

PENGANTAR BIOLOGI MOLEKULER

Penulis:

Indah Sari, S.Si.T., M.Si.

Hani Ammariah, S.Tr.Kes.

Sukron, S.Kep, Ns, MNS.

Egita Windrianatama Puspa, S.Tr. A. K., M. Si.

Septiyanti Utami, S.Tr.AK.



GET PRESS INDONESIA

PENGANTAR
BIOLOGI MOLEKULER

Penulis :

Indah Sari, S.Si.T., M.Si.
Hani Ammariah, S.Tr.Kes.
Sukron, S.Kep, Ns, MNS.
Egita Windrianatama Puspa, S.Tr. A. K., M. Si.
Septiyanti Utami, S.Tr.AK.

ISBN :

Editor : Dr. Oktavianis, M.Biomed.

Tri Putri Wahyuni, S.Pd.

Penyunting: Mila Sari, M.Si.

Desain Sampul dan Tata Letak : Atyka Trianisa, S.Pd.

Penerbit: GET PRESS INDONESIA

Anggota IKAPI No. 033/SBA/2022

Redaksi:

Jl. Palarik RT 01 RW 06, Kelurahan Air Pacah
Kecamatan Koto Tangah, Padang, Sumatera Barat

website: www.getpress.co.id

email: adm.getpress@gmail.com

Cetakan pertama, Juni 2024

Hak cipta dilindungi undang-undang
dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk
dan dengan cara apapun tanpa izin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayahNya, maka Penulisan Buku dengan judul Biologi Molekuler dapat diselesaikan. Buku ini berisikan bahasan tentang Konsep dasar Biologi Molekuler, penggunaan instrumen di laboratorium Biologi Molekuler, jenis sampel Biologi Molekuler, Prosedur Ekstraksi Asam Nukleat, Kualitas Isolat Asam Nukleat, Pemeriksaan teknik PCR, Elektroforesis, faktor yang mempengaruhi hasil pemeriksaan Biologi Molekuler, Verifikasi dan Validasi Pemeriksaan Biologi Molekuler Serta Penanganan Limbah Pemeriksaan Biologi Molekuler.

Buku ini masih dalam tahap awal dan masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat kami nantikan guna penyempurnaan buku ini lebih lanjut. Kami mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang terlibat dalam penyelesaian buku ini. Kami berharap buku ini dapat menjadi referensi dan bahan bibliografi yang mudah dipahami oleh pembaca.

Padang, April 2024
Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
BAB 1 KONSEP DASAR BIOLOGI MOLEKULER.....	1
1.1 Pengertian Biologi Molekuler.....	1
1.2 Biomolekul Penyusun Jasad Hidup	1
1.3 Pengertian Sel.....	2
1.4 Pembagian Organisme Makhluk Hidup	3
1.5 Organel-organel Sel	5
BAB 2 DIAGNOSTIK MOLEKULER	12
2.1 Pendahuluan	12
2.2 Instrumen di Laboratorium Biologi Molekuler	13
BAB 3 JENIS SAMPEL PADA PEMERIKSAAN	
BIOLOGI MOLEKULER.....	18
3.1 Darah.....	19
3.2 Saliva	19
3.6 Tulang dan Gigi Sebagai Sumber DNA	23
3.7 Isolasi dan DNA dari sampel rambut.....	26
3.2.2 Kesesuaian rambut untuk analisis DNA	29
BAB 4 PROSEDUR EKSTRAKSI ASAM NUKLEAT	31
4.1 Asam Nukleat.....	31
4.2 Ekstraksi Asam Nukleat.....	32
4.3 Metode Ekstraksi/Isolasi Asam Nukleat.....	33
4.4 Prosedur Ekstraksi DNA (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)	
Metode Fenol- Kloroform	33
4.5 Prosedur Ekstraksi RNA (<i>Ribonucleic Acid</i>)	
Menggunakan TRIzol – Kloroform.....	36
BAB 5 KUALITAS ISOLAT ASAM NUKLEAT	39
5.1 Pengertian Asam Nukleat.....	39
5.2 Tujuan dan Prinsip Isolasi Asam Nukleat.....	41
5.3 Isolasi Asam Nukleat.....	42

5.4 Isolasi dan Pemurnian DNA (Genom) Manusia	44
5.5 Isolasi Genom dari Saliva	47
5.6 Pengukuran Kemurnian Asam Nukleat	49
BAB 6 PEMERIKSAAN TEKNIK PCR.....	52
6.1 Pemeriksaan PCR	52
6.2 Tahap-tahap PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	52
6.3 Komponen PCR.....	55
6.4 Deteksi PCR dengan Elektroforesis	57
BAB 7 ELEKTROFORESIS.....	59
7.1 Prinsip Dasar Elektroforesis.....	59
7.2 Fungsi Elektroforesis.....	59
7.3 Jenis – jenis Elektroforesis.....	60
7.4 Instrumen Elektroforesis	63
BAB 8 FAKTOR YANG MEMPENGARUHI HASIL PEMERIKSAAN LABORATORIUM BIOLOGI MOLEKULER.....	66
8.1 Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Kerja Enzim.....	66
8.2 Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Pemeriksaan DNA.....	69
8.3 Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Hasil Pemeriksaan PCR.....	71
8.4 Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Hasil Pemeriksaan Protein.....	72
BAB 9 VERIFIKASI DAN VALIDASI HASIL PEMERIKSAAN BIOLOGI MOLEKULER.....	73
9.1 Definisi Verifikasi dan Validasi	73
9.2 Proses Validasi	74
9.3 Parameter Validasi.....	75
9.4 Validasi Metode.....	79
9.5 Alur kerja dalam diagnostik PCR.....	81
BAB 10 PENANGANAN LIMBAH BIOLOGI MOLEKULER.....	88
10.1 Pengertian Limbah Laboratorium	88

10.2 Personel Penanganan Pengolahan Limbah
Biologi Molekuler.....89

10.3 Pembuangan Limbah Biologi Molekuler 90

10.4 Penyimpanan Sementara, Pengangkutan, dan
Pemusnahan Limbah Biologi Molekuler 91

DAFTAR PUSTAKA 92

BIODATA PENULIS

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. 1. Berbagai Ukuran Molekul Dan Makhluk Hidup	3
Gambar 1. 2. Filogenetik Tiga Domain.....	4
Gambar 3. 1. Lokasi DNA pada Sperma	21
Gambar 3. 2. Histologi Tulang.....	24
Gambar 3. 3. Struktur Penampang Gigi Molar	25
Gambar 3. 4. Bagian <i>Kromosom</i>	28
Gambar 3. 5. Sampel Rambut	30
Gambar 5. 1. (a) DNA double helix, (b) Struktur kimia DNA, (c) Model 3D DNA.....	40
Gambar 5. 2. Hasil sentrifugasi isolasi DNA pada pemisahan <i>fenol</i>	48
Gambar 6. 1. Siklus reaksi PCR	54
Gambar 7. 1. Elektroforesis Lempeng Tegak	60
Gambar 7. 2. Elektroforesis Lempeng Mendatar	61
Gambar 7. 3. Elektroforesis Tabung	62
Gambar 7. 4. Elektroforesis Kertas	62
Gambar 7. 5. Elektroforesis Kertas	63
Gambar 9. 1. Rantar Analisis PCR.....	81
Gambar 9. 2. Faktor Mempengaruhi Kinerja.....	82
Gambar 9. 3. Langkah awal evaluasi selektivitas	83
Gambar 9. 4. Selektivitas uji PCR	83
Gambar 9. 5. Batas deteksi (LOD), Batas kuantifikasi (LOQ) dan jangkauan kerja.....	85
Gambar 10. 1. Alat <i>genXpert</i>	89

DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1. Organel-Organel di dalam sel beserta fungsinya... 6

Tabel 2. 1. Instrumen di Laboratorium Biologi
Molekuler..... 13

BAB 1

KONSEP DASAR BIOLOGI MOLEKULER

1.1 Pengertian Biologi Molekuler

Biologi molekuler adalah bidang studi yang mempelajari organisasi makhluk hidup (organisme) serta fungsi berdasarkan sudut pandang komponen dan kendali molekul. Biologi molekuler termasuk kedalam cabang ilmu yang mempelajari hubungan antara struktur dan fungsi molekul biologis serta pelaksanaan dan pengendalian proses biokimia (Fauziah et al., 2022). Biologi molekuler mempelajari dasar molekuler dari berbagai fenomena biologis. Sampel utama yang digunakan dalam biologi molekuler adalah makromolekul biologis, khususnya asam nukleat, dan pemeliharaan informasi biologis melalui replikasi, transkripsi, dan translasi (Thomy & Harnelly, 2018).

Perkembangan biologi molekuler tidak lepas dari berbagai ilmu pengetahuan lainnya seperti biologi sel, genetika, biokimia, kimia organik, dan biofisika (Fatmawati et al., 2019). Biologi molekuler membahas subjek yang sama yaitu organisme hidup, namun dengan pendekatan dan sudut pandang yang berbeda. Organisme yang tercakup dalam biologi molekuler meliputi jenis organisme seluler dan dua kelompok: organisme non-seluler (Kartini et al., 2023).

1.2 Biomolekul Penyusun Jasad Hidup

Biomolekul adalah molekul kimia yang ada pada organisme hidup, dan berat molekul (BM) jauh lebih besar, berkisar antara 10^3 hingga 10^9 . Meskipun komponennya

sama meskipun berupa polimer, mereka lebih kompleks daripada lingkungannya dari suatu senyawa. Biomolekul ini termasuk senyawa lipid, *polisakarida*, asam nukleat, protein, dll (Mushlih, 2019).

Lipid berfungsi sebagai komponen struktural membran sel, hormon, dan sumber energi. *Polisakarida* berfungsi sebagai komponen struktural membran dan dinding sel serta sebagai sumber energi cadangan dalam bentuk glikogen. Asam nukleat berfungsi sebagai unsur genetik (DNA), senyawa koenzim, pembawa atau penyimpan energi (ATP), dan informasi genetik dalam proses pembuatan protein.

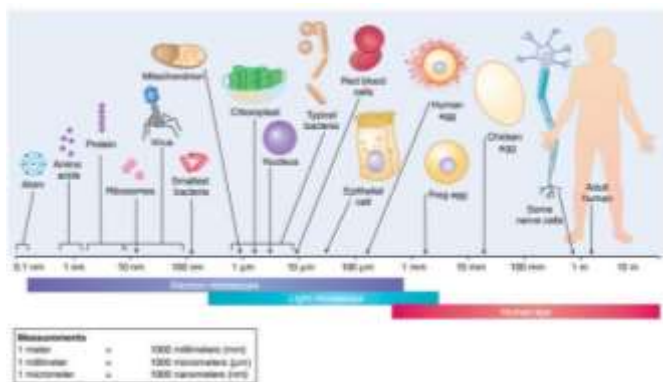
- Protein memiliki banyak fungsi antara lain :
 1. *Biokatalisator* (enzim).
 2. *Bioregulator* (hormon).
 3. Protein transport seperti *Hemoglobin*, *Albumin*, *Lipoprotein*, transferin.
 4. Protein integral membran sel.
 5. Protein kontraktif: aktin dan *miosin*
 6. Protein struktural: kolagen, tubulin, keratin, *Glikoprotein*.
 7. Protein pelindung dan pertahanan: *Imunoglobulin*, *Interferon*, *Perforin*, *Fibrinogen*; dan protein reseptor yang menerima rangsangan
 8. Molekul sinyal pada komunikasi antar sel (Enkavi et al., 2019).

1.3 Pengertian Sel

Sel pertama kali ditemukan dan diperkenalkan oleh Robert Hooke pada tahun 1665. Sel-sel ini sangat kecil sehingga diperlukan kaca pembesar pada saat itu. Disebut "Cell" karena bentuknya menyerupai sel biasa di pusat penahanan. Beberapa sel berukuran sangat kecil, misalnya pada beberapa bakteri, hanya berukuran 0,2-0,3 mikron,

sementara yang lain sangat panjang, lebih dari satu meter - sel saraf (Guerrero et al., 2019).

Bila suatu zat mempunyai struktur fungsional kecil seperti organisme hidup, maka disebut sel. Sel merupakan unit organisasi struktural yang dapat mengendalikan aktivitas kehidupan. Kegiatan tersebut ialah metabolisme (baik anabolisme maupun katabolisme), reaksi terhadap lingkungan (reaksi fisika dan kimia), pertumbuhan dan perkembangan (Noviantari, 2020).



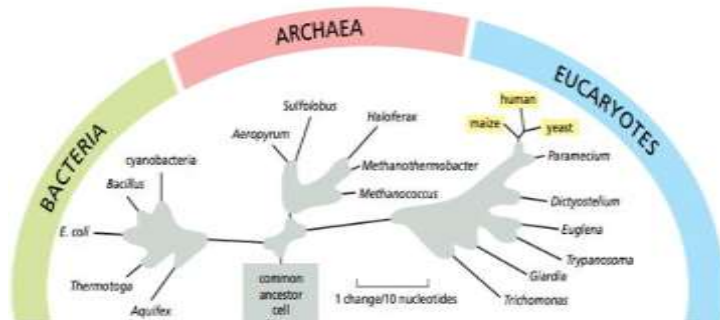
Gambar 1. 1. Berbagai Ukuran Molekul Dan Makhluk Hidup
Sumber Mushlih (2019)

1.4 Pembagian Organisme Makhluk Hidup

Para ilmuwan mengklasifikasikan makhluk hidup menjadi seluler dan non seluler berdasarkan struktur selnya. Virus sering dijadikan sebagai salah satu sampel organisme peralihan antara hidup dan mati, namun aktivitasnya hanya terlihat ketika berada di dalam tubuh organisme lain atau berperan sebagai parasit. Organisme seluler muncul dari sekelompok bakteri yang telah memiliki bahan dasar

penyusun sel, dimulai dari sitoplasma, membran sel, dan bahan genetik inti (Furumichi et al., 2021).

Klasifikasi organisme berdasarkan kompleksitas seluler dapat dibedakan menjadi prokariot dan eukariot. Sel prokariotik adalah sel yang cukup sederhana yang tidak memiliki membran intraseluler (inti dan organel lain kecuali ribosom) (Henggu & Nurdiansyah, 2021). Sel eukariotik memiliki struktur membran internal sehingga memiliki bentuk yang lebih maju dibandingkan sel prokariotik. Sel eukariotik memiliki *nukleus*, *Mitokondria*, *Kloroplas*, *Reticulumendoplasma*, *Kompleks Golgi*. Eukariot memiliki lebih banyak anggota daripada prokariot, yaitu : fungi, *Plantae*, *Protozoa* dan *Animalia* (Erny et al., 2021).



Gambar 1. 2. Filogenetik Tiga Domain
Sumber Mushlih (2019)

Organisme diklasifikasikan berdasarkan jumlah sel yang membentuk suatu individu, yaitu: *organisme uniseluler* dan *organisme multiseluler*. *Organisme uniseluler* adalah organisme yang hanya terdiri dari satu sel. Kelompok *organisme uniseluler* antara lain *Eubacter*, *Archibacter*, dan *Protista*. Berdasarkan pembagian sistem domainnya, organisme saat ini diklasifikasikan menjadi tiga kelompok: *eubacteria*, *archaea*, dan *eukariota*. *Eubacteria* adalah sekelompok bakteri yang mencakup *cyanobacteria*, bakteri

gram positif, bakteri gram negatif, dan *flavobacteria*. *Archibacters*, sebaliknya, adalah bakteri hidup yang berada di lingkungan ekstrim serta dibagi menjadi *halophile*, *metanogen* dan *thermophiles* (Ismaun et al., n.d.).

Manusia termasuk dalam kelompok *Eucariota*, sekelompok organisme yang mempunyai ciri-ciri membran inti (*nukleus*) disebut *Animalia*. Membutuhkan perjalanan panjang dari klasifikasi sederhana seperti tumbuhan dan hewan hingga klasifikasi makhluk hidup yang ada saat ini (Sriwidarti et al., 2019). Klasifikasi didasarkan pada kesamaan organisme. Ciri-ciri yang membedakan ketiga domain Bakteri, *Archaea*, dan *Eukariota* antara lain ada tidaknya membran inti, membran yang mengelilingi *organel intraseluler*, *lipid membran*, jenis *RNA polimerase*, jenis asam amino awal untuk sintesis protein, dan meliputi adanya dari Jumlah intron dalam suatu gen, keberadaan *intron*, kemampuan bertahan hidup di lingkungan ekstrim, dll (Khotimah et al., 2021).

1.5 Organel-organel Sel

Sel merupakan unit terkecil kehidupan, layaknya atom yang menjadi unit terkecil suatu partikel dalam senyawa kimia. Di dalam sel dapat dilihat bagian-bagian sel yang mendukung kehidupan sel. Bagian terluar sel adalah membran sel. Membran plasma memiliki sifat selektif *permeabel* terhadap zat yang keluar dan masuk pada sel. Bagian dalam sel disebut *Sitoplasma* yang berisi cairan dan organel sel. Berikut adalah tabel organel-organel sel:

Tabel 1. 1. Organel-Organel di dalam sel beserta fungsinya

Organel	Deskripsi	Fungsi
Nukleus		
Nukelus	Struktur yang ditutupi oleh dua membran yang mengandung <i>nukleolus</i> dan <i>kromosom</i>	DNA Mentranskripsikan materi genetik untuk membentuk RNA.
Nukleolus	Berbentuk granular dalam <i>Nukleus</i> , terdiri dari RNA dan protein	Sebagai tempat pembentukan dan perakitan <i>ribosom</i>
Kromosom	Kompleks antara DNA dan protein. Benang <i>kromatin</i> dipadatkan dan dibentuk serta menjadi terlihat jelas selama pembelahan sel	Pusat informasi genetik yang nantinya akan diwariskan sertagen yang mengatur seluruh aktivitas sel
Organel Sitoplasma		
Membran Plasma	Membran yang menutupi sel	Sebagai media pergerakan dalam banyak sel, melindungi seluruh bagian sel, membantu menjaga bentuk sel, mengatur pergerakan zat masuk dan keluar

Organel	Deskripsi	Fungsi
		sel, dan berperan sebagai media transmisi sel.
Ribosom	RNA dan protein kompleks. Pada <i>eukariotik</i> , sebagian besar terikat pada <i>retikulum endoplasma</i> dan ada pula yang bebas di dalam <i>sitoplasma</i>	Mensintesis rantai asam amino
Retikulum Endoplasma	Membran internal didalam sel	Sintesis lipid dan pembentukan lipid yang mampu membentuk vesikel sebagai transpor pembawa protein
Kompleks Golgi	Kantong membran yang berbentuk mendatar	Modifikasi protein, pelapisan protein yang disekresi, pemisahan dan penyortiran protein yang didistribusikan di dalam dan dari sel
Lisosom	Kantong membran pada hewan	Pencernaan intraseluler dapat memecah zat dan protein yang tidak diinginkan, termasuk dan

Organel	Deskripsi	Fungsi
		protein
Vakuola	Kantung membran lebih umum terjadi pada tumbuhan, jamur, dan alga	Tempat menyimpan bahan-bahan seperti air, cadangan makanan, minyak, limbah, dll dan untuk mengendalikan tekanan <i>hidrostatik</i>
Peroksisom	Kantung membran yang didalamnya memiliki banyak enzim	Berperan pada proses metabolisme sel seperti memecah asam lemak dan protein
Mitokondria	Kantung yang terdiri dari dua selaput, yaitu selaput dalam dan selaput luar. Membran bagian dalam membentuk lipatan kristal, bagian dalamnya disebut matriks dan mengandung <i>DNA sirkular</i> .	Organel yang berfungsi sebagai reaksi
Sitoskeleton		
Mikrotubulus	Bentuknya seperti tabung dengan lubang di tengahnya dan terbuat dari	Transporter sel yang berperan dalam pergerakan sel dan terdiri dari struktur dasar cilia, flagella,

Organel	Deskripsi	Fungsi
	<i>protein tubulin</i>	sentriol, badan basal
Filamen Intermediet	Berbentuk solid yang tersusun atas protein	Penopang sel yang berperan dalam pergerakan dan pembelahan sel
Sentriol	Memiliki sepasang tabung berongga yang terdiri dari sembilan microtubulus triplet	Gelendong mitosis terbentuk di antara sentriol selama pembelahan sel pada hewan
Silia	Relatif lebih pendek dari permukaan membran sel	Pengangkutan substrat pada permukaan membran, misalnya pada saluran telur manusia, sebagai media pengangkutan beberapa mikroorganisme (<i>Protista</i>).
Flagella	Bentuknya relatif lebih panjang dibandingkan permukaan membran sel	Media transfer untuk beberapa mikroorganisme (protista) seperti sperma

Sumber: Mushlih (2019)

Seluruh aktivitas seluler sel dikendalikan oleh inti sel (*Nukleus*). Didalam *Nukleus* terdapat DNA yang menjadi materi genetik sel. Segmen DNA dinamakan dengan gen yang menyandi kode tertentu sebagai informasi untuk membuat molekul protein. Inti sel memiliki membran yang membatasinya dengan *Sitoplasma*. *Retikulum Endoplasma* merupakan organel kelanjutan dari inti sel. RE juga memiliki membran. Ada dua jenis RE antara lain: RE halus dan RE kasar. RE kasar terletak di dekat inti sel, dan RE jenis ini terikat pada ribosom untuk berfungsi dalam sintesis protein. Sementara itu, RE halus letaknya lebih jauh dari inti sel dan tidak ditemplei *Ribosom*.

RE halus berfungsi dalam proses mensintesis lipid, metabolisme karbohidrat, dan mendetoksifikasi obat maupun racun. *Aparatus Golgi* adalah organel yang fungsinya berkaitan dengan RE yaitu menerima dan memodifikasi protein dari RE kasar. *Golgi* juga berperan dalam transpor vesikel yang berisi molekul ke membran plasma atau ke organel lain. Sementara itu, *Ribosom* adalah organel untuk sintesis protein. *Ribosom* ditemukan di *Sitosol*, RE, *Mitokondria*, dan *Kloroplas*. *Mitokondria* merupakan organel yang berfungsi untuk respirasi seluler. Organel ini menghasilkan ATP sebagai energi yang digunakan sel untuk segala aktivitas selulernya. *Vakuola* juga merupakan organel yang memiliki fungsi kompleks.

Terdapat beberapa jenis vakuola yakni vakuola sentral (ditemukan pada tumbuhan), vakuola makanan, dan vakuola kontraktil. Vakuola sentral memiliki banyak enzim di dalamnya. Fungsinya untuk hidrolisis, tempat menyimpan cadangan makanan, juga racun. Vakuola makanan dan kontraktil banyak ditemukan di organisme *Protista*. Vakuola makanan berperan dalam proses mencerna dan menyalurkan hasil makanan ke seluruh tubuh sedangkan vakuola kontraktil berperan untuk memompa air dari sel, menjaga konsentrasi ion dan molekul dalam sel. *Kloroplas* ditemukan pada sel tumbuhan dan beberapa ganggang yang berfungsi sebagai tempat *fotosintesis*.

Sitoskeleton adalah organel yang tersusun atas serabut-serabut protein. *Sitoskeleton* dibedakan menjadi tubulus mikro, filamen mikro, dan filamen intermediet. Peran sitoskeleton antara lain memelihara bentuk sel, berperan pada motilitas sel maupun organel dalam sel (Mushlih, 2019).

BAB 2

CARA PENGGUNAAN INSTRUMEN DI LABORATORIUM BIOLOGI MOLEKULER

2.1 Pendahuluan

Metode isolasi DNA pertama kali dilakukan pada tahun 1869, kemudian terus berkembang dan dimanfaatkan dalam berbagai bidang hingga saat ini.

Ilmu pengetahuan biologi molekuler lebih efektif jika dilanjutkan melalui kegiatan praktikum. Perkenalan alat laboratorium termasuk langkah pertama sebelum memulai kegiatan atau penelitian yang berkaitan dengan biologi molekuler. Setiap alat laboratorium memiliki prosedur kerja maupun fungsi yang berbeda-beda.

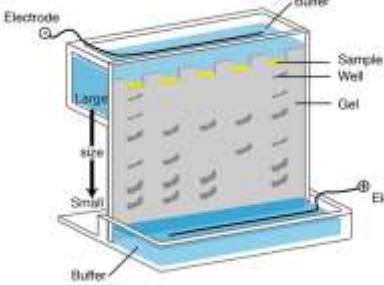
Alat-alat tersebut terdiri atas *Mikropipet*, *Elektroforesis*, *Gel Documentation*, *Sentrifugasi*, *Spektrofotometer*, *Thermocycler* dan *Laminar Air Flow*. Peralatan ini digunakan untuk berbagai tujuan, diantaranya isolasi DNA, isolasi plasmid, analisis DNA kualitatif dan kuantitatif serta PCR. Selain memahami prinsip kerja masing-masing alat, petugas laboratorium mudah dalam menggunakan alat tersebut secara baik dan benar, sehingga meminimalisir terjadi kerusakan pada peralatan dan diharapkan data yang diperoleh menjadi lebih akurat.

2.2 Instrumen di Laboratorium Biologi Molekuler

Alat biologi molekuler, antara lain *Mikropipet*, *Elektroforesis*, *Gel Documentation*, *Sentrifugasi*, *Spektrofotometer*, dan *Thermocycler*.

Tabel 2. 1. Instrumen di Laboratorium Biologi Molekuler

No	Nama Alat	Prinsip Kerja
1.	Mikropipet 	Mikropipet (pipet mikro, <i>micro pipettor</i>) merupakan alat yang digunakan untuk memindahkan cairan/reagen tertentu dalam skala kecil (ukuran mikro) yang memiliki akurasi jauh tinggi dibandingkan dengan pipet biasa. Penguji ketelitian dari alat ini dapat dilakukan melalui kalibrasi terlebih dahulu. Tahap pemipetan termasuk hal yang sangat penting dalam

No	Nama Alat	Prinsip Kerja
		melakukan analisa.
2.	Elektroforesis 	Prinsip dasar elektroforesis adalah adanya pemisahan muatan antara permukaan partikel dan fluida yang mengelilinginya. Medan listrik yang diterapkan bekerja pada kerapatan muatan yang dihasilkan, menyebabkan partikel bermigrasi dan cairan di sekitar partikel mengalir.
3.	<i>Gel Documentation</i>	Prinsip kerja Gel Doc adalah sinar UV yang dipancarkan menyinari pewarna gel agarosa yang terikat pada DNA, sehingga pita DNA dapat divisualisasikan.

No	Nama Alat	Prinsip Kerja
		Pita DNA terlihat melalui koneksi langsung antara Gel Doc dan komputer
4.	Sentrifugasi 	Prinsip kerja sentrifugasi didasarkan pada prinsip putaran tabung berisi larutan, yang dapat memisahkan larutan berdasarkan massa jenisnya. Beberapa faktor yang dipertimbangkan ketika memproduksi peralatan centrifuge, termasuk: dari segi berat, biaya, dan kemudahan pembuatan

No	Nama Alat	Prinsip Kerja
5.	Spektrofotometer 	Prinsip kerja spektrofotometri didasarkan pada penyerapan cahaya yang berbeda oleh senyawa organik pada rentang panjang gelombang tertentu menggunakan hukum Beer-Lambert
6.	<i>Thermal cycler</i> 	Thermal cycler digunakan untuk menaikkan atau menurunkan suhu termoblok dalam langkah-langkah terpisah yang telah diprogram sebelumnya. Blok Termal terdiri dari lubang di mana tabung berisi campuran reaksi dapat dimasukkan. Suhu yang berbeda ini

No	Nama Alat	Prinsip Kerja
		diperlukan untuk memisahkan untaian DNA, mengikat primer, dan memperpanjang untaian baru

BAB 3

JENIS SAMPEL PADA PEMERIKSAAN BIOLOGI MOLEKULER

Sebelum memasuki proses analisis, standar paling umum yang diterapkan pada setiap jenis pemeriksaan laboratorium adalah potensi misidentifikasi sampel, tahap ini harus ditekankan agar tidak membahayakan untuk langkah selanjutnya. Sampel harus diberi label setidaknya dua jenis. Diagnosis molekuler dapat menggunakan berbagai jenis sampel bergantung pada jenis penyakit, penanganan jaringan tubuh, tatalaksana laboratorium atau rumah sakit, serta metode pemeriksaan. Laboratorium juga harus memiliki standar persyaratan minimal kadar asam nukleat agar sesuai dengan sensitifitas pemeriksaan, serta kuantitas dan kualitas asam nukleat harus divalidasi agar didapat hasil yang maksimal dan akurat. Sampel yang digunakan pada laboratorium biomolekuler kesehatan biasanya berupa darah, jaringan, dan cairan tubuh. Sampel biopsi jaringan biasanya dalam bentuk utuh, sedangkan untuk jaringan segar dalam bentuk potong beku.

Sampel yang sering digunakan sebagai barang bukti pada kasus pidana, yaitu bercak darah, keringat, sperma, maupun cairan lainnya. Tentu saja hal ini memerlukan penanganan yang hati-hati. Pertimbangan harus diberikan pada bagaimana bahan yang diperlukan sebagai sumber pengujian DNA dikumpulkan, disimpan, dan diangkut (Yulianti, 2019).

Analisis sampel tes DNA harus ditangani dengan hati-hati karena dapat menentukan tingkat keberhasilan tes DNA selanjutnya. Sampel DNA perlu dilakukan penanganan yang tepat untuk mencegah terjadinya resiko penurunan kualitas sampel pengujian DNA forensik (*degradasi DNA/fragmentasi DNA*). Hal ini membuat tes DNA selanjutnya menjadi lebih sulit. Jika DNA yang digunakan terlalu rusak dapat menyebabkan

kegagalan pembuatan profil DNA, namun tes berbasis DNA (PCR) menggunakan *mini primer set* kini telah dikembangkan (Yudianto, 2019).

3.1 Darah

3.1.1 Distribusi DNA pada Darah

Manusia memiliki berbagai jenis sumber DNA yang berasal dari nucleus. Nucleus tersebar ke berbagai bagian tubuh manusia termasuk darah. Jenis darah yang terdapat nucleus adalah leukosit yang mengandung 180 - 314 $\mu\text{g/ml}$ DNA manusia.(Yao et al. 2020). Whole blood (darah utuh) adalah sampel biologis yang umum untuk ekstraksi DNA. Sampel DNA yang bersumber dari darah memiliki hasil yang lebih baik dan juga minim terfragmentai jika dibandingkan dengan dengan sampel lainnya seperti air liur atau sel bukal, sperma, dll. Darah utuh tersusun atas sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (*white blood cell*), trombosit, dan plasma, serta sumber DNA yang terkandung dalam inti sel darah putih dianggap berkualitas tinggi dan digunakan untuk uji kanker dan forensik. Dari diagnosis tumor hingga tes garis ayah dan berbagai tes biologis lainnya (Lee and Tripathi 2020).

3.2 Saliva

3.2.1 Distribusi DNA pada Saliva

Saliva merupakan cairan dari kelenjar air liur sebagai salah satu sistem homeostatis rongga mulut (Nur and Yamamoto 2022). Sumber DNA pada saliva berasal dari sel epitel (Trost et al. 2019). Selain dari sel epitel, saliva dapat dijadikan sumber DNA karena merupakan cairan tubuh kompleks yang disuplai oleh darah sehingga terdapat leukosit dan plasma (protein,

DNA, RNA) yang dapat digunakan untuk deteksi. Saliva mengandung komponen untuk membantu proses pencernaan dan kebersihan mulut bahkan mikroorganisme. Mikroorganisme yang ada dalam saliva dapat dijadikan sebagai sampel untuk mendeteksi spesies mikroorganisme tersebut. Melalui DNANYa (Nur and Yamamoto 2022).

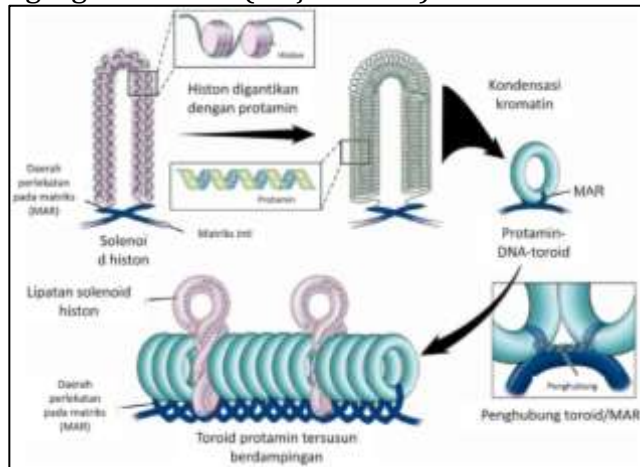
Mikroorganisme dalam air liur dapat berupa bakteri nonpatogen atau patogen penyebab penyakit DNA sistemik dan nonsistemik. Sumber DNA yang berasal dari saliva masih optimal dalam proses identifikasi DNA dan sequencing DNA selama jumlah DNA tercukupi (Nur and Yamamoto 2022). Hasil penelitian menemukan bahwa tidak ada perbedaan kualitas sequencing antara sampel darah dan saliva(Wall et al. 2014). Saliva dapat digunakan sebagai alternatif sampel DNA terlebih bagi pasien yang menolak pengambilan darah karena alasan rasa sakit atau pada pasien anak kecil. Kondisi lain juga terjadi pada pasien pasca transfusi darah, transplantasi sel induk hematopoietik atau leukopenia yang dapat menurunkan hasil DNA dari darah sehingga penggunaan saliva dapat direkomendasikan sebagai sampel (Yao et al. 2020).

3.3 Cairan Semen

3.3.1 Distribusi DNA pada Cairan Semen

Semen adalah cairan yang membawa sel sperma yang dikeluarkan dari alat vital pria, dan fungsi utamanya mengantarkan sel sperma tersebut ke indung telur wanita pada saat ovulasi (Rahmadiani 2021). Sperma yaitu sel gamet jantan yang memiliki kemampuan bergerak untuk penetrasi dan pembuahan. Fungsi utama sperma adalah sebagai sel hidup yang dapat menjadi materi genetik

jantan ke sel ovarium betina dalam proses regenerasi. Pemeriksaan sperma biasanya digunakan untuk melihat kualitas sperma yang dapat mempengaruhi proses keberhasilan ovulasi. Pemeriksaan yang dilakukan berupa motilitas, konsentrasi sperma, morfologi dan rasio sperma yang hidup. Sperma pada eukariotik memiliki DNA yang dikemas secara rapat dan mampu dalam mengorganisir DNA (Küçük 2018).



Gambar 3. 1. Lokasi DNA pada Sperma
Sumber (S. W. Lestari and Sari 2015)

Sumber DNA sperma terletak pada struktur tunggal yang disebut nuclear annulus (Küçük 2018). Berdasarkan strukturalnya, sebagian besar DNA sperma membentuk lingkaran menjadi toroid dan sebagian kecil akan berikatan dengan histon serta DNA lainnya yang melekat di matriks inti sperma yaitu *matrix attachment regions* (MARs) (S. W. Lestari and Sari 2015). Sperma dengan jumlah berbeda mengandung berbagai jenis protamin dengan urutan asam amino yang berbeda pula. Contohnya pada DNA sperma manusia dengan tikus memiliki dua jenis protamin yang berbeda

sedangkan inti sperma sapi jantan dan domba jantan memiliki satu jenis protamin. Ikatan disulfida pada inti sperma yang memiliki dua jenis protamin berbeda dinilai kurang stabil jika dibandingkan dengan inti sperma yang memiliki satu jenis protamin (Küçük 2018).

3.4 Permukaan Kulit

3.4.1 Distribusi DNA pada Permukaan Kulit

Istilah DNA Sentuh "*DNA Touch*" seringkali muncul menjadi salah satu jenis sampel yang digunakan untuk pemeriksaan DNA khususnya pada kasus forensik. Metode *DNA touch* berhubungan dengan permukaan lapisan kulit terluar yaitu epidermis yang terdiri dari lapisan keratinosit yang pipih dan berdiferensiasi disebut korneosit (Burrill et al. 2021). Letak DNA pada *DNA touch* terletak pada sisi terluar dari sel kulit (epitel kulit) (Burrill, Daniel, and Frascione 2019).

Teori menjelaskan tentang asal-usul DNA pada lapisan kulit masih realtif sedikit tetapi penelitian Puspa,dkk tentang identifikasi DNA touch pada permukaan *faceshield* masih memberikan hasil visualisasi elektroforesis yang baik, dilihat dari kemurnian dan konsentrasi DNA yang diperoleh (Puspa et al. 2021). Pengambilan sampel DNA touch terfokuskan pada kemungkinan adanya property atau barang-barang disekitar yang diduga terjadi kontak fisik dengan kulit (Burrill, Daniel, and Frascione 2019).

3.5 Urine

3.5.1 Distribusi DNA pada Urine

Urine merupakan produk dari sistem ekskresi manusia pada organ ginjal. Urine dapat mengandung asam nukleat berupa RNA dan DNA yang dapat terdeteksi dalam suatu pemeriksaan. Sumber DNA pada urine sering disebut DNA ekstraselluler urine atau *Cell Free DNA urine*. Kelemahan DNA yang bersumber dari urine yaitu sering ditemukan dalam konsentrasi rendah dan rentan mengalami fragmentasi. Sumber DNA pada urine dapat ditemukan pada urine yang berasal dari sel kandung kemih atau uretra bahkan sebagai free DNA. Sumber DNA urine dapat berasal dari genom, mitokondria atau bakteri penyebab suatu penyakit.

Pengambilan sampel non-invasif pada urine dapat menjadi alternatif yang ideal untuk skrining atau pemantauan tumor urogenital secara rutin. Penentuan sequencing DNA dan pengukuran konsentrasi urine dapat memberikan informasi untuk beberapa kasus patologi. Contohnya pada analisis DNA urine pada infeksi saluran kemih (ISK) dapat mengidentifikasi spesies bakteri penyebab infeksi dan membantu dalam memantau respon imun tubuh. Selain DNA inti pada urine, juga terdapat DNA mitokondria yang meningkat pada berbagai penyakit akibat pengaruh organ ginjal termasuk diabetes dan non diabetes penyebab ginjal kronis serta hipertensi (Janovičová et al. 2023).

3.6 Tulang dan Gigi Sebagai Sumber DNA

Tulang dan gigi termasuk kedalam jaringan terkuat yang berada didalam tubuh manusia serta berfungsi sebagai sumber informasi untuk identifikasi forensik menggunakan

analisis DNA. Tulang dan gigi memiliki kandungan DNA yang berbeda tergantung pada struktur dan komposisi selnya (Yudianto, 2019). Sel-sel tulang disebut juga dengan *osteosit*, dimana terletak di antara *lamela* atau di celah dan dikelilingi oleh matriks yang disusupi garam mineral, membuat tulang menjadi keras dan tidak fleksibel.

Jaringan fibrosa luar dikenal dengan *periosteum* yang kaya akan pembuluh darah. Jenis sel ini merupakan komponen seluler terpenting dalam jaringan tulang (Jehuda, 2020). *Osteosit* bersama *osteoblas* memiliki peran penting dalam pembentukan matriks tulang di sekitarnya dan menghasilkan *alkaline fosfatase* yang diperlukan untuk membentuk garam kalsium. Sel tulang berjumlah sebanyak 20.000-26.000/mm³.

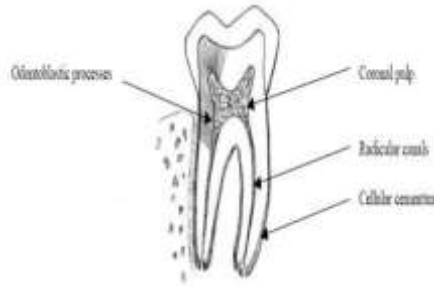


Gambar 3. 2. Histologi Tulang
Sumber Kusuma dewi (2019)

Matriks tulang terdiri dari 95% bahan *osteoid organik* seperti *kolagen tipe I*, GAG (termasuk *kondroitin 4-sulfat*, *kondroitin-6 sulfat*, dan *keratin sulfat*) dan glikoprotein. Bahan anorganik terdiri dari kristal hidroksiaptit kalsium dan fosfor, karbonat, magnesium, fluorida, dan sulfat. Porsi anorganik adalah 50% dari berat tulang (Pertiwi 2020).

Gigi manusia terdiri atas dua bagian, yakni akar dan mahkota gigi. Akar berfungsi sebagai penompang gigi yang terletak di rahang terdiri atas *sementum* dan *mahkota*. Mahkota gigi memiliki *email* (bagian luar) dan *dentin*

(bagian dalam). Di sini, pembuluh darah serta saraf pada pulpa akan masuk ke gigi melalui *foramen apical* yang terletak pada ujung akar (Apeks Gigi).



Gambar 3. 3. Struktur Penampang Gigi Molar
Sumber Jehuda (2020)

Seperti sel lainnya, DNA inti dan mtDNA juga ditemukan pada struktur gigi. Gigi molar memiliki tingkat kekerasan yang lebih tinggi dibandingkan gigi lainnya sehingga tidak mudah rusak akibat pada tahap mengunyah serta sangat cocok dijadikan bahan sampel untuk analisis DNA. Prosedur isolasi DNA dari bahan jaringan pada dasarnya sama dengan isolasi sampel darah dan cairan tubuh lainnya, hanya saja jaringannya harus dirusak terlebih dahulu dan jaringan ikatnya diangkat pada tahap awal. Sel tulang dan gigi dikelilingi oleh matriks. Matriks sendiri terdiri atas garam *anorganik crystalhydroxyapatite* yang tersusun oleh kalsium dan fosfor (Jehuda, 2020).

3.6.1 Distribusi DNA di dalam gigi

Prosedur pengambilan sampel gigi memerlukan pemahaman komprehensif tidak hanya tentang morfologi gigi dan distribusi DNA intradental, namun juga bagaimana hal ini berubah selama proses *postmortem*. Pemahaman ini memungkinkan pemilihan gigi yang optimal dari rahang dan pencabutan sebagian gigi yang ditargetkan. Gigi

manusia secara anatomi dapat dibagi menjadi dua bagian: mahkota, yang terlihat di mulut dan akar yang dikelilingi oleh tulang *alveolar* rahang (Kusuma dewi, 2019).

3.6.2 Faktor faktor yang mempengaruhi kandungan DNA pada gigi

Meskipun *degradasi* DNA gigi terbukti bergantung pada waktu, hubungan antara waktu dan degradasi sangatlah kompleks sehingga sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Degradasi DNA *post-mortem* dimulai dengan pelepasan enzim *intraseluler endogen* (misalnya *Lipase*, *Nuklease*, dan *Protease*), diikuti dengan pelepasan enzim eksogen akibat invasi mikroorganisme lingkungan dan *invertebrata*. *Porositas* gigi yang terbatas dan lokasinya yang terlindungi (Jehuda 2020).

3.7 Isolasi dan DNA dari sampel rambut

Deoxyribonu Cleid Acid (DNA) merupakan materi genetik yang terdiri dari atas komponen molekul gula pentose (*Deoxyribosa*), gugus phosphate, dan basa nitrogen. Pada organisme tingkat tinggi, manusia, hewan, dan tumbuhan, DNA terletak di inti sel (DNA inti), mitokondria (DNA mitokondria), dan kloroplas (DNA kloroplas). DNA di dalam inti sel disebut juga DNA kromosom, dan DNA di luar inti sel disebut *DNA ekstrakromosom* (Fatmala, 2019).

DNA yang berasal dari DNA inti (DNA kromosom), DNA mitokondria dan DNA kloroplas dapat diisolasi dan dimurnikan secara *in vitro* menggunakan teknik tertentu. Memilih teknik yang tepat untuk isolasi dan pemurnian DNA yang akan mendapatkan hasil berupa DNA dalam keadaan paling murni dan DNA tanpa komponen sel lain seperti RNA, protein, atau karbohidrat (Dewi 2020).

3.7.1 Struktur dan fungsi rambut

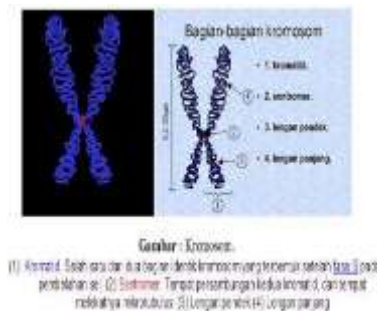
DNA merupakan sebuah makromolekul yang berupa benang panjang terbentuk dari sejumlah besar *deoksiribonukleotida* yang tersusun atas satu basa, satu gula dan satu gugus fosfat. diibaratkan sebuah tubuh, dimana DNA diibaratkan sebagai otak yang akan mengatur segala proses di dalam tubuh. DNA mempunyai peran yang sangat penting pada pewarisan sifat. Senyawa kimia yang penting pada makhluk hidup ialah DNA yang bertugas membawa materi genetik dari suatu generasi ke generasi berikutnya. DNA juga termasuk sebagai senyawa *Polinukleotida* yang membawa sifat-sifat keturunan yang khas pada *kromosom* (Rahmawati, 2019).

Pada *hereditas* DNA juga sangat penting. Paket semua informasi genetik dan dibagikan pada generasi berikutnya. DNA membuat gen serta gen akan membuat *kromosom*. Manusia terdiri atas 23 pasang kromosom – total 46 kromosom. 22 pasang kromosom dari pasangan ini disebut dengan *autosom*, terlihat sama pada laki-laki dan perempuan. Ke 23 pasangan disebut *kromosom seks* dan memiliki perbedaan antara pria dan wanita. Wanita memiliki dua salinan dari kromosom X atau XX, sedangkan pria memiliki satu X dan satu kromosom Y (Yuliyati, 2019).

Setengah dari gen berasal dari orang tua. Kromosom pertama kali dipopulerkan oleh Waldeyer pada tahun 1888 dan etimologinya terdiri atas *Chroma* berarti warna dan *Soma* berarti tubuh. Oleh karena itu, *kromosom* adalah benda halus berbentuk batang, lurus atau melengkung, terbuat dari zat yang mudah bergabung dengan pigmen dalam *nukleus*. Karena *kromosom* mengandung gen, mereka berperan dalam

mentransmisikan karakteristik individu dan informasi genetik.

- Bagian-bagian *Kromosom* terdiri atas:
 1. *Kromomer* ialah struktur yang memiliki kemiripan dengan manik yang merupakan kumpulan bahan kromatin.
 2. *Sentromer* adalah daerah cekung (menyempit) di sekitar daerah tengah suatu kromosom, tempat sentromer juga berada.
 3. *Kinektor* adalah Wilayah di mana filamen gelendong dan lengan kromosom bergabung.
 4. Telomer merupakan daerah terminal kromosom yang fungsinya menjaga kestabilan ujung kromosom agar DNA tidak putus.
 5. Satelit merupakan bagian kromosom berbentuk lingkaran yang terletak di ujung lengan kromatid (Al Husni, 2021).



Gambar 3. 4. Bagian Kromosom

- Berdasarkan letak *sentromer* dan lengan, bentuk kromosom dibedakan menjadi 4 macam, antara lain:
 1. Bentuk *Telosentrik*, yaitu jika letak sentromer berada di ujung.

2. Bentuk *Akrosentrik*, yaitu letak *sentromer* mendekati ujung.
3. Bentuk *submetasentrik*, yaitu jika letak *sentromer* agak jauh dari ujung *kromosom* dan biasanya membentuk huruf L atau J.
4. Bentuk *metasentrik*, yaitu jika letak *sentromer* berada di tengah sehingga panjang masing-masing lengan sama.

F. Miescher pertama kali menemukan DNA pada tahun 1869 yang terdapat pada sel sperma dan sel darah merah burung, dan kemudian disebut *nuklein*. Pada tahun 1880 Fisher juga menemuukan adanya pirimidin (berupa sitosin dan timin) dan dua purin (*adenin dan guanin*). Penemuan ini juga dilengkapi dengan penemuan Levin (1910) tentang gula 5 karbon ribosa, gula deoksiribosa, dan fosfat dalam inti. DNA terutama ditemukan di inti sel (*nukleus*). Namun ada juga yang terjadi di *mitokondria* (Shelly, 2021).

3.7.2 Kesesuaian rambut untuk analisis DNA

Untuk menguji kesesuaian sampel rambut manusia untuk analisis DNA nuklir, mikroskop rambut digunakan untuk melihat ujung rambut dan menentukan apakah rambut tersebut mengandung akar. Jika demikian, sampel tersebut dapat diuji menggunakan prosedur pengujian DNA inti yang disebut analisis *Short Tandem Repeat* (STR). Rambut yang telah rontok tanpa akar tidak dapat dikirim untuk pengujian jenis ini, namun masih dapat dilakukan pengujian DNA mitokondria (*mtDNA*) pada batang rambut. Kombinasi perbandingan rambut mikroskopis dan analisis DNA dapat memberikan pendekatan pelengkap yang menawarkan informasi lebih unggul tentang asal usul rambut, dibandingkan

dengan informasi yang diperoleh hanya dengan menggunakan perbandingan rambut mikroskopis (Al husni, 2021).



Gambar 3. 5. Sampel Rambut

BAB 4

PROSEDUR EKSTRAKSI ASAM NUKLEAT

4.1 Asam Nukleat

Asam nukleat adalah senyawa yang mengandung basa nitrogen sebagai bagian dari struktur asam nukleatnya. Asam nukleat dibentuk oleh *polimerisasi nukleotida* dan berfungsi sebagai tempat penyimpanan utama untuk menyimpan dan mengambil informasi tentang urutan *polipeptida*. Penyusun asam nukleotida antara lain gula basa dan asam fosfat. *Nukleotida* bervariasi tergantung pada jenis gula dan basa nitrogen yang dikandungnya. Ada dua jenis gula yakni: ribosa (RNA) dan deoksiribosa (DNA). Kelompok dasar gula dibagi menjadi purin dan pirimidin. Purin terdiri dari adenin (A) dan guanin (G), dan pirimidin terdiri dari sitosin (S), timin (T) dan urasil (U) (Nufus et al., 2023).

Asam nukleat adalah makromolekul kompleks yang terdiri dari rantai nukleotida yang menyimpan informasi genetik suatu organisme untuk menentukan fungsi organ tubuh, perbaikan sel, pencernaan makanan, dan pernapasan. Asam nukleat terdapat di semua sel hidup dan bertanggung jawab untuk menyimpan dan mentransmisikan gen, menerjemahkan informasi secara akurat, dan mensintesis protein unik untuk setiap sel. Asam nukleat disebut juga *mononukleotida* atau *nukleotida*. *Nukleotida* bergabung bersama membentuk *polinukleotida*. Polinukleotida membentuk senyawa polimer baru yang disebut DNA dan RNA. Ada dua jenis asam nukleat dalam sel: DNA dan RNA (Nufus et al., 2023) (Lestari & Citrawati, 2023) (Dewanata & Mushlih, 2021).

4.2 Ekstraksi Asam Nukleat

Ekstraksi adalah teknik dasar yang perlu dikuasai dalam mempelajari Biologi Molekular. Ekstraksi memiliki tujuan untuk membuang dan memisahkan asam nukleat dari komponen sel lainnya seperti: protein, karbohidrat, lemak, dll sehingga akan diperoleh asam nukleat yang dapat dianalisis maupun dimodifikasi secara lebih lanjut melalui teknik biologi molekuler lainnya.

Ekstraksi (isolasi asam nukleat) merupakan teknik dasar yang harus dikuasai ketika mempelajari teknik biologi molekuler. Tujuan ekstraksi (isolasi asam nukleat) adalah untuk memisahkan asam nukleat yang dihasilkan dari komponen seluler lainnya (protein, karbohidrat, lemak, dll) sehingga dapat dianalisis atau dimodifikasi lebih lanjut dengan menggunakan teknik biologi molekuler lainnya pemisahan asam nukleat (Refai Ibrahim, 2023).

Prosedur ekstraksi (isolasi asam nukleat) terdiri atas 2 proses, yaitu proses fisik dan kimia. Prosesnya dimulai pada tahap homogenisasi jaringan yang membantu dalam meningkatkan jumlah atau luas permukaan sel yang akan dilisis. Rephrase Homogenisasi jaringan sangat berguna untuk mengekstraksi asam nukleat dari organ dan jaringan. Langkah selanjutnya adalah permeabilisasi sel target. Permeabilisasi sel dapat dilakukan dengan menggunakan deterjen nonionik yang tidak mengikat asam nukleat, seperti Tween atau SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). Nonidet, Laureth, dan Triton bekerja untuk melepaskan asam nukleat ke dalam sel yang harus dilisiskan terlebih dahulu (biasanya menggunakan buffer hipotonik).

Langkah selanjutnya adalah degradasi dan pengendapan protein (dengan pemanasan, penggunaan *enzim proteinase*, atau garam *chaotropic*). Asam nukleat yang dihasilkan dapat diendapkan dan dipekatkan menjadi volume yang lebih kecil. Presipitan yang sering digunakan yakni PEG (*polyethylene glycol*), *etanol* dan *isopropanol*.

Langkah terakhir setelah pencucian yaitu tahap pelarutan asam nukleat (Devi Kusumawati et al., 2023).

4.3 Metode Ekstraksi/Isolasi Asam Nukleat

Ekstraksi DNA termasuk langkah awal yang diperlukan dalam prosedur laboratorium untuk berbagai aplikasi molekuler. Metode fenol/kloroform/isoamil alkohol adalah metode yang sering digunakan untuk mengekstraksi/mengisolasi asam nukleat. Metode ini sangat berguna pada aplikasi PCR karena membantu menghilangkan inhibitor PCR yang ada dalam ekstrak.

Metode ini akan menciptakan lapisan air yang mengandung asam nukleat, lapisan fenol-air yang mengandung protein dan polimer penghambat pengendap (termasuk karbohidrat), dan lapisan kloroform-isoamil alkohol yang mengikat lemak. Setelah ekstraksi fenol ini, lapisan berair dipindahkan ke tabung mikrosentrifugasi steril dan natrium asetat 3 M, pH 5,2 ditambahkan untuk mengendapkan asam nukleat, diikuti dengan pencucian dengan etanol 100%, kemudian etanol 70% berfungsi untuk menghilangkan sisa fenol dan garam. Fenol/kloroform/isoamil alkohol sangat beracun dan limbahnya memerlukan perlakuan khusus sebelum dibuang (Saputri et al., 2023) (Pratiwi & Widodo, 2020).

4.4 Prosedur Ekstraksi DNA (*Deoxyribonucleic acid*) Metode Fenol- Kloroform

4.4.1 Bahan

- a. dH₂O
- b. Larutan NaCl 0.8%
- c. Larutan lisis terdiri dari 14 g NH₄Cl dan 0.144 g NH₄HCO₃ dibuat dalam 1 L air steril (dH₂O)
- d. Proteinase K

- e. 10% SDS
- f. STE pH 7,4, terdiri dari 2,92 g NaCl, 3,03 g basa Trizma. Siapkan 0,19 g EDTA dalam 500 ml air steril.
- g. TE terdiri dari 1,21 g basa Trizma; 0,37 g Na-EDTA dibuat dalam 900 ml. Larutan TE ini tidak diencerkan. Jika ingin mencapai pH 8, tambahkan 1N HCl tetes demi tetes ke dalam larutan TE hingga tercapai pH 8. Kemudian tambahkan air steril hingga menjadi 1L. Lakukan hal yang sama dan capai pH 7,6 dalam jam.
- h. TE-Saturated Phenol pH 8 dengan penambahan 0.1% 8- hydroxyquinoline
- i. Kloroform
- j. 99.5% etanol
- k. 3 M Na-Asetat
- l. 70% etanol

4.4.2 Prosedur

- a. Cell Lysis.
- b. Darah (sekitar 2 ml) disentrifus pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.
- c. Tiga lapisan akan terbentuk (serum, *Buffy coat* dan eritrosit/RBC).
- d. Serum dibuang (jika dibutuhkan, simpan di tabung lain).
- e. Tambahkan larutan salin untuk mencuci pelet dan sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C (atau suhu kamar). Buang lapisan atas (supernatan) dan pindahkan *buffy coat* ke tabung baru (microtube 1,5 mL).
- f. Ulangi langkah 4 dan 5 untuk mendapatkan *buffy coat* (sel darah putih) dalam jumlah besar. Tambahkan *lysing solution* (volume maksimum) ke dalam tabung *buffy coat*, kocok dan aduk rata selama 5 menit. Kemudian disentrifugasi selama 5

- menit dengan kecepatan 15.000 rpm pada suhu 4°C.
- g. Ulangi langkah 7 sebanyak tiga kali untuk memastikan tidak ada sel darah merah yang tersisa (hanya *buffy coat*).
 - h. Tambahkan 400 mL STE, campur dengan baik hingga sel darah putih terlarut sempurna.
 - i. Tambahkan 20 µL 10% SDS, campur dengan baik. Tambahkan 4 µL proteinase K, dan campur dengan baik (kocok pelan-pelan, jangan berbuih).
 - j. Biarkan semalaman pada 37°C atau simpan pada inkubator suhu 60°C untuk 1-2 jam (Adhiyanto et al., 2020).
- Reaksi Fenol- Kloroform
 - a. Tambahkan 400 µL TE-saturated phenol, kocok perlahan-lahan selama 5 menit.
 - b. Centrifuge dengan kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu kamar.
 - c. Tiga lapisan terlihat: lapisan atas (DNA), lapisan tengah (protein terdegradasi), dan lapisan bawah (fenol).
 - d. Dengan menggunakan pipet penetes, pindahkan lapisan atas (DNA) ke mikrotube 1,5 mL yang baru.
 - e. Tambahkan 400 ml kloroform dingin, aduk rata (bolak-balik) selama 5 menit, dan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit. (Kloroform dapat menghilangkan atau menetralkan fenol. Fenol mendenaturasi protein enzim yang digunakan dalam tahap PCR atau analisis lainnya dan harus dihilangkan).
 - f. Pindahkan lapisan atas (DNA, kira-kira 400 ml) larutan 1,5 ml ke dalam tabung mikro.
 - g. Ulangi dua langkah sebelumnya sampai semua fenol hilang.

- h. Tambahkan 40 mL 3 M sodium asetat dan 1.0 mL ethanol 99.9 %.
- i. Campur dengan baik, dan DNA akan tampak
- j. Lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit.
- k. Buang supernatan etanol.
- l. Tambahkan 1 mL etanol 70% dan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit.
- m. Buang etanol sepenuhnya.
- n. DNA dapat dikeringkan menggunakan centrifuge vakum selama 5 menit hingga etanolnya hilang.
- o. Jika tidak memiliki centrifuge vakum, letakkan dalam blok inkubator pada suhu 60 °C hingga kering.
- p. Larutkan pelet DNA dalam larutan 100 µL TE (500) per 1 mL darah. Simpan pada suhu 4°C (Handayani & Putri, 2021) (Arini et al., 2021).

4.5 Prosedur Ekstraksi RNA (*Ribonucleic Acid*) Menggunakan TRIzol – Kloroform

4.5.1 Bahan

- a. Darah
- b. 10x RBC Reis buffer steril (89.9g NH₄Cl, 10 g KHCO₃, 2 mL 0.5 M EDTA dalam 1 L dengan pH 7.3), sebagai larutan stok.
- c. TRIzol
- d. PBS
- e. Isopropanol
- f. Etanol
- g. RNase- free water

4.5.2 Prosedur

- a. 1 mL ditambahkan ke 9 mL 1x buffer lisis sel darah merah. Balikkan dengan hati-hati dan diamkan pada suhu 4°C selama 10 menit.

- b. Centrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu kamar.
- c. Buang supernatan dengan hati-hati, perhatikan jangan sampai pelet ikut terbawa.
- d. Tambahkan 1x RBC yang telah dilisis ke dalam pelet dengan cara "pipet ke atas dan ke bawah atau aspirasi butirannya" sampai pelet larut dalam larutan RBC yang telah dilisiskan dan pindahkan ke dalam tabung sentrifugasi 2 mL.
- e. Centrifuge selama 5 menit pada 3000 rpm pada suhu 4 °C (sebaiknya).
- f. Buang supernatan, tambahkan 1 mL PBS, lakukan pemipetan dan ulangi sentrifugasi seperti langkah sebelumnya.
- g. Tambahkan 1200 µL TRIzol ke dalam tabung berisi dengan pipet untuk melarutkan pelet dalam TRIzol.
- h. Tambahkan 200 uL kloroform, vortex 10 detik, kemudian sentrifuse pada kecepatan 13000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.
- i. Ada tiga lapisan larutan di dalam tabung, yaitu lapisan transparan teratas, lapisan tengah berwarna putih tipis dan lapisan bawah berwarna merah muda. RNA terdapat pada lapisan transparan atas, lapisan putih tengah (interface), dan protein terdapat pada lapisan bawah.
- j. Keluarkan lapisan bening atas dengan hati-hati tanpa menghilangkan lapisan putih dan merah muda. Lalu, pindahkan ke tabung steril baru yang bersih.
- k. Tambahkan 500 µL larutan *isopropanol* dingin dan pipet atau kocok. *Isopropanol* akan mengendapkan RNA. Tunggu selama 10 menit.
- l. Simpan sampel pada suhu -20°C jika tidak digunakan.
- m. Centrifuge selama 10 menit pada 13.000 rpm pada suhu 4 °C. Buang supernatannya.

- n. Buang supernatan dengan hati-hati, berhati-hatilah agar pelet putih tidak ikut terbawa. Selanjutnya ditambahkan 500 μL etanol 75% dingin.
- o. Centrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4 °C.
- p. Buang supernatan, keringkan tabung jangan sampai ada etanol sisa.
- q. Tambahkan 30 μL air bebas RNA ke dalam tabung dan diamkan selama 2 jam sampai terlarut.
- r. RNA diperoleh dan simpan pada suhu -20°C.

Metode lain yang dapat dilakukan ialah kombinasi TRIzol dan kit isolasi PCR menggunakan *Direct-zol RNA Miniprep Plus* dari Zymo Research. Kombinasi ini dapat mengurangi waktu kerja dan memudahkan implementasi (Adhiyanto et al., 2020).

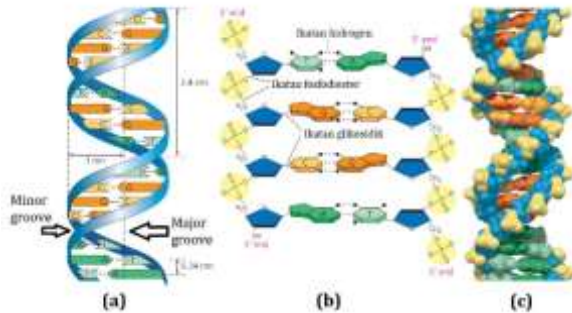
BAB 5

KUALITAS ISOLAT ASAM NUKLEAT

5.1 Pengertian Asam Nukleat

Asam nukleat pada umumnya disebut dengan materi genetik yaitu berupa DNA (*Deoxyribonukleic Acid*), pada beberapa jenis virus dapat berupa RNA (*ribonucleic acid*). DNA dan RNA disebut sebagai materi genetik, sebab materi ini diturunkan kepada sel anaknya (Wu et al., 2020). Materi genetik berperan penting sebagai pusat komando sel. Materi genetik berisi kode untuk pembentukan semua enzim, hormon, dan protein yang dibutuhkan organisme, sehingga biasa disebut sebagai “*blue print*” sel (Thomy & Harnelly, 2018).

DNA merupakan untai ganda asam nukleat, dimana basa dari satu untai komplementer dari basa untai lainnya. Monomer asam nukleat adalah nukleotida. Setiap nukleotida DNA terdiri dari 3 bagian, yakni: basa nitrogen, gula pentosa, dan gugus fosfat (Suhartono et al., 2022). Basa nitrogen DNA ada 4 macam, yaitu: adenin (A), guanin (G), timin (T), dan sitosin (C). Adenin dan guanin disebut purin, sedangkan timin dan sitosin disebut pirimidin. Ukuran purin lebih besar dibandingkan pirimidin, karena biasanya memiliki cincin ganda. Penamaan suatu nukleotida diambil dari jenis basa yang dimilikinya (Aisyah et al., 2019).



Gambar 5. 1. (a) DNA double helix, (b) Struktur kimia DNA, (c) Model 3D DNA

Sumber Aisyah., et al (2019)

RNA tersusun oleh monomer seperti gula *ribosa*, *fosfat*, dan *basa nitrogen purin* dan *pirimidin*. Perbedaannya adalah basa timin pada DNA diganti menjadi urasil, yaitu molekul timin tanpa gugus metil. Gugus gula ribosa dengan dengan hidroksil ada posisi 2' berbeda dengan gugus gula deoksitibosa pada DNA, sehingga RNA adalah polimer linier untai tunggal.

Ikatan fosfodiester terbentuk antara atom karbon 3' ribosa di suatu nukleotida dengan karbon 5' ribosa di nukleotida berikutnya. Karena bentuknya yang linier tunggal, aturan pasangan AC dan GU tidak berlaku untuk semua bagian RNA. Walaupun RNA bukan untai ganda, pada beberapa lokasinya, rantai RNA dapat membentuk struktur sekunder yang disebabkan terbentuk pasangan basa pada untai yang sama. RNA, seperti DNA beruntai ganda, dapat membentuk struktur tiga dimensi yang lebih kompleks dengan melipat dan membentuk pasangan antara AU dan GC. Sifat ini memungkinkan beberapa RNA memiliki fungsi katalitik (seperti enzim) (Pusptaningrum et al., 2018). RNA dengan struktur yang mirip untai ganda dapat ditemukan pada genom beberapa virus.

5.1.1 Perbedaan DNA dan RNA

- a. DNA memiliki bentuk molekul berupa heliks ganda, sedangkan molekul RNA berbentuk untai tunggal yang terlipat, mirip dengan untai ganda. Sekarang telah diketahui bahwa beberapa DNA berbentuk untai tunggal dan RNA memiliki bentuk untai ganda, namun tidak terlalu sering. Pada beberapa virus tumbuhan, RNA terdiri dari *pitadouble* akan tetapi tidak dipelintir menjadi heliks.
- b. Molekul RNA memiliki komposisi kimia berupa *polimer nukleotida*. RNA dan DNA memiliki perbedaan, dimana gula yang menyusunnya DNA adalah *ribosa*, bukan *deoksiribosa*. Urasil adalah basa pirimidin yang menyusun RNA.
- c. RNA memiliki kandungan basa adenin, guanin, dan sitosin. RNA tidak mengandung mengandung urasil. Kandungan guanin tidak harus sama dengan jumlah sitosin pada molekul RNA dan jumlah adenin tidak harus sama dengan jumlah urasil.

5.2 Tujuan dan Prinsip Isolasi Asam Nukleat

Isolasi DNA memiliki tujuan utama yaitu memisahkan DNA dari zat lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Hasil ekstraksi berupa DNA berkualitas tinggi merupakan syarat mendasar yang harus dipenuhi dalam penelitian molekuler. Isolasi DNA terdiri dari tiga prinsip, diantaranya: *lysis* sel, ekstraksi sel, serta *presipitasi* (Yudianto, 2019).

Prinsip dasar isolasi DNA adalah upaya untuk membebaskan materi genetik dari asosiasi protein histon pada dinding sel dan khususnya pada inti sel, dengan kerusakan mekanis dan fisik sesedikit mungkin pada materi genetik. Kekuatan hasil isolasi DNA harus lebih besar dari 25 mg, karena amplifikasi lebih lanjut dengan penanda genetik menggunakan PCR memerlukan minimal 25 mg (Hafy et al., 2018).

Hal ini disebabkan oleh gerakan fisik berlebihan yang dapat terjadi selama proses pemipetan, proses pemutaran di dalam Eppendorf atau centrifuge, atau adanya aktivitas bahan kimia tertentu. Pengeringan alkohol yang tidak sempurna juga dapat mengakibatkan kontaminasi, yang dapat mempengaruhi perhitungan DNA dengan spektrofotometer (Putri & Junitha, 2015).

5.3 Isolasi Asam Nukleat

Isolasi asam nukleat merupakan tahap pemisahan asam nukleat pada sel dengan berbagai cara, termasuk menghancurkan sel tanpa merusak DNA. *Buffer ekstraksi* menyebabkan kerusakan sel dan menghambat enzim RNase dan DNase. Dalam pengujian PCR, kemurnian sangat penting saat mengisolasi asam nukleat untuk mendapatkan hasil identifikasi yang akurat (Jauhani et al., 2020).

Proses isolasi asam nukleat umumnya terdiri dari empat langkah: pelepasan asam nukleat dari sel, *denaturasi kompleks nukleoprotein*, penghambatan proses enzim RNase dan DNase, dan isolasi asam nukleat. Langkah-langkah dalam isolasi asam nukleat sangat dipengaruhi oleh sumber asam nukleat seluler atau jaringan. Langkah pertama dan kedua isolasi asam nukleat terdiri dari pelepasan asam nukleat dari sel melalui gangguan mekanis. *Mortar* dan *pistil* yang menggunakan nitrogen cair digunakan untuk menghancurkannya. Tahap kedua dan ketiga merupakan tahap *denaturasi kompleks nukleoprotein* yang diolah dengan berbagai bahan kimia seperti SDS (*Sodiumdodecyl Sulphate*), Tween, HCl, Triton, EDTA (*Ethylene Diamine Tetraaceticacid*), dan penol: kloroform dan enzim DNase digunakan: *Isoamyl alkohol* dan *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB). Langkah keempat adalah memisahkan asam nukleat yang dihasilkan dari kontaminan (protein, karbohidrat, lemak) untuk selanjutnya dianalisis atau dimodifikasi menggunakan teknik biologi molekuler yaitu PCR.

Metode pertama isolasi asam nukleat dikenal dengan metode konvensional yang terdiri atas beberapa bahan kimia yang jumlah serta konsentrasinya ditentukan berdasarkan target spesifik yang dikembangkan oleh para peneliti. Isolasi asam nukleat dengan metode ini sangat kompleks dan memerlukan waktu yang cukup lama. Dalam mengembangkan metode isolasi, bahan siap pakai digunakan dan kolom filter ditambahkan untuk memisahkan senyawa yang tidak terpakai dari asam nukleat. Metode pemisahan ini disebut metode kit, dan produk yang dikomersialkan bergantung pada target pemisahan, seperti DNA, RNA, dan protein.

Perkembangan metode kit yang berbentuk lembaran kertas membran berfungsi untuk memisahkan asam nukleat yaitu *FTA-card Whatman*. Prinsip isolasi RNA hampir sama dengan DNA, pada RNA prosesnya harus menghindari enzim RNase yang dapat mendenaturasi RNA, diperlukan penambahan DNase untuk menghilangkan DNA, dan mRNA. Perbedaannya adalah isolasi gen target yang mengandung RNA tersebut. gen target harus tercapai di antaranya mRNA (Jayanti & Mushlih, 2021).

Hal-hal yang perlu diperhatikan untuk memperoleh isolat DNA dari sebuah spesimen, antara lain:

- Pemecahan dinding sel – sel atau jaringan yang akan diisolasi DNA-nya, seperti sel – sel darah merah, kultur sel bakteri dan jaringan hewan maupun tanaman. Pemecahan dinding bakteri dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu:
- Debris sel dipisahkan dari larutan DNA.
- Presipitasi RNA dan protein untuk peroleh DNA murni.
- Presipitasi DNA dengan etanol dingin.
- Bahan kimia seperti fenol, kloroform, isopropanol, dan isoamil alkohol digunakan untuk memurnikan DNA dari ekstrak sel.

- Pemurniaan DNA dari kontaminan protein digunakan enzim protase yaitu pronase atau proteinase-K dan kontaminan RNA dengan menggunakan Rnase.
- Pemisahan DNA dari molekul RNA dan protein dapat dilakukan dengan menggunakan densitas gradien sentrifugasi cesium chlorida (CsCl).
- Presipitasi akhir DNA dapat dilakukan dengan menggunakan etanol dingin dibawah kondisi ionik yang kuat dan dicuci dengan etanol 70%.
- Pelet DNA dilarutkan dengan buffer TE atau ddH2O steril.

5.4 Isolasi dan Pemurnian DNA (Genom) Manusia

Isolasi dan pemurnian DNA manusia bertujuan untuk mengisolasi dan memurnikan genom manusia dalam jumlah besar. Secara sederhana dan tidak korosif sumber yang dapat digunakan ialah usap mulut yang diambil dari air liur atau bagian dalam pipi (Mushlih, 2019). Konsentrasi DNA di dalam sel rendah, dengan 90% DNA sebagian besar terletak di inti sel. Karena DNA ada dalam jumlah yang sangat kecil, diperlukan keahlian untuk memisahkannya dari komponen seluler lainnya. Ada banyak cara untuk memurnikan DNA atau memurnikannya bersama komponen lain seperti protein. Namun, semua tahapan mempunyai prinsip dasar yang sama, yaitu:

5.4.1 Menghancurkan Sel

Sel dapat dihancurkan atau dihancurkan dengan teknik sonikasi, penghancuran, pencacahan, atau tekanan tinggi. Namun, dalam proses ini, jika metodenya salah, DNA sering kali terfragmentasi menjadi potongan-potongan kecil sehingga mengurangi kemurnian DNA. Langkah terbaik yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan teknik enzimatik.

5.4.2 Membuang Protein

Menghilangkan seluruh bahan atau komponen protein disebut juga dengan *deproteinasi*. Prinsip dasar *deproteinasi* adalah menghilangkan bahan terlarut dari protein dan mengendapkan protein sedangkan asam nukleat akan tetap larut. Pelarut organik yang dapat digunakan untuk mengendapkan protein antara lain fenol dan kloroform.

Fenol berbentuk kristal pada suhu kamar, tetapi dengan adanya 20% air, fenol membentuk suspensi berair yang mengandung misel fenol yang dikelilingi oleh molekul air. Larutan yang mengandung protein terlarut dicampur dengan fenol yang lebih hidrofobik, yang berdifusi ke dalam inti protein. Protein yang dimodifikasi oleh gugus hidrofobik yang terbuka dan dikelilingi oleh misel fenolik jauh lebih larut dalam fase fenolik dibandingkan dalam fase air. Akibatnya, protein bermigrasi ke fase fenolik dan asam nukleat tetap berada dalam fase air.

Gugus hidrofobik tidak ditemukan pada asam nukleat dan tidak dapat larut dalam fase fenolik. Metode kloroform digunakan karena kloroform tidak larut dalam air, sehingga mencegah hilangnya DNA ke fase organik. Namun, *deproteinisasi* sangat bergantung pada pembentukan daerah interfase yang besar dan oleh karena itu memerlukan pengocokan yang kuat. Metode ini hanya cocok jika memperoleh DNA (biasanya DNA virus) dengan ukuran total 20.000 hingga 50.000 pasangan basa. Kekurangan dari metode fenol dan metode kloroform adalah menghasilkan limbah dalam jumlah besar dan memerlukan pengolahan limbah khusus karena toksisitasnya yang tinggi.

Metode lain selain metode kloroform ialah metode enzim. *Enzim protease* berfungsi untuk menghilangkan protein dari larutan sampel genom.

Enzim protease berperan dalam memecah atau mencerna semua protein. *proteinase K* dan *pronase* adalah dua enzim yang umum digunakan. Enzim ini aktif didalam larutan yang mengandung sejumlah kecil *surfaktan anionik*, garam EDTA konsentrasi tinggi, pH 6–10, dan suhu 50–60 °C. Satu-satunya perbedaan antara kedua enzim ini adalah bahwa pronase dapat dicerna sendiri dan oleh karena itu harus ditambahkan terus-menerus selama proses tersebut. Selain metode yang menggunakan enzim, metode yang menggunakan asam juga dapat digunakan. Prinsip dasar metode asam adalah mengentalkan protein dengan menambahkan larutan asam seperti cuka, sehingga memudahkan pengendapan protein.

5.4.3 Membuang RNA

Langkah penghilangan RNA pada proses isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode enzimatik. Namun meskipun tidak seluruh RNA hilang, sejumlah kecil RNA masih terdeteksi selama proses pemurnian DNA. RNase A dan RNase T1 adalah enzim yang digunakan pada tahap penghilangan RNA. Mekanisme kedua enzim ini berdasarkan posisi pada proses pembelahan basa nukleotida (urasil, sitosin, dan guanin).

5.4.4 Memekatkan DNA

Deproteinisasi adalah langkah awal dari deposisi dan konsentrasi DNA yang menggunakan campuran fenol, kloroform, dan alkohol. Alkohol memiliki prinsip pengendapan yang didasarkan oleh kemampuannya mengurangi kelarutan asam nukleat dalam air. Molekul air polar yang mengelilingi molekul DNA mempengaruhi kelarutan DNA. Etanol mengubah potensi ionik DNA, menghilangkan molekul air yang berinteraksi dengan DNA, dan

mengendapkan DNA. Menambahkan 95% etanol ke larutan sampel DNA akan menarik air dan molekul DNA serta mengendapkan DNA.

Penggunaan etanol murni 95% atau 100% mempunyai implikasi finansial. Untuk alasan ini, etanol digunakan dalam konsentrasi rendah. Penambahan larutan garam ke dalam larutan DNA berfungsi sebagai penetral muatan fosfat pada DNA, sehingga interaksi antara air-DNA akan menghilangkan. Natrium atau amonium adalah senyawa air garam yang umum sering digunakan.

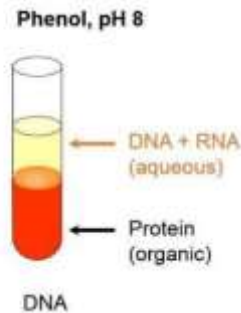
Perlu diperhatikan bahwa penghilangan zat garam yang tidak sempurna pada larutan DNA dapat mempengaruhi pada tahap PCR, karena senyawa garam akan mengganggu proses pada enzimatis. Untuk mendapatkan DNA murni, sangat direkomendasikan penggunaan *amonium asetat* yang memiliki kelarutan tinggi dalam etanol. Setelah larutan DNA mengendap, penambahan etanol 70% akan dengan mudah melarutkan garam amonium. Untuk menghilangkan kandungan etanol pada DNA, pemanasan hingga suhu 60°C akan menguapkan etanol dengan mudah dan cepat (Pusptaningrum et al., 2018).

5.5 Isolasi Genom dari Saliva

Teknik sederhana dan mudah dilakukan adalah salah satunya isolasi genom dari air liur. Bahan serta alat yang diperlukan seperti air liur, tabung reaksi 30 mL, etanol, buffer saline, buffer lysis solution, PCI, ammonium acetate, serta centrifuge dan tabung. Alur kerja untuk mengisolasi genom dari air liur adalah sebagai berikut:

1. Berkumurlah dengan 10 ml saline (*buffer saline*) selama 60 detik.

2. Ludahkan atau Keluarkan ke dalam tabung centrifuge 25 mL dan ulangi prosesnya dua kali.
3. Selanjutnya tabung disentrifugasi dengan kecepatan maksimal (5000 rpm) selama 20 menit. Direkomendasikan menggunakan centrifuge dingin.
4. Berhati-hatilah saat membuang supernatan. Hati-hati jangan sampai pelet sel keluar dari tabung.
5. Tambahkan 1 mL buffer lisis yang terdiri dari campuran 0,5% SDS, 0,1 MEDTA, dan 10 mM Tris-HCl.
6. Tambahkan 50 μ L Proteinase K dan kocok perlahan. Jangan mengaduk sampai pelet terpisah dari dinding tabung. Kemudian diinkubasi selama 3 jam pada suhu 56°C atau dibiarkan semalaman pada suhu kamar.
7. Setelah 3 jam atau setelah didiamkan semalaman, tambahkan larutan PCI (fenol-80H-TE) dengan perbandingan volume yang sama. Kocok kuat-kuat selama 30 detik dan sentrifugasi dengan kecepatan maksimum selama 10 menit.



Gambar 5. 2. Hasil sentifugasi isolasi DNA pada pemisahan *fenol*

8. Lepaskan lapisan atas dan pindahkan ke tabung baru yang berisi kloroform dalam jumlah yang sama. Lakukan sentrifugasi dengan kecepatan maksimal selama 10 menit. kloroform berfungsi untuk menghilangkan fenol dari sampel.

9. Tambahkan setengah volume amonium asetat sebanyak 1 ml dan balikkan tabung sebanyak 10 kali.
10. Tambahkan etanol 95% dingin sebanyak dua kali lipat dari larutan sebelumnya. Misalnya volume total DNA dan amonium asetat adalah 3 ml, dilanjutkan dengan penambahan 6 ml etanol. Balikkan untaian DNA secara perlahan hingga mengembang. Ambil untai DNA dengan hati-hati menggunakan batang kaca dan pindahkan ke dalam tabung berisi 3 mL etanol 70% dingin.
11. Centrifuge dengan kecepatan maksimum selama 5 menit. DNA akan mengendap sebagai lapisan putih atau butiran di bagian bawah tabung.
12. Buang etanol dengan hati-hati, keluarkan sebanyak mungkin, dan keringkan tabung tanpa tutup dalam oven pada suhu 70°C.
13. Setelah kering, larutkan pelet DNA dalam 100 μ L buffer TE (Tris EDTA). Biarkan pada suhu 4 °C semalaman hingga -14 larut.
14. Untuk memverifikasi keberhasilan pengujian, kemurnian dan konsentrasi DNA dapat dihitung menggunakan uji elektroforesis dan nanodrop (Pusptaningrum et al., 2018).

5.6 Pengukuran Kemurnian Asam Nukleat

konsentrasi DNA atau RNA dapat diukur secara sederhana dengan gel sampai modern dengan menggunakan nanodrop, gel elektroforesis, dan teknologi chip seperti Bioanalyzer 2100 (*Agilent Technologies*, USA) dan *Experion* (Bio-Rad Laboratories, USA). Dalam mengukur kuantitas asam nukleat diperlukan alat UV/VIS spektrofotometer berupa cahaya UV/VIS yang ditembakkan ke contoh. Penghitungan konsentrasi (ng μ L⁻¹) pada contoh sebanding dengan cahaya UV/VIS yang diserap oleh contoh. Besaran serapan cahaya UV/VIS tergantung dari ukuran panjang gelombang cahaya yang diterima dari target contoh. Panjang gelombang dengan ukuran 240 nm mampu diserap oleh kontaminan, 260 nm untuk asam nukleat, 280 nm untuk

protein dan 320 nm kemungkinan kontaminan juga (Suhaemi et al., 2022).

Hasil isolasi DNA dikatakan murni jika rasio absorbansinya berada pada kisaran 1,8 – 2,0. Nilai kemurnian DNA dihitung dengan cara nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Apabila DNA terkontaminasi protein dan polisakarida, nilai absorbansinya kurang dari 1,8 dan apabila DNA terkontaminasi RNAmaka nilai absorbansinya lebih dari 2,0 (Ariyanti & Sianturi, 2019).

Pada Spektrofotometer UV-Vis memiliki kemurniaan DNA yang rendah dapat disebabkan oleh sampel yang digunakan saat pengukuran kurang homogen. Hal ini karena prinsip dasar spektrofotometri yaitu sampel harus jernih dan larut sempurna. Kemurnian DNA yang rendah juga dapat diakibatkan penggunaan kuvet yang tidak jernih yang akan mempengaruhi absorbansi sinar UV pada Spektrofotometer. Kuvet harus terbuat dari bahan yang tidak dapat menyerap radiasi, terutama pada bagian yang dilewatkan sinar UV. Umumnya kuvet terbuat dari kaca yang tembus sinar namun terdapat juga kuvet yang terbuat dari plastik. Kuvet yang terbuat dari kaca lebih baik untuk digunakan pada Spektrofotometer UV-Vis karena kuvet yang terbuat dari bahan kaca silikat dapat menyerap sinar ultraviolet (Kuo et al., 2019).

Spektrofotometer merupakan metode yang digunakan dalam mengukur jumlah zat kimia yakni mengukur jumlah cahaya yang diserap oleh larutan sampel. Cahaya yang lewat disebut dengan berkas cahaya. Cahaya akan melewati panjang gelombang tertentu (λ). Spektrofotometer menghasilkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu, sedangkan fotometer adalah alat untuk mengukur intensitas cahaya yang diserap. Secara analisis kuantitatif spektrofotometri sering digunakan pada bidang kimia, fisika, biokimia, teknik material, teknik kimia, dan klinis (Tang et al., 2020).

BAB 6

PEMERIKSAAN TEKNIK PCR

6.1 Pemeriksaan PCR

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu metode pemeriksaan yang prinsip kerjanya memperbanyak (*amplification*) DNA invitro secara enzimatik. Teknik PCR telah dikembangkan untuk diagnosis berbagai penyakit infeksi, seperti Hepatitis, HIV, *Human Papillomavirus*, dan untuk mendeteksi *M. Tuberculosis*

6.2 Tahap-tahap PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Proses PCR terdiri dari tiga langkah: denaturasi DNA templat, penempelan (*annealing*) primer, dan polimerisasi (*extension*) rantai DNA. Denaturasi adalah proses pemisahan untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal DNA dengan cara pemanasan beberapa kali sebentar pada suhu 90°C. Ini berfungsi sebagai templat, tempat pengikatan primer, dan tempat kerja DNA polimerase. Protokol dijalankan pada suhu 95 °C. Berikut penjelasan singkat setiap siklus reaksi PCR, antara lain:

6.2.1 Denaturasi

Pada proses denaturasi, DNA untai ganda akan terurai menjadi dua untai tunggal. Hal ini karena ikatan hidrogen antara basa komplementer terputus pada suhu denaturasi yang tinggi. Tidak semua reaksi enzimatik terjadi pada tahap ini. Tahap denaturasi pada siklus sebelumnya biasanya dilakukan pada suhu 90/95°C.

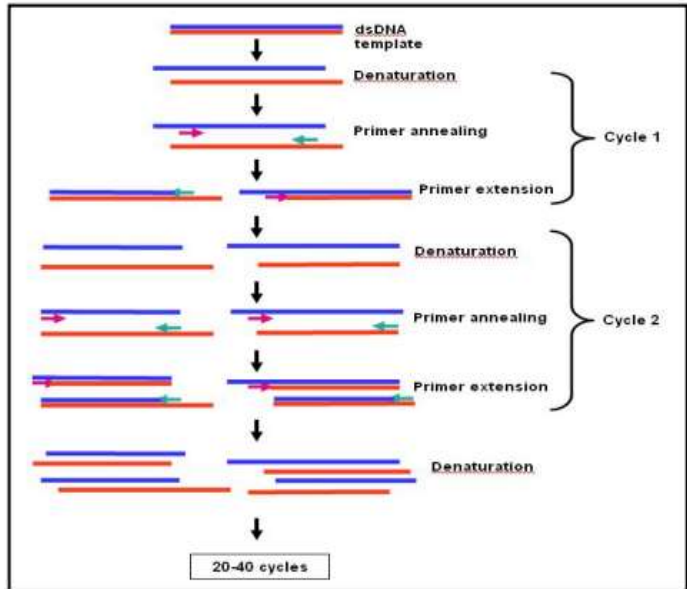
6.2.2 Penempelan Primer

Langkah penempelan primer (*annealing*), primer berpindah ke daerah tertentu yang melengkapi rangkaian primer. Proses *annealing* ini membentuk ikatan hidrogen antara primer dan rangkaian komplementer pada template. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu antara 500°C dan 600°C. Kemudian, ketika DNA polimerase berikatan, ikatan hidrogen menjadi sangat kuat sehingga tidak dapat diputus lagi saat reaksi polimerisasi berikutnya dilakukan (misalnya pada suhu 720 °C).

6.2.3 Reaksi Polimerisasi (*extension*)

extension akan terjadi pada suhu 720°C. Primer yang menempel diperpanjang pada ujung 3'nya oleh DNA polimerase dengan menambahkan dNTP komplementer ke cetakan. Ketika siklus ini berulang, daerah yang dikelilingi oleh dua primer diperkuat secara eksponensial (dalam bentuk untaian ganda yang disebut ampikon), mencapai nomor salinan yang dapat didefinisikan sebagai $(2n)^x$.

Dimana n adalah jumlah siklus dan x adalah jumlah awal molekul DNA. Oleh karena itu, jika terdapat satu salinan DNA sebelum siklus dimulai, setelah satu siklus akan terdapat dua salinan, dan setelah dua siklus akan terdapat empat salinan. Setelah 3 siklus ada 8 copy. Oleh karena itu, perubahan akan bersifat *eksponensial*. PCR menggunakan enzim DNA polimerase Taq pada akhir setiap siklus menambahkan nukleotida A ke ujung 3' dari fragmen DNA yang dihasilkan. Oleh karena itu, produk PCR ini nantinya dapat diklon menggunakan vektor dengan nukleotida T yang melekat pada ujung 5'-nya. Proses PCR dilakukan dengan menggunakan alat yang disebut *thermocycler*.



Gambar 6. 1. Siklus reaksi PCR

6.2.4 Pra-Denaturasi

Waktu yang dibutuhkan pada proses pra-denaturasi yaitu selama 1-9 menit pada tahap awal reaksi untuk memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktifasi DNA *Polymerase* (jenis hot-start alias baru aktif kalau dipanaskan terlebih dahulu).

6.2.5 Final Elongasi

Final Elongasi terjadi pada suhu optimum enzim sekitar 70-72°C selama 5-15 menit untuk memastikan bahwa setiap utas tunggal yang tersisa sudah diperpanjang secara sempurna. Proses ini dilakukan setelah siklus PCR terakhir.

6.3 Komponen PCR

6.3.1 DNA cetakan

Fragmen DNA yang akan dijadikan cetakan untuk menggandakan DNA biasanya berukuran pendek, kurang dari 1.000 pasang basa (bp). Hasil amplifikasi yang efisien antara 100 – 400 bp. DNA cetakan sebaiknya murni, untuk menghasilkan amplikon (hasil amplifikasi DNA) yang murni. Suspensi DNA yang tidak murni akan mempengaruhi reaksi *amplifikasi* dan dapat menghambat kerja enzim DNA *polimerase*.

6.3.2 Primer

Primer adalah *oligonukleotida* rantai pendek yang terbuat secara sintetik, umumnya memiliki 15-32 pasang basa. Primer harus mampu mengenali urutan DNA cetakan yang akan diamplifikasi. Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam perancangan primer oligonukleotida antara lain adalah :

- a. GC primer yang terkandung sebesar 45-60%, dimana ujung 3' harus terdiri dari basa G atau C.
- b. Hindari susunan tiga basa secara berturut – turut yang terdiri dari G atau C pada ujung primer, misalnya CCG, CCC, GCG, GGG atau GCC,
- c. Urutan basa sepanjang primer tidak boleh saling komplementer sehingga akan membentuk dimer atau membentuk ikatan seperti jepitan rambut (*hairpins*).
- d. Hindari merancang suatu primer pada daerah repetitif.
- e. Pemilihan suhu annealing yang tepat. Penentuan suhu annealing primer oligonukleotida (T_m = *melting temperature*)

berdasarkan formula : $T_m = [(jumlah\ A+T) \times 2^{\circ}C] + [(jumlah\ C+G) \times 4^{\circ}C]$

6.3.3 DNA Polymerase

Pada PCR enzim yang digunakan adalah enzim DNA polimerase termostabil yang disebut *TaqDNA polymerase* yang berasal dari isolasi bakteri sumber air panas *Thermus Aquaticus*. Enzim *Taq* DNA polimerase tetap aktif pada suhu $100^{\circ}C$, dengan aktifitas optimal pada suhu $92-95^{\circ}C$. Selain itu, enzim DNA polimerase termostabil lainnya, yang disebut *Vent DNA polymerase*, diisolasi dari bakteri yang hidup di turbin kapal selam.

Aktivitas enzim DNA polimerase ini mengkatalisis polimerisasi DNA berlangsung dari ujung $5'$ ke ujung $3'$ dan memiliki waktu paruh sekitar 40 menit pada suhu $95^{\circ}C$. Biasanya untuk setiap $100\ \mu L$ reaksi PCR ditambahkan 2,0 – 2,5 ungu *Taq DNA polymerase*.

6.3.4 Larutan buffer

Larutan buffer untuk reaksi PCR terdiri atas 50mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8,3) dan 1,5 mM $MgCl_2$. Konsentrasi ion Magnesium dalam larutan buffer merupakan faktor yang sangat menentukan proses denaturasi, penempelan primer, aktivitas enzim, ketelitian reaksi, dan spesifisitas produk PCR.

6.3.5 Deoksi ribonukleotida trifosfat (dNTPs)

Konsentrasi nukleotida yang terdiri dari dATP, dTTP, dCTP, dan dGTP akan memberikan spesifisitas yang tinggi pada hasil reaksi. Konsentrasi masing-masing dNTP adalah $200\ \mu M$, pada pH 7,0. Bila konsentrasi terlalu tinggi akan menimbulkan ketidakseimbangan dengan DNA polimerase. Sedangkan bila konsentrasi terlalu

rendah dapat mempengaruhi ketepatan dan ketelitian hasil amplifikasi DNA.

6.3.6 *PCR gene cycle*

PCR gene cycle pertama kali dikembangkan oleh perusahaan PerlinElmen sebagai pemegang paten asli. Pada saat ini telah dikembangkan dan diproduksi berbagai macam alat *PCR gene cycle* dari berbagai perusahaan yang bergerak di bidang bioteknologi. Alat ini secara meregulasi suhu dan siklus waktu yang dibutuhkan untuk reproduktibilitas dan keakuratan reaksi *amplifikasi*.

6.4 Deteksi PCR dengan Elektroforesis

Elektroforesis adalah alat yang menggunakan teknik dalam memisahkan molekul sel berdasarkan ukurannya. Medan listrik diterapkan pada media yang berisi sampel yang akan dipisahkan. Teknik ini dengan memanfaatkan muatan yang ada pada makromolekul bermuatan negatif seperti DNA. Ketika molekul bermuatan negatif melewati media seperti gel agarosa, arus mengalir dari satu kutub ke kutub yang bermuatan berlawanan, menggerakkan molekul dari kutub negatif ke kutub positif. Kecepatan pergerakan suatu molekul ditentukan oleh rasio massa terhadap muatan dan bentuk molekul.

Teknik elektroforesis dapat digunakan untuk menganalisis DNA, RNA, dan protein. Elektroforesis DNA digunakan, misalnya, untuk menganalisis fragmen DNA yang dihasilkan ketika dipotong dengan enzim restriksi. Fragmentasi molekul DNA yang telah dipotong menjadi fragmen dapat diukur dengan membuat gel agarosa, suatu zat semi padat berupa polisakarida yang diekstrak dari rumput laut.

Gel agarosa dibuat dengan melarutkannya dalam larutan buffer. Untuk memastikan pelarutan yang tepat, pemanasan dalam oven microwave akan mempercepat pelarutan. Saat gel panas, gel akan berubah menjadi cair dan lebih mudah dituangkan ke dalam piring, biasanya terbuat dari *Plexiglas*. Sebelum gel mendingin dan mengeras, gunakan lembaran kaca plexiglass tipis berbentuk sisir untuk membuat lubang di tepi gel. Sisir dimasukkan ke salah satu ujung gel yang masih cair. Akibatnya gel mengeras dan muncul lubang kecil saat Anda melepas sisir. Sampel molekul DNA dimasukkan ke dalam lubang kecil ini.

Gel agarosa yang terbentuk ditempatkan dalam tangki yang berisi buffer yang sama yang digunakan untuk membuat gel. Misalnya, buffer dapat dibuat dengan Tris-acetate-EDTA (TAE) atau Tris-borate-EDTA (TBE). Setelah DNA dimasukkan ke dalam lubang sampel, arus listrik dialirkan. Kutub yang sejajar dengan lubang pada sampel DNA adalah kutub negatif, dan kutub lainnya adalah positif. Karena DNA bermuatan negatif, molekul DNA bergerak menuju kutub positif. Setelah beberapa waktu, rendam gel dalam larutan yang mengandung *etidium bromida*.

Etidium bromida menginterkalasi (menyisipkan) ke dalam DNA. *Etidium bromida* digunakan untuk memudahkan visualisasi karena memancarkan sinar ultraviolet. Ketika sinar UV disinari dari bawah gel, muncul gambar berbentuk pita pada gel. Pita-pita ini adalah molekul DNA yang bermigrasi sepanjang gel setelah elektroforesis. Molekul RNA dapat dianalisis dengan prinsip yang sama yaitu gel agarosa, namun dengan buffer yang berbeda yaitu buffer yang mengandung *formaldehida*.

BAB 7

ELEKTROFORESIS

7.1 Prinsip Dasar Elektroforesis

Elektroforesis berfungsi untuk mengetahui ukuran DNA menggunakan DNA marker yang sudah diketahui ukurannya. Maka prinsip dasar elektroforesis yakni jika molekul muatan negatif (DNA) dilewatkan melalui *gel agarosa* yang dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif, sehingga DNA dapat dipisahkan berdasarkan ukuran panjangnya (Sundari & Bambang Priadi, 2020).

Elektroforesis merupakan metode pemisahan yang berdasarkan perbedaan mobilitas analit yang terdeteksi dalam medan listrik yang diterapkan. Elektroforesis digunakan dalam memisahkan berbagai sampel, termasuk protein, asam nukleat, asam amino, dan karbohidrat (Siallagan Carolin Sonia, 2022).

7.2 Fungsi Elektroforesis

Fungsi elektroforesis diantaranya adalah sebagai berikut :

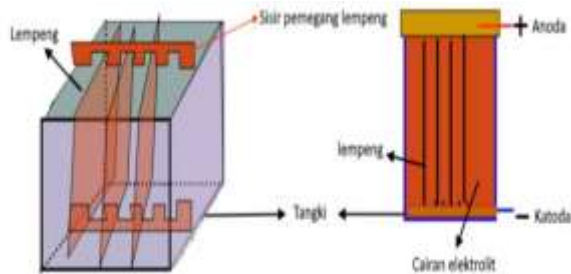
- 7.2.1 Memiliki informasi yang berkaitan dengan ukuran, konfirmasi, muatan protein dan asam nukleat.
- 7.2.2 Metode pemisahan yang digunakan untuk menentukan komponen dari protein atau asam nukleat setiap individu.
- 7.2.3 Pada bidang kepolisian atau forensik teknik ini digunakan dalam pemeriksaan DNA, karakteristik khusus, misalnya sidik jari sehingga membantu polisi dalam menangkap sebuah kasus.
- 7.2.4 Elektroforesis merupakan salah satu cara memvisualisasikan keberadaan DNA, *plasmid*, dan

produk PCR pada bidang biologi molekuler (Nuryady et al., 2020)

7.3 Jenis – jenis Elektroforesis

Elektroforesis zona dan elektroforesis batas bergerak. Keduanya diklasifikasi lebih lanjut. Dibawah ini merupakan jenis-jenis elektroforesis :

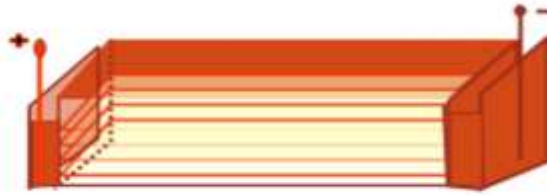
7.3.1 Lempeng Tegak



Gambar 7. 1. Elektroforesis Lempeng Tegak
Sumber Adhiyanto Chris (2020)

Elektroforesis dua arah seperti TLC digunakan pada campuran yang kompleks yaitu asam amino dari proteolisis selama ukurannya persegi, menganalisis hanya satu jenis ion (muatan positif atau negatif) untuk memfasilitasi arah pergerakan ion. Untuk meningkatkan pemisahan dalam *elektroforesis lapis tipis* (ELT), Anda dapat mengubah pH untuk menggantikan *media buffer*. Berbeda dengan TLC yang dimodifikasi, eluennya adalah polar atau nonpolar. Cara penempatan/penandaan sampel pada stand elektroforesis di bagian atas rak, karena sampel akan terpisah searah dengan kecepatan elektroforesis (Adhiyanto Chris, 2020).

7.3.2 Lempeng Mendatar



Gambar 7. 2. Elektroforesis Lempeng Mendatar

Sumber Rachmad Saputra, et al (2022)

Elektroforesis jenis ini merupakan metode pemisahan horizontal, selama jenis protein/senyawa yang dianalisis sama, maka pH elektrolit tidak diubah. Pelat elektroforesis dipakai untuk elektroforesis bertingkat. Dengan cara ini mobilitas setiap bongkahan bervariasi dalam kecepatan. Elektroforesis pelat horizontal mirip dengan elektroforesis vertikal dan elektroda dapat dipertukarkan (Rachmad Saputra et al., 2022).

7.3.3 Elektroforesis Tabung

Elektroforesis ini mirip dengan kromatografi kolom tetapi sampelnya miring. Operator elektroforesis dalam tabung atau intraseluler dapat digunakan untuk beberapa tabung sekaligus. U-tube (*Migrationlimited*) elektroforesis tabung dengan tangki dapat dipisahkan menggunakan puluhan tabung sekaligus, asalkan jenis protein atau senyawa yang dianalisis sama (Lestari et al., 2023).

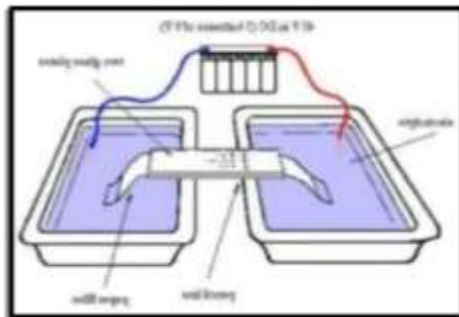


Gambar 7. 3. Elektroforesis Tabung

Sumber Lestari, et al (2023)

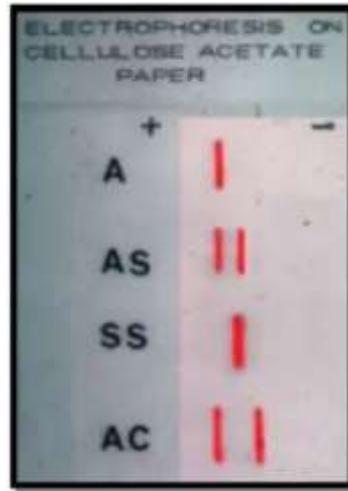
7.3.4 Elektroforesis dengan kertas

Elektroforesis kertas merupakan salah satu jenis elektroforesis yang terdiri dari kertas sebagai fasa diam dan partikel terlarut, terutama ion kompleks, sebagai fasa gerak. Pemisahan ini terjadi karena adanya gradien konsentrasi melintasi sistem pemisahan. Pergerakan partikel dalam kertas tergantung pada muatan atau valensi zat terlarut, luas wadah, tegangan yang digunakan, konsentrasi elektrolit, kekuatan ionik, pH, viskositas, dan kapasitas adsorpsi zat terlarut (Maliza et al., 2021).



Gambar 7. 4. Elektroforesis Kertas

Sumber Maliza, et al (2021)



Gambar 7. 5. Elektroforesis Kertas
Sumber Maliza, et al (2021)

7.4 Instrumen Elektroforesis

7.4.1 Instrumen elektroforesis kertas

Instrumen elektroforesis kertas terdiri dari :

- Kertas saring
- *Larutan buffer*
- Piring pendingin
- Sumbu
- Kantong
- Penyangga
- Elektroda
- Sumber listrik (Yusuf Muhammad, 2022).

7.4.2 Instrumen elektroforesis gel

Instrumen *elektroresis gel agarosa* terdiri dari :

- *Buffer elektroforesis* terdiri dari TAE mempunyai daya ionik sebagai penghantar listrik dalam larutan.

- *Loading dye* berfungsi sebagai pemberat untuk mencegah kebocoran dari sumur.
- *Etidium bromida* berfungsi dalam proses pewarnaan DNA dan disisipkan di antara basa nukleotida
- UV transiluminator memvisualisasikan pewarnaan DNA pada *gel agarosa*
- Aquades berperan sebagai pelarut
- Baki gel agarosa adalah cetakan agarosa
- Asam asetat glasial sebagai elektrolit garam
- EDTA sebagai pe-non aktif DNA
- TAE: *Trisbase* sebagai *buffer* sesuai dengan pH
- Sumur dalam *gel agarosa* menggunakan sisir elektroforesis untuk membuatnya
- Tangki elektroforesis untuk proses running DNA
- Homogenkan sampel DNA yang akan dibuat dikumpulkan menggunakan mikropipet dan *loading dye*
- Kertas *parafilm*
- Sarung tangan
- Sumber arus listrik

7.4.3 Instrumen elektroforesis kapiler

Menurut Effendi Mohammad Sofwan (2021), Instrumen elektroforesis kapiler terdiri dari :

- Pipa kapiler media pemisah kertas
Terbuat dari gelas yang memiliki diameter berkisar antara 25-100 dan panjang antara 50-100 cm. Dimensi pipa kapiler, diameter dan panjang, dapat mempengaruhi efisiensi (N) pemisahan *elektroforesis kapiler*. Dimana jika semakin kecil ukuran diameter pipa kapiler maka semakin besar harga N dikarenakan besar diameter ($> 100 \text{ m}$) mengakibatkan tidak efisien.

- *Buffer* pipa kapiler

Larutan *buffer* berfungsi sebagai larutan *elektrolit*, menghantarkan arus listrik maupun mengontrol muatan molekul. Suatu molekul dapat bermuatan positif, negatif maupun netral tergantung dari pH larutan dan fungsi *buffer* dapat menahan pH. *pH buffer* dapat mengontrol selektifitas pemisahan elektroforesis.

- Sumber arus

Elektroforesis konvensional akan dialiri arus searah sebesar 100 volt dan elektroforesis kapiler memiliki aliran arus searah bertegangan sangat tinggi yaitu berkisar 10.000 - 30.000 volt. Oleh karena itu, eksperimen elektroforesis kapiler dapat dilakukan dalam beberapa menit sedangkan eksperimen elektroforesis konvensional memerlukan waktu selama sehari. Selain itu, tegangan listrik yang tinggi akan mempengaruhi efisiensi pemisahan dalam elektroforesis kapiler.

- Detektor

Semua solute, baik yang bermuatan maupun netral bergerak ke satu arah, yaitu ke katoda, sehingga akan memudahkan pendeteksian. Detektor bisa diletakkan pada salah satu ujung pipa kapiler di dekat katoda (Tetra et al., 2020).

BAB 8

FAKTOR YANG MEMPENGARUHI HASIL PEMERIKSAAN BIOLOGI MOLEKULER

8.1 Faktor – faktor yang mempengaruhi kerja enzim

8.1.1 pH

pH yang terlalu tinggi atau rendah menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Enzim akan mengalami denaturasi yang akan menyebabkan terjadinya perubahan muatan enzim dan substrat akibat perubahan aktivitas enzim. Setiap enzim mempunyai nilai pH optimum yang berbeda-beda. Sebagian besar enzim didalam tubuh menunjukkan aktivitas optimal antara pH 5,0 dan 9,0 (Kurniasiwi et al., 2023).

8.1.2 Suhu

Karena sebagian besar enzim adalah protein, aktivitasnya dipengaruhi oleh suhu. Enzim biasanya tidak rusak pada suhu rendah mendekati titik beku. Pada suhu dimana enzim masih aktif, kenaikan suhu sebesar 10°C akan menggandakan aktivitas enzim ($Q_{10}=2$). Reaksi terjadi paling cepat pada suhu optimal. Semakin meningkatnya suhu, jumlah enzim aktif semakin berkurang akibat proses denaturasi. Suhu optimal untuk enzim dalam tubuh manusia adalah sekitar 37°C.

8.1.3 Konsentrasi Enzim

Kecepatan reaksi enzim (V) berbanding lurus dengan konsentrasi enzim (Enz). Semakin tinggi konsentrasi enzim maka reaksi akan semakin cepat, berbanding terbalik dengan konstanta konsentrasi substrat. Karena substrat sudah jenuh dengan enzim, peningkatan konsentrasi enzim tidak mempercepat reaksi.

8.1.4 Konsentrasi Substrat

Ketika konsentrasi substrat (S) meningkat pada kondisi yang sama, laju reaksi akan meningkat hingga nilai maksimum V . Pada titik maksimum, enzim jenuh dengan substrat. Pada titik A dan B terlihat tidak semua enzim bereaksi dengan substrat. Oleh karena itu, untuk A dan B, penambahan substrat S meningkatkan jumlah Enz S , dan laju reaksi v meningkat seiring dengan penambahan S . Titik C menunjukkan bahwa seluruh enzim telah bereaksi dengan substrat, sehingga penambahan S tidak meningkatkan laju reaksi karena tidak ada lagi enzim bebas yang tersisa. Di titik B, laju reaksi tepat setengah dari laju maksimum. Konsentrasi substrat yang menghasilkan setengah kecepatan maksimum disebut nilai K_m (konstanta Michaelis).

8.1.5 Inhibitor

Inhibitor merupakan zat yang dapat mengakibatkan aktivitas suatu enzim terhambat. Penghambatan enzim ialah suatu proses yang dapat menghentikan reaksi antara enzim dan substrat. Jenis inhibitor secara umum dibagi menjadi dua jenis inhibitor, yaitu: *inhibitor reversibel* dan *inhibitor ireversibel*. *Inhibitor reversibel* dapat menyebabkan kekambuhan. Ada empat jenis inhibitor reversibel.

- **Inhibitor Kompetitif**
Inhibitor kompetitif berikatan dengan sisi aktif suatu enzim. Inhibitor akan berikatan dengan enzim bebas. Inhibitor juga bersaing dengan substrat untuk mendapatkan situs aktif, mengurangi jumlah enzim yang mengikat substrat. Inhibitor tidak dipengaruhi oleh laju degradasi ES kompleks menjadi produk dan dapat diatasi dengan penambahan substrat.
- **Inhibitor non-kompetitif**
Inhibitor non-kompetitif berikatan dengan kompleks enzim-substrat tetapi tidak dapat berikatan dengan enzim bebas. Inhibitor ini mengurangi laju degradasi kompleks enzim-substrat menjadi produk. Kehadiran substrat tambahan meningkatkan penghambatan.
- **Inhibitor non-kompetitif**
Inhibitor non-kompetitif berikatan dengan situs selain situs aktif. Inhibitor ini akan mengikat kompleks enzim-substrat dan enzim bebas.
- **Inhibitor Campuran**
Inhibitor campuran adalah kombinasi dari berbagai inhibitor yang tercantum di atas. Inhibitor ireversibel berikatan secara permanen dengan enzim, sehingga mencegah substrat berikatan dengan enzim.

8.1.6 Hambatan alosterik

Hambatan *alosterik* merupakan suatu gangguan yang disebabkan oleh *enzim alosterik*. *Enzim alosterik* adalah enzim yang memiliki sisi selain sisi aktif yaitu *sisi alosterik*. *Inhibitor alosterik* adalah inhibitor yang menghambat *enzim alosterik*. Terbentuknya ikatan antara *enzim alosterik* dan *inhibitor alosterik* akan mempengaruhi enzim, sehingga bagian aktifnya mengalami perubahan

bentuk yang akan menghambat masuknya substrat ke dalam bagian aktif enzim (Fauziah et al., 2022).

8.2 Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Pemeriksaan DNA

8.2.1 Kualitas Sampel

8.2.2 Prosedur

Keandalan tes DNA juga bergantung pada laboratorium dan teknologi yang digunakan. Health Street menggunakan teknologi terbaru, memastikan 99,9% akurasi pengujian genetik, baik menggunakan peralatan rumah atau mengunjungi klinik.

8.2.3 Protokol Sentrifugasi

Protokol sentrifugasi terdiri atas kecepatan, waktu, suhu, dan jumlah putaran. Langkah sentrifugasi kedua tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hasil DNA kecuali dalam satu penelitian yang mengaitkan hal ini dengan penurunan yang signifikan, menunjukkan bahwa perbedaan tersebut mungkin disebabkan oleh penghilangan plasma tanpa mengganggu lapisan buffy setelah putaran pertama. mengamati tidak ada perbedaan yang signifikan dalam hasil DNA dengan sentrifugasi tunggal 10 menit pada 400 g, 800 g, 1.500 g, 3.000 g dan 16.000 g. Demikian pula, melaporkan tidak ada perbedaan signifikan dalam hasil DNA pada 1.000 g, 2.000 g, dan 10.000 g (Trigg et al., 2018).

Paparan suhu merupakan salah satu faktor kerusakan DNA. Degradasi DNA pada jaringan lunak juga sering terjadi pada tubuh korban yang sudah

rusak oleh karena pembusukan (Toetik Koesbardiati, 2015).

8.2.4 Waktu untuk sentrifugasi darah dan tabung spesimen darah

Pengaruh penundaan waktu antara pungsi vena dan sentrifugasi darah Kadar cfDNA telah dilaporkan oleh beberapa kelompok, dengan observasi umum bahwa tingkat cfDNA meningkat seiring waktu sebelum sentrifugasi yang distabilkan EDTA darah. Untuk mengatasi kebutuhan akan pengolahan darah segera, tersedia tabung pengumpul darah khusus yang mengandung bahan pengawet untuk mencegah lisis leukosit perifer dan memungkinkan penyimpanan seluruh darah di suhu kamar selama beberapa hari sebelum sentrifugasi, ini termasuk BCT DNA Bebas Sel (Streck) dan Tabung DNA Darah PAXgene (Qiagen) (Trigg et al., 2018).

8.2.5 Status shedder

Beberapa orang mungkin dianggap “shedders yang baik” jika mereka cenderung kehilangan atau melepaskan sel kulit lebih cepat dibandingkan orang lain (Jayanti & Mushlih, 2021).

8.2.6 Mencuci tangan

Seseorang yang belum mencuci tangan cenderung ditemukan lebih banyak DNA pada permukaan tangan, saat mencuci akan menghilangkan banyak sel gudang di permukaan tangan (Sandwinata, 2019).

8.2.7 Kebiasaan pribadi

Beberapa orang cenderung menyentuh wajah, mata, hidung, rambut, dll. Mengumpulkan DNA dari

area tersebut untuk ditransfer ke objek berikutnya yang mereka sentuh(Sandwinata, 2019).

8.2.8 Jenis Kontak

Tekanan dan gesekan dapat mentransfer DNA dalam jumlah besar ke benda yang bersentuhan.

8.2.9 Substrat

Kayu, beton maupun permukaan beralur akan lebih baik mempertahankan DNA berupa sel kulit dibandingkan permukaan halus.

8.2.10 Keringat

Keringat dapat meningkatkan jumlah DNA yang tersedia (Yudianto, 2019).

8.3 Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Hasil Pemeriksaan PCR

8.3.1 Waktu Pengambilan Sampel

Bila ini terjadi dalam masa inkubasi virus, yaitu hari ke 2 - 14 setelah terpapar, kondisi ini disebut sebagai negatif palsu. Ini mungkin terjadi karena jumlah virus yang rendah dan berada di bawah ambang deteksi PCR sehingga memberikan hasil negatif.

8.3.2 Prosedur pemeriksaan yang tidak sesuai dengan SOP

8.4 Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Hasil Pemeriksaan Protein

8.4.1 Kerusakan ginjal

Protein urin disebabkan karena ada kerusakan pada ginjal. Ketika ginjal berfungsi dengan baik, maka ginjal akan berperan dalam menyaring produk limbah dari darah, namun akan mempertahankan unsur penting seperti albumin (Farizal, 2020).

8.4.2 Stress

Siapa pun yang mengalami stres dapat terkena tekanan darah tinggi. Hal ini dikarenakan kreatinin berfungsi dalam mengatur kadar protein urin yang tidak stabil sehingga menyulitkan fungsi ginjal dalam menetralkan protein urin (Farizal, 2020).

8.4.3 Preeklampsia

Kondisi yang dapat menyerang ibu hamil yakni tekanan darah tinggi yang dapat menyebabkan adanya protein dalam urin (Farizal, 2020).

8.4.4 Hipertensi

Hipertensi pada masa kehamilan sering terjadi pada ibu hamil dan jika diperiksa pada ibu hamil ditemukan kelainan berupa peningkatan tekanan darah (Wibowo, 2023).

8.4.5 Obat-obatan

Toksisitas obat *aminoglikosida* dan toksisitas pada bahan kimia adalah obat - Obatan yang dapat menyebabkan terganggunya fungsi ginjal (Mus et al., 2022).

BAB 9

VERIFIKASI DAN VALIDASI HASIL PEMERIKSAAN BIOLOGI MOLEKULER

9.1 Definisi Verifikasi dan Validasi

Validasi dan verifikasi metode dalam prosedur laboratorium sebelum digunakan dalam uji klinis sangat penting untuk memberikan layanan yang aman dan berguna bagi dokter dan pasien. Validasi metode analisis merupakan tindakan evaluasi berdasarkan uji laboratorium untuk menunjukkan bahwa parameter memenuhi persyaratan untuk digunakan. Validasi adalah proses penilaian keakuratan dan ketelitian suatu prosedur dengan nilai yang dapat diterima (Mushlih Miftahul., 2019).

Validasi akan memastikan prosedur yang terdokumentasi mempunyai detail yang cukup untuk diterapkan. Validasi kuantitatif metode PCR real-time meliputi spesifisitas, efisiensi yang ditentukan oleh kurva standar, sensitivitas dan reproduibilitas pengujian dalam analisis DNA PCR real-time (Maryani et al., 2021).

Verifikasi metode adalah validasi suatu metode, tetapi hanya berkenaan dengan karakteristik kinerja tertentu. Dalam pemilihan parameter validasi bergantung pada beberapa faktor seperti penerapan, sampel pengujian, tujuan metode, dan peraturan regional atau internasional (Agustiningsih & Daryanto., 2020).

Tujuan validasi suatu metode adalah untuk menunjukkan bahwa suatu laboratorium dapat menggunakan metode tersebut untuk melakukan pengujian dan memberikan hasil yang valid. Selain itu, verifikasi ini juga membantu membuktikan bahwa

laboratorium memiliki data kinerja. Hal ini disebabkan kinerja antar laboratorium tidak sama karena setiap laboratorium memiliki kondisi, keterampilan staf, dan kemampuan peralatan yang berbeda (Mattocks Christopher & Matthijs Gert., 2019). Suatu metode analisis harus divalidasi dengan tujuan memverifikasi apakah parameter kinerjanya cukup untuk mengatasi masalah analitis. Oleh karena itu, metode perlu divalidasi sebagai berikut (Maryani et al., 2021) :

- Metode baru perlu dikembangkan jika ingin mengatasi masalah analitis tertentu
- Disesuaikan dengan pengembangan, ini berarti metode standar perlu direvisi
- Penjaminan Mutu menunjukkan bahwa metode standar telah berubah seiring berjalannya waktu.

9.2 Proses Validasi

Validasi adalah proses yang terdiri dari empat langkah spesifik (Hedman Johanness & Lavander Moa., 2019):

- Validasi perangkat lunak (*Software validation*)
- Validasi perangkat keras/instrument (*instrumen/hardware falidation*)
- Validasi metode
- Kesesuaian system (*system suitability*)

Tahap validasi dimulai dengan perangkat lunak yang terverifikasi dan sistem yang tersertifikasi. Metode yang telah tervalidasi kemudian dikembangkan dengan menggunakan sistem terjamin. Terakhir, validasi lengkap dilakukan melalui langkah-langkah kepatuhan sistem. Setiap fase dari keseluruhan proses validasi ditujukan untuk keberhasilan validasi (Broeders S. Huber I., 2020).

Beberapa alasan valid yang bertujuan dalam pengembangan suatu metode analisis baru, antara lain (Hedman Johanness & Lavander Moa., 2019) :

- Metode yang dilakukan tidak sesuai untuk analit tertentu dalam matriks sampel tertentu.
- Metode yang ada terlalu banyak menimbulkan kesalahan
- *Reliabel* (presisi dan akurasinya rendah)
- Biaya yang digunakan pada metode yang sudah ada terlalu mahal, memerlukan waktu yang cukup lama, membutuhkan banyak energi, atau tidak dapat diotomatisasikan
- Metode tidak memberikan sensitivitas atau spesifitas yang mencukupi pada sampel
- Instrumentasi dan teknik yang lebih baru memberikan kesempatan untuk meningkatkan.
- Kinerja metode tersebut, yang meliputi peningkatan identifikasi analit peningkatan batas
- Deteksi, serta akurasi dan presisi yang lebih baik.

9.3 Parameter Validasi

Validasi metode analisis USP meliputi delapan langkah: Validasi Metode, Daya Tahan, Kekasaran, Linearitas, dan Rentang. Spesifikasi, batas deteksi, akurasi, presisi, batas kuantifikasi. Menurut ICH, karakteristik validasi metode saat ini meliputi: validasi metode, ketahanan, jangkauan, linearitas, spesifisitas, batas deteksi, presisi, presisi, batas kuantisasi, dan kesesuaian sistem (Agustiningsih & Daryanto., 2020) :

9.3.1 Ketepatan (akurasi)

Akurasi adalah ketepatan atau keakuratan suatu metode analisis antara nilai terukur dan nilai yang diterima, baik nilai lazim maupun nilai aktual atau acuan. Akurasi diukur sebagai jumlah analit yang diperoleh dari pengukuran dengan melakukan spiking pada sampel.

9.3.2 Presisi

Presisi adalah ukuran ketelitian dari sekumpulan hasil analisis yang diperoleh dari beberapa pengukuran pada sampel homogen yang sama. Ada tiga tingkat akurasi:

- Keterulangan (*repetibility*)

Dengan kata lain keakuratan dalam kondisi percobaan yang sama (pengulangan), termasuk orang, peralatan, lokasi, dan waktu.

- Presisi antara (*intermediate precision*)

Artinya, akurasi dalam kondisi eksperimen yang berbeda seperti orang, peralatan, lokasi, dan waktu.

- Ketertiruan (*reproduksibility*) mengacu pada hasil laboratorium lain.

9.3.3 Spesifisitas

Selektivitas atau spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur secara hati-hati dan menyeluruh hanya suatu zat tertentu dibandingkan komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Definisi spesifisitas lainnya adalah kemampuan mendeteksi keberadaan komponen lain dalam matriks sampel, seperti: produk degradasi atau kontaminasi komponen matriks. Sehingga harus diukur secara akurat dan spesifik.

Selektivitas sering dilakukan pada sampel yang mengandung bahan tambahan berupa pengotor, produk degradasi, senyawa analog, dan senyawa asing lainnya, dan mengukur derajat penyimpangan metode dibandingkan dengan hasil analisis sampel. Tidak mengandung bahan tambahan lainnya.

9.3.4 Batas Deteksi (*Limit of Detection*) dan Batas Kuantitasi (*Limit of Quantification*)

Batas deteksi merupakan jumlah analit terendah dalam sampel yang masih menimbulkan respon signifikan dibandingkan dengan nilai blanko. Batas deteksi ialah parameter pengujian batas. Batas kuantifikasi merupakan parameter dalam mikroanalisis dan didefinisikan sebagai jumlah minimum analit dalam suatu sampel yang dapat memenuhi kriteria akurat dan lengkap.

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah yang masih dapat terdeteksi dalam sampel. Batas deteksi merupakan parameter pengujian batas. Batas kuantitatif adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima berdasarkan kondisi pengoperasian metode yang digunakan.

9.3.5 Linearitas dan Rentang

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode analisis dalam memberikan respon yang sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode menunjukkan batas bawah dan atas analit yang dapat dibuktikan diukur dengan presisi, kelengkapan, dan linearitas yang dapat diterima.

9.3.6 Kisaran

Kisaran suatu metode adalah konsentrasi terendah dan tertinggi dimana metode analisis tersebut mempunyai ketelitian dan linearitas yang cukup. Kisaran konsentrasi yang diuji tergantung pada jenis metode dan penerapannya untuk menguji komponen utama. Sehingga konsentrasi standar harus mengukur konsentrasi yang mendekati atau sama

dengan konsentrasi kandungan analit yang diharapkan.

9.3.7 Kekasaran (*Ruggudness*)

Kekasaran adalah derajat reproduktifitas dari apa yang diperoleh pada kondisi berbeda dan dinyatakan sebagai derajat deviasi relatif (persentase) larutan pada kondisi tersebut, analisis laboratorium, peralatan reagen, dan waktu percobaan yang berbeda. Ketahanan metode adalah tingkat reproduksibilitas hasil pengujian yang diperoleh dengan menganalisis sampel yang sama dalam kondisi pengujian yang berbeda, seperti: hasil uji laboratorium, analisa, instrumen, reagen, suhu, hari, dll tercapai. Ketahanan biasanya dinyatakan sebagai fakta bahwa perbedaan perilaku atau lingkungan kerja tidak mempengaruhi hasil tes. Ketahanan metode adalah ukuran reproduktifitas antar laboratorium dan antar analis dalam kondisi operasi normal.

9.3.8 Kekuatan (*Robustness*)

Kekuatan mengacu pada kemampuan metode analisis untuk tidak terpengaruh oleh variasi kecil dalam parameter metode.

9.3.9 Uji kesesuaian system

Sebelum melakukan analisis harian, analis harus memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakannya dapat memberikan data yang dapat diterima.

9.4 Validasi Metode

Metode-metode validasi pada biologi molekuler sebagai berikut (Broeders S. Huber I., 2020):

9.4.1 Validasi metode pengambilan sampel

Pengambilan sampel bisa dilakukan secara langsung, artinya sepotong bahan/matriks diambil secara langsung untuk diproses lebih lanjut, atau tidak langsung, artinya digunakan alat pengambilan sampel untuk mengangkat sampel dari bahan tersebut. Swabbing bisa dibilang merupakan pendekatan yang paling umum untuk pengambilan sampel tidak langsung, dalam analisis DNA forensik serta pengujian mikroba. Untuk memvalidasi metode pengambilan sampel, matriks yang relevan, bebas dari analit target, dapat dibubuhi sel/virus target dalam jumlah yang diketahui. Saat memvalidasi metode pengambilan sampel sel manusia yang tertumpah pada pakaian, bahan referensi dapat disiapkan oleh seseorang yang mengenakan pakaian serupa dengan cara yang terkontrol untuk jangka waktu tertentu.

9.4.2 Validasi metode perlakuan sampel

Dalam validasi, penting untuk menerapkan sampel yang relevan mengenai matriks sampel, jenis sel, dan metode pengambilan sampel. Untuk pengujian patogen pada air, hal ini dapat mencakup penggunaan air bersih serta air dengan jumlah zat humat yang berbeda. Pemulihan adalah parameter terpenting dalam kaitannya dengan perlakuan sampel.

9.4.3 Validasi metode ekstraksi DNA/RNA

Validasi metode ekstraksi DNA/RNA dapat dilakukan dengan menerapkan matriks relevan yang dibubuhi sel target dalam jumlah yang

diketahui (misalnya mikroorganisme atau sel manusia). Pendekatan ini memungkinkan untuk mengukur efek pemulihan, presisi dan matriks. Dalam forensik, misalnya, kertas saring rokok dari merek tertentu mungkin dibubuhi air liur dalam jumlah tertentu untuk menyelidiki efek matriks.

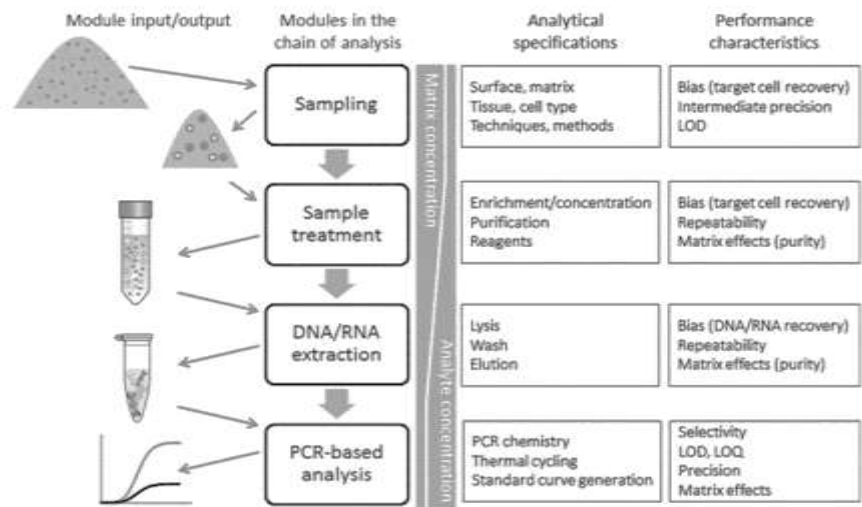
9.4.4 Validasi metode PCR atau RT-PCR

Penghambatan PCR adalah faktor pembatas utama dalam diagnostik PCR dan harus dipelajari secara cermat dalam validasi metode. Dengan menambahkan PCR dengan matriks yang relevan dan terhomogenisasi serta menambahkan DNA berkualitas tinggi, efek penghambatan PCR dapat ditentukan dengan cara yang mudah dan dapat direproduksi. Pendekatan ini memungkinkan kuantifikasi efek matriks serta memastikan efek serupa dari waktu ke waktu (Mushlih Miftahul, 2019).

9.5 Alur kerja dalam diagnostik PCR

Alur-alur kerja dalam diagnostic PCR Sebagai berikut (Agustiningsih & Daryanto., 2020):

9.5.1 Pengambilan sampel

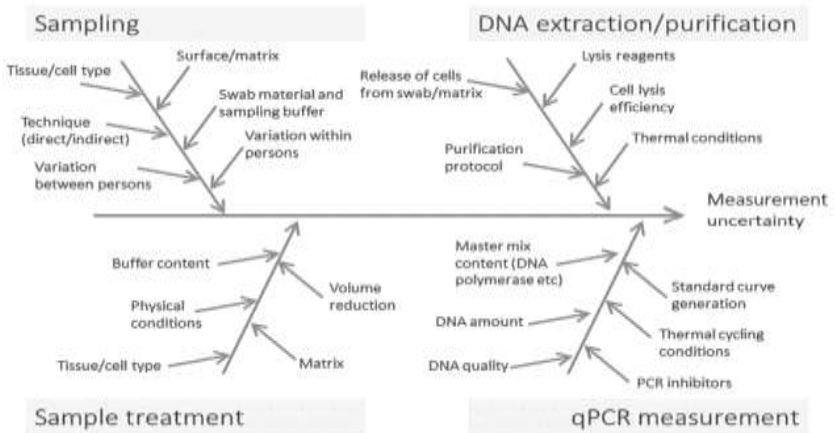


Gambar 9. 1. Rantar Analisis PCR

Sumber Alif et al (2019)

Rantai analisis PCR dijelaskan oleh empat modul: pengambilan sampel, perlakuan sampel, ekstraksi DNA/RNA, dan analisis berbasis PCR. Aliran sampel ditampilkan di sebelah kiri, dimulai dengan sel/virus dalam matriks dan diakhiri dengan DNA dalam tabung PCR. Saat sampel diproses, konsentrasi matriks idealnya diturunkan dan konsentrasi analit meningkat. Spesifikasi analitis dan karakteristik kinerja disertakan untuk setiap modul untuk penyelidikan validasi metode.

9.5.2 Validasi Metode PCR

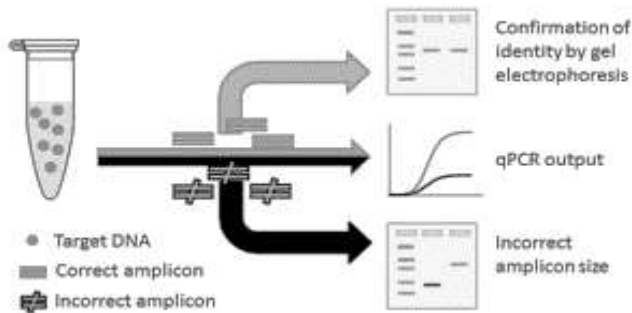


Gambar 9. 2. Faktor Mempengaruhi Kinerja
Sumber Setiawan et al (2023)

Variasi diagnostik PCR. Faktor-faktor yang mempengaruhi kinerja, variasi dan ketidakpastian pengukuran analisis PCR di masing-masing empat modul ditampilkan. Faktor lain selain yang disebutkan juga dapat mempengaruhi variasi, seperti langkah transkripsi terbalik dalam analisis RNA.

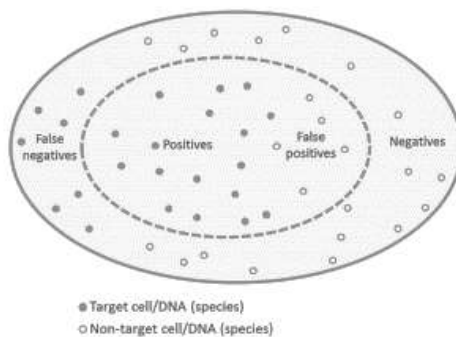
9.5.3 Selektivitas

Langkah awal dalam mengevaluasi selektivitas adalah konfirmasi identitas dalam diagnostic pcr rangkaian DNA/RNA tertentu diperkuat memungkinkan identifikasi, misalnya individu tertentu dalam penyelidikan frensik didalamnya.



Gambar 9. 3. Langkah awal evaluasi selektivitas
Sumber (Agustiningsih & Daryanto., 2020)

Kofirmasi identitas dalam nalisis berbasis PCR. Didalam sumber keluaran qPCR kurva amplifikasi adalah diverifikasi dngan melakukan elektroforesis gel untuk menentukan ukuran fragmen DNA yang dihasilkan. Kurva amplikasi abu-abu dan pita gel adalah hasilimplikasi yang benar, membenarkan pengujian tersebut mendeteksi target seharusnya dideteksi. *Amplifikasi* hitam kurva sebaliknya, berasal dari deteksi salah (lebih kecil) amplicon (produk tidak spesifik atau data primer) (Agustiningsih & Daryanto., 2020).



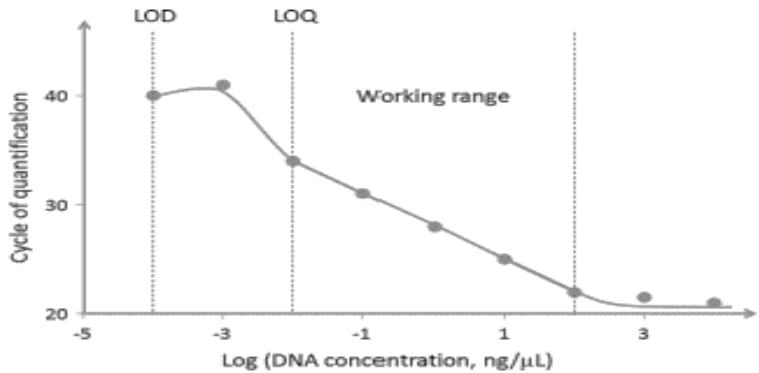
Gambar 9. 4. Selektivitas uji PCR
Sumber Setiawan et al (2023)

Sampel/strain yang terdeteksi oleh pengujian divisualisasikan dengan lingkaran garis putus-putus, menunjukkan hasil positif-benar (lingkaran abu-abu terisi di dalam garis putus-putus), hasil negatif palsu (lingkaran abu-abu terisi di luar garis putus-putus), hasil positif palsu (lingkaran putih di dalam garis putus-putus) dan hasil negatif nyata (lingkaran putih di luar garis putus-putus) (Khariri et al., 2020).

9.5.4 Batas deteksi (LOD), Batas kuantifikasi (LOQ) dan jangkauan kerja

LOD mengacu pada konsentrasi analit terkecil yang dapat dideteksi oleh metode dengan probabilitas tertentu. Umumnya, baik untuk metode berbasis PCR maupun dalam konteks lain, LOD₉₅ digunakan, yang didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah di mana 95% sampel positif terdeteksi oleh metode analisis [17]. Batas kuantifikasi (LOQ) mengacu pada konsentrasi analit terendah yang dapat ditentukan dengan ketidakpastian yang dapat diterima.

Rentang kerja mengacu pada rentang konsentrasi analit yang dapat diukur dengan akurasi yang dapat diterima. Titik terendah dalam rentang kerja adalah LOQ. LOD, LOQ, dan rentang kerja untuk uji PCR dapat ditentukan melalui rangkaian pengenceran yang mengandung DNA/RNA target dalam jumlah yang diketahui. Rangkaian pengenceran harus mencakup beberapa ulangan dan konsentrasi asam nukleat untuk memberikan perkiraan LOD dan/atau LOQ serta rentang kerja yang berguna (Hedman Johanness & Lavander Moa, 2019).



Gambar 9. 5. Batas deteksi (LOD), Batas kuantifikasi (LOQ) dan jangkauan kerja
Sumber Maryani et al (2021)

Nilai siklus kuantifikasi (CQ) dari pengenceran DNA diplot terhadap log konsentrasi DNA untuk menghasilkan kurva standar yang mencakup rentang kerja diperkenalkan mendekati level kritis untuk meningkatkan estimasi LOD/LOQ. Seri pengenceran dapat terdiri dari DNA standar murni atau, lebih disukai, sel target/DNA dalam matriks yang relevan. Hal terakhir ini memastikan bahwa efisiensi amplifikasi sama untuk sampel yang disiapkan dan sampel nyata, membuat estimasi LOD, LOQ dan rentang kerja relevan untuk situasi analisis rutin. Faktanya, kuantifikasi dengan qPCR didasarkan pada asumsi efisiensi amplifikasi yang identik untuk standar dan sampel yang tidak diketahui. Dalam dPCR, tidak diperlukan kurva standar untuk kuantifikasi absolut, sehingga teknologi ini tidak terlalu terpengaruh oleh perbedaan efisiensi amplifikasi, misalnya karena pengotor. LOD dan LOQ juga dapat diselidiki saat memvalidasi modul pra-PCR, jika dianggap perlu (R.Danarto & Indwiani Astuti., 2021).

9.5.5 Presisi

Keterulangan adalah variasi antara analisis yang dilakukan dengan cara yang sama, misalnya replikasi dalam batch ekstraksi DNA atau proses PCR. Oleh karena itu, analisis untuk pengujian keterulangan dilakukan dengan reagen yang identik dan menggunakan instrumen yang sama, dalam jangka waktu singkat.

9.5.6 Sentitivitas analitis

Sensitivitas analitis mengacu pada perubahan sinyal respons instrumen sebagai fungsi perubahan konsentrasi analit. Perhatikan bahwa ini berbeda dengan sensitivitas diagnostik, yang mengacu pada kemampuan untuk mendiagnosis dengan benar. Kata sensitivitas harus dihindari ketika mengacu pada LOD, untuk menghindari kebingungan. Secara umum, evaluasi sensitivitas analitis untuk analisis berbasis PCR kurang penting; jarang menarik untuk menentukan sampel mana yang tidak diketahui yang mengandung jumlah sel target tertinggi.

9.5.7 Kebenaran

Kebenaran tidak dapat diukur secara langsung, namun dapat diperkirakan sebagai bias. Bias mengacu pada kedekatan antara nilai pengukuran dan nilai sebenarnya atau, sebagai alternatif, nilai referensi.

9.5.8 Kekerasan

Kekasaran, terkadang disebut sebagai ketahanan, adalah ketidakpekaan metode terhadap perubahan kecil yang dilakukan secara sadar dalam kondisi eksperimen. Kekasaran dievaluasi selama validasi dengan memvariasikan parameter utama atau konsentrasi reagen dan mempelajari efeknya. Untuk metode PCR, efek dari sedikit variasi suhu dan waktu inkubasi selama siklus termal atau penerapan jumlah primer/probe yang berbeda dapat dievaluasi. Untuk reagen, penyimpangan

sekitar $\pm 10\%$ dari konsentrasi optimal sering diterapkan. Jenis pengujian ini memberikan informasi tentang seberapa kuat metode ini dalam menangani kesalahan pemipetan. Hasil uji ketangguhan dapat digunakan untuk menentukan batasan metode, misalnya mengenai rentang waktu inkubasi pada berbagai tahap ekstraksi DNA/RNA (Mattocks Christopher & Matthijs Gert., 2019).

BAB 10

PENANGANAN LIMBAH PEMERIKSAAN BIOLOGI MOLEKULER

10.1 Pengertian Limbah Laboratorium

Limbah laboratorium adalah limbah yang dihasilkan ketika berbagai larutan kimia bereaksi selama eksperimen. Limbah laboratorium mengandung berbagai jenis senyawa organik dan logam. Pembuangan langsung tanpa adanya pembuangan terlebih dahulu berdampak terhadap lingkungan. Limbah laboratorium lingkungan dapat diolah dengan menggunakan proses koagulasi dan adsorpsi. Pengolahan limbah dengan proses flokulasi bertujuan untuk menurunkan parameter kebutuhan oksigen kimia (COD), dan pengolahan dengan proses adsorpsi bertujuan untuk mereduksi logam Fe dan Pb.

Tuberkulosis (TBC) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh infeksi bakteri. TBC biasanya menyerang paru-paru, namun bisa juga menyerang organ tubuh lain seperti ginjal, tulang belakang, dan otak. Menurut WHO, hingga 1,5 juta orang meninggal karena tuberkulosis pada tahun 2020. PCR TB (Gene Expert) adalah pengujian yang dilakukan dengan menggunakan alat Gene Expert untuk mendeteksi materi genetik *Mycobacterium tuberculosis* penyebab penyakit tuberkulosis (TB).

Gene Expert merupakan alat yang dapat diintegrasikan ke dalam komputer untuk mendeteksi keberadaan *Mycobacterium tuberculosis* secara cepat menggunakan teknologi PCR. PCR merupakan suatu teknik pengujian yang didasarkan pada prinsip perbanyakan (*amplifikasi*) DNA (materi genetik)

Mycobacterium tuberculosis pada sampel uji. *Mycobacterium tuberculosis* adalah bakteri penyebab tuberkulosis. Jika sampel uji tidak mengandung bakteri tuberkulosis, maka materi genetik tidak akan tumbuh. Oleh karena itu, bakteri ini tidak dikenali oleh alat ahli genetika. Spesialis genetika ini dikenal juga dengan *Rapid Molecular Testing* (TCM).



Gambar 10. 1. Alat *genXpert*

10.2 Personel Penanganan Pengelolaan Limbah Biologi Molekuler

Agar personel pengelolaan limbah menyadari bahaya yang mungkin terjadi saat bekerja dan dapat bekerja dengan aman, diperlukan hal-hal sebagai berikut:

- Pelatihan umum: layout laboratorium, kode praktik , pedoman kerja setempat, manual safety, penilaian risiko, peraturan terkait dengan tugas, dan prosedur respons darurat;
- Pelatihan spesifik pekerjaan;
- Pendampingan dan penilaian sebelum bekerja sendiri dilakukan bagi petugas baru;
- Evaluasi dan pelatihan refresher berkala;

- Pelatihan keamanan dan keselamatan kerja, termasuk kesiapsiagaan terhadap kondisidarurat;
- Sosialisasi informasi dan prosedur terbaru

10.3 Pembuangan Limbah Biologi Molekuler

Dalam menentukan langkah-langkah pembuangan limbah bersifat infeksius perlu dilakukan analisis risiko lebih dulu dengan memperhatikan prinsip keamanan dan keselamatan kerja terkait dengan agen infeksius tersebut. Misalnya, dalam hal pembuangan limbah terkait dengan Covid-19 petugas perlu memperhatikan dan mempertimbangkan pedoman *biosafety* Covid-19 dari pemerintah pusat dan setempat, WHO, CDC, atau lembaga lain yang kompeten.

Dalam kondisi jenis agen infeksius *emerging*, pedoman dapat berubah sewaktu-waktu seiring dengan perkembangan pengetahuan mengenai agen infeksius tersebut. Oleh karena itu, disarankan agar selalu memeriksa pemutakhiran (*update*) pedoman jika status pedoman tersebut masih bersifat sementara (*interimguidance*) Prosedur umum pembuangan limbah B3 disesuaikan dengan kategori limbah masing-masing. Berikut beberapa jenis limbah biologi molekuler dihasilkan dalam pemeriksaan laboratorium

- Limbah Infeksius Cair
 - a. Limbah cair dicampur dengan disinfektan (larutan klorin 1:10) selama 30 menit dalam kontainer yang leakproof dan ditutup rapat.
 - b. Kontainer berisi campuran limbah dan disinfektan dimasukkan ke dalam kantong plastik berlabel Biohazard, ditutup rapat, dan dibuang.
- Limbah Kimiawi Nonradioaktif
 - a. Limbah yang dapat dinetralkan
 - 1) Jika dapat dinetralkan, limbah dinetralkan terlebih dahulu secara perlahan dan hati-hati.

- 2) Setelah dinetralkan, limbah dapat ditempatkan pada wadah jerigen atau drum kecil atau jika fasilitas tersedia, limbah dibuang ke instalasi pembuangan air limbah (IPAL).
- b. Limbah yang tidak dapat dinetralkan
 - 1) Jika tidak dapat dinetralkan, limbah dimasukkan ke dalam wadah yang antikorosif dan sebaiknya tidak terbuat dari kaca atau logam.

10.4 Penyimpanan Sementara, Pengangkutan, dan Pemusnahan Limbah Biologi Molekuler

- Proses penyimpanan sementara, pembuangan, pengangkutan, dan pemusnahan limbah B3 harus mengikuti peraturan nasional dan pemerintah setempat.
- Jika tidak memiliki fasilitas pengolahan limbah sendiri, maka harus menggunakan pihak ketiga yang memiliki izin dan terdaftar di Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan (KLHK) untuk mengangkut dan memusnahkan limbah.
- Pihak penghasil limbah, pengangkut limbah, serta pemusnahan limbah sama-sama bertanggung jawab terhadap proses pengangkutan hingga pemusnahan limbah. Pengguna jasa pihak ketiga perlu melakukan evaluasi dan memastikan bahwa pihak ketiga tersebut benar-benar telah memusnahkan limbah tersebut.
- Proses penyimpanan sementara, pengangkutan, dan pemusnahan harus tercatat dalam dokumen manifes.
- Penumpukan limbah biologi molekuler sebaiknya tidak dilakukan dalam waktu yang lama.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboul-Ella, H., Hamed, R., & Abo-Elyazeed, H 2020, Recent trends in rapid diagnostic techniques for dermatophytosis. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 8(1), 115-123. <https://doi.org/10.1080/23144599.2020.1850204>
- Adhyatma, I. G. R., Darwinata, A. E., Hendrayan, M. A., Fatmawati, N. N. D 2020, Amplifikasi Sekuen Is6110 dengan Ekstraksi DNA menggunakan Metode Pemanasan (Rapid Boiling) untuk Identifikasi Mycobacterium tuberculosis. *Jurnal Medika Udayana*, 9(2), pp. 93-100.
- Adhiyanto, C., Hendarmin, L., & Puspitaningrum, R 2020, *Pengenalan Dasar Teknik Bio-Molekuler*. 88.
- Adlung, L 2022, Cell and Molecular Biology for Non-Biologists, Cell and Molecular Biology for Non-Biologists. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-65357-9>
- Afiani, N., Widyagama, S., & Malang, H 2021, Peningkatan kemampuan teknik pemilahan limbah tajam laboratorium (ibm LILA), *Media Husada Journal of Community Service*, 1(2), 53-61, <https://ojs.widyagamahusada.ac.id>
- Afifa, R 2022, *Modul Praktikum Instrumen Media dan Reagensia*, Yayasan Penerbit Muhammad Zaini.
- Agung, M. U. K., Askar, A. T., Andriani, Y., Yuliadi, L. P 2020, Identifikasi Molekuler Berbasis Marka Gen 16s rRNA Terhadap Bakteri Coliform Terkultur yang diisolasi dari Foraminifera Jenis Calcarina Asal Perairan Pulau Pramuka, Kabupaten Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. *Jurnal Harpodon Borneo*, 13 (1), pp. 10-18.
- Agustiningsih & Daryanto 2020, Pemeriksaan Pcr Sars-cov-2 Bagi Petugas Laboratorium, Balitbangkes.

- Ahmad Dahlan, Adhiyanto, Chris, Laifa Hendarmin, and Rini Puspitaningrum. 2020. "Pengenalan Dasar Teknik Bio-Molekuler." : 88.
- Aisyah, Riandini, Nur Mahmudah, and Erika Risanti. 2019. *Biologi Molekuler*. 1st ed. Surakarta: Muhammadiyah University Press.
- Arini, Septi, Arief Budi Witarto, and Setia Betaria Aritonang. 2021. "Analisis Pengaruh Paparan Fisik Pada Sampel Gigi Terhadap Hasil Kuantifikasi Dna Forensik Menggunakan Metode Kit Purifikasi Dna Komersial." *Jurnal TAMBORA* 5(2): 59–65.
- Ariyanti, Yanti, and Sister Sianturi. 2019. "Ekstraksi DNA Total Dari Sumber Jaringan Hewan (Ikan Kerapu) Menggunakan Metode Kit for Animal Tissue." *Journal of Science and Applicative Technology* 3(July 2018): 40–45.
- Burrill, Julia et al. 2021. "Corneocyte Lysis and Fragmented DNA Considerations for the Cellular Component of Forensic Touch DNA." *Forensic Science International: Genetics* 51(August 2020): 102428. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102428>.
- Burrill, Julia, Barbara Daniel, and Nunzianda Frascione. 2019. "A Review of Trace 'Touch DNA' Deposits: Variability Factors and an Exploration of Cellular Composition." *Forensic Science International: Genetics* 39(November 2018): 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.11.019>.
- Devi Kusumawati, Siska, Ikhwan Hadiano, Adella Alayda Pracojo, and Novia Ayu Handayani. 2023. "Perbandingan Nilai Pengukuran Kuantitatif Isolat Asam Ribonukleat (RNA) Menggunakan Spektrofotometer Nanodrop Dan Mikrodrops Pada Sampel Hepar Ayam (Gallus Gallus Domesticus)." *Indonesian Journal of Laboratory* 4887: 62–71.

- Dewanata, Pandu Aji, and Miftahul Mushlih. 2021. "Differences in DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients." *Indonesian Journal of Innovation Studies* 15: 1–10.
- Enkavi, Giray et al. 2019. "Multiscale Simulations of Biological Membranes: The Challenge To Understand Biological Phenomena in a Living Substance."
- Erny, Okky Prasetyo, Ayli Soekanto, and Astrid Amanda. 2021. "Pengaruh Obesitas Pada Status Imunitas Individu Terhadap Infeksi Virus Dan Bakteri." 19(1): 86–94.
- Farizal, Jon. 2020. "Protein Urin Pada Pekerja Buruh Sawit Di Pt.Palma Mas Sejati Bengkulu Tengah." *Journal of Nursing and Public Health* 8(1): 54–57.
- Fatmawati, Dian, Ulfah Indrayani, and Azizah Safitri. 2019. *Sel, Jaringan, Dan Metabolisme*. Pertama. Semarang: FK UNISULA.
- Fauziah, Prima Nanda et al. 2022. *Biologi Molekuler*.
- Fauziah, Prima, Martina Rohmah, Faiqah Umar, and Fakhrizal Wahdi. 2022. *Biologi Molekuler*. Peratama. eds. Waode Munaenin and Effi Sidik. Makassar: CV. Tohar Medka.
- Furumichi, Miho, Yoko Sato, and Mari Ishiguro-watanabe. 2021. "KEGG: Integrating Viruses and Cellular Organisms." 49(October 2020): 545–51.
- Guerrero, Carlos R, Pablo D Garcia, and Ricardo Garcia. 2019. "Subsurface Imaging of Cell Organelles By."
- Hafy, Zen, Veny Larasati, and Riana Sari Puspita. 2018. "Hubungan Lama Penyimpanan Sampel Arsip Jaringan Dalam Blok Parafin Terfiksasi Formalin Dengan Kualitas Hasil Ekstraksi DNA Mitokondria Jaringan." *Sriwijaya Journal of Medicine* 1(3): 158–63.

- Handayani, Sri Octa, and Dwi Hilda Putri. 2021. "Perbandingan Metode Fenol-Kloroform Dan Mini-Prep CTAB Untuk Isolasi DNA Tanaman Cabai (*Capsicum Annum* L.)." *Serambi Biologi* 6(2): 37–41.
- Henggu, Krisman Umbu, and Yopi Nurdiansyah. 2021. "Review Dari Metabolisme Karbohidrat , Lipid , Protein , Dan Asam Nukleat." 3: 9–17.
- Ismaun, Muzuni, and Nur Hikmah. "DETEKSI MOLEKULER BAKTERI *Escherichiacoli* SEBAGAI PENYEBAB PENYAKIT DIARE DENGAN MENGGUNAKAN TEHNIK PCR." *BIOMA : Jurnal Biologi Makassar* 7168: 1–9.
- Janovičová, Ľubica et al. 2023. "DNA in Fresh Urine Supernatant Is Not Affected by Additional Centrifugation and Is Protected against Deoxyribonuclease." *Molecular and Cellular Probes* 68(January): 0–4.
- Jauhani, Muhammad Afiful et al. 2020. "Kualitas Dan Kuantitas DNA Pada Bercak Darah Pascapaparan Tanah Dan Ultraviolet-C DNA Quality and Quantity on Blood Spot Post Soil and Ultraviolet-C Exposure." 6(3): 181–84.
- Jayanti, Liah Dwi, and Miftahul Mushlih. 2021a. "Comparison of the Quality of DNA Template Isolation Results of the Resin Method with and Without Centrifugation." *Indonesian Journal of Innovation Studies* 15: 1–9.
- . 2021b. "Perbandingan Kualitas DNA Template Hasil Isolasi Metode Resin Dengan Dan Tanpa Sentrifugasi." *Indonesian Journal of Innovation Studies* 15: 1–9.
- Kartini, Fika Anggraini, Khairuddin, and Atep Supardan. 2023. *Pengantar Biomolekuler*. Pertama. eds. Agus Wibowo and Tomy Nurtamin. Purbalingga: Eureka Media Aksara.

- Khotimah, Dwi Fitri, Ulinnuha Nur Faizah, and Titah Sayekti. 2021. "Proceeding of Integrative Science Education Seminar Protein Sebagai Zat Penyusun Dalam Tubuh Manusia : Tinjauan Sumber Protein Menuju Sel." 1: 127–33.
- Küçük, Niyazi. 2018. "Sperm DNA'sı ve Spermelerde DNA Kırıklarının Belirlenmesi." *Turkish Journal of Urology* 44(1): 1–5.
- Kuo, Chao-chung et al. 2019. "Isolation and Genome-Wide Characterization of Cellular DNA : RNA Triplex Structures." 47(5): 2306–21.
- Kurniasiwi, Putri, Roosmarinto Roosmarinto, and Narendra Yoga Hendarta. 2023. "Gambaran Hasil Pemeriksaan Aktivitas Enzim Alanine Aminotransferase (ALT) Pada Serum Setelah Disimpan Selama 14 Hari." *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology* 5(2): 316–19.
- Lee, Kiara, and Anubhav Tripathi. 2020. "Parallel DNA Extraction From Whole Blood for Rapid Sample Generation in Genetic Epidemiological Studies." *Frontiers in Genetics* 11(April): 1–16.
- Lestari, Indah, and Sopia Citrawati. 2023. "Konsep Metabolisme Asam Nukleat Dalam Perspektif Al-Qur'an." *Journal of Development and Reseach in Education* 4(1): 1–10.
- Lestari, Silvia W., and Triyana Sari. 2015. "Fragmentasi DNA Spermatozoa: Penyebab, Deteksi, Dan Implikasinya Pada Infertilitas Laki-Laki." *eJournal Kedokteran Indonesia* 3(2).
- Mus, Rosdiana, Mutmainnah Abbas, and Titin Agustina. 2022. "Skrining Kesehatan Melalui Pemeriksaan Protein Urine Di Kompleks Aditarina Kota Makassar." *Jurnal Mandala Pengabdian Masyarakat* 3(2): 225–30.
- Mushlih, Miftahul. 2019. *Biologi Molekuler Aplikasi Dasar Di Dunia Kesehatan*. ed. Septi Budi Sartika. Sidoarjo: UMSIDA Press.

- Noviantari, Ariyani. 2020. "Prosiding Seminar Nasional Sains Pemanfaatan Teknologi Biologi Sel Dalam Dunia Kedokteran Modern Abstrak." 1(1): 121-27.
- Nufus, Lale Syifaun, Dahlia Andayani, and Khairil Pahmi. 2023. "Isolasi Asam Nukleat Dari Tanaman Brokoli (Brassica Oleracea L.)." 11(2): 53-55.
- Nur, Abidah, and Zulham Yamamoto. 2022. "Saliva Sebagai Sumber DNA Genom Manusia." *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala* 22(2): 126-34.
- Pratiwi, Eka, and Lovendo Ilham Widodo. 2020. "Kuantifikasi Hasil Ekstraksi Gen Sebagai Faktor Kritis Untuk Keberhasilan Pemeriksaan Rt Pcr." *Indonesian Journal for Health Sciences* 4(1): 1.
- Puspa, Egita Windrianatama et al. 2021. "Analysis of Time Exposure to DNA Touch Quality on Face Shield Using STR CODIS – TH01 and D18S51." *Jurnal Teknologi Laboratorium* 10(2): 68-74.
- Pusptaningrum, Rini, Chris Adhiyanto, and Solihin. 2018. *Genetika Molekuler Dan Aplikasinya*. 1st ed. Yogyakarta: Deepublish Publisher.
- Putri, Ni Putu, and I Ketut Junitha. 2015. "KUALITAS DAN KUANTITAS DNA DARAH KERING PADA BESI DAN KAYU YANG DISIMPAN DALAM KURUN WAKTU BERBEDA." *Jurnal Biologi* 19(1): 21-24.
- Rahmadiani, Devi. 2021. "Ekstrak Pollen Kurma (Phoenix Dactylifera L) Sebagai Terapi Infertilitas Pada Pria." *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada* 10(1): 31-40.
- Refai Ibrahim. 2023. *Biologi Molekuler I Konsep Dan Tiori*. TAHUN 2023. ed. Zulita A. yogyakarta: CV BUDI UTAMA.
- Sandwinata, Muh. Fhajar. 2019. "Analisis Dna Dalam Kasus Forensik." *Teknosains: Media Informasi Sains Dan Teknologi* 12(1): 1-10.

- Saputri, Febriani, Bertha Rusdi, and Miswar Fattah. 2023. "Optimasi Metode Polymerase Chain Reaction (PCR) Untuk Identifikasi Polimorfisme Gen SLC01B1 Sebagai Farmakogen Statin." *Bandung Conference Series: Pharmacy* 1: 145–52.
- Shailendra D, et al. 2017. "Diseases and Molecular Diagnostics: A Step Closer to Precision Medicine." *Indian J Clin Biochem.* : 374-398.
- Sriwidarti, Nyimas Sa'diyah, and Setyo Utomo. 2019. "POLA PEWARISAN KARAKTER KUALITATIF KACANG PANJANG (*Vigna Sinensis* Var. *Sesquipedalis* L.) KETURUNAN TESTA COKLAT X HITAM." *Jurnal Agrotropika* 15(1): 43–47.
- Suhaemi, Zasmeli et al. 2022. "Intensitas Dan Presentase Keberhasilan Isolasi DNA Darah Itik Lokal Sumatera Barat Pada Lama Inkubasi Lysis Sel Yang Berbeda." 2(2): 293–98.
- Suhartono, Maggy, Wangsa Ismaya, and Debbie Retnoningrum. 2022. *Biokimia Asam Nukleat*. 1st ed. ed. Cicilia Heni. Yogyakarta: PT Kanisius.
- Tang, Congli et al. 2020. "Application of Magnetic Nanoparticles in Nucleic Acid Detection." *Journal of Nanobiotechnology*: 1–19.
- Thomy, Zalirin, and Essy Harnelly. 2018. *Buku Ajar Dasar-Dasar Biologi Sel Dan Molekuler*. Pertama. Banda Aceh: Syiah Kuala University Press.
- Toetik Koesbardiati, Aris Saputro Ahmad Yudianto. 2015. "Pengaruh Lama Paparan Suhu Kamar Terhadap Kualitas DNA Pada Pemeriksaan SWAB Earphone Dalam Penentuan Jenis Kelamin." *Jurnal Biosains Pascasarjana* 17(1): 33.
- Trigg, R. M., L. J. Martinson, S. Parpart-Li, and J. A. Shaw. 2018. "Factors That Influence Quality and Yield of Circulating-Free DNA: A Systematic Review of the Methodology Literature." *Heliyon* 4(7): e00699.

- Trost, Brett et al. 2019. "Impact of DNA Source on Genetic Variant Detection from Human Whole-Genome Sequencing Data." *Journal of Medical Genetics* 56(12): 809–17.
- Wall, Jeffrey D. et al. 2014. "Estimating Genotype Error Rates from High-Coverage next-Generation Sequence Data." *Genome Research* 24(11): 1734–39.
- Wibowo, Subur. 2023. "Examination of Urine Protein in Elderly People at Posyandu Beringin V Kedungwuni Barat Sub-District With The Dipstic Method." *Jurnal Kesehatan* 11(1): 151–68.
- Wu, Jianguo et al. 2020. "Detection and Analysis of Nucleic Acid in Various Biological Samples of COVID-19 Patients." *Travel Medicine and Infectious Disease* 37(March): 101673.
- Yao, Roderick A., Oyediran Akinrinade, Marie Chaix, and Seema Mital. 2020. "Quality of Whole Genome Sequencing from Blood versus Saliva Derived DNA in Cardiac Patients." *BMC Medical Genomics* 13(1): 1–10.
- Yudianto, Ahmad. 2019a. *DNA Touch Dalam Identifikasi Forensi*. 1st ed. Surabaya: Scopindo Media Pustaka.
- . 2019b. 53 *Journal of Chemical Information and Modeling DNA Touch Dalam Identifikasi Forensik*.
- Aisyah, R., Mahmudah, N., & Risanti, E 2019, *Biologi Molekuler*, 1st ed, Muhammadiyah University Press.
- Alif Yanuar Zukmadini, Umie Lestari & Murni Sapta Sari 2019, Pengembangan Moduk Berbasis Penelitian Analisis Aktivitas Fosforilasi Protein Membran Spermatozoa Protein Membran Spermatozoa Kambing Untuk Mata Kuliah Teknik Analisis Teknik Biologi Molekuler, <https://doi.org/10.33369/diklabio.3.2.153-165>
- Anggraini, D., syakurah, adlia, rizma, andriani, prasnti, putri., et al 2022, *Penelitian Ilmu Kesehatan*.

- Anggraini, N., Agustina, T. E., & Hadiah, F 2022, Pengaruh pH dalam Pengolahan Air Limbah Laboratorium Dengan Metode Adsorpsi untuk Penurunan Kadar Logam Berat Pb, Cu, dan Cd. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 20(2), 345–355, <https://doi.org/10.14710/jil.20.2.345-355>
- Ardyansyah, A 2020, *Mengenal Phlebotomy Dalam Proses Mengeluarkan Darah*.
- Arini, S., Budi Witarto, A., & Betaria Aritonang, S 2021, Analisis Pengaruh Paparan Fisik Pada Sampel Gigi Terhadap Hasil Kuantifikasi DNA Forensik Menggunakan Metode Kit Purifikasi Dna Komersial, *Jurnal TAMBORA*, 5(2), 59–65. <https://doi.org/10.36761/jt.v5i2.1126>
- Ariyanti, Y., & Sianturi, S 2019, Ekstraksi DNA Total dari Sumber Jaringan Hewan (Ikan Kerapu) Menggunakan Metode KIT For Animal Tissue, *Journal Of Science And Applicative Technology*, 3(July 2018), 40–45.
- Azzara, A. K 2022, *Pengolahan Limbah B3 Logam Berat Cadmium (Cd) Di Laboratorium Kualitas Lingkungan Menggunakan Metode Stabilisasi/Solidifikasi, Cd*, <https://dspace.uui.ac.id/handle/123456789/41446%0A>
- Basuki, R. S., Isnain, M. F., Rozi, Poermadjaja, B., & Saptarini 2020, *Prosiding Penyidikan Penyakit Hewan Rapat Teknis Dan Pertemuan Ilmiah (RATEKPIL) dan Surveilans Kesehatan Hewan Tahun 2020*, 2(Group D), 115–122.
- B., Nugraheni, U. R., & Rahayu, M 2021, Vacutainer serum separator sebagai alternatif tabung penampung darah pada pemeriksaan kadar ureum. *The Journal of Muhammadiyah Medical Laboratory Technologist*, 4(1), 81. <https://doi.org/10.30651/jmlt.v4i1.7447>
- Broeders S. Huber I 2020, Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods, *Trends in food Science & Technology*, Vol 37

- Damo, N. Y., Porotu'o, J. P., Rambert, G. I., & Rares, F. E. S 2021, Diagnostik Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) dengan Pemeriksaan Laboratorium Mikrobiologi Klinik. *Jurnal E-Biomedik*, 9(1), 77-86, <https://doi.org/10.35790/ebm.v9i1.31899>
- Devi Kusumawati, S., Hadioanto, I., Alayda Pracoyo, A., & Ayu Handayani, N 2023, Perbandingan Nilai Pengukuran Kuantitatif Isolat Asam Ribonukleat (RNA) Menggunakan Spektrofotometer Nanodrop dan Mikrodrops pada Sampel Hepar Ayam (*Gallus gallus domesticus*), *Indonesian Journal of Laboratory*, 4887, 62-71.
- Dewanata, P. A., & Mushlih, M 2021, Differences in DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15, 1-10, <https://doi.org/10.21070/ijins.v15i.553>
- Didik Wahyudi 2019, Clustering Analysis and Gonome Inference Of Pisang Raja Local Cultivars (Musa Spp) From Jawa Island By Random Ampilified Polymorphic DNA (Rapid) Marker, *Journal Tropical Biodevirsity And Biotechnologi*, vol 04.
- Effendi Mohammad Sofwan 2021, *Prosiding pengembangan profesi pranata laboratorium pendidikan*.
- Endrawati, D., Pribadi, E. S., Indrawati, A., & Kusumaningtyas, E, 2021, Molecular Technique for Dermatophyte Identification Isolated From Pets in Jakarta and Bogor. *Jurnal Veteriner*, 22(1), 56-67, <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2021.22.1.56>
- Enkavi, G., Javanainen, M., Kulig, W., Ro, T., & Vattulainen, I 2019, Multiscale Simulations Of Biological Membranes: The Challenge To Understand Biological Phenomena In A Living Substance. <https://doi.Org/10.1021/Acs.Chemrev.8b00538>

- Erny, Prasetyo, O., Soekanto, A., & Amanda, A 2021, Pengaruh Obesitas Pada Status Imunitas Individu Terhadap Infeksi Virus dan Bakteri, 19(1), 86–94.
- Fatmawati, D., Indrayani, U., & Safitri, A., 2019, Sel, Jaringan dan Metabolisme (Pertama), FK UNISULA.
- Fauziah, P. N., Rohmah, M. K., Umar, F., Wahdi, F. H., Wahyuningsih, E., Setiyabudi, L., Sihombing, M. A. E. M., & Firmansyah 2022, *Biologi Molekuler*.
<https://www.researchgate.net/publication/372134006>
- Farizal, J 2020, Protein Urin Pada Pekerja Buruh Sawit di PT.Palma Mas Sejati Bengkulu Tengah, *Journal of Nursing and Public Health*, 8(1), 54–57,
<https://doi.org/10.37676/jnph.v8i1.1013>
- Furumichi, M., Sato, Y., & Ishiguro-Watanabe, M 2021, *KEGG: Integrating Viruses And Cellular Organisms*, 49 (October 2020), 545–551. <https://doi.org/10.1093/Nar/Gkaa970>
- Gelolodo, M. A., Simarmata, Y. T. R. M. R., Utami, T., Tophianong, T. C., Datta, F. U., Sitompul, Y. Y., Dewi Gaina, C., Diana, N., Foeh, F. K., Deta, H. U., & Pandarangga, P 2023, Diagnosa Penyakit Hewan dengan Teknik Polymerase Chain Reaction di Lingkungan Universitas Nusa Cendana. *International Journal of Community Service Learning*, 7(2), 160–167, <https://doi.org/10.23887/ijcsl.v7i2.55140>
- Guerrero, C. R., Garcia, P. D., & Garcia, R 2019, Subsurface Imaging Of Cell Organelles By.
<https://doi.org/10.1021/Acsnano.9b04808>
- Handayani, S. O., & Putri, D. H 2021, Perbandingan Metode Fenol-Kloroform dan Mini-Prep CTAB Untuk Isolasi DNA Tanaman Cabai (*Capsicum annum L*), *Serambi Biologi*, 6(2), 37–41.

- Hafy, Z., Larasati, V., & Puspita, R. S 2018, Hubungan Lama Penyimpanan Sampel Arsip Jaringan Dalam Blok Parafin Terfiksasi Formalin dengan Kualitas Hasil Ekstraksi DNA Mitokondria Jaringan, *Sriwijaya Journal Of Medicine*, 1(3), 158–163.
- Hedman Johanness & Lavander Moa 2019, Validation guidelines for PCR workflows in bioterrorism preparedness, food safety and forensics, *Accreditation and Quality Assurance*, Vol 23.
- Henggu, K. U., & Nurdiansyah, Y 2021, Review Dari Metabolisme Karbohidrat, Lipid, Protein dan Asam Nukleat, 3, 9 – 17.
- Ismaun, Muzuni, & Hikmah, N (N.D.), Deteksi Molekuler Bakteri *Escherichiacoli* Sebagai Penyebab Penyakit Diare dengan Menggunakan Teknik PCR, *Bioma : Jurnal Biologi Makassar*, 7168, 1–9.
- Iwan, D 2023, Pelatihan Operasional Dasar Mikroskop dan Pengenalan Alat Laboratorium pada Mahasiswa Pendidikan Biologi Universitas Pendidikan Mandalika, *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 3(2), 78-9.
- Jannah, M., Sari, N. K., Mushlih, M., Hariri, M. R., Pratiwi, R. H., Dwi, S., Priyono, Y., Rubiyana, P., Prananingrum, D. A., et al 2021, *Metode biologi molekuler*, www.penerbitwidina.com
- Jauhani, M. A., Rachmania., & S., Yudianto, A 2020, Kualitas dan Kuantitas DNA Pada Bercak Darah Pascapaparan Tanah dan Ultraviolet-C DNA Quality And Quantity On Blood Spot Post Soil And Ultraviolet-C Exposure, 6(3), 181–184.
- Jayanti, L. D., & Mushlih, M 2021, Perbandingan Kualitas DNA Template Hasil Isolasi Metode Resin dengan dan tanpa Sentrifugasi, *Indonesian Journal Of Innovation Studies*, 15, 1–9. <https://doi.org/10.21070/Ijins.V15i.551>
- Kartini, Anggraini, F., Khairuddin, & Supardan, A 2023, *Pengantar Biomolekuler* (A. Wibowo & T. Nurtamin (Eds.); Pertama), Eureka Media Aksara.

- Khariri, Novi Amalia & Sundari Nursafiah 2020, Perkembangan Metode Deteksi Biomolekuler Era 4.0 Mampu Menggantikan Pemeriksaan Laboratorium, Seminar Nasional Riset Kedokteran (SENSORIK).
- Khotimah, D. F., Faizah, U. N., & Sayekti, T 2021, Proceeding Of Integrative Science Education Seminar Protein Sebagai Zat Penyusun dalam Tubuh Manusia: Tinjauan Sumber Protein Menuju Sel, 1, 127–133.
- Kurniasiwati, P., Roosmarinto, R., & Hendarta, N. Y 2023, Gambaran Hasil Pemeriksaan Aktivitas Enzim *Alanine Aminotransferase* (ALT) pada Serum Setelah Disimpan Selama 14 Hari, *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology*, 5(2), 316–319, <https://doi.org/10.33084/bjmlt.v5i2.4866>
- Kuo, C., Ribarska, T., Li, R., Sent, N., Costa, G., & Grummt, I 2019, Isolation And Genome-Wide Characterization Of Cellular DNA: RNA Triplex Structures, 47(5), 2306–2321. <https://doi.org/10.1093/Nar/Gky1305>
- Lestari, I., & Citrawati, S 2023, Konsep Metabolisme Asam Nukleat Dalam Perspektif Al-Qur'an. *Journal of Development and Research in Education*, 4(1), 1–10.
- Lestari, W., Meinar Dwi Rantisari, A. T., & Saleh, A 2023, Deteksi Mutasi A3243G MTDNA pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2 Menggunakan PCR Allele's Specific Amplification (PASA), *SEHATMAS (Jurnal Ilmiah Kesehatan Masyarakat)* 2(3), 752–759, <https://doi.org/10.55123/sehatmas.v2i3.2588>
- Lubis Tyta Rizky Anugrah, & Handayani Dewi Yanti 2023, Knowledge Overview of Uisu Medical Students on Pcr, Antigen, and Antibody Test in Detecting Covid-19, *Jurnal Kedokteran Sains Dan Teknologi Medik*, 6(1), 97–105.

- Maliza, R., Lutfi, S. P., & Dyah, A. P 2021, Uji Kualitas DNA Darah Pada Kertas Whatman Yang Diisolasi Dengan CHELEX-100 Serta Variasi Waktu Penyimpanan. *Surabaya : The Journal of Muhamadiyah Medical Laboratory Technologist*, 2(4), 113–119.
- Maryani, Sismindari & Rumiyati 2021, Validasi Metode *Real-time Polymerase Chain Reaction* Untuk Deteksi DNA Babi (*Sus Scrofa Domesticw*) dan Celeng (*Sus Barbatus*) Pada Sosis Sapi, *Jurnal Ilmiah Indonesia*, Vol 6(8).
- Mattocks Christopher & Matthijs Gert 2019, A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *European jurnal of Human Genetics*, Vol 18.
- Mursyidin, D. H., Nazari, Y. A., Setiawan, D., Prasetyo, R. H. H., & Wahidi, N 2023, Pengenalan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk Meningkatkan Kompetensi Guru Biologi pada Tingkat SMA di Kalimantan Selatan. *Jurnal Pengabdian ILUNG (Inovasi Lahan Basah Unggul)*, 3(1), 66, <https://doi.org/10.20527/ilung.v3i1.9346>
- Mushlih, M 2019, *Biologi Molekuler Aplikasi Dasar di Dunia Kesehatan* (S. B. Sartika (ed.)). UMSIDA Presss.
- Mus, R., Abbas, M., & Agustina, T 2022, Skrining Kesehatan Melalui Pemeriksaan Protein Urine di Kompleks Aditarina Kota Makassar. *Jurnal Mandala Pengabdian Masyarakat*, 3(2), 225–230. <https://doi.org/10.35311/jmpm.v3i2.102>
- Nufus, L. S., Andayani, D., & Pahmi, K 2023, Isolasi Asam Nukleat dari Tanaman Brokoli (*Brassica oleracea L.*), 11(2), 53–55.

- Nurhajri, N. A., Kurniawan, E., & Mentari, I. N 2022, Deteksi Resistensi *Mycobacterium Tuberculosis* terhadap Antibiotik Etambutol dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR). *Media of Medical Laboratory Science*, 6(1), 16–22,
<http://www.lppm.poltekfmh.ac.id/index.php/mmls/article/view/307>
- Nuryady, Moh. M., Husamah, H., Miharja, F. J., Hindun, I., & Patmawati, P 2020, Desain dan Optimasi Primer Gen Pengkode MRPA *Trypanosoma evansi* dan Penerapan pada Pembelajaran Biologi Molekuler, *Jurnal Penelitian Dan Pengkajian Ilmu Pendidikan: E-Saintika*, 4(2), 211,
<https://doi.org/10.36312/e-saintika.v4i2.217>
- Noviantari, A 2020, Prosiding Seminar Nasional Sains Pemanfaatan Teknologi Biologi Sel dalam Dunia Kedokteran Modern Abstrak, 1(1), 121–127.
- Oberacker, P., Stepper, P., Bond, D. M., et al., T. P 2019, Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open Platform for High-throughput Nucleic Acid Extraction and Manipulation. *PloS Biol*, 17(1), pp. 1-16.
- Pertiwi, N. P. D., Mahardika, I. G. N. ., & Watiniasaih, N. L 2010, Optimasi amplifikasi dna menggunakan metode pcr (*Polymerase Chain Reaction*) pada ikan karang anggota famili *Pseudochromidae* (DOTTYBACK). *Jurnal Biologi*, 19(2), 1–5,
<https://ojs.unud.ac.id/index.php/BIO/article/view/21254/14017>
- Prasetyo, E., Triwahju, A., Nunuk, S. M., & Maimun, Z. A 2019, Uji Imunogenitas Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* (Galur Indonesia): Ekspresi TNF- α , IL-17 dan Sel T CD4+ pada Kultur PBMC. *Jurnal Respirologi Indonesia*, 39(3), 160-168.

- Pratiwi, E., & Widodo, L. I 2020, Kuantifikasi Hasil Ekstraksi Gen Sebagai Faktor Kritis Untuk Keberhasilan Pemeriksaan Rt Pcr. *Indonesian Journal for Health Sciences*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.24269/ijhs.v4i1.2293>
- Pusptaningrum, R., Adhiyanto, C., & Solihin 2018, *Genetika Molekuler dan Aplikasinya* (1st Ed.), Deepublish Publisher.
- Putri, N. P., & Junitha, I. K 2015, Kualitas dan Kuantitas DNA Darah Kering Pada Besi Dan Kayu Yang Disimpan Dalam Kurun Waktu Berbeda, *Jurnal Biologi*, 19(1), 21–24.
- Rachmad Saputra, R., Ariefin, M., Kristia, E., Diki Wahyudi, D., Rahman, A., Wayan Prema Mulya Sari, N., et al 2022, Aplikasi Instrumen Spektroskopi FTIR dan Spektrometri Massa di Dunia Kesehatan: Review, *Jurnal Cendekia Kimia*, 02, 2023, <https://e-journal.upr.ac.id/index.php/bohr/RefaiIbrahim2023>, *Biologi Molekuler I Konsep dan Tiori*, CV Budi Utama, <https://doi.org/Bu>
- Raharjo, I., & Kuswadi, D 2020, Kombinasi Proses Presipitasi dan Adsorpsi untuk Menangani Limbah Bahan Berbahaya Beracun (B3) Hasil Kegiatan Analisis di Laboratorium Analisis Polinela. *Jurnal Ilmiah Teknik Pertanian - TekTan*, 12(2), 65–71, <https://doi.org/10.25181/tektan.v12i2.1896>
- R.Danarto & Indwiani Astuti 2021, Expression of Hsa-miR-22-3p on Urin Patients Benign Prostate Hyperplasia (BPH) as Biomarker Non Invasive, *Jurnal Ilmu-ilmu Hayati*, 20(1).
- Sari, I 2023, Edukasi Pengaruh Sampel Darah Pada Teknik Flebotomi Terhadap Pemeriksaan Laboratorium. *Khidmah*, 5(1), 116–123, <https://doi.org/10.52523/khidmah.v5i1.448>

- Saputri, F., Rusdi, B., & Miswar Fattah 2023, Optimasi Metode Polymerase Chain Reaction (PCR) Untuk Identifikasi Polimorfisme Gen SLC01B1 Sebagai Farmakogen Statin. *Bandung Conference Series: Pharmacy*, 1, 145–152. <https://doi.org/10.29313/bcsp.v3i2.8381>
- Setiawan Deni, Prasetyo & Wahidin Natsir 2023, Pengenalan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk Meningkatkan Kompetensi Guru Biologi pada Tingkat Sekolah Menengah Atas di Kalimantan Selatan, *Jurnal Pengabdian Ilung*, Vol 3(1): 66-71.
- Septiani, R. A., Nurhayati, A., & Pujiono, P 2023, Penanganan Limbah Medis Padat Dan Limbah Medis Cair. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, 15(1), 58–69, <https://doi.org/10.34011/juriskesbdg.v15i1.2215>
- Sinaga, A. S., Wulandari, N., Gunawan, F. F., & Apriani, I 2024, Penerapan Metode Gabungan Netralisasi, Koagulasi, Filtrasi dan Adsorpsi dalam Pengelolaan Limbah Cair Laboratorium. *Jurnal Teknologi Lingkungan Lahan Basah*, 12(1), 097, <https://doi.org/10.26418/jtllb.v12i1.73910>
- Siallagan Carolin Sonia, M. S 2022, Visualisasi Gel Akrilamida Sidik Jari DNA 49 Genotipe Padi (*Oryza sativa L*) menggunakan Marka SSR (Simple Sequence Repeat), *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 8.
- Sinaga, Hotman 2011, *Urinalisis*, Multi Sarana, Palembang.
- Suhaemi, Z., Hidayati, S. G., et al 2022, *Intensitas dan Presentase Keberhasilan Isolasi DNA Darah Itik Lokal Sumatera Barat Pada Lama Inkubasi Lysis Sel Yang Berbeda*, 2(2), 293–298.
- Suhartono, M., Ismaya, W., & Retnoningrum, D 2022, *Biokimia Asam Nukleat* (C. Heni (Ed.); 1st Ed.), PT Kanisius.
- Sundari, & Bambang Priadi 2020, Teknik isolasi dan elektroforesis DNA ikan tapah, *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 17(2), 87–90.

- Sriwidarti, Sa'diyah, N., & Utomo, S 2019, Pola Pewarisan Karakter Kualitatif Kacang Panjang (*Vigna Sinensis* Var. *Sesquipedalis* L.) Keturunan Testa Coklat X Hitam. *Jurnal Agrotropika*, 15(1), 43–47.
- Syafrina Ginting, S., & Krisdianilo, V 2021, Seminar Pemeriksaan Dengan Metode *Real Time Polymerase Chain Reaction Assay* (RT-PCR) Sebagai Tes Cepat *Mycobacterium tuberculosis* dari Sampel Dahak Pasien Tuberculosis Di Puskesmas Lubuk Pakam. *Farmatra Jurnal*, 4(1), 500–503. <https://doi.org/10.35451/jpk.v1i2.633>
- Tang, C., He, Z., Liu, H., Xu, Y., Huang, H., Yang, G., Xiao, Z., & Li, S 2020, Application Of Magnetic Nanoparticles In Nucleic Acid Detection. *Journal Of Nanobiotechnology*, 1–19. <https://doi.org/10.1186/S12951-020-00613-6>
- Tetra, D. A., Afif Bakri, A., & Bungalim, M. I 2020, Perbandingan Metode Isolasi DNA Terhadap Nilai Kemurnian DNA untuk Pengujian White Spot Syndrom Virus (WSSV) pada Lobster Bambu (*Panulirus versicolor*), In *Universitas Hasanuddin*.
- Thomy, Z., & Harnelly, E 2018, *Buku Ajar Dasar-Dasar Biologi Sel dan Molekuler* (Pertama), Syiah Kuala University Press.
- Toetik Koesbardiati, A. S. A. Y 2015, Pengaruh Lama Paparan Suhu Kamar Terhadap Kualitas DNA pada Pemeriksaan SWAB Earphone dalam Penentuan Jenis Kelamin. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 17(1), 33. <https://doi.org/10.20473/jbp.v17i1.2015.33-45>
- Trigg, R. M., Martinson, L. J., Parpart-Li, S., & Shaw, J. A 2018, Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature. *Heliyon*, 4(7), e00699. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00699>

- Wardhani, E., & Kamil, F. A 2020, Pengelolaan Limbah B3 di Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Padjadjaran Kota Bandung. *Jurnal Serambi Engineering*, 5(4), 1443–1451, <https://doi.org/10.32672/jse.v5i4.2357>
- Wibowo, S 2023, Examination of urine protein in elderly people at posyandu beringin V Kedungwuni Barat Sub-District With The Dipstic Method. *Jurnal Kesehatan*, 11(1), 151–168.
- Widayat, W., Winarni Agustini, T., Suzery, M., Ni'matullah Al-Baarri, A., & Rahmi Putri, S 2019, Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sebagai Alat Deteksi DNA Babi dalam Beberapa Produk Non-Pangan. *Indonesia Journal of Halal*, 2(1), 26, <https://doi.org/10.14710/halal.v2i1.5361>
- Wijaya, H., Alwi, M. K., & Baharuddin, A 2021, *Analisis Risiko Keselamatan dan Kesehatan Kerja (K3) Dalam Pengelolaan Limbah Medis Rumah Sakit Islam Hasanah Muhammadiyah Mojokerto Di Masa Pandemi COVID-19*, 2(1).
- Wu, J., Liu, J., Li, S., Peng, Z., Xiao, Z., Wang, X., Yan, R., & Luo, J 2020, Detection And Analysis Of Nucleic Acid In Various Biological Samples Of COVID-19 Patients. *Travel Medicine And Infectious Disease*, 37(March), 101673. <https://doi.Org/10.1016/J.Tmaid.2020.101673>
- Wulandari, S. D., Ghoida, S. N., Pangastuti, S., Ni'mah, U., Basri, F. N. A., Saifuddin, M. F., & Puspitasari, E. D 2022, Pengelolaan Limbah Laboratorium Biologi Sma Di Kabupaten Bantul, D.I. Yogyakarta. *Didaktika Biologi: Jurnal Penelitian Pendidikan Biologi*, 6(2), 105, <https://doi.org/10.32502/dikbio.v6i2.4769>
- Yudianto, A 2019, DNA Touch dalam Identifikasi Forensik. In *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 53, issue 9.

- Yulidar, Y., Ramadhan, N., Rosdiana, R., & Wilya, V 2020, Deteksi DNA *Mikrofilaria Brugia malayi* dengan Teknik PCR-Pocket Nucleic Acid Analyzer Pada Nyamuk di Kabupaten Pidie. *Balaba: Jurnal Litbang Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang* *Banjarnegara*, 47–56, <https://doi.org/10.22435/blb.v16i1.2072>
- Yusuf Muhammad, B. S 2022, Studi In Silico Gadolinium (III)-*Diethylene Triamine Pentaacetic Acid*-Folat Dan Modifikasinya Terhadap Reseptor Folat Sebagai Senyawa Pengontras Untuk Deteksi Kanker, *Chimica et Natura Acta*. <https://doi.org/10.24198/cna.v9.n3.36035>

BIODATA PENULIS



Indah Sari, S.Si.T., M.Si

Dosen Program Studi DIV Teknologi Laboratorium Medis
Fakultas Sains dan Teknologi
Institut Ilmu Kesehatan dan Teknologi
Muhammadiyah Palembang

Penulis lahir di Palembang tanggal 19 April 1996, Putri sulung dari pasangan bapak Indra Gunawan dan Ibu Nurlaila. Penulis adalah dosen tetap pada program studi DIV Teknologi Laboratorium Medis, Institut Ilmu Kesehatan dan Teknologi Muhammadiyah Palembang. Menyelesaikan pendidikan DIV Teknologi Laboratorium Medis UNIKA Musi Charitas Palembang dan melanjutkan S2 pada prodi Biologi Forensik Universitas Airlangga Surabaya. Dibalik seorang dosen, penulis merupakan ibu dari Maheera Alzenha Otsutsuki dan Maheera Alzenhi Otsutsuki. Penulis menekuni bidang menulis karena terinspirasi oleh suami tercinta yaitu Sukron, S.Kep, Ns., MNS yang memiliki background sebagai seorang dosen Perawat di kampus yang sama. Semoga Buku ini dapat bermanfaat untuk kita semua. Penulis dapat dihubungi melalui e-mail: iindahsari1917@gmail.com

BIODATA PENULIS



Hani Ammariah, S.Tr.Kes

Staff Laboratorium

Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Universitas PGRI Palembang

Penulis lahir di Kayuagung tanggal 17 Juli 2000, Putri kedua dari tiga bersaudara dari pasangan bapak Isa Ansori dan Ibu Ratis Yupiter. Penulis adalah staff laboratorium pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas PGRI Palembang. Menyelesaikan pendidikan DIV Teknologi Laboratorium Medis di Institut Ilmu Kesehatan dan Teknologi Muhammadiyah Palembang. Semoga buku ini dapat bermanfaat dan menambah informasi untuk kita semua terutama bagi tenaga kesehatan. Penulis dapat dihubungi melalui e-mail: hani.ammariah123@gmail.com

BIODATA PENULIS



Sukron, S.Kep, Ns, MNS

Dosen Program Studi Ilmu Keperawatan
Fakultas Ilmu Kesehatan
Institut Ilmu Kesehatan dan Teknologi Muhammadiyah
Palembang

Penulis Lahir di Tulung Selapan tanggal 8 Februari 1990. Penulis adalah dosen Program Studi S1 Keperawatan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Institut Ilmu Kesehatan & Teknologi Muhammadiyah Palembang. Penulis Menyelesaikan Pendidikan Sarjana (S1) Keperawatan dan Profesi Ners di Institut Ilmu Kesehatan & Teknologi Muhammadiyah Palembang pada tahun 2011 dan 2012, kemudian melanjutkan program Master (S2) di Khon Kaen University Thailand tahun 2016. Penulis sudah lulus sertifikasi dosen pada tahun 2020 dengan jabatan fungsional lektor. Selama berkiprah sebagai seorang dosen, penulis sering mengikuti kegiatan international conference di bidang ilmu Kesehatan dan diundang untuk menjadi narasumber di beberapa seminar nasional dan internasional yang fokus pada pembahasan dalam bidang Kesehatan khususnya kasus-kasus keperawatan medikal bedah, paliatif dan kegawatdaruratan. Penulis juga banyak menghasilkan Hak Cipta (HKI) baik dalam bentuk poster kesehatan, video edukasi kesehatan maupun komik Kesehatan yang digunakan sebagai media untuk penyuluhan di Masyarakat. Penulis dapat dihubungi melalui email: Sukron_90@yahoo.com

BIODATA PENULIS



Egita Windrianatama, S.Tr.A.K., M.Si

Dosen Prodi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis
Fakultas Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Pringsewu

Penulis lahir di Rumbia, 27 Juni 1997 yang merupakan anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Febriansyah dan Ibu Wiwin Windaryuni. Penulis merupakan dosen tetap pada perguruan tinggi Universitas Muhammadiyah Pringsewu Fakultas Kesehatan Prodi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis. Riwayat pendidikan penulis yaitu D3 Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang, D IV Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang dan Program Pascasarjana Ilmu Forensik peminatan Biologi Forensik Universitas Airlangga Surabaya. Penulis mengucapkan rasa syukur kepada Allah SWT atas terselesaikannya penulisan buku ini, serta mengucapkan terima kasih kepada suami tercinta yaitu Gustiadi Saputra, S.Tr.AK., M.Imun yang selalu mendukung dalam setiap pencapaian karir penulis. Semoga buku ini dapat menjadi salah satu referensi literasi dan bermanfaat bagi kita semua. Penulis dapat dihubungi melalui e-mail: egitapuspa27@gmail.com

BIODATA PENULIS



Septiyanti Utami, S.Tr.AK

Pranata Laboratorium Rumah Sakit
Instalasi Laboratorium Patologi Klinis RSD dr. A Dadi
Tjokrodipo Bandar Lampung

Penulis saat ini bekerja di laboratorium pada instalasi laboratorium patologi klinis Rumah Sakit dr. A. Dadi Tjokrodipo Bandar Lampung. Menyelesaikan pendidikan DIII Analisis Kesehatan di Poltekkes Kemenkes Palembang, kemudian DIV Teknologi Laboratorium Universitas Muhammadiyah Semarang. Penulis dapat dihubungi melalui e-mail: septiyantami@gmail.com

