






MANUAL PROSEDUR
AMPLIFIKASI PEMERIKSAAN GEN AZF
LABORATORIUM PUSAT RISET BIOMEDIK (CEBIOR)
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO

Kode Dokumen	: SPMI-UNDIP/MP/04.07/10
Revisi ke	: -
Tanggal	: 15 Januari 2018
Disiapkan oleh	: Ketua Laboratorium CEBIOR
Dikaji ulang oleh	: Wakil Dekan Riset dan Inovasi
Dikendalikan oleh	: Tim Penjaminan Mutu Fakultas
Disahkan oleh	: Dekan Fakultas Kedokteran

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO	MANUAL PROSEDUR Amplifikasi Pemeriksaan Gen AZF SPMI-UNDIP/MP/04.07/10	Disetujui oleh  Dekan
---	---	--

		MANUAL PROSEDUR Amplifikasi Pemeriksaan Gen AZF	Disetujui oleh:  Dekan
Revisi ke -	Tanggal 15-01-2018	SPMI-UNDIP/MP/04.07/10	

Tujuan

Untuk mendeteksi delesi pada gen AZFa, AZFb dan AZFc pada region di kromosom Y dengan PCR.

Definisi

1. Gen AZF adalah gen yang terletak pada kromosom Y di bagian eukromatin lengan panjang region 1 band 1 (Yq11).
2. Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik atau metode perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme.

Syarat Administrasi

Alat :

1. Mesin PCR
2. Mikro centrifuge
3. Mikro pipet
4. Mikro Tube
5. Blue Tip
6. Yellow Tip
7. Gel Elektroforesis
8. Gel Documentation

Bahan :

1. DNA
2. Milli-Q
3. PCR Buffer 10X + MgCl₂ 15 mM
4. dNTPs
5. Primer Multiplex A
 - Primer forward : gtagcacacagactatgcttc
 - Primer reverse : acacacagaggacaaccct
 - Primer forward : ggctcacaacgaaaagaaa
 - Primer reverse : ctgcaggcagtaataagggga
 - Primer forward : ggggtgtaccagaaggcaaa
 - Primer reverse : gaaccgtatctaccaaagcagc
 - Primer forward : accrctgtactgactgtgattacac

- Primer reverse : gcacytctttggtatcygagaaagt
 - Primer forward : gaatattcccgctctccgga
 - Primer reverse : gctggtgctccattcttgag
6. Primer Multiplex B
- Primer forward : agaagggtctgaaagcaggt
 - Primer reverse : gcctactacctggaggcttc
 - Primer forward : gtctgcctcaccataaaacg
 - Primer reverse : accactgcaaaaactttcaa
 - Primer forward : gttacaggattcggcgtgat
 - Primer reverse : ctgcatgtgcagccac
 - Primer forward : accrctgtactgactgtgattaca
 - Primer reverse : gcacytctttggtatcygagaaagt
 - Primer forward : gaatattcccgctctccgga
 - Primer reverse : gctggtgctccattcttgag
7. Amplitaq Gold Enzyme/ Taq

RUANG LINGKUP






Ruang lingkup MP Amplifikasi Pemeriksaan Gen AZF ini meliputi:

- a. Persyaratan yang diperlukan pada amplifikasi pemeriksaan gen AZF;
- b. Tahap kegiatan dalam prosedur amplifikasi pemeriksaan gen AZF;
- c. Pihak-pihak yang terlibat dalam amplifikasi pemeriksaan gen AZF;
- d. Waktu yang dibutuhkan dalam amplifikasi pemeriksaan gen AZF;
- e. Dokumen yang diperlukan atau dihasilkan dalam amplifikasi pemeriksaan gen AZF.

PROSEDUR

1. PCR menggunakan primer Multiplex A dan Multiplex B untuk mendeteksi ukuran gen AZF dan SRY. DNA (100ng) diamplifikasi dengan 2,5 p-mol primer dalam volume 50 ul.yang berisi 0,2 U enzyme taq polymerase (MRC Holland) dengan PCR buffer 15 mM MgCl₂ (AB), 0.5 mM dNTPs.
2. Larutan reaksi didenaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit kemudian diamplifikasi 35 siklus : denaturasi selama 94°C selama 30 detik , annealing selama 45 detik pada suhu 55°C, ekstensi selama 45 detik pada suhu 72°C, diikuti dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit.
3. Product PCR 7 ul ditambahkan dengan loading dye 3 ul di masukkan pada sumuran yang telah dicetak pada Agarose.
4. Hasil PCR dilihat dengan menggunakan agarose 2 % dan dilarikan dengan Elektroforesis selama 1 jam 120 V, kemudian dilihat pada Gel Dokumentasi.
5. Besaran produk pada gen AZF dan SRY dapat dilihat dan diukur dengan menggunakan marker pengukur 100bp.

BAGAN ALIR MANUAL PROSEDUR
Amplifikasi Pemeriksaan Gen AZF

No	Kegiatan	PELAKSANA	BAKU MUTU		Keterangan
		Laboran	Waktu	Output	
1	PCR menggunakan primer Multiplex A dan Multiplex B untuk mendeteksi ukuran gen AZF dan SRY. DNA (100ng) diamplifikasi dengan 2,5 p-mol primer dalam volume 50 ul.yang berisi 0,2 U enzyme taq polymerase (MRC Holland) dengan PCR buffer 15 mM MgCl ₂ (AB), 0.5 mM dNTPs.		30 Menit		
2	Larutan reaksi didenaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit kemudian diamplifikasi 35 siklus : denaturasi selama 94°C selama 30 detik , annealing selama 45 detik pada suhu 55°C, ekstensi selama 45 detik pada suhu 72°C, diikuti dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit.		2 jam		
3	Product PCR 7 ul ditambahkan dengan loading dye 3 ul di masukkan pada sumuran yang telah dicetak pada Agarose.		15 Menit		
4	Hasil PCR dilihat dengan menggunakan agarose 2 % dan dilarikan dengan Elektroforesis selama 1 jam 120 V, kemudian dilihat pada Gel Dokumentasi.		1 jam		
5	Besaran produk pada gen AZF dan SRY dapat dilihat dan diukur dengan menggunakan marker pengukur 100bp.		15 menit		