

LAPORAN PRAKTIKUM V, VI, VII

Isolasi DNA dan Teknik PCR

Oleh:

Selly Oktaria : 127008001

Paska Situmorang : 127008011

Kamis, 18 Oktober 2012

Pukul: 08.00 - 11.00

Tujuan :

1. Mahasiswa dapat melakukan metode umum isolasi DNA
2. Mahasiswa dapat melakukan isolasi DNA dari sel-sel epitelial mulut dan darah

Cara kerja :

Bagian A – isolasi dari sel-sel epitelial mulut

1. Gosok bagian dalam pipi dengan batang kayu selama ± 30 detik, jangan ditelan.
2. Kumur-kumur dengan 10 mL minuman isotonic selama ± 1 menit, kemudian keluarkan minuman tersebut kedalam beaker.
3. Ambil 1,5 mL larutan sel kedalam tabung mikrosentrifus.
4. Sentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 10.000rpm, maka akan terlihat endapan putih dibawah tabung.
5. Buang supernatannya dan tambah lagi larutan sel tadi sampai 1,5mL

6. Ulangi langkah 4 dan 5 hingga 5-6 kali, supaya endapan semakin banyak.
7. Buang supernatannya
8. Tambah 1 mL buffer Tris-EDTA.
9. Vortex sampel selama 30 detik
10. Tambahkan 50µL Proteinase K dan biarkan di waterbath (56°C) selama 10 menit
11. Tambahkan 100µL NaCl 2,5M, aduk dengan membolak-balikkan tabungnya
12. Pindahkan semua ke tabung reaksi yang bersih dan kering dengan hati-hati
13. Tambahkan 1 mL etanol dingin dengan hati-hati
14. Diamkan sebentar, kemudian sedikit diputar maka tampak DNA menggumpal (seperti benang putih)
15. DNA diambil dengan menggunakan pipet micrometer lalu ditaruh ditabung sentrifugasi kecil
16. Sentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000rpm selama 1 menit, lalu DNA akan dilihat sebagai endapan, buanglah supernatant, letakkan tabung secara terbalik diatas kertas absorben / tisu dan keringkan diudara selama 10-15 menit.
17. Tambahkan 100µL larutan rehidrasi DNA, kemudian inkubasi pada 65°C selama 30-60 menit.

Bagian B-Isolasi dari darah

1. Ambil 1 tabung Eppendorf (mikrosentrifus 1,5 ml yang steril). Isi dengan 1 mg antikoagulan (EDTA) dan masukkan 1 ml darah kedalamnya
2. Digoyangkan perlahan agar darah dan anti-koagulan bercampur dengan baik
3. Ambil satu tabung Eppendorf yang steril lagi dan isikan 900 µ larutan sel lisis
4. Ambil 300 µl darah dari tabung mikrosentrifus pertama dan masukkan kedalam tabung kedua, bali-balikkan tabung 5-6 kali supaya cairannya bercampur baik.
5. Inkubasi tabung mikrosentrifus kedua selama 10 menit pada temperature ruang (bolak-balikkan tabung 2-3 kali selama masa inkubasi) untuk melisis sel-sel darah merah
6. Sentrifugasi tabung pada 13.500 rpm selama 2 menit pada temperature ruangan
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, agar sel-sel darah putih tersuspensi kembali
9. Tambahkan 300 µl larutan nuklei lisis kedalam suspensi diatas. Campur dengan menggunakan 5-6 kali untuk melisis sel-sel darah putih. Larutan akan menjadi “viscous” (kental).
10. Tambahkan larutan “protein precipitation” sebanyak 100 µl kedalam larutan yang diperoleh dan vortex dengan kuat selama 10-20 detik
11. Sentrifugasi 13.500 rpm selama 3 menit, pada temperature ruangan. Pellet protellet protein yang berwarna coklat tua akan terlihat
12. Pindahkan supernatannya ke dalam tabung Eppendorf steril yang berisi 300 µl isopropanol
13. Tabung dibalikkan perlahan-lahan supaya larutan bercampur dan akan terlihat massa seperti benang-benang putih (DNA-strands)
14. Sentrifugasi pada 13.500 rpm selama 1 menit pada temperature ruangan. DNA akan terlihat sebagai pellet kecil yang putih
15. Buang supernatant tambahkan 300 µl 70% etanol (temperature ruangan). Bolak-balikkan tabung perlahan beberapa kali untuk mencuci pellet DNA. Sentrifugasi lagi.
16. Dengan hati-hati aspirasikan etanol (menggunakan pipet). Jangan sampai pelletnya terbang. Letakkan tabung secara terbalik diatas kertas adsorben dan keringkan diudara selama 10-15 menit
17. Tambahkan 100 µl larutan rehidrasi DNA dan inkubasi tabung pada 65⁰ C selama 30-60 menit. Secara periodic, campurkan larutan dengan cara menepuk tabung perlahan. Boleh juga dengan cara membiarkannya pada 4⁰ C selama 1 malam.
18. DNA disimpan pada temperature 2-8⁰ atau untuk jangka panjang pada 20⁰C

Kesimpulan :

1. Pada percobaan isolasi DNA dari darah yang digunakan adalah leukosit (sel darah putih) karena pada eritrosit (sel darah merah) tidak mempunyai inti yang merupakan tempat produksi DNA.
2. Pada percobaan isolasi DNA dari sel-sel epitel, semakin sering larutan sel yang disentrifus dilakukan berkali-kali maka semakin banyak endapan putih yang didapat dan percobaan ini akan menjadi lebih baik karena akan banyak didapat DNA nya.

3. Larutan isotonic merupakan larutan yang berisi 0,9% NaCl, 5% sukrosa, dan larutan ini digunakan pada percobaan isolasi DNA untuk sel-sel epitel dimana larutan isotonic yang merupakan larutan garam yang berfungsi untuk melepaskan ikatan protein histon dengan DNA.

Isolasi Protein dari Darah

Tujuan :

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

Cara kerja :

Bagian A: Sel-sel Darah dan Plasma dipisahkan

1. Ambil darah 4-5 ml darah
2. Transfer darah ke tabung sentrifus klinik, putar selama 5 menit
3. Transfer semua plasma (yaitu bagian supernatant) ke tabung mikrosentrifuse (2ml) yang bersih dan kering, Tandai tabung dengan "plasma" dan letak di dalam es. Inilah merupakan sampel plasma.
4. Dengan hati-hati buang sisa supernatan ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan pipet tetes.
5. Tambah 6 ml buffer cuci yang dingin ke tabung sentrifus klinik tersebut. Tutup dan vorteks pelan-pelan supaya sel-sel bercampur rata dengan buffer.
6. Masukkan kedalam alat sentrifus, putar selama 5 menit.
7. Dengan hati-hati buang supernatan ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan pipet tetes.
8. Ulangi langkah 5-7 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. 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.
7. 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. Setelah selesai keluarkan tabung mikrosentrifus dengan hati-hati, jika ada 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.

Bagian C Pengendapan Protein Plasma dengan Larutan Garam Berkonsentrasi Tinggi

1. Pada tabung mikrosentrifus 1,5ml tambahkan 250µl larutan (NH₄)₂SO₄ 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. 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. 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 garam tinggi (**GP**). Tambah 500 l buffer hemolisis dan simpan di bagian atas kulkas.

Bagian D Pengendapan Protein Plasma dengan Etanol

1. Pada tabung mikrosentrifus 1,5ml tambahkan 250 μ l etanol absolut yang dingin. Tambahkan 500 μ l sampel plasma dari tabung yang disimpan tadi.
2. Tutup dan vorteks kuat sebentar. Biar diam selama 5 menit di atas es.
3. 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.

PRAKTIKUM PCR, ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS-PAGE (*SDS PolyAcrilamide Gel Elektroforesis*)

Tujuan:

1. Mahasiswa dapat mengetahui dan memahami teknik PCR
2. Mahasiswa dapat mengetahui dan memahami prinsip dasar elektroforesis-protein
3. Mahasiswa dapat melatih teknik elektroforesis agarose dengan sampel-sampel DNA yang diperoleh dari sel epitel dan darah
4. Mahasiswa dapat menggunakan teknik SDS-PAGE untuk memisahkan protein-protein darah

Cara kerja PCR :

1. Siapkan larutan **Mix Solution**
2. Siapkan 12 tabung PCR (steril), dipipetkan sebanyak 23 μ Mix Solution masukan ke masing-masing tabung PCR
3. Tambahkan 2 μ larutan DNA sampel, vortex
4. Jangan lupa mengikutsetakan control negative dalam setiap menjalankan PCR (control negative = tabung PCR hanya berisikan Mix Solution, tanpa penambahan larutan DNA sampel)
5. Tambahkan lagi sebanyak 50 μ Mineral Oil
6. Tabung ditutup rapat dan susun di dalam rak/blok alat Thermal Cycler
7. Atur program untuk menjalankan PCR

Cara kerja elektroforisis agarose

Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

1. **1X TBE**

setiap kelompok siapkan 1000mL (resep dibawah ini utk 1000ml)

0.8 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. **0.8% Agarose**

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

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 ~60° dan tambahkan 12µL larutan ethidium bromide/casting tray.

3. **Larutan Dapar Sampel**

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

4. **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. Setiap mhs menyiapkan 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.

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 disii dengan 3 casting gel.
3. Tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel-gel terbenam seluruhnya.
4. Gunakan mikropipet untuk menghisap 20µL sampel DNA dan secara hati-hati masukkan ke dalam “*well*”/sumur tertentu. Pada saat memasukkannya, pastikan ujung

dari tip sudah sedikit masuk pada lubang well gel elektroforesis. Catat posisi dan urutan sampel

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.
6. Nyalakan mesin elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 90V. Sampel-sampelnya akan mulai bergerak ke katode, (DNA bermuatan negatif)
7. Matikan mesin elektroforesis secara sempurna.
8. Dengan sangat hati-hati keluarkan gel dan letakan pada tray yang disediakan. Gambar hasil yang diperoleh.
9. Pindahkan ke alat "UV reader". Foto hasilnya.

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. Untuk menyiapkan gel poliakrilimide-SDS 10%, ikutilah tabel yang di bawah. Siapkan gel pemisah dulu.
4. Tuang campuran gel pemisah ke dalam ruang antara lempeng kaca, Sisakan kira-kira 2,5 cm dari tepi atas lempeng kaca untuk gel penumpuk. Teteskan isobutanol untuk menyingkirkan udara pada bagian atas gel dan agar batas antar gel dapat terbentuk dengan baik. Biarkan gel pemisah berpolimerisasi selama kurang lebih 30 menit. Siapkan gel penumpuk.

5. Setelah gel pemisah berpolimerisasi, tuangkan campuran gel penumpuk di atasnya. Sisipkan sisir plastik (pembentuk sumur sampel). Biarkan hingga gel penumpuk berpolimerisasi.
6. Setelah gel penumpuk berpolimerisasi, lepas sisir dari bagian atas dan klem serta *spacer* bagian bawah.
7. Letakkan lempeng kaca yang berisi gel secara vertikal pada alat elektroforesis dan kemudian klem. Isi tempat dapar dengan dapar elektroda. Singkir gelembung udara pada bagian bawah gel.

Bagian B: Persiapan sampel-sampel protein (sampel-sampel protein akan disiapkan petugas lab)

1. Pakailah sarung tangan dan teknik keselamatan di laboratorium yang benar.
2. Tentukan waterbath pada temperatur 100C.
3. Siapkan 7 tabung mikrosentrifus dan tandai dengan “plasma”, “M”, “S”, “GS”, “GP”, “ES”, “EP”. Keluarkan 7 sampel protein darah kalian (yaitu plasma, M, S, GS, GP, ES, EP) dari kulkas.
4. Tambah 450 μ L buffer sampel dan 25 μ L -merkaptetoetanol ke setiap tabung mikrosentrifus yang sudah ditandai. Transfer 50 μ L sampel protein plasma, M, S, GS, GP, ES, EP ke tabung mikrosentrifus masing-masing.
5. Tutup dan vorteks pelan-pelan supaya endapannya dicampur rata dengan buffer.
6. Masukkan semua tabung mikrosentrifus ke dalam waterbath yang mendidih. Biarkan 5 menit.
7. Tentukan bahwa tabung mikrosentrifus berkeseimbangan dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan 14.000 rpm.

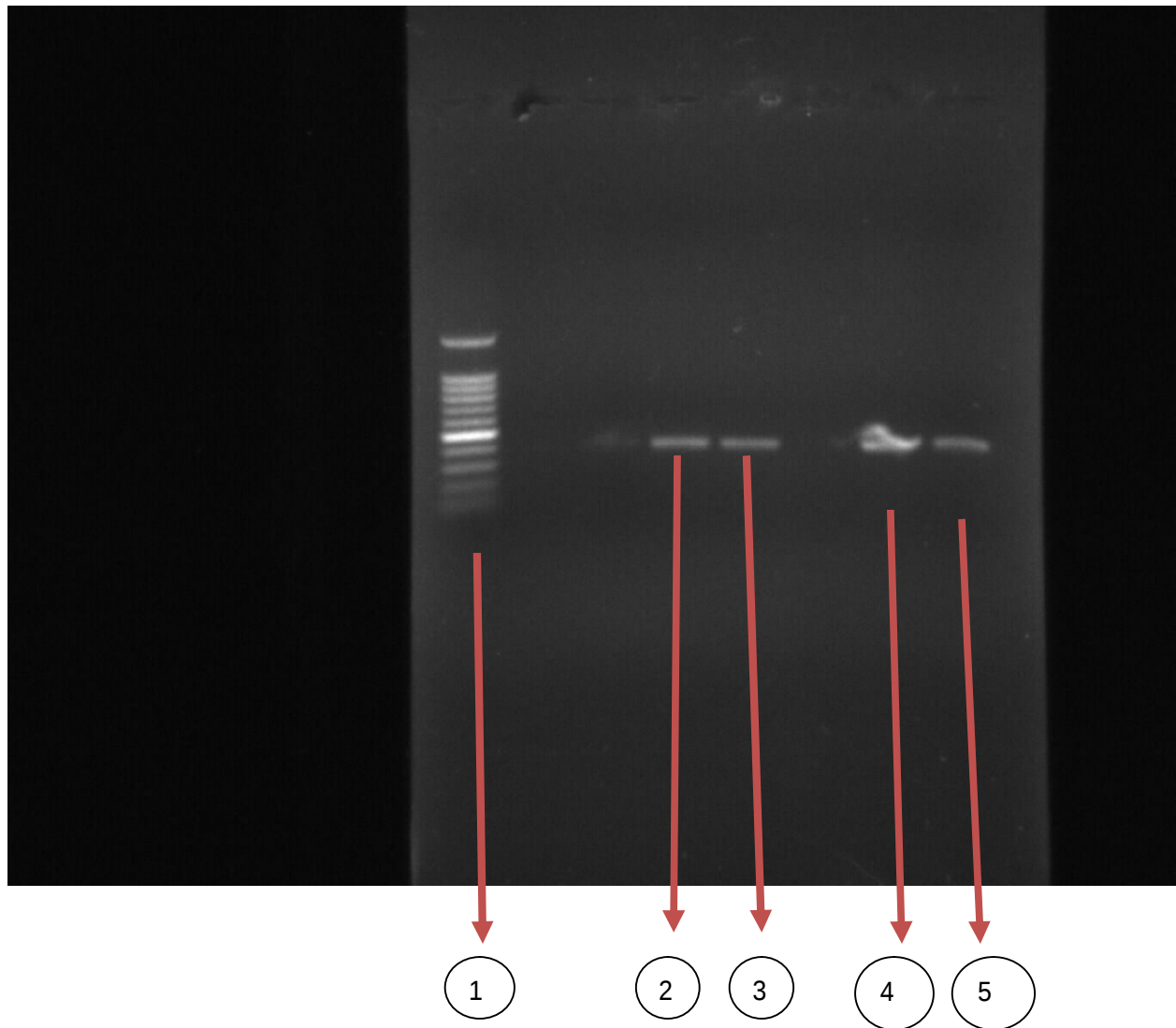
Bagian C: Loading and running the gel

1. Masukkan 10 μ L 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 10 μ L 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.
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.

Hasil Praktikum elektroforesis gel agarose :



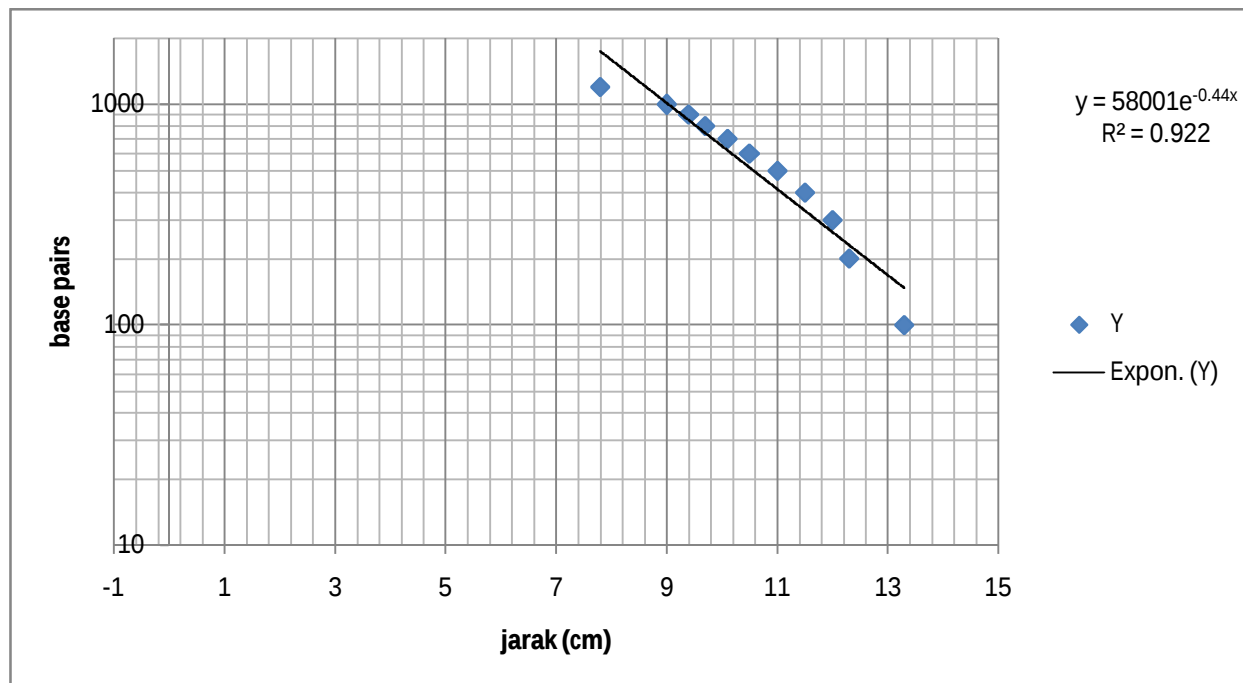
Keterangan :

1. Standard
2. Sel epitel jeni
3. darah liza
4. Sel epitel selly
5. Sel epitel paska

Marker

band	Jarak (cm)	Base pairs
band 1	13,3	100
band 2	12,3	200
band 3	12	300
band 4	11,5	400
band 5	11	500
band 6	10,5	600
band 7	10,1	700
band 8	9,7	800
band 9	9,4	900
band 10	9	1000
band 11	7,8	1200

Grafik hasil elektroforesis Agarose



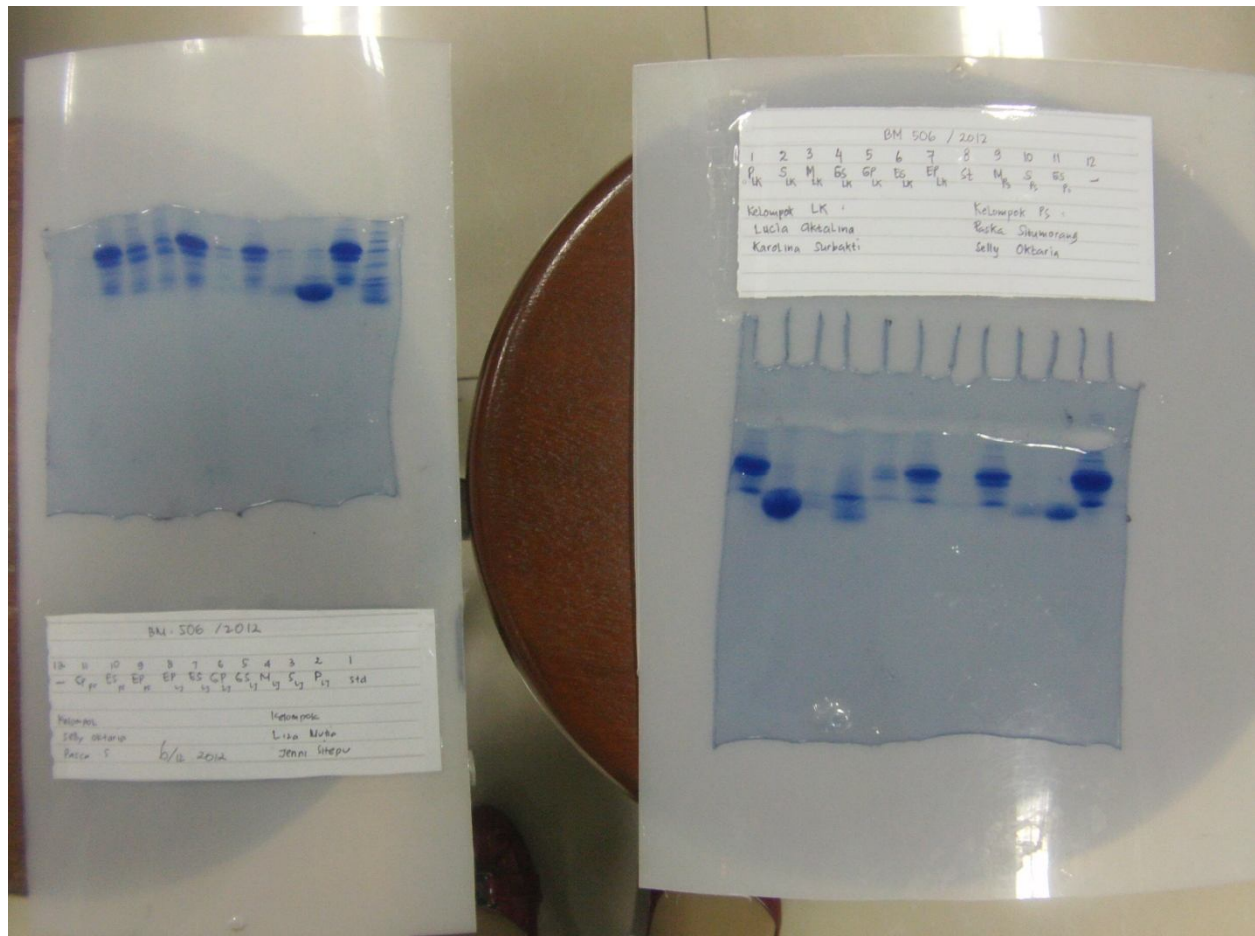
Hasil sampel

	Jarak (cm)	Base pairs
Sel epitel jeni	11,2	379,71
Darah Liza	11,2	379,71
Sel epitel selly	11,3	363,04
Sel epitel paska	11,2	379,71

Kesimpulan :

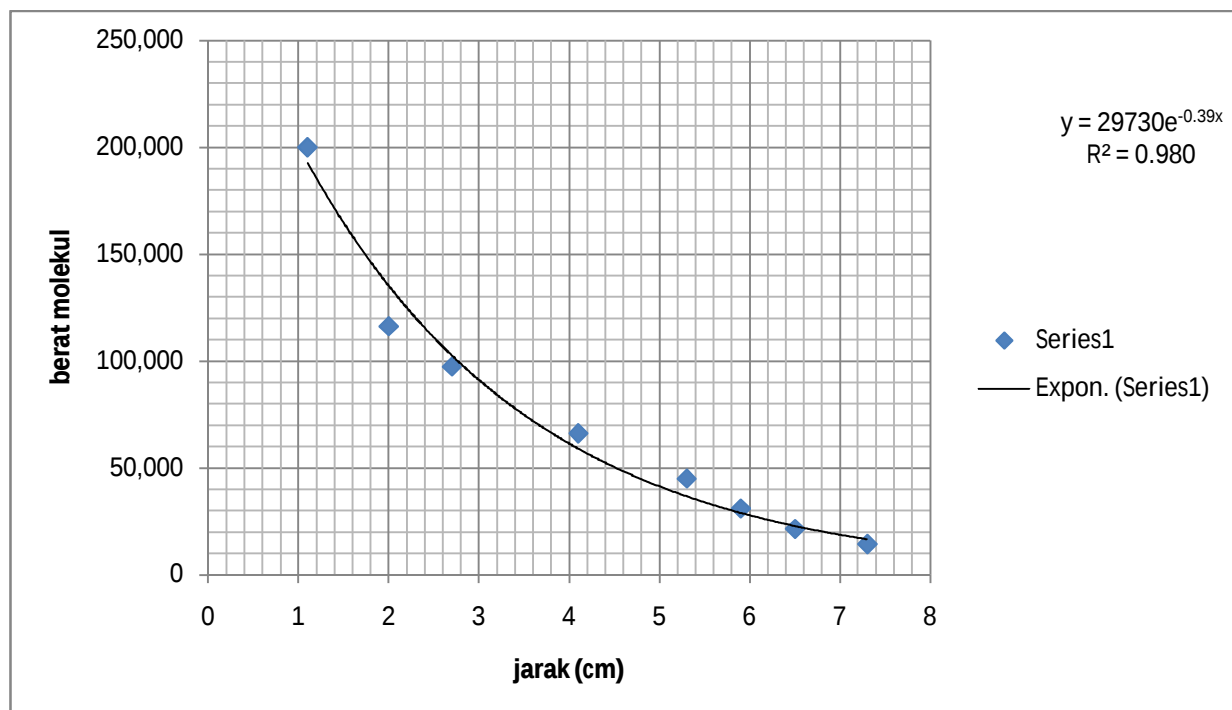
1. Hasil sampel sel epitel dan darah sebesar > 300 base pairs pada lokasi band ke 3
2. Dari hasil PCR yang diperoleh melalui gambar, tampak band-band yang hilang, hal ini dikarenakan kesalahan teknik pada menginjeksi sampel.
3. Tidak ada perbedaan yang mencolok dari semua sampel.

Hasil praktikum SDS page :

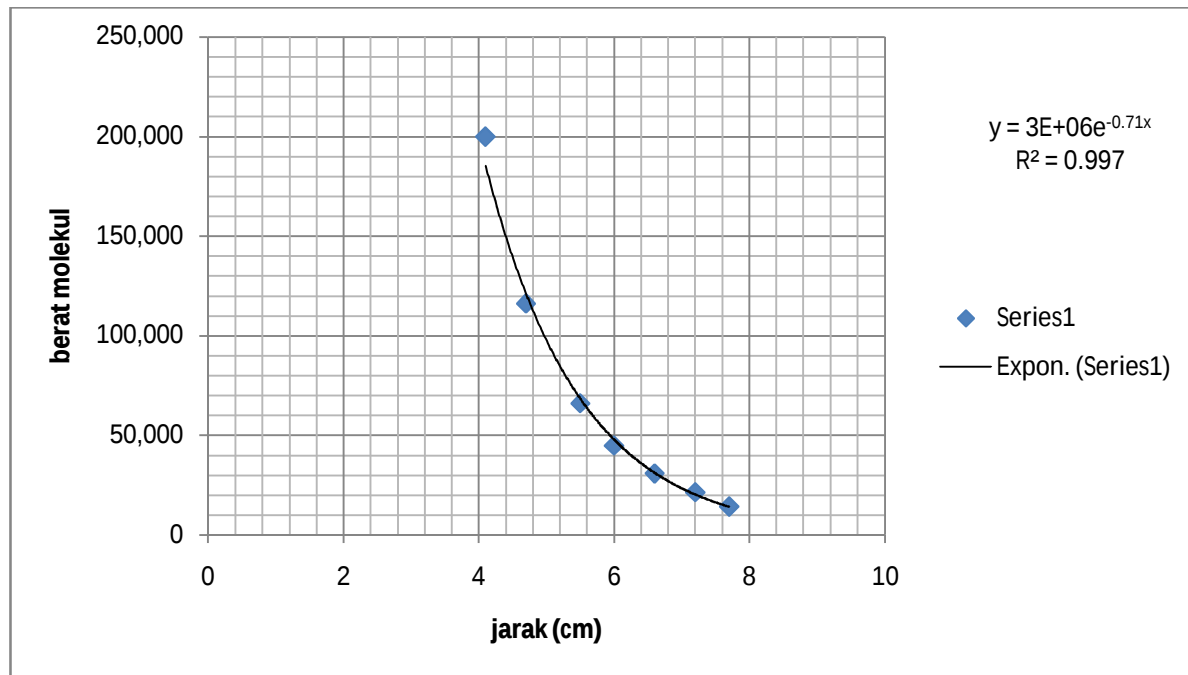


protein	standard 1 jarak (cm)	berat molekul	Ep	Es	standard 2 jarak (cm)	M	S	Gs
myosin	1,1	200.000			4,1			4,4
Galactosidase	2	116.250			4,7			5
Glycogen phosphorylase b	2,7	97400	3,2	3,2				
Bovine serum albumin	4,1	66200	4,3	4,1	5,5			5,5
ovalbumin	5,3	45000			6			6,3
carbonic anhydrase	5,9	31000			6,6			7
trypsin inhibitor	6,5	21500	6,5	6,5	7,2			7,7
lysozyme	7,3	14400	7	7	7,7	8,5	8,5	

Grafik Hasil SDS Akrilamit 1 :



Grafik Hasil SDS Akrilamit 2 :



Tabel hasil sampel elektroforesis :

Nama sampel	Berat molekul (Daltons)	Nama protein
Ep	84264,88	Glycogen
	54629,02	Albumin
	22960,26	trypsin inhibitor
	18854,75	lysozyme
Es	84264,88	Glycogen
	59107,94	Albumin
	22960,26	trypsin inhibitor
	18854,75	lysozyme
M	10441,26	lysozyme
S	10441,26	lysozyme
Gs	52518,49	Myosin
	41461,50	Galactosidase
	34047,80	Albumin
	24842,73	Ovalbumin
	18854,75	carbonic anhydrase
	14310,10	trypsin inhibitor

Kesimpulan :

1. Pada hasil sampel elektroforesis tidak tampak Gp (Protein dalam pengendapan), hal ini karena terjadi kesalahan pada saat memindahkan sampel.
2. Berdasarkan dari hasil sampel dari standar 1 didapat sampel Ep dan Es terdapat protein Glycogen, Albumin, trypsin inhibitor dan lysozyme
3. Hasil sampel pada standard ke2 tidak dapat disimpulkan karena standard yang digunakan belum benar.

Saran :

1. Waktu yang dibutuhkan dalam praktikum PCR dan SDS Page sebaiknya jangan terlalu singkat, perlu adanya kesesuaian dengan praktikum tersebut.
2. Kebersihan masih perlu diperhatikan.
3. Dalam memasukkan sampel ke dalam sumur diperlukan ketelitian dan kehati-hatian.