

Laporan Praktikum
Isolasi DNA, Teknik PCR dan Elektroforesis Agarose

Hari / Tanggal Praktikum : Kamis / 1 November dan 22 November 2012
Nama Praktikan : Rica Vera Br. Tarigan dan Jekson Martiar Siahaan
Pukul : 08.00 – 15.00

A. TUJUAN PRAKTIKUM

Agar mahasiswa/i dapat:

1. Melakukan isolasi DNA dari darah dan dari sel epitel
2. Memahami bahwa DNA dapat diperoleh dari jaringan apapun yang memiliki inti sel
3. Memahami prinsip dasar PCR dan Elektroforesis Agarose
4. Menggunakan alat elektroforesis dengan benar untuk membaca nilai base pair fragment DNA
5. Mengolah data yang diperoleh dari praktikum untuk memperoleh base pair fragment DNA
6. Mengumpulkan data dari hasil praktikum
7. Membuat dan menginterpretasi grafik.

B. ALAT DAN BAHAN

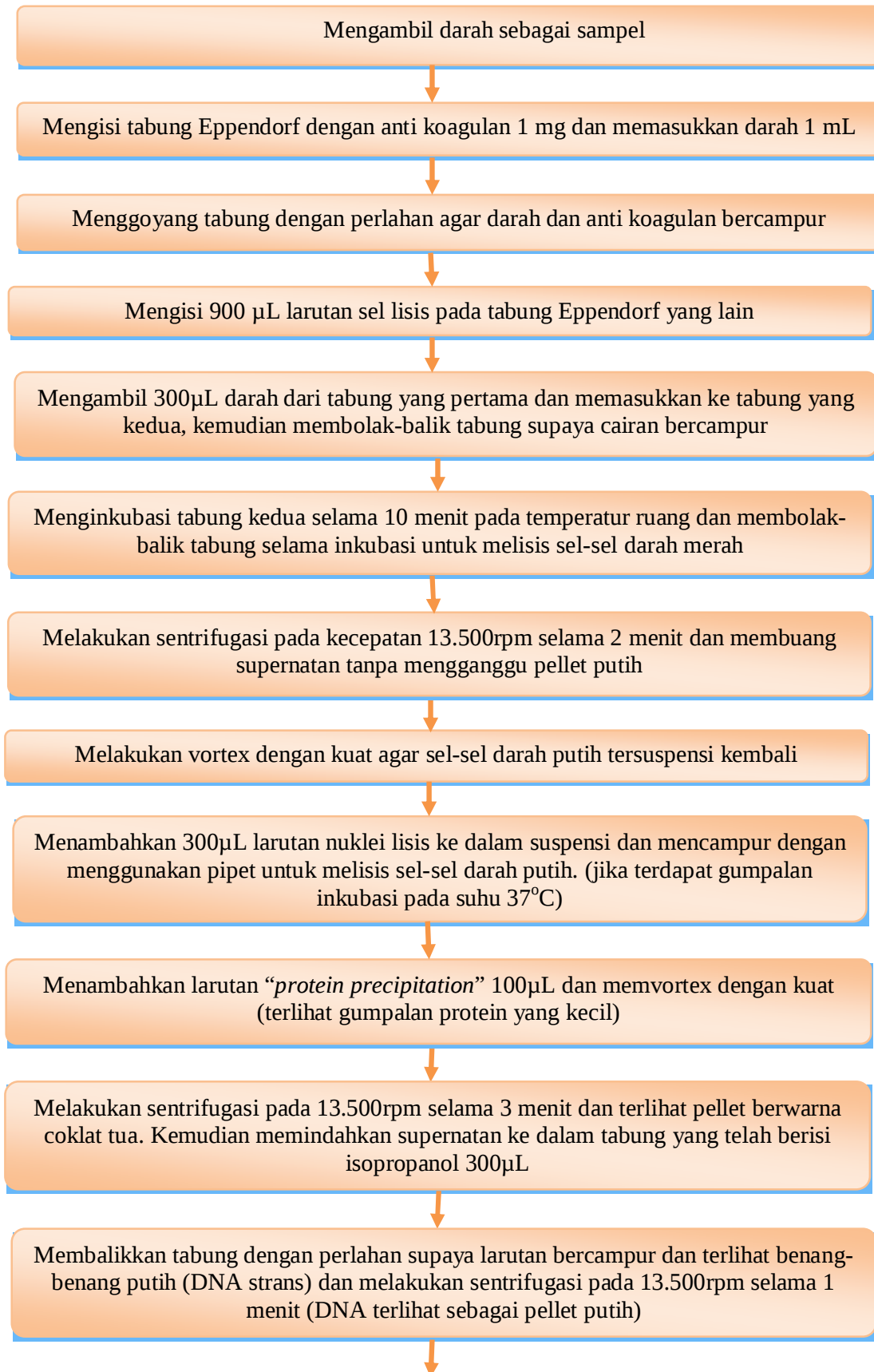
Minuman Isotonik	pH Meter	Rak Tabung Reaksi
Batang Kayu	Tabung Reaksi	Tris-EDTA
Timbangan Digital	Vortex	HCl
Stok Proteinase K	Mikrosentrifus	Etanol dingin
Tabung Mikrosentrifus	Spidol	NaCl
Beaker Glass	Pipet Mohr	Darah
Waterbath	Pipet Otomatik	Isopropanol
Larutan nuklei lisis	Larutan RNAase	Anti koagulan
Larutan sel lisis	Etanol 70%	Pipet tetes
Larutan rehidrasi DNA	Larutan " <i>protein precipitation</i> "	Tisu / Kertas Absorben
Jarum	PCR	

C. CARA KERJA

1. Isolasi DNA dari Sel Epitel



2. Isolasi DNA dari darah



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.



Mengambil etanol perlahan dengan pipet tanpa mengganggu pellet dan meletakkan tabung terbalik pada kertas absorben. Setelah kering menambahkan larutan rehidrasi DNA 100 μ L

3. Elektroforesis Agarose

Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

1. 1X TBE (larutan yang disiapkan 500 mL) sehingga resep untuk membuat larutan berubah menjadi 5,4 g Tris, 2,75 g asam borik, 0,37 g EDTA dan menambahkan akuades sampai 450 mL, setelah diaduk dengan magnetic stirer sampai larut dilakukan penambahan aquades sampai volume menjadi 500 mL.

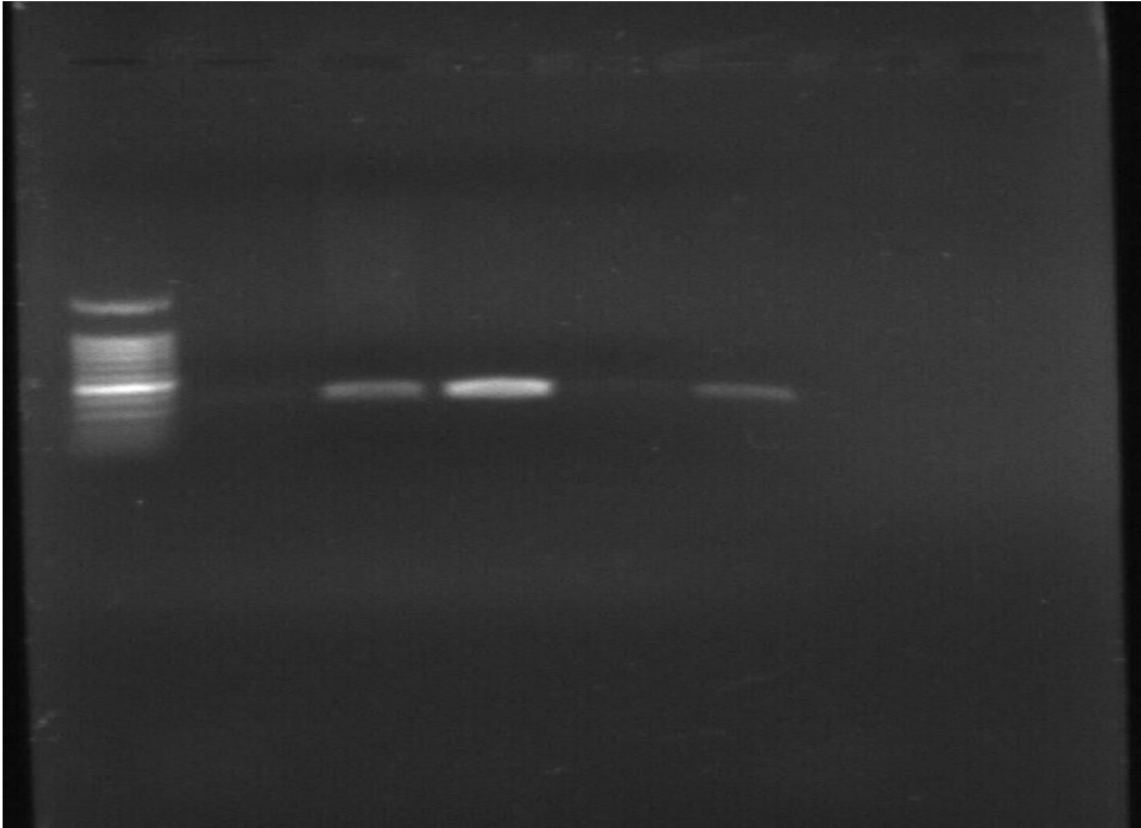
2. 0,8% Agarose

Bahan yang digunakan untuk membuat 0,8% agarose menjadi memasukkan 0,32 g agarose ke dalam beaker glass dan menambahkan 40 mL larutan 1x TBE buffer solution. Kemudian larutan dipanaskan dari yang putih susu menjadi jernih.

4. Hasil dan Pembahasan:

a. Hasil

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

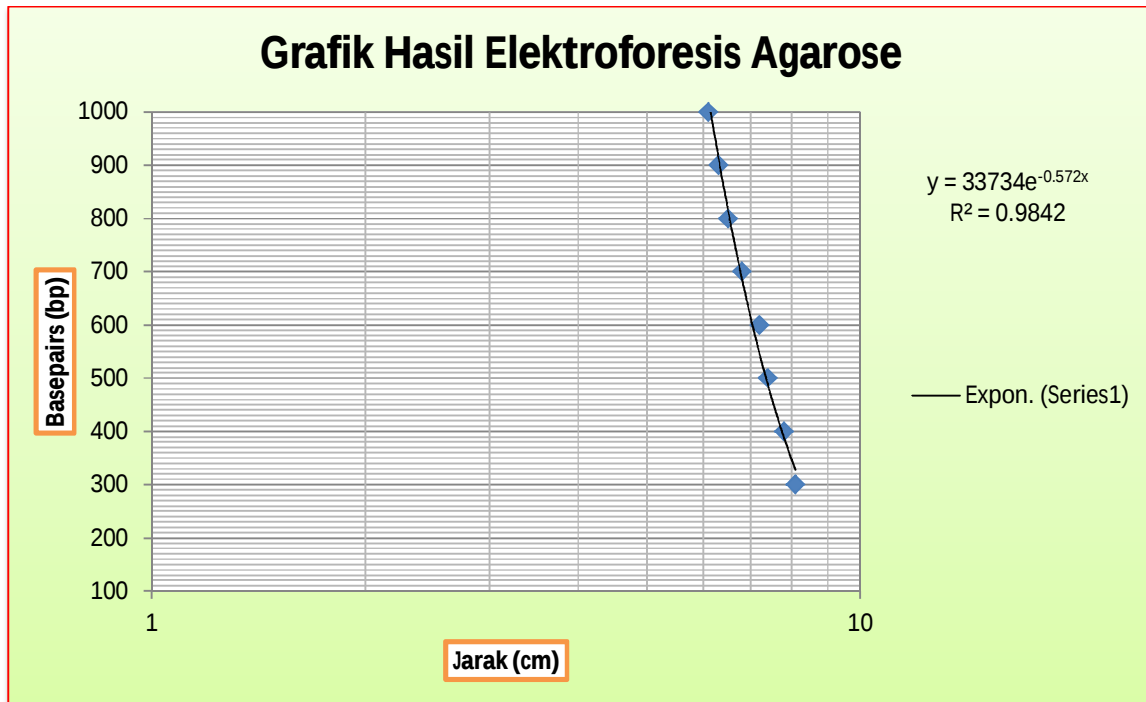


Gambar 1. Foto Hasil Elektroforesis Agarose

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 (cm) dan Basepairs (bp) Hasil Elektroforesis Agarose Marker

Jarak (cm)	Basepairs (bp)
6.1	1000
6.3	900
6.5	800
6.8	700
7.2	600
7.4	500
7.8	400
8.1	300
7.5	Sampel Darah



Gambar 2. Grafik Jarak vs Basepairs Hasil Elektroforesis Agarose Marker

b. Pembahasan

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

- Denaturasi pada suhu 95°C selama 45 detik sebanyak 35 siklus (DNA memisah)
- Annealing pada suhu 60°C selama 45 detik (pimer menempel)
- Extensi pada suhu 72°C selama 45 detik (DNA diperpanjang)
- Extensi pada suhu 72°C selama 7 menit
- Soaking pada suhu 4°C (dilakukan untuk menurunkan suhu)

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-retak dan agar-agar juga tidak boleh terlalu dingin karena agar-agar akan mengental dan tidak dapat menjadi sumur. Saat menuang agar-agar ke dalam cetakan yang harus diperhatikan adalah gelembung udara karena tidak boleh ada gelembung udara pada saat menceta 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. Untuk sampel digunakan pewarna sebanyak 2µL dan sampel (DNA) sebanyak 8µL, pewarna dan DNA dijadikan satu di atas parafilm kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing sumur. 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 negatif ke positif.

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

Berdasarkan data yang diperoleh dari hasil elektroforesis agarose diperoleh rumus untuk menghitung basepairs dari sampel. Pada sampel diketahui jarak nya adalah 7,5 cm dan diperoleh basepairs sampel 469,31 bp. Dalam hal ini marker yang digunakan untuk 360 bp dan gen MMIF (Makrofag Migration Inhibitor Factor). Dari hasil yang diperoleh basepairs sampel adalah 469,31bp sedangkan marker yang digunakan untuk menentukan 360 bp. Dalam hal ini tidak sesuai marker dengan sampel yang berarti tidak ada gen MMIF pada DNA yang diteliti.

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 pada 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 dari pada isolasi DNA yang berasal dari darah. Tahapan pengerjaan isolasi dari darah lebih rumit dan lebih kompleks.
3. Etanol menyebabkan adanya ruang untuk DNA menggumpal.

5. KESIMPULAN dan SARAN

- a. Kesimpulan
 - Teknologi PCR digunakan untuk memperbanyak sampel DNA.
 - DNA yang diperoleh dari darah lebih banyak daripada DNA dari hasil isolasi sel epitel.
 - 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.

- Marker yang hasil dari elektroforesis bertumpuk diakibatkan karena saat memasukkan marker ke dalam sumur kurang hati-hati dan mungkin diakibatkan karena kurangnya waktu saat elektroforesis.
- Dari hasil elektroforesis yang diperoleh hanya band yang berasal dari darah, sedangkan yang berasal dari sel epitel tidak terlihat.
- Setelah data diinterpretasikan ke dalam grafik diperoleh basepair dari fragment DNA darah adalah 469.31 bp dengan jarak band 7.5 cm. Hal ini tidak sesuai dengan primer yang digunakan.

b. Saran

- Saat praktikan mengisolasi DNA dari sel epitel dan dari darah sebaiknya lebih diperhatikan oleh survervisor sehingga kesalahan dalam pengerjaan prosedur dapat dikurangi dan DNA diperoleh dengan benar.
- Peralatan yang digunakan untuk praktikum sebaiknya ditambah sehingga memudahkan untuk pengerjaan praktikum dan praktikan juga lebih memahami proses praktikum.

Laporan Praktikum
Isolasi Protein Darah dan Elektroforesis SDS-PAGE

Hari / Tanggal Praktikum : Kamis / 8 November dan 12 Desember 2012
Nama Praktikan : Rica Vera Br. Tarigan dan Jekson Martiar Siahaan
Pukul : 08.00 – 11.00

1. TUJUAN PRAKTIKUM

Agar mahasiswa/i dapat:

1. Mengerti teknik sentrifugasi untuk pemisahan bagian-bagian sel
2. Melakukan isolasi protein dari darah
3. Memahami prinsip dasar Elektroforesis SDS-Page
4. Menggunakan alat elektroforesis dengan benar untuk membaca nilai berat molekul protein dari DNA
5. Mengolah data yang diperoleh dari praktikum untuk memperoleh berat molekul protein dari DNA
6. Mengumpulkan data dari hasil praktikum
7. Membuat dan menginterpretasi grafik.

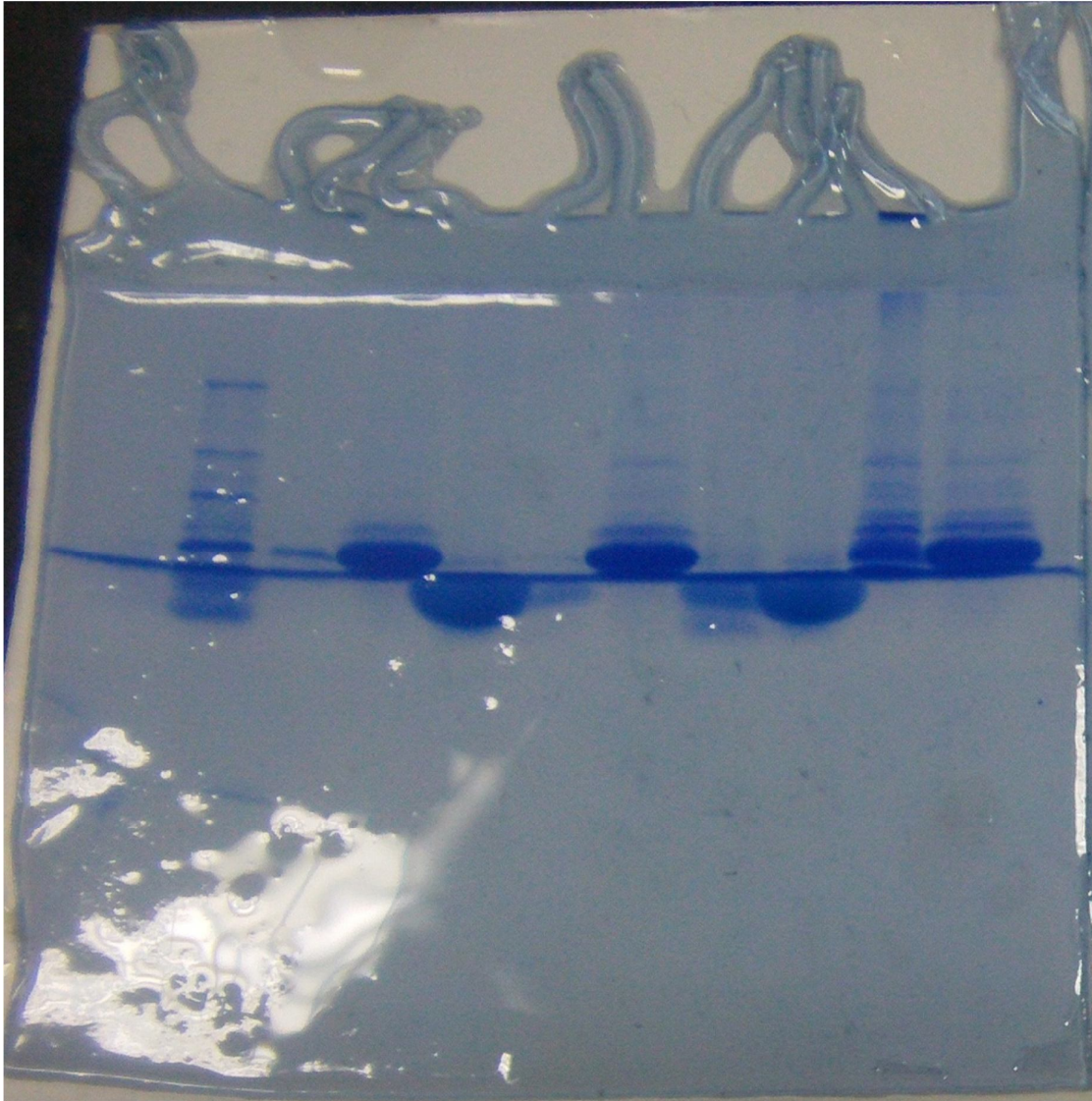
2. ALAT DAN BAHAN

Jarum steril	Tabung steril	Tabung sentrifuse klinik 14 mL
Sentrifus klinik	Pipet otomatis	Tabung mikrosentrifus 2 mL
mikrosentrifus	Pipet tetes	Tabung mikrosentrifus 1,5 mL
es	Vorteks	Larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jenuh
pH meter	NaCl	Larutan 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Tabung reaksi dan rak	Na_2PO_4	Etanol absolut dingin
Pipet Mohr	EDTA	Tisu
spidol	Akrilamide 30%	1,5 M Tris-HCl
0,5 M Tris-HCl	SDS	Amonium persulfat 10%
Temed	Alat elektroforesis	

3. Hasil dan Pembahasan:

a. Hasil

Dari isolasi protein diperoleh sampel, yaitu sampel protein membran (M), sampel protein pengendapan garam tinggi (Gp), Sampel protein supernatan garam tinggi (Gs), sampel protein supernatan etanol (Es), sampel protein pengendapan etanol tinggi (Ep) dan sampel protein sitoplasmik (S).

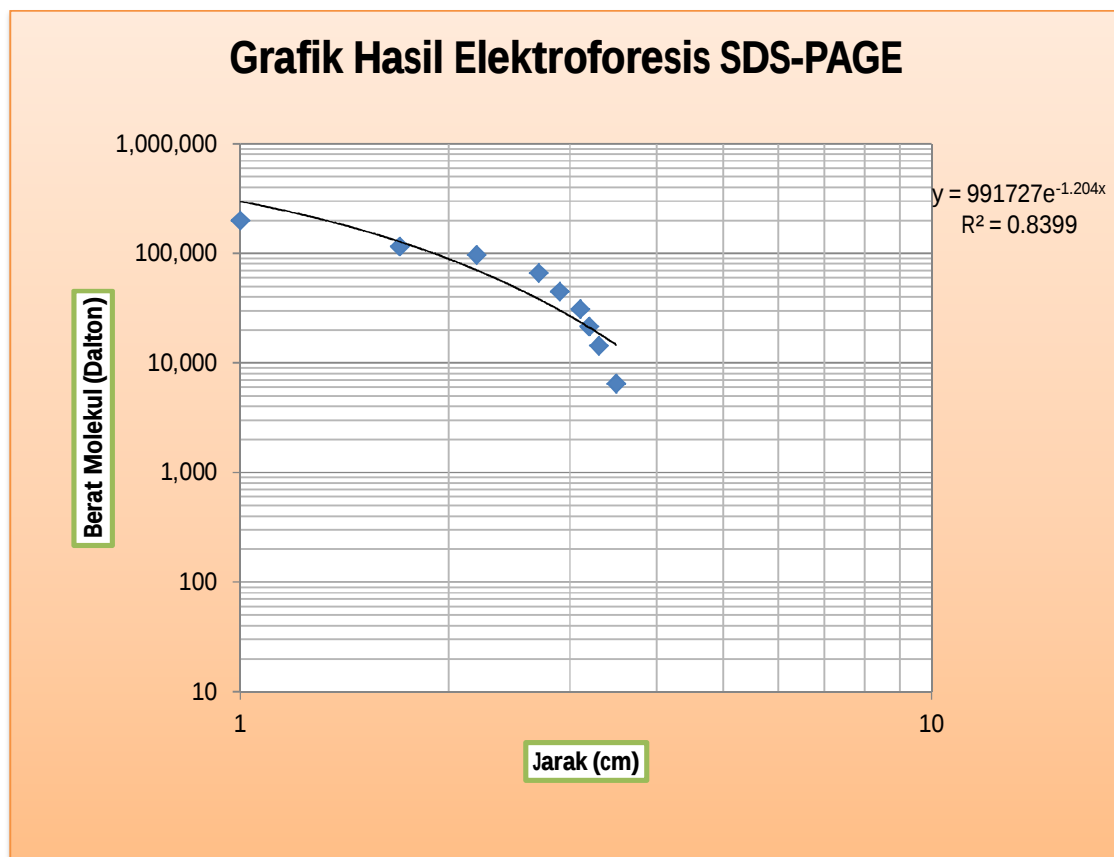


Gambar 1. Foto Hasil Elektroforesis SDS-PAGE

Dari foto dapat diperoleh jarak dan berat molekul dari marker yang menjadi standart untuk menentukan berat molekul sampel. Data hasil pengukuran dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Data Jarak dan Berat Molekul Hasil Elektroforesis SDS-PAGE

Standart	Jarak (cm)	Berat Molekul (Dalton)
Miosyn	1	200,000
B-Galaktosidase	1.7	116,250
Phosphosylase b	2.2	97,400
albumin	2.7	66,200
ovalbumin	2.9	45,000
carbonicanhydrase	3.1	31,000
trypsin inhibitor	3.2	21,500
Lysozyme	3.3	14,400
Aprotinin	3.5	6,500



Gambar 2. Grafik Jarak dan Berat Molekul Hasil Elektroforesis SDS-PAGE

b. Pembahasan

SDS (Sodium Dodesil Sulfat) Polakrilamida merupakan teknik deterjen ionik yang dapat melarutkan molekul hidrofobik yang memberikan muatan negatif pada keseluruhan struktur protein. Cara kerja SDS-PAGE adalah dengan menghambat interaksi hidrofobik dan merusak ikatan hidrogen.

Pada pembuatan gel volume total yang akan digunakan adalah 6,4 mL dimana 5,2 mL adalah gel pemisah dan 1,2 mL adalah gel penumpuk dengan masing – masing data sebagai berikut:

Tabel 2. Data bahan gel penumpuk dan gel pemisah

Bahan	Gel Pemisah	Gel penumpuk
- Akrilamide	1880 µL	360 µL
- 1,5 Tris-HCl	1280 µL	-
- 0,5 Tris HCl	-	240 µL
- Akuades	1930 µL	700 µL
- SDS 10%	56 µL	10 µL
- Amonium persulfat 10%	38 µL	7,2 µL
- Temed	3, 7 µL	1 µL

Dari grafik diperoleh jarak band sampel protein darah dan berat molekul sebagai berikut :

Tabel 3. Data hasil perhitungan berat molekul sampel dari rumus grafik

Sumur 3 (x)	Berat Molekul (Dalton)	Sumur 4 (x)	Berat Molekul (Dalton)	Sumur 5 (x)	Berat Molekul (Dalton)	Sumur 6 (x)	Berat Molekul (Dalton)	Sumur 7 (x)	Berat Molekul (Dalton)
2,8	3444,765	2,5	4937,483	2,8	3444,765	3,2	2131,563	1,8	11437,023
		2,8	3444,765	3,3	1890,527			2,5	4937,483
								2,8	3444,765

Dari data tersebut diketahui bahwa data tersebut tidak sesuai dengan jarak pada standard, hal ini dikarenakan pada grafik garisnya tidak linier sehingga rumus nya tidak sesuai untuk menghitung berat molekul dari jarak band yang diketahui. Berat molekul juga tidak sesuai dikarenakan jarak marker pada hasil elektroforesis tidak terlihat dengan jelas yang mengakibatkan praktikan kesulitan menentukan jarak setiap standard yang sebagai protein. Hal lain mungkin waktu yang digunakan untuk elektroforesis kurang sehingga band – band dari setiap sampel dan marker belum terpisah dengan baik jelas.

Hal yang perlu diperhatikan juga saat menuangkan gel penumpuk dan gel pemisah adalah gel pemisah tidak boleh dituang sebelum gel penumpuk benar-benar membeku karena jika gel

pemisah dituang saat gel penumpuk belum membeku, sumur yang terbentuk belum sempurna dan tidak mampu menampung cairan yang dituang sehingga cairan akan merembes ke semua sumur dan akibatnya sampel tidak dapat dianalisis.

Pada sampel Ep (pengendapan etanol tinggi) diperoleh protein sebanyak 1 dengan berat molekul 3444,765 Dalton, pada sampel Es (protein supernatan etanol) diperoleh protein sebanyak 2 dengan berat molekul 4937,483 Dalton dan 3444,765, pada sampel S (protein sitoplasmik) diperoleh protein sebanyak 2 dengan berat molekul 3444,765 Dalton dan 1890,527 Dalton, pada sampel M (membran) diperoleh protein sebanyak 1 dengan berat molekul 2131,563 Dalton, Gs (supernatan garam tinggi) diperoleh protein sebanyak tiga 3 dengan berat molekul 11437,023 Dalton, 4937,483 Dalton dan 3444,765 Dalton.

Protein yang diperoleh dari sampel protein dalam pengendapan etanol (Ep), protein dalam supernatan etanol, dan protein dalam supernatan pengendapan dengan larutan garam tinggi yang berasal dari plasma dimana pada plasma terdapat protein albumin dan dari hasil foto diketahui ada protein albumin pada sampel tersebut dengan berat molekul albumin 66.200 Dalton.

4. KESIMPULAN dan SARAN

a. Kesimpulan

- Berat molekul protein sampel tidak sesuai dengan standard yang dikarenakan jarak marker standard tidak terlihat jelas yang membingungkan praktikan untuk menentukan jaraknya.
- Protein yang diperoleh dari sampel protein dalam pengendapan etanol (Ep), protein dalam supernatan etanol, dan protein dalam supernatan pengendapan dengan larutan garam tinggi yang berasal dari plasma dimana pada plasma terdapat protein albumin dan dari hasil foto diketahui ada protein albumin pada sampel tersebut.
- Pada sampel Ep (pengendapan etanol tinggi) diperoleh protein sebanyak 1 dengan berat molekul 3444,765 Dalton, pada sampel Es (protein supernatan etanol) diperoleh protein sebanyak 2 dengan berat molekul 4937,483 Dalton dan 3444,765, pada sampel S (protein sitoplasmik) diperoleh protein sebanyak 2 dengan berat molekul 3444,765 Dalton dan 1890,527 Dalton, pada sampel M (membran) diperoleh protein sebanyak 1 dengan berat molekul 2131,563 Dalton, Gs (supernatan garam tinggi) diperoleh protein sebanyak tiga 3 dengan berat molekul 11437,023 Dalton, 4937,483 Dalton dan 3444,765 Dalton.

b. Saran

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