

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1: Komposisi media Murashige & Skoog (MS) (1962)

A Makronutrien	Kepekatan (mg/l)
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1650
NH ₄ NO ₃	1900
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
 B Mikronutrien	
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ H ₂ O	15.6
CaCl ₂ 6H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6
NaMoO ₄ 5H ₂ O	0.25
CuSO ₄ 7H ₂ O	0.025
KI	0.85
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
 C Vitamin	
Thiamine HCL	0.5
Pyridoxine HCL	0.5
Asid nikotinik	0.05
Mio-inositol	100
Sukrosa	30 000
Agar	8000

LAMPIRAN 2: Penyediaan penimbal ekstrak DNA

Penyediaan larutan penimbal pengekstrakan DNA (CTAB buffer) 1L

▪ 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)	12.114 g
▪ 1.4 M NaCl	81.816 g
▪ 3.0 % CTAB	30.0 g
▪ 20 mM EDTA	7.444 g
▪ 0.5 % PVP	5.0 g
▪ Air suling	1000 ml

Washing buffer 1L

▪ 76.0 % etanol	760 ml
▪ 10 mM ammonium asetat	0.7708 g
▪ Air suling	240 ml

TE buffer 50 ml

▪ 1 M tris-HCl (pH 8.0)	2.5 ml
▪ 0.5 M EDTA	1.0 ml
▪ Air suling	46.5 ml

Larutan RNase 10 mg/ml

▪ 2 M Tris-HCl (pH 7.5)	5 µl
▪ 5 M NaCl	3 µl
▪ dH ₂ O	992 µl
▪ RNase A	10 mg

A Larutan penimbal (CTAB buffer) 1L

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)	12.114 g
1.4 M NaCl	81.816 g
3.0% CTAB	30.0 g
20 mM EDTA	7.444 g
0.5% PVP	5.0 g
Air suling	1000 ml
0.2%β-mercaptoethanol	2.0 ml

B Washing Buffer 1L

76% etanol	760 ml
10mM ammonium asetat	0.7708 g
Air suling	240 ml

C	TE buffer 50 ml	
	1 M Tris-HCl (pH 8.0)	2.5 ml
	0.5 EDTA	1.0 ml
	Air suling	46.5 ml
D	Larutan RNase 10 mg/ml	
	2 M Tris-HCl (pH 7.5)	5 μ l
	5 M NaCl	3 μ l
	dH ₂ O	992 μ l
	RNase A	10 mg

LAMPIRAN 3: Penyediaan gel dan bahan kimia untuk elektroforesis

Elektroforesis Gel Agarose.

- A Larutan penimbal TAE 1L (komposisi 50x TAE)
- | | |
|-----------------------------|----------|
| 2 M Tris asetat | 242.0 g |
| Asid asetik | 57.1 ml |
| 0.5 M EDTA (pH 8.0) | 100.0 ml |
| Air suling sehingga 1000 ml | 10 mg |
- B Gel Agarose
- | | |
|----------------|-------------|
| 1.0% 1.5% agar | Ekstrak DNA |
| 1.5% agar | Produk PCR |

Bahan kimia untuk Elektroforesis

- A 0.5 M EDTA (pH 8.0)
EDTA dilarutkan dalam dH₂O, laraskan pH hingga nilai pH 8.0 menggunakan NaOH. Larutan diautoklaf dan disimpan pada suhu bilik.

*EDTA tidak larut pada pH rendah dan mula melarut sekitar pH 7.6

Jumlah	100 ml	500 ml
EDTA	18.6 g	93.1 g
NaOH	2.0 g	10.0 g

- B 1 M Tris-HCl (pH 8.0)
Tris dilarutkan dalam dH₂O. pH dilaraskan sehingga pH 8.0. Larutan diautoklafkan dan disimpan dalam suhu bilik

Jumlah	100 ml	500 ml
Tris	12.1 g	60.6 g
HCl	4.0 ml	20.0 g

- C TE (10 mM Tris HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0)
Diautoklaf dan simpan pada suhu bilik.

Jumlah	100 ml	500 ml
10 mM Tris HCl pH 8.0	1.0 ml	5.0 ml
1 mM EDTA pH 8.0	2.0 g/0.2 ml	1.0 ml

LAMPIRAN 4: Pengukuran DNA

- A
- DNA diukur menggunakan spektrofotometer dimana ukuran penyerapan cahaya UV oleh sampel diambil.
 - Ukuran optikal density (OD) dibuat pada 260 dan 280 nm
 - Sampel DNA dicairkan dan diemparkan sekejap ($2 \mu\text{l DNA} + 998 \mu\text{l ddH}_2\text{O}$) sebelum bacaan diambil
 - Larutan dimasukkan kedalam kuvet
 - 1 ml dH_2O dimasukkan kedalam tiub kuvet lain sebagai blank.
 - Kedua-dua kuvet tersebut dimasukkan ke dalam slot biofotometer dan ukuran OD dibaca.
 - Kepekatan dan ketulenan ($\text{OD}_{260/280}$) dapat diperolehi daripada bacaan.

LAMPIRAN 5: Penyediaan mini gel agarose

- A
- Untuk penyediaan 1.0% gel agarose, 0.4 agarose ditambahkan ke dalam 40 ml larutan tampan 0.5X TAE
 - Larutan dipanaskan dan dibiarkan sehingga 600C dan ditambahkan 1.0 l Ethidium Bromida.
 - Gel dimasukkan kedalam acuan berisi sikat pada tangki elektroforesis secara perlahan-lahan. Pastikan tiada gelembung udara, jika ada dikeluarkan menggunakan tip pipet.
 - Selepas gel dituang, ia dibiarkan beku. Setelah gel beku sikat dikeluarkan dengan berhati-hati.
 - Larutan tampan 0.5X TAE dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis sehingga gel tenggelam kira-kira 4.0 mm.

Elektroforesis sampel DNA di dalam gel agarose

- A
- Sampel DNA ditambah sebanyak 1/10 di dalam 'loading dye'. Campuran diemparkan selama 2-3 saat.
 - Sampel DNA dituang perlahan-lahan menggunakan mikropipet. Penanda molekul (Marker 100 bp ladder plus) dimasukkan untuk analisa RAPD.
 - Setelah sampel DNA dimasukkan, litar disambungkan dan aliran elektrik dijalankan pada 80 V selama 1-2 jam.
 - Bekalan elektrik dimatikan setelah 'loading dye' menghampiri lebih kurang 2 cm daripada terminal positif.

Penyediaan 'Master Mix' untuk kajian RAPD.

- A Isipadu akhir 25 µl
- 12.5 µl PCR Master Mix
 - 2.0 µl Primer
 - 2.5 µl DNA
 - 8.0 µl ddH₂O
- 2.5 µl DNA dimasukkan kedalam setiap tiub PCR yang mengandungi 'Master Mix'.