

LAPORAN PRAKTIKUM

❖ PRAKTIKUM ISOLASI DNA MANUSIA (SEL EPITHEL MULUT DAN DARAH)

❖ PRAKTIKUM ISOLASI PROTEIN DARI DARAH

❖ PRAKTIKUM PCR,ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS-PAGE

OLEH : Yuni Rahmayanti – Ade Putra Sinaga

Waktu : tgl 07,14,21 dan 28 November 2013

I. TUJUAN PRAKTIKUM

- 1.1 Mengerti metode umum mengisolasi DNA
- 1.2 Mengerti dan tahu cara mengisolasi DNA dari sel –sel Epithel mulut
- 1.3 Mengerti dan tahu cara mengisolasi DNA dari sel – sel darah
- 1.4 Mengerti teknik *sentrifugasi* untuk pemisahan bagian – bagian darah,yaitu sel darah dan plasma darah,memisahkan protein plasma dari protein intraselular dan protein membrane maupun dari bagian sel lain.
- 1.5 Mengerti teknik biokimia umum lain yang penting dalam proses isolasi protein,yaitu selain sentrifugasi,teknik yang penting dalam proses isolasi protein adalah pengendapan.
- 1.6 Mengerti dan memahami teknik PCR
- 1.7 Mengerti prinsip dasar elektroforesis
- 1.8 Melatih teknik elektroforesis agarose dengan sampel – sampel DNA yang diperoleh dari jaringan manusia.
- 1.9 Menggunakan teknik SDS – PAGE untuk memisahkan protein – protein darah.

II. HASIL DAN PEMBAHASAN

2.1 Hasil isolasi DNA

2.1.1 **Hasil isolasi DNA dari sel epithel mulut** : Di dapatkan *Endapan seperti serat benang yang merupakan DNA dari sel epithel mulut*.DNA ini akan digunakan pada praktikum berikutnya.

2.1.2 **Hasil isolasi DNA dari darah** : Di dapatkan *Pellet yang mengandung DNA dari darah pada dasar tabung*.DNA dari darah ini akan di gunakan pada praktikum berikutnya.

2.2 Hasil Isolasi protein dari darah

2.2.1 Hasil

Bagian A	Supernatan	Pengendapan
Jumlah /Warna	7 ml / Plasma berwarna kuning	1 ml Warna merah pekat
Pengamatan yang lain	-	-

Diperoleh supernatant 7 ml dan pengendapan 1 ml.

Bagian B	Supernatan	Pengendapan
Jumlah /warna	7 ml / berwarna kuning	1 ml Warna merah
Pengamatan yang lain	-	-

Diperoleh supernatant 7 ml berwarna kuning dan pengendapan 1 ml berwarna merah.Dari hasil isolasi ini diperoleh sampel protein sitoplasmik (S) dan protein membrane (M).

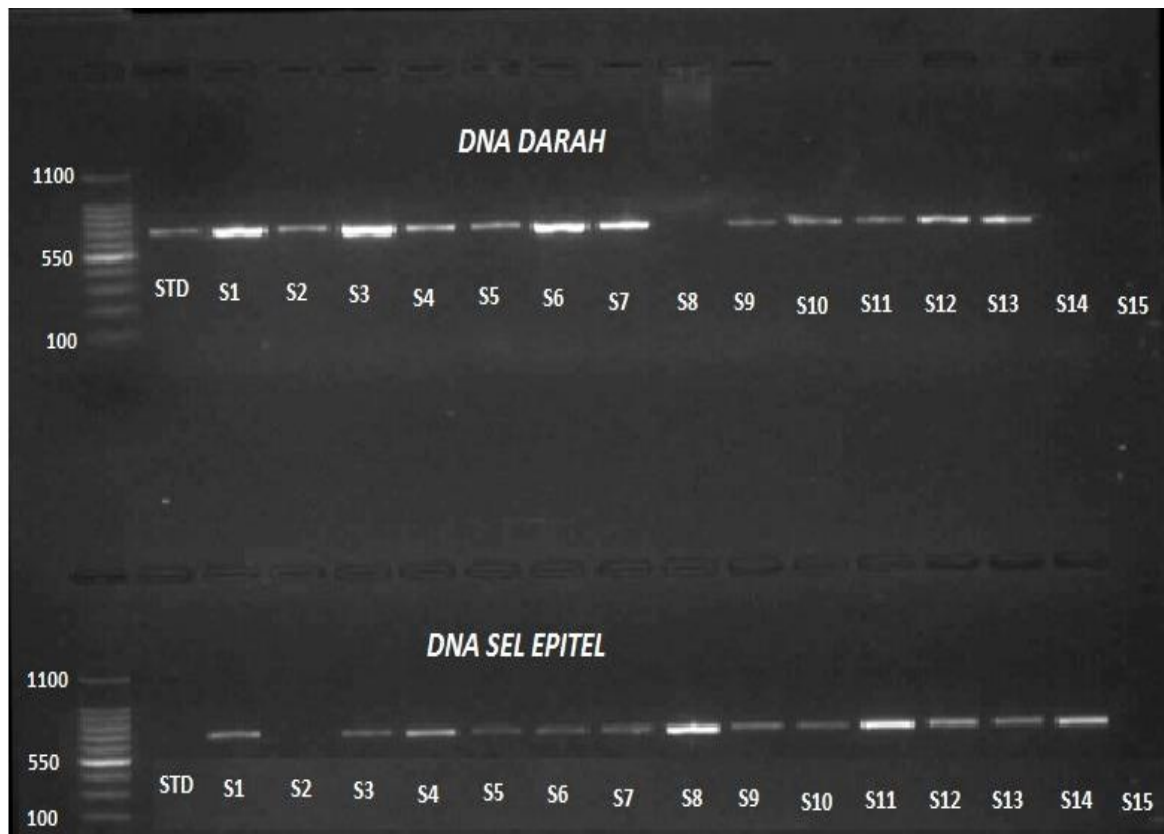
Bagian C	Supernatan	Pengendapan
Jumlah/warna	0,80 ml/ berwarna kuning	0,1 Warna kuning gelap
Pengamatan yang lain	-	-

Diperoleh supernatant 0,80 ml berwarna kuning dan pengendapan 0,1 ml berwarna kuning gelap. Ini merupakan isolasi untuk sampel protein supernatant garam tinggi (Gs) dan sampel protein pengendapan garam tinggi (Gp)

Bagian D	Supernatan	Pengendapan
Jumlah/Warna	1 ml/ berwarna kuning	0,25 ml Warna putih
Pengamatan yang lain	-	-

Diperoleh supernatant 1 ml berwarna kuning dan pengendapan 0,25 ml berwarna putih yang merupakan isolasi untuk sampel protein supernatant etanol (Es) dan sampel protein pengendapan Etanol (Ep)

2.3 Foto Hasil PCR dan Elektroforesis Agarose



Gambar 1. Foto Hasil PCR dan Elektroforesis pada Medium Agarose

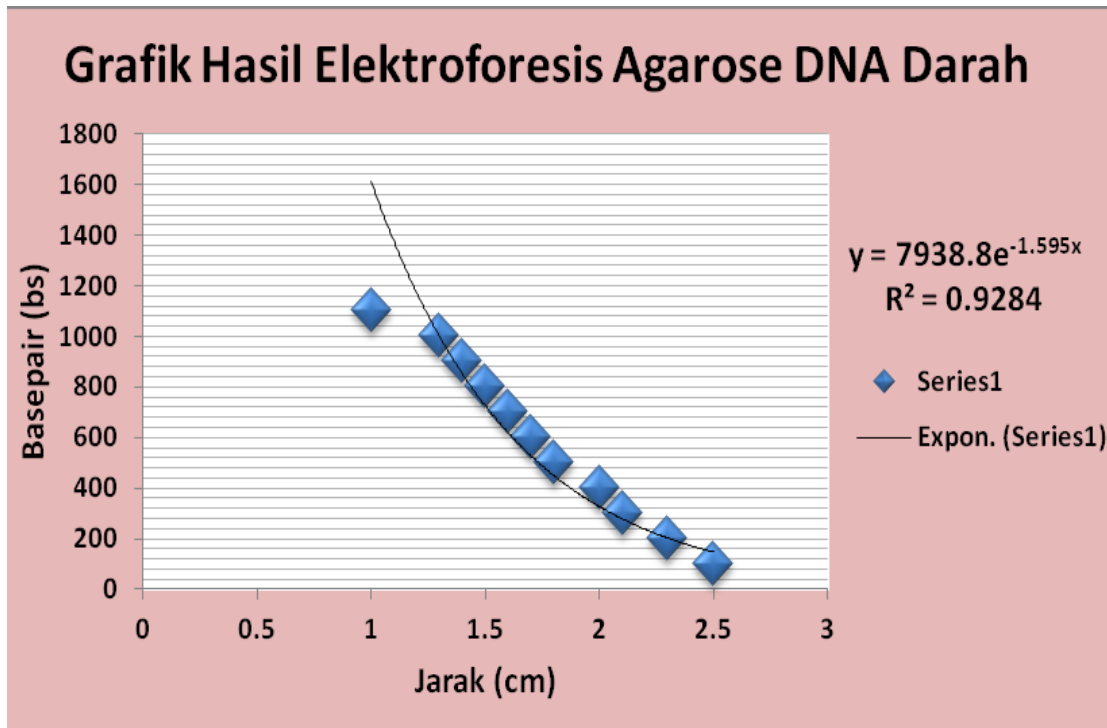
Keterangan gambar 1 : STD : Standar S1 : Kontrol

S2	: Seri	S3	: Amirul
S4	: Deby	S5	: Adit
S6	: Ichwan	S7	: Ramadhan
S8	: Melviana	S9	: Barlian
S10	: Maya	S11	: Yunus
S12	: Yuni	S13	: Ade
S14	: Ferry	S15	: Nita

Tabel 1. Hasil elektroforesis sel darah

Band	Jarak Band (cm)	Basepairs (Bp)
Band 1	1,0	1100
Band 2	1,3	1000
Band 3	1,4	900
Band 4	1,5	800
Band 5	1,6	700
Band 6	1,7	600
Band 7	1,8	500
Band 8	2,0	400
Band 9	2,1	300
Band 10	2,3	200

Hubungan jarak Band dan Basepairs sampel DNA darah dapat dilihat pada grafik dibawah ini.

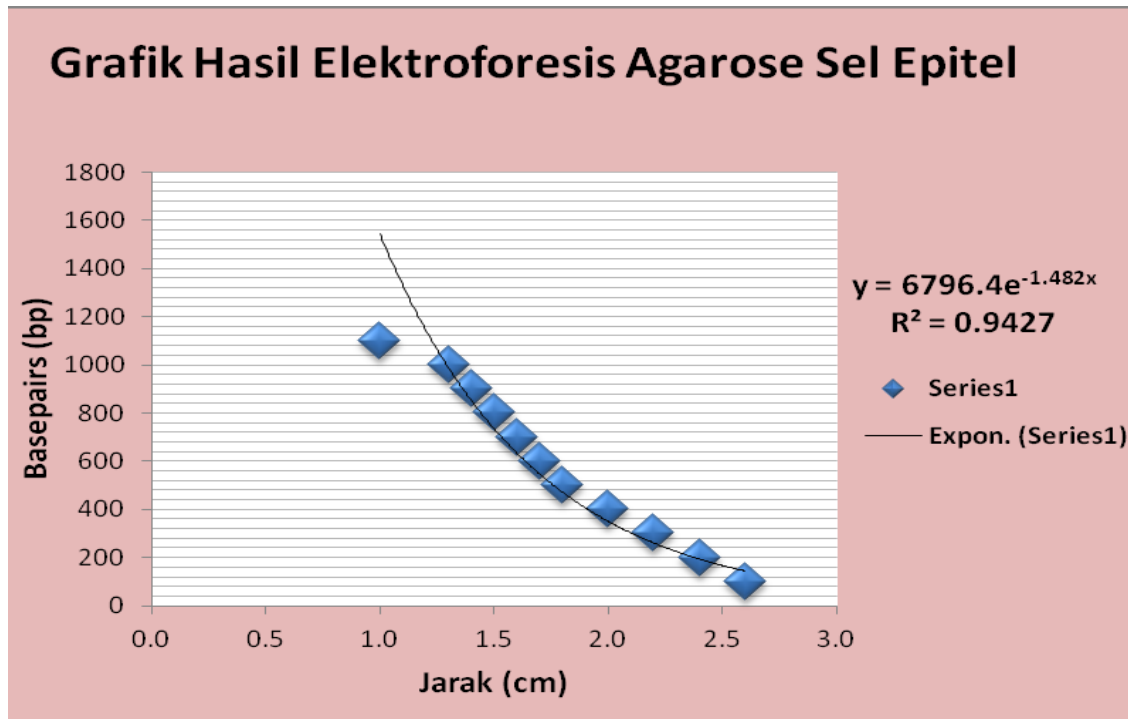


Gambar 1. Grafik Hasil Elektroforesis DNA Darah

Tabel 2. Hasil elektroforesis sel Epitel

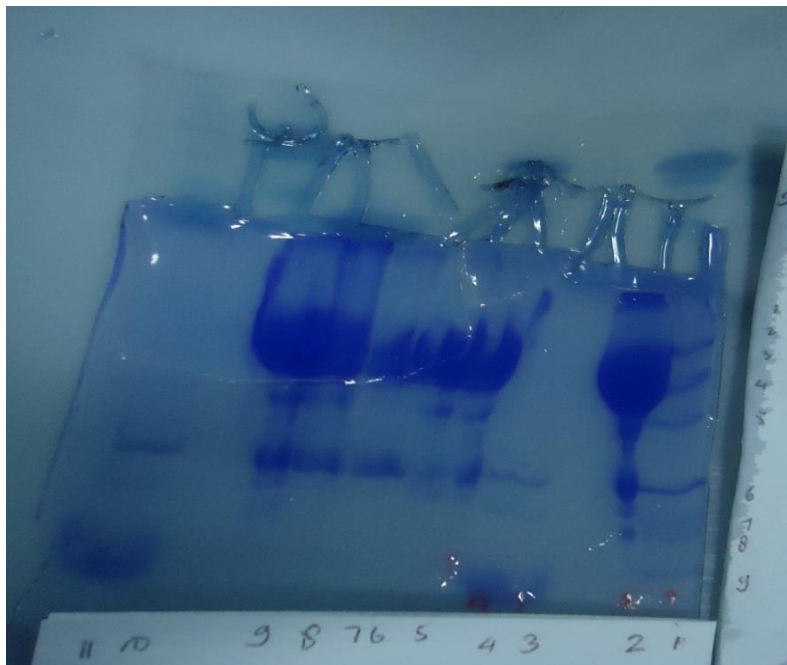
Band	Jarak Band (cm)	Basepairs (Bp)
Band 1	1,0	1100
Band 2	1,3	1000
Band 3	1,4	900
Band 4	1,5	800
Band 5	1,6	700
Band 6	1,7	600
Band 7	1,8	500
Band 8	2,0	400
Band 9	2,2	300
Band 10	2,4	200

Hubungan jarak Band dan Basepairs Sampel DNA Epithel dapat dilihat pada grafik dibawah ini



Gambar 2. Grafik Hasil Elektroforesis Sel Epite

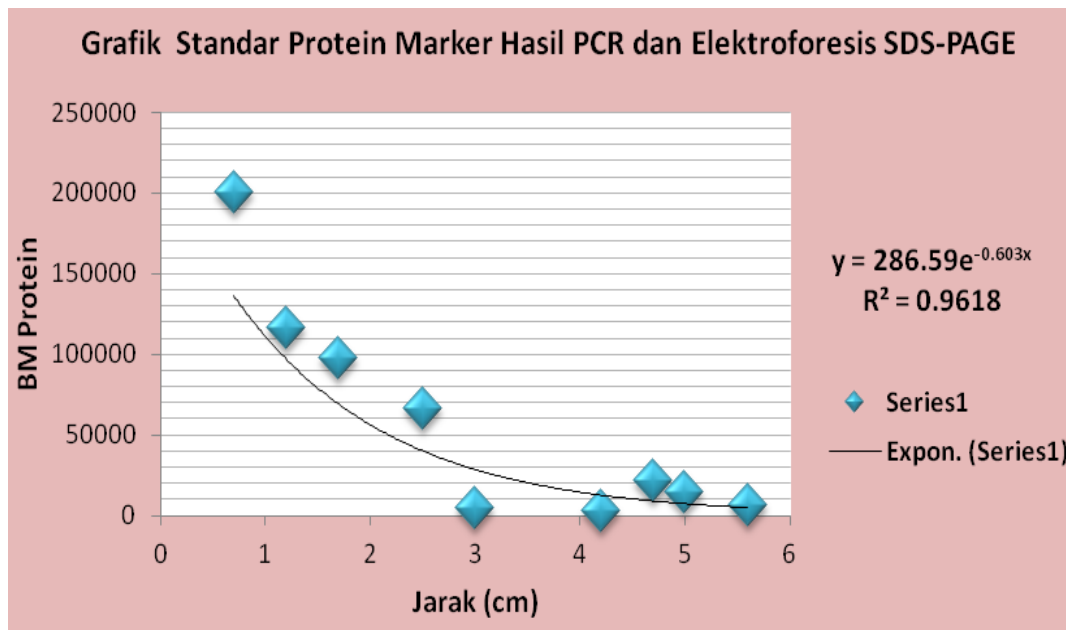
Foto Hasil PCR dan Elektroforesis Polyacrilamide Gel



Gambar 3.Foto Hasil PCR dan Elektroforesis Polyacrilamide Gel

Tabel 3. Jarak Band dan Berat Molekul Protein Marker Hasil PCR dan Elektroforesis SDS-PAGE

Nama Protein	Jarak Band (cm)	BM Protein
Myosin	0,7	200.000
B – Galaktoside	1,2	116.250
Phosphorylase b	1,7	97.400
Albumin	2,5	66.200
Ovalbumin	3,0	45.000
Carbonic anhydrase	4,2	31.000
Trypsin inhibitor	4,7	21.500
Lysozime	5,0	14.400
Aprotinin	5,6	6.500



Gambar 4. Grafik standar Protein Marker Hasil PCR dan Elektroforesis SDS-PAGE

Tabel 4. Jarak Band, Berat molekul dan Jenis Protein Sampel Elektroforesis SDS-PAGE

Sampel	Band 1	Band 2	Band 3	Band 4	Band 5	Band 6	Band 7	Band 8
Plasma	0,7			2,6	3,2	4,2	4,7	5,0
	200.000	-	-	66.200	45.000	31.000	21.500	14.400
	Myosin			Albumin	Ovalbumin	Carbonic anhydrase	Tripsin inhibitor	Lysozim
Protein Sitoplasmik(S)	0,3			2,2		4,1	4,8	-
	200.000	-	-	66.200	-	45.000	21.500	
	Myosin			Albumin		Ovalbumin	Tripsin inhibitor	
Protein Membrane (M)				2,6	3,1	4,5	4,7	5,1
	-	-	-	66.200	45.000	31.000	21.500	14.400
				Albumin	Ovalbumin	Carbonic anhydrase	Tripsin inhibitor	Lysozim
Protein supernatant teknik Pengendapan lar garam (Gs)					3,2	4,2	4,7	
	-	-	-	-	45.000	31.000	21.500	-
					Ovalbumin	Carbonic anhydrase	Tripsin inhibitor	

Protein Endapan				2,3		4,4		
teknik	-	-	-	66.200	-	31.000	-	-
pengendapan lar				Albumin		Carbonic		
garam (Gp)						anhydrase		
Protein								
Supernatan				2,5	3,1	4,3	4,6	
teknik				66.200	45.000	31.000	21.000	
pengendapan lar	-	-	-	Albumin	Ovalbumin	Carbonic	Tripsin	
Etanol (Es)						anhidrase	inhibitor	-
Protein endapan								
teknik	-			2,7		4,3		
pengendapan lar				66.200		31.000		
Etanol (Ep)		-	-	Albumin	-	Carbonic	-	-
						anhidrase		

2.2 Pembahasan

1. Bahan yang digunakan, yaitu :

- Tris berfungsi untuk mendenaturasi protein.
- EDTA berfungsi sebagai penghancur sel dengan cara mengikat ion magnesium yang diperlukan oleh sel untuk menjaga keutuhan selubung sel secara keseluruhan.
- SDS berperan dalam melisiskan membran sel juga dapat berperan dalam mengurangi aktivitas enzim nuklease yang merupakan enzim pendegradasi DNA NaCl berfungsi sebagai bahan penetral pada gula fosfat DNA.
- Proteinase K untuk melisiskan membran pada sel darah dan mendegradasi protein globular maupun rantai polipeptida dalam komponen sel
- larutan sel lisis untuk pelisisan sel
- nuclei lisis untuk pelisisan nucleus/inti sel sehingga DNA dapat diperoleh.
- enzim RNase berfungsi melisiskan RNA dari ekstrak DNA isopropanol dingin bertujuan agar DNA tersebut mengendap/mengumpul sekaligus memisahkannya dari garam-garam mineral sisa.
- Etanol 70% berperan dalam pemurnian DNA, garam-garam yang terlibat dalam proses ekstraksi bersifat kurang larut dalam isopropanol sehingga dapat terpresipitasi bersama DNA, oleh sebab itu dibutuhkan presipitasi kembali dengan etanol setelah presipitasi dengan isopropanol untuk menghilangkan residu garam.

2. DNA dapat diisolasi dari jaringan apapun yang mempunyai sel inti. Langkah – langkah yang harus di ikuti untuk memulai mengisolasi jaringan apapun adalah :

- Pengumpulan / panen sel – sel (cell harvest)
- Pemecahan sel – sel
- Pencernaan protein agar asam nucleat dilepaskan (protein digestion)
- Pengendapan DNA (DNA Precipitation)

3. Pada sumur kontrol seharusnya tidak boleh terlihat adanya DNA, ini terjadi kemungkinan penggunaan pipetnya yang telah terkontaminasi dengan DNA. Pada S8 sel darah, band terlihat hancur sehingga hanya sebagian band yang terlihat (tidak begitu jelas). Pada S14 dan S15 pada sel darah tidak menunjukkan adanya band, serta pada S3 sel epitel tidak terlihat adanya DNA, hal ini disebabkan karena sedikitnya jumlah DNA yang terisolasi, dan kesalahan dalam pengambilan sampel. Sedangkan pada Band

yang lainnya DNA terlihat jelas. Band yang jelas menunjukkan banyak DNA yang terisolasi.

4. Pada Foto hasil elektroforesis agarose terlihat bahwa jarak antara band – band DNA sangat dekat. Hal tersebut dapat disebabkan karena waktu yang digunakan untuk elektroforesis singkat. Untuk memperjelas hasil Band – Band DNA seharusnya Elektroforesis dilakukan lebih lama.
5. Pada Foto hasil Elektroforesis polyacrilamide terlihat bahwa jarak antara Band – Band DNA sangat dekat. Hal tersebut dapat disebabkan karena waktu yang digunakan untuk elektroforesis sangat singkat. Terlihat dari Band – Band DNA hanya sampai setengah dari medium agarose. Untuk memperjelas hasil Band – Band DNA seharusnya dilakukan elektroforesis lebih lama sampai Band – Band DNA hampir mencapai ujung dari medium polyacrilamide.
6. SDS-PAGE merupakan metode elektroforesis yang menggunakan kombinasi polyacrilamida dan SDS. Dalam praktikum ini migrasi protein dengan elektroforesis dilakukan pada tegangan 70 volt dan lama pemisahan kurang lebih 4 jam agar didapatkan molekul protein yang berbeda dapat terpisah dengan baik. Penanda migrasi ditentukan dengan pewarna coomassie brilliant blue.
7. Dari elektroforesis SDS-PAGE diperoleh persamaan $y = 286.59e^{-0.603x}$, sehingga dapat ditentukan berat molekul (BM) protein berdasarkan persamaan tersebut seperti pada tabel 9. Dari data dapat dilihat protein standar carbonic anhydrase dijumpai pada semua sampel protein yang dielektroforesis. Sampel protein membran dan protein plasma paling banyak ditemukan jenis protein standar.

III. KESIMPULAN DAN SARAN

3.1 Kesimpulan

1. Jarak Band – Band DNA pada kedua teknik elektroforesis yang dilakukan pada praktikum ini terlalu dekat. Hal ini mungkin disebabkan waktu elektroforesis masih terlalu singkat, konsentrasi medium yang di gunakan tidak sesuai atau kesalahan pada alat elektroforesis sendiri sehingga DNA bergerak lambat pada medium.
2. Ketelitian dalam membuat sampel sangat dibutuhkan.
3. Berat molekul protein sampel elektroforesis SDS-PAGE dihitung - berdasarkan persamaan $y = 286.59e^{0.603x}$
4. Band DNA darah dan sel epitelial manusia hasil elektroforesis agarose berada pada kisaran 700 bp dengan persamaan $y = 7938e^{-1.59x}$ untuk DNA darah dan $y = 6796e^{-1.48x}$ untuk DNA sel epitel.

3.2 Saran

1. Casting tray polyacrilamide yang digunakan dalam praktikum sebaiknya ditambah agar masing - masing praktikan dapat melakukan praktikum.
2. Persiapan bahan, gel dan elektroforesis sebaiknya dilakukan lebih awal dan lebih baik sehingga proses elektroforesis dapat dimulai lebih awal sehingga durasi elektroforesis lebih panjang. Dengan demikian, jarak Band – Band DNA hasil elektroforesis yang diperoleh akan lebih panjang.