

LAPORAN PRAKTIKUM ISOLASI DNA DAN TEKNIK PCR

Nama : Juwita (127008003)

Rika Nailuvar Sinaga (127008004)

Hari / Tanggal Praktikum : Kamis / 01 November 2012

Waktu Praktikum : 12.00 – 15.00 WIB

Tujuan :

- a. Memahami metode isolasi DNA
- b. Mampu mengerjakan isolasi DNA sesuai prosedur, dengan sampel DNA diambil dari sel epitelial mulut
- c. Memahami dan dapat melakukan teknik PCR menggunakan DNA manusia.

Pendahuluan :

DNA adalah asam nukleat yang mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis seluruh bentuk kehidupan. DNA terdapat di nukleus, mitokondria, dan kloroplas. Ada perbedaan di antara ketiga lokasi DNA ini, yaitu: DNA nukleus berbentuk linear dan berhubungan sangat erat dengan protein histon, sedangkan DNA mitokondria dan kloroplas berbentuk sirkular dan tidak berhubungan dengan protein histon.

DNA memiliki struktur helix utas ganda, yang mengandung komponen-komponen gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, dan pasangan basa. Satu sel memiliki DNA yang merupakan materi genetik dan akan diturunkan pada keturunannya.

DNA dapat diisolasi, baik pada manusia maupun tumbuhan. Isolasi DNA merupakan langkah tepat untuk mempelajari DNA. Prinsipnya ada dua, yaitu :

- a. Sentrifugasi

Merupakan teknik untuk memisahkan campuran berdasarkan berat molekul komponennya. Molekul yang mempunyai berat molekul besar akan berada di bagian

bawah tabung dan molekul ringan akan berada pada bagian atas tabung. Teknik sentrifugasi dilakukan oleh mesin yaitu mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi. Hasil sentrifugasi akan menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah, yaitu supernatan di bagian atas dan pelet di bagian bawah.

b. Presipitasi

Merupakan langkah yang dilakukan untuk mengendapkan suatu komponen dari campuran.

Langkah-langkah isolasi DNA:

- a. Pengumpulan sel-sel
- b. Pemecahan sel (lisis sel) dan pencernaan protein
- c. Pengendapan DNA

Pada praktikum ini, DNA akan diisolasi dari sel epitelial mulut.

Alat dan Bahan :

Alat	Bahan
Batang kayu	Minuman isotonik
Timbangan digital	Stok proteinase K (100 µg/ml)
Tabung mikrosentrifus	EDTA
Beaker	NaCl
Waterbath	Tris
pH meter	1 N HCl
Kertas absorben	Akuades
Tabung reaksi	Etanol dingin
Spidol	Minuman isotonik
Vortex	Stok proteinase K (100 µg/ml)
Mikrosentrifus	EDTA
SDS	
Pipet Mohr	

Tahap isolasi DNA epitel

a. Pengumpulan sel-sel

1. Gosok pipi bagian dalam menggunakan batang kayu selama ± 30 detik (penting: jangan ditelan).
2. Ambil minuman isotonik $\rightarrow$ kumur-kumur dengan minuman isotonik sebanyak ± 10 ml, sekaligus menggosok pipi selama 1 menit $\rightarrow$ hasil berkumur ini jangan ditelan, tetapi keluarkan ke dalam beaker $\rightarrow$ ini yang menjadi larutan sel epitel yang akan diisolasi DNA nya.

b. Pemecahan sel (lisis sel) dan pencernaan protein

3. Atur temperatur 56°C pada waterbath.
4. Ambil 1,5 ml larutan sel epitelial menggunakan pipet Mohr $\rightarrow$ masukkan ke dalam tabung mikrosentrifus.
5. Masukkan tabung mikrosentrifus dalam mesin sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 10.000rpm, dan gunakan sampel orang lain sebagai penyeimbang. Hasil sentrifus yang didapat $\rightarrow$ supernatant dibuang, kemudian tambahkan larutan sel lagi.
6. Langkah 5 dan 6 diulang sebanyak dua kali $\rightarrow$ agar endapan (pelet) yang terbentuk semakin banyak
7. Kemudian tambahkan 1 mL buffer Tris-EDTA ke dalam tabung mikrosentrifus.
8. Tabung mikrosentrifus di vortex selama 30 detik (sampai endapan hancur).
9. Selanjutnya tambahkan 50 μL Proteinase K (enzim untuk mencerna protein) dan masukkan dalam waterbath (56°C) selama 10 menit.

c. Pengendapan DNA

10. Masukkan 100 μL NaCl, 2,5M ke dalam tabung mikrosentrifus $\rightarrow$ aduk isi tabung agar tercampur baik, dengan cara membolak-balikkan tabungnya.
11. Pindahkan semua isi tabung mikrosentrifus ke tabung lain yang bersih dan kering (hati-hati, agar tidak banyak muncul busa).

12. Pelan-pelan tambahkan 1 mL etanol dingin (untuk mengendapkan atau menggumpalkan DNA) agar terlihat batas jelas → biarkan selama 5 menit.
13. DNA akan menggumpal di antara batas buffer dan etanol (terlihat ada yang melayang seperti benang putih)
14. Ambil DNA menggunakan batang kaca atau besi → taruh di tabung sentrifugasi kecil yang bersih. (Gunakan tisu bersih untuk menghisap sisa etanol).
19. Simpan tabung mikrosentrifus kecil di lemari pendingin, pada suhu di bawah 0⁰ C.

Isolasi DNA dari Darah

Alat dan Bahan yang digunakan:

Alat	Bahan
Waterbath	Darah (1 cc)
Vorteks	Isopropanol
Tabung mikrosentrifus	Larutan nuklei lisis
Kertas absorben	Larutan RNAase
Mikrosentrifus	Larutan sel lisis
Pipet tetes	Larutan rehidrasi DNA
	Anti-koagulan
	70% etanol
	Larutan “protein precipitation”

Tahap Isolasi DNA Darah :

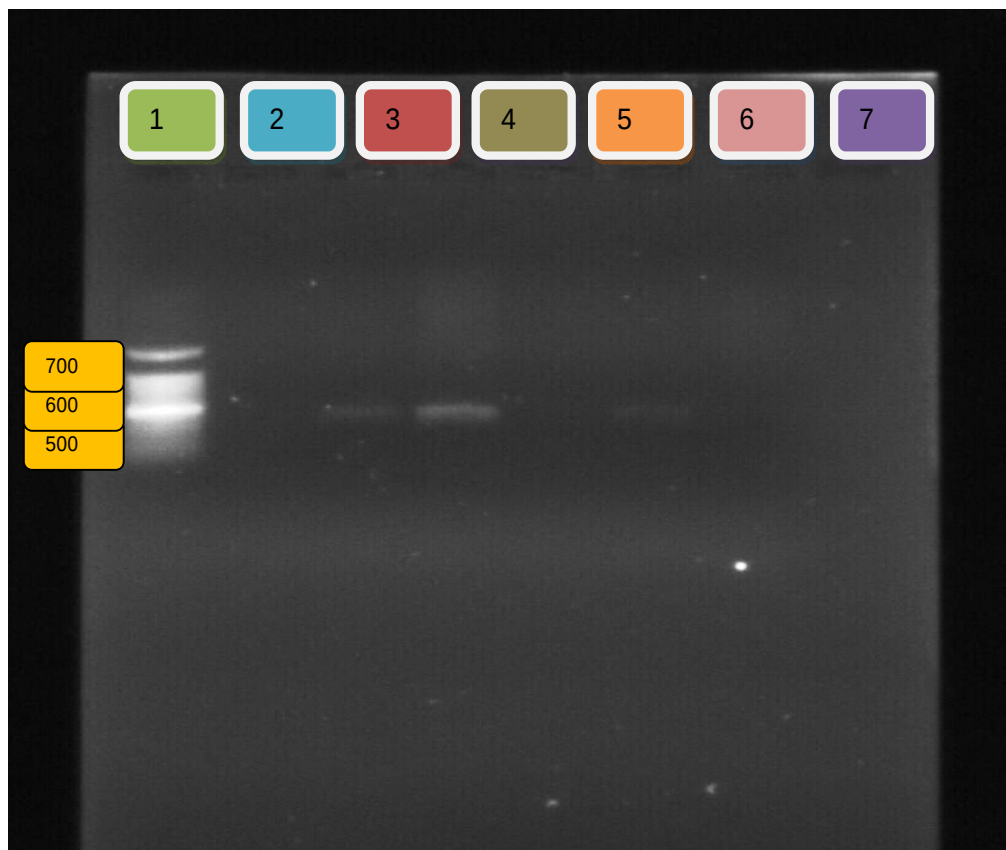
1. Gunakan tabung mikrosentrifus 1,5 ml yang steril → isi dengan 1 mg anti-koagulan (EDTA, atau heparin) → masukkan 1 ml darah ke dalamnya.
2. Goyangkan tabung mikrosentrifus perlahan agar darah dan anti-koagulan bercampur dengan baik.
3. Gunakan satu tabung mikrosentrifus steril lagi → masukkan 900 µL larutan sel lisis
4. Ambil 300 µl darah dari tabung mikrosentrifus pertama → masukkan ke dalam tabung kedua → bolak-balikkan tabung 5-6 kali supaya cairannya bercampur baik.

5. Inkubasikan 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 kecepatan 13.500 rpm selama 2 menit pada temperatur ruang.
7. Supernatant dibuang sebanyak mungkin (hati-hati! Jangan sampai pellet putih ikut terbang) → sekitar 10-20 μ l cairan residu akan tertinggal dalam tabung tersebut
8. Tabung divortex dengan kuat (10-15 detik) → agar sel-sel darah putih tersuspensi kembali.
9. Tambahkan 300 μ l larutan nuklei lisis ke dalam tabung tersebut (di langkah ke-8). → campurkan dengan menggunakan pipet sebanyak 5-6 kali untuk melisiskan sel-sel darah putih → larutan menjadi “viscous” (kental) → jika terlihat gumpalan, maka inkubasikan tabung pada 37 °C sampai gumpalan tersebut larut → dinginkan pada temperatur ruangan
10. Tambahkan larutan “*protein precipitation*” sebanyak 100 μ l ke dalam larutan di langkah 9 → vortex dengan kuat selama 10-20 detik → gumpalan protein yang kecil mungkin akan terlihat.
11. Sentrifugasi pada kecepatan 13.500 rpm selama 3 menit (pada temperatur ruangan) → pellet protein yang berwarna coklat tua akan terlihat.
12. Pindahkan supernatant ke dalam tabung Eppendorf steril (tabung mikrosentrifus 1,5 ml) yang diisi 300 μ l isopropanol (temperatur ruangan).
13. Tabung dibalikkan perlahan-lahan → supaya larutan bercampur → akan terlihat massa seperti benang-benang putih (DNA).
14. Sentrifugasi pada kecepatan 13.500 rpm selama 1 menit pada temperatur ruangan → DNA akan terlihat sebagai pellet kecil yang putih.
15. Supernatant dibuang → tambahkan 300 μ l 70% etanol (di suhu temperatur ruangan). → bolak-balikkan tabung perlahan beberapa kali untuk mencuci pellet DNA → sentrifugasi lagi seperti pada langkah 15 diatas.
16. Aspirasikan etanol menggunakan pipet (jangan sampai pelletnya terbang!) → letakkan tabung secara terbalik diatas kertas absorben dan keringkan di udara selama 10-15 menit.
17. Tambahkan 100 μ l larutan rehidrasi DNA → DNA direhidrasi dengan menginkubasikan tabung pada 65 °C selama 30-60 menit → secara periodik, campurkan larutan dengan cara menepuk tabung perlahan.
18. DNA disimpan pada temperatur 2-8°C atau untuk jangka panjang pada -20°C.

Observasi pada praktikum ini:

- Awalnya pelet yang terbentuk hanya sedikit, tetapi setelah ditambahkan larutan sel epitel dan disentrifus beberapa kali, terbentuk endapan atau pelet berwarna putih di dasar tabung yang semakin banyak.
- Supernatan seharusnya dibuang sebanyak mungkin dengan hati-hati, agar pelet atau endapan tidak ikut terbangun → bila tidak banyak supernatan yang terbangun, maka saat proses selanjutnya, volume larutan dalam tabung akan semakin banyak (berbeda dengan batas volume larutan pada kelompok lain).
- Hasil akhir didapatkan endapan atau pelet coklat di dasar tabung → kemudian sampel disimpan dalam lemari pendingin untuk diproses di waktu praktikum selanjutnya.

HASIL PRAKTIKUM ISOLASI DNA EPITEL DAN DNA DARAH



Gambar 1: Hasil Isolasi DNA Epitel dan Darah Dengan Teknik PCR.

Keterangan :

1 = standard

2 = darah

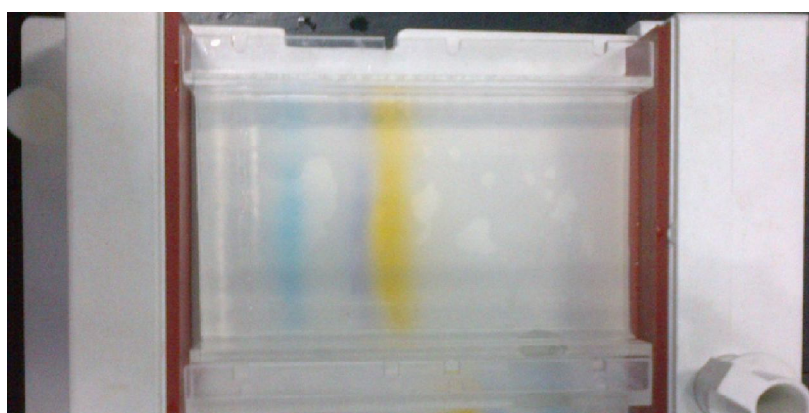
3 = epitel (juwita)

4 = epitel (rika)

5 = darah kelompok ayu/yulia

6 = epitel (ayu)

7 = epitel (yulia)

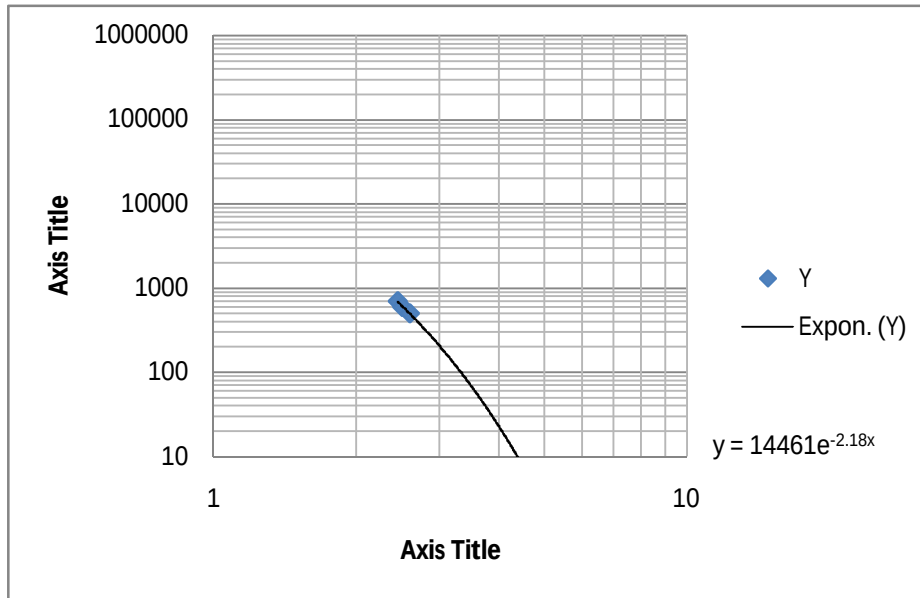


Gambar 2: Hasil elektroforesis

Pembahasan :

Tabel 1. Marker Hasil pengamatan elektroforesis isolasi DNA

X	Y
2,45	700
2,5	600
2,6	500



Grafik 1. Hasil pengamatan elektroforesis isolasi DNA

Tabel 2. Pita hasil PCR DNA Sampel

	Sumur 3	Sumur 4	Sumur 6
Jarak band (cm)	2,6	2,6	2,6
Panjang DNA (Base pair)	494	494	494

Dari hasil praktikum diatas diperoleh :

1. Pada marker, batas-batas pitanya tidak terlihat jelas sehingga tidak terlalu dapat dibedakan batas pita yang satu dengan batas pita lainnya. Hal ini kemungkinan disebabkan karena waktu elektroforesis yang terlalu singkat ($\pm 1,5$ jam). Seharusnya untuk mendapatkan hasil yang baik diperlukan waktu ± 4 jam pada proses elektroforesis.
2. Pada sampel, pita-pita tampak pada sumur 3,4 dan 6. Di masing-masing sumur hanya ada satu pita yang terlihat jelas. Hal ini disebabkan oleh kesalahan praktikan dalam memproses sampel baik saat pertama kali mengisolasi DNA atau pada saat menyiapkan sampel untuk masuk proses elektroforesis. Jarak yang diukur dari batas sumur sampai pada pita di sumur 3,4 dan 6 adalah sama yaitu sekitar 2,6 cm.

3. Dari grafik hasil PCR standar DNA didapat persamaan $y = 14461e^{-2.18x}$ → rumus ini digunakan untuk menghitung panjang DNA sampel → sehingga didapat panjang DNA sampel pada sumur 3,4 dan 6 adalah 494 bp.

Saran :

1. Praktikan harus lebih berhati-hati dalam melakukan isolasi DNA dan mempersiapkan sampel agar hasil yang didapat baik.
2. Pada saat melakukan elektroforesis, diperlukan ketepatan pengukuran dan ketelitian praktikan serta waktu yang dipakai dalam menjalankan elektroforesis harus ± 4 jam agar marker dan sampel yang dihasilkan baik.

LAPORAN PRAKTIKUM ISOLASI PROTEIN DARI DARAH

Nama : Juwita (127008003)

Rika Nailuvar Sinaga (127008004)

Hari / Tanggal Praktikum : Kamis / 8 November 2012

Waktu Praktikum : 12.00 – 15.00 WIB

Tujuan :

Memahami cara pemisahan bagian sel dengan teknik sentrifugasi, dan memahami teknik lainnya untuk isolasi protein.

Pendahuluan :

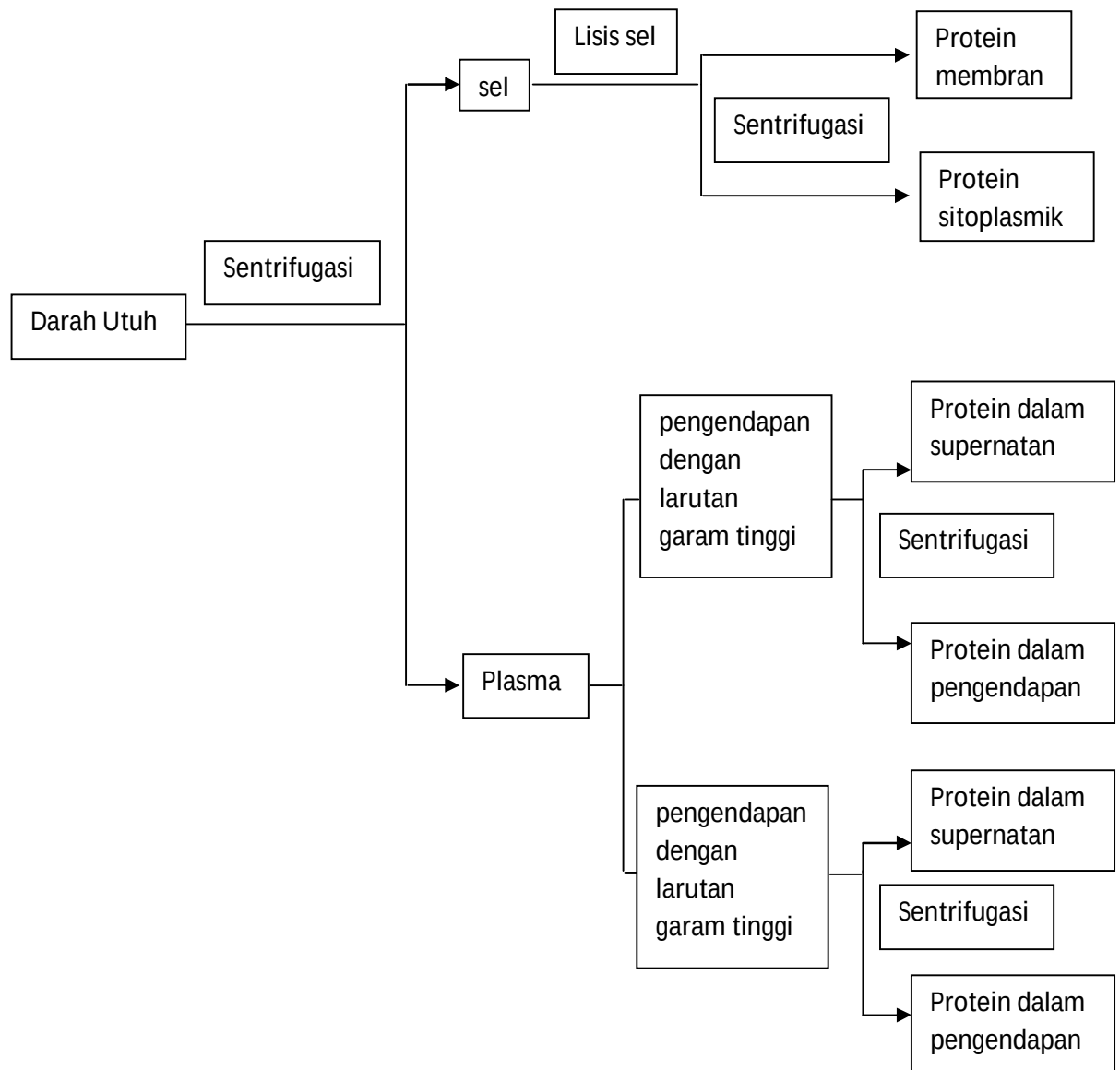
Protein adalah makromolekul yang secara fisik dan fungsional kompleks yang melakukan beragam peran penting. Untuk meneliti sifat-sifat fisik dan fungsional suatu protein secara rinci, diperlukan protein yang sangat murni. Sel mengandung ribuan protein yang berlainan, masing-masing dengan jumlah yang sangat bervariasi.

Untuk memisahkan masing-masing protein dari campuran kompleks sering digunakan pelarut atau elektrolit (atau keduanya) untuk mengeluarkan fraksi protein yang berbeda sesuai karakteristik kelarutannya. Hal ini adalah dasar dari sesuatu yang disebut sebagai metode *salting-out*, yang digunakan dalam penentuan fraksi protein di laboratorium klinik. Oleh karena itu, kita dapat memisahkan protein plasma menjadi tiga kelompok besar –fibrinogen, albumin, dan globulin- berdasarkan pemakaian natrium atau amonium sulfat dengan berbagai konsentrasi.

Metode tersering yang digunakan untuk menganalisis protein plasma adalah elektroforesis. Terdapat banyak jenis elektroforesis, yang masing-masing menggunakan medium penopang/penunjang yang berbeda.

Akan dicoba pemisahan 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). Diharapkan didapat 6 sampel protein yaitu M, S, Gs, Gp, Es, Ep. Dan sampel-sampel ini akan dianalisis menggunakan metode SDS-PAGE.



Alat dan Bahan:

Alat	Bahan
Jarum steril	Es
Sentrifus klinik	NaCl
Mikrosentrifus	Na ₂ PO ₄
pH meter	EDTA
Tabung reaksi dan rak	Larutan (NH ₄) ₂ SO ₄ yang jenuh
Pipet Mohr	Larutan 50% (NH ₄) ₂ SO ₄
Tabung steril	Etanol absolut, dingin
Pipet otomatis	
Pipet tetes	
Vorteks	
Tabung sentrifus klinik 2 ml	
Tabung sentrifus klinik 1,5 ml	
Tempat membuang cairan biologis	
Tisu	
Spidol	

Siapkan dahulu larutan-larutan:

- Buffer cuci : 100 ml buffer yang berisi 150 mM NaCl, 5 mM Na₂HPO₄, 0,1 mM EDTA → atur sampai pH =7,4
 - Buffer hemolisis : 100ml buffer yang berisi 5 mM Na₂HPO₄, 0,1 mM EDTA → atur sampai pH =8
- Kedua buffer ini disimpan dalam lemari pendingin

Bagian A: Pemisahan Sel-sel Darah dari Plasma

1. Ambil 5 ml darah → diharapkan akan didapat $\pm 1,5$ ml plasma dari darah yang diambil (500 μ l plasma untuk prosedur pengendapan dengan garam tinggi, 500 μ l plasma untuk pengendapan dengan etanol, dan 500 μ l plasma merupakan sampel protein plasma).
2. Pindahkan darah ke tabung sentrifus klinik → masukkan ke dalam alat sentrifus klinik, dan gunakan tabung sentrifus klinik lain sebagai penyeimbang → atur waktu sentrifus selama 5 menit.
3. Pindahkan semua plasma (yaitu supernatant) ke tabung mikrosentrifus 2 ml yang bersih dan kering → tandai tabung dengan tulisan “plasma” dan simpan di dalam es → sebagai sampel plasma.
4. Buang sisa supernatan ke dalam tempat buangan cairan biologis menggunakan pipet tetes.
5. Tambahkan 6 ml buffer cuci dingin ke dalam tabung sentrifus klinik → tutup dan vorteks pelan.
6. Selanjutnya masukkan tabung ke dalam alat sentrifus klinik, dan gunakan tabung lain sebagai penyeimbang → sentrifus selama 5 menit.
7. Buang supernatan ke dalam tempat buangan cairan biologis menggunakan pipet tetes dengan hati-hati.
8. Langkah 6-8 diulang sekali lagi → nantinya akan didapat endapan yang merupakan sel-sel darah

Bagian B: Isolasi Protein-protein dari Sel-sel

1. Masukkan 6 ml buffer hemolisis dingin ke dalam tabung sentrifus klinik yang berisi sel-sel darah.
2. Tutup tabung dan vorteks sampai isi tabung melarut.
3. Masukkan tabung ke mesin sentrifus, dan gunakan tabung lain sebagai penyeimbang → atur waktu sentrifus selama 10 menit.

4. Ambil 1 ml supernatan dari atas tabung sentrifus klinik (hati-hati) → masukkan ke dalam tabung reaksi mikrosentrifus yang 2 ml → tandai tabung dan simpan di dalam es → ini merupakan sampel protein sitoplasmik (S) → langsung simpan di bagian atas kulkas.
5. Buang ± 5 ml supernatan ke tempat buangan cairan biologis menggunakan pipet tetes → masukkan 7 ml buffer hemolisis dingin → vortex dengan kuat.
6. Setelah di vortex → masukkan tabung ke dalam mesin sentrifus klinik, gunakan tabung sentrifus klinik lain sebagai penyeimbang → sentrifus selama 10 menit.
7. Buang supernatant ke tempat buangan cairan biologis (hati-hati) → kira-kira 2 ml paling bawah (termasuk endapan, kalau ada) dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus 2 ml lain yang sudah ditandai → sampel ini sebagai protein membran (M).
8. Tabung mikrosentrifus ini dimasukkan dalam alat mikrosentrifus, dengan menyertakan tabung yang lain sebagai penyeimbang → atur pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 menit.
9. Selesai proses sentrifus → keluarkan tabung mikrosentrifus → perhatikan apakah ada endapan yang agak halus → selanjutnya buang supernatan ke tempat buangan cairan biologis.
10. Tambahkan 500 µl buffer hemolisis atau buffer cuci → tutup tabung sampai rapat → simpan di bagian atas lemari pendingin.

Bagian C: Pengendapan Protein Plasma dengan Larutan Garam Berkonsentrasi Tinggi

1. Masukkan 250 µl larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang **jenuh** kedalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml dan masukkan 500 µl sampel plasma.
2. Vortex kuat tabung tersebut dalam keadaan tertutup dan diamkan selama 5 menit pada temperatur ruangan.
3. Masukkan tabung tersebut ke dalam alat mikrosentrifus (pakai tabung dari kelompok lain untuk menyeimbangkan) lalu putar selama 3 menit dengan kecepatan tinggi.
4. Setelah di sentrifugasi ambil supernatan yang ada sebanyak 500 µl dan masukkan ke tabung reaksi mikrosentrifus yang lain, tandai dan letakkan di atas es (Gs).

5. Gunakan tissue dan keringkan bagian atas endapannya. Teteskan 1 ml larutan 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang tak jenuh, campur dengan baik.
6. Masukkan tabung tersebut ke dalam alat mikrosentrifus (pakai tabung dari kelompok lain untuk menyeimbangkan) lalu putar selama 3 menit dengan kecepatan tinggi.
7. Buang supernatannya dan keringkan bagian atas endapan dengan tissue lalu tandai dengan Gp. Tambah 500 μl buffer hemolisis dan simpan di dalam kulkas.

Bagian D: Pengendapan Protein Plasma dengan Etanol

1. Masukkan 250 μl etanol absolute dingin dan 500 μl sampel plasma ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml.
2. Tutup tabung dan vortex kuat lalu diamkan selama 5 menit di atas es.
3. Masukkan tabung tersebut ke dalam alat mikrosentrifus (pakai tabung dari kelompok lain untuk menyeimbangkan) lalu putar selama 3 menit dengan kecepatan tinggi.
4. Supernatan yang dihasilkan pindahkan ke tabung mikrosentrifus lain, tandai dan letakkan di atas es (Es).
5. Keringkan bagian atas endapan dengan menggunakan tissue lalu tambahkan 1 ml etanol 50% dan campur dengan pipet otomatis, jaga agar tabung tetap dingin dan simpan di atas es.
6. Masukkan tabung tersebut ke dalam alat mikrosentrifus (pakai tabung dari kelompok lain untuk menyeimbangkan) lalu putar selama 3 menit dengan kecepatan tinggi.
7. Buang supernatant dan keringkan bagian atasnya dengan tissue. Ini merupakan sampel protein pengendapan etanol tinggi (Ep).
8. Tambahkan 500 μl buffer hemolisis dan simpan di dalam kulkas.

Point penting dalam praktikum ini:

- Pada praktikum ini yang harus diperhatikan adalah pada saat mengambil supernatan harus dilakukan dengan hati-hati jangan sampai endapan yang ada ikut terambil karena akan mempengaruhi hasil.

LAPORAN PRAKTIKUM PCR, ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS-PAGE

(SDS PolyAcrilamide Gel Elektroforesis)

Nama : Juwita (127008003)

Rika Nailuvar Sinaga (127008004)

Hari / Tanggal Praktikum : Kamis / 22 November 2012

Kamis / 15 Desember 2012

Waktu Praktikum : 12.00 – 17.00 WIB

Tujuan :

- a. Praktikan memahami prinsip teknik PCR dan prinsip dasar elektroforesis.
- b. Praktikan mampu mengerjakan prosedur teknik elektroforesis agarose menggunakan sampel DNA yang diperoleh dari jaringan manusia.
- c. Praktikan mampu melakukan teknik SDS-PAGE.

Pendahuluan :

Protein adalah makromolekul yang secara fisik dan fungsional kompleks yang melakukan beragam peran penting. Untuk meneliti sifat-sifat fisik dan fungsional suatu protein secara rinci, diperlukan protein yang sangat murni. Sel mengandung ribuan protein yang berlainan, masing-masing dengan jumlah yang sangat bervariasi.

Untuk memisahkan masing-masing protein dari campuran kompleks sering digunakan pelarut atau elektrolit (atau keduanya) untuk mengeluarkan fraksi protein yang berbeda sesuai karakteristik kelarutannya. Hal ini adalah dasar dari sesuatu yang disebut sebagai metode *salting-out*, yang digunakan dalam penentuan fraksi protein di laboratorium klinik. Oleh karena itu, kita dapat memisahkan protein plasma menjadi tiga kelompok besar –fibrinogen, albumin, dan globulin- berdasarkan pemakaian natrium atau amonium sulfat dengan berbagai konsentrasi.

Metode yang paling sering digunakan untuk menentukan kemurnian suatu protein adalah SDS-PAGE- elektroforesis gel poliakrilamid (*polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE) dengan menggunakan deterjen anionik natrium dodesil sulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS). Elektroforesis memisahkan biomolekul-biomolekul bermuatan berdasarkan laju migrasi biomolekul tersebut dalam medan listrik. Pada SDS-PAGE, akrilamid mengalami polimerisasi dan pengikatan silang untuk menghasilkan matriks berpori. SDS mendenaturasi dan mengikat protein dengan perbandingan satu molekul SDS per dua ikatan peptida. Jika digunakan bersama 2-merkaptotanol atau ditionitritol untuk mereduksi dan memutus ikatan disulfida, SDS memisahkan komponen polipeptida dari protein multimerik. Jumlah molekul SDS anionik yang besar, masing-masing bermuatan -1, di masing-masing polipeptida mengalahkan muatan yang ditimbulkan oleh gugus fungsional asam amino. Karena perbandingan muatan terhadap massa masing-masing kompleks SDS-polipeptida kira-kira sama, resistensi fisik yang dijumpai masing-masing peptida sewaktu bergerak melintasi matriks akrilamid menentukan laju migrasi. Karena kompleks besar menemui resistensi yang lebih besar, polipeptida-polipeptida akan terpisah berdasarkan massa molekul relatif polipeptida tersebut. Setiap polipeptida yang terperangkap dalam gel akrilamid divisualisasikan dengan pulasan zat pewarna, seperti *Coomassie blue*.

Alat dan bahan yang dibutuhkan pada percobaan PCR

1. Forward Primer : konsentrasi 40 pmol
2. Reverse Primer : konsentrasi 40 pmol
3. dNTP's : konsentrasi akhir adalah 0,2 mM untuk setiap nukleotida (A T,G,C)
4. 10 x Buffer (10 x Konsentrasi) dengan konsentrasi $MgCl_2$ 25 mM
5. Aquabidest steril
6. Taq Polimerase
7. Sampel DNA

8. Mineral oil (untuk menghindari penguapan)
9. Thermo Cycler PCR
10. UV reader

Cara kerja PCR

- Siapkan larutan **Mix Solution**
- Penyimpanan larutan-larutan Primer, dNTP's, Buffer, Taq dan larutan DNA → ada yang harus disimpan pada temperature – 20⁰ C → saat bekerja larutan-larutan ini harus diletakan dalam wadah berisi es
- Selalu gunakan tabung dan tips yang telah disterilisasi, hindari risiko kontaminasi seminimal mungkin.

Menyiapkan Mix Solution :

No.	Bahan	1 sampel
1	Forward Primer (40 pmol)	0,25 µl
2	Reverse Primer (40 pmol)	0,25 µl
3	dNTP's	0,5 µl
4	10 x Buffer	5 µl
6	Taq Polimerase	0,2 µl
7	Aquabidest (17,8 – 2,5 = 15,3 µl)	15,3 µl
8	MgCl ₂ 25 mM	1 µl
	Jumlah	22,5 µl

- Siapkan 12 tabung PCR (steril) → pipetkan sebanyak 22,5 µl Mix Solution → masukkan ke masing-masing tabung PCR
- Tambahkan 2,5 µl larutan DNA sampel ke dalam tabung → kemudian vortex
- Tambahkan Mineral Oil sebanyak 50 µl
- Tutup rapat tabung dan susun di dalam blok alat Thermal Cycler

- Sertakan kontrol negatif setiap menjalankan PCR
- Atur program untuk menjalankan PCR

Cara kerja elektroforesis agarose

Alat dan bahan yang digunakan :

a. Alat

- | | |
|----------------------------------|-----------------------|
| - Sarung tangan | - Pipet otomatis |
| - Tempat buang cairan biologis | - Pipet tetes |
| - Waterbath | - Alat elektroforesis |
| - Mikrosentrifus | - Power supply |
| - Alat elektroforesis agarose | - Beaker |
| - Tabung mikrosentrifus (1,5 ml) | - Hamilton syringe |
| - Pipet Mohr | - Vorteks |
| - Erlenmeyer flask | - Spidol |
| - pH meter | - Tisu |

b. Bahan

- | | |
|---|-----------------------------|
| - 7 sampel protein darah dari minggu yang lalu | - β -merkaptotanol |
| - Sampel DNA sel epitelial | - Tris |
| - Pewarna DNA (crystal violet dalam 20% gliserol) | - DTT |
| - Akuades | - SDS |
| - Etanol absolut dingin | - Agar 2% |
| - Gel poliakrilamide – SDS 10% | - Na_2HPO_4 |
| - Isobutanol | - Gliserol |
| - Protein standard SDS-PAGE | - EDTA |
| - 1 N HCl | - Asam borik |
| - Bromfenol biru | - Larutan pewarna |
| | - Larutan pencuci |
| | - Agarose |

Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

1. **1X TBE** - siapkan 1000 ml dengan komposisi:
10.8 g Tris, 5.5 g asam borik acid, 0.74 g EDTA → dimasukkan ke dalam beaker 1000 ml → tambahkan 900 ml akuades → aduk dengan magnetic stirrer sampai larut → Tambahkan akuades sampai volume larutan 1 liter. → simpan di dalam botol bersih pada temperatur ruangan.
2. **0.8% Agarose** - siapkan agarose secukupnya (diperlukan 40 ml/casting tray) dengan komposisi:
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 → panaskan sampai mendidih dan larutan jernih → kemudian dinginkan sampai 60° → tambahkan 12 µl larutan ethidium bromide/casting tray.
3. **Larutan Dapar Sampel** (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 10%(v/v) gliserol; 1% (b/v) SDS; 0,01% (b/v) biru bromfenol).
4. **Larutan Dapar Elektroda** (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 1,8 M glisin; 1% (b/v) SDS).
5. **Larutan Pewarna** (0,15% Coomassie Brilliant Blue R-250; 250 ml metanol; 50 ml asam asetat; akuades sampai 500 ml)
6. **Larutan Pencuci** (50 mL metanol; 75 mL asam asetat; akuades sampai 1000 mL)

Tahap Pertama – ELEKTROFORESIS GEL AGAROSE

1. Siapkan casting tray → pasang satu “*comb*” (sisir) pada pertengahan “*tray*” (plat cetakan) dan satu sisir lagi pada ujungnya..
2. Tuangkan ± 40 ml 0,8% agarose ke dalam casting tray.

Cara kerja alat elektroforesis:

- a. Tunggu sampai gel beku → lepaskan comb secara hati-hati.
- b. Letakkan gel di dalam elektroforesis tank yang sudah berisi larutan 1X TBE → kemudian tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel terbenam.
- c. Untuk mewarnai DNA epitel → campurkan 10 µl DNA epitel dengan 10 µl pewarna DNA di atas parafilm → kemudian masukkan semuanya (20 µl) ke dalam sumur gel.
- d. Kemudian dengan parafilm baru lagi → campurkan 10 µl DNA sel darah dengan 10 µl pewarna DNA di atas parafilm → masukkan semuanya (20 µl) ke sumur gel. (Jangan lupa mencatat posisi dan urutan sampel-sampel DNA).
- e. Hidupkan mesin elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 90 V. Sampel-sampelnya akan mulai bergerak ke katode. (karena DNA bermuatan negatif)
- f. Matikan mesin elektroforesis secara sempurna
- g. Keluarkan gel dengan sangat hati-hati dan letakkan pada tray yang disediakan.
- h. Pindahkan ke alat “UV reader” supaya hasilnya jelas.

SDS PAGE

Persiapan Gel

1. Bersihkan dulu plat kaca menggunakan akuades dan etanol (70%)
2. Susun lempeng kaca beserta *spacer* → tutup celah antara lempeng dengan *spacer* menggunakan agar 2% secukupnya.
3. Siapkan gel poliakrilamide - SDS 10% (Siapkan gel pemisah dulu).

Bahan	Gel pemisah ± 5 ml/gel (tabung reaksi 1)	Gel penumpuk ± 1,5 ml/gel (tabung reaksi 2)
Akrilamide 30%	1,88 ml	0,36 ml
1,5 M Tris-HCl pH=8,6	1,28 ml	-
1,5M Tris-HCl pH=6,8	-	0,24 ml
Akuades	1,93 ml	0,70 ml
SDS 10%	56 µl	10 µl
Amonium persulfat 10%	38 µl	7,2 µl
TEMED	3,8 µl	1 µl

Perhitungan plate serta spacer elektroforesisnya adalah:

- Plate elektroforesis: $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 0,2 \text{ cm} = 20 \text{ cm}^3$
- Spacer elektroforesis : $1 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} = 1 \text{ cm}^3$
- Volume aktifnya : $8 \text{ cm} \times 8,5 \text{ cm}$
 - o Untuk membuat gel pemisah dibutuhkan akrilamid = 6,5 cm
Volume gel pemisah = $p \times l \times t \rightarrow 8 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} \times 6,5 \text{ cm}$
 $= 5,2 \text{ cm}^3 = 5,2 \text{ ml}$
 - o Untuk membuat gel penumpuk dibutuhkan 1,5 cm
Volume gel penumpuk = $p \times l \times t \rightarrow 8 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} \times 1,5 \text{ cm}$
 $= 1,2 \text{ cm}^3 = 1,2 \text{ ml}$

4. Tuangkan dulu campuran gel pemisah ke dalam ruang di antara lempeng kaca $\rightarrow$ sisakan $\pm 2,5 \text{ cm}$ dari tepi atas lempeng kaca untuk gel penumpuk.
5. Teteskan isobutanol untuk menyingkirkan udara pada bagian atas gel dan agar batas antar gel dapat terbentuk dengan baik.
6. Biarkan gel pemisah selama ± 30 menit $\rightarrow$ siapkan gel penumpuk.
7. Setelah ± 30 menit gel pemisah berpolimerisasi $\rightarrow$ tuang campuran gel penumpuk di atasnya $\rightarrow$ sisipkan sisir plastik untuk membentuk sumur sampel $\rightarrow$ biarkan gel penumpuk berpolimerisasi.

8. Setelah gel penumpuk berpolimerisasi → lepaskan sisir bagian atas dan klem serta *spacer* bagian bawah.
9. Letakkan lempeng kaca yang berisi gel secara vertikal pada alat elektroforesis dan kemudian klem → isi tempat dapar dengan dapar elektroda, dan singkirkan gelembung udara pada bagian bawah gel.

Tahap Kedua : Mempersiapkan sampel protein

1. Atur temperatur waterbath di 100⁰ C.
2. Siapkan 7 tabung mikrosentrifus yang bersih dan kering → tandai dengan “plasma”, “M”, “S”, “G_S”, “G_P”, “E_S”, “E_P”.
3. Ambil ke-7 sampel protein darah (yaitu plasma, M, S, G_S, G_P, E_S, E_P) dari lemari pendingin.
4. Masukkan 450 µL buffer sampel, dan 25 µL β-merkaptotanol ke tiap tabung mikrosentrifus yang sudah ditandai → tambahkan 50 µL sampel protein plasma, M, S, G_S, G_P, E_S, E_P ke tabung mikrosentrifus masing-masing.
5. Tutup rapat tabung → vorteks pelan-pelan supaya endapan tercampur rata dengan buffer.
6. Masukkan semua tabung mikrosentrifus ke dalam waterbath yang mendidih selama 5 menit.
7. Masukkan tabung –tabung ini ke dalam mesin sentrifus → pastikan letak semua tabung seimbang → atur pada kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit.

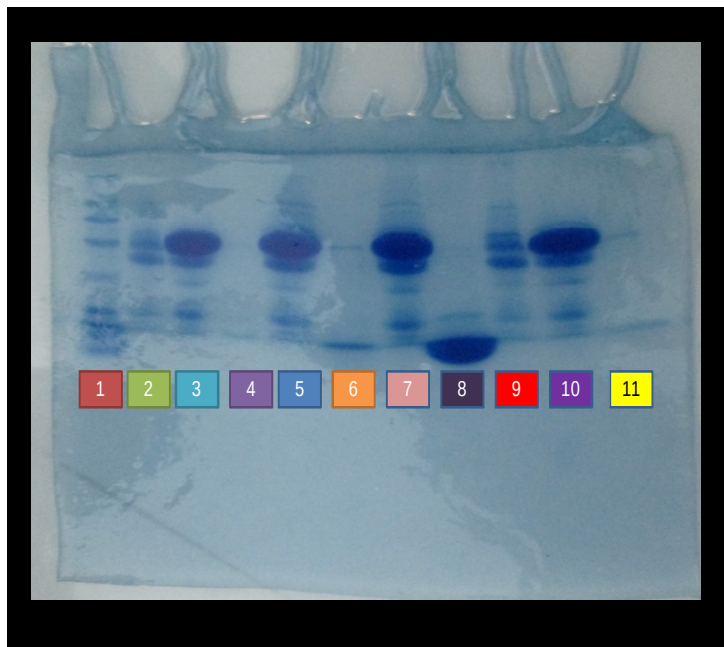
Tahap Ketiga: Loading and running the gel

1. Masukkan 10 µL sampel protein (yaitu plasma, M, S, G_S, G_P, E_S, E_P) ke dalam sumur masing-masing menggunakan Hamilton syringe → pada sumur yang terakhir masukkan 10 µL marker. (jangan lupa catat nomor sumur dan sampel apa).
2. Hubungkan alat elektroforesis dengan *power supply* → jalankan elektroforesis selama 4 jam atau lebih.

Tahap Keempat: Pewarnaan Gel

1. Selesai proses pemisahan protein → matikan *power supply* dan lepaskan semua kabel dari alat elektroforesis.
2. Buka klem (gunakan sarung tangan) → 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.
3. Angkat gel dan rendam dalam larutan pewarna selama 30-60 menit.
4. Pindahkan gel 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 marker untuk menentukan berat molekulnya. Untuk menentukan berat molekul protein sampel, ukur jarak pita-pita protein sampel serta pita-pita marker dari batas atas gel pemisah.

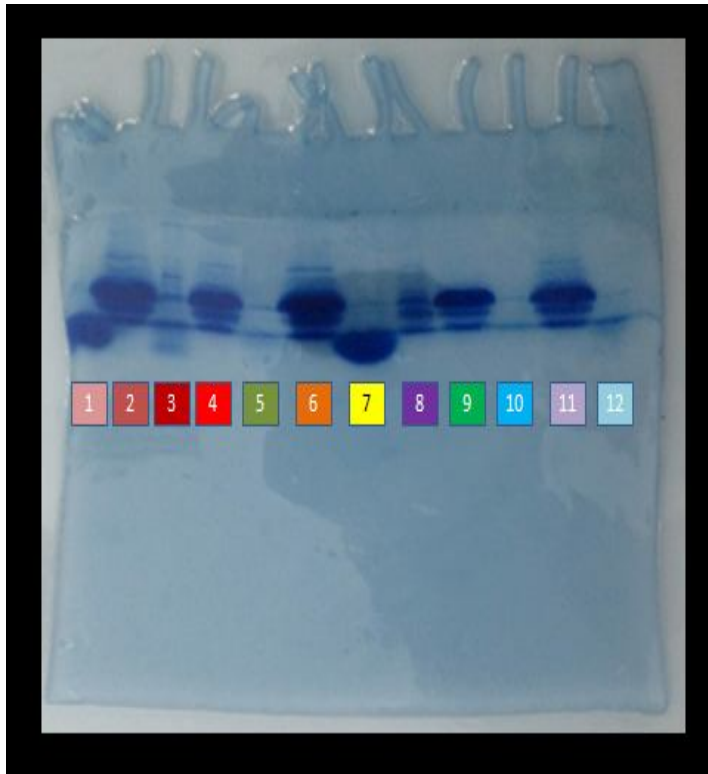
Hasil praktikum:



Gambar 1. Gel hasil Isolasi Protein SDS-PAGE

Keterangan :

- 1 = Standar
- 2 = Ep2
- 3 = Es2
- 4 = Gp2
- 5 = Gs2
- 6 = M2
- 7 = P2
- 8 = S2
- 9 = Ep4
- 10 = Es4
- 11 = Gp4



Keterangan :

- 1 = S3
- 2 = P3
- 3 = Standar
- 4 = Gs4
- 5 = M4
- 6 = P4
- 7 = S4
- 8 = Ep3
- 9 = Es3
- 10 = Gp3
- 11 = Gs3
- 12 = M3

Gambar 2. gel hasil Isolasi Protein SDS-PAGE

Keterangan Kelompok :

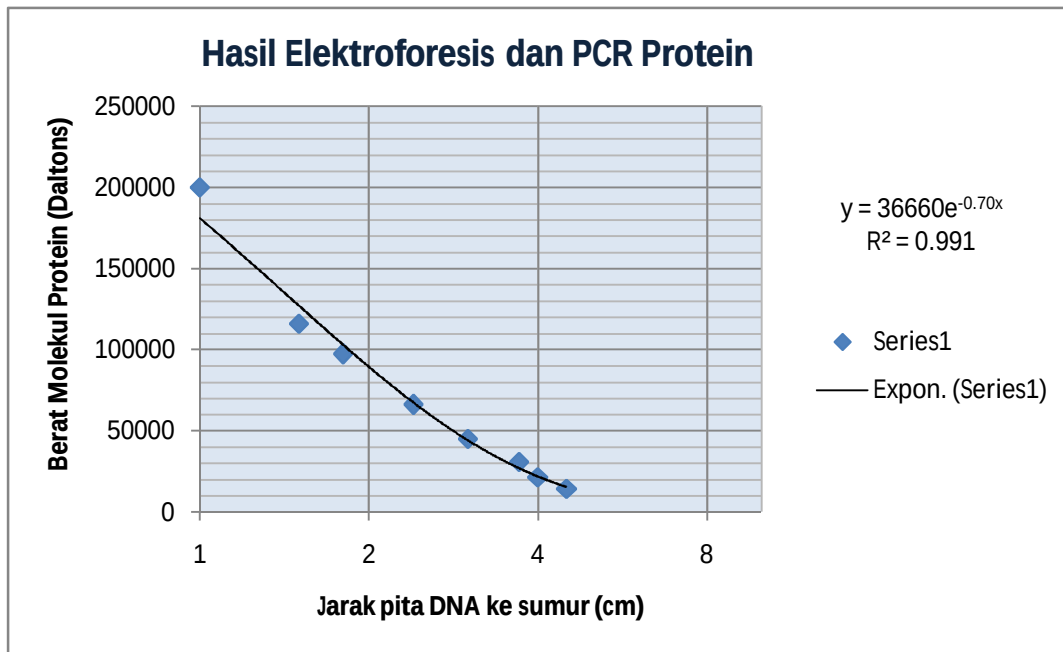
Kelompok 2 : Herviani Sari & Henny S. Ompusunggu

Kelompok 3 : Rebecca Rumesty & Maria Lestari

Kelompok 4 : Juwita & Rika Nailuvar

Tabel 1 . Pita standar pada SDS-PAGE

Jarak Pita (cm)	Berat Molekul (Dalton)	Protein
1	200.000	Myosin
1,5	116.250	β-Galaktosidase
1,8	97.400	Phosphorylase B
2,3	66.200	Albumin
3	45.000	Ovalbumin
3,8	31.000	Carbonic anhydrase
4	21.500	Trypsin inhibitor
5,3	14.400	Lysozime



Gambar 3. Grafik Hasil Elektroforesis dan PCR Protein Darah

Tabel 2. Pita sampel hasil SDS-PAGE

	Sumur 10	
Jarak band (cm)	1,1	1,8
Berat Molekul (Dalton)	30160,4	61978,2

Pembahasan :

1. Dari grafik hasil elektroforesis dan PCR standar DNA didapat persamaan $y = 36660e^{-0.70x}$ → digunakan untuk menghitung berat molekul protein sampel.
2. Pada sumur 10 didapatkan beberapa pita – pita DNA → setelah dicoba dimasukkan ke dalam rumus ternyata berat molekulnya tidak sesuai seperti seharusnya. Seharusnya berat molekul yang paling besar terletak pada pita yang paling atas. Tetapi pada hasil praktikum di dapati hasil yang sebaliknya yaitu berat molekul yang paling kecil ada di pita yang paling atas.
3. Kemungkinan kesalahan ini bisa disebabkan oleh praktikan yang kurang teliti dalam menjalankan prosedur pembuatan gel poliakrilamid, baik kesalahan dalam mengukur volume bahan atau kesalahan membuat gel pemisah dan gel penumpuk.

Saran :

1. Sebaiknya sebelum praktikum dimulai perhatikan bahan-bahan untuk praktikum.
2. Sebaiknya praktikan membaca dan memahami prosedur pengerjaan.