

PRAKTIUM ISOLASI PROTEIN DARI DARAH

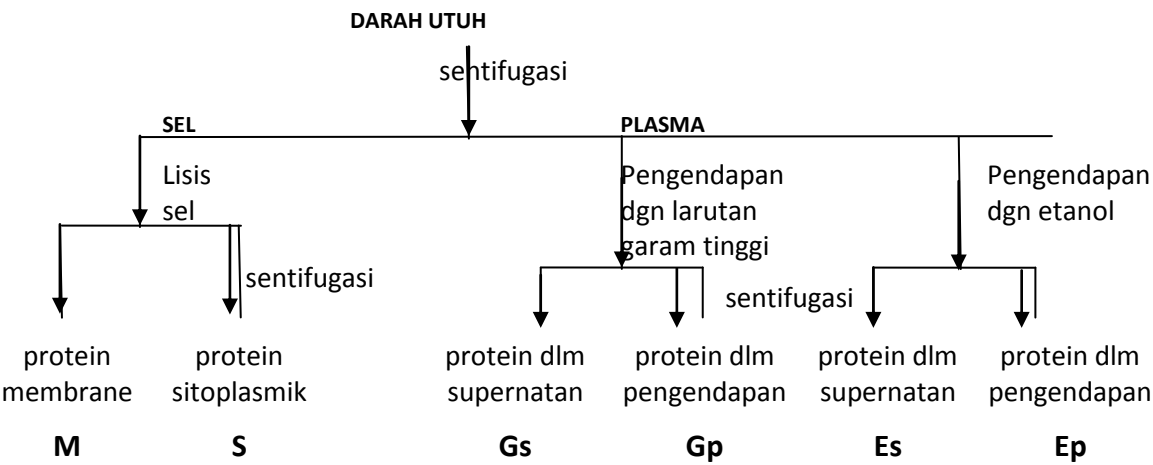
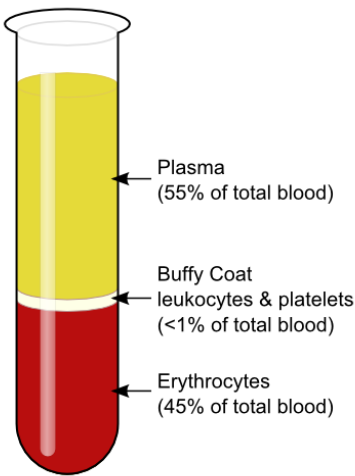
- Tujuan: i) mengerti teknik sentrifugasi untuk pemisahan bagian-bagian sel
ii) mengerti teknik biokimia umum lain yang penting dalam proses isolasi protein

*Kegiatan praktikum ini diadaptasi dari bahan:

- Mordacq, J.C. & Ellington R.W. 1994. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of blood proteins. *Tested Studies For Laboratory Teaching* 15:15-44
- Bagian Biokimia FKUI, 2000. Isolasi dan Pemisahan Protein. *Biokimia Eksperimen Laboratorium* Jakarta: Widya Medika, pp13-34

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). Cara-cara yang bisa digunakan untuk meneliti protein strukur dan fungsi memang banyak. Pada praktikum hari ini kita menggunakan beberapa teknik biokimia yang sering dipakai untuk mengisolasi protein dari molekul/ bahan sel yang lain,

Jaringan yang akan kita gunakan 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 minggu depan (yaitu M, S, Gs, Gp, Es, Ep). Schema (*flow-chart*) bagi kegiatan praktikum ini digambarkan di bawah.



Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

Buffer Cuci: siapkan 100ml buffer yang berisi 150mM NaCl, 5mM Na₂HPO₄, 0,1mM EDTA. Tentukan pH =7,4. Simpan di kulkas atau di dalam es.

Buffer Hemolisis: siapkan 100ml buffer yang berisi 5mM Na₂HPO₄, 0,1mM EDTA. Tentukan pH =8. Simpan di kulkas atau di dalam es.

Bagian A: Sel-sel Darah dan Plasma dipisahkan

- 1) Pakailah sarung tangan dan teknik keselamatan di laboratorium yang benar.
- 2) 4-5 ml darah diambil dari seseorang dari grup meja Anda. Diharap dapat +/- 1,5 ml plasma dari darah yang diambil (500 µl plasma dibutuhkan untuk prosedurnya 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 endapan kalau ada) ditransfer ke tabung mikrosentrifus 2 ml yang sudah ditandai. Ini merupakan sampel protein membran (M).
- 9) ****TUNGGU HINGGA SEMUA GRUP SELESAI
SEBELUM ALAT MIKROSENTIFUS 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 Anda tunggu hasil langkah “9”, teruskan dengan bagian C.
- 11) Ketika periode mikrosentrifus sudah siap, keluarkan tabung mikrosentrifus dengan hati-hati. Mudah-mudahan Anda akan melihat pengendapan yang agak halus. Buang supernatan ke tempat buangan cairan biologis. Tambah 500 µl 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 250µl larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang jenuh. Tambahkan 500µl 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 µl supernatan ke tabung reaksi mikrosentrifus lain yang sudah ditandai. Letakkan di atas es. Inilah merupakan sampel protein supernatan garam tinggi (**G_S**). Langsung simpan di bagian atas kulkas.
- 5) Pakailah tisu untuk mengeringkan bagian atas endapannya. Tambah 1ml larutan 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (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 (**G_P**). Tambah 500 µl buffer hemolisis dan simpan di bagian atas kulkas.

Bagian D Pengendapan Protein Plasma dengan Etanol

- 8) Pada tabung mikrosentrifus 1,5ml tambahkan 250µl etanol absolut yang dingin. Tambahkan 500µl sampel plasma dari tabung yang disimpan tadi.
- 9) Tutup dan vorteks kuat sebentar. Biar diam selama 5 menit di atas es.
- 10) 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.
- 11) Dengan hati-hati transfer supernatan ke tabung reaksi mikrosentrifus lain yang sudah ditandai. Letakkan di atas es. Inilah merupakan sampel protein supernatan etanol (**E_S**).
- 12) 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)
- 13) 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.
- 14) Buanglah supernatan dan keringkan bagian di atas endapannya dengan tisu. Inilah merupakan sampel protein pengendapan etanol tinggi (**E_P**). Tambah 500 µl buffer hemolisis dan simpan di atas es/bagian atas kulkas.

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

Catatan Praktikum Isolasi Protein dari Darah

Tidak ada laporan yang perlu disiapkan minggu ini. Catat poin-poin yang Anda amati selama praktikum hari ini dibelakang kertas ini biar dimasukkan pada laporan yang akan Anda siapkan minggu depan.

Bagian A: SEL-SEL DARAH DAN PLASMA DIPISAHKAN

Bagian B: ISOLASI PROTEIN-PROTEIN DARI SEL-SEL

Bagian C: PENGENDAPAN PROTEIN PLASMA DENGAN LARUTAN GARAM BERKONSENTRASI TINGGI

BAGIAN D: PENGENDAPAN PROTEIN PLASMA DENGAN ETANOL