|  | Disiapkan oleh: | Disetujui oleh: | **Ditetapkan oleh:** |
| --- | --- | --- | --- |
| Nama |  |  |
| Jabatan |  |  |
| Tanda Tangan |  |  |
| **STANDAR PROSEDUR OPERASIONAL** | | Tanggal Terbit: | Unit Kerja:  Integrated Cellular and Molecular Biology Laboratory |
| **Pengertian:**  Pemisahan molekul DNA dan RNA dari komponen biomolekul sel yang berasal dari sampel biologis.  **Tujuan:**   1. Memberikan petunjuk kepada petugas laboratorium mengenai ekstraksi DNA dan RNA menggunakan reagen Genezol. 2. Menjamin pemeriksaan laboratorium dilakukan sesuai prosedur   **Prosedur:**  BAHAN HABIS PAKAI:   1. Reagen Genezol 2. Kloroform 3. Isopropanol 4. Etanol 70% 5. *RNase-free water* 6. Etanol absolut 7. 0,1 M sodium sitrat di dalam 10% etanol, pH 8,5 8. *Elution buffer* 9. Tabung 1,5 mL   CATATAN SEBELUM MEMULAI PROSEDUR :   1. Proses ekstraksi tidak perlu dilakukan di dalam BSC 2. Pastikan mesin *centrifuge* telah dinyalakan terlebih dahulu, lalu diatur pada suhu 4°C (pastikan *chamber* bagian dalam telah dingin sebelum digunakan) 3. Jumlah sel yang digunakan untuk ekstraksi:    1. Minimal: 800 ribu sel    2. Maksimal: 5 juta sel 4. Pastikan tabung 1.5 mL telah dilabel secara spesifik untuk DNA atau RNA   PREPARASI SEL :   1. Sel yang telah *ditreatment* di dalam *6-well plate* dilepaskan menggunakan *Trypsin-EDTA* 0.05% sebanyak 500 μL, lalu inkubasi selama 5 menit. Selama inkubasi, sel dapat diamati dengan mikroskop untuk memastikan sel telah terlepas. 2. Hentikan reaksi tripsin dengan menambahkan sebanyak 700 μL medium kultur ke dalam *well*, lakukan homogenisasi dengan *pipetting*. 3. Pindahkan larutan yang telah tercampur ke dalam tabung 1,5 mL baru, kemudian lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 *x* g selamat 5 menit. 4. Setelah *pellet* teramati, buang *supernatant*. Apabila sel akan disimpan terlebih dahulu, tambahkan sebanyak 500 μL PBS, lalu simpan sel di *storage* -80 °C.   LISIS SEL :   1. Pisahkan sel dari PBS atau medium kultur dengan melakukan sentrifugasi 300 *x* g selama 5 menit, lalu buang *supernatant*. 2. Tambahkan 1000 μL genezol kemudian lakukan homogenisasi dengan *pipetting*, lalu inkubasi selama 5 menit di suhu ruang. 3. Tambahkan 200 μL kloroform, lalu homogenisasi dengan vorteks selama 10 detik. 4. Lakukan sentrifugasi pada 15.000 *x* g selama 15 menit pada 4°C.   EKSTRAKSI RNA :   1. Pindahkan larutan bening yang berada di lapisan atas ke dalam tabung 1.5 mL baru (perhatikan jangan sampai fase organik berwarna merah muda dan interfase berwarna putih terambil). 2. Tambahkan 200 μL isopropanol kemudian homogenisasi dengan inversi 10 kali, lalu inkubasi 10 menit pada suhu ruang. 3. Lakukan sentrifugasi pada 15.000 *x* g selama 15 menit pada 4°C. *Pellet* RNA akan terbentuk di bagian dasar tabung, buang *supernatant* dengan cara dituangkan ke dalam waste secara hati-hati. 4. Tambahkan 1000 μL etanol 70% ke dalam tabung, lalu homogenisasi dengan vorteks selama 5 detik. 5. Lakukan sentrifugasi pada 15.000 *x* g selama 5 menit pada 4°C. 6. Buang *supernatant* dengan cara dituangkan ke dalam waste secara hati-hati. 7. Buka tutup tabung 1.5 mL, lalu biarkan *pellet* mengering selama 10—15 menit pada suhu ruang. 8. Tambahkan 80 μL *RNase-free water* untuk meresuspensi RNA, lalu inkubasi di dalam oven pada suhu 60°C selama 15 menit. 9. Lakukan kuantifikasi RNA menggunakan Nanodrop, lalu simpan di dalam *storage* -80°C.   EKSTRAKSI DNA:   1. Pindahkan larutan fase organik (merah muda) dan interfase (putih) ke dalam tube 1.5 mL baru. 2. Tambahkan 300 μL etanol absolut kemudian homogenisasi dengan inversi 10 kali. 3. Inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang, lalu lakukan sentrifugasi 2.000 *x* g selama 5 menit pada 4°C. Buang *supernatant* secara hati-hati. 4. Lakukan pencucian dengan menambahkan 1000 μL (0,1 M sodium sitrat di dalam 10% ethanol) ke dalam sampel, lalu inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Lakukan inversi secara perlahan setiap 5 menit. 5. Lakukan sentrifugasi 2.000 *x* g selama 5 menit pada 4°C. Buang *supernatant* secara hati-hati. Ulangi tahap pencucian 1 kali. 6. Tambahkan 1000 μL etanol 70% kemudian inkubasi selama 15—20 menit pada suhu ruang. Lakukan inversi secara perlahan setiap 5 menit. 7. Lakukan sentrifugasi 2.000 *x* g selama 5 menit pada 4°C. Buang *supernatant* secara hati-hati. 8. Buka tutup tabung 1.5 mL, lalu biarkan *pellet* mengering selama 5—10 menit pada suhu ruang. 9. Tambahkan 100 μL *elution buffer* kemudian inkubasi di dalam oven pada suhu 60°C selama 15 menit untuk melarutkan DNA. Lakukan *tapping* pada bagian bawa tabung setiap 5 menit. 10. Lakukan sentrifugasi 15.000 *x* g selama 10 menit. Pindahkan *supernatant* secara hati-hati ke dalam tabung 1.5 mL baru. 11. Lakukan kuantifikasi DNA menggunakan Nanodrop, lalu simpan di dalam *storage* -80 °C.   **Bahan berbahaya :**  Lihat MSDS (*material safety data sheet*)  **Kewaspadaan keselamatan :**   1. Melaksanakan prosedur kewaspadaan standar dalam menangani semua sampel dan reagen laboratorium. 2. Melaksanakan prosedur penanganan limbah laboratorium terhadap semua bahan bekas pemeriksaan.   **Prosedur/ dokument terkait :**   1. SOP Penggunaan Alat Microcentrifuge, Refrigerated 2. SOP Keselamatan Kerja 3. SOP Pembuangan limbah ICEMBIO 4. SOP Pemeliharaan dan Kalibrasi peralatan laboratorium   **Rujukan :**   1. Geneaid. 2015 Genezol reagent. 4 halaman. | | | |