	<b>LABORATORIUM BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN BELAWAN</b>	Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.07 Edisi/ No Revisi : 1/1 Tanggal Terbit : 3 Juni 2019 Tanggal Revisi : 26 April 2021 Halaman Ke : 1 Dari 5 Paraf Kabid : Wasdak
<b>INSTRUKSI KERJA METODA</b>		
<b>DETEKSI SAPI PADA BAHAN BAKU PAKAN DENGAN METODE <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i> (PCR) KONVENSIONAL</b>		


**1. Tujuan** : Mendeteksi DNA sapi pada bahan baku pakan untuk memastikan kemurniannya

**2. Bahan**

- 1) Primer Sapi *Forward* B1 (5'-CATCATAGCAATTGCCATAGTCC-3'), *Reverse* B2 (5'-GTACTAGTAGTATTAGAGCTAGAATTAG-3') dengan target gen mitokondria (mtDNA) (Corona *et al.*, 2007)
- 2) *My Taq HS Red Mix* kit (Bioline)
- 3) *gSync DNA Extraction* kit (Geneaid)
- 4) Bufer TBE 1x
- 5) *Agarose Biotechnology grade*
- 6) *Gel Red* (Biotium)
- 7) *DNA Marker 100bp*
- 8) *Filtered tips* (100-1000 µl, 20-200 µl, 10-100 µl, 0,5-10 µl, 0,2-2 µl)
- 9) Mikrotub 1,5 ml
- 10) Tabung PCR 0,2 ml
- 11) *Disposable nitril glove*
- 12) Ethanol absolut
- 13) Alkohol 70%
- 14) Bleach 1-5%

**3. Alat**

- 1) *Mesin thermocycler*
- 2) *Bio Safety Cabinet (BSC) Class II*
- 3) *PCR Hood/ Work Station*
- 4) *Horizontal agarose gel electrophoresis apparatus dan power supply*
- 5) *Agarose gel casting dan well-forming combs*
- 6) *UV Transilluminator*
- 7) *Micropipette single channel* (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl, 2 µl)
- 8) *Vortex mixer*
- 9) *Dry block thermostat (drybath)/waterbath*
- 10) Mikrosentrifus
- 11) Minisentrifus
- 12) *Microwave*

	<b>LABORATORIUM BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN BELAWAN</b>	Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.07 Edisi/ No Revisi : 1/1 Tanggal Terbit : 3 Juni 2019 Tanggal Revisi : 26 April 2021 Halaman Ke : 2 Dari 5 Paraf Kabid : Wasdak :
<b>INSTRUKSI KERJA METODA</b>		
<b>DETEKSI SAPI PADA BAHAN BAKU PAKAN DENGAN METODE <i>POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) KONVENSIONAL</i></b>		

- 13) Timbangan digital
- 14) Rak mikrotub
- 15) Kamera
- 16) Lampu Ultra Violet
- 17) Kulkas/Medicool
- 18) Freezer -20°C
- 19) Freezer -80°C
- 20) *Uninterruptible Power Supply (UPS)*

#### 4. Preparasi sampel, reagen dan alat

##### 4.1. Persiapan sampel

- Spesimen berupa bahan baku pakan yang berasal dari unggas yaitu *Poultry by Product Meal (PPM)* dan *Hydrolyzed Feather Meal (HFM)* yang diduga terkontaminasi sapi.
- Sampel berbentuk tepung halus sehingga tidak perlu digerus

##### 4.2. Persiapan Reagen

###### 4.2.1 *Penyiapan Primer*

- Primer dalam bentuk *powder* dilarutkan menjadi primer stok konsentrasi 200  $\mu\text{M}$  dengan menambahkan *TE buffer* sesuai dengan volume yang tertera pada *oligo technical data sheet*.
- *Primer stock* kemudian diencerkan lagi menjadi konsentrasi 10  $\mu\text{M}$  dengan perbandingan 1:19 (pengenceran sebanyak 20 kali) dengan cara mencampurkan 1 bagian *aliquot* primer stok dengan 19 bagian *DNase/RNase free water*.
- Primer di *aliquot* ke dalam beberapa tabung mikrotub.
- Penyimpanan pada -20 °C.

###### 4.2.2 *Persiapan Kit Ekstraksi*

- Tambahkan ethanol absolut 200 ml ke dalam *Wash Buffer* dan homogenkan.
- Tambahkan ddH<sub>2</sub>O pH 7.0-8.5 sebanyak 6,5 ml ke dalam Proteinase K dan homogenkan.

##### 4.3. Persiapan Alat

Sebelum dilakukan pengujian, semua alat yang akan digunakan dilakukan dekontaminasi terlebih dahulu. Alat-alat yang akan dipergunakan dalam BSC/PCR Hood (Mikropipet, rak tabung, dll) didekontaminasi dengan menggunakan alkohol 70% selanjutnya iradiasi sinar UV



**LABORATORIUM  
BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN  
BELAWAN**

Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.07  
Edisi/ No Revisi : 1/1  
Tanggal Terbit : 3 Juni 2019  
Tanggal Revisi : 26 April 2021  
Halaman Ke : 3 Dari 5  
Paraf Kabid :  
Wasdak

**INSTRUKSI KERJA METODA**


**DETEKSI SAPI PADA BAHAN BAKU PAKAN DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)* KONVENSIONAL**

selama minimal 30 menit.

**5. Prosedur Kerja**

**5.1. Ekstraksi dan purifikasi DNA menggunakan *gSync DNA Extraction Kit***

- Panaskan *heating block/drybath/waterbath* hingga suhu stabil 60°C.
- Pada tabung koleksi 1,5 ml, masukkan 25 mg sampel bahan baku pakan, 200 µl larutan bufer GST dan 20 µl Proteinase K kemudian vorteks secara cepat.
- Inkubasi pada 60 °C hingga *lysate* jernih ( $\pm 30$  menit). Setiap 5 menit, lakukan vorteks secara cepat.
- Selama inkubasi, panaskan sejumlah larutan bufer elusi (50 µl x jumlah sampel) pada 60 °C.
- Selanjutnya campuran disentrifugasi selama 2 menit pada 14.000-16.000 x g dan secara hati-hati transfer supernatan bening ke tabung koleksi 1,5 ml baru.
- Tambahkan 200 µl larutan bufer GSB dan vorteks selama 10 detik.
- Tambahkan 200 µl etanol absolut pada sampel *lysate* kemudian vorteks selama 10 detik.
- Transfer seluruh campuran tersebut ke GS *column* dan sentrifugasi pada 14.000-16.000 x g selama 1 menit. Pindahkan GS *column* ke tabung koleksi 2 ml baru.
- Tambahkan 400 µl bufer W1 ke GS *column* dan sentrifugasi pada 14.000-16.000 x g selama 1 menit kemudian pindahkan GS *column* ke tabung koleksi 2 ml baru.
- Tambahkan 400 µl bufer pencuci (*Wash buffer*) ke GS *column* dan sentrifugasi pada 14.000-16.000 x g selama 30 detik kemudian pindahkan GS *column* ke tabung koleksi 2 ml baru
- Sentrifugasi pada 14.000-16.000 x g selama 3 menit pada matriks membran kering.
- Transfer GS *column* ke tabung koleksi 1,5 ml baru. Tambahkan 30 µl *pre-heated* bufer elusi langsung ke matriks kolom dan inkubasi pada suhu ruang selama 3 menit.
- Sentrifugasi pada 14.000-16.000 x g selama 30 detik dan kolom dibuang.
- DNA hasil elusi dapat langsung digunakan untuk proses PCR atau disimpan pada suhu -20°C atau -80 °C untuk penyimpanan lama.

	<b>LABORATORIUM BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN BELAWAN</b>	Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.07 Edisi/ No Revisi : 1/1 Tanggal Terbit : 3 Juni 2019 Tanggal Revisi : 26 April 2021 Halaman Ke : 4 Dari 5 Paraf Kabid : Wasdak :
	<b>INSTRUKSI KERJA METODA</b>	
<b>DETEKSI SAPI PADA BAHAN BAKU PAKAN DENGAN METODE <i>POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)</i> KONVENSIONAL</b>		

### 5.2. Pembuatan *Master Mix*

- Lakukan pencampuran *master mix My Taq HS Red Mix* (Bioline) di BSC II dengan rumus sebagai berikut :

Jenis reagen	Volume (µl)
<i>MyTaq HS Red Mix 2x</i>	12,5
Pimer B1(10 µM)	1
Pimer B2 (10 µM)	1
<i>DNase/RNase free water</i>	8,5
Templat	2
Volume total	25

- Buat *PCR mix* dengan komposisi seperti di atas dikalikan dengan jumlah sampel
- Vorteks dan *spin down*

### 5.3. Amplifikasi PCR


Campuran DNA spesimen dimasukkan ke dalam *Thermocycler* dengan pengaturan suhu sebagai berikut :

Tahapan	Temperatur	Waktu	Siklus
Inisial denaturasi	95 °C	1 menit	1
Denaturasi	95 °C	15 detik	35
Anealing	58 °C	15 detik	
Ekstensi	72 °C	10 detik	
Ekstensi akhir	72 °C	5 menit	1

### 5.4. Proses Elektroforesi

#### 5.4.1. Pembuatan TBE 1x (pada volume 500 ml)

- Takarlaklah akuades steril sebanyak 450 ml dengan menggunakan gelas ukur
- Tambahkan bufer TBE 10x sebanyak 50 ml ke dalam akuades steril kemudian
- Dihomogenkan

	<b>LABORATORIUM BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN BELAWAN</b>	Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.07 Edisi/ No Revisi : 1/1 Tanggal Terbit : 3 Juni 2019 Tanggal Revisi : 26 April 2021 Halaman Ke : 5 Dari 5 Paraf Kabid : Wasdak
<b>INSTRUKSI KERJA METODA</b>		
<b>DETEKSI SAPI PADA BAHAN BAKU PAKAN DENGAN METODE <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i> (PCR) KONVENSIONAL</b>		

#### 5.4.2. Pembuatan agar gel 1,5%

- Timbanglah agarose sebanyak 0,75 g dan tambahkan 50 ml bufer TBE 1x
- Panaskan dengan microwave hingga mendidih dan terlihat bening ( $\pm 1$  menit)
- Tambahkan *Gel Red* sebanyak 0,8-1  $\mu$ l
- Tuang agar ke dalam cetakan agar dan tunggu hingga membeku

#### 5.4.3. Elektroforesis

- Tuangkan larutan TBE *Buffer* 1x sampai *agarose* terendam dengan sempurna
- Masukkan marker, kontrol positif dan negatif serta sampel ke tiap-tiap *well* masing-masing sebanyak 5  $\mu$ l
- Agarose dan sampel dielektroforesis dengan menggunakan *power supply* (100 volt, 40 menit).
- Baca hasil dengan menggunakan uv transiluminator

#### 5.5. Interpretasi Hasil

- Positif : Jika terdapat pita (*band*) yang terang pada posisi 165 bp pada sampel maupun kontrol positif
- Negatif : Jika tidak terlihat adanya pita (*band*) pada 165 bp

#### 6. Pustaka

Corona B, R. Lleonard, Y. Carpio, O. Uffo dan S. Martínez. 2007. Short communication. PCR detection of DNA of bovine, ovine-caprine and porcine origin in feed as part of a bovine spongiform encephalopathy control program. *Spanish Journal of Agricultural Research* 5(3), 312-317.

gSync DNA Extraction kit (cat# GS300) Instruksi Manual. 2019. Geneaid Biotech Ltd.  
<http://www.geneaid.com/sites/default/files/GS15.pdf> diunduh pada 26 Januari 2019.

Mytaq HS Red Mix (cat#BIO-25048) Instruksi Manual. 2019. Bioline.  
[https://www.bioline.com/downloads/dl/file/id/2687/mytaq\\_hs\\_red\\_mix\\_product\\_manual.pdf](https://www.bioline.com/downloads/dl/file/id/2687/mytaq_hs_red_mix_product_manual.pdf) diunduh pada 26 Januari 2019.