






MANUAL PROSEDUR
EKSTRAKSI DNA METODE *Salting Out*
LABORATORIUM PASIEN
LABORATORIUM PUSAT RISET BIOMEDIK (CEBIOR)
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO

Kode Dokumen	: SPMI-UNDIP/MP/04.07/08
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 Ekstraksi DNA Metode <i>Salting Out</i> SPMI-UNDIP/MP/04.07/08	Disetujui oleh  Dekan
---	--	--

		MANUAL PROSEDUR Ekstraksi DNA Metode " <i>Salting Out</i> "	Disetujui oleh:  Dekan
Revisi ke -	Tanggal 15-01-2018	SPMI-UNDIP/MP/04.07/08	

Tujuan

Untuk memberikan arahan kepada laboran/analisis dalam mengekstraksi DNA dengan menggunakan metode "*salting out*"

Definisi

1. Ekstraksi adalah proses pemisahan zat berdasarkan kelarutannya.
2. DNA adalah suatu asam nukleat yang menyimpan segala informasi biologis yang unik dari setiap makhluk hidup dan beberapa virus.
3. Salting out adalah proses penambahan larutan elektrolit ke dalam fase air yang mengandung senyawa organik, penambahan larutan elektrolit ini difungsikan agar kelarutan senyawa organik dalam air bisa menurun dan juga konsentrasi senyawa organik dalam fasa organik akan lebih besar dari pada dalam fasa air.

Syarat Administrasi

Bahan Pemeriksaan :

1. Sampel: >2ml darah EDTA

Reagen Pemeriksaan :

1. Bufer lisis NH₄Cl pH 7.5 menghemolisis sel eritrosit 5 % Ba(OH)₂. Ditimbang 5 g Ba(OH)₂ kemudian dilarutkan dengan 100 ml aquadest
2. Bufer lisis TE pH 7.5 (20mM Tris dan 5mM EDTA)
3. Bufer TE normal pH 8 (10mM Tris dan 1mM EDTA)
4. Proteinase K enzyme 10 mg/ml akan mencerna protein pd membran sel & nukleus
5. SDS (Sodium dodecyl sulfate)10% (1gr/10ml), detergent anionic yang akan membantu denaturasi protein, disrupti lemak membran.
6. 0.5M EDTA untuk menghentikan aktivitas enzim (DNAse)
7. 6M NaCl, Na⁺ bermuatan + akan mengikat protein yg bermuatan negatif dan membiarkan DNA tetap dalam larutan air

RUANG LINGKUP

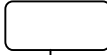
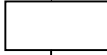
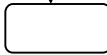
Ruang lingkup MP Ekstraksi DNA Metode "*Salting Out*" ini meliputi:

- a. Persyaratan yang diperlukan pada saat ekstraksi DNA metode "*Salting Out*";
- b. Tahap kegiatan dalam prosedur ekstraksi DNA metode "*Salting Out*";
- c. Pihak-pihak yang terlibat dalam ekstraksi DNA metode "*Salting Out*";
- d. Waktu yang dibutuhkan dalam ekstraksi DNA metode "*Salting Out*";
- e. Dokumen yang diperlukan atau dihasilkan dalam ekstraksi DNA metode "*Salting Out*".

PROSEDUR

1. Hemolisis sel darah merah
 - Darah EDTA masuk tabung 50 ml + 10-30 ml buffer lisis NH₄Cl, >10 menit
 - Pusingkan 15 menit 2500 RPM, suhu ruang
 - Buang supernatan, ulangi pencucian ~3x s/d pellet putih
2. Pencernaan protein
 - Tambahkan 2ml buffer lisis TE kedalam pelet putih, diresuspensi
 - Tambahkan 30-50ul enzim Proteinase K
 - Tambahkan 100 ul 10% SDS, campur sempurna, tampak mengental
 - Masukkan dalam 50 derajat H₂O bath semalam
 - Ambil tabung dari H₂O bath dan biarkan dingin disuhu kamar 30'
3. Ekstraksi dan Presipitasi (*salting out method*)
 - Tambahkan NaCl 6M sebanyak 1/3 vol (1ml) dan kocok kuat
 - Centrifuge tabung 2500 rpm selama 20 menit
 - Pindahkan supernatan kedalam tabung baru
 - tambahkan pelan- pelan 2x volume 100% ethanol, DNA tampak berupa jaringan putih yg mengambang
 - Ambil DNA dengan jarum dari 1 ml syringe. Cuci dgn 70 % ethanol
 - Pindahkan DNA kedalam 1.5 eppendorf tube. Keringkan sisa ethanol
 - Perkirakan jumlah DNA, kemudian tambahkan normal TE buffer ~300ul-500ul untuk melarutkan dan menyimpan DNA. Biarkan paling sedikit semalam disuhu kamar

BAGAN ALIR MANUAL PROSEDUR
Ekstraksi DNA Metode "Salting Out"

No	Kegiatan	PELAKSANA	BAKU MUTU		Keterangan
		Laboran	Waktu	Output	
1	<p>Hemolisis sel darah merah</p> <ul style="list-style-type: none"> - Darah EDTA masuk tabung 50 ml + 10-30 ml buffer lisis NH₄Cl, >10 menit - Pusingkan 15 menit 2500 RPM , suhu ruang - Buang supernatan, ulangi pencucian ~3x s/d pellet putih 		30 Menit		
2	<p>Pencernaan protein</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tambahkan 2ml buffer lisis TE kedalam pelet putih, diresuspensi - Tambahkan 30-50ul enzim Proteinase K - Tambahkan 100 ul 10% SDS, campur sempurna, tampak mengental - Masukkan dalam 50 derajat H₂O bath semalam - Ambil tabung dari H₂O bath dan biarkan dingin disuhu kamar 30' 		24 jam		
3	<p>Ekstraksi dan Presipitasi (salting out method)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tambahkan NaCl 6M sebanyak 1/3 vol (1ml) dan kocok kuat - Centrifuge tabung 2500 rpm selama 20 menit - Pindahkan supernatan kedalam tabung baru - tambahkan pelan- pelan 2x volume 100% ethanol, DNA tampak berupa jaringan putih yg mengambang 		30 Menit		

	<ul style="list-style-type: none">- Ambil DNA dengan jarum dari 1 ml syringe. Cuci dgn 70 % ethanol- Pindahkan DNA kedalam 1.5 eppendorf tube. Keringkan sisa ethanol- Perkirakan jumlah DNA, kemudian tambahkan normal TE buffer ~300ul-500ul untuk melarutkan dan menyimpan DNA. Biarkan paling sedikit semalam disuhu kamar				
--	--	--	--	--	--