

LAPORAN PRAKTIKUM

ISOLASI DNA MANUSIA (EPITELIAL MULUT DAN DARAH) DAN TEKNIK PCR DAN ISOLASI PROTEIN DARI DRAH, ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS-PAGE

Oleh : Nita Andriani Lubis dan Fery Prawira Gurusinga

Waktu Praktikum : 08.00 s/d 17.00

Kamis, 7,14,21,28 Nopember 2013

Kelompok Siang

I. TUJUAN

1. Mengerti metode umum mengisolasi DNA dengan teknik sentrifugasi
2. Mampu mengisolasi DNA dari sel – sel epitelial mulut dan darah manusia
3. Mengerti dan mampu melakukan teknik PCR dengan sampel DNA manusia
4. Mampu mengisolasi protein darah manusia
5. Mengerti dan mampu melakukan Elektroforesis Agarose
6. Mengerti dan mampu melakukan Elektroforesis SDS-PAGE

II. PRINSIP

Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA.

Prinsip elektroforesis agarose adalah teknik pemisahan asam nukleat/ protein berdasarkan perbedaan medan listrik, molekul dan partikel bermuatan akan bergerak ke arah elektrode yang memiliki muatan berlawanan di bawah pengaruh medan listrik.

Prinsip elektroforesis SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Reaction) teknik pemisahan protein darah dengan migrasi komponen acrilamida berdasarkan perbedaan berat molekul.

III. PENDAHULUAN

DNA dapat diisolasi dari setiap bagian makhluk hidup yang mengandung nukleus/ inti sel, dengan langkah-langkah berikut :

- o Pengumpulan/panen sel-sel (*cell harvest*)
- o Pemecahan sel-sel (*cell lysis*)
- o Pencernaan protein agar asam nukleat dilepaskan (*protein digestion*)
- o Pengendapanan DNA (*DNA precipitation*)

Setiap sel manusia mengandung banyak macam protein seperti protein sitoplasmik, dan protein membran. Protein ini dapat diisolasi dengan teknik sentrifugasi dan teknik biokimia umum yang lain untuk dianalisis.

Dasar siklus PCR yang utama merupakan siklus berulang 30-35 siklus meliputi:

Hot start	95°C	7 menit	1 cycle
Denaturasi	95°C	15 detik	35 cycle
Anneling	52°C	45 detik	
Extensi	72°C	30 detik	
Extensi (post run)	22°C	7 detik	1 cycle
Hold	16°C	7 menit	1 cycle

Agarosa merupakan polisakarida turunan yang didapat dari alga merah. Gel agarose dapat digunakan untuk memisahkan DNA berukuran lebih dari 100 bp, sedangkan untuk memisahkan DNA dengan ukuran lebih pendek dapat digunakan gel poliakrilamid. Gel agarose merupakan fase diam dalam pemisahan fragmen DNA dan muatan listrik sebagai fase geraknya.

Metode PAGE yang umumnya digunakan untuk analisa campuran protein secara kualitatif adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis*). Metode ini sering digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein disamping untuk memonitor pemurnian protein. Penggunaan poliakrilamida mempunyai keunggulan dibandingkan dengan gel lainnya, karena tidak bereaksi dengan sampel dan tidak membentuk matriks dengan sampel, sehingga tidak menghambat pergerakan sampel yang memungkinkan pemisahan protein secara sempurna. Selain itu, gel poliakrilamida ini mempunyai daya pemisahan yang cukup tinggi. Penggunaan SDS berfungsi untuk mendenaturasi protein karena SDS bersifat sebagai deterjen yang mengakibatkan ikatan dalam protein terputus membentuk protein yang dapat terelusi dalam gel begitu juga mercaptoetanol.

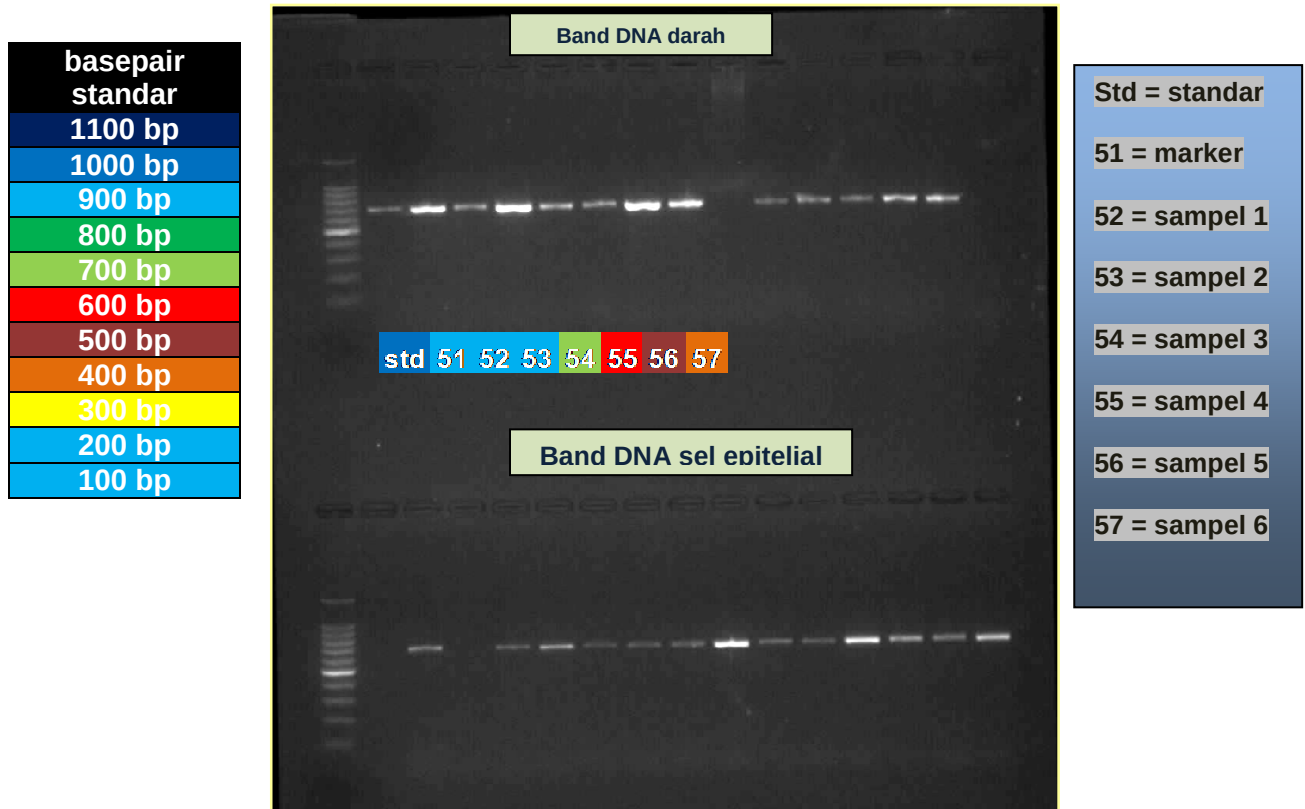
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

Isolasi DNA,Teknik PCR, dan Elektroforesis Agarose

Hasil isolasi DNA sampel darah dan sel epitelial mukosa manusia dilanjutkan dengan teknik PCR untuk proses replikasi dan dielektroforesis agarose dengan hasil seperti pada gambar 1.

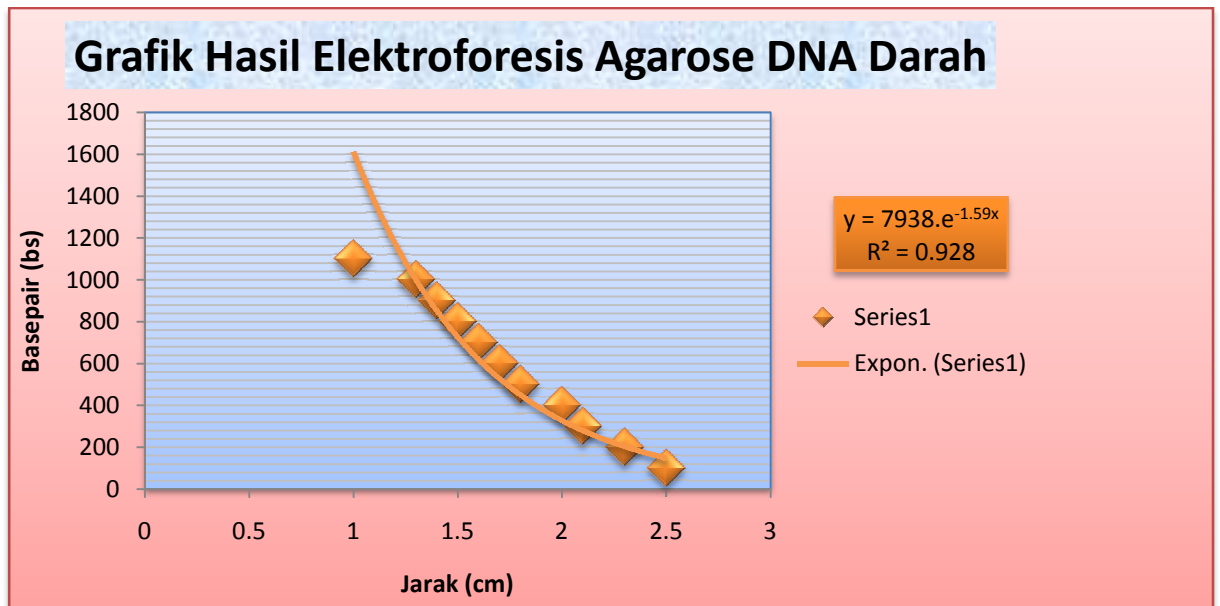
Gambar 1. Hasil elektroforesis agarose DNA darah dan sel epitelial manusia



Tabel 1. Hasil elektroforesis agarose sel 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

Jarak terendah band DNA darah 1,0 cm dengan basepairs 1100 dan sebaliknya jarak terjauh band DNA darah 2,5 cm pada basepairs 100. Hubungan jarak band dan basepairs sampel DNA darah dapat dilihat pada grafik dibawah ini.

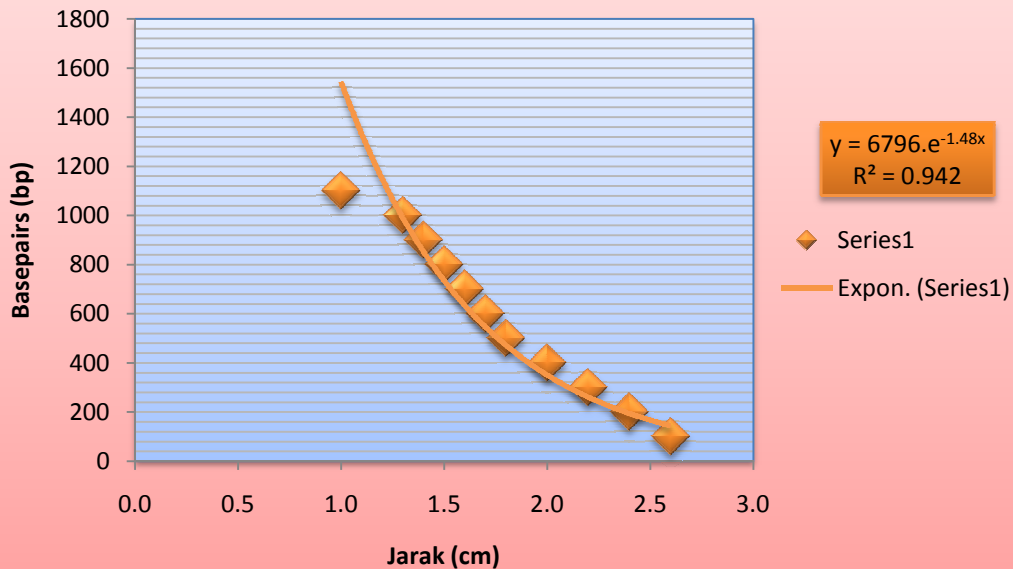


Tabel 2. Hasil elektroforesis agarose sel epitelial

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

Jarak terendah band DNA sel epitelial 1,0 cm dengan basepairs 1100 dan sebaliknya jarak terjauh band DNA sel epitelial 2,6 cm pada basepairs 100. Hubungan jarak band dan basepairs sampel DNA darah dapat dilihat pada grafik dibawah ini.

Grafik Hasil Elektroforesis Agarose Sel Epitel



Tabel 3. Hasil elektroforesis agarose sampel sel darah dan sel epitelial

Band	Jarak (cm)	Basepairs (bp)
Darah feri	1,6	700
Darah nita	*	*
Epitelial feri	1,6	700
Epitelial nita	1,6	700

*Band DNA tidak tampak

Sampel DNA darah dan sampel DNA sel epithelial memiliki jarak band yang sama yaitu 1,6 dengan kisaran basepairs pada 700, sedangkan pada sampel darah nita tidak dijumpai band DNA.

Isolasi Protein Darah dan Elektroforesis SDS-PAGE

Sampel darah dari : Nita

☐ laki-laki ☐ perempuan

Tanggal Praktikum : 14 Nopember 2013
Jumlah darah yang diambil : 5 ml

Nama anggota grup saya : Fery
Waktu yang diambil : 08.48 WIB

Tabel 4. Hasil pengamatan isolasi protein darah manusia

BAGIAN A	SUPERNATAN	PENGENDAPAN
Jumlah/ Warna	Jumlah : 7 ml Warna : kuning	Jumlah : 1 ml Warna : merah

Bagian A diperoleh supernatant 7 ml dan pengendapan 1 ml, hasil ini dilanjutkan untuk isolasi berikutnya dan diperoleh hasil seperti pada table dibawah ini.

Tabel 5. Hasil pengamatan isolasi protein darah manusia

BAGIAN B	SUPERNATAN	PENGENDAPAN
Jumlah/ Warna	Jumlah : 7 ml Warna : kuning	Jumlah : 1 ml Warna : merah

Bagian B diperoleh supernatant 7 ml berwarna kuning dan pengendapan 1 ml berwarna merah. Dari hasil isolasi ini diperoleh sampel protein sitoplasmik (S) dan protein membran (M).

Tabel 6. Hasil pengamatan isolasi protein darah manusia

BAGIAN C	SUPERNATAN	PENGENDAPAN
Jumlah/ Warna	Jumlah : 0,65 ml Warna : kuning	Jumlah : 0,1 ml Warna : kuning gelap

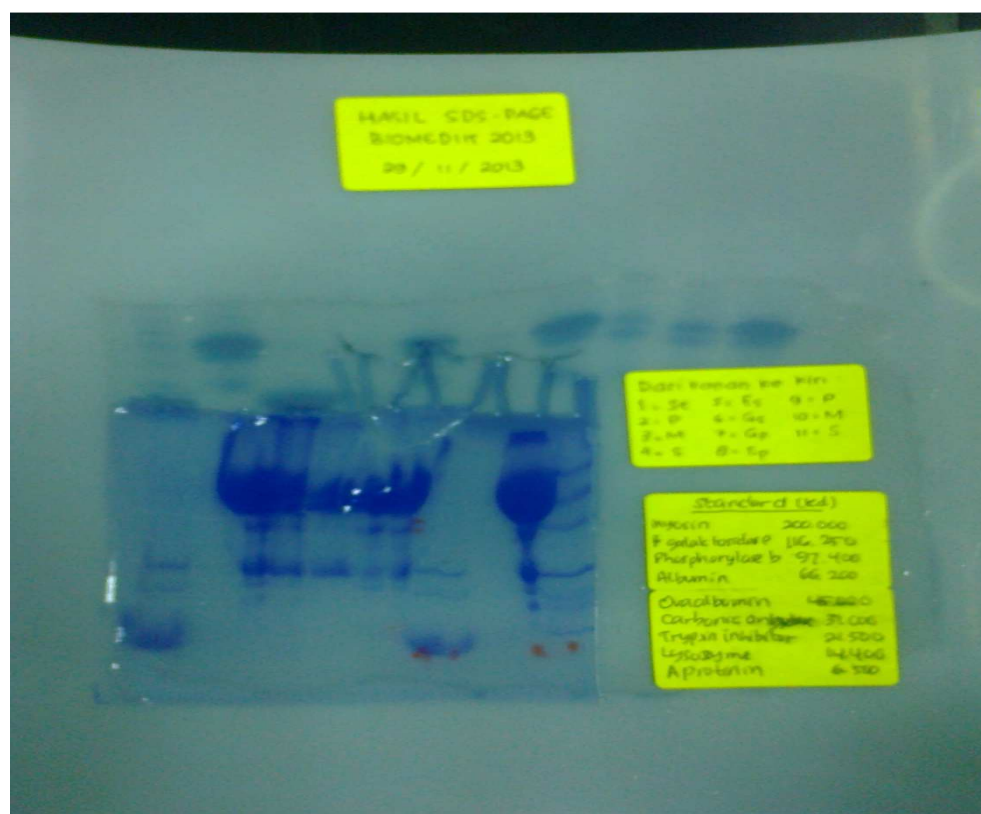
Bagian C diperoleh supernatant 0,65 ml berwarna kuning dan pengendapan 0,1 ml berwarna kuning gelap yang merupakan isolasi untuk sampel protein supernatant garam tinggi (G_s) dan sampel protein pengendapan garam tinggi (G_p).

Tabel 7. Hasil pengamatan isolasi protein darah manusia

BAGIAN D	SUPERNATAN	PENGENDAPAN
Jumlah/ Warna	Jumlah : 1,2 ml Warna : kuning	Jumlah : 0,25 ml Warna : putih

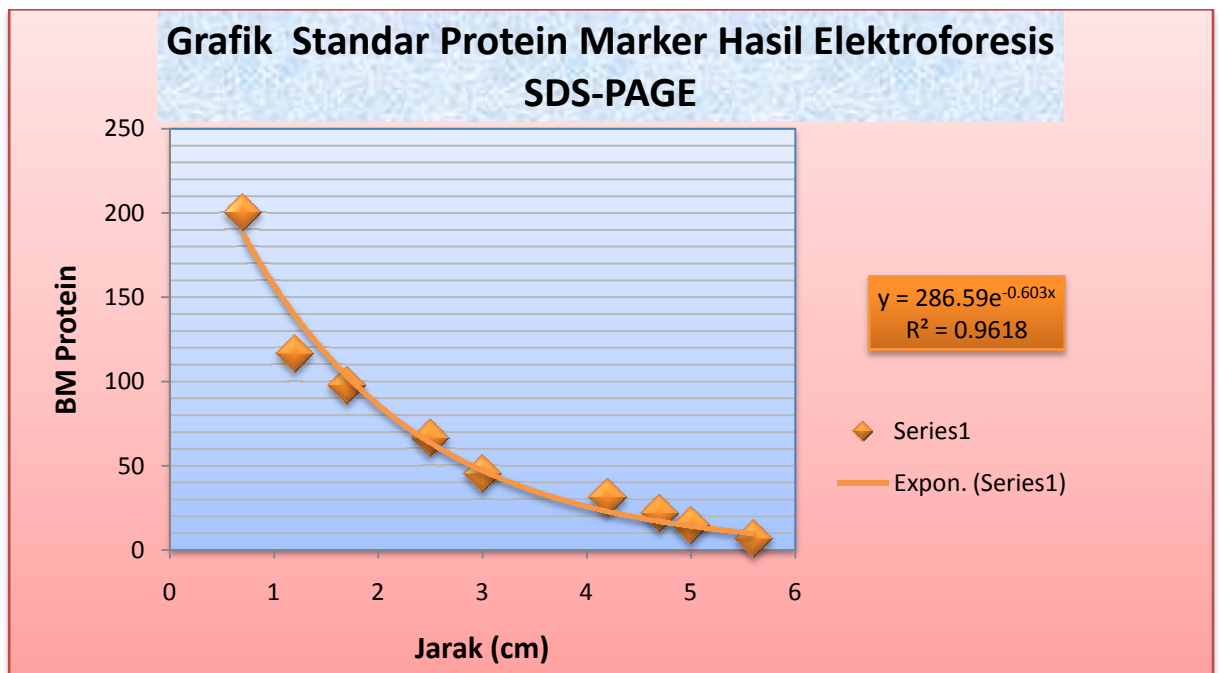
Bagian D diperoleh supernatant 1,2 ml berwarna kuning dan pengendapan 0,25 ml berwarna putih yang merupakan isolasi untuk sampel protein supernatant etanol (E_s) dan sampel protein pengendapan etanol (E_p).

Gambar 2. Hasil elektroforesis SDS-PAGE protein darah manusia



Tabel 8. Jarak band dan berat molekul protein standar Elektroforesis SDS-PAGE darah manusia

Jenis Protein	Jarak (cm) Band	BM Protein (kD)
Myosin	0,7	200.000
β -Galaktosidase	1,2	116.250
Glycogen phosphorilase 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



Jarak band protein standar terdekat memiliki berat molekul tertinggi dan sebaliknya jarak band yang terjauh memiliki berat molekul terendah.

Tabel 9. Hasil Elektroforesis SDS-PAGE protein darah manusia

Sampel	Band 9	Band 8	Band 7	Band 6	Band 5	Band 4	Band 3	Band 2	Band 1
Plasma	0,7 36663,89 Myosin	-	-	2,5 130942,49 albumin	3,0 157130,99 ovaalbumin	4,2 219983,39 Carbonic anhydrase	4,7 246171,89 Trypsin inhibitor	5,0 261884,99 Lysozyme	-
Protein (S) Sitoplasmik	0,3 15713.09 Myosin	-	-	2,2 115229,39 albumin	-	4,1 214745,69 Carbonic anhydrase	4,8 251409,59 Trypsin inhibitor	-	6,1 319499,68 Aprotinin
Protein (M) Membran	-	-	-	2,6 136180,19 albumin	3,1 162368,69 ovaalbumin	4,5 235696,49 Carbonic anhydrase	4,7 246171,89 Trypsin inhibitor	5,0 261884,99 Lysozyme	6,2 324737,38 Aprotinin
Protein supernatan pengendapan larutan garam (Gs)	-	-	-	-	3,2 167606.39 ovaalbumin	4,2 219983.39 Carbonic anhydrase	4,7 246171,89 Trypsin inhibitor	-	-
Protein endapan pengendapan larutan garam (Gp)	-	-	-	2,3 120467,09 albumin	-	4,4 230458.79 Carbonic anhydrase	-	-	-
Protein supernatant pengendapan larutan etanol (Es)	-	-	-	2,5 130942,49 albumin	3,1 162368,69 ovaalbumin	4,3 225221,09 Carbonic anhydrase	4,6 240934,19 Trypsin inhibitor	-	-
Protein supernatant pengendapan larutan etanol (Ep)	-	-	-	2,7 141417,89 albumin	-	4,6 240934,19 Carbonic anhydrase	-	-	-

Dari tabel diatas jenis protein carbonic anhydrase dijumpai pada semua sampel protein, sedangkan bovine serum albumin, ovaalbumin dan soybean trypsin inhibitor hampir dijumpai disemua jenis sampel protein. Glycogen yang di elektroforesis SDS-PAGE.

4.2. Pembahasan

Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Dalam isolasi DNA ini digunakan bahan-bahan berikut :

- Tris berfungsi untuk mendenaturasi protein.
- EDTA berfungsi sebagai penghancur sel dengan cara mengikat ion magnesium yang diperlukan oleh sel untuk menjaga keutuhan selubung sel secara keseluruhan.
- SDS berperan dalam melisiskan membran sel juga dapat berperan dalam mengurangi aktivitas enzim nuklease yang merupakan enzim pendegradasi DNA
- NaCl berfungsi sebagai bahan penetral pada gula fosfat DNA.
- proteinase K untuk melisiskan membran pada sel darah dan mendegradasi protein globular maupun rantai polipeptida dalam komponen sel
- larutan sel lisis untuk pelisisan sel
- nuclei lisis untuk pelisisan nucleus/inti sel sehingga DNA bias diperoleh
- enzim RNase berfungsi melisiskan RNA dari ekstrak DNA
- isopropanol dingin bertujuan agar DNA tersebut mengendap/mengumpul sekaligus memisahkannya dari garam-garam mineral sisa.
- Etanol 70% berperan dalam pemurnian DNA, garam-garam yang terlibat dalam proses ekstraksi bersifat kurang larut dalam isopropanol sehingga dapat terpresipitasi bersama DNA, oleh sebab itu dibutuhkan presipitasi kembali dengan etanol setelah presipitasi dengan isopropanol untuk menghilangkan residu garam.

Setelah DNA dari sampel darah dan sel epitelial mukosa diperoleh dari hasil isolasi, dilanjutkan dengan teknik PCR. Tahap ini merupakan proses replikasi DNA dengan enzim taq polymerase dan hasil replikasi DNA dielektroforesis agarose.

Dari hasil elektroforesis DNA agarose dapat dilihat migrasi elektroforesis DNA melalui gel agarosa dipengaruhi oleh faktor ukuran dan konformasi

molekul DNA, konsentrasi agarosa, arus listrik dan temperatur. Ethidium Bromide sebagai pewarna fluoresensi digunakan untuk alat identifikasi dan mengukur semi-kualitatif fragmen DNA yang terseparasi dalam gel. Ethidium Bromide ini akan terikat diantara dua untai ganda DNA, sehingga band/pita DNA dalam gel agarosa akan berpendar, karena pewarna ini mengandung zat fluoresence. Ethidium Bromide dapat diberikan pada setiap sampel yang akan dimasukkan ke sumuran gel atau dicampurkan ke gel agarosa sebelum gel dicetak dalam cetakan gel. Intensitas fluoresence dapat diukur dengan menggunakan DNA marker standar, sehingga dapat diperkirakan kuantitas DNAny.

Pada band urutan ke-9 hasil elektroforesis agarose sel darah tidak tampak jelas, hal ini mungkin disebabkan DNA yang diperoleh hanya sepotong-sepotong saat melakukan isolasi. Saat isolasi mungkin saja terjadi kontaminasi, seperti kita ketahui kulit tangan banyak mengandung nuklease sehingga apabila terkontaminasi enzim ini dapat memotong untai DNA yang diisolasi. Sehingga ketika kita elektroforesis band yang tampak seperti pada gambar 1.

Band urutan ke-13 hasil elektroforesis agarose sel darah tidak tampak adanya band, ini disebabkan tidak adanya DNA dalam sampel yang diisolasi.

Sedangkan pada band urutan ke-1 dan 3 hasil elektroforesis agarose sel-sel epitelial juga tampak adanya band, ini disebabkan kesalahan dalam pemindahan sampel DNA ke sumur elektroforesis agarose, sehingga tidak ditemukan DNA.

Dari grafik diatas diperoleh persamaan pada DNA darah $y = 7938.e^{-1.59x}$ dan DNA sel epitelial $y = 6796.e^{-1.48x}$. Dari kedua persamaan ini dapat dihitung jumlah basepairs sampel DNA yang dielektroforesis agarose.

Dari hasil perhitungan jumlah basepairs DNA darah sampel darah dan DNA sel epitelial kelompok 3 grup siang yaitu pada band nomor 12 dan 13 berjumlah 700 bp. Hal ini sesuai dengan letak band pada posisi marker ke-7 (700 bp).

SDS-PAGE merupakan metode elektroforesis yang menggunakan kombinasi polyacrilamida dan SDS. Dalam praktikum ini migrasi protein dengan elektroforesis dilakukan pada tegangan 70 volt dan lama pemisahan kurang lebih 4 jam agar didapatkan molekul protein yang berbeda dapat terpisah dengan baik. Penanda migrasi ditentukan dengan pewarna coomassie brilliant blue.

Pada praktikum ini digunakan 9 protein standar yang telah diketahui berat molekulnya, yaitu Myosin, β -Galaktosidase, Glycogen phosphorilase b, Bovine serum albumin, Ovaalbumin, Carbonic anhydrase, Soybean trypsin inhibitor, Lysozyme, dan Aprotinin dengan berat molekul secara urut seperti pada tabel 4.

Dari elektroforesis SDS-PAGE diperoleh persamaan $y = 286.59e^{-0.603x}$, sehingga dapat ditentukan berat molekul (BM) protein berdasarkan persamaan tersebut seperti pada tabel 9. Dari data dapat dilihat protein standar carbonic anhydrase dijumpai pada semua sampel protein yang dielektroforesis. Sampel protein membran dan protein plasma paling banyak ditemukan jenis protein standar.

V. Kesimpulan dan Saran

5.1. Kesimpulan

1. Band DNA darah dan sel epitelial manusia hasil elektroforesis agarose berada pada kisaran 700 bp dengan persamaan $y = 7938.e^{-1.59x}$ untuk DNA darah dan $y = 6796.e^{-1.48x}$ untuk DNA sel epitelial.
2. Jarak band elektroforesis agarose dan SDS-PAGE yang diperoleh dipengaruhi oleh konsentrasi medium (agarose dan polyacrilamida), voltage dan waktu elektroforesis yang digunakan.
3. Berat molekul protein sampel elektroforesis SDS-PAGE dihitung berdasarkan persamaan $y = 286.59e^{-0.603x}$.
4. Hasil elektroforesis SDS-PAGE semua sampel protein mengandung jenis protein standar carbonic anhydrase.
5. Protein sitoplasmik dan protein membran memiliki lebih banyak jenis protein dibandingkan sampel protein yang lain.

5.2. Saran

1. Disarankan kepada praktikan saat melakukan praktikum menggunakan standar keselamatan laboratorium seperti *handscoon*, masker, dan baju lab untuk menghindari zat yang bersifat karsinogenik.
2. Diharapkan praktikan memiliki ketelitian dan kemampuan penggunaan alat yang tinggi sehingga hasil yang diperoleh sesuai dan menghindari pecah nya alat yang digunakan.
3. Disarankan penambahan alat dan bahan sehingga masing-masing praktikan dapat melakukan percobaan secara mandiri.