

PRAKTIKUM V
ISOLASI DNA DAN TEKNIK PCR

Oleh:

Ayu Elvana (127008013)

Yulia Fitri Ghazali (127008007)

Hari/Tanggal praktikum : Kamis/1 November 2012

Tujuan:

- i) Agar mahasiswa dapat mengerti metode umum mengisolasi DNA
- ii) Agar mahasiswa dapat mengisolasi DNA dari sel-sel epitelial mulut
- iii) Agar mahasiswa dapat mengerti dan mempraktek teknik PCR dengan sampel DNA manusia

ISOLASI DNA DARI SEL-SEL EPITELIAL

Alat dan bahan yang digunakan

Tabel 1. Alat dan bahan isolasi DNA sel-sel epitelial

<i>ALAT</i>	<i>BAHAN</i>
batang kayu	minuman isotonic
timbangan digital	EDTA
tabung mikrosentrifus	1 N HCl
Beaker	NaCl
Waterbath	Tris
pH meter	Akuades
tabung reaksi	SDS
Spidol	etanol dingin
Vortex	
pipet Mohr	
Mikrosentrifus	

Persiapan minuman isotonik (0,9% NaCl, 5% sukrosa dalam aqua botol). = 100 ml

Persiapan buffer Tris-EDTA (10mM Tris, 1 mM EDTA, 1% SDS;pH =8). = 50 ml

Berat molekul Tris =121,1 g/mol; EDTA = 292,2 g/mol.

Tentukan pHnya dengan 1 N HCl

Simpan di dalam botol bersih pada temperatur ruangan.

Persiapan buffer 2,5M NaCl; 50mL.

50mL 2,5 M NaCl yang cukup untuk semua kebutuhan praktikum ini. Berat molekul NaCl = 7,25 g/mol

Isolasi DNA dari sel-sel epitelial

A. Panen sel-sel

1. Dengan batang kayu, gosok bagian dalam pipi selama 30 detik. Jangan ditelan.
2. Kumur 10 mL minuman isotonic di dalam mulut sekaligus menggosok pipi-pipi selama 1 menit. Jangan ditelan. Keluarkan minuman tersebut ke dalam beaker.

Lisis sel-sel dan pencernaan protein

3. Tentukan waterbath pada temperatur 56C.
4. Dengan pipet Mohr, ambil 1,5 mL larutan sel ke dalam tabung mikrosentrifus.
5. Dengan sampel orang lain sebagai keseimbangan, sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 10,000rpm. Buanglah supernatant dan tambah larutan sel Anda lagi.
6. Ulangi langkah 5 dan 6 dua kali lagi supaya endapan semakin banyak.
7. Tambah 1 mL buffer Tris-EDTA.
8. Vortex sampel selama 30 detik (endapan sudah hancur).
9. Tambahkan 50µL Proteinase K dan biarkan di waterbath(56C) selama 10 menit.

B. Pengendapan DNA

10. Tambahkan 100µL NaCl, 2,5M. Aduk dengan cara mebolak-balikkan tabungnya.
11. Transfer semua ke tabung reaksi yang bersih dan kering dengan hati-hati biar tidak banyak buih-buih..
12. Dengan hati-hati tambahkan 1 mL etanol dingin supaya batasnya jelas.
13. Diamkan selama 5 menit
14. DNA akan menggumpal di batasan buffer dan etanol (kelihatan seperti benang putih)
15. DNA diambil dengan batang kaca atau besi u etanolnya dibuang hingga lapisan putih dan ditaruh di tabung sentrifugasi kecil. Pakailah tisu utk mengisap sisa dari etanol. Pakai alat sentrifugasi pada kecepatan tinggi selama 2 menit– DNA akan dilihat sebagai endapan. Buanglah supernatant. Simpan di bawah 0° C

Epitel :

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.

PRAKTIKUM ISOLASI DNA DAN ELEKTROFORESIS AGAROSE

ISOLASI DNA DARI DARAH

Alat dan bahan yang digunakan :

Tabel 2. Alat dan bahan isolasi DNA sel-sel epitelial

darah (1cc)	larutan RNAase	anti-koagulan
isopropanol	larutan sel lisis	70% etanol
larutan nuklei lisis	larutan rehidrasi DNA	larutan “ <i>protein precipitation</i> ”
water bath	tabung mikrosentrifus	mikrosentrifus
vorteks	kertas absorben	pipet tetes

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 ke dalamnya.
2. Digoyangkan perlahan agar darah dan anti-koagulan bercampur dengan baik.
3. Ambil satu tabung Eppendorf steril lagi dan isikan dengan 900 μ L larutan sel lisis
4. Ambil 300 μ l darah dari tabung mikrosentrifus pertama dan masukkan ke dalam tabung kedua. Bolak-balikkan tabung 5-6 kali supaya cairannya bercampur 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 x g) selama 2 menit pada temperatur ruang.
7. Buang supernatant sebanyak mungkin tanpa mengganggu pellet putih yang tampak. Lebih kurang 10-20 μ 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 μ l larutan nuklei 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). Jika terlihat gumpalan, maka inkubasikan tabung pada 37 °C sampai gumpalan tersebut larut. Dinginkan pada temperatur ruangan.

10. Optional: Tambahkan larutan RNAase 1,5 μ l dan bolak-balikkan tabung 2-5 kali untuk mencampurnya. Inkubasikan pada 37°C selama 15 menit dan kemudian dinginkan pada temperatur ruangan.
11. Tambahkan larutan "*protein precipitation*" sebanyak 100 μ 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.
12. Sentrifugasi 13.500 rpm (1 3.000 - 16.000 x g) selama 3 menit, pada temperatur ruangan. Pellet protein yang berwarna coklat tua akan terlihat.
13. Pindahkan supernatannya kedalam tabung Eppendorf steril yang berisi 300 μ l isopropanol (temperatur ruangan).
14. Tabung dibalikkan perlahan-lahan supaya larutan bercampur dan akan terlihat massa seperti benang-benang putih (DNA-strands).
15. Sentrifugasi pada 13.500 rpm (1 3.000 - 16.000 x g) selama 1 menit pada temperatur ruangan. DNA akan terlihat sebagai pellet kecil yang putih.
16. Buang supernatant dan tambahkan 300 μ l 70% etanol (temperatur ruangan). Bolak-balikkan tabung perlahan beberapa kali untuk mencuci pellet DNA. Sentrifugasi lagi seperti pada langkah 15 diatas.
17. Dengan hati-hati aspirasikan etanol (menggunakan pipet). Jangan sampai pelletnya terbang! Letakkan tabung secara terbalik diatas kertas absorben dan keringkan di udara selama 10-15 menit.
18. Tambahkan 100 μ 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.
19. DNA disimpan pada temperatur 2-8°C atau untuk jangka panjang pada -20°C

Darah :

Supernatan seharusnya dibuang sebanyak mungkin dengan hati-hati, agar pelet atau endapan tidak ikut terbang, bila tidak banyak supernatan yang terbang, 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.

PRAKTIKUM 6
PRAKTIKUM ISOLASI PROTEIN DARI DARAH

Oleh:

Ayu Elvana (127008013)

Yulia Fitri Ghazali (127008007)

Hari/Tanggal praktikum : Kamis/ 8 November 2012

I. Tujuan :

Agar mahasiswa dapat :

- Mengerti teknik sentrifugasi untuk pemisahan bagian-bagian sel
- Mengerti teknik biokimia umum lain yang penting dalam proses isolasi protein

II. Cara Kerja :

Alat dan Bahan:

Tabel 3. Alat dan bahan praktikum isolasi protein dari darah

jarum steril	tabung steril utk darah	14 ml tabung sentrifuse klinik (3 buah)
sentrifus klinik	pipet otomatis	2 ml tabung mikrosentrifus (2 buah)
Mikrosentrifus	pipet tetes	1,5 ml tabung mikrosentrifus
Es	vorteks	larutan (NH ₄) ₂ SO ₄ yang jenuh (>13,2 g/100 ml)
PH meter	NACL	larutan 50% (NH ₄) ₂ SO ₄
tabung reaksi dan rak	Na ₂ PO ₄	tempat membuang cairan biologis
pipet Mohr	EDTA	etanol absolut, dingin
Tisu		Spidol

Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

Buffer Cuci: 100ml buffer yang berisi 150mM NaCl, 5mM Na₂PO₄, 0,1mM EDTA.

Tentukan pH =7,4. Simpan di kulkas atau di dalam es.

Buffer Hemolisis: 100ml buffer yang berisi 5mM Na₂PO₄, 0,1mM EDTA. Tentukan pH=8.

Simpan di kulkas atau di dalam es.

A. Sel-sel darah dipisahkan

1. Ambil 4-5 ml darah
2. Sentrifus darah tersebut selama 5 menit
3. Transfer plasma (bagian supernatant) ke tabung mikrosentrifuse (2 ml). tandai tabung dengan plasma dan simpan dilemari es.
4. Buang supernatant
5. Tambahkan 6 ml buffer cuci yang dingin ketabung sentrifus klinik. Tutup dan vortex pelan-pelan agar sel bercampur rata dengan buffer.
6. Sentrifuskan bahan diatas selama 5 menit.
7. Buang supernatannya,
8. ulangi langkah ke 5,-7 sekali lagi

Pengamatan/ Catatan

- Setelah sel darah terpisah (pecah) dan DNA keluar dari dalam sel (DNA terpisah)
- Pada pembuangan supernatant (tahap I) endapan tampak sedikit.
- Pada pengulangan pembuangan supernatant (tahap II), endapan sel-sel darah tampak lebih jelas (banyak yang menempel di tabung).
- Semakin banyak pengulangan pembuangan supernatant maka akan semakin banyaklah endapan yang akan didapatkan.

B. Isolasi Protein-protein dari sel-sel

1. Tambahkan 6 ml buffer hemolisis yang dingin
2. Tutup dan vortex kuat
3. Sentrifus selama 10 menit
4. Ambil 1 ml supernatant masukkan ke tabung reaksi mikrosentrifus 2 ml tandai (S). Simpan dikulkas.
5. Buang 5 ml supernatant
6. Tambahkan 7 ml buffer hemolisis, vortexs.
7. Sentrifus selama 10 menit
8. Buang supernatant. Ambil 2 ml larutan yang paling bawah(termasuk pengendapan). Masukkan ke tabung mikrosentrifus 2 ml, tandai (M).
9. Sentrifus selama 30 menit pada kecepatan 14.000 rpm

10. Buang supernatant, tambahkan 500 µl buffer hemolisis/cuci dan tutup tabung. Simpan di atas es/ di bagian atas kulkas.

Pengamatan/ Catatan :

- Setelah pembuangan supernatant dan setelah disentrifus selama 30 menit, pada tabung terlihat adanya endapan
- Semua Protein yang mengendap (pellet) terlihat berwarna putih susu.

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 dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi. (13.000 rpm)
4. Dengan hati-hati transfer 500 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% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (yang tak jenuh) dan campur baik dengan pipet tetes.
6. Pakai tabung mikrosentrifus yang lain 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 l buffer hemolisis dan simpan di bagian atas kulkas.

Pengamatan / Catatan :

- Tidak terbentuk endapan Gp dikarenakan kesalahan ketika pencampuran, karena salah pemakaian larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang jenuh. Yang dipakai larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang tak jenuh. Dan karena sampel darah yang diambil hanya 4 ml , maka tidak dapat dilakukan pengulangan cara kerja untuk point pembuatan GP. Sehingga tidak dapat dilanjutkan ke point 5, 6 dan 7.

Bagian D Pengendapan Protein Plasma dengan Etanol

1. Pada tabung mikrosentrifus 1,5ml tambahkan 250µl etanol absolut yang dingin. Tambahkan 500µl sampel plasma.

2. Tutup dan vorteks kuat sebentar. Biar diam selama 5 menit di atas es.
3. Pakai tabung mikrosentrifus, Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi.
4. Dengan hati-hati transfer supernatan ke tabung reaksi mikrosentrifus lain yang sudah ditandai (Es). Letakkan di atas 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, 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 l buffer hemolisis dan simpan di atas es/bagian atas kulkas.

Pengamatan /Catatan :

- Setelah pembuangan supernatant terbuang terlihat sedikit endapan yang tertinggal di dalam tabung.

Kesimpulan :

1. Semakin banyak pengulangan pembuangan supernatant maka akan semakin banyaklah endapan yang akan didapatkan.
2. Setiap perlakuan dalam praktikum ini, endapan yang di dapat haruslah disimpan di suhu dingin (dalam es)/lemari es.

PRAKTIKUM 7

PRAKTIKUM PCR ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS PAGE

(SDS Polyacrilamide Gel Elektroforesis)

Oleh:

Ayu Elvana (127008013)

Yulia Fitri Ghazali (127008007)

Hari/Tanggal praktikum : Kamis/ 8 November 2012

I. Tujuan:

Agar mahasiswa dapat :

- Mengerti dan memahami teknik PCR
- Mengerti prinsip dasar elektroforesis
- Melatih teknik elektroforesis agarose dengan sampel-sampel DNA yang diperoleh dari jaringan manusia.
- Menggunakan teknik SDS-PAGE untuk memisahkan protein-protein darah.

II. Bahan dan Cara Kerja :

Persiapan PCR Mixture dengan kappa untuk TNF β (LTa)

1st PCR

10x PCR Buffer	: 2,5 μ l
dNTPs 10 mM	: 0,5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	: 1 μ l
Primer LTa-HTB-1 (40 pmol)	: 0,25 μ l
HTB-3 (40 pmol)	: 0,25 μ l
Taq Polimerase	: 0,2 μ l
Dd H ₂ O	: 17,8 μ l
<u>Template DNA</u>	<u>: 2,5 μl</u>
Total	25 μ l

1. Siapkan 12 tabung PCR (steril), dipipetkan sebanyak 23 L Mix Solution masukan ke masing-masing tabung PCR
2. Tambahkan 2 μ L larutan DNA sampel, vortex sebentar
3. Jangan lupa mengikutsetakan control negative dalam setiap menjalankan PCR (control negative = tabung PCR hanya berisikan Mix Solution, tanpa penambahan larutan DNA sampel)
4. Tambahkan lagi sebanyak 50 μ L Mineral Oil (1 tetes)
5. Tabung ditutup rapat dan susun di dalam rak/blok alat Thermal Cycler
6. Atur program untuk menjalankan PCR (FTS = 320) → posisi tabung berurutan, control dimasukkan.

Alat dan bahan yang digunakan :

Tabel 4. Alat dan Bahan PCR Elektroforesis Agarose

7 sampel protein darah dari minggu yg lalu		Tris
sampel DNA sel epitelial	Protein standard SDS-PAGE	DTT
perwarna DNA (crystal violet dalam 20% gliserol)		
sarung tangan	1 N HCl	SDS
tempat buang cairan biologis	pipet otomatis	agar 2%
water bath	biru bromfenol	Na ₂ HPO ₄
Mikrosentifus	pipet tetes	gliserol
Akuades		EDTA
alat elektroforesis agarose		asam borik
tabung mikrosentrifus (1,5ml)	alat elektroforesis	larutan pewarna
pipet Mohr	power supply	larutan pencuci
Erlenmeyer flask	beaker	spidol
pH meter	Hamilton syringe	penggaris (mm)
etanol absolute, dingin	vorteks	Tisu
gel poliakrilamide – SDS 10%	β -merkaptotanol	Agarose
Isobutanol	kertas grafik semi-log	water bath

Larutan yang disiapkan :

1. **1X TBE** - setiap kelompok siapkan 500mL
5,4 g Tris, 2,75 g asam borik acid, 0,37 g EDTA dimasukkan ke dalam beaker 500 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.
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. Dipanaskan sampai mendidih dan larutan jernih. Dinginkan sampai $\sim 60^{\circ}$ dan tambahkan 12 μ L 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 – ELEKTROFORESIS GEL AGAROSE

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

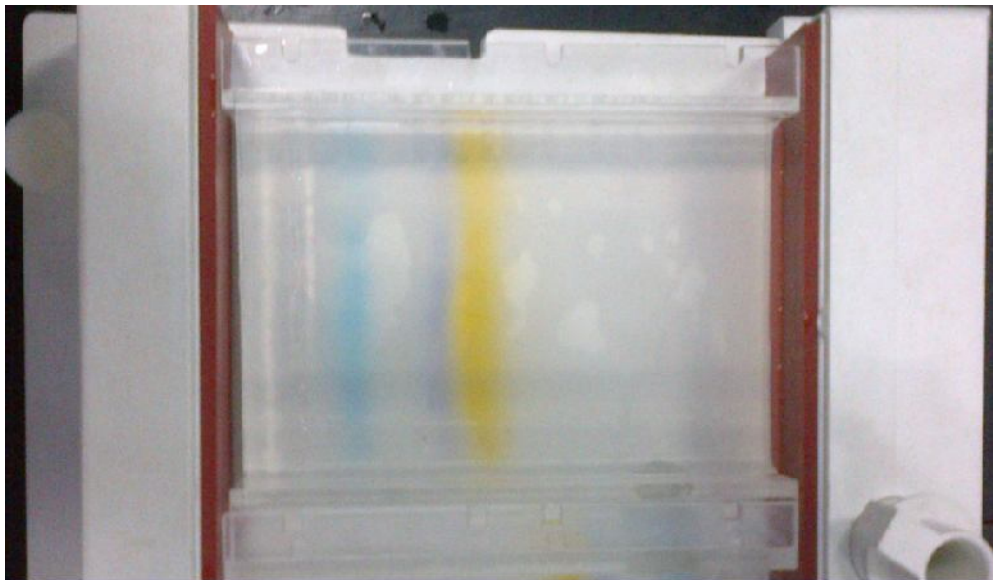
Cara kerja alat elektroforesis:

1. Bila 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 diisi dengan 3 casting gel.
3. Tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel-gel terbenam seluruhnya.
4. Untuk mewarnai DNA buah, tambahkan 100 μ l perwarna DNA (crystal violet dalam 20% gliserol) pada DNA yang disimpan dari minggu yang lalu di tabung mikrosentrifus
5. Gunakan mikropipet untuk menghisap 20 μ L sampel DNA buah dan secara hati-hati masukkan ke dalam “*well*”/sumur tertentu. Pada saat memasukkannya, pastikan ujung

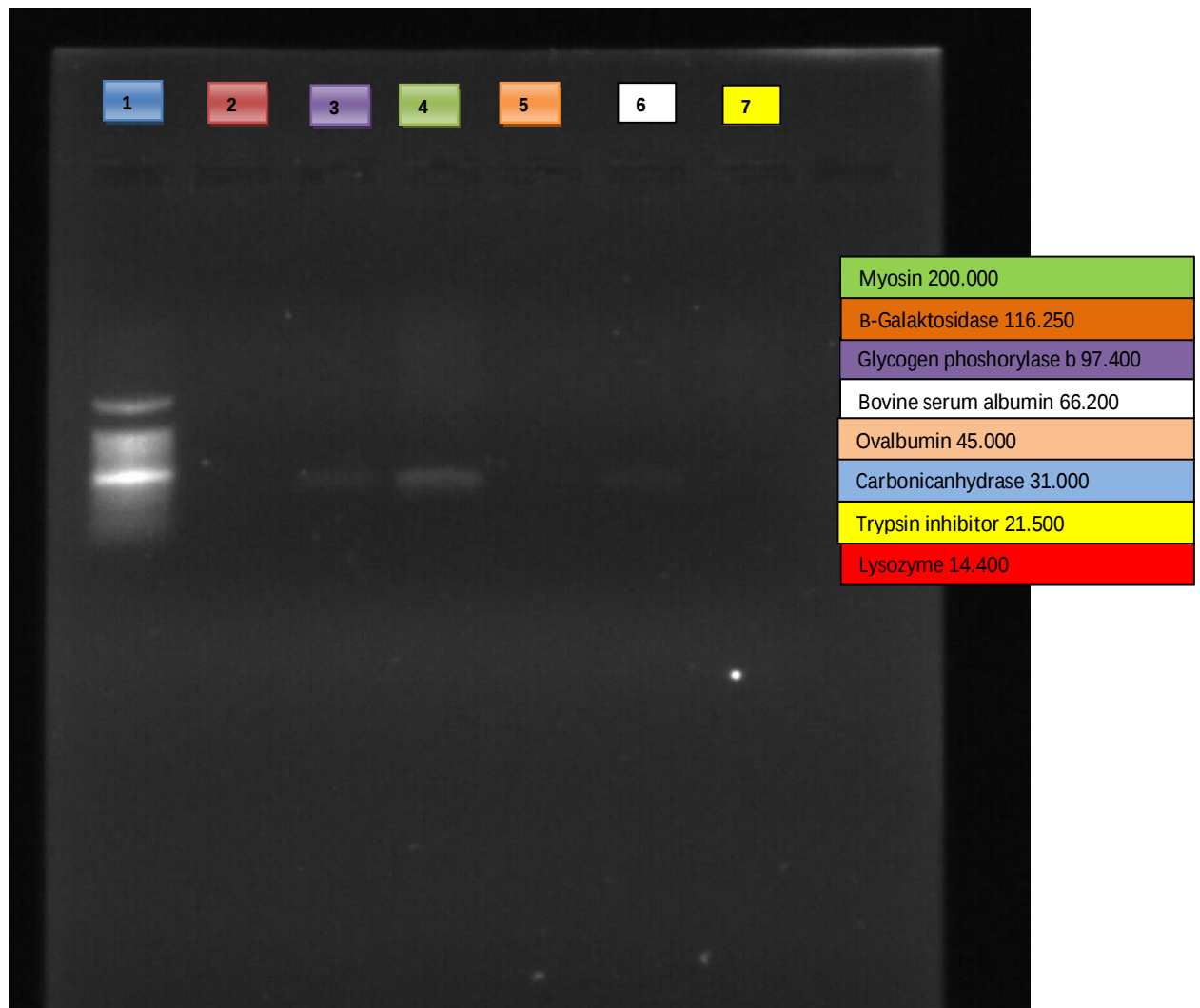
dari tip sudah sedikit masuk pada lubang well gel elektroforesis. Catat posisi dan urutan sampel grup Anda pada halaman hasil praktikum ini.

6. Untuk mewarnai DNA manusia, campur 10 μ l DNA dari sel epitelial dengan 10 μ l perwarna DNA di atas parafilm dan langsung masukan semuanya (20 μ l) ke sumur gel. Kemudian, dengan parafilm baru lagi, campur 10 μ l DNA dari sel darah dengan 10 μ l perwarna DNA di atas parafilm dan langsung masukan semuanya (20 μ l) ke sumur gel. Catat posisi dan urutan sampel grup Anda pada halaman hasil praktikum ini.
7. Nyalakan mesin elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 90V. Sampel-sampelnya akan mulai bergerak ke katode, (DNA bermuatan negatif)
8. Matikan mesin elektroforesis secara sempurna.
9. Dengan sangat hati-hati keluarkan gel dan letakan pada tray yang disediakan. Gambarkan pada halaman hasil praktikum ini hasil yang diperoleh.
1Pindahkan ke alat “UV reader” supaya hasilnya lebih jelas lagi. Foto hasilnya.

HASIL ELEKTROFORESIS GEL AGAROSE :



Gambar 1. Hasil elektroforesis



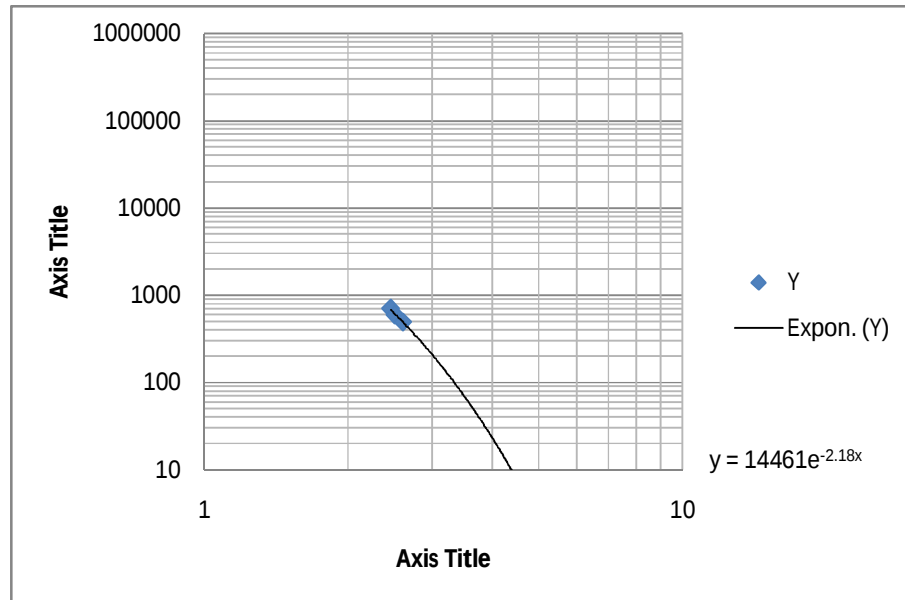
Gambar 2. Hasil Isolasi DNA Epitel dan Darah Dengan Teknik PCR

Keterangan Gambar :

- 1 : standart
- 2 : darah kelompok juwita/rika
- 3 : epitel juwita
- 4 : epitel rika
- 5 : darah kelompok ayu/yulia
- 6 : epitel ayu
- 7 : epitel yulia

Tabel 5.. Marker Hasil pengamatan elektroforesis isolasi DNA

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



Gambar 3. Grafik Hasil pengamatan elektroforesis isolasi DNA

Tabel 6. Pita hasil PCR DNA Sampel

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

PEMBAHASAN :

Isolasi DNA pada dasarnya dapat dilakukan dengan merusak dinding dan membrane sel dan juga membrane inti. Fragmen DNA yg tidak sempurna, karena fragmen-fragmennya terurai.

KESIMPULAN :

SARAN :

1. Pada praktikum isolasi DNA darah, Supernatan seharusnya banyak dibuang dan dilakukan dengan hati-hati agar pelet atau endapan tidak ikut terbangun juga ketika

menuangkan supernatan keluar. Jika supernatan tidak banyak yang terbuang, maka ketika proses selanjutnya, volume larutan dalam tabung akan semakin banyak sehingga berbeda dengan batas volume larutan pada kelompok lain.

2. Seharusnya waktu melakukan elektroforesis diperlukan tambahan waktu agar bisa memanjang dengan baik dan mendapatkan hasil yang baik pula, sehingga dapat dihitung secara tepat.

SDS PAGE

Persiapan Gel

1. Bersihkan plat kaca dengan akuades dan etanol (70%)
2. Susun lempeng kaca serta *spacer*. Celah antara lempeng dengan *spacer* ditutup dengan agar 2% secukupnya.
3. Untuk menyiapkan gel poliakrilimide-SDS 10%, ikutilah tabel yang di bawah. Siapkan gel pemisah dulu.

Tabel 8. Bahan PCR Elektroforesis SDS-PAGE

Bahan	Gel Pemisah <i>Perlu ~20ml/Gel</i> (Tabung Reaksi 1)	Gel Penumpuk <i>Perlu ~5ml/Gel</i> (Tabung Reaksi 2)
akrilamide 30%/bisakrilamide 0,8%	10 mL	3,05 mL
1,5M Tris-HCl pH=8,6	6,8 mL	---
1,5M Tris-HCl pH=6,8	---	2,0mL
akuades	10,2mL	4,65mL
SDS 10%	300µL	85µL
amonium persulfat 10%	200µL	75µL
TEMED	20µL	7,5µL

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 elektroforesis 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. Pakailah sarung tangan dan teknik keselamatan di laboratorium yang benar.
2. Tentukan waterbath pada temperatur 100C.
3. Siapkan 7 tabung mikrosentrifus 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.
4. ****Kerjakan langkah ini di fumehood****. Tambah 450 μ L buffer sampel dan 25 μ L - merkaptotanol ke setiap tabung mikrosentrifus yang sudah ditandai. Transfer 50 μ L sampel protein plasma, M, S, GS, GP, ES, EP ke tabung mikrosentrifus masing-masing.
5. Tutup dan vorteks pelan-pelan supaya endapannya dicampur rata dengan buffer.
6. Masukkan semua tabung mikrosentrifus ke dalam waterbath yang mendidih. Biarkan 5 menit.
7. 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

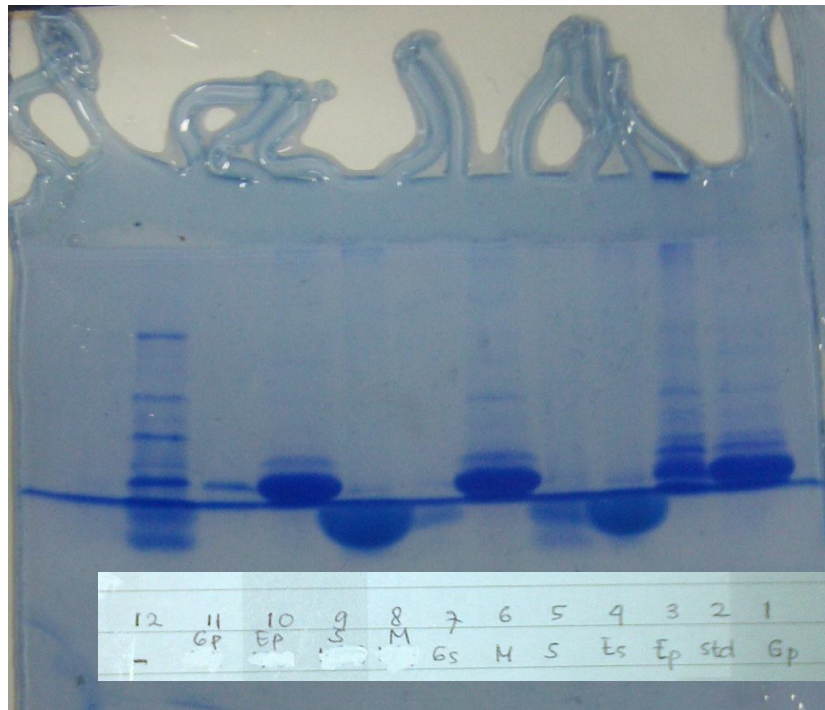
1. Masukkan 10 μ L sampel protein (yaitu plasma, M, 2S, GS2, GP, ES2, EP) ke dalam sumur masing-masing dengan pipet otomatis atau dengan Hamilton syringe. Pada sumur yang terakhir masukkan 10 μ L protein petanda. Catat nomor sumur dan isinya.

2. Hubungkan alat elektroforesis dengan *power supply*. Jalankan elektroforesis selama 4 jam atau lebih (voltage yang ditentukan pada alat elektroforesis tergantung waktu yang ada untuk menjalankannya).

Bagian D: Pewarnaan Gel

1. Setelah waktu 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 ELEKTROFORESIS SDS-PAGE:



Gambar 4. Gel Hasil Isolasi Protein SDS-PAGE

Tabel hasil elektroforesis SDS page

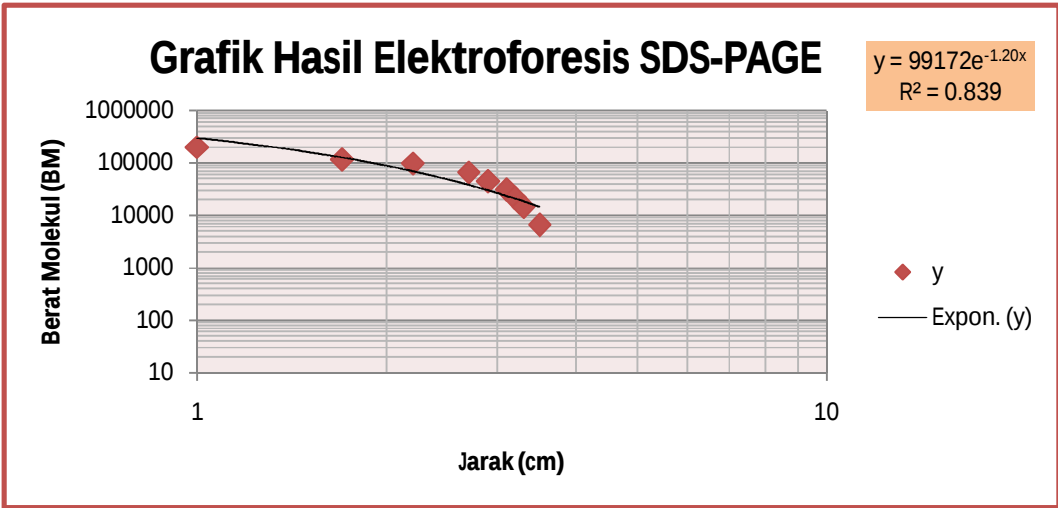
Tabel 9. Hasil elektroforesis SDS page

Jarak (cm)	Berat molekul(kd)	Protein
1	200.000	Myosin
1,7	116.250	Betagalaktosidase
2,2	97.400	Phosphosylase
2,7	66.200	Albumin
2,9	45.000	Ovalalbumin
3,1	31.000	Carbonic anhydrase
3,2	21.500	Trypsin inhibitor
3,3	14.400	Lysozyme
3,5	6.500	aprotinin

Tabel 10. Hasil Perhitungan Rumus Berat Molekul Sampel

No. Sampel	Protein Membran (M)		Protein Sitoplasmik (S)		Protein Supernatan Etanol (Es)		Protein Pengendapan Garam Tinggi (Gp)	
	x	y	x	y	x	Y	x	Y
band 1	3,3	1890,527	3,2	2131,563	1,8	11437,023	2,3	6276,771
band 2	3,5	1487,141			2,3	6276,771	2,5	4937,483
band 3					2,5	4937,483	2,8	3444,765
band 4					2,7	3883,961		

Grafik elektroforesis SDS page



Gambar 5. Grafik elektroforesis SDS page

Keterangan :

- sampel protein membrane (M) terlihat 2 band ;
 - Band 1 jaraknya 3,3 cm dan berat molekul 1890,527 kd
 - band ke 2 dengan jarak 3,5 cm dan berat molekul 1487,141 kd
- sampel protein sitoplasmik (S) terlihat 1 band
 - jarak 3,2 cm dan berat molekul 2131,563 kd
- sampel protein supernatant etanol(Es) terlihat 4 band ;
 - Band 1 berjarak 1,8 cm dan berat molekul 11437,023 kd
 - band 2 berjarak 2,3 cm dan berat molekul 6276,771 kda
 - band 3 berjarak 2,5 cm dengan berat molekul 4937,483 kd
 - band 4 berjarak 2,7 cm dengan berat molekul 3883,961 kd. jarak 3,2 cm dan berat molekul dengan rumus didapatkan berat molekul 2131,563 kd
- dari hasil perhitungan berat molekul yang diperoleh tidak ada satu sampel pun yang sesuai dengan marker. Hal ini disebabkan karena grafik marker tidak linear dan nilai $R=0,8$ jadi hasil kurang akurat

PEMBAHASAN :

Mesin PCR yang digunakan dalam praktikum isolasi Protein SDS-PAGE adalah yang 0,5 ml. Ketika pembuatan PCR Mixture dengan Kappa untuk TNF β (LT α) untuk kelengkapan bahan penting dalam praktikum ini taq polymerase harus ditambahkan terakhir, sebab taq polymerase ini sangat mudah rusak.

Mix solution PCR :

Buffer + dNTPs + MgCl₂ + taq

SDS PAGE pada umumnya hanya digunakan untuk menseparasi semua protein sesuai dengan berat molekulnya, sehingga pada pita tersebut, semakin besar berat molekulnya maka akan mendapatkan hasil pita yang lebih panjang dan baik. Pada gambar ditemukan perbedaan panjang dari pita-pita protein, hal tersebut dikarenakan perbedaan dari berat molekul yang terkandung di dalam bahan yang diisikan pada setiap lubang pada alat tersebut. Pada gambar ada yang memiliki pita lebih pendek dibandingkan yang lainnya, karena jumlah proteinnya disana lebih sedikit atau tidak ada sama sekali, sehingga pitanya tidak tervisualisasi sampai ke bawah. Dari gambar gen yang terpotong tidak dapat terlihat jelas, hal ini dikarenakan banyaknya gen yang masih terikat pada gel.

KESIMPULAN :

- Dari hasil isolasi DNA dari epitel mulut dan darah terdapat perbedaan, pada sampel darah lebih banyak didapatkan DNANYa dibandingkan dari sampel epitel mulut. Hal ini terjadi karena pada saat pengambilan epitel mulut terdapat kesalahan praktikan dalam melakukan teknik pengambilan sampel tersebut, misalnya pada saat kumur-kumur waktu yang dilakukan oleh praktikan kurang lama serta tehnik menggosok bagian dalam pada pipi yang kurang benar sehingga hasil yang didapatkan sangat sedikit memperlihatkan DNANYa
- Pada saat melakukan proses elektroforesis PCR waktu yang tersedia tidak cukup banyak, sehingga terjadi percepatan waktu dalam melakukan elektroforesis tersebut, sehingga didapat hasil yang kurang baik, sebab pemanjangan DNA nya belum sempurna.
- Semakin besar berat molekulnya maka akan mendapatkan hasil pita yang lebih panjang dan baik
- Pita yang lebih pendek dibandingkan yang lainnya, disebabkan oleh jumlah proteinnya lebih sedikit atau tidak ada sama sekali.
- Tidak ada satu sampel pun yang sesuai dengan marker. Hal ini disebabkan karena grafik marker tidak linear jadi hasil kurang akurat

SARAN :

- Diperlukan tambahan waktu dalam melakukan proses elektroforesis agar hasil yang diperoleh menjadi lebih baik
- Praktikan harus lebih teliti dan hati-hati dalam menyuntikkan sampel ke dalam sumur-sumur pada agar supaya bahan-bahan tersebut tidak merembes keluar dari sumur.
- Praktikan harus memahami prosedur kerja dengan baik, agar pada saat melakukan praktikum tidak terjadi kesalahan-kesalahan yang menyebabkan kerusakan pada hasil yang diperoleh.