

PENUNTUN PRAKTIKUM  
**BIOTEKNOLOGI**

Disusun oleh:

Dr. Salomo Hutahaean  
Dr. It Jamilah, MSc.  
Dr. Saleha Hannum Nst, MSi



LABORATORIUM GENETIKA DAN BIOLOGI MOLEKULER  
DEPARTEMEN BIOLOGI FMIPA  
UNIVERSITAS SUMATERA UTARA  
MEDAN, 2014

**PENUNTUN PRAKTIKUM**  
**PRODUKSI DAN ISOLASI SENYAWA ANTIMIKROB DARI *Bacillus* sp.**

**Dr. It Jamilah, M.Sc.**

## PENDAHULUAN

### Senyawa Antimikrob dari *Bacillus*

Antibiotik tersebar luas di alam, dimana bahan ini memiliki peranan yang penting dalam mengatur populasi mikrob di tanah, air, limbah dan kompos. Umumnya antibiotik diperoleh dari sekelompok kecil mikrob dari genus *Penicillium*, *Streptomyces*, *Cephalosporium*, *Micromonospora* dan *Bacillus* (Park *et al.* 1998). Pada industry Farmasi beberapa antibiotik yang penting yang dihasilkan oleh *Bacillus* ialah basitrasin, polimiksin, gramisidin, tirosidin, subtilin dan basilisin. Mayoritas antibiotik *Bacillus* sp. merupakan peptida berberat molekul rendah, diproduksi pada lintasan biosintetik nonribosom yang melibatkan enzim spesifik yang disebut peptide sintetase. Peptida-peptida ini memiliki berbagai aktivitas biologi yang luar biasa, termasuk aktivitas antimikrob, antivirus, antitumor (Cane *et al.* 1998).

Senyawa antimikrob diproduksi secara luas oleh bakteri. Bakteriosin dan senyawa-senyawa penghambat mirip bakteriosin (BLIS) ialah antimikrob peptida yang disintesis di ribosom. Senyawa ini diproduksi oleh sejumlah bakteri yang biasanya efektif melawan spesies yang berhubungan dekat (Riley & Wertz 2002). Bakteriosin diklasifikasikan ke dalam beberapa kelompok. Bakteriosin Klas I (lantibiotik) merupakan peptida kecil yang terbentuk pada modifikasi *post-translational* untuk menghasilkan peptide aktif contoh: nisin. Nisin merupakan bakteriosin yang paling banyak dipelajari, aktif terhadap spektrum yang luas bakteri pembusuk makanan dan bakteri patogen termasuk *Listeria monocytogenes* (Delves-Broughton 1990). Bakteriosin klas II: stabil terhadap panas, berberat molekul rendah, peptide yang aktif pada membrane. Anggota kelompok III merupakan protein labil terhadap panas dan kelas ke-empat merupakan bakteriosin kompleks (Klaenhammer 1993).

Antibiotik ialah produk metabolik dari jalur biosintesis kompleks pada mikrob, biasanya diproduksi oleh bakteri pembentuk spora aerobik dari genus *Bacillus* dan *Streptomyces* dan pada jamur *Penicillium* dan *Cephalosporium*. Antimikrob seperti bakteriosin ialah peptida atau protein inhibitor yang memiliki efek bakterisidal terhadap mikroorganisme yang berhubungan dekat dengan produser (Okulate 2009).

Beberapa genus *Bacillus* memiliki sejumlah spesies bakteriosigenik seperti *B. subtilis* menghasilkan subtilin (Jansen & Hirschmann 1944) dan subtilisin (Zeng & Slavik 1999), *B. coagulans* yang menghasilkan koagulin (Hyronimus *et al.* 1998), *B. megaterium* memproduksi megasin (von Tersch & Carlton 1983). *B. thungeriensis* digunakan untuk

mngontrol berbagai insek patogen di bidang pertanian berupa protein Kristal (d-endotoksin) (Beegle & Yamamoto 1992).

Kelompok *Bacillus* dikenal sebagai penghasil senyawa antimikrob potensial. *Bacillus cereus* menghasilkan senyawa antimikrob yang disebut basitrasin (cerein). Senyawa ini aktif dalam menghambat strain lain *B. cereus* tapi tidak untuk bakteri lain. Cerein terdeteksi pada kultur supernatan pada fase pertumbuhan supernatant pada fase pertumbuhan stasioner dan produksinya terhambat pada saat sporulasi (Naclerio *et al.* 1993). Berat molekul senyawa ini berkisar 9.000 Da dan stabil setelah berbagai perlakuan kimia maupun fisika. Berdasarkan spesifitasnya bakteriosin potensial sebagai agent antimikrob untuk *B. cereus* tanpa mengganggu pertumbuhan bakteri lain.

### **Alat dan Bahan**

Alat utama : autoklaf, sentrifus, laminar, cawan petri, erlenmeyer, jarum ose, mikropipet, pipet volum, bunsen, tabung scotch, tabung sentrifus, batang pengaduk, magnetik stirer

Bahan : bacto pepton, yeast ekstrak, gliserol, air laut, akuades, nutrient agar (NA), bufer fosfat, NaCl, Larutan Mac Farland

### **Metode**

#### **Persiapan Kutur Bakteri**

Isolat stok murni (*Bacillus* sp. dan isolat *E coli*, *Salmonella* sp. dan *Staphylococcus* sp.) disubkultur pada media SWC-agar dengan metode cawan gores. Disiapkan media SWC-agar pada cawan petri steril, dibiarkan satu malam. Kutur stok diambil 1 ose digores pada cawan berisi media yang telah disiapkan, diinkubasi 24-48 jam. Koloni terpisah siap digunakan.

#### **Deteksi Senyawa Antimikrob *Bacillus***

Stok kultur murni *Bacillus* spp. diremajakan pada media SWC-agar. Untuk mengetahui kemampuan isolat ini menghasilkan senyawa antimikrob, dilakukan ujiantang sel terhadap bakteri patogen yang diisolasi dari tambak udang. Isolat yang dipakai ialah *E.*

*coli*, *Salmonella* sp. dan *Staphylococcus* sp. (asal tambak udang). Sebanyak 1 ose biakan bakteri target disebar pada permukaan media agar-agar SWC.

Kultur *Bacillus* sp. umur 24 jam diinokulasikan sebanyak satu ujung tusuk gigi pada SWC padat yang ditumbuhkan bakteri uji dengan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Bakteri yang memproduksi senyawa antimikrob akan membentuk zona bening (zona hambatan) disekitar koloninya. Diukur besar masing-masing zona yang terbentuk.

$$\text{Zona hambatan} = \text{diameter zona bening (dz)} - \text{diameter koloni (dk)}$$

$$\text{Indek hambatan} = \frac{\text{dz} - \text{dk}}{\text{dk}}$$

### **Isolasi dan Produksi dan Aplikasi Senyawa Antimikrob**

Senyawa antimikrob dari *Bacillus* sp. diproduksi dengan cara mengkulturkan *Bacillus* sp pada media SWC cair pada suhu ruang, digoyang 120 rpm selama 18 jam. Diambil 20 ml kultur kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 x g, suhu 4 °C selama 15 menit. Disiapkan kertas cakram ditetesi dengan 30 ul supernatan yang mengandung senyawa antimikrob, kemudian ditakan ditengah biakan bakteri patogen. Kontak senyawa antimikrob dengan bakteri target dibiarkan 24-24 jam. Kontrol ialah supernatan yang direndam dengan akuades steril, lalu diperlakukan sama dengan sampel.

--Selamat Bekerja--

IJ

**PENUNTUN PRAKTIKUM**  
**ISOLASI DNA PLASMID**  
**ELEKTROFORESIS DNA PLASMID PADA GEL AGAROSE**  
***POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)***

**Dr. Saleha Hanum, Msi.**

## ISOLASI DNA PLASMID

### Dasar Teori

Plasmid merupakan DNA ekstrakromosom yang dikenal pada bakteri, berutas ganda, dan berbentuk sirkuler. Plasmid memiliki ukuran yang relatif kecil dan terletak di luar kromosom dalam sel prokariot khususnya bakteri dan sel eukariot tingkat rendah seperti khamir. Plasmid mengalami duplikasi sebelum pembelahan sel inang. Plasmid biasanya digunakan dalam teknologi DNA rekombinan menggunakan *Escherichia coli* sebagai inang sehingga dalam rekayasa genetika, plasmid sering digunakan sebagai vektor untuk membawa gen-gen tertentu yang diinginkan ke dalam suatu sel inang.

Isolasi DNA plasmid merupakan sesuatu yang penting dalam rekayasa genetika, sebelum bakteri disisipi oleh plasmid rekombinan yang telah tersisipi oleh gen target, maka perlu disiapkan terlebih dahulu plasmid sebagai vector. Keberhasilan dalam mempersiapkan plasmid dengan kualitas yang baik sangat diperlukan, terlebih lagi tingkat kemurnian plasmid apabila akan digunakan untuk sequencing, PCR, cloning, dan restriction digestion.

Isolasi DNA plasmid secara manual menggunakan 3 jenis larutan buffer lysis, larutan I adalah larutan dengan komposisi glukosa konsentrasi tinggi. Seperti pada prinsip difusi-osmosis, jika ada larutan yang konsentrasi tinggi masuk dalam sel, dengan sendirinya membran sel akan rusak. Kemudian pemberian larutan II yang harus fresh (NaOH dan SDS). Larutan II mengandung NaOH sebagai alkali, yang berfungsi merusak membran sel, dan SDS adalah sabun yang juga untuk menghancurkan membran sel. Larutan III berguna untuk netralisasi, yaitu menetralkan pH untuk menghentikan denaturasi DNA kromosomal sehingga terbentuk presipitat DNA kromosom yang menempel dengan debris seluler, dan memisahkan DNA plasmid yang larut di dalam supernatan.

## Alat dan Bahan Praktikum

Adapun alat-alat yang digunakan dalam praktikum yaitu :

1. Mikro pipet
2. Mesin vortex
3. Mesin sentrifugasi (sentrifius)
4. Tube 2 mL
5. Gloves (sarung tangan)

## Bahan Praktikum

Adapun bahan - bahan yang digunakan dalam praktikum yaitu :

1. Kultur bakteri *E.coli*
2. Buffer Lysis

Larutan I	Larutan II	Larutan III
50 mM glucose	0.2 N NaOH (harus fresh)	5 M potassium acetate 60 ml
25 mM Tris-Cl (pH 8.0)	1 % SDS	Acetic acid glacial 11.5 ml
10 mM EDTA (pH 8.0)		H <sub>2</sub> O 28.5 ml

3. Phenol : Cloroform ( 1 : 1)
4. Etanol absolute
5. Etanol 70 %
6. ddH<sub>2</sub>O

## Metode Praktikum

1. Kultur bakteri 1.5 mL dimasukkan ke dalam tube berukuran 2 mL, disentrifuge 8000 rpm selama 5 menit.
2. Buang supernatant dan resusupensikan pellet dengan 200 µl larutan I dingin. Campur merata dengan menggunakan vortex.
3. Tambahkan 200µl larutan II.Campur dengan merata dengan cara membolak balik tabung dengan cepat ± 8 kali (jangan menggunakan vortex!).



4. Tambahkan 150 $\mu$ l larutan III dingin. Bolak-balik  $\pm$  10 kali. Simpan dalam es selama 3-5 menit.
5. Sentrifugasi (12,000 rpm) selama 5 menit pada suhu 4°C , supernatant diambil dan pindahkan ke tabung lain.
6. Tambahkan phenol:chloroform 1 x volume, vortex sampai bercampur.
7. Sentrifugasi (12,000 rpm) selama 5 menit pada suhu 4°C, dan supernatant dipindahkan ke dalam tabung lain.
8. Tambahkan etanol (2x volume supernatant ) untuk mempresipitasikan DNA, bolak balik agar tercampur, kemudian diinkubasi 10 menit di es (freezer).
9. Sentrifugasi 12,000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, buang supernatant.
10. Pelet dibilas dengan ethanol 70% (dingin) kemudian sentrifugasi seperti cara no 9.
11. Supernatan dibuang dan tabung dibalikkan untuk mengeringkan selama 10 menit.
12. Resuspensi DNA dengan 25  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

## ELEKTROFORESIS DNA PLASMID PADA GEL AGAROSE

**Tujuan :** Mendeteksi DNA plasmid pada gel agarose

### Dasar Teori

Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen/molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik (Westermeier, 2004). Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Dengan demikian elektroforesis dapat digunakan untuk separasi makromolekul (seperti protein dan asam nukleat). Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan matriks penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan. Gel poliakrilamid dan agarosa merupakan matriks penyangga yang banyak dipakai untuk pemisahan protein dan asam nukleat.

Metode elektroforesis tersebut pada prinsipnya melibatkan fase stasioner yang berupa gel agarosa dan fase gerak berupa buffer Tris-acetate EDTA (TAE) atau Tris-borat EDTA (TBE). TBE (Tris-borat EDTA) 1X, Tris/Borat merupakan buffer yang umum digunakan sebagai buffer elektroforesis karena memiliki kapasitas buffering yang tinggi pada titik isoelektriknya. Borat bertindak sebagai conducting ion sehingga dapat mempertahankan kesetimbangan ion  $H^+$  dan  $OH^-$  yang dihasilkan oleh elektrode, hal ini berhubungan dengan fungsi buffer dalam menjaga kesetimbangan pH saat migrasi fragmen DNA berlangsung, perubahan pH dapat mendenaturasi struktur DNA sehingga merubah elektromobilitas DNA.

DNA merupakan molekul bermuatan negative, sehingga bila diletakkan di medan listrik, DNA akan bergerak dari kutub negative ke kutub positif. Prinsip inilah yang dipakai dalam elektroforesis untuk memisahkan molekul-molekul DNA. Pergerakan ini kecepatannya tergantung dari: ukuran molekul DNA, kerapatan (konsentrasi) gel yang dilalui DNA, dan arus listrik yang diberikan untuk memigrasikan molekul DNA. Semakin kecil ukurannya, DNA akan bermigrasi semakin cepat. Semakin rapat media (gel) yang digunakan semakin lambat pergerakan DNA di dalam gel. Dan semakin kuat arus listrik yang diberikan akan semakin cepat migrasi DNA.

Pergerakan plasmid di dalam agarose juga berbeda sesuai dengan bentuknya. Sehingga hasil elektroforesis plasmid di gel agarose akan ada beberapa pita. Plasmid

memiliki bentuk yang beragam, antara lain: *Supercoiled (covalently closed-circular)*, *relaxed circular* yang kedua ujung DNA menyatu dan berbentuk sirkuler, dan *nicked open circular* yang terpotong pada salah satu sisi ujung DNA.

DNA yang akan dimigrasikan di gel agarose harus dicampur terlebih dahulu dengan larutan penyangga muatan pewarna (loading buffer/dye). Visualisasi DNA selanjutnya dilakukan di bawah paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dahulu gel dalam pembuatannya ditambahkan larutan etidium bromid. Cara lain untuk melihat visualisasi DNA adalah gel direndam di dalam larutan etidium bromid sebelum dipaparkan di atas sinar ultraviolet.

Pada praktikum ini, para praktikan diharapkan dapat mengamati DNA plasmid.

## **Alat dan Bahan**

### **Alat**

1. Pemanas (hot plate/ pemanas bunsen/kompor listrik/microwave)
2. Alat elektroforesis
3. enlemeyer
4. Seperangkat Alat Elektroforesis
5. Gelas ukur
6. Mikropipet dan tipnya
7. Gel doc (1 set)

### **Bahan**

1. TAE (Tris acetat EDTA) 1X
2. Agarose
3. DNA marker, misalnya 1 Kb Ladder
4. DNA
5. Kertas Parafilm
6. Larutan Etidium Bromid (EtBr)

## **Prosedur Kerja**

1. Buat gel agarosa 1% dengan cara menimbang agarosa 0,2 g untuk dilarutkan ke dalam bufer TAE 1x hingga volume 20 ml. Larutan agarosa dididihkan hingga larut sempurna.
2. Siapkan baki gel agarosa, dan pasang sisir elektroforesis di salah satu ujung baki gel agarosa dengan posisi hampir menyentuh dasar baki

3. Periksa suhu larutan agarosa dengan cara menempelkan erlenmeyer ke tangan, jika suhunya sudah turun hingga sekitar 50-60 °C. Larutan agarosa dihomogenkan sebentar, kemudian tuangkan larutan ke dalam baki gel agarosa, biarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat.
4. ambil sisir dengan hati-hati, masukkan baki yang telah berisi gel agarosa ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan larutan bufer TAE 1x (pastikan bahwa gel terendam seluruhnya dalam TAE).
5. siapkan sekitar 5 cm kertas parafilm di dekat tangki elektroforesis.
6. masukkan 10 µl sampel DNA dan 2 µl loading dye 6x ke dalam sumuran gel agarosa dengan cara mencampurkan kedua bahan tersebut terlebih dahulu secara merata pada kertas parafilm menggunakan mikropipet.
7. buatlah catatan mengenai nomor sumuran dan jenis sampel DNA yang dimasukkan.
8. hubungkan kabel dari sumber arus ke tangki elektroforesis (pastikan bahwa kabel yang tersambung ke kutub negatif berada di dekat sumuran; jika tidak demikian, ubahlah posisi baki/gel ke arah sebaliknya).
9. Mengatur volatase dan waktu running hingga diperoleh angka 80 V dan 30 menit dengan cara menekan tombol yang sesuai pada sumber arus.
10. jalankan elektroforesis (lakukan running) dengan cara menekan tombol run pada sumber arus.
11. elektroforesis akan berhenti apabila waktu yang ditetapkan sudah habis,. keluarkan gel dan rendam dalam larutan ethidium 10 menit, kemudian air 5 menit. (PERINGATAN : Hati-hati EtBr bersifat karsinogenik)
12. Letakkan gel diatas UV transluminator, dan nyalakan UVnya. Amatii pita-pita DNA yang tervisualisasi dan ukurannya. Bedakan pita DNA yang supercoil, sirkuler dan linear.

## ***POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)***

**Tujuan :** Memahami dan dapat melakukan teknik PCR menggunakan DNA plasmid.

### **Dasar Teori**

*Polymerase chain reaction* (PCR) merupakan salah satu teknik yang paling penting dalam biologi molekuler. Teknik tersebut bertujuan untuk memperbanyak DNA secara *in vitro* dalam suatu reaksi termal. Prinsip kerja PCR melalui mekanisme perubahan suhu. Setiap siklus reaksi PCR terdiri atas tiga tahap perubahan suhu, yaitu denaturasi, annealing, dan polimerisasi (sintesis DNA). Denaturasi berlangsung pada suhu 94°C selama 30 detik. Pada tahap denaturasi, reaksi enzimatik berhenti dan ikatan hidrogen terputus sehingga DNA untai ganda berpisah menjadi DNA untai tunggal. Annealing berlangsung pada suhu  $\pm 55$  °C (bergantung primer yang digunakan) selama 30 detik. Pada tahap tersebut primer akan menempel pada DNA template di tempat yang berkomplemen dengan sekuens primer. Tahap terakhir yaitu polimerisasi berlangsung selama 1 menit pada suhu 72 °C merupakan proses pemanjangan primer menggunakan untai tunggal DNA sebagai cetaknya. DNA polymerase akan memasang dNTP yang sesuai dengan pasangannya. Waktu yang dibutuhkan dalam setiap tahapan dapat disesuaikan dengan template yang akan diamplifikasi.

Reaksi enzimatik dalam PCR menggunakan *reaction mixture* dengan komposisi enzim DNA polymerase yang bersifat termostabil dan buffer, fragmen DNA yang pendek untuk inisiasi disebut primer, template DNA (cetakan DNA yang akan diamplifikasi), dNTP, dan air. Enzim DNA polymerase yang digunakan di dalam PCR dikenal juga dengan taq polymerase yaitu enzim polymerase bersifat termostabil yang diisolasi dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Bufer berfungsi untuk mengkondisikan reaksi agar berjalan optimum dan menstabilkan enzim DNA polymerase. Primer berfungsi untuk inisiasi sintesis DNA pada sekuens target yang spesifik oleh enzim DNA polymerase. Primer dirancang dengan memiliki sekuens yang komplemen dengan DNA template sehingga dapat mengagap daerah tertentu yang diinginkan. Syarat primer yang baik antara lain memiliki panjang basa olinukleotida antara 18-24 basa. dNTP (*deoxynucleoside triphosphate*) sebagai

pembentuk basa komplementer dan penyusun DNA, terdiri atas 4 macam sesuai dengan basa penyusun DNA, yaitu dATP, dCTP, dGTP dan dTTP.

### **Alat dan Bahan**

#### **Alat**

8. Mesin PCR
9. Pipet Mikro dan tip
10. Tube PCR

#### **Bahan**

1. Template DNA Plasmid
2. Primer
3. Taq Polymerase dan Buffer
4. dNTP
5. ddH<sub>2</sub>O

### **Prosedur Kerja**

1. Siapkan tabung PCR dan diisi dengan mix PCR (semua bahan mix PCR selalu berada di dalam es) sebagai berikut:

#### **Komposisi PCR**

No	Komposisi	Jumlah ( $\mu$ l )
1.	10 x PCR buffer	2
2.	Primer forward (10 pmol/ $\mu$ l)	1
3.	Primer reverse (10 pmol/ $\mu$ l)	1
4.	dNTP mix (2 mM/ $\mu$ l)	2
5.	DNA Plasmid (100ng/ $\mu$ l)	1
6	ddH <sub>2</sub> O	13
	Volume	20

2. Mesin PCR diset dengan suhu denaturasi 94°C 30 detik, annealing 50°C 30 detik, sintesis DNA 72°C 1 menit, dan 40 siklus.
3. Masukkan tabung PCR ke dalam mesin dan RUN.

**Penuntun Praktikum**  
**Ekstraksi antibodi IgY dari telur ayam**

Oleh

Dr. Salomo Hutahaean

### Hal-hal yang perlu diingat selama pelaksanaan praktikum:

1. Pekerjaan ekstraksi antibodi tergolong pekerjaan laboratorium yang bersifat aseptik. Bekerjalah dengan sedapat-dapatnya menerapkan prinsip-prinsip kerja aseptik yang sudah Anda peroleh dalam praktikum sebelumnya, seperti praktikum mikrobiologi.
2. Peralatan dan bahan-bahan yang digunakan dalam praktikum, selain sulit didapat juga mahal-mahal harganya. Daripada merusak dan harus menggantinya, lebih baik Anda berhati-hati dalam bekerja.
3. Dalam praktikum ini, hasil akhir berupa molekul IgY hanya mungkin diperoleh melalui pekerjaan yang tekun dan mengikuti prosedur tahap demi tahap. Ketidaktepatan pada salah satu tahap di hari pertama akan terlihat pengaruhnya pada hasil di hari kedua. Untuk itu, bekerjalah secara cermat dan terencana.

### Acara Praktikum: Ekstraksi antibodi IgY dari telur ayam

#### Bahan:

1. Dua butir telur ayam per kelompok. Telur yang digunakan adalah telur ayam yang dihasilkan dari induk ayam kampung yang telah diimunisasi dengan antigen berupa peptide c-Myc.
2. Kit ekstraksi antibodi *IgY Eggspress Purification Kit* dari perusahaan Gallus Immunotech. Inc. Pada kit terdapat dua botol reagen : Reagen A dan Reagen B.
3. Posphat Buffer Saline (PBS) pH 7,2
4. Akuades

#### Alat:

1. Egg separator
2. Petri dish
3. Gunting kecil
4. Pipet plastik
5. Gelas beaker 200 ml
6. Tabung sentrifus
7. Kertas tissue dan lap kain
8. Magnetic stirer dan spin rod
9. Refrigerator
10. Sentrifus dingin
11. Spektrofotometer
12. Filter 0,22  $\mu$ m disposable
13. Tabung reaksi kecil
14. Lembar kerja



Gambar 1. Sebagian dari peralatan yang digunakan dalam praktikum ekstraksi antibody IgY dari telur ayam



## Hari Pertama: Preparasi

Cara kerja:

1. Perhatikan bahwa telur dan Reagen A telah disimpan terlebih dahulu di dalam refrigerator pada suhu sekitar 4°C sebelum digunakan. Pastikan bahwa keduanya masih dalam keadaan dingin saat akan digunakan dan tetap terjaga pada suhu rendah selama pekerjaan.
2. Isikan data yang tertulis pada kulit telur ke dalam lembar kerja.
3. Pecahkan telur dan tuang isinya ke dalam *egg separator* secara perlahan. Hati-hati jangan sampai kuning telur pecah. Tampung pada petri dish putih telur yang keluar dari lubang di sisi alat. Gunakan gunting kecil untuk memotong putih telur yang menggantung. Usahakan agar yolk bebas sepenuhnya dari putih telur.



Gambar 2. Egg separator digunakan untuk memisahkan putih telur dari yolk

4. Cuci yolk dengan cara menuang akuades ke atas yolk. Setelah itu, pindahkan yolk ke dalam petri dish baru.
5. Dengan menggunakan ujung gunting, buat lubang kecil di puncak yolk yang cukup untuk tempat menyisipkan ujung pipet plastik. Ambil (sedot) 1 mL yolk dan pindahkan ke dalam beaker glass.
6. Masukkan batang pengaduk (magnet) ke dalam beaker glass, lalu tempatkan beaker glass tersebut di atas stirer plate. Hidupkan mesin stirer dan atur motor pada angka di antara 1 dan 2 (gerak memutar magnet perlahan-lahan, jangan sampai terbentuk buih). Pengaturan suhu pada alat jangan dihidupkan. Dengan menggunakan spuit injeksi ambil 5 mL Reagen A dan teteskan perlahan-lahan ke dinding dalam beaker glass. Biarkan sediaan diaduk oleh putaran magnet hingga tercampur sempurna (4-5 menit).



Gambar 3. Mesin stirrer dikombinasi dengan hotplate (A). Pengatur kecepatan adukan (putaran batang magnet) adalah tombol hijau di sebelah kiri, tombol kanan untuk pengatur suhu. Pada praktikum ini pengatur suhu tidak dihidupkan, plate dibiarkan dingin. Gambar (B) menunjukkan cara pemberian Reagen A ke sediaan yolk.

7. Setelah tercampur sempurna (homogen), tuang sediaan ke dalam tabung sentifus. Beri label pada tabung sentrifus, tuliskan nama kelompok Anda pada label.
8. Masukkan tabung ke dalam refrigerator dan biarkan semalaman. Isikanlah data pada lembar kerja kelompok Anda.
9. Jangan lupa, bersihkan meja kerja dan peralatan Anda sebelum meninggalkan ruang laboratorium.

**Hari kedua:**

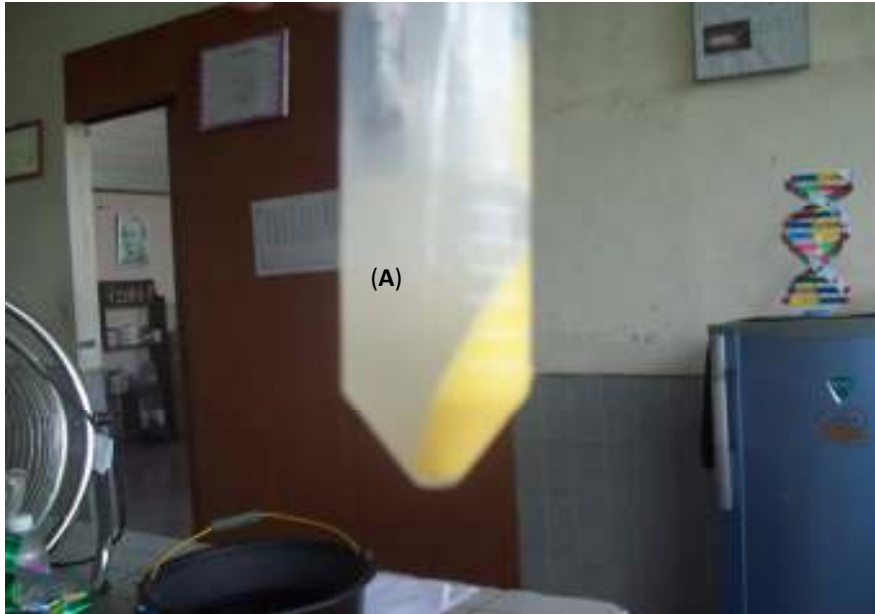
**A. Ekstraksi dan Kuantifikasi IgY**

1. Ambil tabung sentrifus berisi sediaan dari dalam refrigerator. Aduk isi tabung perlahan dengan cara memutar-mutar tabung.
2. Bawa tabung ke ruang sentrifus (Lab. Sentral). Perhatikan bahwa asisten lab telah melakukan pengaturan pada alat sentrifus sebagai berikut:
  - a. Pre cold untuk suhu 4°C
  - b. Kecepatan putaran pada 4.000 x g
  - c. Waktu sentifusi 20 menit
3. Masukkan tabung ke dalam sentrifus. Untuk satu kali putaran alat dapat memuat 6 tabung, karena itu sebaiknya kelompok praktikan diminta untuk saling menunggu sehingga tiga kelompok menggunakan alat sekaligus (6 tabung). Jalankan sentrifus sesuai dengan pengaturan di atas (dipandu oleh asisten).



Gambar 4. Mesin sentrifus dingin. Mesin sentrifus bekerja memisahkan komponen suatu larutan dengan cara memutarnya dengan kecepatan tinggi. Mesin ini dapat diatur kecepatan, suhu, dan waktu

4. Setelah sentrifusi, perhatikanlah bahwa sediaan pada tabung telah terpisah menjadi 2 lapisan, yaitu supernatan berupa cairan tembus pandang di lapisan atas dan pelet berupa endapan kuning di dasar tabung. Bawalah kembali tabung ke ruang praktikum.



Gambar 5. Hasil sentrifusi: supernatan (A) dan pelet (B).

5. Dengan menggunakan mikropipet, pindahkan supernatan ke dalam beaker glass bersih. Buang pelet kuning dan cuci kembali tabung sentrifus hingga bersih, lalu bilas dengan akuades. Jangan lupa, catat volume supernatan dan isikan ke dalam lembar kerja. Tambahkan Reagen B (volume sama dengan volume supernatan tadi) ke dalam beaker glass secara perlahan-lahan di atas stirer seperti yang dilakukan ketika mencampur yolk dengan Reagen A. Setelah homogen (4-5 menit), pindahkan sediaan ke dalam tabung sentrifus dan diamkan selama satu jam di dalam refrigerator.
6. Sentrifus kembali sediaan dengan pengaturan suhu, kecepatan, dan waktu yang sama dengan sentrifusi pertama. Jika Anda bekerja dengan baik, setelah sentrifusi maka pada dasar tabung akan terdapat endapan putih (IgY). Buanglah supernatan dengan cara menuanginya ke dalam wadah yang tersedia. Tambahkan PBS sebanyak volume awal yolk (1 mL). Goyangkan tabung perlahan-lahan hingga endapan larut.

## **B. Kuantifikasi hasil**

1. Kuantifikasi IgY dilakukan dengan spektrofotometer. Perhatikan bahwa peralatan spektrofotometer terdiri atas mesin spektro (mesin ini menggunakan sinar uv) dan perangkat printer pencetak hasil data. Dengan menggunakan mikropipet, pindahkan 300  $\mu$ L IgY ke dalam tabung reaksi kecil, encerkan 20 X dengan cara menambahkan PBS sebanyak 6 X 950  $\mu$ L. Ambil dua cuvet spektrofotometer, isi masing-masing dengan sediaan sampai batas garis pada cuvet.
2. Dengan dipandu asisten, masukkan cuvet ke dalam mesin spektrofotometer. Ukur absorbansinya (Abs) pada panjang gelombang 280 nm. Catat hasil pada lembar kerja Anda.



Gambar 6. Perangkat alat spektrofotometer

3. Tentukan konsentrasi IgY dengan cara:

$$\text{Abs\#1} = \underline{\hspace{2cm}} \quad \text{Abs\#2} = \underline{\hspace{2cm}} \quad \text{Abs. rataan} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\text{Konsentrasi IgY} = \frac{\text{Abs. Rataan} \times 20}{1,35} = \underline{\hspace{2cm}} \text{ mg/mL}$$

4. Isikan konsentrasi IgY Anda pada lembar isian.

### C. Sterilisasi menggunakan filter

1. Teknik ini disebut dengan syringe sterilization. Sterilisasi dilakukan di ruang hood. Dengan menggunakan tangan kanan, masukkan (sedot) sediaan IgY ke dalam syringe. Lepaskan jarum injeksi dari ujung syringe. Buka plastik pembungkus filter dengan tangan kiri, lalu masukkan ujung syringe ke lubang di atas filter. Putar syringe searah jarum jam hingga mengunci filter. Angkat dan letakkan filter ke mulut tabung steril lalu tekan perlahan spuit hingga sediaan menetes dari ujung bawah filter masuk ke dalam tabung.
2. Setelah filtrasi selesai, tutup tabung dan simpan sediaan di dalam refrigerator pada suhu sekitar 4 °C.



Gambar 7. Cara sterilisasi menggunakan filter disposable dengan bantuan spuit injeksi (Syringe sterilization)