

Laporan 5. PRAKTIKUM ISOLASI DNA DAN TEKNIK PCR

Hari / tanggal : Kamis, 01 november 2012
Pukul : 08.00 wib
Praktikan : Sari Hutagaol, Yulia Fitri (A), Nunung Sri Mulyani

I. Tujuan

1. Mampu memahami metode umum mengisolasi DNA
2. Mampu melakukan isolasi DNA sel-sel epitelial mulut

II. 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*)**

III. Cara kerja ISOLASI DNA DARI SEL-SEL

Alat dan bahan yang digunakan

minuman isotonik	beaker	pH meter	akuades
batang kayu	waterbath	tabung reaksi	mikrosentrifus
timbangan digital	EDTA	spidol	SDS
stok proteinase K (100g/ml)	NaCl	vortex	etanol dingin
tabung mikrosentrifus	Tris	1 N HCl	pipet Mohr

1. **Persiapan minuman isotonik (0,9% NaCl, 5% sukrosa dalam aqua botol).**
Siapkan 100mL minuman isotonik
2. **Persiapan buffer Tris-EDTA (10mM Tris, 1 mM EDTA, 1% SDS;pH =8).**
S 50mL buffer Tris EDTA yang cukup untuk semua kebutuhan praktikum ini. 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.
3. **Persiapan buffer 2,5M NaCl; 50mL.**
Siapkan 50mL 2,5 M NaCl yang cukup untuk semua kebutuhan praktikum ini. Berat molekul NaCl = _____g/mol

IV. 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. Inilah merupakan larutan sel.

B. Lisis sel-sel protein

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

C. Pengendapan DNA

1. Tambahkan 100µL NaCl, 2,5M. Aduk dengan cara mebolak-balikkan tabungnya.
2. Transfer semua ke tabung reaksi yang bersih dan kering dengan hati-hati biar tidak banyak buih-buih.
3. Dengan hati-hati tambahkan 1 mL etanol dingin supaya batasnya jelas.
4. Diamkan selama 5 menit
5. DNA akan menggumpal di batasan buffer dan etanol (kelihatan seperti benang putih)
6. DNA diambil dengan batang kaca atau besi dan ditaruh di tabung sentrifugasi kecil. Pakailah tisu utk mengisap sisa dari etanol.
7. Simpan di bawah 0C

Hasil pengamatan :

Untaian benang putih hanya terlihat sedikit, hal ini mungkin disebabkan karena:

1. Kurang lama pada saat penggosokan pipi bagian dalam
2. Teknik menggosok pipi bagian dalam tidak benar

Kesimpulan:

1. Jumlah sel yang dipanen sangat berhubungan dengan tehnik dan lamanya proses penggosokan pipi bagian dalam. Bila terlalu cepat (kurang dari 30 detik), sel-sel yang dihasilkan sedikit. sehingga dibutuhkan penggosokan yang berulang.
2. Sebelum panen, mulut harus dipastikan dalam keadaan bersih untuk mencegah kontaminan DNA lain yang dapat bersumber dari sisa makanan.

V. ISOLASI DNA DARI DARAH

Alat dan bahan yang digunakan

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

Cara 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 ke dalamnya.
2. Digoyangkan perlahan agar darah dan anti-koagulan bercampur dengan baik.
3. Ambil satu tabung Eppendorf steril lagi dan isikan dengan 900µL larutan sel lisis
4. Ambil 300 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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 DNAny 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

Hasil pengamatan :

Pellet putih hanya terlihat sedikit, hal ini mungkin disebabkan karena:

1. Pada pengambilan supernatan ada pellet yang terbang
2. Pada saat membalikkan tabung di atas kertas absorben ada pellet yang terbang.

Kesimpulan:

1. Pada isolasi DNA dari darah, prosedur lebih panjang dibanding isolasi DNA dari epitel.
2. Pada proses pengambilan supernatant,hati-hati jangan sampai pelletnya terbang.

Saran:

Praktikan harus lebih teliti dan terampil dalam melakukan setiap prosedur praktikum.

Laporan 6. PRAKTIUM ISOLASI PROTEIN DARI DARAH

Hari/tanggal : Kamis, 8 November 2012

Pukul : 08.00 wib

Praktikan : Sari Hutagaol, Yulia Fitri (A), Nunung Sri Mulyani

Tujuan:

1. Mampu melakukan teknik sentrifugasi untuk pemisahan bagian-bagian sel
2. Mampu memahami teknik biokimia umum lain yang penting dalam proses isolasi protein

Pendahuluan:

Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Teknik sentrifugasi tersebut dilakukan didalam sebuah mesin yang bernama mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi, contohnya 2500 rpm (rotation per minute) atau 3000 rpm.

Isolasi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu

1. Melisis sel dengan cell lysis solution
2. Melisis inti dengan nuclei lysis solution juga menguraikan atau merusakkan molekul RNA dengan RNase solution
3. Mempresipitasi protein dengan protein precipitation solution
4. Mengkonsentrasikan DNA genom yang diperoleh.

Isolasi DNA merupakan cara ataupun metode yang digunakan untuk memisahkan DNA dari sel, baik dari inti, mitokondria, maupun kloroplas. Kit Wizard DNA Purification (Promega) terdiri dari : a. Cell lysis solution adalah senyawa larutan konsentrasi tinggi (hipertonis). Bila bercampur dengan sel maka akan terjadi proses osmosis yang mengakibatkan sel akan mengalami lisis. b. Nuclei lysis solution adalah senyawa yang mengandung detergen digunakan untuk melisis barrier sel secara kimia sebagai pengganti senyawa kimia yang mampu merusak dinding dan membran sel. Karena pada detergen mengandung sodium dodecil sulfat (SDS) yang dapat menyebabkan hilangnya molekul lipid pada membran sel sehingga struktur membrane akan rusak dan melisis isi sel.

Cara Kerja:

Alat dan Bahan:

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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang jenuh ($>13,2\text{g}/100\text{ml}$)
pH meter	NaCl	larutan 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
tabung reaksi dan rak	Na_2PO_4	tempat membuang cairan biologis

pipet Mohr
tissue

EDTA
Spidol

etanol absolut, dingin

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 l plasma dibutuhkan untuk prosedurnya pengendapan dengan garam tinggi, 500 l plasma untuk pengendapan dengan etanol dan 500 l 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. Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan bagian sel dengan sitoplasma. Selanjutnya supernatan yang terbentuk dibuang
4. Transfer semua plasma (yaitu bagian supernatan) 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. Hemolisis berfungsi untuk merusak lipid pada membran sel sehingga leukosit hancur.
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. Masukkan ke dalam alat mikrosentrifus supaya *hinge* ke tengah alat. Putar selama 30 menit pada kecepatan 14.000 rpm.
10. 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 l buffer hemolisis/cuci dan tutup tabung. Simpan di atas es/ di bagian atas kulkas.

Hasil pengamatan :

1. Saat mengambil sampel protein sitoplasmik (S),hati-hati jangan sampai sel-sel darah juga ikut terambil.
2. Demikian juga saat mengambil sampel protein membrane (M),lakukan dengan hati-hati.
3. Terlihat endapan yang halus berwarna putih

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 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, agar seimbang (misalnya dari grup meja lain) dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi.

Hasil pengamatan :

1. Pada proses penyiapan sampel Gp dan GS, perhatikan teknik pengambilan supernatant, jangan sampai endapan ikut terambil.
2. Pastikan tabung mikrosentrifus dalam keadaan dingin, kerjakan dengan cepat dan segera masukan kedalam es.

Bagian D Pengendapan Protein Plasma dengan Etanol

1. Pada tabung mikrosentrifus 1,5ml tambahkan 250µl etanol absolut yang dingin. Tambahkan 500µl 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 l buffer hemolisis dan simpan di atas es/bagian atas kulkas

Hasil pengamatan ;

1. Pada proses penyiapan sampel ES dan EP, perhatikan teknik pengambilan supernatant, jangan sampai endapan ikut terambil.
2. Pastikan tabung mikrosentrifus dalam keadaan dingin, kerjakan dengan cepat dan segera masukan kedalam es.
3. Hasil DNA yang didapat dalam praktikum menunjukkan struktur berupa gumpalan putih yang sedikit dan sangat halus walaupun tidak terlihat jelas struktur untai ganda.

Hasil pengamatan :

1. Saat menyiapkan sampel ini, pastikan setiap langkah dilakukan dengan hati-hati agar sampel bebas dari kontaminan.
2. Saat supernatant dipindahkan ketabungmikrosentrifus yang lain,hati-hati jangan sampai sel-sel dibagian bawah tabung ikut terambil.
3. Perhatikan agar seluruh supernatant sudah terambil untuk mendapatkan sel-sel darah yang murni.
4. Supernatan yang dihasilkan pada proses sentrifugasi darah adalah sel darah merah yang telah lisis. Pelet yang dihasilkan dari proses sentrifugasi darah adalah sel darah putih yang mengendap.

LAPORAN PRAKTIKUM 7. A PCR, ELEKTROFORESIS AGAROSE

Hari /Tanggal : Kamis, 22 November 2012
Pukul : 08.00 wib – 17.00 wib
Praktikan : Sari Hutagaol, Yulia Fitri (A), Nunung Sri Mulyani

I. Tujuan:

1. Mampu memahami langkah-langkah teknik PCR dengan benar
2. Mampu memahami prinsip dasar elektroforesis
3. Mampu melakukan teknik elektroforesis agarose dengan sampel-sampel DNA yang diperoleh dari jaringan manusia (darah dan epitel).
4. Mampu melakukan teknik SDS-PAGE untuk memisahkan protein-protein darah.

II. Pendahuluan

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu teknik atau metode perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Dengan teknik ini, DNA dapat dihasilkan dalam jumlah besar dengan waktu relatif . Proses PCR biasanya berulang sekitar 20-30 siklus. Setiap siklus terdiri dari 3 tahap, yakni: denaturasi, penempelan (*annealing*), dan pemanjangan (elongasi).

- a. Denaturasi merupakan proses pemutusan ikatan hidrogen DNA sehingga menjadi berkas DNA tunggal. Proses ini berlangsung pada suhu 94–96 °C. Biasanya pada tahap awal PCR (pra-PCR denaturasi) tahap ini dilakukan 5 menit untuk memastikan semua berkas DNA terpisah. Pemisahan ini menyebabkan DNA tidak stabil dan siap menjadi templat bagi primer. Durasi proses denaturasi adalah 1–2 menit.
- b. Penempelan (*annealing*) merupakan proses penempelan primer pada bagian DNA templat yang komplementer urutan basanya dan berlangsung pada suhu 50–65 °C..tahap ini berlangsung 1–2 menit.
- c. Pemanjangan (elongasi) Dengan Taq-polimerase, proses ini biasanya dilakukan pada suhu 72 °C, sesuai dengan suhu optimum enzim Taq

Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik. Secara umum, elektroforesis digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA. Prinsip dasar teknik elektroforesis gel adalah pemisahan DNA, RNA, atau protein menggunakan medan listrik. Molekul-molekul tersebut dipisahkan berdasarkan laju perpindahannya oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekul zat yang akan dipisahkan

Untuk memisahkan protein, gel yang digunakan adalah gel poliakrilamida, dibuat dengan konsentrasi berbeda-beda antara akrilamida dan zat yang memungkinkan pertautan silang (*cross-linked*), menghasilkan jaringan poliakrilamida dengan ukuran rongga berbeda-beda. Untuk memisahkan asam nukleat, gel yang digunakan adalah agarosa

Dalam proses elektroforesis, sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur pada gel yang ditempatkan di dalam larutan penyangga, dan dialiri listrik. Molekul-molekul sampel tersebut akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai dengan muatannya. Asam nukleat akan bergerak adalah menuju elektroda positif, disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya. Untuk menjaga agar laju perpindahan asam nukleat benar-benar hanya berdasarkan ukuran (yaitu panjangnya), zat seperti natrium hidroksida atau formamida digunakan untuk menjaga agar asam nukleat berbentuk lurus. Sementara itu, protein didenaturasi dengan SDS untuk membuat protein tersebut berbentuk lurus dan bermuatan negatif.

Setelah proses elektroforesis selesai, dilakukan proses pewarnaan (staining) agar molekul sampel yang telah terpisah dapat dilihat. Etidium bromide atau pewarna *Coomassie blue* dapat digunakan untuk proses ini. Pita-pita (*band*) pada lajur (*lane*) yang berbeda pada gel akan tampak setelah proses pewarnaan, dengan satu lajur merupakan arah pergerakan sampel dari sumur gel. Pita-pita yang berjarak sama memiliki molekul-molekul yang berukuran sama. Marka atau penanda (*marker*) yang merupakan campuran molekul dengan ukuran berbeda-beda dapat digunakan untuk menentukan ukuran molekul dalam pita sampel dengan melakukan elektroforesis terhadap marka tersebut. Pita-pita pada lajur marka tersebut dapat dibandingkan dengan pita sampel untuk menentukan ukurannya. Jarak pita dari sumur gel berbanding terbalik terhadap logaritma ukuran molekul.

III. 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 MgCl₂ 1,5 mM
5. Aquabidest steril
6. Taq Polimerase : 0,125 L
7. Sample DNA
8. Mineral oil (untuk menghindari penguapan)
9. Thermo Cycler PCR
10. UV reader

IV. Cara kerja PCR

1. Siapkan larutan **Mix Solution** untuk 16 sampel + 1 kontrol yaitu :

a. Forward Primer	4 µL	4,25 µL
b. Reverse Primer	4 µL	4,25 µL
c. dNTP's	8 µL	8,5 µL
d. 10 x Buffer	4 µL	4,25 µL
e. Taq Polimerase	2 µL	2,125µL
f. Aquabidest	348 µL	367,62 µL
Jumlah	384 µL	391 µL
2. Saat bekerja letakkan larutan pada wadah yang berisi es. (Primer, dNTP's, Buffer, Taq dan bila perlu larutan DNA disimpan pada temperature -20oC)
3. Gunakan tabung dan tips yang telah disterilasi (untuk mencegah kontaminasi sampel)
4. Siapkan 16 tabung PCR (steril), dipipetkan sebanyak 23 L Mix Solution masukan ke masing-masing tabung PCR
5. Tambahkan 2 L larutan DNA sampel, vortex
6. Sertakan control negative dalam setiap menjalankan PCR (control negative = tabung PCR hanya berisikan Mix Solution, tanpa penambahan larutan DNA sampel)
7. Untuk mencegah penguapan pada PCR yang lama, tambahkan 50 L Mineral Oil
8. Tabung ditutup rapat dan susun di dalam rak/blok alat Thermal Cycler
9. Atur program untuk menjalankan PCR

V. Cara kerja elektroforisis agarose

A. Alat dan bahan yang digunakan

7 sampel protein darah	Tris	Agar 2%
Sampel DNA sel epithelial	Protein standar SDS-Page	Na ₂ HPO ₄
Pewarna DNA(crystal violet dalam 20% gliserol)	DTT	Gliserol
Tempat cairan biologis	Pipet otomatis	Water bath

Mikrosentifus	Biru bromfenol	Pipet tetes
Aquades	EDTA	Alat elektroforesis agarose
Asam boric	Tabung mikrosentrifus (1,5ml)	Pipet Mohr
Power supply	Larutan pencuci	Erlenmeyer flask
Beaker	Spidol	PH meter
Hamilton syringe	Penggaris (mm)	Etanol absolute)
Vortex	Tissue	Gel poliakrilamide-SDS 100%
Merkaptoetanol	Agarose	isobutanol
Kertas grafik semi-log		

B. Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

1. 1X TBE - siapkan 1000mL yaitu :

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

2. 0.8% Agarose sebanyak 40ml/casting tray

Karena yang disiapkan 40 ml maka dipakai perhitungan $0,8/100 \times 40 = 0,32$ mg

- Gunakan sarung tangan, 0,32g agarose dimasukkan ke dalam beaker/flask 250 ml yang bersih.
- Tambahkan 40 ml larutan 1X TBE buffer solution.. Tutup flask/beaker dengan foil aluminium untuk mengurangi penguapan dan sisakan celah sedikit.
- Aduk dengan gerakan flask.
- Dipanaskan sampai mendidih dan larutan jernih.
- Dinginkan sampai $\sim 60^\circ$ dan tambahkan 12 μ L larutan ethidium bromide/casting tray.

3. Siapkan Larutan Dapar Sampel (50mM Tris-HCl pH 6,8; 10%(v/v) gliserol; 1% (b/v) SDS; 0,01% (b/v) biru bromfenol).

4. Buat 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. Siapkan 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. 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. 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.
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. Gambarkan pada halaman hasil praktikum ini hasil yang diperoleh.
8. Pindahkan ke alat “UV reader” supaya hasilnya lebih jelas lagi. Foto hasilnya.

LAPORAN PRAKTIKUM 7. B SDS-PAGE (*SDS PolyAcrilamide Gel Elektroforesis*)

Hari /Tanggal : Rabu, 12 Desember 2012
Pukul : 08.00 wib – 17.00 wib
Praktikan : Sari Hutagaol, Yulia Fitri (A), Nunung Sri Mulyani

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. Gunakan sarung tangan dan siapkan gel poliakrilimide-SDS 10%,
4. Janganlah menambah ammonium persulfat serta TEMED sebelum siap menuangkan campuran akrilamide ke dalam plat kaca yang sudah disiapkan oleh karena bahan tersebut berfungsi sebagai katalyst polimerisasi akrilamide

Bahan	gel pemisah(20 mL/gel) (tabung reaksi 1)	gel penumpuk (5mL/gel) (tabung reaksi 2)
akrilamide	1,88mL	36 mL
30%/bisakrilamide 0,8%		
1,5M Tris-HCl pH=8,6	1,28mL	---
1,5M Tris-HCl pH=6,8	---	240 mL
akuades	1,93mL	700 mL
SDS 10%	56µL	10 µL
amonium persulfat 10%	38µL	7,2 µL
TEMED	3,8µL	1 µL

Bagian C: Loading and running the gel

1. Masukkan 10µL 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 10µL 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).

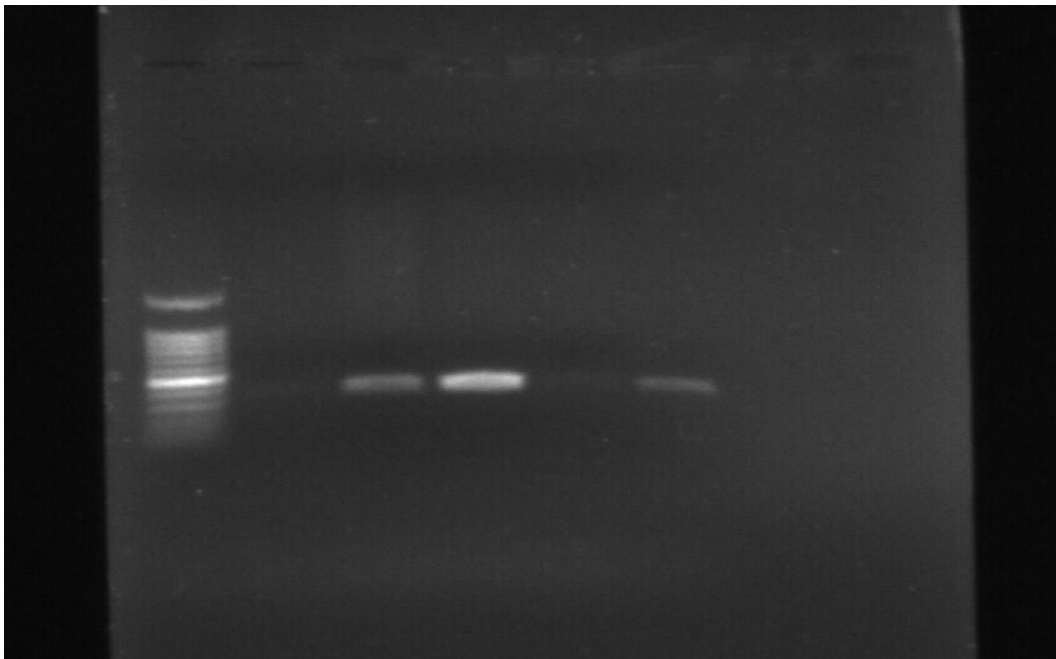
Bagian D: Pewarnaan Gel

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.

VI. Pembahasan

A. Hasil foto elektroforesis agarose



Gambar 1. Hasil foto elektroforesis agarose

Berdasarkan foto diatas dapat dilihat bahwa

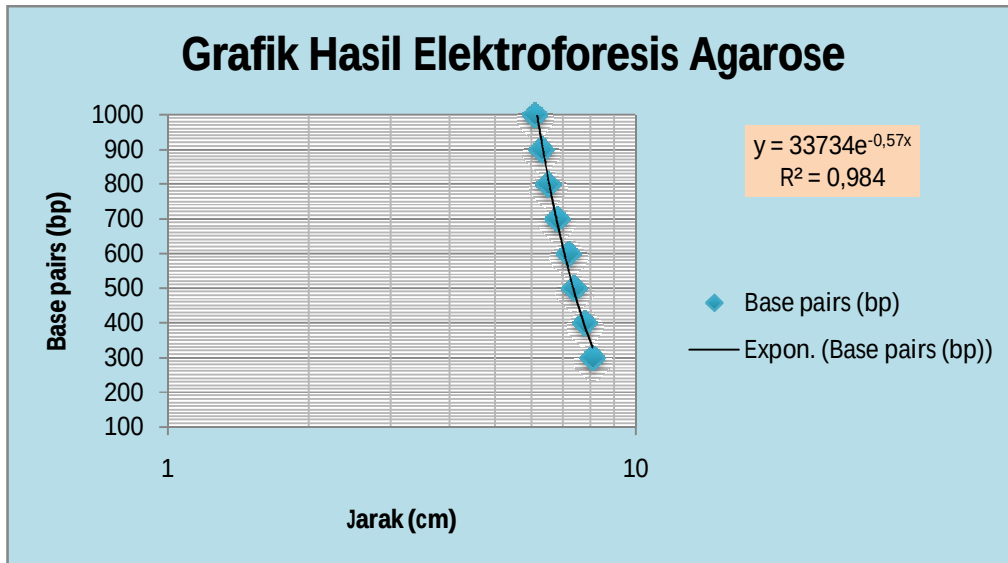
1. Band marker tidak terpisah dengan batas yang jelas sehingga ada kesulitan dalam melakukan pengukuran untuk membuat grafik marker.
2. Tidak semua sampel terlihat bandnya
3. Kemungkinan penyebab dari kedua hal tersebut diatas dikarenakan kesalahan saat memasukan sampe kedalam sumur (*well*) antara lain injeksi sampel terlalu dalam melewati dasar sumur atau penusukan tidak tepat didalam sumur sehingga sampel atau marker jumlah tidak cukup didalam yang berakibat tidak terbaca saat dilakukan elektroforesis.

B. Tabel hasil elektroforesis agarose

Tabel 1. Hasil Elektroforesis Agarose

Jarak (cm)	Base Pair (bp)
6,1	1000
6,3	900
6,5	800
6,8	700
7,2	600
7,4	500
7,8	400
8,1	300
7,7	Sampel epitel
7,6	Sampel darah

C. Grafik hasil elektroforesis



Gambar 1. Grafik hasil elektroforesis agarose

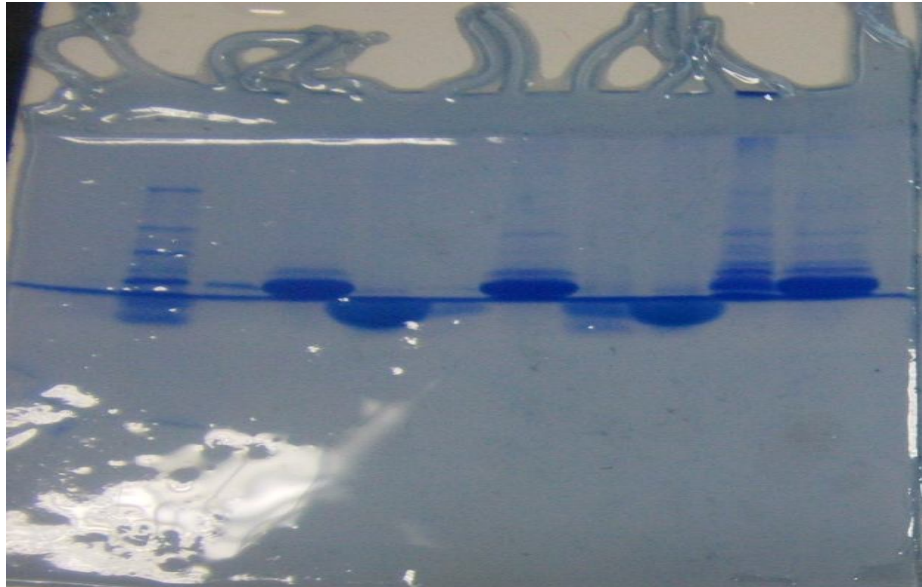
D. Berdasarkan grafik diatas didapatkan rumus $y = 33734e^{-0,57x}$ $R^2 = 0,984$:

- Pada sampel epitel didapat jarak 7,7 cm dan dengan rumus diatas didapatkan hasil 418,74 bp
- Pada sampel darah didapat jarak 7,6 cm dan dengan rumus diatas didapatkan hasil 443,31 bp

Sedangkan primer yang digunakan yaitu MMIF(macrophage migration inhibitor factor) memiliki 360 bp sehingga dari hasil perhitungan diatas dapat disimpulkan hasil sampel diatas tidak benar karena tidak sama dengan marker.

E. Hasil elektroforesis SDS-PAGE

1. Hasil foto elektroforesis SDS –PAGE



Gambar 3. Foto hasil elektroforesis SDS-Page

Keterangan :

1. Berdasarkan foto diatas dapat dilihat bahwa terlihat garis yang memisahkan gel penisah dan gel penumpuk yang seharusnya tidak ada. Hal ini mungkin disebabkan pada saat memasukkan gel penumpuk, gel pemisah sudah terlalu keras sehingga tidak menyatu dengan gel penumpuk.
2. Pemotongan gel agarosa juga terlihat tidak merata, hal ini juga akan berpengaruh pada hasil yang diperoleh, akibatnya daerah elusi dengan dapar tidak seimbang, sehingga pergeseran pita tidak optimum
3. Terlihat belum semua marker dan sampel terpisah dan tidak mempunyai batas yang jelas (bertumpuk). Hal ini dapat disebabkan oleh waktu elektroforesis kurang lama dan juga tegangan saat elektroforesis tidak tepat sehingga migrasi molekul tidak sesuai dengan yang seharusnya dan membuat pembacaan tidak akurat. Proses pencucian yang kurang lama juga mungkin dapat menyebabkan hal ini.

2. Tabel hasil elektroforesis SDS page

Tabel 2. Hasil elektroforesis SDS page

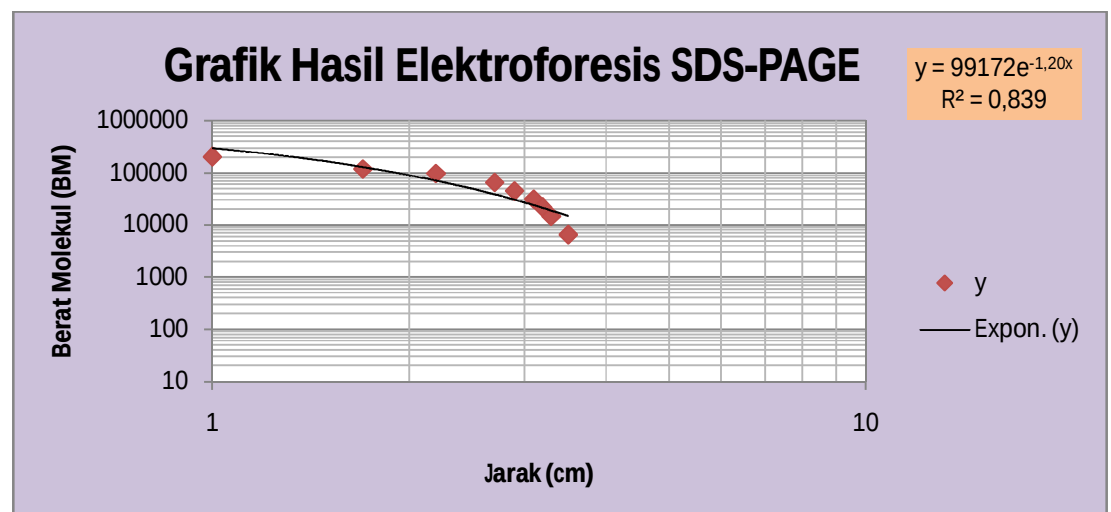
Jarak (cm)	Berat molekul(kd)	Protein
1	200.000	Myosin
1,7	116.250	Betagalaktosidase

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 3. 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		

1. Grafik elektroforesis SDS page



Gambar 4. Grafik elektroforesis SDS page

Keterangan :

- Pada sampel protein membrane (M) terlihat 2 band. Band 1 dengan jarak 3,3 cm dan dengan rumus didapatkan berat molekul 1890,527 kd, band ke 2 dengan jarak 3,5 cm dan dengan rumus didapatkan berat molekul 1487,141 kd.

- b. Pada sampel protein sitoplasmik (S) terlihat 1 band dengan jarak 3,2 cm dan dengan rumus didapatkan berat molekul 2131,563 kd,
- c. Pada 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 dan 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,
- d. Berdasarkan hasil perhitungan, berat molekul yang didapatkan tidak ada yang sesuai dengan marker. Hal ini dikarenakan grafik marker tidak linear dan nilai $R=0,8$ sehingga keakuratan hasil dari perhitungan tidak dapat dipercaya.

VII. Kesimpulan

1. Terdapat perbedaan hasil isolasi DNA dari epitel mulut dan darah dimana DNA lebih banyak didapatkan pada sampel darah. Hal ini dimungkinkan karena pada proses pengambilan epitel mulut terdapat kesalahan teknik, diantaranya pada waktu kumur-kumur kurang lama dan tehnik menggosok bagian dalam pipi yang tidak benar dan kurang lama
2. Teknik elektroforesis agarose dan SDS –Page membutuhkan kehati-hatian, ketelitian dan pengetahuan yang cukup dalam melakukan urutan langkah kegiatannya sehingga dapat menghasilkan foto dengan kualitas baik.
3. Pada bagian A (*elektroforesis agarose*, saat persiapan gel, pastikan gel pemisah benar-benar sudah terbentuk agar-agar dan tidak terlalu keras sebelum disisipkan sisir plastic dimasukan gel pemisah sehingga dapat membentuk sumur sampel yang tepat.
4. Pada bagian C (*loading and running the gel*), perlu diperhatikan tehnik memasukan sampel ke masing-masing sumur, lakukan dengan teliti dan hati-hati agar jarum tepat berada didalam sumur dan tidak menembus ke dasar sumur.
5. Untuk mendapatkan hasil foto yang baik (dengan gambar band yang jelas) dibutuhkan waktu yang lama dalam proses perendaman larutan pencuci (4 s.d 1 x 24 jam).

VIII. Saran

1. Disarankan sebelum praktikum dimulai, alat PCR sudah diuji coba terlebih dahulu untuk memastikan alat PCR beserta perangkatnya siap digunakan dan untuk efektifitas waktu.
2. Diberikan penjelasan yang lengkap tentang langkah-langkah praktikum sehingga praktikan mudah mengerti, memahami dan melakukan prosedur praktikum.
3. Diharapkan kepada praktikan untuk lebih teliti dalam melakukan setiap prosedur dan melakukan tindakan dengan menjaga sterilitas sampel untuk meminimalisasikan terjadinya kontaminasi pada sampel.