

LAPORAN PRAKTIKUM
ISOLASI DNA, ISOLASI PROTEIN DARAH, PCR, DAN ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS PAGE

NAMA PRAKTIKAN : Aditya Chandra
Ramadhan Bestari
GRUP PRAKTIKAN : Grup Pagi
KELOMPOK : 3

HARI/TGL. PRAKTIKUM : Kamis, 7 November 2013
Kamis, 14 November 2013
Kamis, 21 November 2013
Kamis, 28 November 2013
Jumat, 29 November 2013

I. TUJUAN PRAKTIKUM

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.
4. Mengolah data yang diperoleh dari kegiatan praktikum untuk memperoleh nilai base-pair fragment DNA.
5. Mengerti teknik sentrifugasi untuk pemisahan sel darah dengan plasma darah.
6. Melakukan isolasi protein dari darah.
7. Memahami prinsip dasar Elektroforesis SDS-Page.
8. Menggunakan alat elektroforesis dengan benar untuk membaca nilai berat molekul protein dari darah.
9. Mengolah data yang diperoleh dari kegiatan praktikum untuk memperoleh berat molekul protein dari darah.
10. Membuat dan menginterpretasi grafik.

II. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Praktikum Isolasi DNA

Terlihat massa seperti benang-benang putih yang merupakan untaian DNA di tabung Eppendorf.

Hasil Praktikum Isolasi Protein Darah

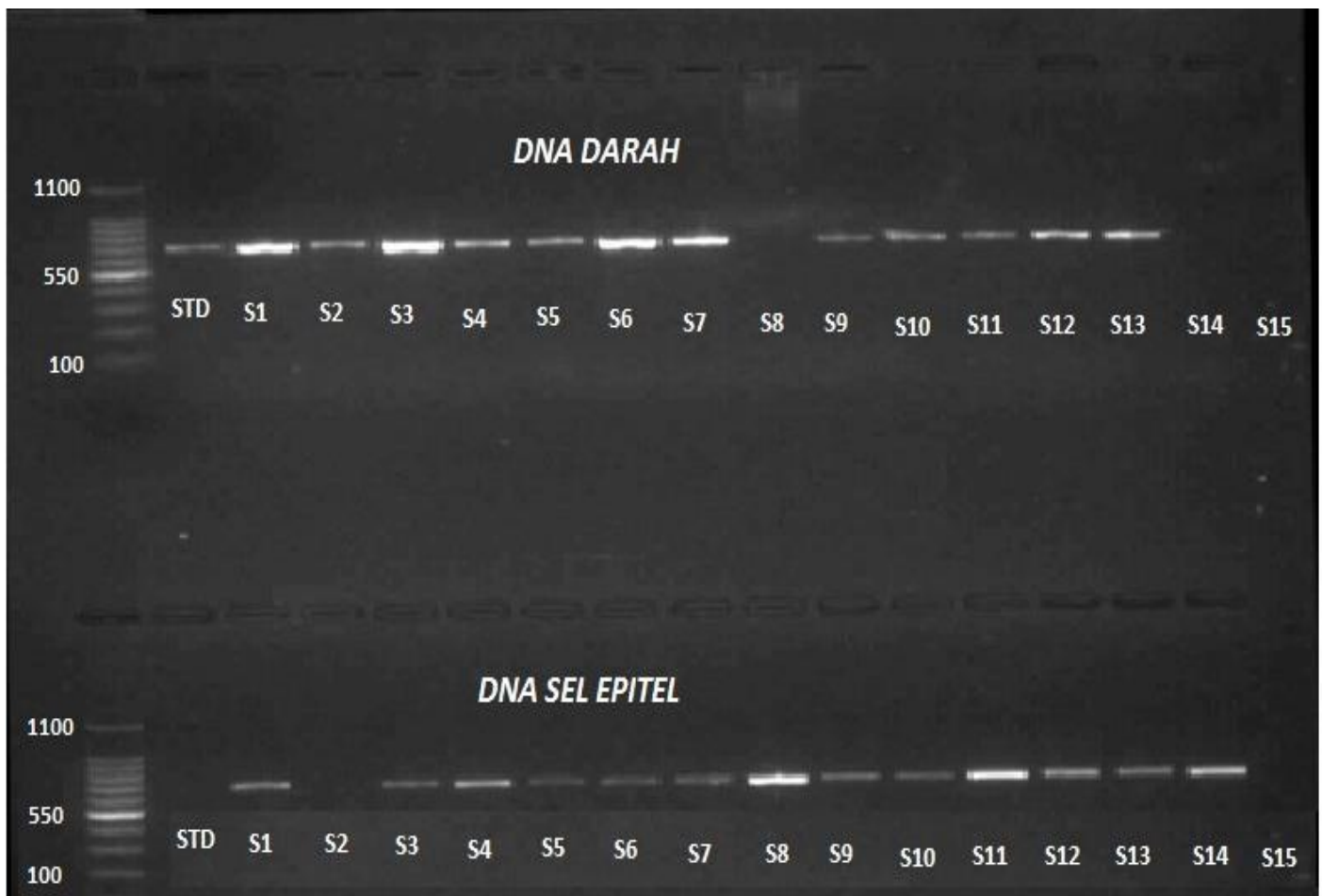
Sampel darah dari Ramadhan Bestari, jenis kelamin laki-laki, jumlah darah yang diambil 5 mL dan waktu pengambilan pukul 08.15 WIB

Bagian A	Supernatan	Pengendapan
Jumlah/warna	Jumlah : 1,5 mL Warna : kuning	Jumlah : 3,5 mL Warna : merah
Pengamatan yang lain	Diambil 500 μ L untuk sampel plasma, 500 μ L untuk bagian C dan 500 μ L untuk bagian D	Dilanjutkan ke bagian B
Bagian B	Supernatan	Pengendapan
Jumlah/warna	Jumlah : 7 mL Warna : putih kekuningan	Jumlah : 1 mL Warna : merah
Pengamatan yang lain	Diambil 1 mL untuk sampel protein sitoplasmik (S)	Setelah ditambah 7 mL buffer hemolisis, diambil 2 mL cairan terbawah beserta endapan untuk sampel protein membran (M), setelah disentrifus buang supernatannya dan ditambah 500 μ L buffer hemolisis

Bagian C	Supernatan	Pengendapan
Jumlah/warna	Jumlah : 0,65 mL Warna : kuning	Jumlah : 0,1 mL Warna : kuning gelap
Pengamatan yang lain	Diambil 500 μ L untuk sampel protein supernatan garam tinggi (Gs)	Diambil untuk sampel protein pengendapan garam tinggi (Gp) dan ditambah dengan 500 μ L buffer hemolisis
Bagian D	Supernatan	Pengendapan
Jumlah/warna	Jumlah : 1,2 mL Warna : kuning	Jumlah : 0,25 mL Warna : putih
Pengamatan Yang Lain	Diambil seluruh supernatan untuk sampel protein supernatan etanol (Es)	Diambil untuk sampel protein pengendapan etanol (Ep) dan ditambah dengan 500 μ L buffer hemolisis

Hasil Praktikum PCR dan Elektroforesis Agarose DNA

Hasil isolasi sampel DNA darah dan sel epitel mukosa manusia dilanjutkan dengan teknik PCR untuk proses replikasi dan teknik elektroforesis agarose dengan hasil seperti di bawah ini



Sampel DNA Darah

STD : Standar
S1 : Marker
S2 : Seri
S3 : Amirul
S4 : Melvi
S5 : Debby
S6 : Aditya

Sampel DNA Sel Epitel Mukosa

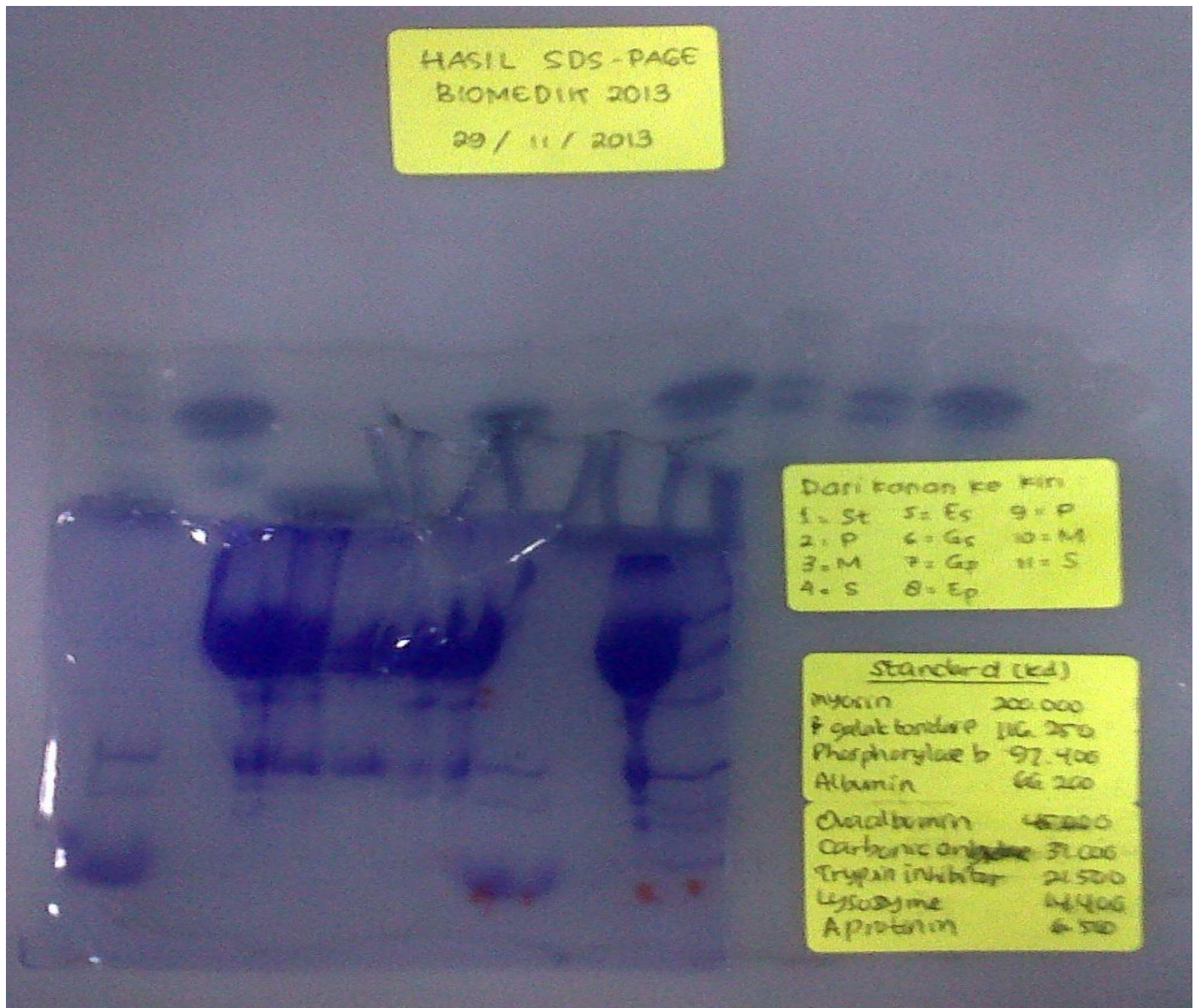
STD : Standar
S1 : Marker
S2 : Seri
S3 : Amirul
S4 : Melvi
S5 : Debby
S6 : Aditya

S7 : Ramadhan
 S8 : Ichwan
 S9 : T. Barlian
 S10 : Maya
 S11 : M. Yunus
 S12 : Yuni
 S13 : Ade
 S14 : Ferry
 S15 : Nita

S7 : Ramadhan
 S8 : Ichwan
 S9 : T. Barlian
 S10 : Maya
 S11 : M. Yunus
 S12 : Yuni
 S13 : Ade
 S14 : Ferry
 S15 : Nita

Hasil Praktikum Praktikum Elektroforesis SDS-Page

Hasil isolasi protein dari darah dilanjutkan dengan teknik Elektroforesis dengan hasil seperti dibawah ini



Dari kanan ke kiri berturut-turut

S1 : Standar
 S2 : Protein Plasma
 S3 : Protein Membran
 S4 : Protein Sitoplasmik
 S5 : Protein Supernatan Etanol
 S6 : Protein Supernatan Garam Tinggi
 S7 : Protein Pengendapan Garam Tinggi

S8 : Protein Pengendapan Etanol

S9 : Protein Plasma

S10 : Protein Membran

S11 : Protein Sitoplasmik

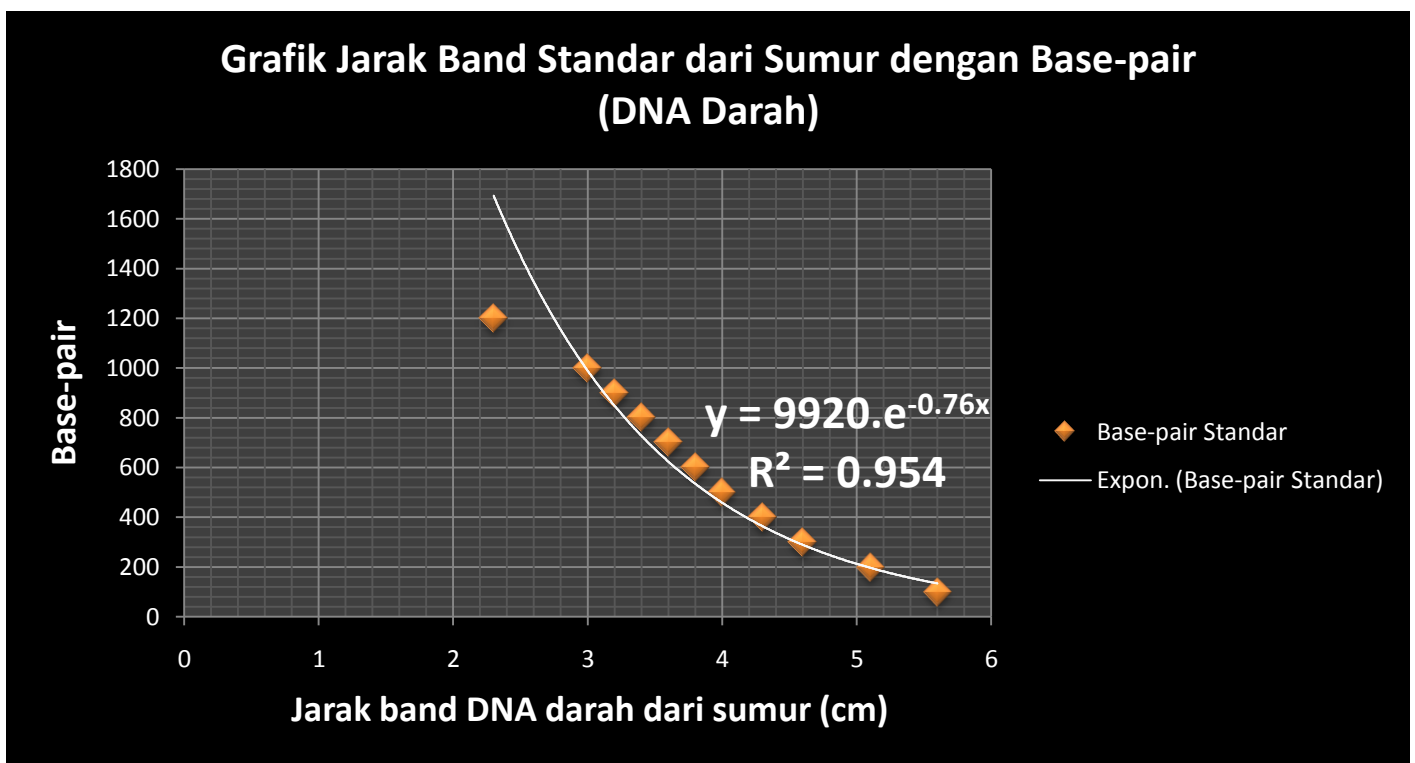
Pembahasan

Praktikum Isolasi DNA, PCR, dan Elektroforesis Agarose DNA

Dilakukan pengukuran terhadap DNA standar pada gambaran elektroforesis DNA dan didapatkan hasil seperti tabel di bawah ini : (pengukuran dilakukan dengan terlebih dahulu mencetak gambaran elektroforesis DNA yang diperbesar pada kertas A4)

DNA Darah

Band	Jarak Band-Sumur (cm)	Base-pair
1	5,6	100
2	5,1	200
3	4,6	300
4	4,3	400
5	4	500
6	3,8	600
7	3,6	700
8	3,4	800
9	3,2	900
10	3	1000
11	2,3	1200



Dari grafik di atas didapatkan persamaan eksponen $y = 9920.e^{-0.76x}$ yang dapat digunakan untuk menghitung base-pair sampel DNA darah. (Base-pair tidak memiliki bilangan desimal sehingga harus digenapkan)

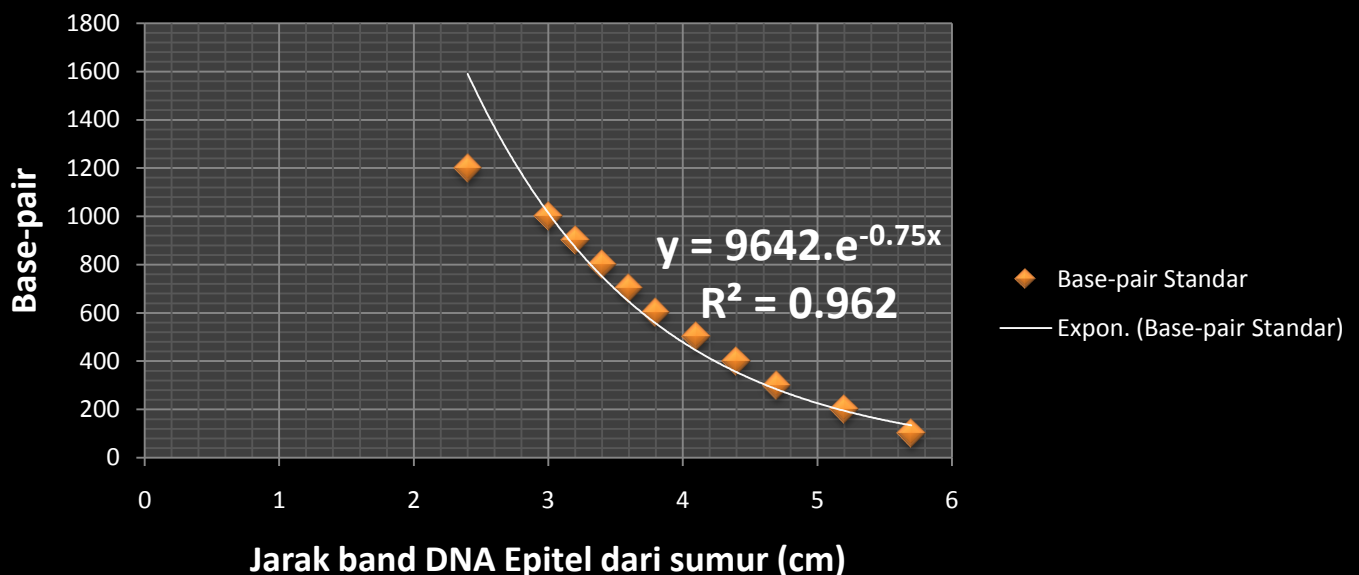
S7 : Aditya = 3,4 cm = 748,6774 = 749

S8 : Ramadhan = 3,4 cm = 748,6774 = 749

DNA Epitel Sel Mukosa

Band	Jarak Band-Sumur (cm)	Base-pair
1	5,7	100
2	5,2	200
3	4,7	300
4	4,4	400
5	4,1	500
6	3,8	600
7	3,6	700
8	3,4	800
9	3,2	900
10	3	1000
11	2,4	1200

Grafik Jarak Band Standar dari Sumur dengan Base-pair (DNA Epitel)



Dari grafik di atas didapatkan persamaan eksponen $y = 9642.e^{-0.75x}$ yang dapat digunakan untuk menghitung base-pair sampel DNA darah. (Base-pair tidak memiliki bilangan desimal sehingga harus digenapkan)

S7 : Aditya = 3,5 cm = 698,4641 = 698

S8 : Ramadhan = 3,5 cm = 748,6774 = 698

- Jarak band yang paling jauh dari sumur memiliki base-pair yang lebih sedikit dibandingkan dengan band yang lebih dekat ke sumur, sebab fragmen DNA dengan base-pair yang lebih sedikit dapat terlempar lebih jauh dari sumur dibandingkan dengan fragmen DNA dengan base-pair yang lebih banyak.
- Dari grafik di atas dapat diperoleh persamaan eksponen di mana pada DNA darah adalah $y = 9920.e^{-0.76x}$ sedangkan pada DNA Epitel adalah $y = 9642.e^{-0.75x}$ yang nantinya dapat digunakan untuk menghitung base-pair DNA sampel.
- Pada marker sampel DNA darah (S2) dijumpai bayangan band yang pada seharusnya tidak boleh dijumpai, hal ini dapat disebabkan adanya kesalahan pada saat pengisian sampel DNA darah (S3) yang berada di sebelah marker sehingga mengakibatkan kontaminasi pada marker (S2).

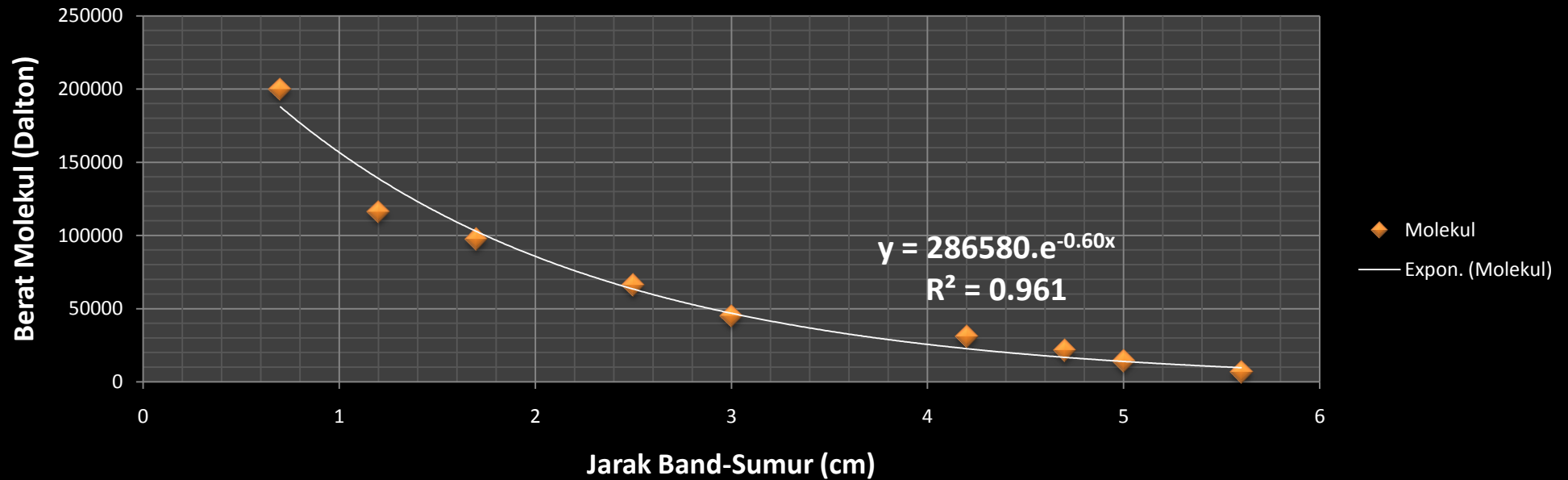
- S10 dan S16 pada sampel DNA darah serta S3 pada sampel DNA epitel sama sekali tidak menunjukkan bayangan band DNA yang berarti tidak terdapatnya fragmen DNA.
- Untuk menentukan base-pair DNA sampel pada pemeriksaan elektroforesis agarose pada prinsipnya harus menunjukkan adanya bayangan band yang jelas seperti ditunjukkan oleh S3, S5, S8, dan S9, sebab bila dijumpai bayangan yang kabur atau bahkan tidak terlihat dapat mengakibatkan kesalahan dalam menentukan base-pair DNA sampel.
- Band-band yang kabur atau bahkan tidak terlihat pada pemeriksaan elektroforesis agarose dapat disebabkan oleh banyak hal diantaranya adalah proses isolasi yang tidak benar, proses PCR yang kurang bekerja, telah terkontaminasinya sampel DNA, dan lain sebagainya.

Praktikum Isolasi Protein dan Elektroforesis SDS-Page

Dilakukan pengukuran terhadap protein standar pada elektroforesis SDS-Page dan didapatkan hasil seperti tabel di bawah ini : **(pengukuran dilakukan pada elektroforesis SDS-Page yang terbentuk)**

No.	Nama Protein	Berat Molekul (Dalton)	Jarak Sumur-Band (cm)	Jarak Sumur-Band Sampel (cm)									
				P	M	S	Es	Gs	Gp	Ep	P	M	S
1	Aprotinin	6500	5.6		6.2	6.1							6.1
2	Lysozim	14400	5	5								5.1	
3	Trypsin Inhibitor	21500	4.7	4.7	4.7	4.6	4.6	4.7			4.6	4.7	4.8
4	Carbonic Anhydrase	31000	4.2	4.2	4.3	4.2	4.3	4.2	4.4	4.3	4.3	4.5	4.1
5	Ovalbumin	45000	3				3.1	3.2			3.2	3.1	
6	Albumin	66200	2.5				2.5		2.3	2.7	2.6	2.6	2.1
7	Phosphorylase b	97400	1.7										
8	β -Galaktosidase	116250	1.2										
9	Myosin	200000	0.7	0.7									0.3

Grafik Jarak Band dari Sumur dengan Berat Molekul



Berat molekul yang terdapat pada masing-masing sampel protein (didapatkan dari persamaan eksponen grafik $y = 286580.e^{-0.60x}$)

Band	Nama Protein	Berat Molekul Protein dalam Sampel (Dalton)									
		P	M	S	Es	Gs	Gp	Ep	P	M	S
1	Aprotinin		6944.971	7374.423							7374.423
2	Lysozim	14267.98								13437.08	
3	Trypsin Inhibitor	17081.87	17081.87	18138.15	18138.15	17081.87			18138.15	17081.87	16087.1
4	Carbonic Anhydrase	23058.11	21715.31	23058.11	21715.31	23058.11	20450.71	21715.31	21715.31	19259.76	24483.95
5	Ovalbumin				44612.66	42014.62			42014.62	44612.66	
6	Albumin				63944.64		72097.38	56713.81	60220.8	60220.8	81289.57
7	Phosporylase b										
8	β-Galaktosidase										
9	Myosin	188296.5									239371.7

- Jarak band yang paling jauh dari sumur memiliki berat molekul yang lebih ringan dibandingkan dengan band yang lebih dekat ke sumur, sebab sebab molekul protein dengan berat molekul yang lebih ringan dapat terlempar lebih jauh dari sumur dibandingkan dengan berat molekul yang lebih berat.
- Dari grafik di atas dapat diperoleh persamaan eksponen $y = 286580.e^{-0.60x}$ yang nantinya dapat digunakan untuk menghitung berat molekul protein sampel.
- Standar yang digunakan untuk percobaan ini mengandung 9 molekul protein yaitu aprotinin, lysozym, trypsin inhibitor, carbonic anhydrase, ovalbumin, albumin, phosphorylase b, β -Galaktosidase, dan myosin dengan berat molekul masing-masing protein seperti pada tabel di atas.
- Pada tabel di atas dapat terlihat bahwa protein carbonic anhydrase terdapat pada semua sampel protein, sedangkan protein phosphorylase b dan β -Galaktosidase tidak terdapat pada semua sampel protein.

III. KESIMPULAN

1. Dalam melakukan percobaan ini membutuhkan ketelitian yang tinggi karena kesalahan sedikit saja dapat mengakibatkan kesalahan interpretasi hasil percobaan.
2. Teknologi PCR digunakan untuk memperbanyak sampel DNA.
3. Analisa elektroforesis gel agarose merupakan metode standar untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi dan purifikasi dari molekul DNA/RNA, baik untuk pemisahan untai tunggal atau untai ganda molekul DNA. Molekul-molekul tersebut akan bermigrasi menuju kutub positif atau kutub negatif berdasarkan muatan yang terkandung di dalamnya.
4. Seara kasat mata dapat dilihat bahwa DNA yang diperoleh dari darah lebih banyak daripada DNA dari hasil isolasi sel epitel.
5. Pada saat memanen sel dari sel epitel, mulut dalam keadaan bersih dan saat menggosok bagian dalam pipi harus tepat, jika tidak tepat maka DNA tidak akan diperoleh.
6. Marker pada elektroforesis agarose bertumpuk diakibatkan karena saat memasukkan marker ke dalam sumur kurang hati-hati dan mungkin diakibatkan karena kurangnya waktu saat dilakukan proses elektroforesis.
7. Dari marker dapat dibuat grafik persamaan eksponen untuk kemudian dapat dihitung base-pair fragmen DNA sampel.
8. Jarak band marker standard maupun jarak band untuk sampel protein lainnya pada elektroforesis SDS-Page tidak terlihat jelas sehingga membuat praktikan sulit untuk menentukan jaraknya.
9. Dengan elektroforesis SDS-Page dapat ditentukan berat molekul protein yang terkandung pada sampel darah.
10. Dari marker dapat dibuat grafik persamaan eksponen untuk kemudian dapat dihitung berat molekul masing-masing protein yang terdapat pada sampel.

IV. SARAN

1. Waktu yang digunakan untuk elektroforesis SDS-PAGE sebaiknya ditambah agar semua protein benar-benar terpisah.
2. Peralatan yang digunakan untuk kegiatan praktikum sebaiknya ditambah sehingga memudahkan untuk melakukan kegiatan praktikum dan praktikan juga dapat lebih memahami proses praktikum.
3. Sebaiknya laporan dibuat setiap setelah praktikum supaya laporan tidak menumpuk, jika praktikum tidak memiliki hasil analisis data, praktikan membuat laporan tentang pengamatan.