

LAPORAN PRAKTIKUM
ISOLASI DNA, TEKNIK PCR, DAN ELEKTROFORESIS AGAROSE

NAMA PRAKTIKAN : KARIN TIKA FITRIA (157008003)
RAHMIWITA (157008005)

HARI/ TANGGAL PRAKTIKUM :

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| 1. ISOLASI DNA DARI DARAH | : KAMIS/ 28 APRIL 2016 |
| 2. ISOLASI DNA DARI EPITEL | : KAMIS/ 26 MEI 2016 |
| 3. PCR | : KAMIS/ 2 JUNI 2016 |
| 4. ELEKTROFORESIS AGAROSE | : KAMIS/ 9 JUNI 2016 |

TUJUAN PRAKTIKUM

Agar mahasiswa/I dapat:

1. Melakukan isolasi DNA dari darah dan dari sel epitel
2. Memahami prinsip dasar PCR dan Elektroforesis Agarose
3. Menggunakan alat Elektroforesis dengan benar untuk membaca nilai base pair fragment DNA

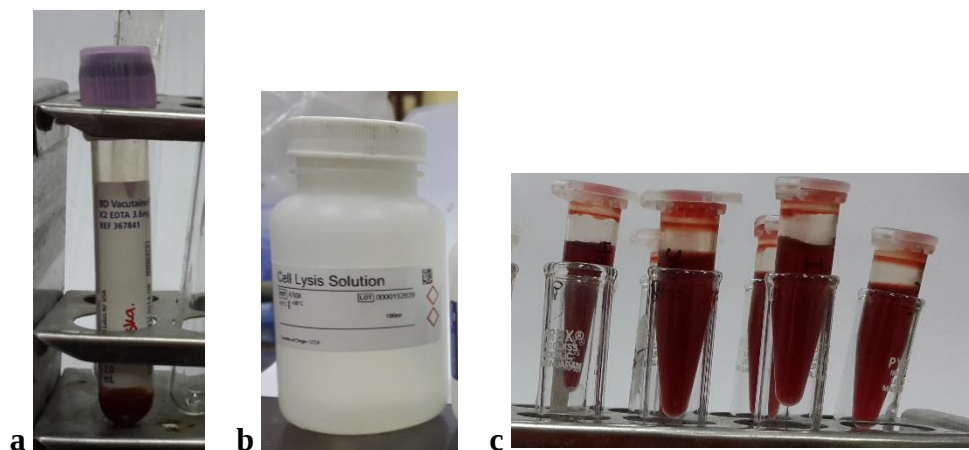
A. ISOLASI DNA DARI DARAH

ALAT DAN BAHAN

Darah	Larutan RNAase	Anti-koagulan
Isopropanol	Larutan sel lisis	70% etanol
Larutan nuklei lisis	Larutan rehidrasi DNA	Larutan “ protein precipitation”
Water bath	Tabung mikrosentrifus	Mikrosentrifus
vorteks	Kertas absorben	Pipet tetes

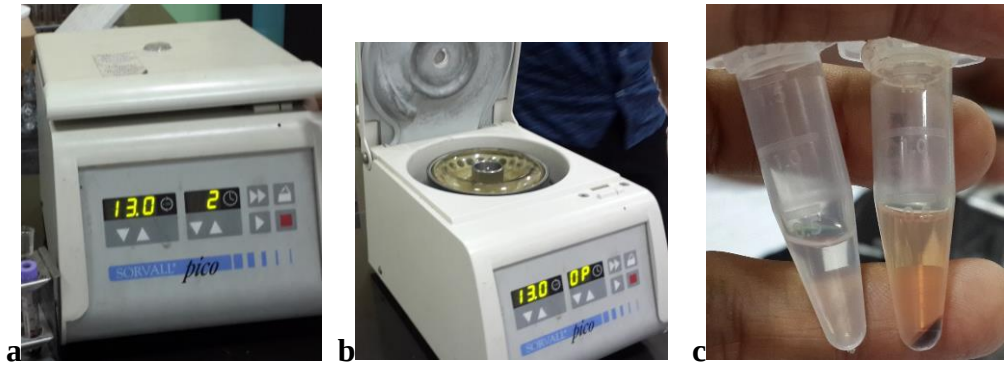
CARA KERJA

1. Mengambil darah sebanyak 1,5-2 cc sebagai sampel menggunakan spuit kemudian ditempatkan pada tabung sampel darah **BD Vacutainer® Blood Collection Tubes dengan K2 EDTA 3,6 mg** yang di dalamnya sudah terdapat EDTA.
2. Menggoyangkan tabung dengan perlahan agar darah dan anti koagulan (EDTA) bercampur
3. Mengisi 900 μ L larutan sel lisis pada tabung Mikroentrifus berukuran 1,5 ml
4. Mengambil 300 μ L darah dari tabung sampel darah dan memasukkan ke tabung mikrosentrifus, kemudian membolak-balik tabung supaya larutan dan darah bercampur



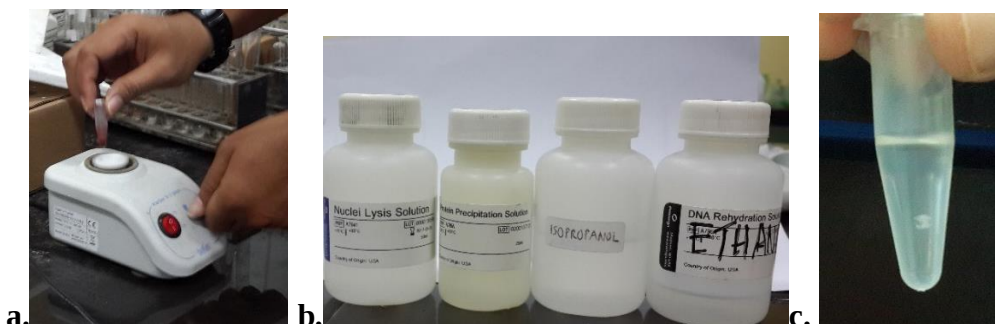
Gambar 1. a. BD Vacutainer® Blood Collection Tubes dengan K2 EDTA 3,6 mg yang telah diisi sampel darah; b. Cell Lysis Solution
c. Tabung mikrosentrifus yang telah diisi dengan 900 μ L larutan sel lisis dan 300 μ L darah

5. Menginkubasi tabung kedua selama 10 menit pada temperatur ruang dan membolak-balik tabung selama inkubasi untuk melisis sel-sel darah merah
6. Melakukan sentrifugasi tabung mikrosentrifus pada kecepatan 13.500 rpm selama 2 menit dan membuang supernatan tanpa mengganggu pellet putih, lebih kurang 20-30 μ L residu tertinggal di dalam tabung tersebut



Gambar 2. a. Sorvall Biofuge Pico Centrifuge diatur dengan kecepatan 13.0 (karena tidak ada pilihan 13.500 rpm maka diatur dengan kecepatan 13.000 rpm) **b.** Meletakkan tabung mikrosentrifus pada **Sorvall Biofuge Pico Centrifuge** dan mengatur peletakannya agar seimbang dalam melakukan sentrifugasi. **C.** hasil sentrifugasi terbentuk pellet dan supernatant

7. Melakukan vortex dengan kuat agar pellet tersuspensi kembali
8. Menambahkan 300µL larutan nuklei lisis ke dalam suspensi dan mencampur dengan menggunakan pipet sebanyak 5-6 kali untuk melisis sel-sel darah putih. (jika terdapat gumpalan inkubasi pada suhu 37°C)
9. Menambahkan larutan “*protein precipitation*” 100µL dan memvortex dengan kuat (terlihat gumpalan protein yang kecil)
10. Melakukan sentrifugasi pada 13.500rpm selama 3 menit dan terlihat pellet berwarna coklat tua. Kemudian memindahkan supernatan ke dalam tabung mikrosentrifus yang telah berisi isopropanol 300µL (temperatur ruangan)
11. Membalikkan tabung dengan perlahan supaya larutan bercampur dan terlihat benang- benang putih (DNA strans) dan melakukan sentrifugasi pada 13.500 rpm selama 1 menit (DNA terlihat sebagai pellet putih)



Gambar 3. a. Personal Vortex V-1 plus Boisan digunakan untuk mensuspensi kembali pellet yang terbentuk **b.** *Nuclei Lysis Solution* dan *Protein Precipitation Solution*. **C.** Pellet putih yang terbentuk setelah sentrifugasi yang ke tiga

12. Membuang supernatan dan menambahkan 300 μ L etanol 70% dan membolak-balikkan tabung perlahan untuk mencuci pellet DNA kemudian mensentrifugasi kembali pada 13.500rpm selama 1 menit
13. Mengambil etanol perlahan dengan pipet tanpa mengganggu pellet dan meletakkan tabung terbalik pada kertas absorben. Setelah kering menambahkan larutan rehidrasi DNA 50 μ L
14. DNA disimpan pada temperatur 2-8 °C atau untuk jangka panjang pada suhu -20°C

B. ISOLASI DNA DARI SEL EPITEL

ALAT DAN BAHAN

Minuman isotonic	Tabung reaksi	Spidol
Batang kayu	PHmeter	Vortex
Timbangan digital	Tris	1 N HCl
Stok proteinase K (100 µg/ml)	NaCl	Akuades
Tabung mikrosentrifus	EDTA	Mikrosentrifus
Beaker	Water bath	SDS,
Etanol dingin	Pipet Mohr	

CARA KERJA

1. Menyiapkan larutan isotonic (0,9% NaCl dan 5% sukrosa dalam botol mineral).

Setiap peserta praktikum membutuhkan 10 ml larutan isotonic, sehingga dibuat sebanyak 100 ml larutan isotonic yaitu dengan menimbang NaCl sebanyak 0,9gr dan 5 gr sukrosa kemudian dilarutkan dengan aquades hingga mencapai 100 ml.

2. Menyiapkan buffer Tris-EDTA (10mM Tris, 1 mM EDTA, 1% SDS;pH =8). Berat molekul Tris =121,1 g/mol; EDTA = 292,2 g/mol. Larutan dibuat sebanyak 50 ml

Tris 10 mM = $121,1 \times 0,01 \times 0,05 = 0,06055$ gr Tris

EDTA 1 mM = $292,2 \times 0,001 \times 0,05 = 0,0292$ gr EDTA

SDS 1 % = 1gr SDS

Dilarutkan dalam aquadest hingga mencapai 100 ml

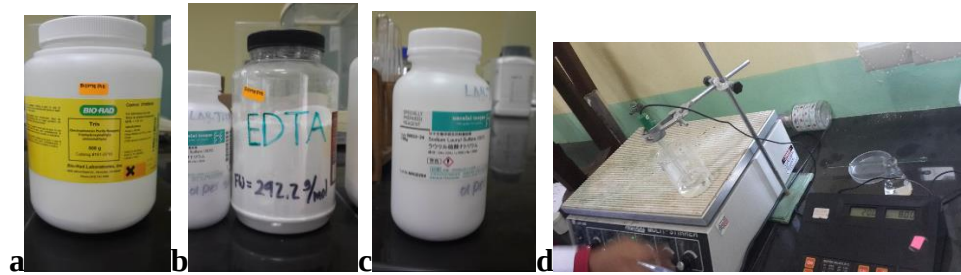
Tentukan pHnya dengan pH meter dan menambahkan 1 N HCl hingga mencapai pH=8

3. Menyiapkan 50mL 2,5 M NaCl

Berat molekul NaCl 58,45 gr/mol

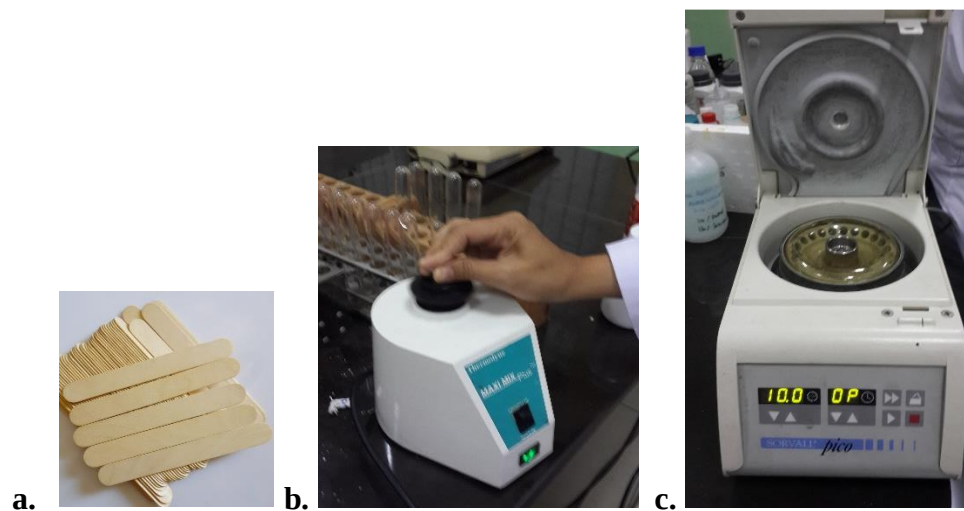
Sehingga dibutuhkan NaCl sebanyak = $58,45 \times 2,5 \times 0,05 = 7,30625$ gr

Kemudian dilarutkan dalam aquadest hingga mencapai 50 ml



Gambar 4. a. *Tris* b. *EDTA*. c. *SDS* d. Pengaturan pH hingga mencapai pH yang dibutuhkan (pH=8) dengan menambahkan 1 N HCl

4. Menggosok bagian dalam pipi dengan batang kayu selama 30 detik
5. Berkumur dengan larutan isotonik sambil menggosok-gosok pipi selama 1 menit dan mengeluarkan ke dalam *beaker glass* (karena keterbatasan alat maka digunakan gelas air mineral bersih)



Gambar 5. a. stik kayu. c. Vortex V-1d. Pengaturan pH hingga mencapai pH yang dibutuhkan (pH=8) dengan menambahkan 1 N HCl

6. Mengambil 1,5 mL larutan sel dan memasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus
7. Mensentrifus selama 30 detik pada kecepatan 10.000rpm, kemudian membuang supernatan dan menambah larutan sel lagi
8. Mengulangi sentrifugasi dan membuang supernatan serta menambah larutan sel sampai memperoleh endapan yang banyak
9. Menambahkan 1 mL buffer Tris-EDTA dan memvortex sampai endapan hancur

10. Menambahkan 50 μ L Proteinase K dan membiarkan di waterbath yang bersuhu 56 °C selama 10 menit
11. Menambahkan 100 μ L NaCl 2,5 M dan mengaduk tabung dengan cara membolak-balik tabung
12. Memindahkan semua larutan ke dalam tabung reaksi dengan hati-hati
13. Menambahkan etanol dingin 1 mL dengan hati-hati supaya batasnya jelas
14. Membiarkan larutan selama 5 menit dan akan terlihat DNA kemudian memindahkan DNA ke tabung sentrifugasi kecil.
15. Menyimpan drfjgtyfr vi bawah 0°C

C. TEKNIK PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

ALAT DAN BAHAN

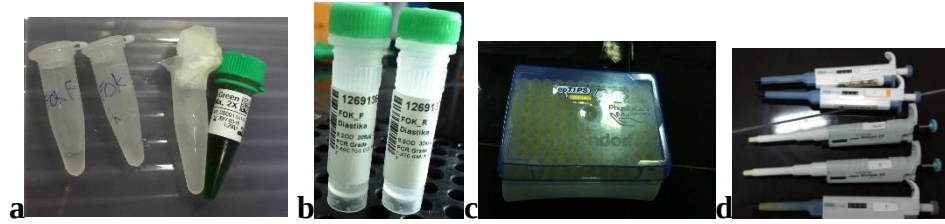
1. Forward Primer : konsentrasi 20 pmol
2. Reverse Primer : konsentrasi 20 pmol
3. *Go Taq® Green Master Mix* (berisi *GoTaq® G2 DNA Polymerase*, dNTPs, $MgCl_2$ dan *reaction buffers*)
4. Sampel DNA
5. Nuclease- Free Water (NF Water) → untuk mencukupkan volume sampel hingga total 25 μL
6. *Therma Cyclor PCR*

CARA KERJA

1. Menyiapkan larutan mix untuk semua sampel sekaligus atau disebut dengan larutan *Mix Solution* (untuk memudahkan pekerjaan dan memperoleh ketepatan volume) - Perhatikan penyimpanan larutan-larutan diatas, ada yang harus pada temperature $-20^{\circ}C$ (*Go Taq® Green Master Mix*, Sampel DNA, Nuclease- Free Water -NF Water), oleh karena itu pada saat bekerja harus diletakan yang berisi es
Untuk jumlah sampel sebanyak 9 sampel ditambah 1 *negative control* maka *mix solution* yang dibutuhkan adalah:

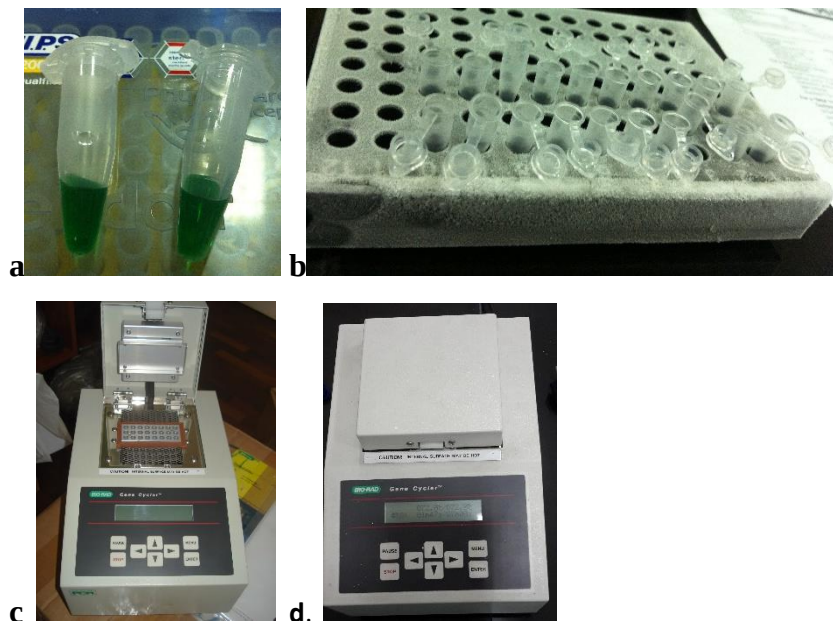
Bahan	1 sampel	10 sampel
a. Forward Primer	1 μL	10 μL
b. Reverse Primer	1 μL	10 μL
c. <i>Master Mix 2x</i>	12,5 μL	125 μL
d. N.F water	8,5 μL	85 μL
e. <u>DNA Template</u>	<u>2</u>	
Total	25 μL	

Untuk *Mix Solution* sebanyak 10 sampel untuk isolasi DNA dari darah dan 10 sampel untuk isolasi DNA dari epitel, maka dicampurkan bahan a-d ke dalam 2 buah tabung mikrosentrifus steril dengan masing masing ukuran pada tiap tabung *mix solution* sesuai perhitungan di atas.



Gambar 6. **a.** dari ki-ka : Forward Primer; Reverse Primer; NF Water; Go Taq® Green Master Mix . **b** . Kemasan Primer Forward dan Reverse **c.** micropipette tip **d.** micropipette

2. Menyiapkan 10 tabung PCR untuk sampel Isolasi DNA dari darah dan 10 tabung untuk sampel isolasi DNA dari epitel
3. Mengisi masing masing tabung dengan 23 μL mix solution.



Gambar 7. **a.** Mix Solution untuk Sampel isolasi DNA darah dan sampel isolasi DNA epitel . **b.** Tabung PCR **c.** Bagian dalam Thermal Cyclers (Bio-Rad Gene Cyclers™) **d.** Pengaturan program Thermal Cycling

4. Menambahkan 2 μL hasil isolasi DNA ke dalam setiap tabung PCR tersebut. Kecuali untuk tabung yang berisi *negative control*
5. Tabung ditutup rapat dan ditempatkan dalam Thermal Cyclers

6. Atur Program untuk menjalankan PCR dengan pengaturan sebagai berikut:

Langkah	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Hot Start	94	5 menit	1
Denaturasi	94	30 detik	35
Annealing	61	30 detik	
Extention	72	1 menit	
Extention	72	7 menit	1

7. Tabung PCR kemudian disimpan dalam freezer

Pembahasan

1. Go Taq® Green Master Mix, yaitu larutan siap pakai untuk reaksi PCR yang telah dicampurkan di pabrik pembuatnya dan berisi *GoTaq® G2 DNA Polymerase*, dNTPs, MgCl₂ serta buffer reaksi pada konsentrasi optimal untuk amplifikasi yang efisien dari template DNA dalam rentang yang luas. Master mix ini telah mengandung *loading dye* sehingga tidak perlu langkah pemberian loading dye yang dibutuhkan untuk pewarnaan band yang terbentuk pada prosedur elektroforesis
2. Primer yang digunakan adalah primer untuk gen FOK yang diperoleh dari 1st *Base Custom Oligos* (FBCO) dengan urutan nukleotida sebagai berikut:
 - a. Forward Primer : 5' AGC TGC CCC TGC CAC TGA CTC TGC TCT 3'
 - b. Reverse Primer : 5' ATG GAA ACA CAC TGC TTC TTC TTC CTC 3'

D. ELEKTROFORESIS AGAROSE

ALAT DAN BAHAN

TAE buffer 1000 ml	Casting Tray dan well comb dengan 15 sumur
2 x 40 ml 2 % Agarose	Heater dan Stirrer beserta magnetic stirrer
Timbangan digital	<i>Bio-Rad Nucleic Acid Electrophoresis tank</i>
Bio-Rad EZ Load™ 100 bp <i>Molecular Ruler (50 µg/ml)</i>	<i>Bio-Rad PowerPac Basic power supply for horizontal DNA electrophoresis in agarose gels and vertical acrylamide gel electrophoresis of proteins</i>
Ethidium bromida	Uvitec
Beaker	Gelas ukur

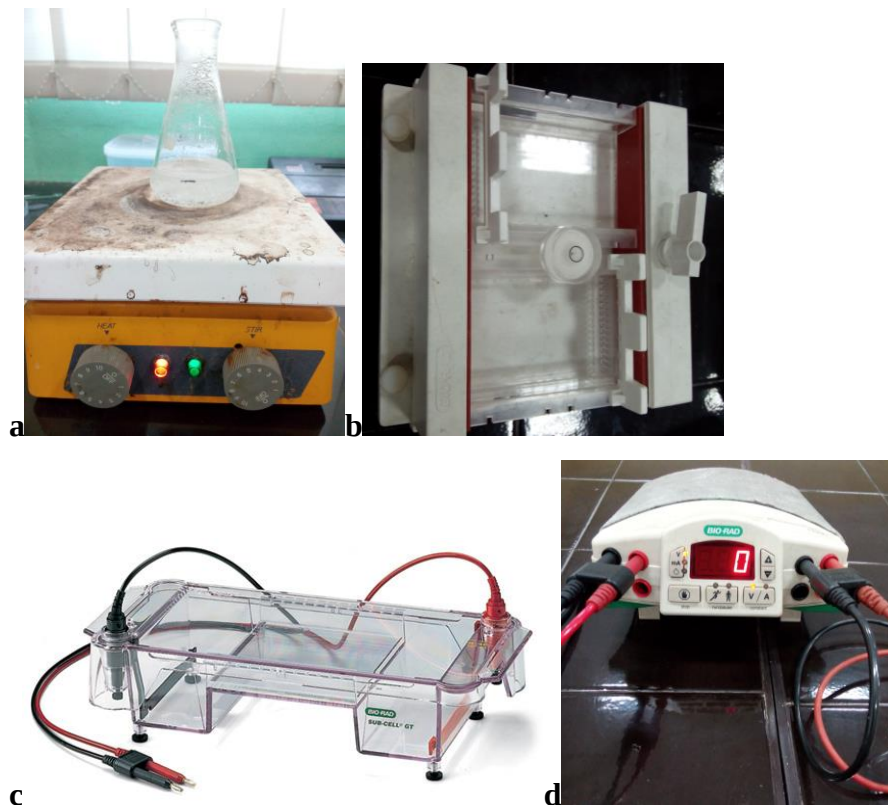
CARA KERJA

1. Menyiapkan larutan TAE Buffer sebanyak 1000 ml. TAE buffer yang tersedia adalah TAE 40 x. sehingga untuk membuat TAE Buffer sebanyak 1000 ml maka kita mengencerkan 25 ml TAE 40x dengan aquadest hingga 1000 ml
2. Menyiapkan 2x 40 ml 2 % Agarose. Yaitu dengan menimbang 0,8 gr agarose dan menambahkan 1x TAE buffer hingga volume 40 ml. larutan agarose dibuat 2 set untuk 2 casting tray
3. Sebelum dipanaskan beaker/elenmaeyer flask ditandai pada batas ketinggian cairan untuk mengetahui adanya pengurangan volume cairan ketika setelah dipanaskan. Larutan diaduk dan dihangatkan dengan heater&stirrer hingga mendidih dan larutan tampak jernih. Bila ada penurunan ketinggian volume cairan dari batas sebelumnya maka ditambahkan 1 x TAE buffer hingga mencapai volume semula. Agarose didinginkan hingga ~60°C



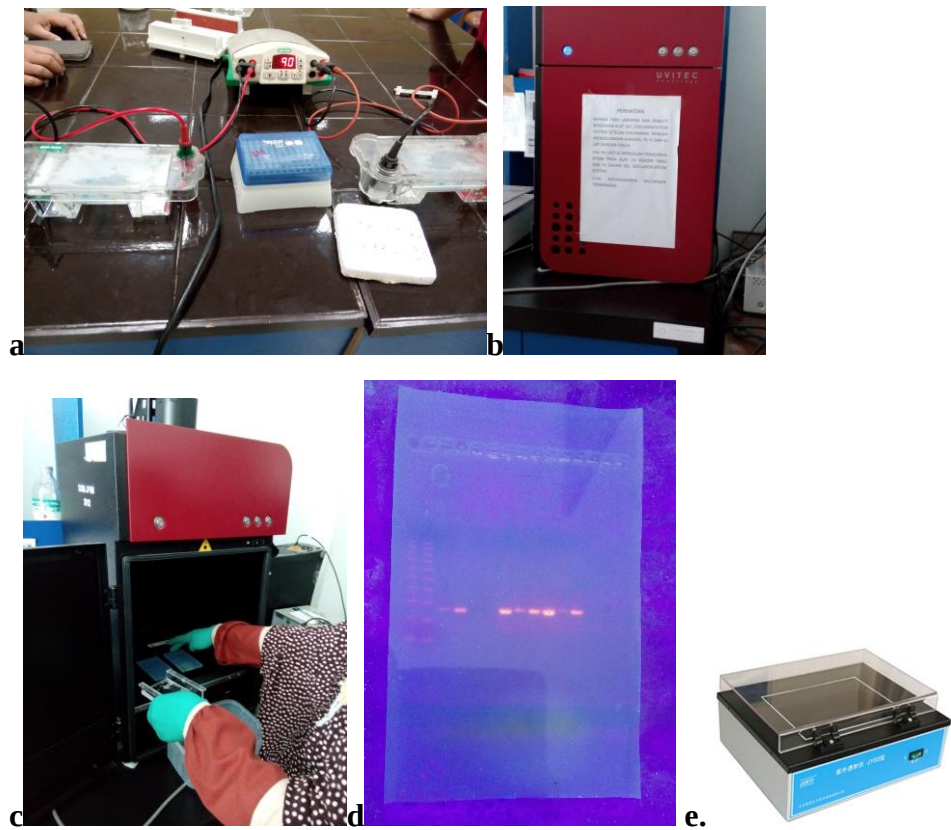
Gambar 8. a. TAE Buffer 40x. b. bubuk Agarose c. Bio-Rad EZ Load™ 100 bp Molecular Ruler (50 µg/ml); d. Ethidium Bromida

4. Tambahkan Ethidium Bromida sebanyak 12 µl pada setiap larutan agarose
5. Casting tray diatur dan dipasang *well comb* pada ujungnya
6. Agarose dituangkan ke dalam casting tray dan ditunggu hingga memadat



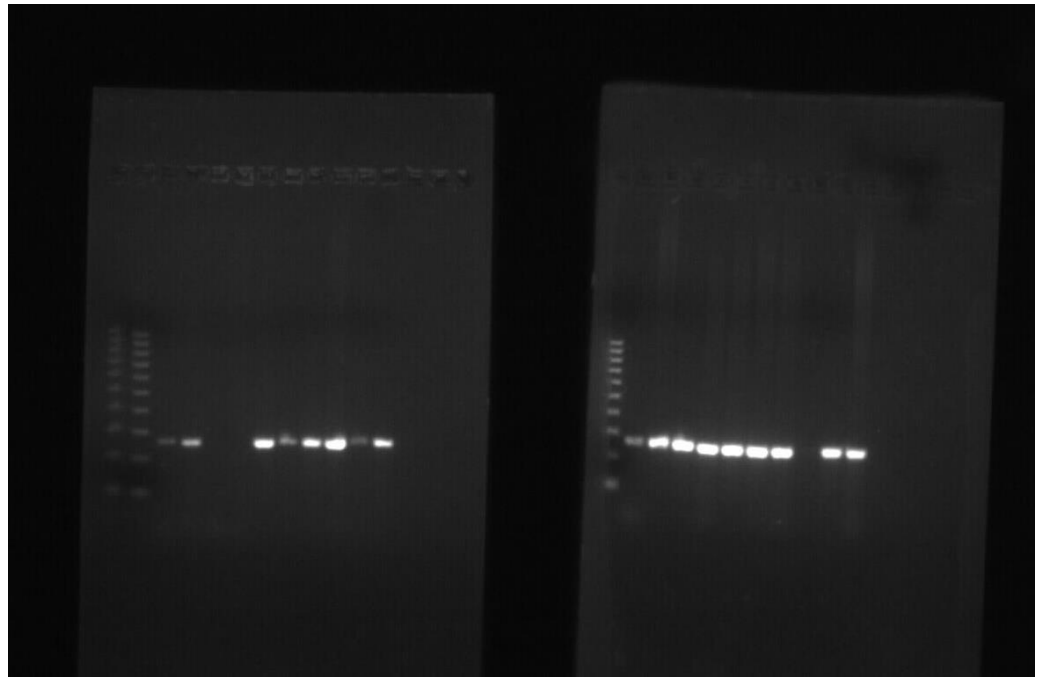
Gambar 8. a. Pemanasan dan pengadukan larutan agarose di atas mesin heater-stirrer. b. Casting tray c. Bio-Rad Nucleic Acid Electrophoresis tank d. Bio-Rad PowerPac Basic power supply

7. Setelah padat, *well comb* diangkat dan terbentuk well atau sumur untuk meletakkan hasil pcr
8. Letakkan gel di dalam elektroforesis tank yang sudah berisi larutan 1X TBE. Perhatikan cara meletakkannya.
9. Tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel-gel terbenam seluruhnya.
10. Memasukkan marker pada sumur pertama sebanyak 5 μ l dengan micropipette dan hasil PCR sampel pada sumur –sumur berikutnya sebanyak masing masing 8 μ L. Pada saat memasukkannya, pastikan ujung dari tip sudah sedikit masuk pada lubang well gel elektroforesis. Catat posisi dan urutan sampel grup



Gambar 9. a. Pengaliran listrik dari power supply ke electrophoresis tank yang berisi agarose gel b Uvitec UV reeader c. Hasil Elektroforesis yang dilihat dengan alat UV Transluminator d. UV Translumintor e.

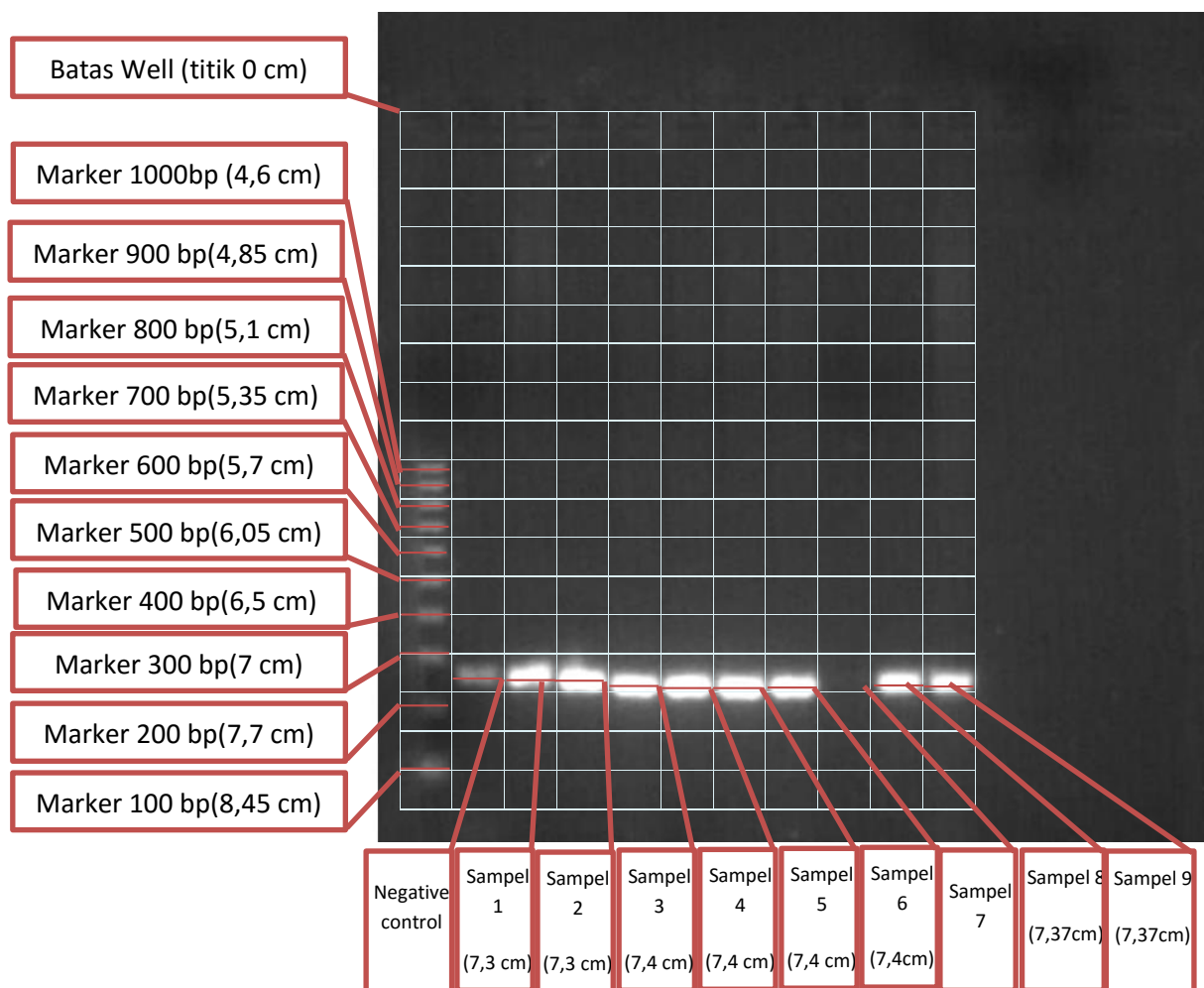
11. Nyalakan mesin elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 90V. Sampel-sampelnya akan mulai bergerak ke katode, (DNA bermuatan negatif)
12. Matikan mesin elektroforesis secara sempurna.
13. Dengan sangat hati-hati keluarkan gel dan letakan pada tray yang disediakan.
14. Pindahkan ke alat “UV reader” supaya hasilnya lebih jelas lagi.



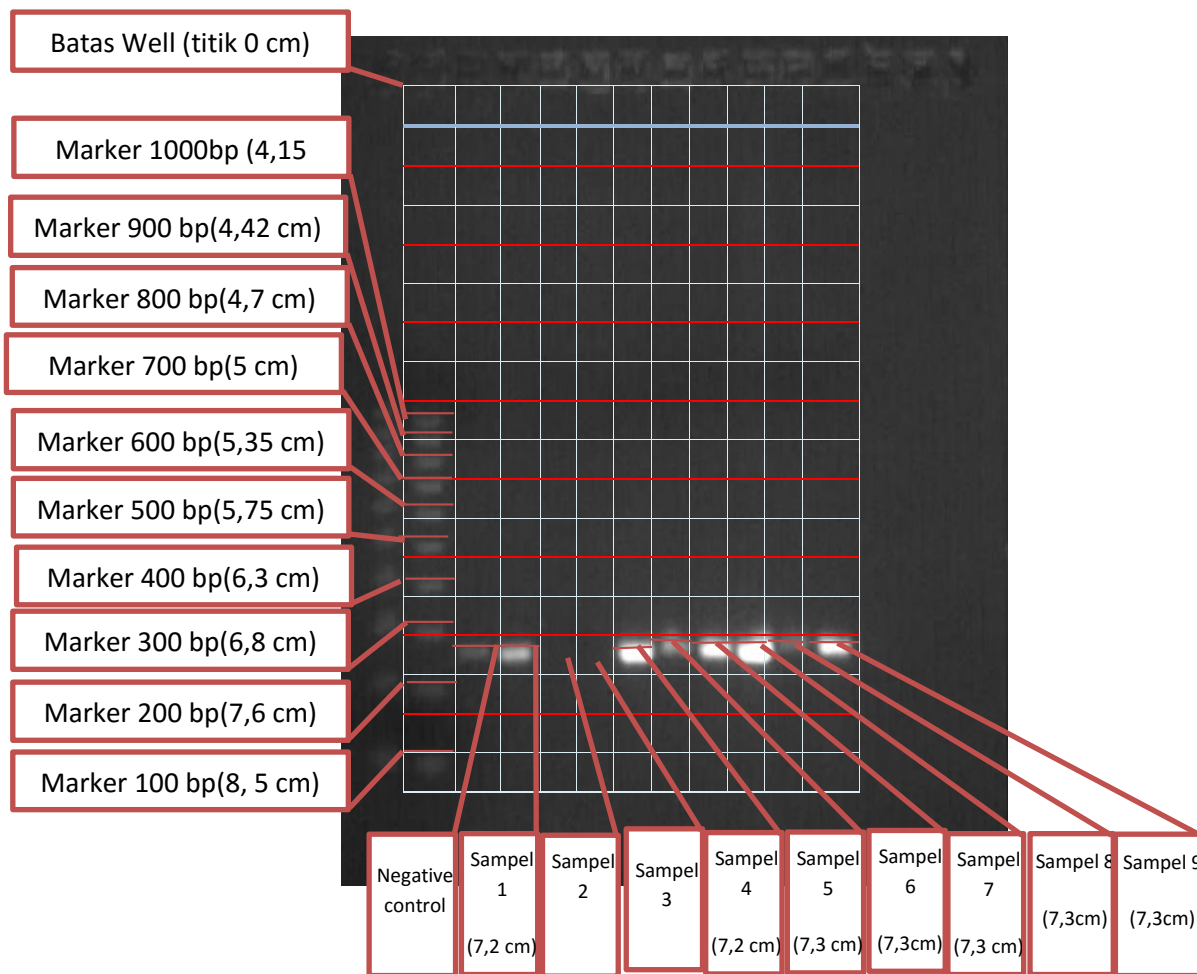
Gambar 10.kiri: Hasil elektroforesis sampel DNA sampel epitel **kanan:** hasil elektroforesis DNA sampel darah

Tabel 1. Jarak Band marker basepairs dari garis well

basepairs	Jarak(cm) Agarose sampel darah	Jarak(cm) Agarose sampel epitel
100	8,45	8,5
200	7,7	7,6
300	7	6,8
400	6,5	6,3
500	6,05	5,75
600	5,7	5,35
700	5,35	5
800	5,1	4,7
900	4,85	4,42
1000	4,6	4,15



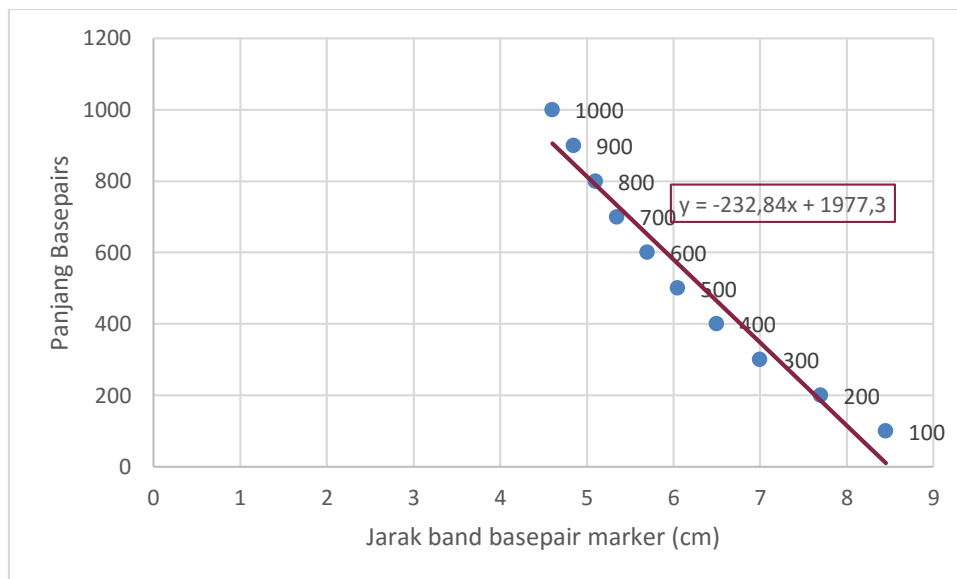
Gambar 10. a. Hasil elektroforesis dari sampel darah dengan UV Reader (jarak tiap baris grid =0,5 cm)



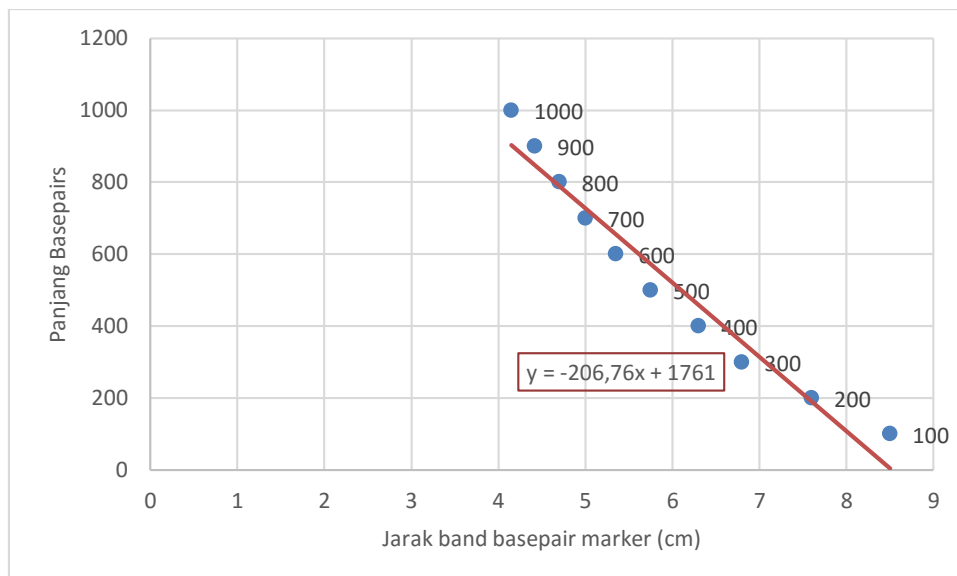
Gambar 11. Hasil elektroforesis dari sampel epitel dengan UV Reader (jarak tiap baris grid =0,5 cm)

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. Pengukuran jarak band sampel darah dan epitel ada pada gambar 10 dan 11 sementara perumusan persamaan untuk menghitung panjang bp sampel terlihat dari diagram 12 dan 13. Untuk mengukur panjang band yang terbentuk, titik acuan pengukuran dimulai dari batas lubang well



Gambar 12. Diagram scattered dan garis trendline untuk marker pada agarose sampel DNA dari darah



Gambar 13. Diagram scattered dan garis trendline untuk marker pada agarose sampel DNA dari epitel

Tabel 2. Hasil Perhitungan panjang basepair tiap sampel

Nomor Kolom	Sampel	Nama	Sampel darah		Sampel epitel	
			Y= -232,84x +1977,3		Y= -206x+1761	
			Jarak (x)	Panjang bp (y)	Jarak (x)	Panjang bp (y)
1	Marker					
2	Negative Control					
3	1	Reza	7,3	277,568	7,2	272,328
4	2	Siska	7,3	277,568		
5	3	Karin	7,4	254,284		
6	4	Yuli	7,4	254,284	7,2	272,328
7	5	Henny	7,4	254,284	7,3	251,652
8	6	Bina	7,4	254,284	7,3	251,652
9	7	Rahmi			7,3	251,652
10	8	Irma	7,37	261,2692	7,3	251,652
11	9	Dinno	7,37	261,2692	7,3	251,652

- 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 idak terdapat pembatas di bagian pangkalnya sehingga memungkinkan kontaminasi cairan/sel walaupun dalam jumlah yang sangat kecil

Saran

1. Ketelitian dan kecermatan sangat dibutuhkan dalam pelaksanaan baik teknik isolasi DNA dari darah dan epitel, PCR maupun elektroforesis agarose
2. Pasokan listrik yang stabil di ruang praktikum sangat dibutuhkan karena pada saat menjalankan Thermal Cycling terjadi lampu mati sebelum siklus benar benar selesai sehingga ada kemungkinan tidak terbentuk hasil multiplikasi gen yang diinginkan dalam jumlah yang cukup
3. Fasilitas air sangat krusial bagi laboratorium terutama untuk membersihkan alat alat, karena adanya kontaminasi dapat mempengaruhi hasil