

KURSUS TEKNIK BIOLOGI MOLEKULER DAN MIKROTEKNIK

Di Laboratorium Biologi Molekuler, Histologi dan Biologi Sel, Fakultas Kedokteran UGM.

Dewi Marbawati*, Endang Setiyani*

Kegiatan kursus dilaksanakan selama 4 hari dibagi menjadi 2 bagian. Dua hari pertama adalah pelatihan Teknik Biologi Molekuler dilanjutkan dengan kursus Mikroteknik pada 2 hari berikutnya. Kegiatan kursus diikuti oleh peneliti dan klinisi pada bidang kedokteran sehingga dapat diaplikasikan pada penelitian, pengajaran dan pelayanan kedokteran di Indonesia. Kursus diikuti oleh peserta dari berbagai instansi seperti Universitas Gajah Mada (UGM), Universitas Diponegoro (UNDIP), Universitas Islam Negeri (UIN) Yogyakarta, Universitas Sultan Agung Semarang, berbagai UPT Badan Litbang Depkes seperti Lokalitbang Banjarnegara, Loka Litbang Ciamis, dsb.

Kursus teknik Biologi Molekuler menitik beratkan pada teknik dasar Biologi molekuler, seperti isolasi DNA darah, PCR (*Polymerase Chain Reactions*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Elektroforesis, Sequencing DNA serta penelusuran gene bank melalui internet. Teknik biologi molekuler merupakan alat yang penting untuk membedakan organisme atau mikroorganisme walau hanya menunjukkan perbedaan susunan genetik yang sangat kecil. Hal ini dapat merupakan alat yang memberikan pandangan yang lebih realistis di bidang ilmu dasar dan aplikasi kesehatan masyarakat khususnya dalam studi spesifik yang menargetkan gen atau mikroorganisme tertentu pada studi epidemiologi akibat kelainan gen tertentu pada individu.

Praktek Isolasi DNA, PCR dan RFLP (inkubasi) dipandu oleh Ibu Susanna H Hutajulu dengan dibantu oleh beberapa asisten dilaksanakan di laboratorium Biomelekuler. Dalam prakteknya peserta melakukan pengambilan reagen/bahan (*hand's on*). Prinsip dalam proses megekstraksi DNA dari sampel darah adalah :

- Disrupsi sel untuk mengeluarkan kandungan kandungannya (dilakukan dengan cara buffer lisis dan sentrifugasi)
 - Membuang komponen komponen non asam nukleat (misal protein dan debris) sehingga hanya tinggal DNA yang tersisa. Dilakukan dengan sentrifugasi, secara enzimatis (proteinase, RNAse), phenol, chloroform, SDS (*sodium dodecyl sulphat*).
 - Mengkonsentrasikan DNA (presipitasi dengan

ethanol)

- Menyimpan DNA dalam larutan fisiologis (misal TE, H₂O)

Kemajuan dramatis di bidang biologi molekuler dipicu dengan penemuan monumental reaksi berantai polimerasi materi genetis secara *in vitro*, yang populer disebut PCR. Di dalam reaksi PCR, diperlukan DNA, dNPTs, enzim polimerase, bufer, dan pencetak (*primers*). Ada 3 langkah utama dalam reaksi PCR, dimana langkah langkah tersebut diulang dalam 30 40 siklus. Teknik ini dilakukan oleh suatu *automated cycler* dimana tube berisi DNA dan campuran reaksi PCR akan mengalami pemanasan dan pendinginan dalam waktu yang sangat singkat. Langkah langkah reaksi PCR adalah :

- Denaturasi, umumnya dilakukan pada suhu 94 98°C. Selama denaturasi *double stranded* DNA akan meleleh dan terpisah menjadi *single stranded* DNA, reaksi enzimatis lain akan terhenti (misal reaksi ekstensi dari siklus sebelumnya).
- Annealing, umumnya dilakukan pada suhu sekitar 54°C (37 65°C). Pada tahap ini primer akan menempel pada urutan basa yang sesuai template dan *enzym polymerase* dapat menempel dan mengkopi template.
- Extension, umumnya dilakukan pada suhu 72°C. Suhu annealing adalah suhu yang ideal bagi aktivitas *polymerase*. Basa yang *complementary* terhadap template akan berpasangan dengan primer.

Reaksi PCR bekerja pada kondisi terkontrol dengan menargetkan pada susunan nukleotida tertentu pada gen yang menjadi tempat hibridisasi dan sekaligus awal reaksi pencetakan, sehingga dihasilkan potongan gen dengan panjang tertentu yang secara teoritis bisa dihitung ukuran panjangnya.

Tahapan PCR dilanjutkan dengan elektroforesis yang menggunakan medium terpisah (*agarose, polyacrilamide*). Dengan menjalankan mesin elektroforesis dari muatan negatif ke positif, DNA akan terpisah berdasarkan ukuran fragmen-fragmennya. Hasil elektroforesis dapat dilihat dibawah sinar Ultra Violet (UV).

Kursus Mikroteknik bertujuan memberikan

*Staf Loka Litbang P2B2 Banjarnegara

pemahaman dasar mengenai pembuatan sediaan awetan guna memperoleh gambaran struktur jaringan atau sel. Struktur dan sifat jaringan/sel dapat divisualisasi dengan pengecatan kimiawi, imunohistokimia atau hibridisasi in situ. Materi pertama kursus mikroteknik diawali dengan materi "Etika perlakuan hewan coba, anestesi, nekropsis". Dilanjutkan dengan materi: "Dasar dasar pembuatan sediaan histologik awetan dengan parafin dan praktek".

Pembuatan sediaan dari suatu jaringan dimulai dengan operasi, biopsi, atau autopsi. Jaringan yang diambil kemudian diproses dengan fiksatif yang akan menjaga agar sediaan tidak akan rusak (bergeser posisinya, membusuk, atau rusak). Beberapa jaringan yang dipakai dalam praktek adalah jaringan dalam organ hati, paru paru, limpa dan ginjal. Fiksatif yang paling umum digunakan adalah formalin (10% formaldehida yang dilarutkan dalam air). Larutan Bouin juga dapat digunakan sebagai fiksatif alternatif meskipun hasilnya tidak akan sebaik formalin karena akan meninggalkan bekas warna kuning dan artefak. Artefak adalah benda yang tidak terdapat pada jaringan asli, namun tampak pada hasil akhir sediaan. Artefak ini terbentuk karena kurang sempurnanya pembuatan sediaan.

Sampel jaringan yang telah terfiksasi direndam dalam cairan etanol (alkohol) bertingkat untuk menghilangkan air dalam jaringan (dehidrasi). Selanjutnya sampel dipindahkan ke dalam toluena untuk menghilangkan alkohol (dealkoholisasi).

Langkah terakhir yang dilakukan adalah memasukkan sampel jaringan ke dalam parafin panas yang menginfiltirasi jaringan. Selama proses yang berlangsung selama 12-16 jam ini, jaringan yang awalnya lembek akan menjadi keras sehingga lebih mudah dipotong menggunakan mikrotom. Pemotongan dengan mikrotom ini akan menghasilkan lapisan dengan ketebalan 5 mikrometer. Lapisan ini kemudian diletakkan di atas kaca objek untuk diwarnai.

Pada hari ke-empat dilakukan demonstrasi pembuatan sediaan dari *cryostat section* dan kultur sel, dilanjutkan dengan pengecatan/pewarnaan hematoksinilin dan eosin. (praktek). Pewarnaan perlu dilakukan karena objek dengan ketebalan 5 mikrometer akan terlihat transparan meskipun di bawah mikroskop. Hematoksinilin akan memberi warna biru pada nukleus, sementara eosin memberi warna merah muda pada sitoplasma. Masih terdapat berbagai zat warna lain yang biasa digunakan dalam mikroteknik, tergantung pada jaringan yang ingin diamati. Sebagai acara penutupan diberikan materi fotomikrografi, dimana kita belajar mendokumentasikan preparat/awetan yang sudah kita buat dengan penampilan yang lebih menarik. Sehingga dapat menjadi suatu koleksi yang sangat baik untuk bahan pembelajaran.