

LAPORAN PRAKTIKUM

ISOLASI DNA, TEKNIK PCR, DAN ELEKTROFORESIS AGAROSE

Nama : T.M. Reza Syahputra

Irma Yanti

Dinno Rilando

Tgl Praktikum : Kamis, 2 Juni 2016

Tujuan Praktikum :

1. Mengerti metode umum mengisolasi DNA.
2. Mengisolasi DNA dari sel-sel epitelial mulut dan darah.
3. Mengerti dan mempraktekkan teknik PCR dengan sampel DNA manusia.
4. Latihan pembuatan dan interpretasi grafik.
5. Mengerti prinsip dasar elektroforesis.
6. Melatih teknik elektroforesis agarose dengan sampel-sampel DNA yang diperoleh dari epitel dan darah manusia.

Pendahuluan:

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

DNA dapat di isolasi dari jaringan apapun yang mempunyai sel inti. Langkah-langkah yang harus diikuti dengan jaringan apapun adalah :

Pengumpulan / panen sel-sel (*cell harvest*)

Pemecahan sel-sel (*cell lysis*)

Pencernaan protein agar asam nukleat dilepaskan (*protein digestion*)

Pengendapan DNA (*DNA precipitation*)

Protein-protein atau asam nukleat dapat dipisahkan satu dari yang lain atas dasar perbedaan muatan listrik. Elektroforesis agarose dapat digunakan untuk memisahkan asam nukleat (atau fragmennya) yang bermuatan negatif sesuai dengan arus listrik. Pada sistem elektroforesis tersebut, agarose merupakan bahan media yang berfungsi sebagai alas/ medium pemisah yang diletakkan antara anode dan katode alat elektroforesis. Medium pemisah tidak bergerak (fasa stationer). Molekul yang ingin dipisahkan diletakkan pada medium pemisah dan dibawa sesuai dengan muatan listrik oleh karena medium pemisah direndam dengan larutan ionik. Molekul yang besar bergerak lebih lambat dari pada molekul lebih kecil. Gel agarose disiapkan dengan ethidium bromide yang mengikat dengan DNA (*intercalater*) dan diperlihatkan warna oranye kalau disinarkan dengan cahaya UV.

A. Isolasi DNA dari sel-sel epitelial

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 (100 µg/ml)	NaCl	Vortex	Etanol dingin
Tabung mikrosentrifus	Tris	1 N HCl	Pipet Mohr

Persiapan minuman isotonik (0,9% NaCl, 5% Sukrosa dalam aqua botol).

Satu kelompok meja menyiapkan 100 ml minuman isotonik yang cukup untuk semua kebutuhan praktikum ini.

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

Satu kelompok meja menyiapkan 50 ml buffer Tris EDTA yang cukup untuk semua kebutuhan praktikum ini. Berat molekul Tris = 121,1 g/mol; EDTA = 292,2 g/mol.

Tentukan pH-nya dengan 1 N HCl.

10 mM Tris dlm 50 ml = $121,1 \times 0,01 \times 0,05 = 0,06055$ gr.

1 mM EDTA dlm 50 ml = $292,2 \times 0,001 \times 0,05 = 0,01461$ gr.

Persiapan buffer 2,5M NaCl; 50 ml.

2,5M NaCl 50 ml = $58,44 \times 2,5 \times 0,05 = 7,305$ g/mol. Jadi berat molekul NaCl = **7,305 g/mol**.

Isolasi DNA dari sel-sel epitelial.

1. Pengumpulan / panen sel-sel

- a. Dengan batang kayu, gosok bagian dalam pipi selama 30 detik. Jangan ditelan.
- b. Ambil minuman isotonik → kumur-kumur dengan minuman isotonik sebanyak 10ml, sekaligus menggosok pipi selama 1 menit → hasil berkumur ini jangan ditelan, tetapi dikeluarkan ke dalam beaker → ini yang menjadi larutan sel epitel yang akan diisolasi DNA nya.

2. Lisis sel-sel dan pencernaan protein

- c. Tentukan waterbath pada temperatur 56°C.
- d. Ambil 1,5 ml larutan sel epitelial menggunakan pipet Mohr → masukkan ke dalam tabung mikrosentrifus.
- e. Dengan sampel orang lain sebagai keseimbangan, sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 10.000rpm. Buanglah supernatant dan tambah larutan sel anda lagi.
- f. Ulangi langkah f dan g dua kali lagi supaya endapan semakin banyak.
- g. Tambah 1 ml buffer Tris-EDTA.
- h. Vortex sampel selama 30 detik (sampai endapan hancur).
- i. Tambahkan 50 µL Proteinase K (enzim untuk mencerna protein) dan biarkan di waterbath (56°C) selama 10 menit.

3. Pengendapan DNA

- j. Tambahkan 100 µL NaCl 2,5 M. Aduk dengan cara membolak-balikkan tabungnya.
- k. Transfer semua ke tabung reaksi yang bersih dan kering dengan hati-hati biar tidak banyak buih-buih.
- l. Dengan hati-hati tambahkan 1 mL etanol dingin supaya batasnya jelas.
- m. Diamkan selama 5 menit.
- n. DNA akan menggumpal di batasan buffer dan etanol (kelihatan seperti benang putih).
- o. DNA diambil dengan batang kaca atau besi dan ditaruh di tabung sentrifugasi kecil. Pakailah tisu untuk menghisap sisa dari etanol.
**Kalau tidak bisa diambil dengan batang kaca, cobalah buang etanol sampai ke lapisan putih dan ambil bagian yang dianggap berisi DNA ke dalam tabung reaksi

sentrifugasi. Pakai alat sentrifugasi pada kecepatan tinggi selama 2 menit, DNA akan tampak sebagai endapan. Buanglah supernatant.

p. Simpan dibawah 0°C.

B. Isolasi DNA dari darah

Alat dan Bahan yang digunakan.

Darah (1 cc)	Larutan RNA-ase	Anti koagulan
Isopropanol	Larutan sel lisis	70% etanol
Larutan nuklei lisis	Larutan rehidrasi DNA	Larutan ' <i>protein precipitation</i> '
Waterbath	Tabung mikrosentrifus	Mikrosentrifus
Vortex	Kertas absorben	Pipet tetes

1. Ambil satu tabung Eppendorf (tabung mikrosentrifus 1,5 mL) yang steril. Isi dengan 1 mg anti-koagulan (EDTA, heparin atau citrat) dan masukkan 1 ml 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 20-30 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 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 **50 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.

C. Elektroforesis Agarose

Alat dan Bahan

Sampel DNA epitel dan DNA darah	Tris	Sarung tangan
Pewarna DNA (crystal violet dalam 20% gliserol)	1 N HCl	Pipet otomatis
Tempat buang cairan biologis	Agar 2%	Waterbath

Biru bromfenol	Na ₂ HPO ₄	Mikrosentrifus
Pipet tetes	Gliserol	Aquades
Alat elektroforesis agarose	EDTA	Larutan pewarna
Tabung mikrosentrifus (1,5 ml)	Pipet Mohr	Larutan pencuci
Erlenmeyer flask	Beaker glass	Spidol
Etanol absolute, dingin	Vortex	pH meter

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 µL.
7. Sample DNA.
8. Mineral oil (untuk menghindari penguapan).
9. Thermal Cycler PCR.
10. UV reader.

Cara kerja PCR

- ✓ Disiapkan larutan untuk beberapa orang sekaligus atau disebut dengan larutan **Mix Solution** (untuk memudahkan pekerjaan dan memperoleh ketepatan volume).
- ✓ Perhatikan penyimpanan larutan-larutan diatas, ada yang harus pada temperature -20°C (Primer, dNTP's, Buffer, Taq dan bila perlu larutan DNA), oleh karena itu pada saat bekerja harus diletakkan yang berisi es.
- ✓ Selalu gunakan tabung dan tips yang telah disterilisasi.

Contoh menyiapkan Mix Solution :

	1 sample	10 sample
1. Master Mix 2x	12,5 µL	125 µL
2. Forward Primer	1	10

3. Reverse Primer	1	10
4. N. F. Water	8,5	85
5. DNA Template	2	

$$\text{Total} = 25 \mu\text{L} \rightarrow 25 - 2 = \mathbf{23 \mu\text{L}}$$

Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

1. **1X TBE** – setiap kelompok siapkan 1000mL (resep dibawah ini utk 1000ml)

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 (bisa disimpan selama beberapa bulan).

2. **2% Agarose** - setiap kelompok siapkan agarose secukupnya untuk anggotanya (perlu 40ml/casting tray) – resep di bawah ini utk 125ml.

****Hati-hati dengan ethidium bromide – pakailah sarung tangan*****

1 g agarose dimasukkan ke dalam beaker/flask 250 ml yang bersih. Tambahkan 125 ml larutan 1X TBE buffer solution. Tutup flask/beaker dengan foil aluminium untuk mengurangi penguapan dan sisakan celah sedikit. Aduk secara gerakan flask. Dipanaskan sampai mendidih dan larutan jernih. Dinginkan sampai $\sim 60^\circ$ dan tambahkan 12 μL larutan ethidium bromide/casting tray (marker 8 μL).

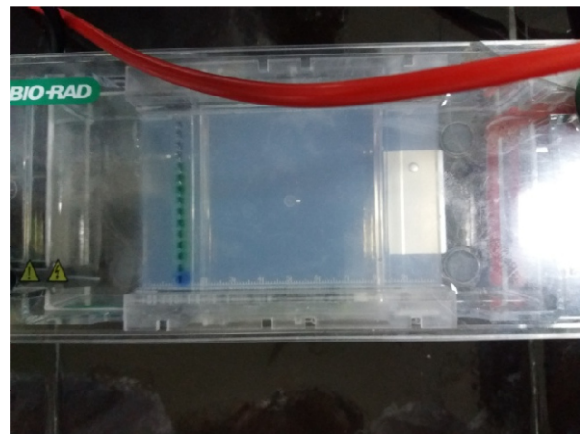
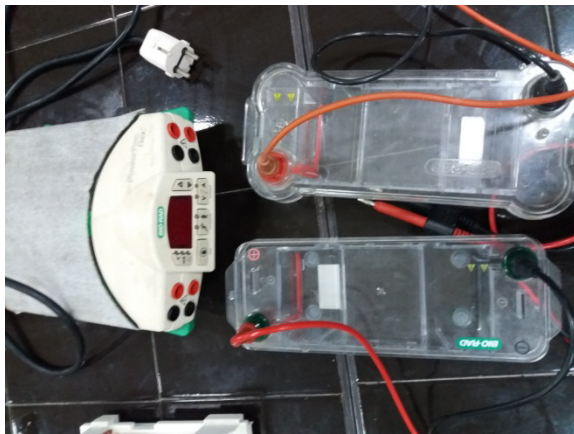


Gmb 1. Agarose dan Larutan TBE.

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. Elektroforesis tank dapat disii dengan 3 casting gel.

3. Tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel-gel terbenam seluruhnya.
4. Gunakan mikropipet untuk menghisap 20 μ L sampel DNA dan secara hati-hati masukkan ke dalam “well”/sumur tertentu. Catat posisi dan urutan sampel grup Anda pada halaman hasil praktikum ini.
5. 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.
6. Nyalakan mesin elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 90V. Sampel-sampelnya akan mulai bergerak ke katode, (DNA bermuatan negatif).



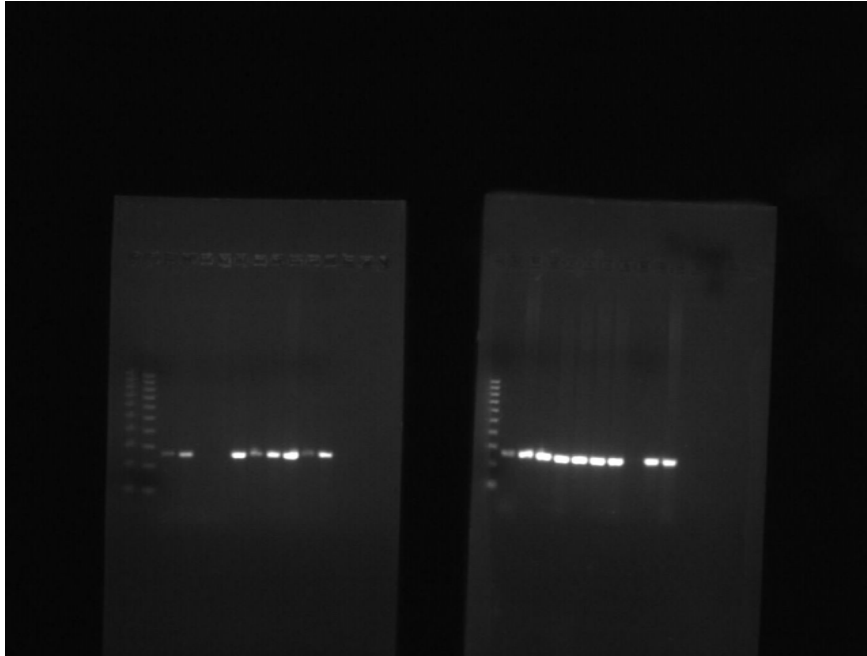
Gmb 2. Mesin Elektroforesis dan Elektroforesis tank (kiri). Masing-masing sampel DNA dimasukkan ke dalam “well” / sumur tertentu (kanan).

7. Matikan mesin elektroforesis secara sempurna.
8. Dengan sangat hati-hati keluarkan gel dan letakan pada tray yang disediakan. Gambarkan pada halaman hasil praktikum ini hasil yang diperoleh.
9. Pindahkan ke alat “UV reader” supaya hasilnya lebih jelas lagi. Foto hasilnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Dari hasil elektroforesis agarose sampel dan marker diperoleh data yang akan digunakan untuk menghitung basepairs sampel.



Gmb 3. Hasil isolasi DNA epitel(kiri) dan darah(kanan).

Keterangan:

1. Marker
2. -
3. Reza (epitel & darah)
4. Siska (epitel & darah)
5. Karin (epitel & darah)
6. Yuli (epitel & darah)
7. Henny (epitel & darah)
8. Bina (epitel & darah)
9. Rahmi (epitel & darah)
10. Irma (epitel & darah)
11. Dinno (epitel & darah)

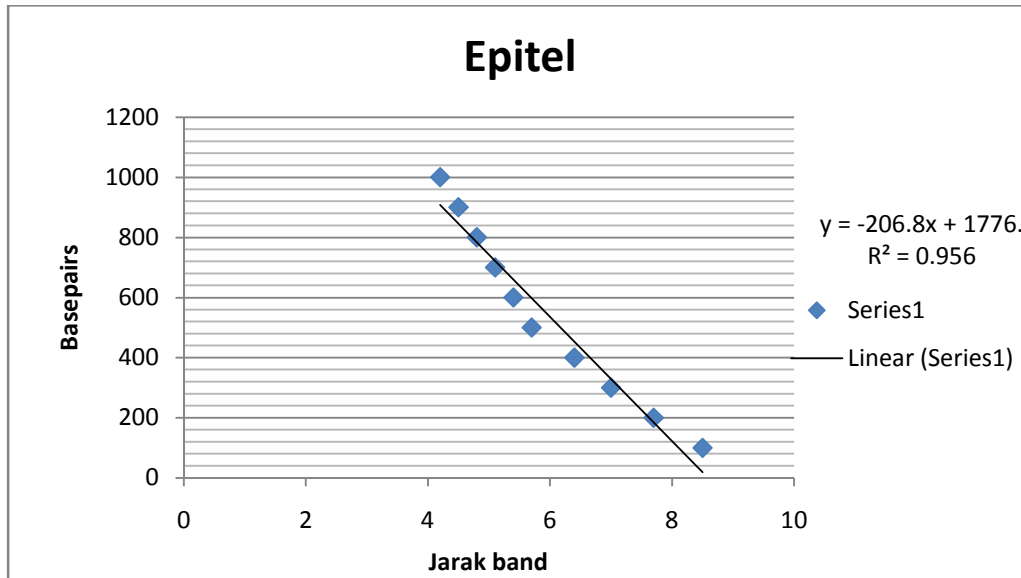
Dari foto hasil elektroforesis agarose dapat diukur jarak setiap band dari marker dan sampel. Data pengukuran jarak dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Data Jarak band marker Basepairs (bp) dari garis well (sumur).

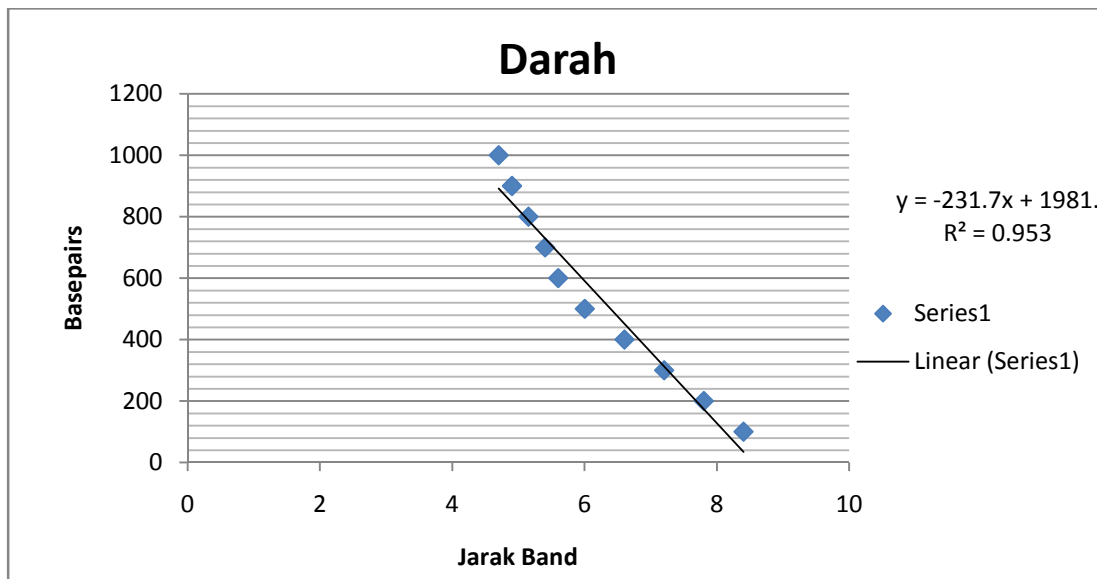
Basepairs	Jarak (cm) sampel darah	Jarak (cm) sampel epitel
100	8.4	8.5
200	7.8	7.7
300	7.2	7
400	6.6	6.4
500	6	5.7
600	5.6	5.4
700	5.4	5.1
800	5.15	4.8
900	4.9	4.5
1000	4.7	4.2

Analisa Hasil Elektroforesis dan Pembahasan

1. Band yang terbentuk dari Hasil elektroforesis adalah marker yang panjangnya 100bp hingga 1000 bp.
2. Untuk menentukan panjang basepair band sampel yang terbentuk, maka kita buat rumus persamaan antara jarak band dengan panjang basepair marker. Perumusan persamaan untuk menghitung panjang bp sampel terlihat dari gambar 4 dan 5. Untuk mengukur panjang band yang terbentuk, titik acuan pengukuran dimulai dari batas lubang well.



Gambar 4. Diagram scattered dan garis trendline untuk marker pada agarose sampel DNA dari epitel



Gambar 5. Diagram scattered dan garis trendline untuk marker pada agarose sampel DNA dari darah

Tabel 2. Hasil Perhitungan panjang basepair tiap sampel

Nomor Kolom	Sampel	Nama	Sampel Darah $y = -231.7x + 1981$		Sampel Epitel $y = -206.8x + 1776$	
			Jarak (x)	Panjang Bp (y)	Jarak (x)	Panjang Bp (y)
1	Marker					
2	Negative					
3	1	Reza	7.35	278.005	7.2	287.04
4	2	Siska	7.35	278.005		
5	3	Karin	7.5	243.25		
6	4	Yuli	7.5	243.25	7.2	287.04
7	5	Henny	7.5	243.25	7.35	256.02
8	6	Bina	7.5	243.25	7.35	256.02
9	7	Rahmi			7.35	256.02
10	8	Irma	7.4	266.42	7.35	256.02
11	9	Dinno	7.4	266.42	7.35	256.02

- Setelah diperoleh persamaannya maka dapat dihitung panjang basepair tiap sampel dengan memasukkan besarnya jarak dari well ke band yang terbentuk, ke dalam persamaan.
- Untuk hasil isolasi DNA darah, pada kolom ke 9 atau sampel ke 7 tidak terbentuk band. Hal ini dikarenakan kegagalan dalam proses isolasi DNA, begitu pula dengan hasil elektroforesis sampel epitel pada kolom ke 4 dan 5 atau sampel 2 dan 3. Band juga dapat gagal terbentuk bila kurang tepat dalam memasukkan sampel ke dalam well.
- Hasil band yang terbentuk pada elektroforesis sampel darah tampak lebih tebal dibandingkan dengan hasil sampel epitel. Hal ini dapat terjadi mungkin akibat konsentrasi sel yang diperoleh dari sampel darah lebih banyak dibandingkan dari epitel rongga mulut.
- Adanya band yang muncul pada negative control dapat terjadi mungkin akibat kontaminasi dari micropipette yang digunakan untuk memasukkan bahan ke dalam

tabung pcr. Walaupun setiap sampel menggunakan tip yang baru, namun tip yang digunakan tidak terdapat pembatas di bagian pangkalnya sehingga memungkinkan kontaminasi cairan/sel walaupun dalam jumlah yang sangat kecil.

B. Pembahasan

Sebelum dilakukan elektroforesis, teknologi PCR dilakukan terlebih dahulu terhadap sampel. Perlakuan yang dilakukan pada sampel saat pada PCR:

- Hot Start pada suhu 94°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus.
- Denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik sebanyak 35 siklus (DNA memisah).
- Annealing pada suhu 61°C selama 30 detik sebanyak 35 siklus (pimer menempel).
- Extensi pada suhu 72°C selama 1 menit sebanyak 35 siklus (DNA diperpanjang).
- Extensi pada suhu 72°C selama 7 menit sebanyak 1 siklus.
- Soaking pada suhu 4°C (dilakukan untuk menurunkan suhu).



Gmb 6. Thermal Cycler

Pada penggunaan agar-agar untuk elektroforesis agarose, agar-agar yang digunakan tidak boleh terlalu panas saat dituang ke dalam cetakan karena jika terlalu panas cetakan akan retak dan juga tidak boleh terlalu dingin karena agar-agar akan mengeras dan tidak dapat menjadi sumur. Saat menuangkan agar-agar ke dalam cetakan yang harus diperhatikan adalah gelembung udara karena tidak boleh ada gelembung udara pada saat mencetak agar-agar.

Pada saat melakukan elektroforesis tahap pertama yang dilakukan adalah mengisi masing-masing sumur, dimana setiap agar-agar harus diisi dengan marker, negatif dan sampel. Setelah

marker, negatif dan sampel DNA diisi pada setiap sumur, arus dijalankan pada elektroforesis. Adanya arus dapat diketahui dari gelembung gas yang keluar dan arus berlangsung dari positif ke negatif.

Hasil elektroforesis terlihat jelas band DNA yang berasal dari darah sedangkan dari sel epitel tidak begitu jelas ataupun tidak muncul. Hal ini menunjukkan bahwa pada pengerjaan untuk mendapatkan sampel DNA dari sel epitel kurang teliti, mungkin pada saat menggosok bagian dalam pipi tidak tepat atau pada saat memperoleh endapannya yang kurang baik pengerjaannya.

Jawaban Pertanyaan:

1. Dari hasil isolasi DNA sel epitel dan darah terdapat perbedaan.
Perbedaan nya terletak pada:
 - a. Proses untuk mendapatkan DNA, pada sel epitel lebih sederhana daripada dari darah. Untuk mendapatkan DNA dari sel epitel dilakukan sentrifugasi berulang-ulang, sedangkan pada DNA darah hanya sekali sentrifugasi untuk memperoleh pellet.
 - b. DNA yang diperoleh dari sel epitel lebih sedikit daripada DNA yang diperoleh dari darah.
2. Cara kerja pada isolasi DNA pada sel epitel lebih sederhana daripada isolasi DNA yang berasal dari darah. Tahapan pengerjaan isolasi dari darah lebih rumit dan lebih kompleks.
3. Etanol menyebabkan adanya ruang untuk DNA menggumpal.

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Teknologi PCR digunakan untuk memperbanyak sampel DNA.
2. DNA yang diperoleh dari darah lebih banyak daripada DNA dari hasil isolasi sel epitel.
3. Pada saat memanen sel dari sel epitel, mulut dalam keadaan bersih dan saat menggosok bagian dalam pipi harus tepat, jika tidak tepat DNA tidak akan diperoleh.
4. Marker hasil dari elektroforesis apabila bertumpuk diakibatkan karena saat memasukkan marker ke dalam sumur kurang hati-hati dan mungkin diakibatkan karena kurangnya waktu saat elektroforesis.

B. Saran

1. Praktikan harus lebih berhati-hati dalam melakukan isolasi DNA dan mempersiapkan sampel agar hasil yang didapat baik.
2. Pada saat melakukan elektroforesis, diperlukan ketepatan pengukuran dan ketelitian praktikan serta waktu yang dipakai dalam menjalankan elektroforesis sedikit lebih lama agar marker dan sampel yang dihasilkan baik.
3. Saat praktikan mengisolasi DNA dari sel epitel dan darah sebaiknya lebih diperhatikan oleh supervisor sehingga kesalahan dalam pengerjaan prosedur dapat dikurangi dan DNA diperoleh dengan benar.
4. Peralatan yang digunakan untuk praktikum sebaiknya ditambah sehingga memudahkan untuk pengerjaan praktikum dan praktikan juga lebih memahami proses praktikum.