

## LAPORAN PRAKTIKUM 5

### ISOLASI DNA

Oleh : Herviani Sari dan Henny E. S. Ompusunggu

Hari/Tanggal/Jam Praktikum : Kamis/ 1 November 2012/ 12.00-15.00 WIB

#### Tujuan :

1. Praktikan mengerti metode umum mengisolasi DNA
2. Praktikan dapat Mengisolasi DNA dari sel-sel epithelial mulut
3. Praktikan mengerti dan dapat mempraktekkan teknik PCR dengan sempel DNA manusia

#### Pendahuluan:

DNA dapat diisolasi dari jaringan apapun yang mempunyai sel inti.

Langkah-langkah yang harus diikuti dengan jaringan apapun adalah:

1. Pengumpulan/panen sel-sel (*cell harvest*)
2. Pemecahan sel-sel (*cell lysis*)
3. Pencernaan protein agar asam nucleat dilepaskan (*protein digestion*)
4. Pengendapanan DNA (*DNA precipitation*)

Pada praktikum ini, DNA diisolasi dari “jaringan” praktikan sendiri, yaitu sel-sel epitelial mulut dan diisolasi dari darah. PCR (polimer chain reaksi) dilaksanakan dengan sempel DNA manusia.

#### Isolasi DNA dari Sel-Sel Epitel

#### Alat dan Bahan

Minuman isotonic	beaker	pH meter	akuades
Batang kayu	waterbath	Tabung reaksi	mikrosentrifus
Timbangan digital	EDTA	Spidol	SDS
Stok proteinase K (100 $\mu$ g/ml)	NaCl	Vortex	Etanol dingin
Tabung mikrosentrifus	Tris	1 N HCl	Pipet Mohr

## **Prosedur Kerja**

### A. Panen Sel-Sel

1. Dengan batang kayu praktikan menggosok bagian dalam pipi selama 30 detik. Jangan ditelan.
2. Kemudian praktikan berkumur dengan 10 mL larutan isotonic, sekaligus menggosok-gosok bagian dalam pipi selama 1 menit. Jangan ditelan.
3. Kemudian keluarkan minuman tersebut ke dalam beaker. Inilah merupakan larutan sel sampel dari praktikan.

### B. Lisis sel-sel dan pencernaan protein

4. Tentukan waterbath pada temperatur 56°C.
5. Dengan pipet Mohr, ambil 1,5 mL larutan sel ke dalam tabung mikrosentrifus.
6. Dengan seluruh sampel praktikan agar seimbang, sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 10,000rpm. Buanglah supernatant yang ada dan tambahkan larutan sel praktikan lagi.
7. Mengulangi langkah 5 dan 6 dua kali lagi supaya endapannya semakin banyak.
8. Tambahkan 1 mL buffer Tris-EDTA.
9. Kemudian vortex sampel selama 30 detik (sampai endapan hancur).
10. Kemudian ditambahkan 50 $\mu$ L Proteinase K dan biarkan di waterbath (56C) selama 10 menit.

### C. Pengendapan DNA

11. Tambahkan 100 $\mu$ L NaCl, 2,5M. Aduk dengan cara mebolak-balikkan tabungnya.
12. Transfer semua ke tabung reaksi yang bersih dan kering dengan hati-hati biar tidak banyak buih-buih.
13. Dengan hati-hati tambahkan 1 mL etanol dingin supaya batasnya jelas (untuk mengendapkan/menggumpalkan DNA). Kemudian diamkan selama 5 menit
14. DNA akan menggumpal di batasan buffer dan etanol (kelihatannya seperti benang putih)

15. DNA diambil dengan batang kaca atau besi dan ditaruh di tabung sentrifugasi kecil. Pakailah tisu utk mengisap sisa dari etanol.

\*\* Kalau tidak bisa diambil dengan batang kaca, cobalah buang etanol sampai ke lapisan putih dan ambil bagian yang dianggap berisi DNA ke dalam tabung reaksi sentrifugasi. Pakai alat sentrifugasi pada kecepatan tinggi selama 2 menit- DNA akan dilihatkan sebagai endapan. Buanglah supernatant.\*\*

16. Sentrifugasi lagi pada kecepatan 13.500 rpm selama 1 menit.

17. Buang supernatant , kemudian keringkan dengan tissue.

18. Kemudian tambahkan 100 $\mu$ L larutan DNA rehidrasi.

19. Lalu masukkan kedalam waterbath dengan suhu 65°C selama 30 menit (Hal ini dilakukan untuk melarutkan DNA nya).

### **Isolasi DNA dari Darah**

Alat dan Bahan yang digunakan

Darah 1 cc	Larutan RNAase	Anti-koagulan
Isopropanol	Larutan sel lisis	70% etanol
Larutan nuclei lisis	Larutan rehidrasi DNA	Larutan “protein precipitation”
Waterbath	Tabung mikrosentrifus	Mikrosentrifus
Vortex	Kertas absorben	Pipet tetes

### **Prosedur Kerja**

1. Ambil satu tabung Eppendorf (tabung mikrosentrifus 1,5 mL) yang steril. Isi dengan 1mg anti-koagulan (EDTA, heparin atau citrat) dan masukkan 1ml darah kedalamnya.
2. Digoyangkan perlahan agar darah dan anti-koagulan bercampur dengan baik.
3. Ambil satu tabung Eppendorf steril lagi dan isikan dengan 900 $\mu$ L larutan sel lisis (sel lisis berfungsi untuk memecah sel darah merah).

4. Ambil 300  $\mu\text{L}$  darah dari tabung mikrosentrifus pertama dan masukkan ke dalam tabung kedua. Bolak-balikkan tabung 5-6 kali supaya cairannya bercampur dengan baik.
5. Inkubasi tabung mikrosentrifus kedua selama 10 menit pada temperatur ruang (bolak-balikkan tabung 2-3 kali selama masa inkubasi) untuk melisis sel-sel darah merah.
6. Sentrifugasi tabung pada 13.500 rpm (13.000-16.000  $\times g$ ) selama 2 menit pada temperatur ruang.
7. Kemudian Buang supernatant sebanyak mungkin tanpa mengganggu pellet putih yang tampak. Lebih kurang 10-20  $\mu\text{l}$  cairan residu akan tertinggal dalam tabung tersebut.
8. Vortex tabung dengan kuat, sebentar (10-15 detik) agar sel-sel darah putih tersuspensi kembali.
9. Tambahkan 300  $\mu\text{L}$  larutan nukleii lisis kedalam suspensi diatas (langkah ke-8). Campur dengan menggunakan pipet 5-6 kali untuk melisis sel-sel darah putih. Larutan akan menjadi “viscous” (kental).
10. Tambahkan larutan “protein precipitation” sebanyak 100  $\mu\text{L}$  kedalam larutan yang diperoleh pada langkah 9 atau 10 dan vortex dengan kuat selama 10-20 detik. Gumpalan protein yang kecil mungkin akan terlihat.
11. Sentrifugasi 13.500 rpm (13.000 - 16.000  $\times g$ ) selama 3 menit, pada temperatur ruangan. Pellet protein yang berwarna coklat tua akan terlihat.
12. Pindahkan supernatantnya kedalam tabung Eppendorf steril yang berisi 300  $\mu\text{l}$  isopropanol (temperatur ruangan).
13. Tabung dibalikkan perlahan-lahan supaya larutan bercampur dan akan terlihat massa seperti benang-benang putih (DNA-strands).
14. Sentrifugasi pada 13.500 rpm (13.000 - 16.000  $\times g$ ) selama 1 menit pada temperatur ruangan. DNA akan terlihat sebagai pellet kecil yang putih.
15. Buang supernatant dan tambahkan 300  $\mu\text{L}$  70% etanol (temperatur ruangan). Bolak-balikkan tabung perlahan beberapa kali untuk mencuci pellet DNA. Sentrifugasi lagi seperti pada langkah 15 diatas.
16. Dengan hati-hati aspirasikan etanol (menggunakan pipet). Jangan sampai pelletnya terbuang! Letakkan tabung secara terbalik diatas kertas absorben dan keringkan di udara selama 10-15 menit.
17. Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  larutan rehidrasi DNA dan rehidrasi DNanya dengan menginkubasikan tabung pada 65 °C selama 30-60 menit. Secara periodik, campurkan

larutan dengan cara menepuk tabung perlahan. Boleh juga dengan cara membiarkannya pada 4 °C selama satu malam.

18. DNA disimpan pada temperatur 2-8°C atau untuk jangka panjang pada -20°C.

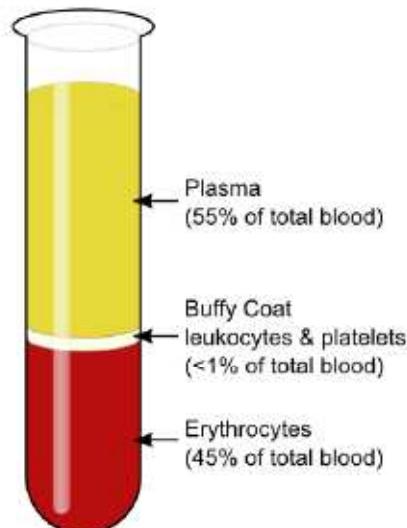
**LAPORAN PRAKTIKUM 6**  
**ISOLASI PROTEIN DARI DARAH**  
**Oleh : Herviani Sari dan Henny E. S. Ompusunggu**  
**Hari/Tanggal/Jam Praktikum : Kamis/ 8 November 2012/ 12.00-15.00 WIB**

**Tujuan:**

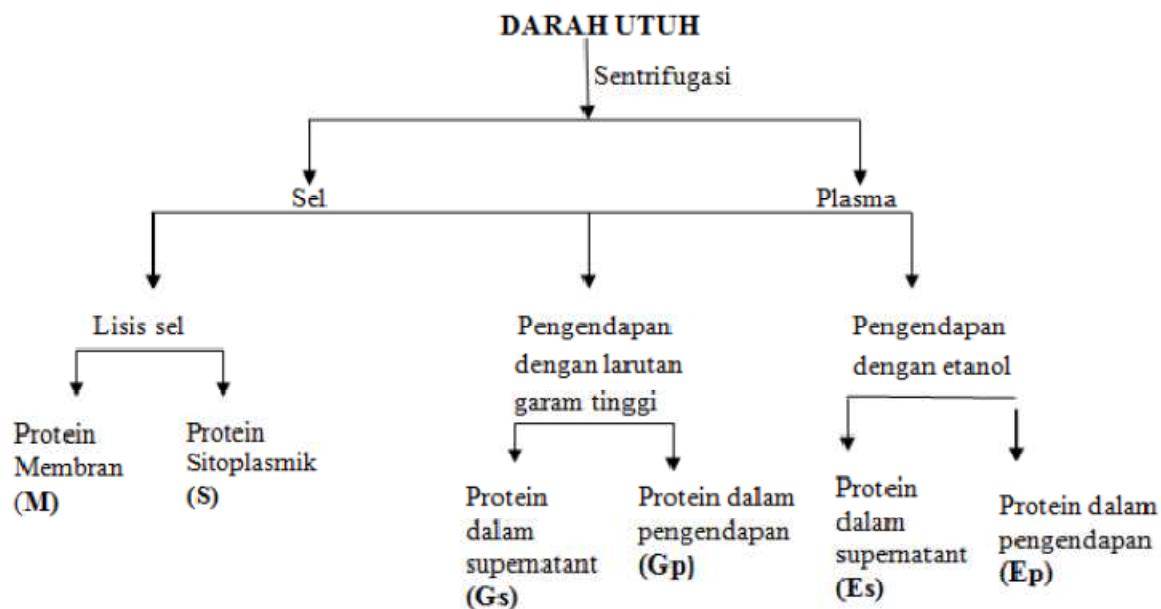
1. Praktikan mengerti teknik sentrifugasi untuk pemisahan bagian-bagian sel
2. Praktikan mengerti teknik biokimia umum lain yang penting dalam proses isolasi protein

**Pendahuluan:**

Setiap sel kita berisi dengan ribuan macam protein. Ada protein yang berada di cairan intraselular (protein sitoplasmik) dan ada yang berkaitan dengan membran sel (membran ekstraselular maupun membran-membran organel). Pada praktikum ini kita menggunakan beberapa teknik biokimia yang sering dipakai untuk mengisolasi protein dari molekul/ bahan sel yang lain. Jaringan yang akan digunakan adalah darah. Seperti kita ketahui, darah kita terdiri dari plasma serta sel-sel darah. Kita akan mencoba memisahkan protein plasma dari protein intraselular dan protein membran, maupun dari bagian sel lain dengan teknik sentrifugasi serta pengendapan protein dengan larutan garam konsentrasi tinggi (*salting out*) dan pengendapan protein dengan etanol (*alcohol precipitation*). Pada akhirnya diharapkan ada 6 sampel protein yang dapat dianalisa lanjut dengan SDS-PAGE yaitu M, S, Gs, Gp, Es, Ep.



Schema (*flow-chart*) kegiatan praktikum ini digambarkan di bawah.



#### Alat dan Bahan :

Jarum steril	Tabung steril untuk darah	14 ml tabung sentrifuse klinik (3 buah)
Sentrifus klinik	Pipet otomatis	2 ml tabung mikrosentrifuse (2 buah)
Mikrosentrifus	Pipet tetes	1,5 ml tabung mikrosentrifus
Es	Vorteks	Larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang jenuh (>13,2g/100ml)
pH meter	NaCl	Larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Tabung reaksi dan rak	$\text{Na}_2\text{PO}_4$	Tempat membuang cairan biologis
Pipet Mohr	EDTA	Etanol absolut, dingin
Tisu		Spidol

#### Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

- ❖ **Buffer Cuci:**

Siapkan 100ml buffer yang berisi 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 mM EDTA.  
Tentukan pH =7,4. Simpan di kulkas atau di dalam es.

❖ **Buffer Hemolisis:**

Siapkan 100 ml buffer yang berisi 5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1mM EDTA. Tentukan pH =8. Simpan di kulkas atau di dalam es.

**Cara Kerja:**

***Bagian A: Sel-sel Darah dan Plasma dipisahkan***

1. Pakailah sarung tangan dan teknik keselamatan di laboratorium yang benar.
2. Diambil 4-5 ml darah dari seseorang dari 1 grup meja. Diharap dapat +/- 1,5 ml plasma dari darah yang diambil (500 µl plasma dibutuhkan untuk prosedur pengendapan dengan garam tinggi, 500 µl plasma untuk pengendapan dengan etanol dan 500 µl plasma lagi merupakan sampel protein plasma).
3. Transfer darah ke tabung sentrifus klinik. Pakai tabung sentrifus klinik yang lain, agar seimbang (misalnya dari grup meja lain) dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selama 5 menit.
4. Transfer semua plasma (yaitu bagian supernatant) ke tabung mikrosentrifuse (2ml) yang bersih dan kering. Tandai tabung dengan “plasma” dan letak di dalam es. Inilah merupakan sampel plasma.
5. Dengan hati-hati buang sisa supernatan ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan pipet tetes.
6. Tambah 6 ml buffer cuci yang dingin ke tabung sentrifus klinik tersebut. Tutup dan vorteks pelan-pelan supaya sel-sel bercampur rata dengan buffer.
7. Pakai tabung sentrifus klinik yang lain, agar seimbang (misalnya dari grup meja lain) dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selama 5 menit.
8. Dengan hati-hati buang supernatan ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan pipet tetes.
9. Ulangi langkah 6-8 sekali lagi. Endapan ini merupakan sel-sel darah

***Bagian B: Isolasi Protein-protein dari Sel-sel***

1. Pada tabung sentrifus klinik yang berisi sel-sel darah, tambahkan 6 ml buffer hemolisis yang dingin.
2. Tutup dan vorteks kuat.
3. Pakai tabung sentrifus klinik yang lain, agar seimbang (misalnya dari grup meja lain) dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selama 10 menit.

4. Dengan hati-hati ambil 1 ml supernatan dari atas tabung sentrifus klinik dan masukan ke dalam tabung reaksi mikrosentrifus yang 2 ml. Tandai tabungnya dan letak di dalam es. Inilah merupakan sampel protein sitoplasmik (**S**). Langsung simpan di bagian atas kulkas.
5. Buang +/- 5 ml supernatan lagi ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan pipet tetes.
6. Tambahkan 7 ml buffer hemolisis yang dingin. Vortex dengan kuat.
7. Pakai tabung sentrifus klinik yang lain, agar seimbang (misalnya dari grup meja lain) dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selama 10 menit.
8. Buanglah supernatant ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan hati-hati. 2ml yang paling bawah (termasuk pengendapan kalau ada) ditransfer ke tabung mikrosentrifus yang 2ml yang sudah ditandai. Inilah merupakan sampel protein membran (**M**).
9. \*\*Tunggu semua kelompok siap, sebelum alat mikrosentrifus dihidupkan utk langkah berikut ini\*\* Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang (misalnya dari grup meja lain) dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus supaya *hinge* ke tengah alat. Putar selama 30 menit pada kecepatan 14.000 rpm.
10. Selama menunggu hasil langkah “9”, teruskan dengan bagian C.
11. Ketika periode mikrosentrifus sudah siap, keluarkan tabung mikrosentrifus dengan hati-hati. Akan terlihat pengendapan yang agak halus. Buang supernatan ke tempat buangan cairan biologis. Tambah 500  $\mu$ l buffer hemolisis/cuci dan tutup tabung. Simpan di atas es/ di bagian atas kulkas.

#### ***Bagian C Pengendapan Protein Plasma dengan Larutan Garam Berkonsentrasi Tinggi***

1. Pada tabung mikrosentrifus 1,5ml tambahkan 250 $\mu$ l larutan (NH4)2SO4 yang jenuh. Tambahkan 500 $\mu$ l sampel plasma dari tabung yang disimpan tadi.
2. Tutup dan vorteks kuat sebentar. Biarkan diam selama 5 menit di temperatur ruangan.
3. Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang (misalnya dari grup meja lain) dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi.
4. Dengan hati-hati transfer 500  $\mu$ l supernatan ke tabung reaksi mikrosentrifus lain yang sudah ditandai. Letakkan di atas es. Inilah merupakan sampel protein supernatan garam tinggi (**GS**). Langsung simpan di bagian atas kulkas.
5. Pakailah tisu untuk mengeringkan bagian atas endapannya. Tambah 1ml larutan 50% (NH4)2SO4 (yang tak jenuh) dan campur baik dengan pipet tetes.

6. Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang (misalnya dari grup meja lain) dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi.
7. Buanglah supernatan dan keringkan bagian di atas endapannya dengan tisu. Inilah merupakan sampel protein pengendapan garam tinggi (**GP**). Tambah 500  $\mu$ l buffer hemolisis dan simpan di bagian atas kulkas.

#### ***Bagian D Pengendapan Protein Plasma dengan Etanol***

1. Pada tabung mikrosentrifus 1,5ml tambahkan 250 $\mu$ l etanol absolut yang dingin. Tambahkan 500 $\mu$ l sampel plasma dari tabung yang disimpan tadi.
2. Tutup dan vorteks kuat sebentar. Biar diam selama 5 menit di atas es.
3. Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang (misalnya dari grup meja lain) dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi.
4. Dengan hati-hati transfer supernatan ke tabung reaksi mikrosentrifus lain yang sudah ditandai. Letakkan di atas es. Inilah merupakan sampel protein supernatan etanol (**ES**).
5. Pakailah tisu untuk mengeringkan bagian atas endapannya. Tambah 1ml etanol 50% dan campur baik dengan pipet otomatis – jagalah supaya tabung mikrosentrifus sedingin mungkin (yaitu kerjakan dengan cepat dan selalu simpan di atas es)
6. Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang (misalnya dari grup meja lain) dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi.
7. Buanglah supernatan dan keringkan bagian di atas endapannya dengan tisu. Inilah merupakan sampel protein pengendapan etanol tinggi (**EP**). Tambah 500 1 buffer hemolisis dan simpan di atas es/bagian atas kulkas.

Ketika semua sampel siap, periksa bahwa semuanya ditandai dengan jelas. Simpan di kulkas, bagian atas sampai minggu depan.

**LAPORAN PRAKTIKUM 7**  
**PCR, ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS-PAGE**  
**(*SDS POLYACRILAMIDE GEL ELEKTROFORESIS*)**  
**Oleh : Herviani Sari dan Henny E. S. Ompusunggu**  
**Hari/Tanggal/Jam Praktikum :**  
**Kamis/ 22 November 2012 dan 13 Desember 2012/ 12.00-18.00 WIB**

**Tujuan :**

1. Praktikan memahami dan mengerti teknik PCR.
2. Praktikan mengerti teknik dasar elektroforesis.
3. Praktikan dapat melatih teknik elektroforesis agarose dengan sampel DNA yang diperoleh.
4. Praktikan mengerti teknik penggunaan SDS-PAGE untuk memisahkan protein-protein darah.

**Pendahuluan:**

Protein-protein atau asam nukleat dapat dipisahkan satu dari yang lain atas dasar perbedaan muatan listrik. Pada hari ini, Anda akan diperlihatkan hasil elektroforesis DNA dengan teknik elektroforesis agarose dan memisahkan protein-protein yang sudah diisolasi dari darah dengan SDS-PAGE.

Elektroforesis agarose dapat digunakan untuk memisahkan asam nukleat (atau fragmennya) yang bermuatan negatif sesuai dengan arus listrik. Pada sistem elektroforesis tersebut, agarose merupakan bahan media yang berfungsi sebagai alas/ medium pemisah yang diletakkan antara anode dan catode alat elektroforesis. Medium pemisah tidak bergerak (fase stationer). Molekul yang ingin dipisahkan diletakkan pada medium pemisah dan dibawa sesuai dengan muatan listrik oleh karena medium pemisah direndam dengan larutan ionik. Molekul yang besar bergerak lebih lambat dari pada molekul lebih kecil. Gel agarose disiapkan dengan ethidium bromide yang mengikat dengan DNA (*intercalater*) dan diperlihatkan warna oren kalau disinarkan dengan cahaya UV.

Protein-protein dapat dipisahkan berdasarkan berat molekul. SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis*) adalah teknik elektroforesis yang sering digunakan dalam analisis protein di laboratorium. Sempel protein denaturasi (dipanaskan) dan dicampur dengan SDS (yang merupakan detergen yang anionik) dengan akibat kompleks

protein-detergen itu bermuatan negatif dan protein yang lebih besar menpunyai muatan negatif yang lebih besar.. Kompleks protein-detergen itu akan dibawa oleh medan listrik ke arah kutub positif (anoda). Gel akrilamide berfungsi sebagai dasar atau alas atas gerakan sampel protein. Konsentrasi akrilamide menentukan ukuran pori-pori gel dan ukuran pori-pori gel menentukan jarak yang ditempuh oleh kompleks protein-SDS. Jadi berapa faktor harus ditentukan untuk memaksimalkan pemisahan protein-protein melalui teknik SDS-PAGE (antara lain: kadar SDS, konsentrasi gel akrilamide dan ukuran gelnya, kemurnian sampel protein dan jumlah sampel yang diletakkan pada gel; voltage yang digunakan pada alat elektroforesis dan selama medan listrik dihidupkan).

### **Percobaan PCR**

#### **Alat dan bahan yang dibutuhkan pada percobaan PCR**

1. Forward Primer : konsentrasi 20 pmol
2. Reverse Primer : konsentrasi 20 pmol
3. dNTP's : konsentrasi akhir adalah 0,1 mM untuk setiap nukleotida (A T,G,C)
4. 10 x Buffer (10 x Konsentrasi) dengan konsentrasi MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM
5. Aquabidest steril
6. Taq Polimerase : 0,125 L
7. Sample DNA
8. Mineral oil (untuk menghindari penguapan)
9. Therma Cycler PCR
10. UV reader

#### **Cara kerja PCR**

1. Disiapkan larutan untuk beberapa orang sekaligus atau disebut dengan larutan **Mix Solution** (untuk memudahkan pekerjaan dan memperoleh ketepatan volume)
2. Perhatikan penyimpanan larutan-larutan diatas, ada yang harus pada temperature -20°C (Primer, dNTP's, Buffer, Taq dan bila perlu larutan DNA), oleh karena itu pada saat bekerja harus diletakan yang berisi es
3. Selalu gunakan tabung dan tips yang telah disterilisasi

### Contoh menyiapkan Mix Solution :

	<b>1 sample</b>	<b>13 sample</b>
• 5x PCR Buffer	5 µL	65 µL
• dNTPs 10 mM	0,5 µL	6,5 µL
• MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1 µL	13 µL
• Primer LT <sub>a</sub> -HTB-1 (40 pmol)	0,25 µL	3,25 µL
HTB-3 (40 pmol)	0,25 µL	3,25 µL
• Taq polymerase	0,2 µL	2,6 µL
• Dd H <sub>2</sub> O	15,3 µL	198,9 µL
• Tempalate DNA	2,5 µL	
TOTAL	25 µL	

4. Siapkan 13 tabung PCR (steril), dipipetkan sebanyak 22,5 µL Mix Solution masukan ke masing-masing tabung PCR
5. Tambahkan masing-masing 2,5 µL larutan DNA 12 sampel, vortex
6. Jangan lupa mengikutsetakan kontrol negatif dalam setiap menjalankan PCR (control negative = tabung PCR hanya berisikan Mix Solution, tanpa penambahan larutan DNA sampel)
7. Tambakan lagi sebanyak 50 µL (1 tetes) mineral oil (untuk mencegah penguapan saat dilakukan PCR)
8. Tabung ditutup rapat dan susun di dalam rak/blok alat Thermal Cycler
9. Atur program untuk menjalankan PCR

### Elektroforesis Agarose

#### Alat dan Bahan

<b>Alat</b>	<b>Bahan</b>
Sarung tangan	7 sampel protein darah yang telah disiapkan pada praktikum sebelumnya
Waterbath	Sampel DNA sel epithelial
Mikrosentrifus	Pewarna DNA (crystal violet dalam 20% gliserol)
Tabung mikrosentrifus (1,5 ml)	Etanol absolute dingin
Pipet Mohr	Gel poliakrilamide-SDS 10%

Erlenmeyer flask	Isobutanol
pH meter	Protein standarad SDS-PAGE
Pipet otomatis	1 N HCL
Pipet tetes	Tris
Alat elektroforesis agarose	DTT
Alat elektroforesis	SDS
Power supply	Agar 2%
Beaker	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Hamilton syringe	Gliserol
Vortex	EDTA
Tissue	Asam boric
	Larutan pewarna
	Larutan pencuci
	Agarose

### Persiapan Larutan :

1. **1X TBE** - setiap kelompok menyiapkan 1000mL (resep dibawah ini utk 1000ml)
  - 10.8 g Tris, 5.5 g asam borik acid, 0.74 g EDTA dimasukkan ke dalam beaker 1000 ml.
  - Tambahkan 900mL akuades dan aduk dengan magnetic stirrer sampai larut.
  - Tambahkan akuades sampai volume larutan sama dengan 1 L.
  - Simpan di dalam botol bersih pada temperatur ruangan (bisa disimpan selama beberapa bulan).
2. **0.8% Agarose** - setiap kelompok siapkan agarose secukupnya untuk anggotanya (perlu 40ml/casting tray) – resep di bawah ini utk 125ml.
  - 1 g agarose dimasukkan ke dalam beaker/flask 250 ml yang bersih.
  - Tambahkan 125 ml larutan 1X TBE buffer solution.
  - Tutup flask/beaker dengan foil aluminium untuk mengurangi penguapan dan sisakan celah sedikit.
  - Aduk secara gerakan flask. Kemudian panaskan sampai mendidih dan larutan jernih.

- Dinginkan sampai ~60° dan tambahkan 12µL larutan ethidium bromide/casting tray.
3. **Larutan Dapar Sampel** (50mM Tris-HCl pH 6,8; 10%(v/v) gliserol; 1% (b/v) SDS; 0,01% (b/v) biru bromfenol).
  4. **Larutan Dapar Elektroda** (250mM Tris-HCl pH 6,8; 1,8M glisin; 1% (b/v) SDS).
  5. **Larutan Pewarna** (0,15% Coomassie Brilliant Blue R-250; 250mL metanol; 50mL asam asetat; akuades sampai 500mL)
  6. **Larutan Pencuci** (50mL metanol; 75mL asam asetat; akuades sampai 1000mL)

#### **Bagian A – ELEKTROFORESESIS GEL AGAROSE**

1. Setiap praktikan menyiapkan casting tray masing-masing. Pasang satu “comb” (sisir) pada pertengahan “tray” (plat cetakan) dan satu sisir lagi pada ujungnya..
2. Tuangkan ~ 40ml 0,8% agarose ke casting tray Anda.

#### **Cara kerja alat elektroforesis:**

1. Apabila gel sudah beku, lepaskan comb secara hati-hati.
2. Letakkan gel di dalam elektroforesis tank yang sudah berisi larutan 1X TBE. Perhatikan cara meletakkannya. Elektroforesis tank dapat disisi dengan 3 casting gel.
3. Tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel-gel terbenam seluruhnya.
4. Untuk mewarnai DNA manusia, campur 10µl DNA dari sel epitelial dengan 10µl perwarna DNA di atas parafilm dan langsung masukan semuanya (20µl) ke sumur gel. Kemudian, dengan parafilm baru lagi, campur 10µl DNA dari sel darah dengan 10µl perwarna DNA di atas parafilm dan langsung masukan semuanya (20µl) ke sumur gel. Catat posisi dan urutan sampel grup Anda pada halaman hasil praktikum ini.
5. Nyalakan mesin elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 90V. Sampel-sampelnya akan mulai bergerak ke katode, (DNA bermuatan negatif)
6. Matikan mesin elektroforesis secara sempurna.
7. Dengan sangat hati-hati keluarkan gel dan letakan pada tray yang disediakan.
8. Pindahkan ke alat “UV reader” untuk melihat hasilnya.supaya hasilnya lebih jelas. Kemudian foto hasilnya.

## SDS PAGE

### Persiapan Gel

1. Bersihkanlah plat kaca dengan aquades dan etanol (70%)
2. Kemudian susun lempeng kaca serta *spacer*. Celaht antara lempeng dengan *spacer* ditutup dengan agar 2% secukupnya.
3. Untuk menyiapkan gel poliakrilimide-SDS 10%, sesuai dengan tabel yang di bawah ini. Siapkan gel pemisah dulu.

Bahan	gel pemisah perlu ~20ml/gel (tabung reaksi 1)	gel penumpuk perlu ~5ml/gel (tabung reaksi 2)
Acrylamid	1880µL	360 µL
1,5 M Tris HCl pH 8,6	1280 µL	-
0,5M Tris HCl pH 6,8	-	240 µL
Aquadest	1930 µL	700µL
SDS 10%	5,6 µL	10µL
APS	3,8 µL	7,2 µL
Temed	3,8 µL	1mL

4. Tuang campuran gel pemisah ke dalam ruang antara lempeng kaca, Sisakan kira-kira 2,5 cm dari tepi atas lempeng kaca untuk gel penumpuk. Teteskan isobutanol untuk menyingkirkan udara pada bagian atas gel dan agar batas antar gel dapat terbentuk dengan baik. Biarkan gel pemisah berpolimerisasi selama kurang lebih 30 menit. Siapkan gel penumpuk.
5. Setelah gel pemisah berpolimerisasi, tuangkan campuran gel penumpuk di atasnya. Sisipkan sisir plastik (pembentuk sumur sampel). Biarkan hingga gel penumpuk berpolimerisasi.
6. Setelah gel penumpuk berpolimerisasi, lepas sisir dari bagian atas dan klem serta *spacer* bagian bawah.
7. Letakkan lempeng kaca yang berisi gel secara vertikal pada alat electroforesis dan kemudian klem. Isi tempat dapar dengan dapar elektroda. Singkir gelembung udara pada bagian bawah gel.

***Bagian B: Persiapan sampel-sampel protein (sampel-sampel protein akan disiapkan petugas lab)***

1. Tentukan waterbath pada temperatur 100C.
2. Praktikan menyiapkan 7 tabung mikrocentrifus dan tandai dengan “plasma”, “M”, “S”, “GS”, “GP”, “ES”, “EP”. Keluarkan 7 sampel protein darah kalian (yaitu plasma, M, S, GS, GP, ES, EP) dari kulkas.
3. Tambahkan 450  $\mu\text{L}$  buffer sampel dan 25 $\mu\text{L}$  -merkaptoetanol ke setiap tabung mikrosentrifus yang sudah ditandai. Transfer 50  $\mu\text{L}$  sampel protein plasma, M, S, GS, GP, ES, EP ke tabung mikrosentrifus masing-masing.
4. Tutup dan vorteks pelan-pelan supaya endapannya tercampur rata dengan buffer.
5. Masukan semua tabung mikrosentrifus ke dalam waterbath yang mendidih. Biarkan 5 menit.
6. Tentukan bahwa tabung mikrosentrifus berkeseimbangan dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan 14.000 rpm.

***Bagian C : Loading and running the gel***

1. Masukkan 10 $\mu\text{L}$  sampel protein (yaitu plasma, m, 2S, G<sub>s</sub>2, G<sub>p</sub>, E<sub>s</sub>2, E<sub>p</sub>) ke dalam sumur masing-masing dengan pipet otomatik. Pada sumur yang terakhir masukkan 10 $\mu\text{L}$  protein petanda. Catat nomor sumur dan isinya.
2. Hubungkan alat elektroforesis dengan *power supply*. Jalankan elektroforesis selama 3 jam (voltage yang ditentukan pada alat elektroforesis tergantung waktu yang ada untuk menjalankannya).

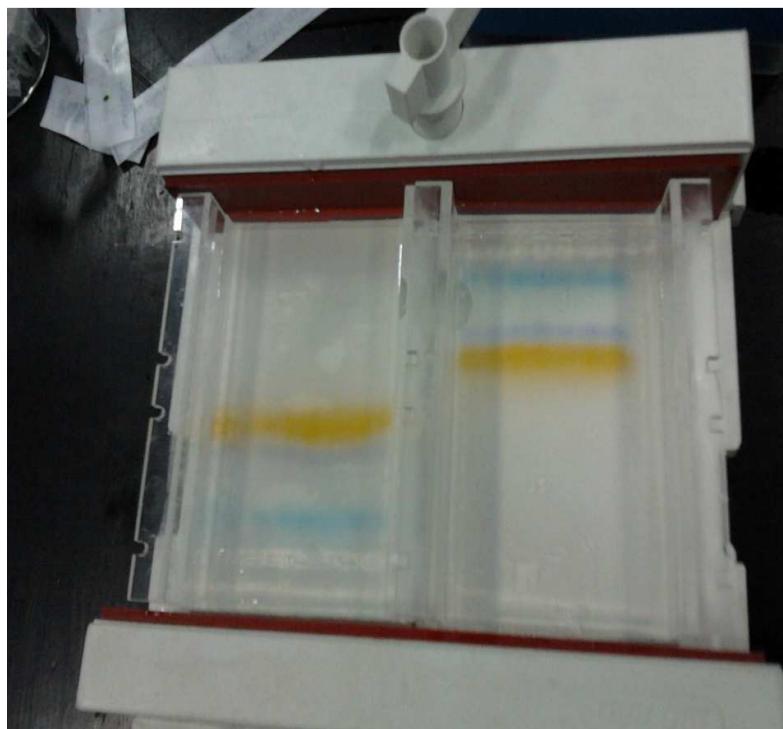
***Bagian D: Pewarnaan Gel***

1. Setelah waktunya untuk menjalankan pemisahan protein selesai, matikan *power supply* dan lepaskan semua kabel dari alat elektroforesis.
2. Pakai sarung tangan. Buka klem. Angkat *spacer* pada kedua sisi lempeng kaca, kemudian pisahkan satu lempeng kaca dari gel. Potong gel pada batas antara gel penumpuk dan gel pemisah. Tandai salah satu ujung gel (catat petanda yang Anda buat supaya ingat).
3. Dengan hati-hati angkat gel dan rendam dalam larutan pewarna selama 30-60 menit.

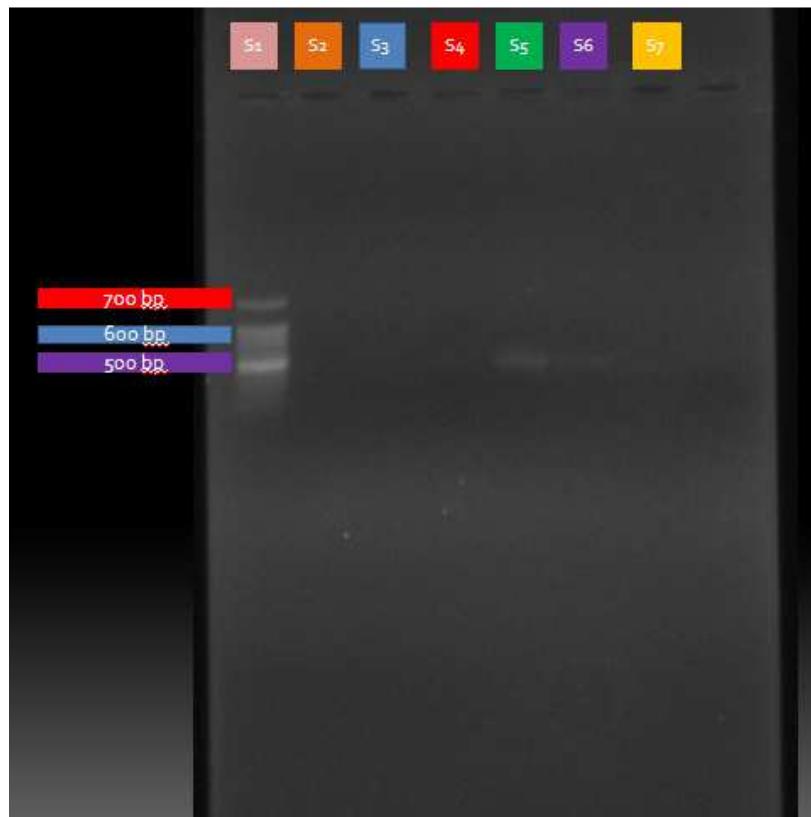
4. Pindahkan ke tempat larutan pencuci. Ganti larutan pencuci beberapa kali hingga warna latar belakang memudar dan pita-pita protein jelas terlihat.
5. Bandingkan mobilitas semua protein sampel dengan protein petanda untuk menentukan berat molekulnya. Untuk menentukan berat molekul protein sampel, ukur jarak pita-pita protein sampel serta pita-pita protein petanda dari batas atas gel pemisah. Masukkan hasil pada tabel di halaman hasil praktikum ini.

**Hasil dan Pembahasan:**

**Elektroforesis dan PCR Agarose DNA Epitel dan Darah**



Gambar 1. Elektroforesis DNA Epitel dan Darah



Gambar 2. Hasil PCR DNA Epitel dan Darah

Keterangan Gambar 2:

S1 : Standar

S2 : Sampel DNA darah grup Henny/Sari

S3 : Sampel DNA epitel Henny

S4 : Sampel DNA epitel Sari

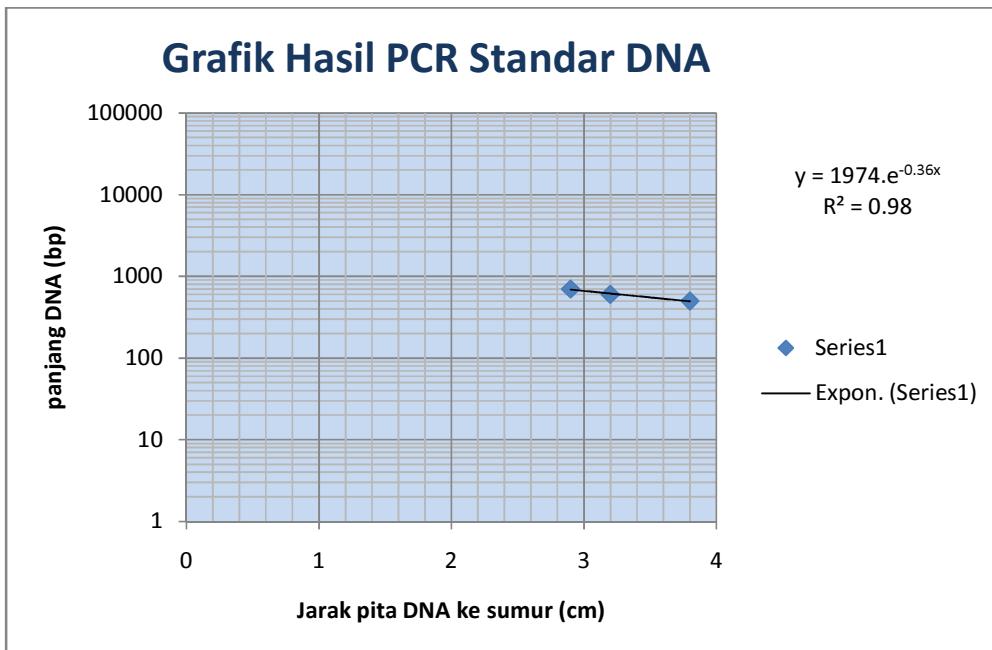
S5 : Sampel DNA darah grup Rebecca/Maria

S6 : Sampel DNA epitel Maria

S7 : Sampel DNA epitel Rebecca

**Tabel 1. Pita hasil PCR DNA standar**

	Pita 1	Pita 2	Pita 3
<b>Jarak pita DNA ke sumur</b>	2,9 cm	3,2 cm	3,8 cm
<b>Panjang Pita DNA</b>	700 bp	600 bp	500 bp



Gambar 3. Grafik Hasil PCR Standar DNA

Dari garfik hasil PCR standar DNA didapat persamaan :  $y = 1974.e^{-0.36x}$

Persamaan ini yang dipakai untuk menghitung panjang DNA sampel.

**Tabel 2. Pita hasil PCR DNA Sampel**

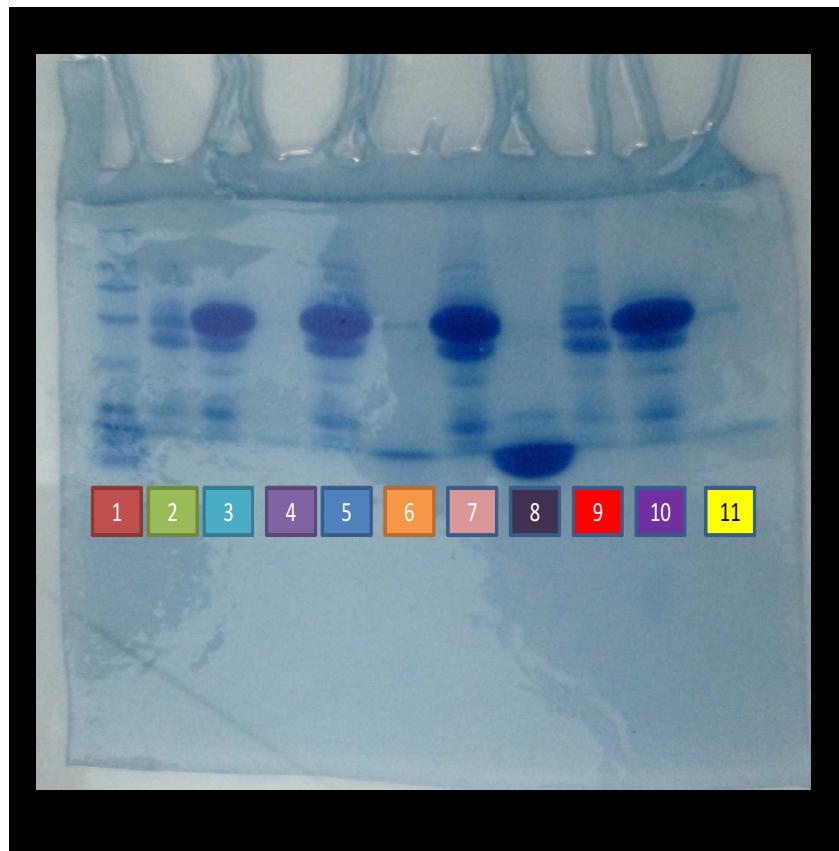
	S5	S6
Jarak pita DNA ke sumur	3,8 cm	3,7 cm
Panjang Pita DNA	493 bp	514 bp

#### Pembahasan:

1. Hanya 1 pita DNA pada masing-masing sumur 5 dan sumur 6 yang muncul pada hasil PCR. Mungkin disebabkan oleh karena praktikan kurang teliti dalam memasukkan sampel ke dalam sumur pada saat melakukan elektroforesis atau saat proses isolasi DNA epitel tidak terisolasi, sehingga pada saat dilakukan PCR tidak tampak gambaran pita DNA.
2. Baik pita DNA standar maupun pita DNA sampel yang tampak pada PCR tidak terpisah (terurai) sempurna dikarenakan kurangnya waktu untuk proses elektroforesis dimana proses penguraian DNA belum melewati minimal setengah agarose (lihat gambar 1)
3. Dari garfik hasil PCR standar DNA didapat persamaan  $y = 1974.e^{-0.36x}$  yang dipakai untuk menghitung panjang DNA sampel, sehingga didapat panjang DNA S5(sampel

DNA darah grup Rebecca/Maria) 493 bp dan panjang DNA S6 (sampel DNA epitel Maria) 514,5 bp

### Elektroforesis Poliakrilami



Gambar 4. Gel hasil Isolasi Protein SDS-PAGE

Keterangan Gambar 4:

Sumur <span style="background-color: #800000; border: 1px solid black; padding: 2px;">1</span>	: Standard	Sumur <span style="background-color: #C0392B; border: 1px solid black; padding: 2px;">7</span>	: P <sub>2</sub>
Sumur <span style="background-color: #6AA84F; border: 1px solid black; padding: 2px;">2</span>	: Ep <sub>2</sub>	Sumur <span style="background-color: #3F51B5; border: 1px solid black; padding: 2px;">8</span>	: S <sub>2</sub>
Sumur <span style="background-color: #00BCD4; border: 1px solid black; padding: 2px;">3</span>	: Es <sub>2</sub>	Sumur <span style="background-color: #FF0000; border: 1px solid black; padding: 2px;">9</span>	: Ep <sub>4</sub>
Sumur <span style="background-color: #7B68EE; border: 1px solid black; padding: 2px;">4</span>	: Gp <sub>2</sub>	Sumur <span style="background-color: #9E9AC8; border: 1px solid black; padding: 2px;">10</span>	: Es <sub>4</sub>
Sumur <span style="background-color: #3F51B5; border: 1px solid black; padding: 2px;">5</span>	: Gs <sub>2</sub>	Sumur <span style="background-color: #FFFF00; border: 1px solid black; padding: 2px;">11</span>	: Gp <sub>4</sub>
Sumur <span style="background-color: #FF8A20; border: 1px solid black; padding: 2px;">6</span>	: M <sub>2</sub>		



Gambar 5. gel hasil Isolasi Protein SDS-PAGE

Keterangan Gambar 5 :

Sumur <span style="background-color: #c0392b; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">1</span>	: S <sub>3</sub>	Sumur <span style="background-color: #ffff00; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">7</span>	: S <sub>4</sub>
Sumur <span style="background-color: #800080; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">2</span>	: P <sub>3</sub>	Sumur <span style="background-color: #800080; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">8</span>	: Ep <sub>3</sub>
Sumur <span style="background-color: #c00000; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">3</span>	: Standard	Sumur <span style="background-color: #008000; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">9</span>	: Es <sub>3</sub>
Sumur <span style="background-color: #c00000; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">4</span>	: Gs <sub>4</sub>	Sumur <span style="background-color: #00ffff; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">10</span>	: Gp <sub>3</sub>
Sumur <span style="background-color: #6b8e23; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">5</span>	: M <sub>4</sub>	Sumur <span style="background-color: #800080; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">11</span>	: Gs <sub>3</sub>
Sumur <span style="background-color: #ff0000; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">6</span>	: P <sub>4</sub>	Sumur <span style="background-color: #00ffff; border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">12</span>	: M <sub>3</sub>

Keterangan Kelompok :

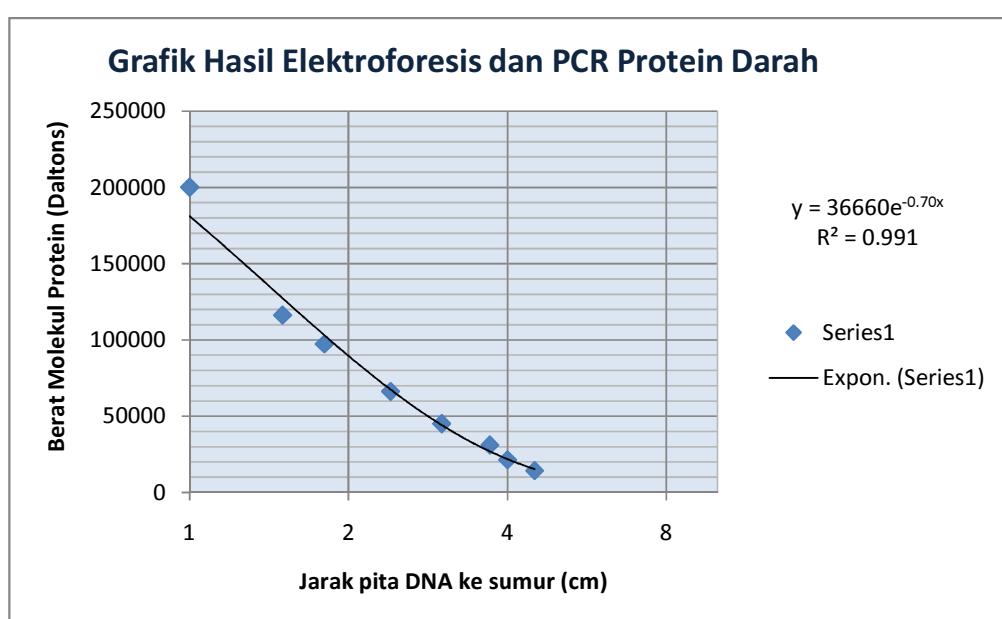
Kelompok 2 : Herviani Sari & Henny S. Ompusunggu

Kelompok 3 : Rebecca Rumesty & Maria Lestari

Kelompok 4 : Juwita & Rika Nailuvar

**Tabel 2. Pita DNA Standar :**

	Jarak DNA ke sumur (cm)	Berat Molekul (dalton)	Nama Protein
Pita 1	1	200.000	Myosin
Pita 2	1,5	116.250	$\beta$ -Galaktosidase
Pita 3	1,8	97.400	Phosphorylase
Pita 4	2,4	66.200	Albumin
Pita 5	3	45.000	Ovalbumin
Pita 6	3,7	31.000	Carbonic anhydrase
Pita 7	4	21.500	Trypsin inhibitor
Pita 8	4,5	14.400	Lysozime



Gambar 6. Grafik Hasil Elektroforesis dan PCR Protein Darah

**Pembahasan :**

1. Dari garfik hasil elektroforesis dan PCR standar DNA didapat persamaan  $y = 36660e^{-0.70x}$  yang dipakai untuk menghitung berat molekul protein darah sampel.
2. Tidak dapat ditentukan jenis protein sampel oleh karena persamaan yang didapat tidak dapat digunakan untuk menghitung berat molekul protein darah sampel
3. Kemungkinan kesalahan terjadi karena adanya kekeliruan prosedur pada saat pembuatan plate poliakrilamid (kesalahan tahapan pembuatan plate dan takaran gel pemisah dan gel penumpuk), sehingga mempengaruhi hasil elektroforesis.

**Saran :**

- Hendaknya ketersediaan bahan-bahan kimia di laboratorium dilengkapi dan dicukupkan sehingga pada saat praktikum para praktikan tidak mengalami kehabisan/kekurangan bahan.
- Pengaturan alat-alat laboratorium yang akan dipakai praktikum sebaiknya diatur 1 jam sebelum melakukan praktikum, sehingga pada saat praktikum tidak perlu lagi menunggu pengaturan alat yang memakan waktu lama.
- Sebelum melakukan praktikum sebaiknya diberikan pengarahan yang jelas mengenai tahapan praktikum sehingga praktikum berjalan dengan benar dan hasil yang diperoleh dapat bermakna (tidak terjadi kesalahan prosedur praktikum).
- Alokasi waktu untuk praktikum harus sudah dipertimbangkan dengan baik sehingga semua prosedur praktikum dapat dilakukan sebagaimana yang seharusnya, karena pengurangan waktu dari setiap tahapan prosedur dapat mempengaruhi hasil praktikum.