

## **LAPORAN PRAKTIKUM 5, 6 , 7, 8**

### **ISOLASI DNA, ISOLASI PROTEIN DARAH,**

### **SERTA PEMERIKSAAN DENGAN TEKNIK PCR, ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS-PAGE**

Nama (NIM) : Debby Mirani Lubis (137008010) dan Melviana (137008011)

Hari/ Tanggal : Kamis, 7, 14, 21, 28, dan 29 November 2013 (08.00-selesai)

#### **I. Tujuan:**

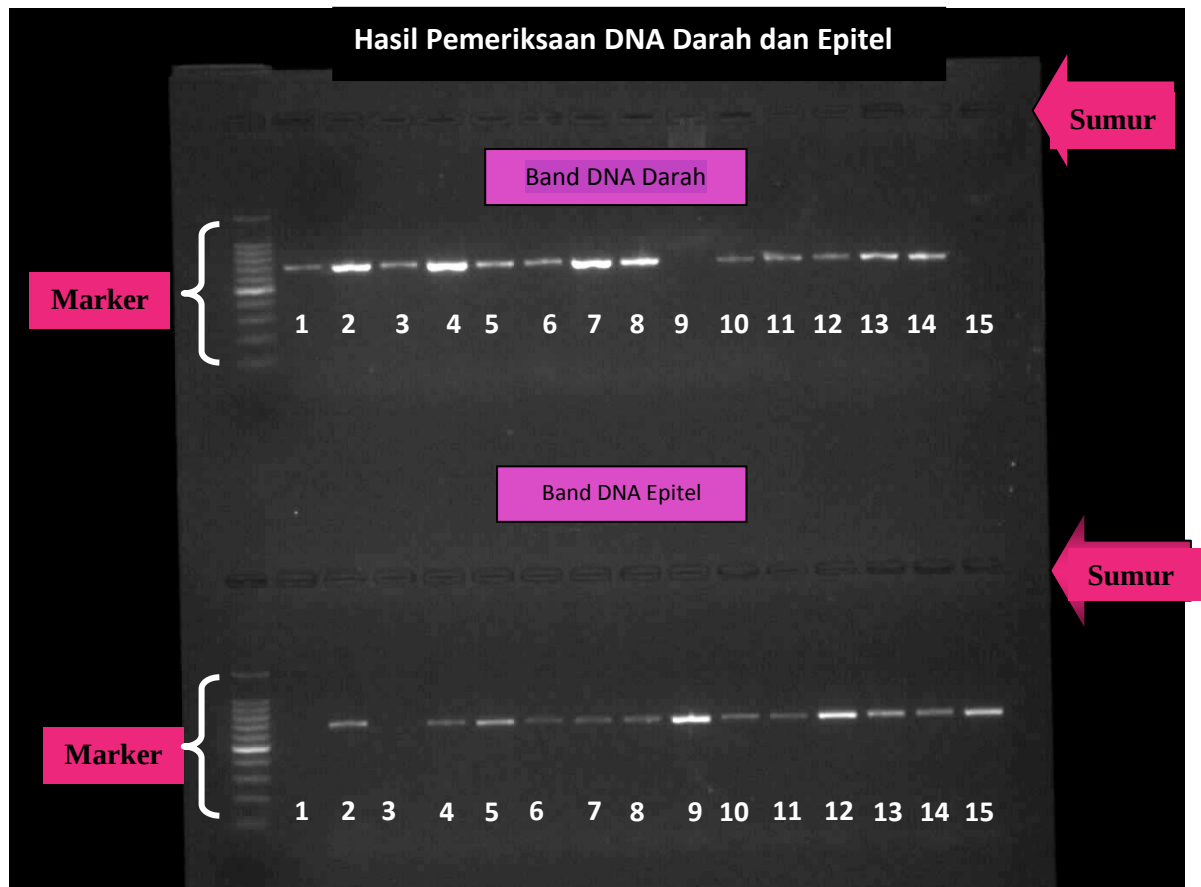
1. Praktikan mengerti dan dapat mempraktekkan metode dan cara kerja mengisolasi DNA
2. Praktikan mampu melakukan isolasi DNA dari sel epitelial mukosa bagian dalam pipi
3. Praktikan mampu mengisolasi DNA dari darah
4. Praktikan mengerti dan dapat mempraktekkan teknik PCR dengan sampel DNA manusia
5. Praktikan mampu melakukan isolasi protein darah dengan teknik sentrifugasi serta pengendapan dengan larutan garam konsentrasi tinggi dan etanol
6. Praktikan mengerti metode elektroforesis
7. Praktikan mampu membuat gel agarose yang akan digunakan sebagai medium elektroforesis
8. Praktikan mampu mempraktekkan teknik elektroforesis agarose dengan sampel-sampel DNA dari manusia mulai dari persiapan bahan, proses menjalankan alat PCR
9. Praktikan mampu melakukan teknik PCR, mulai dari persiapan bahan, proses menjalankan alat PCR dan mengumpulkan hasil PCR untuk memperbanyak sampel protein yang akan dilakukan elektroforesis
10. Praktikan mampu membuat grafik PCR Standar DNA yang membandingkan jarak pita DNA dari sumur dengan ukuran DNA (bp)
11. Praktikan mampu membaca ukuran berat molekul (bp) DNA epitel dan darah hasil elektroforesis agarose
12. Praktikan mampu melakukan pemisahan protein darah dan memeriksanya dengan teknik SDS-PAGE
13. Praktikan mampu membuat gel poliakrilamide yang akan digunakan sebagai medium elektroforesis SDS-PAGE
14. Praktikan mampu melakukan teknik elektroforesis mulai dari persiapan bahan, proses menjalankan alat, pewarnaan dan pencucian gel
15. Praktikan mampu membaca berat molekul protein sampel pada gel hasil elektroforesis
16. Praktikan mampu membuat kurva standar protein petanda

#### **II. Hasil Praktikum**

##### **II.1 Isolasi DNA dilanjutkan teknik PCR dan elektroforesis Agarose**

Pada praktikum isolasi DNA di dapat hasil 2 sampel DNA yang berupa endapan yang masing-masing diperoleh dari darah praktikan Melvi dan Epitel mukosa mulut praktikan Debby. Selanjutnya DNA tersebut akan diperiksa bersama dengan hasil isolasi DNA praktikan dari grup lain dengan teknik PCR

kemudian elektroforesis agarose dan dibaca dengan sinar UV dan didapat hasil berupa gambar sebagai berikut:



**Gambar 1. Hasil Pita DNA diamati di Bawah Sinar UV**

Keterangan:

|                   |                     |                   |
|-------------------|---------------------|-------------------|
| 1 = Standar       | 6 = Sampel Ichwan   | 11 = Sampel Yunus |
| 2 = Sampel Seri   | 7 = Sampel Ramadhan | 12 = Sampel Yuni  |
| 3 = Sampel Amirul | 8 = Sampel Melvi    | 13 = Sampel Ade   |
| 4 = Sampel Debby  | 9 = Sampel Barlian  | 14 = Sampel Feri  |
| 5 = Sampel Adit   | 10 = Sampel Maya    | 15 = Sampel Nita  |

**Tabel 1. Hasil Pengukuran Jarak Sumur-Band Marker DNA Darah**

| Band | Jarak (cm) | Basepairs (bp) |
|------|------------|----------------|
| 1    | 1,0        | 1100           |
| 2    | 1,3        | 1000           |
| 3    | 1,4        | 900            |
| 4    | 1,5        | 800            |
| 5    | 1,6        | 700            |
| 6    | 1,7        | 600            |
| 7    | 1,8        | 500            |
| 8    | 2,0        | 400            |

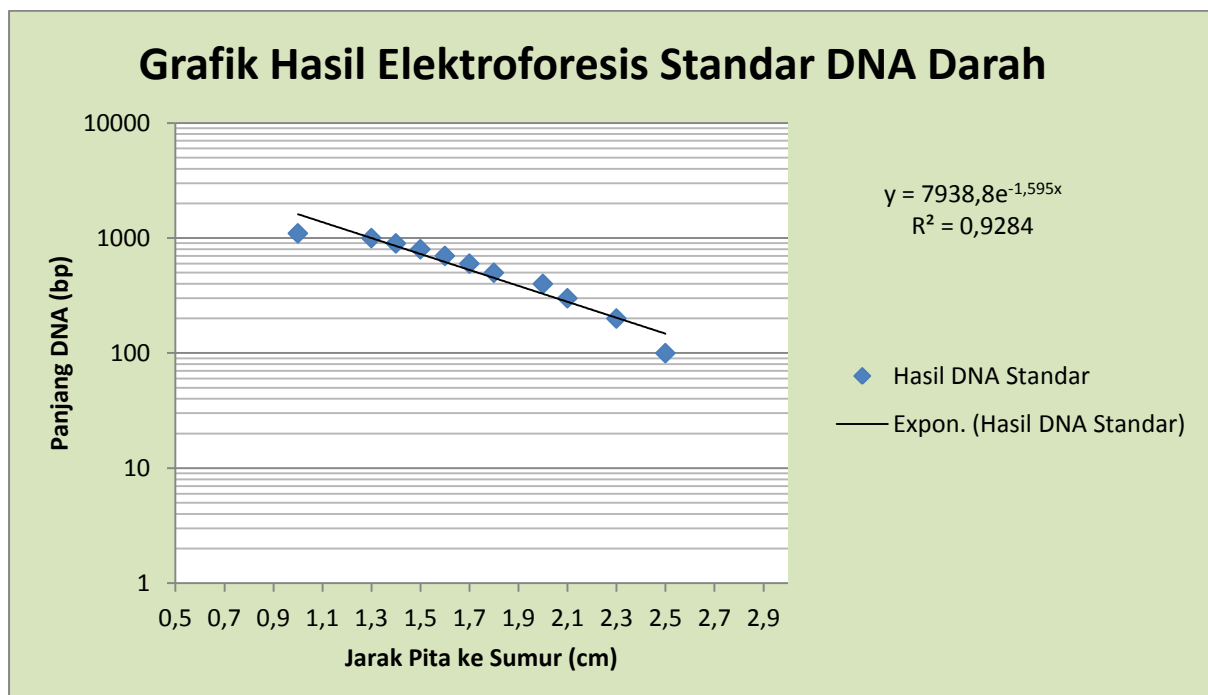
|    |     |     |
|----|-----|-----|
| 9  | 2,1 | 300 |
| 10 | 2,3 | 200 |
| 11 | 2,5 | 100 |

**Tabel 2. Hasil Pengukuran Jarak Sumur-Band Marker Sel Epitel**

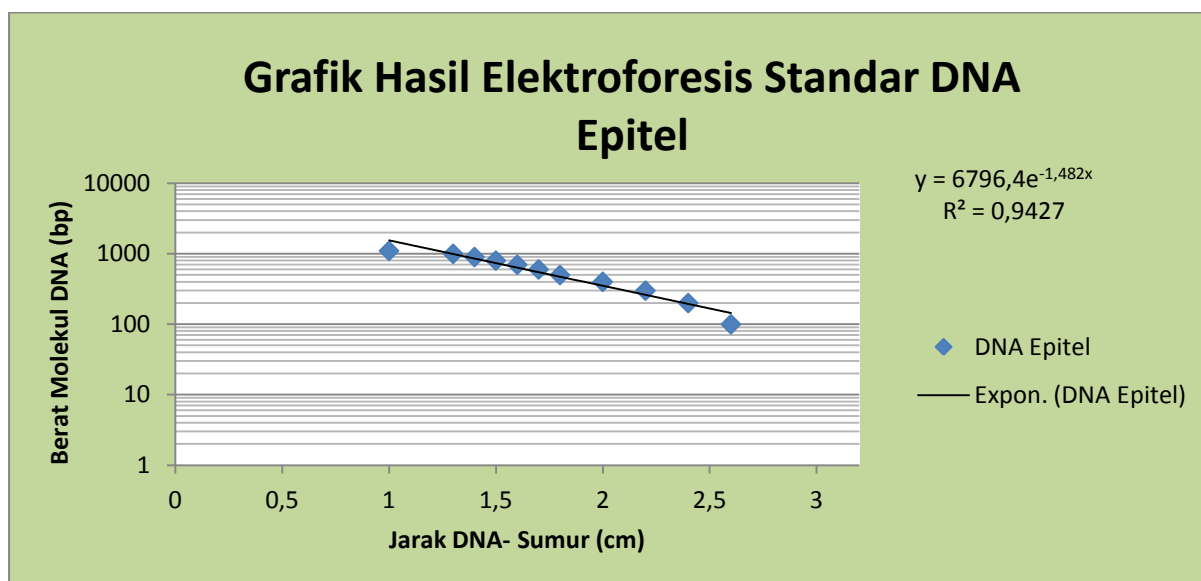
| Band | Jarak (cm) | Basepairs (bp) |
|------|------------|----------------|
| 1    | 1,0        | 1100           |
| 2    | 1,3        | 1000           |
| 3    | 1,4        | 900            |
| 4    | 1,5        | 800            |
| 5    | 1,6        | 700            |
| 6    | 1,7        | 600            |
| 7    | 1,8        | 500            |
| 8    | 2,0        | 400            |
| 9    | 2,2        | 300            |
| 10   | 2,4        | 200            |
| 11   | 2,6        | 100            |

Dari data di atas dibuat suatu grafik berat molekul DNA (bp) – jarak migrasi DNA dari sumur (cm) sebagai berikut:

**Grafik 1a. Berat Molekul DNA Standar (bp) – jarak migrasi DNA dari sumur (cm) dari DNA darah**



**Grafik 1b. Berat Molekul DNA Standar (bp) – jarak migrasi DNA dari sumur (cm) dari DNA epitel**



Untuk sampel praktikan (sumur no. 4 dan no. 8), baik untuk sampel DNA darah maupun DNA epitel hasilnya sama dengan pita no 4 dari protein standar, dengan jarak migrasi 1,5 cm. Ini berarti berat molekul DNA praktikan adalah 800 bp.

## II.2 Isolasi Protein Darah dilanjutkan teknik SDS PAGE

Pada praktikum isolasi protein darah, dilakukan fraksinasi protein dari sampel 5 ml darah, dengan anggota kelompok berjenis kelamin wanita. Ringkasan hasil dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil dan Pengamatan dari Sampel 5 ml Darah Wanita**

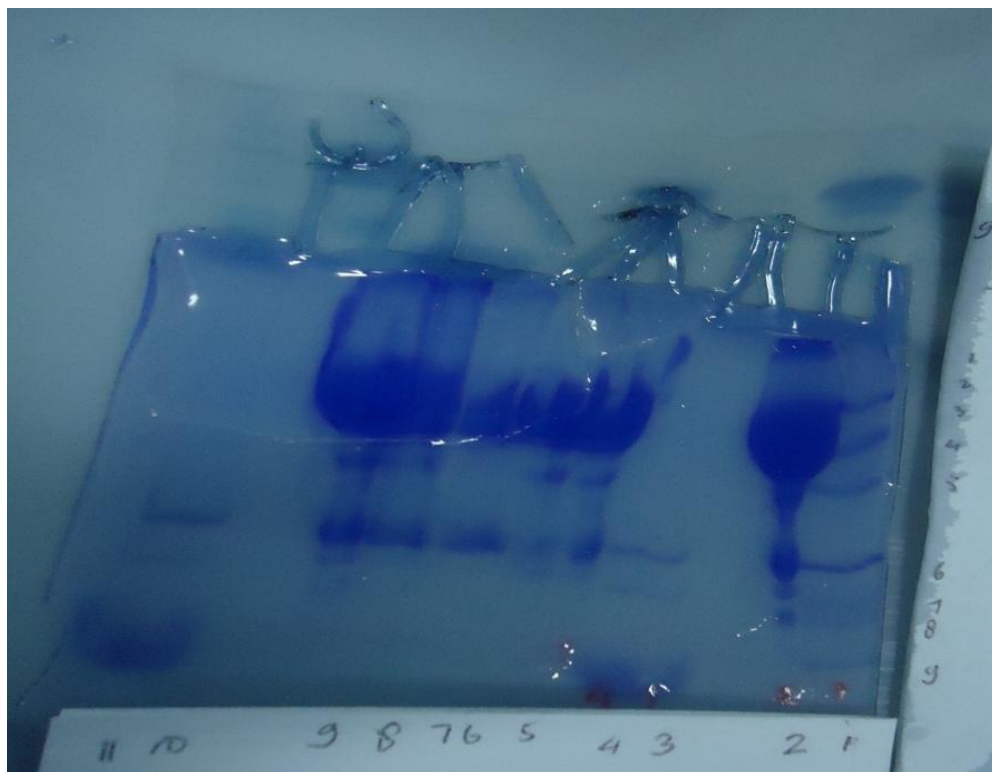
| Bagian A             | Supernatan                                                                                                                                    | Pengendapan                                                                                           |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Jumlah/ Warna        | 5 ml, warna merah → kuning setelah disentrifus dan setelah penambahan cairan → 7 ml                                                           | Warna merah sebanyak 2,3 ml                                                                           |
| Pengamatan Yang Lain | Tampak pemisahan setelah sentrifugasi, larutan berwarna merah di bawah, diikuti warna kuning di atas, di antara keduanya tampak lapisan putih |                                                                                                       |
| Bagian B             | Supernatan                                                                                                                                    | Pengendapan                                                                                           |
| Jumlah/ Warna        | 7 ml kuning                                                                                                                                   | Merah<br>Hasil supernatan terakhir 1,3 ml ditambah 7 ml buffer, setelah disentrifus → Protein membran |
| Pengamatan Yang Lain | --                                                                                                                                            | Pengendapan halus                                                                                     |
| Bagian C             | Supernatan                                                                                                                                    | Pengendapan                                                                                           |
| Jumlah/ Warna        | 0,65 ml putih kekuningan                                                                                                                      | 0,1 ml kuning                                                                                         |
| Pengamatan Yang Lain | Sampel awal: 0,5 ml bagian plasma putih kekuningan tambah 0,25 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                |                                                                                                       |

| Bagian D             | Supernatan                                                            | Pengendapan                                      |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Jumlah/ Warna        | 0,6 ml                                                                | Setelah proses, jumlah sampel 0,3 ml warna putih |
| Pengamatan Yang Lain | Sampel awal: 0,5 ml bagian plasma putih kekuningan tambah 0,25 etanol |                                                  |

Dari supernatan pada bagian A dilanjutkan untuk sampel pada bagian B. Dari bagian B diperoleh protein sitoplasmik (S) dan protein membran (M). Bagian C berasal dari sampel sebanyak 0,5 ml plasma darah dan ditambah 0,25 amonium sulfat. Hasilnya berupa protein supernatan garam tinggi (Gs) dan protein pengendapan garam tinggi (Gp). Bagian D berasal dari sampel plasma sebanyak 0,5 ml ditambah 0,25 ml etanol. Hasilnya berupa protein supernatan etanol (Es) dan protein pengendapan etanol (Ep).

Setelah sampel protein difraksinasi, kemudian dilakukan proses elektroforesis SDS PAGE. Gambar hasil dapat dilihat pada gambar 2. Kemudian masing-masing sumur yang mewakili fraksi protein tertentu diamati untuk melihat pita protein mana saja yang terdapat di dalamnya. Hasil pengamatan diringkas pada tabel 4.

**Gambar 2. Hasil Elektroforesis SDS PAGE Protein Darah**



Keterangan: Dari gambar di atas , urutan sampel dari sumur 1 (paling kiri) sampai sumur ke 11 (paling kanan) adalah sebagai berikut: 1= Protein Penanda, 2= P (Protein Plasma), 3= M (protein membran) , 4= S (protein sitoplasmik), 5= Es (protein dalam supernatan etanol), 6= Gs (protein dalam supernatan garam), 7= Gp (protein dalam pengendapan garam), 8= Ep (protein pengendapan etanol), 9= P (Protein Plasma), 10=M (protein membran) , 11= S (protein sitoplasmik).

**Tabel 4. Hasil Elektroforesis SDS PAGE: Protein Darah-Pita DNA**

| Nama Protein                | Protein Penanda | P | M | S | Es | Gs | Gp | Ep |
|-----------------------------|-----------------|---|---|---|----|----|----|----|
| Myosin (Pita 1)             | +               | + | - | + | -  | -  | -  | -  |
| B Galaktosidase (Pita 2)    | +               | - | - | - | -  | -  | -  | -  |
| Phosphorylase b (Pita 3)    | +               | - | - | - | -  | -  | -  | -  |
| Albumin (Pita 4)            | +               | + | + | + | +  | +  | +  | +  |
| Ovalbumin (Pita 5)          | +               | + | + | - | +  | +  | -  | -  |
| Carbonic anhydrase (Pita 6) | +               | + | + | + | +  | +  | +  | +  |
| Trypsin inhibitor (Pita 7)  | +               | + | + | + | +  | +  | -  | -  |
| Lysozyme (Pita 8)           | +               | + | + | - | -  | -  | -  | -  |
| Aprotinin (Pita 9)          | +               | - | + | + | -  | -  | -  | -  |

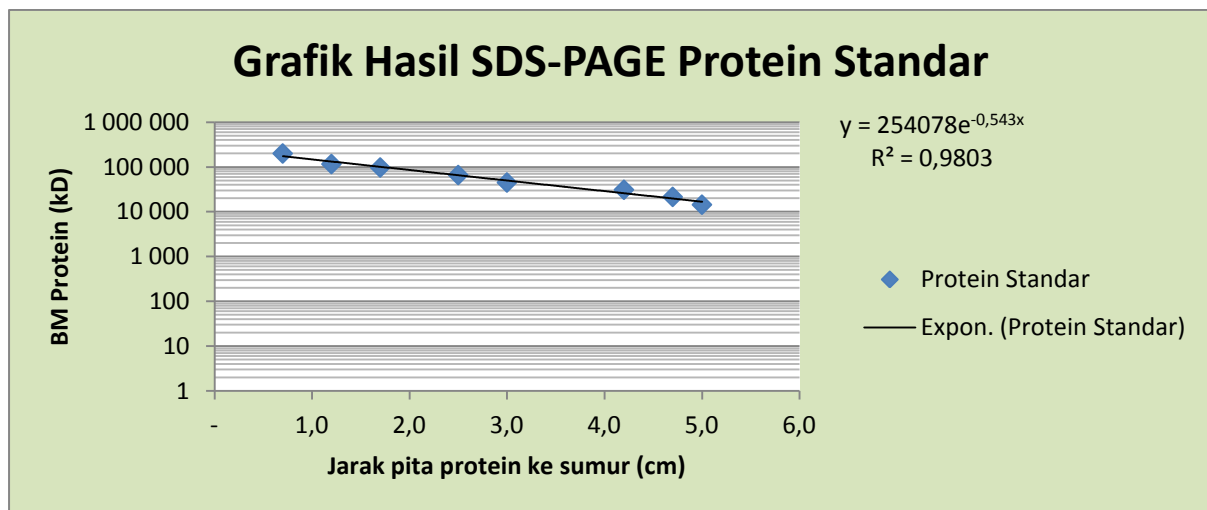
Untuk mengukur Berat molekul protein sampel, maka dapat dihitung dari persamaan yang diperoleh dari grafik semilog, berdasarkan berat protein (kD)- jarak migrasi protein dari sumur (cm). Dari hasil pengukuran diperoleh tabel data berikut:

**Tabel 5. Hasil Pengukuran Berat Protein Penanda (kD) -Jarak Migrasi Protein (cm)**

| Protein                   | Band | Protein (kD) |
|---------------------------|------|--------------|
| Myosin                    | 0,7  | 200.000      |
| $\beta$ -Galaktosidase    | 1,2  | 116.250      |
| Glycogen phosphorylase b  | 1,7  | 97.400       |
| Bovine serum albumin      | 2,5  | 66.200       |
| Ovaalbumin                | 3,0  | 45.000       |
| Carbonic anhydrase        | 4,2  | 31.000       |
| Soybean trypsin inhibitor | 4,7  | 21.500       |
| Lysozyme                  | 5,0  | 14.400       |
| Aprotinin                 | 5,6  | 6.500        |

Dengan membuat grafik regresi, kemudian di dapat persamaan yang akan digunakan untuk menghitung berat molekul protein tertentu, yang diketahui jarak migrasinya.

Grafik 2. Hasil SDS PAGE Protein Standar



### III. Pembahasan

#### III.1 Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis Agarose

Berbagai zat yang digunakan dalam praktikum isolasi DNA memiliki fungsi yang berbeda. Beberapa larutan digunakan untuk melisis sel dan melarutkan DNA, lainnya digunakan untuk reaksi enzimatis/kimia untuk menghilangkan zat lain selain DNA yang akan mengkontaminasi proses analisis DNA, seperti protein, RNA, dan makromolekul (karbohidrat, lemak). Larutan Tris EDTA digunakan sebagai langkah awal untuk melisis sel. Tris merupakan buffer yang berfungsi mempertahankan pH pada nilai stabil, Tris juga berinteraksi dengan lipopolisakarida pada membran sehingga membran sel bisa terbuka. EDTA mampu berikatan dengan kation bervalensi 2 seperti kalsium dan magnesium, sehingga karena ion ini penting untuk integritas membran, ikatan oleh EDTA-Ca/Mg merusak membran. Selain menggunakan Tris EDTA larutan lain yang berfungsi dalam lisis sel adalah deterjen seperti juga SDS. Deterjen memiliki kemampuan melarutkan lipid sebagai komponen membran sel, karena memiliki sifat amfipatik.

Selanjutnya, NaCl sebagai suatu garam berperan pada tahap presipitasi, karena garam mengganggu ikatan hidrogen antara DNA dan air, sehingga keduanya bisa dipisahkan. Isopropanol menyebabkan perubahan struktur DNA apabila terdapat kation, sehingga DNA akan beragregasi dan terpresipitasi. Kemudian dengan tenaga mekanik dari pemutaran sentrifus, terkumpul pellet yang terpisah dari supernatan.

Setelah dipresipitasi maka untuk mendapat hasil yang murni dilakukan tahap pembersihan dengan berbagai macam metode diantara yang bisa digunakan adalah etanol 70% untuk menghilangkan garam-garam dan zat terlarut lainnya namun tidak menyebabkan DNA terpresipitasi. Setelah pemurnian dan pembersihan, barulah DNA diresuspensi dengan larutan TE.

Pada proses yang standar untuk mencapai hasil dengan kemurnian tinggi, pada tahap presipitasi digunakan kloroform atau fenol. Namun pada prosedur ini tidak digunakan larutan tersebut. Sehingga dapat dimaklumi apabila hasil isolasi DNA pada praktikum tidak sempurna hasil penelitian.

Dari Gambar 1a (DNA epitel), dapat dilihat bahwa terdapat pita DNA pada sumur kontrol. Hal ini merupakan suatu kesalahan karena sebenarnya pada kontrol tidak ada DNA sehingga seharusnya hasilnya kosong (tidak ada pita DNA). Kesalahan ini mungkin disebabkan oleh terjadinya kesalahan mahasiswa waktu mengisi sumur, sehingga DNA sampel mahasiswa masuk ke sumur kontrol. Namun dari sumur lainnya, band/pita yang tampak pada gambar menunjukkan DNA sudah terisolasi dengan benar.

Ada beberapa mahasiswa yang pita DNANYa tidak terlihat (kosong) yaitu nomor 9 dan 15, hal ini mungkin disebabkan DNA tidak terambil pada waktu proses isolasi DNA (kesalahan pada proses isolasi DNA). Jarak sumur ke pita DNA beberapa sampel mahasiswa tidak jauh berbeda hal ini menunjukkan bahwa teknik yang dilakukan sudah benar. Dari grafik hasil pemeriksaan elektroforesis dan PCR standar DNA didapat persamaan:

$$y = 7938, e^{-1,59x} \text{ dengan nilai } R^2 = 0,928.$$

Persamaan ini dipakai untuk menghitung berat molekul DNA sampel (base pair) dimana x adalah jarak dari sumur ke pita dalam cm. Berdasarkan nilai R dapat dinilai bahwa persamaan yang dihasilkan dari data tersebut cukup akurat.

Sedangkan dari gambar 1b (DNA epitel) dapat dilihat bahwa tidak terdapat pita DNA pada sumur kontrol. Hal ini berarti sudah benar karena pada kontrol memang tidak ada DNA. Band/pita yang tampak pada gambar menunjukkan DNA sudah terisolasi dengan benar. Ada satu mahasiswa (nomor 3) yang pita DNANYa tidak terlihat (kosong), hal ini mungkin disebabkan DNA tidak terambil pada waktu proses isolasi DNA (kesalahan pada proses isolasi DNA). Jarak sumur ke pita DNA beberapa sampel mahasiswa tidak jauh berbeda hal ini menunjukkan bahwa teknik yang dilakukan sudah benar.

Dari grafik hasil pemeriksaan elektroforesis dan PCR standar DNA didapat persamaan:

$$y = 6796, e^{-1,48x} \text{ dengan nilai } R^2 = 0,942$$

yang dipakai untuk menghitung berat molekul DNA sampel (base pair) dimana x adalah jarak sumur ke pita dalam cm. Berdasarkan nilai R dapat dinilai bahwa persamaan yang dihasilkan dari data tersebut cukup akurat.

Karena sampel dari kelompok (sumur no 4 dan 8), baik sampel DNA epitel dan darah, jarak migrasinya sama dengan pita 4 (1,5 cm) maka berat molekul DNA adalah 800 bp.

### III.2 Isolasi Protein Darah dan Elektroforesis SDS PAGE

Isolasi protein merupakan suatu teknik penting untuk mempelajari dan mengkarakterisasi suatu protein tertentu. Darah terdiri dari sel-sel darah dan plasma darah. Membran sel darah merah (M) mengandung berbagai protein, yang antara lain berfungsi sebagai sitoskeleton, protein integral, protein perifer dan beberapa enzim untuk jalur glikolisis. Protein plasma juga terdiri dari berbagai protein, dengan albumin dan globulin sebagai protein utamanya. Globulin terdiri dari 3 jenis yakni  $\alpha$  globulin,  $\beta$  dan  $\gamma$  globulin. Salah satu contoh dari  $\alpha$  globulin adalah prothrombin yang berperan dalam sistem pembekuan. Feritin merupakan contoh dari  $\beta$  globulin terbanyak dan imunoglobulin sebagai antibodi merupakan nama lain dari  $\gamma$  globulin. Selain itu terdapat pula fibrinogen sebagai protein koagulasi.

Peran dari amonium sulfat dan etanol adalah untuk mempresipitasi protein, sehingga pada hasil kurang lebih didapatkan hasil yang serupa dalam kandungan protein pengendapan garam tinggi (Gp) dengan protein pengendapan etanol (Ep), dan antara protein supernatan garam tinggi (Gs) dan protein supernatan etanol (Es).

Ada kemungkinan tidak semua protein muncul karena kesalahan-kesalahan teknis dan atau jumlah protein secara keseluruhan sangat banyak, sehingga beberapa protein yang jumlahnya sedikit tertutupi oleh protein lain. Dan karena jumlah albumin dan hemoglobin sangat banyak pada darah, ( $4 \times 10^6$  unit



dalam 1 eritrosit), maka besar kemungkinan keduanya ditemukan pada tiap fraksi dan menjadi kontaminan.

Dari hasil pada tabel 4, sesuai teori bahwa albumin sebagai protein yang kandungannya sangat banyak pada darah, ditemui pada seluruh sampel (P, M, Gs, Es, Gp, Ep dan S). Dan protein yang paling banyak ditemui pada sampel protein membran dan protein sitoplasmik.

Dari data yang ada didapat persamaan regresi  $y = 25407e^{-0,54x}$  dengan nilai  $R^2 = 0,980$ . Dari data tersebut dapat dihitung berat molekul protein tertentu berdasarkan jarak migrasi yang diketahui.

#### **IV. Kesimpulan**

1. Persamaan regresi hasil elektroforesis DNA darah dan DNA epitel, untuk sampel praktikan adalah  $y = 7938e^{-1,59x}$  dengan nilai  $R^2 = 0,928$  dan  $y = 6796e^{-1,48x}$  dengan nilai  $R^2 = 0,942$ .
2. Sampel DNA praktikan baik DNA darah maupun epitel, bermigrasi sejauh 1,5 cm, dengan ukuran 800 bp.
3. Berat molekul protein sampel SDS PAGE dihitung berdasarkan persamaan  $y = 25407e^{-0,54x}$  dengan nilai  $R^2 = 0,980$
4. Semua sampel protein mengandung albumin
5. Pada elektroforesis dan SDS PAGE, molekul dengan ukuran besar bermigrasi lebih lama (pendek)
6. Protein sitoplasmik dan protein membran memiliki jenis protein terbanyak.

#### **V. Saran**

1. Hendaknya ketersediaan bahan-bahan kimia di laboratorium dilengkapi dan dicukupkan sehingga pada saat praktikum para praktikan tidak mengalami kehabisan/kekurangan bahan.
2. Pengaturan alat-alat laboratorium yang akan dipakai praktikum sebaiknya diatur sebelum melakukan praktikum, sehingga pada saat praktikum tidak perlu lagi menunggu pengaturan alat yang memakan waktu lama.
3. 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).
4. 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.