis digunakan larutan penyangga (buffer) yang bertujuan mempertahankan muatan listrik dan disebabkan oleh perubahan pH. Pemilihan larutan penyangga harus berdasar pada persyaratan kondisi yang diperlukan untuk memelihara aktivitas protein dengan memperhatikan pemisahan komponen protein yang akan diamati. Penandaan pada DNA dalam menggunakan sistem elektroforesis menggunakan ethidium bromid dan diperiksa dengan bantuan alat transiluminator sinar UV. Penandaan DNA dapat dengan isotop radioaktif, misal dengan  $S^{35}$  atau  $P^{32}$  (Irawan.1997)..

Agarose gel elektroforesis adalah bentuk polimer linier dengan struktur :



Agarose diekstrak dari rumput laut, secara komersial agarose telah dikontaminasi dengan polisakarida, garam dan protein-protein. Modifikasi agarose digunakan untuk preparasi elektroforesis DNA ataupun yang telah diberi enzim restriksi. Agarose ada yang khusus untuk analisis DNA ukuran kecil (10-500 bp). DNA pada pH netral selalu bermigrasi kearah anoda (Sambrook. et al.1989).

Molekul-molekul linier untai ganda DNA dapat diorientasikan pada medan listrik dalam posisi di elektroforesis (Fisher and Digman,1971; Aaij and Borst,1972).Molekul-molekul yang besar migrasi dengan lambat karena molekul besar tersebut harus melalui pori-pori gel yang bila dibandingkan dengan molekul-molekul yang kecil akan lebih sulit (Sambrook,J. et al.1989).

Untuk keperluan pemisahan dan pemurnian fragmen DNA antara 0.5 dan 25 kb dapat dipergunakan ethidium bromid yang ditambahkan pada gel. Kemudian di elektroforesis. Penambahan ethidium bromid 0.5 ug/ml. Perkiraan konsentrasi agarose untuk keperluan pemisahan variasi fragmen fragmen DNA harus diperhitungkan dengan mantap. Photographi untuk DNA dalam gel elektroforesis dengan menggunakan sinar UV (>2500uw/cm<sup>2</sup>) memakai transiluminator UV. Alat photographi dapat menggunakan kamera polaroid. Tipe film yang dapat dipergunakan adalah tipe film Polaroid asa 3000 (Ausubel. et al.1992).

Elektroforesis dengan gel agarose biasanya menggunakan voltase 20-150 V. Berbagai macam agarose berkemampuan memisahkan fragmen fragmen yang berbeda. DNA dilihat dengan sinar UV setelah diwarnai dengan ethidium bromid. Pada prinsipnya ethidium bromid

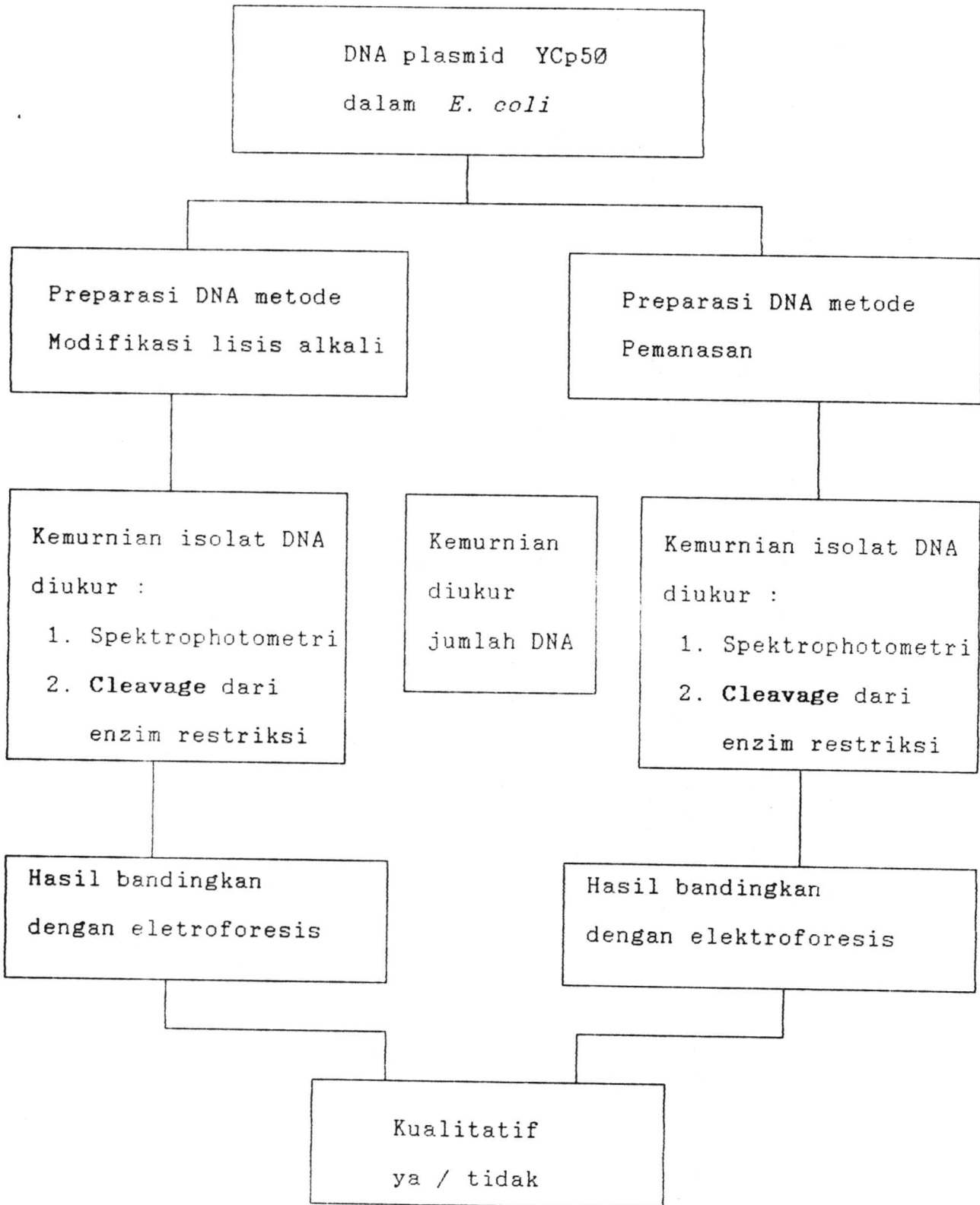
merupakan molekul yang dapat menyusup dalam asam nukleat dan berfluoresensi bila terkena sinar UV (Irawan.1997).

Penanda yang dipergunakan untuk melihat penampilan DNA di gel agarose pada proses elektroforesis selain dengan ethidium bromid juga diberi pembanding, dapat memakai *Lamda Est EII*, *Lamda Hind III*, atau *pBR 322 EstNI*, tergantung ukuran fragmen yang diperiksa (Ausubel. et al.1992).

**BAB III****KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN DAN HIPOTESIS****3.1. Kerangka Konseptual**

Metoda modifikasi minipreparasi DNA plasmid lisis alkali (Zoum. et al.1990) adalah metoda isolasi DNA plasmid E.coli skala kecil yang dapat dilakukan dengan cepat dan hasilnya dapat diandalkan. Metoda tersebut dibandingkan dengan metoda minipreparasi dengan pemanasan akan menunjukkan kelebihan yang bermakna. Teknik isolasi DNA plasmid menggunakan metoda modifikasi lisis alkali tidak memakai phenol kloroform untuk ekstraksi dan tidak perlu lysozyme. Metoda tersebut merupakan metoda alternatif untuk isolasi DNA plasmid skala kecil yang dapat dilakukan dengan cepat dalam temperatur kamar di laboratorium. Hasil isolasi DNA plasmid dengan metoda tersebut dapat menunjang persiapan teknik rekombinasi DNA, karena DNA plasmid yang dihasilkan dapat diandalkan. Bagan teoritis kerangka konseptual penelitian ditunjukkan pada skema 3.1.:

**SKEMA 3.1.**



- 2. Hipotesis :**
1. Minipreparasi DNA plasmid metode modifikasi lisis alkali lebih baik dari segi kemurnian hasil, dibanding minipreparasi metode pemanasan.
  2. DNA plasmid hasil minipreparasi dengan metode modifikasi lisis alkali lebih baik dari segi kuantitasnya, dibanding hasil minipreparasi metode pemanasan.

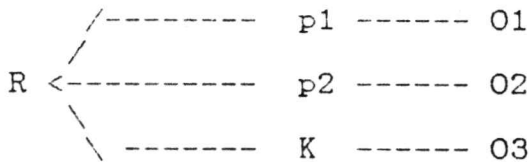


## BAB IV

## METODA PENELITIAN

## 4.1. Rancangan Penelitian

Berdasarkan sifat permasalahannya, maka rancangan dalam penelitian ini adalah: rancangan penelitian Post Test Only Controlgroup design (Zainudin,M.1988), jenis penelitiannya eksperimental laboratorium.



## 4.2. Identifikasi variabel dan Definisi operasional

4.2.1. Variabel bebas : prosedur minipreparasi DNA plasmid dengan metoda modifikasi lisis alkali dan metoda pemanasan.

4.2.2. Variabel terikat : proses pemeriksaan hasil dalam agar gel elektroforesis, dan penampilan DNA plasmid .

## 4.2.3. Definisi Operasional

Isolasi DNA plasmid skala kecil dengan prosedur modifikasi lisis alkali lebih dapat diandalkan hasilnya dibandingkan dengan prosedur pemanasan. Pemeriksaan dilakukan setelah diberi enzim restriksi dan dalam proses agar gel elektroforesis. Titik berat pemeriksaan pada band dan kemurnian plasmid.

## 4.3. Bahan bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang dipakai adalah: kuman E.coli, DNA plasmid YCP 50, Agarose , ethanol, alkohol yang terdiri:



alkohol absolut , alkohol 70%, phenol, chloroform, enzim *RNAase*, *BamHI*, *HindIII*, *E. coli*, *EcoRV*, Larutan TE buffer dan larutan TENS, larutan STET dan isopropanol.

#### 4.4. Alat-alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: inkubator dengan penggoyang (shaker incubator), spektrophotometer, microcentrifuge dingin, pipet Eppendorf, tabung Eppendorf, Transiluminator, autoklave, vortex, beaker glas, tabung reaksi, cawan petri, kamera polaroid, film polaroid, freezer  $-20^{\circ}$  C dan  $-70^{\circ}$  C.

#### 4.5. Lokasi dan waktu Penelitian

##### 4.5.1. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia FMIPA UNAIR dan laboratorium PUSVETMA Surabaya.

##### 4.5.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan bulan Juni sampai dengan bulan November 1998.

#### 4.6. Prosedur Isolasi DNA plasmid dan pemeriksaannya

4.6.1. Prosedur modifikasi minipreparasi DNA plasmid lisis alkali. Kultur kuman *Escherichia coli* diambil satu koloni ditanam pada media LB yang telah diberi Ampicilin sesuai kebutuhan. Sebanyak 1,5 ml kultur kuman *E. coli* ditanam dalam media LB dan diinkubasikan 37 C selama semalam di waterbath dengan penggoyang. Sampel lalu disentrifuge dingin. Pellet dicampur dengan larutan TENS. Diberi Natrium asetat pada lapisan

endapan . Kemudian ditambahkan dua kali ethanol dan disentrifuge. Pellet kemudian dicuci dengan ethanol 70% dan absolut .Sampel disuspensikan dalam TE buffer. Diperiksa dengan agarose elektroforesis setelah dicampuri ethidium bromid, diphoto diatas transiluminator UV. Isolat DNA plasmid kemudian dipotong dengan enzim restriksi dan fragmen-fragmen diperiksa di transiluminator, dibandingkan dengan marker dalam proses agarose elektroforesis. Enzym resriksi yang dipergunakan adalah *EcoRI*, *EcoRV* dan *BamHI*. Marker yang dipergunakan *HindIII*. Formula TENS dapat dilihat pada lampiran 8. \*

#### 4.6.2. Prosedur minipreparasi DNA plasmid dengan pemanasan dan pemeriksaannya.

Satu koloni *E. coli* diinokulasikan pada media LB Ampisilin ditumbuhkan pada 37°C . Disentrifuge 20 menit . Ditambahkan larutan STET 300 ul, larutan tersebut mengandung 200 ug lyzozyme. Kemudian tabung diletakkan pada es selama 30 detik atau 10 menit. Sesudah itu tabung yang berisi sampel dipanaskan 100°C dalam waterbath selama 2 menit. Kemudian disentrifuge dalam mikrosentrifuge selama 30 menit, lalu supernatan dipindahkan dalam tabung baru. Kemudian campur dengan 200 ul isopropanol dingin dan ditaruh pada -20°C selama 30 menit. Diputar dalam mikrosentrifuge 5 menit dan supernatan dipindahkan. Dikeringkan. Kemudian disuspensikan dalam TE buffer. Diperiksa dalam agarose elektroforesis. Isolat DNA plasmid kemudian dipotong dengan enzim restriksi, pita-pita yang terbentuk dilihat pada transiluminator U V dibandingkan dengan marker dalam gel agarose elektroforesis.

#### 4.7. Analisis Data

Data dianalisis dengan *Milcoxon's Rank Sum Test* dari penampilan DNA plasmid di agar gel elektroforesis yang diperiksa diatas transiluminator. Pemeriksaan kemurnian isolat DNA plasmid berdasarkan pada pemeriksaan spektrophotometri dan *cleavage* enzim restriksi.

## BAB V

## HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

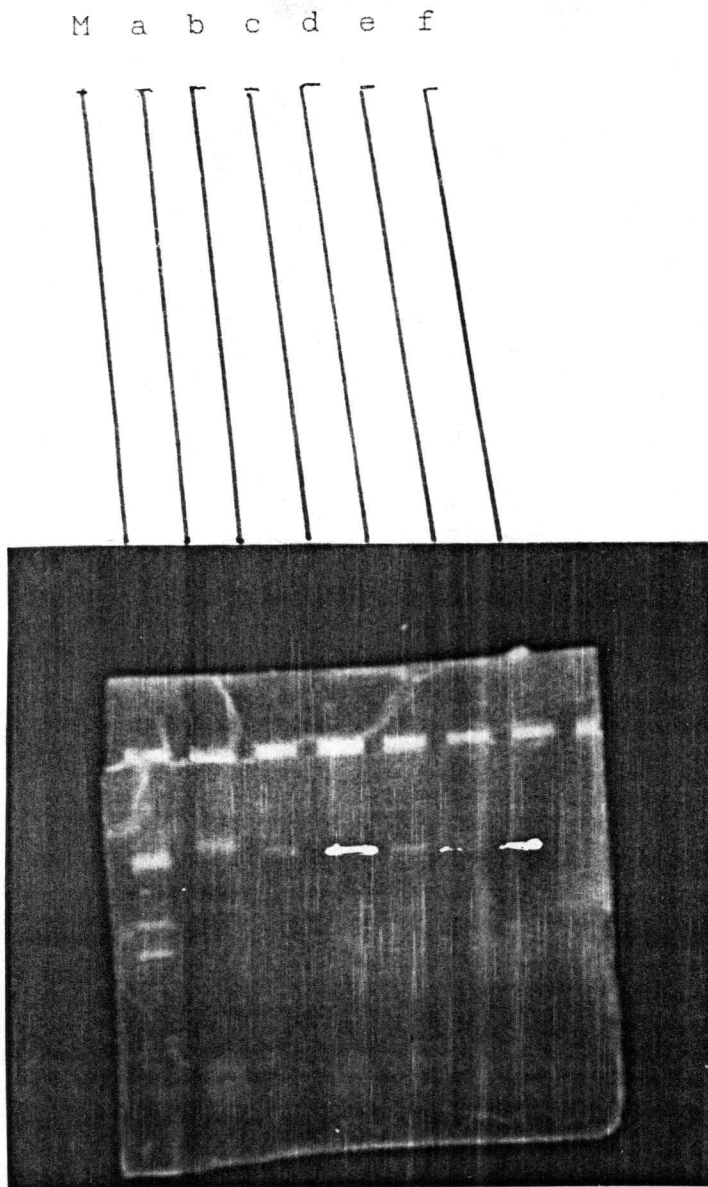
## 5.1. Hasil Penelitian

DNA plasmid YCp50 dalam transforman *E.coli* telah dapat diisolasi dengan metode modifikasi lisis alkali dan pemanasan. Kemurnian cukup baik, terutama ditujukan pada kemurnian terhadap kontaminasi protein lain. Isolat berupa DNA plasmid yang masih mengandung RNA.

Sampel plasmid YCp 50 diisolasi dengan metode modifikasi lisis alkali dibagi dalam perlakuan: langsung dipreparasi setelah semalam diinkubator goyang, setelah sehari disimpan di lemari es, dua hari setelah disimpan di lemari es. Perlakuan diulangi dua kali. Hasil preparasi dilihat pada agarose elektroforesis. Penampakan hasil pada transiluminator UV dan di abadikan dengan photo polaroid. Hasil isolasi terlihat pada gambar 1 a dan 1 b.

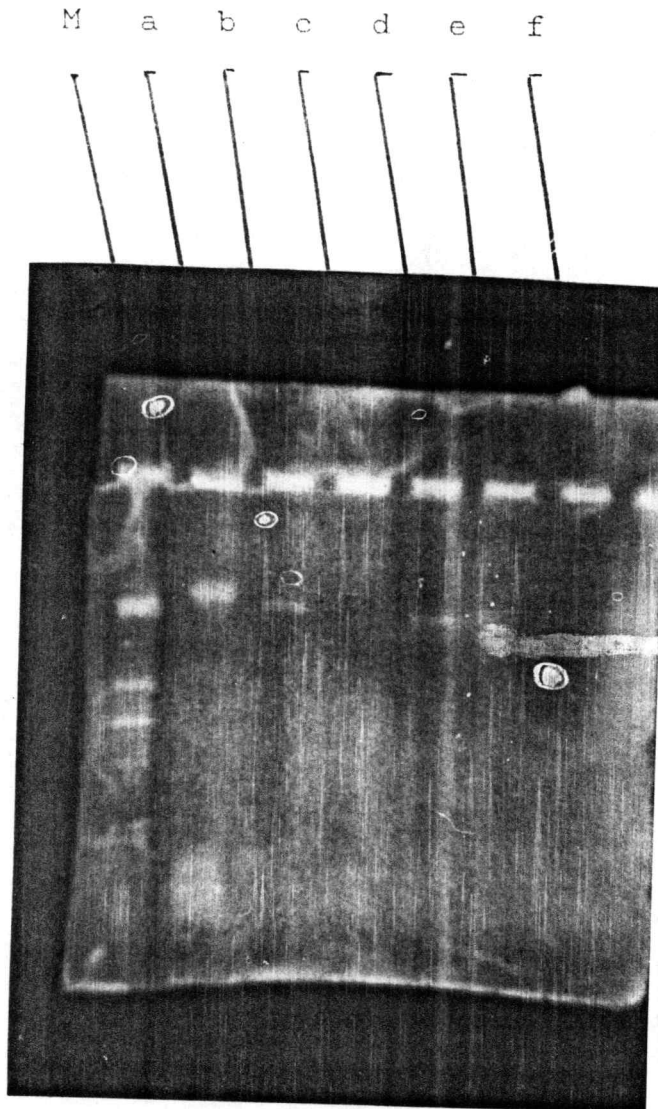


Gambar 1.a. Perbandingan hasil isolat antara minipreparasi modifikasi lisis alkali dan pemanasan. Hasil pemanasan lebih sedikit (a). M: marker.



Gambar 1b : Hasil minipreparasi DNA plasmid dengan metode modifikasi lisis alkali. Marker *λ* Hind III. M: marker, a. langsung dikerjakan, b. disimpan dalam lemari es sehari, c. disimpan dalam lemari es dua hari, sedangkan d sampai f adalah pengulangan perlakuan.

Sampel plasmid DNA YCp 50 telah dapat dipreparasi dengan minipreparasi pemanasan. Isolat diperlakukan dengan agarose elektroforesis dan dilihat di transiluminator. Hasil photo dengan polaroid dapat dilihat pada gambar 2 :



Gambar 2 : Hasil minipreparasi DNA plasmid YCp50 dengan metode pemanasan. Marker yang dipergunakan *λ Hind III*.

Keterangan: M: marker, a. plasmid langsung dikerjakan pasca semalam inokulasi, b. disimpan semalam di lemari es, c. disimpan dua malam, d sampai f adalah perlakuan ulangan.

Hasil pengukuran kemurnian DNA plasmid dengan metode modifikasi lisis alkali dan metode pemanasan dapat dilihat pada tabel 1. Pengukuran dengan Spektrophotometer UV, pada 260nm dan pada 280nm.

Tabel 1 :

Hasil Pemeriksaan Spektrophotometri  
Isolat DNA plasmid YCp 50 dan ratio  
260nm/280nm

Modifikasi lisis alkali		Pemanasan	
1. 260 nm : 3,8 abs	2,71	1. 260 nm : 3,1 abs	2,58
280 nm : 1,4 abs		280 nm : 1,2 abs	
2. 260 nm : 3,9 abs	2,25	2. 260 nm : 3,2 abs	2,13
280 nm : 1,2 abs		280 nm : 1,5 abs	
3. 260 nm : 3,6 abs	2,4	3. 260 nm : 3,9 abs	2,29
280 nm : 1,5 abs		280 nm : 1,7 abs	
4. 260 nm : 3,2 abs	3,2	4. 260 nm : 3,1 abs	2,8
280 nm : 1,0 abs		280 nm : 1,1 abs	
5. 260 nm : 3,1 abs	2,58	5. 260 nm : 3,2 abs	2,46
280 nm : 1,2 abs		280 nm : 1,3 abs	
6. 260 nm : 3,8 abs	3,16	6. 260 nm : 3,3 abs	2,06
280 nm : 1,2 abs		280 nm : 1,6 abs	

## Keterangan:

Dari ratio hasil spektrophotometri 260 nm/ 280 nm ternyata hasilnya > 1,8 berarti DNA plasmid hasil isolasi terdiri dari DNA dan RNA tetapi bersih dari protein lain selain DNA dan RNA.

## 5.2. Analisis Hasil Penelitian

DNA plasmid YCp50 hasil minipreparasi dengan metode modifikasi lisis alkali diperbandingkan dengan hasil metode pemanasan. Analisis terutama dilakukan pada tingkat kemurnian isolat DNA plasmid, dengan enzim restriksi dan juga jumlah DNA yang dihasilkan. Enzim restriksi yang dipergunakan : *EcoRI*, *BamHI* dan *EcoRV*. Hasil pemotongan plasmid YCp50 dengan enzim restriksi hasilnya terlihat pada tabel 2:

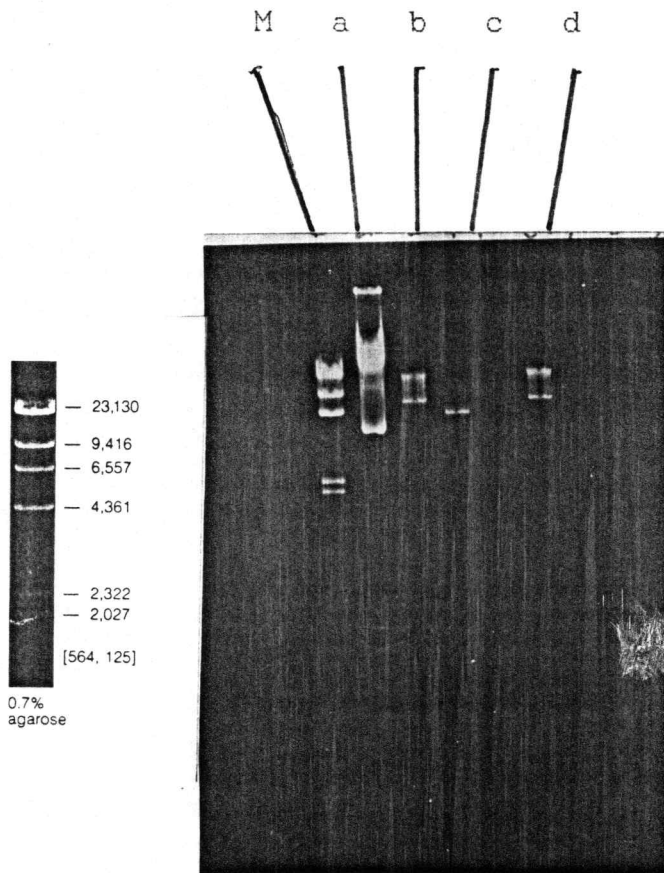
Plasmid	Enzim Restriksi	Posisi pemotongan	Ukuran fragmen (bp)
YCp50	<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	± 8000
	<i>BamHI</i>	G↓GATCC	± 8000
	<i>EcoRV</i>	GAT↓ATC	± 6300 dan ± 1700

Tabel 2 : Hasil pemotongan plasmid YCp50 dengan enzim restriksi.

Peta restriksi DNA plasmid YCp50 dapat dilihat pada lampiran 1. Setelah DNA plasmid dipotong dengan enzim restriksi lalu dianalisis dengan agarose elektroforesis. Hasil elektrofo-



resis setelah diberi Ethidium Bromid , analisis ditransiluminator UV. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 3:



Gambar 3: Hasil pemotongan DNA plasmid dengan enzim restriksi.  
Keterangan: M: marker, a:isolat sebelum dipotong, b: dipotong EcoRI, c.dipotong EcorV, d. BamHI.

## BAB VI. PEMBAHASAN

### 6.1. Minipreparasi metode modifikasi lisis alkali

Pada dasarnya metode modifikasi lisis alkali tidak menggunakan enzim dan tidak menggunakan ekstraksi phenol-kloroform. Reagen utama yang dipergunakan adalah reagen TENS. Metode tersebut diadaptasi dari Zhou dkk (1990). Walaupun sebenarnya ada metode modifikasi yang lain namun pangkal pokoknya adalah metode yang sederhana, cepat dan akurasinya cukup baik pada skala kecil atau skala penelitian. Dengan metode tersebut dapat dihasilkan DNA plasmid yang kualitasnya cukup baik, karena kontaminasi oleh protein lain dapat dihindari.

Menurut Sambrook dkk (1989) modifikasi lisis alkali telah dilakukan oleh Birnboim dan Doly tahun 1979. Kemudian Ish-Horowicz dan Burke pada tahun 1981 telah melakukan modifikasi pula. Dalam penelitian ini digunakan metode modifikasi lisis alkali oleh Zhou dkk.(1990) dan ternyata pada penelitian pendahuluan yang penulis lakukan hasilnya cukup bagus. Teknik pengerjaan metode tersebut dapat dilakukan dengan cepat dan dapat dilakukan pada suhu kamar. Walaupun masih mengandung RNA tetapi kontaminasi protein lain dapat dihindarkan. Tujuan utama penggunaan metode tersebut adalah menghindari pemakaian enzim yang mahal dan phenol-kloroform yang toksik terhadap DNA plasmid.

Analisis DNA plasmid dengan elektroforesis gel agarosa, landasan teorinya adalah merupakan metode standard yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi dan menurunkan fragmen DNA. Teknik tersebut lebih cepat dan sederhana dalam memperoleh DNA. Agarose merupakan senyawa polimer linier yang dapat diekstraksi

dari rumput laut struktur dasarnya dapat dilihat pada lampiran 2: Cara penyiapan gel agarosa dapat dilihat pada lampiran gambar 4. Preparasi agarosa yang tidak tepat akan mempengaruhi hasil dalam pemeriksaan diatas transiluminator UV.

## 6.2. Minipreparasi dengan metode pemanasan

Minipreparasi metode pemanasan yang dipergunakan dalam penelitian ini berdasarkan prosedur Ausubel dkk (1992). Reagen utama yang dipergunakan terutama larutan STET yang formulasinya dilakukan dilaboratorium PUSVETMA. Enzym yang dipergunakan *lysozym* untuk merusak dinding sel E.coli sebagai transforman. Ekstraksi dengan menggunakan Isopropanol dingin. Formula STET dapat dilihat pada lampiran 8 .

Isolat hasil minipreparasi metode pemanasan diperiksa dalam agarosa elektroforesis dan analisis pada transiluminator UV. Marker yang dipergunakan  $\lambda$  HindIII.

## 6.3. Komparasi hasil minipreparasi modifikasi lisis alkali dan pemanasan.

Untuk memperbandingkan hasil minipreparasi dengan metode modifikasi lisis alkali dan metode pemanasan cara yang dipergunakan adalah memperbandingkan hasil DNA plasmid YCp50 dari preparasi yangberbeda tersebut. Titik berat perbandingan terutama pada tingkat kemurnian DNA plasmid dengan menggunakan cara spektrophotometri pada panjang gelombang 260nm dan 280nm.

Analisis komparasi secara statistik digunakan Wilcoxon's Rank Sum Test. Data angka dihasilkan dari ratio pemeriksaan

spektropotometri pada 260nm dan 280nm. Ternyata dari kedua metode minipreparasi tersebut rata-rata hasilnya  $>1,8$  bermakna bahwa DNA yang dihasilkan baik karena tidak dikontaminasi protein selain RNA. Hasil analisis statistik dengan Wilcoxon's Rank Sum Test menunjukkan bahwa minipreparasi dengan metode modifikasi lisis alkali lebih baik daripada metode pemanasan. Metode modifikasi lisis alkali tanpa menggunakan enzim, sehingga secara perhitungan lebih ekonomis. Dengan metode modifikasi lisis alkali DNA plasmid dapat diisolasi dengan cepat. Hasil statistik dengan Wilcoxon's Rank Sum Test dapat dilihat pada lampiran 5.

Selain dengan Wilcoxon's Rank Sum Test jumlah DNA plasmid yang dihasilkan dianalisis dengan T-test hasilnya terlihat dalam lampiran 7. Dari analisis statistik tersebut bermakna bahwa ada perbedaan nyata antara dua metode minipreparasi yang dipergunakan. Metode modifikasi lisis alkali lebih baik daripada metode pemanasan khususnya dalam minipreparasi. Tingkat kemurnian isolat DNA plasmid minipreparasi metode modifikasi lisis alkali lebih baik dibandingkan isolat DNA plasmid minipreparasi metode pemanasan. ( $p < 0,05$ ).



## BAB VII

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1. SIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh melalui serangkaian penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan:

1. Minipreparasi DNA plasmid YCp50 dari transforman *E. coli* dengan metode modifikasi lisis alkali lebih baik daripada minipreparasi metode pemanasan dari segi kemurnian hasil preparasi.
2. Isolat DNA plasmid YCp50 dengan teknik minipreparasi modifikasi lisis alkali lebih banyak daripada isolat minipreparasi metode pemanasan.

#### 7.2. SARAN

1. Perlu dilakukan dengan hati-hati penambahan enzim *lysozim* pada metode pemanasan dan faktor pH perlu diperhatikan pada metode modifikasi lisis alkali.
2. Dapat dikembangkan penelitian lebih lanjut tentang minipreparasi lisis alkali dan dapat dikembangkan modifikasi metode pemanasan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abelson, P. 1998. A Third Technological Revolution. *Science*. 279:2019
- Akella, R and Porter, R. 1993. Rapid isolation and sequencing of Double stranded plasmid DNA. *Biotechniques*. 14,5: 725 - 728.
- Alberts, B et al. 1994. *Molecular Biology of the cell*. Terjemahan Alex Tri Kantjono W. PT. Gramedia. Jakarta. h: 12-14.
- Alisjahbana, I. 1980. *Teknologi dan perkembangan*. Yayasan Idayu. Jakarta. h: 15-17.
- Anonimous, 1997. *Molecular Weight Markers. Reference guide*. Promega Corporation. Madison USA. p : 8.
- Alper, Y. 1998. Weighing DNA for fast Genetic Diagnosis. *Science*. 279: 2044-2045.
- Anonimous. 1998. *Transgenic Animals in Kenshu-In. Japan International Cooperation Agency*. Tokyo. Japan. p: 27.
- Anonimous. 1989. *Promega protocols and Applications Guide*. Folkenberg. Sweden. pp: 14-71.
- Armstrong and Gilbert. 1991. Application of Biotechnology For future Livestock Production in Physiological Aspects of Digestion and Metabolism In Ruminants. Proc of the 7 th. Int. symp. on ruminant physiology. Eds. T. Tsuda et al. Academic Press. San Diego. pp.: 737-762.
- Ausubel, F.M. et al. 1992. *Short protocols in Molecular Biology. A compendium of methods from current Protocols in Molecular Biology*. Greene publishing Associates and John Wiley and Sons. New York.
- Bains, S. 1998. Double Helix Double as Engineer *Science*. 279:2043-2044
- Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513.
- Brown, T.A. 1991. *Gene Cloning on Introduction*. Terjemahan oleh : Ahmad. Yayasan Essentia Medica. Yogyakarta.
- Clover, D.M. 1986. *DNA cloning. A practical approach*. IRL Press. Washington D.C. America. 2: 3,4,33,34.
- Crouse, J. and Amorese, D. 1987. *Focus*, 9,2,3.
- Darnell, J; Lodish, h and Baltimore, D. 1990. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. New York.
- Davis, L.G, Dibner MD and Battey, JF. 1986. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishers BV. New York.

- Goeddel, D. 1991. Gene expression Technology. Academic Press, Inc. New York.
- Hardjasmita, P. 1997. Ikhtisar Biokimia Dasar B. Balai Penerbit FK UI .Jakarta. h: 130-145.
- Hartomo, A. 1994. DNA problem ribosa. Andi Offset. Yogyakarta. h: 4-6.
- Hartiko, H. dkk. 1995. Bioteknologi dan Keselamatan hayati. Mengantisipasi dampak Bioteknologi Modern terhadap kehidupan manusia dan etika. Konphalindo .Jakarta. h: 4-7.
- Huang, A and Campbell, J. 1993. A Simple improvement to the Triton Lysis procedure for Plasmid isolation. Biotechniquea. 14,5:728.
- Innis, M.A. 1990. PCR protocols .A Guide to Methods and Applications .Academic Press, Inc. New York.
- Inumaru, S . 1993. Expression Vectors . Tsukuba International Centre . Japan International Cooperation Agency. Tsukuba .Japan.
- Irawan, B . 1997. Teknik Elektroforesis. Jurusan Biologi FMIPA Unair. Surabaya.
- Irawan, B . 1997, Tinjauan struktur Molekuler Gen. FMIPA UNAIR Surabaya.
- Irawan, B. 1998. Transformasi gen dialam. Pelatihan transformasi gen .FMIPA UNAIR Surabaya.
- Kruger, B.D. 1989. Phenol extraction of DNA . Focus 11,1: 14.
- Keating, M. 1996. Pengelolaan Bioteknologi dalam Bumi Lestari Menuju abad 21. Agenda 21 dan hasil KTT Bumi. Terjemahan ;Jasin, L. Konphalindo. Jakarta. h:38-39.
- Lehninger, A.L. 1994. Principles of Biochemistry. Terjemahan Thenawijaya. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Marx, J.l. 1991. A Revolution in Biotechnology .Terjemahan Wildan Yatim. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta. h: 9-41.
- Marshal, M , Kaprowicz, L and Van Hoff, D. 1993. Stability of extrachromosomal DNA after different storage conditions. Biotechniques. 14,5:737 - 739.
- Mayes, P A, Gronner, Darryl K, Rodwell, Victor W and Martin D. 1985. Biokimia. EGC Penerbit buku Kedokteran. Jakarta. h:441,445,446,448.
- Morelle, G. 1989. A plasmid extraction procedures on a miniprep scale . Focus .11,1:7,8.

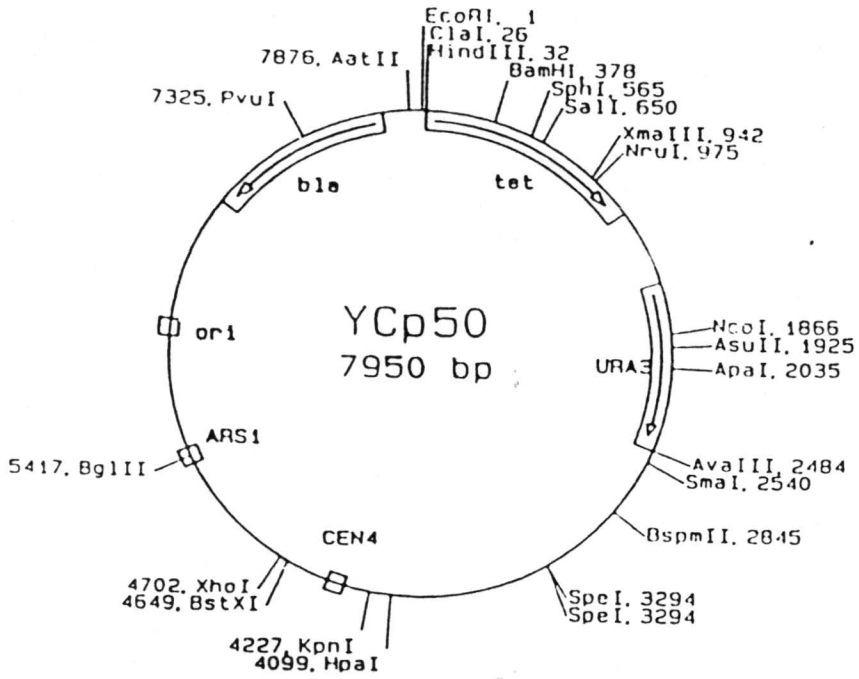
- Murdiyatmo,U . 1997. Penerapan teknik Biologi Molekuler dalam pengembangan Iptek di bidang Biologi Industri. Disampaikan dalam pelatihan teknik rekayasa genetika FMIPA UNAIR . Surabaya.
- Nazir,M.1988. Metoda Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Purwadi,T .1992. Metode penelitian dan statistik terapan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Rose,M and Broach,J. 1991. Cloning gene by complementation in Yeast on Guide Yeast Genetics and Molecular Biology .Academic Press,Inc. New York. pp:195-214.
- Rothstein,R.1991 . DNA cloning. A practical approach. IRL Press. Oxford. Washington DC. pp; 49-56.
- Sambrook,J., Fritsch and Maniatis,T. 1989.Molecular Cloning A laboratory manual.. Second Edition.Cold Spring Harbor
- Sardjoko. 1991. Bioteknologi.Latar Belakang dan beberapa penerapannya. Penerbit P.T.Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Sastroasmoro,S dan Ismael. 1995. Dasar dasar Metodologi Penelitian Klinis. Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Sekikawa,K.1993. An overview of Biochemical Science Based on Molecular Biology.JICA. Tsukuba.Japan. p:1-2
- Shahib,N.1990.Dasar-dasar rekombinasi DNA.Pusat Antar Universitas. Institut Teknologi Bandung.
- Shannon,T A. 1995. Pengantar Bioetika. Penerbit P.T.Gramedia Pustaka Utama.Jakarta. h:3,4,131-142.
- Sherman,F.1991. Getting started with yeast in Guide Yeast Genetics and Molecular Biology. Academic Press,Inc. New York. pp; 3-21.
- Sherman,F and Hicks,J. 1991. Mapping Yeast genes in Guide yeast Genetics and Molecular Biology. Academic Press.Inc. New York. pp: 38-57.
- Smith,J.E. 1993. Biotechnology Principles. Terjemahan Usman, FS. dkk. P.T.Gramedia. Jakarta. h: 10-14,41-54.
- Smith,J.E. 1995. Biotechnology. 2nd. Ed. Alih Bahasa : Andry Hartono. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. h: 54, 55, 172, 173.
- Sobota,A.E, Orlando,P.J, and Barnet,R.J. 1993. A One Step Method for the Recovery of Unstained DNA from Agarose Gels. Biotechniques 14,5: 742-744.



- Soedarsono, J. 1991. Bioteknologi Modern. Aplikasi prinsip sains dan rekayasa. PAU Bioteknologi UGM. Yogyakarta.
- Sofie Retnaningrum, D. 1998. Peran transformasi genetik dalam Bioteknologi Farmasi dan Kedokteran . PAU Bioteknologi FMIPA ITB Bandung.
- Sudarmono, P . 1995. Bioetika dan keamanan Biologik dalam penelitian pengembangan dan aplikasi Bioteknologi Peternakan. Lokakarya Nasional Bioteknologi Peternakan. Balitnak Bogor. h.1-10.
- Suharto, IGN. 1995. Bioteknologi dalam industri. Andi Offset. Yogyakarta. h:1-12, 225.
- Subowo. 1995. Biologi Sel. Angkasa .Bandung. h: 109-136.
- Sudjana. 1996. Metoda Statistik. Penerbit Tarsito .Bandung.
- Suryanto, I. 1993. Basic Techniques of gene manipulation concerning Advanced Technology for Veterinary Diagnosis . Presented in National Institute of Animal Health. Tsukuba. Japan. pp:1-3.
- Suryanto, I. 1998. Pendekatan Biologi Molekuler sebuah paradigma baru pada penelitian vaksin dan bahan diagnostik hewan. Buletin Veterinaria Farma . Surabaya. I:7. h: 9-16.
- Taatputra, S. 1997. Biologi Molekuler Kedokteran. Airlangga University Press. Surabaya. h: 3-9.
- Taubes, G. 1997. Ways to Vary Gene Vaccine Theme. Science. 278:1713.
- Tripuspaningsih, N. 1997. Analisis 6 DNA Rekombinan dengan enzim *EcoRI*, Journal of Biological Researches (Berkala Penelitian Hayati). Surabaya.
- Tripuspaningsih, N. 1997. Kloning gen. Disampaikan dalam Pelatihan Teknik Rekayasa Genetika untuk Penelitian Dasar Pra kloning. FMIPA UNAIR. Surabaya.
- Tripuspaningsih, N. 1997. Teknik transformasi DNA sel *Escherisia coli* dan *Saccharomyces cerevisiae*. FMIPA UNAIR. Surabaya.
- Tsauri, S . 1996. Indonesia menghadapi tantangan global. Peran dan fungsi ipteknas. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jakarta.
- Wallace, D.M. 1987. Methodes Enzymol. 152, 33.
- Wasito. 1995. Bioteknologi Kesehatan Hewan. Lokakarya Nasional Bioteknologi Peternakan. Balitnak Bogor. h. 1, 2, 3.
- Watson, J.D., Tooze, J and Kurtz, D.T. 1983. Recombinant DNA. A short course. Scientific American Books. New York.

- Watson, J.D. 1987. Molecular Biology of the gene. The Benjamin Cummings publishing Company, Inc. California.
- Wiryosuhanto, S dan Sudarjat D, S 1993. Aplikasi Bioteknologi Kesehatan Hewan. Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian. Jakarta. h: 5, 6, 18, 51, 61, 112, 113.
- Wolstenholme, G.B.W. 1969. Bacterial Episomes and plasmids. A Ciba Foundation Symposium. J and A Curchill. Ltd. London. pp: 4-11.
- Yatim, W . 1992. Biologi sel lanjut. Penerbit Tarsito. Bandung. h: 85-125.
- Yeung, M and Lau, A. 1993. Fast and economical Large scale Preparation of High-Quality plasmid DNA. Biotechniques. 15, 3: 149- 151.
- Young, H.A. 1993. Resque of Plasmid DNA from Nonviable Bacterial Glycerol stocks. Biotechniques 14, 5: 745.
- Zainudin, M. 1988. Metodologi Penelitian. Fakultas Farmasi UNAIR. Surabaya. h: 56-61.
- Zeugin, J and Hartley, J. 1985. Ethanol precipitation of DNA. Focus. 7, 4: 200-2001.
- Zhou, C; Young, Y. and Jong, A Y. 1990. Miniprep in Tens minutes. Biotechniques . 2: 173.

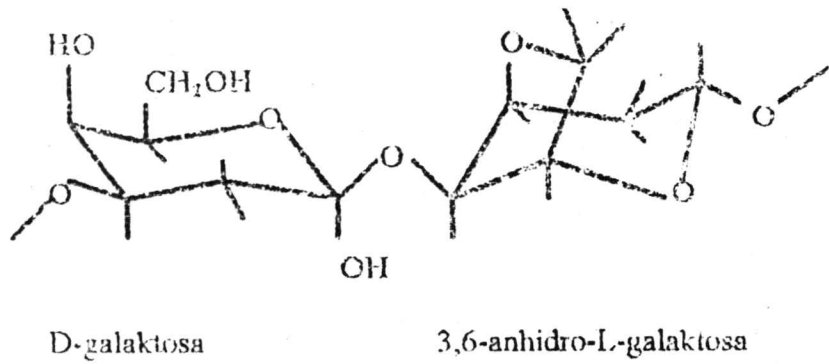
Lampiran 1



Gambar 7. Peta restriksi DNA plasmid YCp50

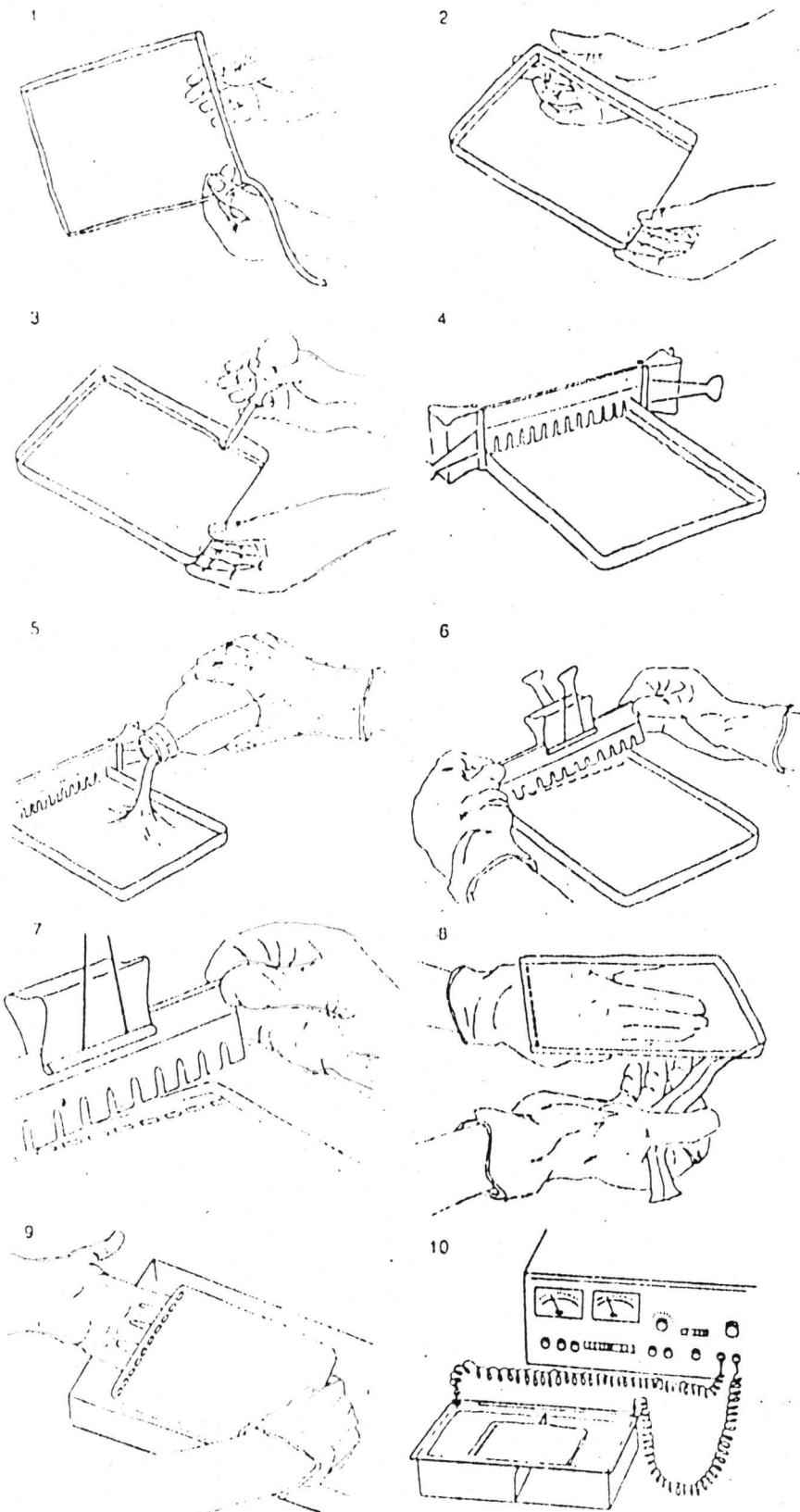
( Rose, DM, 1991)

Lampiran 2



Gambar 6. Agarosa

Lampiran 3



Penyiapan Agarosa

## Lampiran 4

HEADER DATA FOR: A:1 LABEL:  
NUMBER OF CASES: 12 NUMBER OF VARIABLES: 2

	METODE	RANK
1	2.70	8.00
2	3.25	11.00
3	2.40	4.00
4	3.26	12.00
5	2.58	6.50
6	3.16	10.00
7	2.58	6.50
8	2.13	2.00
9	2.29	3.00
10	2.81	9.00
11	2.46	5.00
12	2.06	1.00

Lampiran 5

----- NONPARAMETRIC TESTS -----

LEADER DATA FOR: A:1 LABEL:  
NUMBER OF CASES: 12 NUMBER OF VARIABLES: 2

WILCOXON RANK-SUM TEST FOR TWO GROUPS

VARIABLE TESTED: RANK

SUM OF RANKS, GROUP 1 = 51.5 N1 = 6

SUM OF RANKS, GROUP 2 = 26.5 N2 = 6

Z = 2.002, PROB. = .0227

Lampiran 6

HEADER DATA FOR: A:2 LABEL:  
NUMBER OF CASES: 6 NUMBER OF VARIABLES: 2

	LISIS	PANAS
1	55	70
2	60	75
3	75	85
4	50	55
5	60	65
6	60	88



Lampiran 7

----- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS -----

ORDER DATA FOR: A:2 LABEL:  
 NUMBER OF CASES: 6 NUMBER OF VARIABLES: 2

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	60.0000	73.0000
STD. DEV. =	8.3666	12.4097
N =	6	6
	DIFFERENCE =	-13.0000
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		6.1101

T = -2.1276 (D.F. = 10)      GROUP 1: LISIS  
 GROUP 2: PANAS

PROB. = .0296



## Lampiran 8

Formula larutan TENS dan STET

a) Larutan TENS: R/ NaOH

SDS 20%

TE (pH= 7,5)

20 M Tris HCL

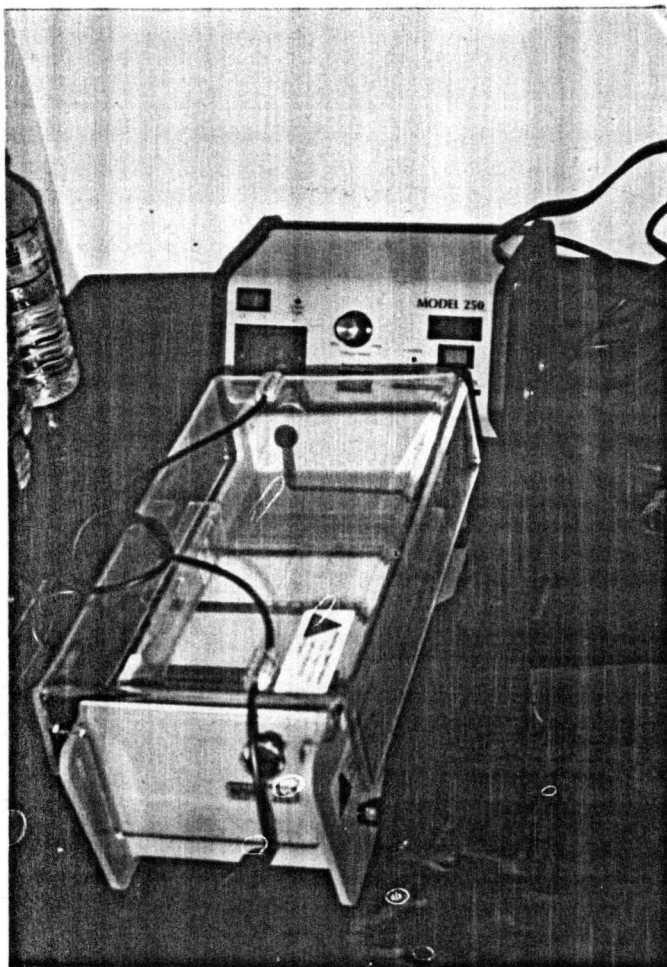
1 n M EDTA

b). Larutan STET : R/ 0,1 M NaCl

10 mM Tris Cl ( pH=8)

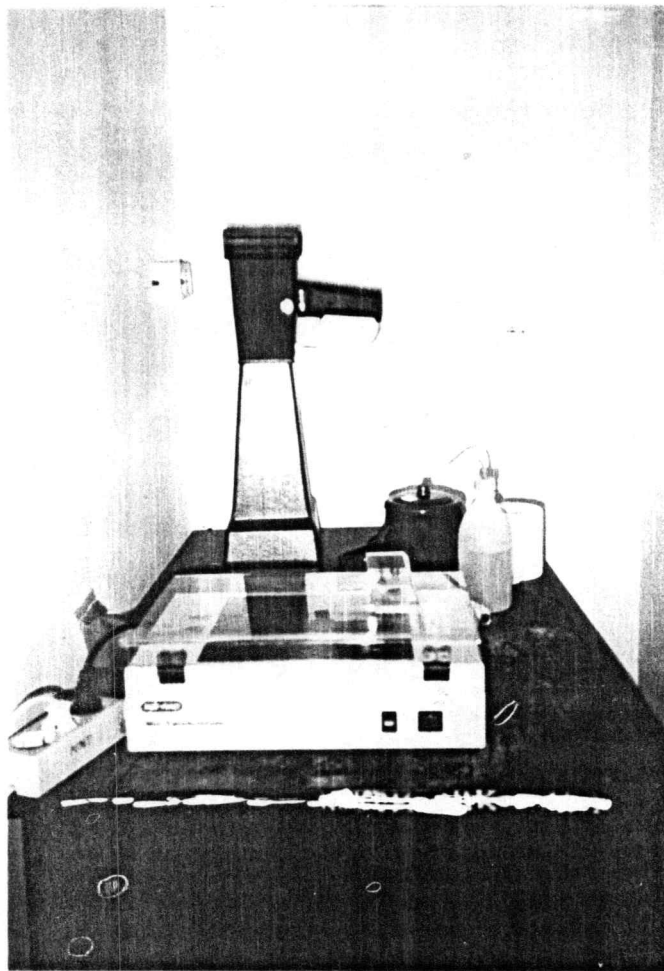
1 mM EDTA ( pH=8)

50% Triton X-100.



Gambar 7. Alat elektroforesis

mpiran 10



Gambar 8. Transiluminator dan alat photo pollaroid.