

LAPORAN PRAKTIKUM

Isolasi DNA dari Epitel dan Darah (5), Isolasi Protein Darah(6) dan PCR (Elektroforesis agarose dan Akrilamid)(7)

Nama : Maria Lestari (127008012)
Rebecca Rumesty Lamtiar (127008016)

Hari / Tanggal Praktikum : Kamis 1 November 2012
Kamis / 8 November 2012
Kamis / 22 November 2012
Kamis / 13 Desember 2012

Waktu Praktikum : Pukul 12.00 – 17.30 WIB

Latar belakang:

DNA dapat diisolasi dari jaringan apapun yang mempunyai sel inti. Langkah-langkah yang harus diikuti dengan jaringan apapun adalah: diantaranya proses pengumpulan sel-sel (*cell harvest*), pemecahan sel-sel (*cell lysis*), pencernaan protein agar asam nucleat dilepaskan (*protein digestion*) dan pengendapanan DNA (*DNA precipitation*) Pada praktikum ini, DNA akan diisolasi dari “jaringan” Anda sendiri, yaitu sel-sel epitelial mulut. Pada pr PCR (polimer chain reaksi) akan dilaksanakan dengan sampel DNA manusia. Pada praktikum elektroforesis Anda akan periksa hasil isolasi DNA dari epitel manusia dan hasil PCR DNA orang dengan teknik elektroforesis agarose dan akrilamid.

Tujuan Praktikum:

1. Mengerti metode umum mengisolasi DNA
2. Mengisolasi DNA dari sel-sel epithelial mulut dan dari darah
3. Memahami tehnik sentrifugasi untuk pemisahan bagian –bagian sel
4. Mengerti dan mempraktek teknik PCR dengan sampel DNA manusia
5. Memahami prinsip elektroporesis
6. Melatih tehnik elektroforesis dengan sampel darah dan epitel manusia
7. Menggunakan tehnik SDS-PAGE untuk memisahkan protein-protein darah

ISOLASI DNA YANG BERASAL DARI EPITEL

Prinsip Kerja

Isolasi DNA merupakan langkah yang tepat untuk mempelajari DNA. Prinsipnya ada dua, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Sentrifugasi merupakan teknik untuk memisahkan campuran berdasarkan berat molekul komponennya. Molekul yang mempunyai berat molekul besar akan berada di bagian bawah tabung dan molekul ringan akan berada pada bagian atas tabung. Hasil sentrifugasi akan menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah, yaitu supernatan pada bagian atas dan pelet pada bagian bawah. Presipitasi merupakan langkah yang dilakukan untuk mengendapkan suatu komponen dari campuran.

Alat dan Bahan

Tabel 1. Alat dan Bahan yang berasal dari Epitel

minuman isotonik	Beaker	pH meter	Akuades
batang kayu	Waterbath	tabung reaksi	mikrosentrifus
timbangan digital	EDTA	Spidol	SDS
stok proteinase K (100g/ml)	NaCl	Vortex	etanol dingin
Tabung mikrosentrifus	Tris	1 N HCl	pipet Mohr

Cara Kerja:

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

Minuman isotonik sudah disediakan di ruang praktikum

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

Disiapkan 50mL buffer Tris EDTA yang cukup untuk semua kebutuhan praktikum ini.

Berat molekul Tris = 121,1 g/mol; EDTA = 292,2 g/mol.

Simpan di dalam botol bersih pada temperatur ruangan.

Persiapan buffer 2,5M NaCl; 50mL.

3. Panen sel-sel

- a. Dengan batang kayu, gosok bagian dalam pipi selama 30 detik. Jangan ditelan.
- b. Kumur 10 mL minuman isotonic di dalam mulut sekaligus menggosok pipi-pipi selama 1 menit. Jangan ditelan. Keluarkan minuman tersebut ke dalam beaker. Inilah merupakan larutan sel Anda.

4. Lisis sel-sel dan pencernaan protein

- a. Tentukan waterbath pada temperatur 65C.
- b. Dengan pipet otomatis, ambil 1,5 mL larutan sel ke dalam tabung efendorf.
- c. Dengan sampel orang lain sebagai keseimbangan, sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 10,000rpm. Buanglah supernatant dan tambah larutan sel Anda lagi.
- d. Ulangi langkah 5 dan 6 dua kali lagi supaya endapan semakin banyak.
- e. Tambah 1 mL buffer Tris-EDTA yang berfungsi untuk melisiskan sel selnya
- f. Vortex sampel selama 30 detik (endapan sudah hancur).
- g. Tambahkan 50µL Proteinase K dan biarkan di waterbath(65C) selama 10 menit. Proteinase K ini membantu terbentuknya endapan yang mengandung DNA.

6. Pengendapan DNA

1. Tambahkan 100µL NaCl, 2,5M sebagai bagian dari proses salting out. Aduk dengan cara mebolak-balikkan tabungnya.
2. Transfer semua ke tabung reaksi yang bersih dan kering dengan hati-hati biar tidak banyak buih-buih.
3. Dengan hati-hati tambahkan 1 mL etanol dingin supaya batasnya jelas.
4. Diamkan selama 5 menit
5. DNA akan menggumpal di batasan buffer dan etanol (kelihatan seperti benang putih)
6. DNA diambil dengan batang kaca atau besi ipet otomatis dan ditaruh di tabung sentrifugasi kecil. Pakailah tisu utk mengisap 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 dilihat sebagai endapan. Buanglah supernatant.

7. Simpan di bawah 0°C

Hasil Pengamatan:

Didapat endapan pelet putih yang mengandung DNA epitel yang nantinya akan diisolasi

ISOLASI DNA YANG BERASAL DARI DARAH

Prinsip Kerja

Sel darah merah dilisiskan dengan larutan lisis kemudian terbentuk nukleus (gumpalan putih) dilisiskan dengan larutan nukleus lisis. Lalu penambahan protein precipitation untuk mengikat protein. Kemudian penambahan isopropanol diberikan untuk pembentukan DNA strands. Penambahan etanol 70% dilakukan untuk mencuci DNA strands. Proses yang terakhir ditambahkan larutan rehidrasi DNA ditambahkan untuk menghilangkan air pada strand DNA.

Alat dan Bahan

Tabel 2. Alat dan Bahan Isolasi DNA yang berasal dari Darah

Darah (1 cc)	Larutan RNA ase (bila ingin melihat RNA)	Antikoagulan
Isopropanol	Larutan sel lisis	70% etanol
Larutan nuklei lisis	Larutan rehidrasi DNA	Larutan protein precipitation
Water bath	Tabung mikrosentrifus	Mikrosentrifus
Vorteks	Tissue	Pipet tetes

Cara Kerja:

1. Ambil satu tabung Eppendorf (tabung mikrosentrifus 1,5 mL) yang steril. Isi dengan 1mg anti koagulan (EDTA, heparin atau citrat) dan masukkan 1ml darah kedalamnya.
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 10-20 μ l 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 μ l 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. Tambahkan larutan “*protein precipitation*” sebanyak 100 μ l kedalam larutan yang diperoleh pada langkah 9 dan vortex dengan kuat selama 10-20 detik. Gumpalan protein yang kecil mungkin akan terlihat.
11. 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.
12. Pindahkan supernatannya kedalam tabung Eppendorf steril yang berisi 300 μ l isopropanol (temperatur ruangan).
13. Tabung dibalikkan perlahan-lahan supaya larutan bercampur dan akan terlihat massa seperti benang-benang putih (DNA-strands).
14. 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.
15. 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 14 diatas.
16. 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.
17. Tambahkan 100 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.
18. DNA disimpan pada temperatur 2-8°C atau untuk jangka panjang pada -20°C

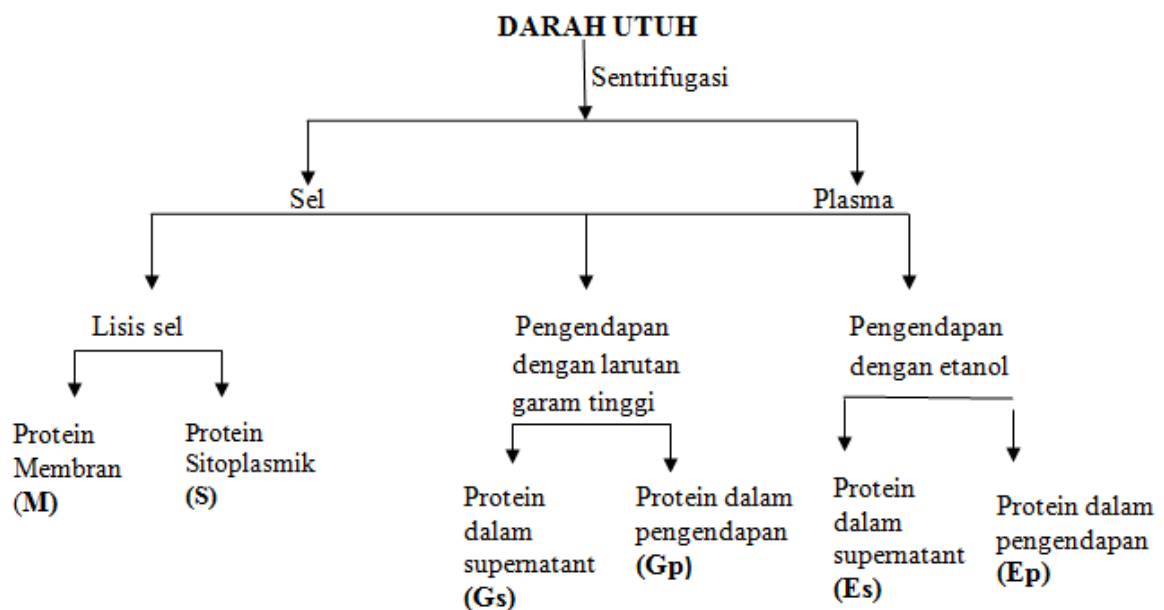
Hasil Pengamatan:

Endapan pelet putih yang didapat mengandung DNA yang berasal dari darah. Endapan ini disimpan pada temperatur 2-8⁰C, dan dapat dipakan dalam pemeriksaan DNA.

ISOLASI PROTEIN DARAH

Prinsip Kerja

Darah kita terdiri dari plasma serta sel-sel darah. Pada praktikum ini kita mencoba memisahkan protein plasma dari protein intraselular dan protein membran, maupun dari bagian sel lain dengan teknik sentrifugasi serta pengendapan protein dengan larutan garam konsentrasi tinggi (*salting out*) dan pengendapan protein dengan etanol (*alcohol precipitation*). Pada akhirnya diharapkan ada 6 sampel protein yang dapat dianalisa lanjut dengan SDS-PAGE minggu depan (yaitu M, S, Gs, Gp, Es, Ep). Schema (*flow-chart*) bagi kegiatan praktikum ini digambarkan di bawah.



Gambar 1. Skema Kegiatan Isolasi Protein Darah

Alat dan Bahan

Tabel 3. Alat dan Bahan Isolasi Protein Darah

Jarum steril	Tabung steril untuk darah	14 ml tabung sentrifuse klinik (3 buah)
Sentrifus klinik	Pipet otomatis	2 ml tabung mikrosentrifus (2 buah)
Mikrosentrifus	Pipet tetes	1,5 ml tabung mikrosentrifus
Es	Vorteks	Larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang jenuh ($> 13,2\text{g}/100\text{ml}$)
pH meter	NaCl	Larutan 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Tabung reaksi dan rak	Na_2PO_4	Tempat membuang cairan biologis
Pipet Mohr	EDTA	Etanol absolut, dingin
Tissue	Spidol	

Cara Kerja:

1. Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

- Buffer Cuci:** siapkan 100ml buffer yang berisi 150mM NaCl, 5mM Na_2HPO_4 , 0,1mM EDTA. Tentukan pH =7,4. Simpan di kulkas atau di dalam es.
- Buffer Hemolisis:** siapkan 100ml buffer yang berisi 5mM Na_2HPO_4 , 0,1mM EDTA. Tentukan pH =8. Simpan di kulkas atau di dalam es.

2. Pemisahan sel – sel darah dan plasma

- Sebanyak 4-5 ml darah diambil dari salah seorang perwakilan group meja (Perlu diingat bahwa diharapkan $\pm 1,5$ ml plasma dari darah yang diambil, dimana 500 μl plasma dibutuhkan untuk prosedur pengendapan dengan garam tinggi, 500 μl plasma untuk pengendapan dengan etanol dan 500 μl plasma lagi merupakan sampel protein plasma)
- Ditransfer darah ke tabung sentrifus klinik. Pakai tabung sentrifus yang lain agar seimbang dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selama 5 menit
- Ditransfer semua plasma (bagian supernatant) ke tabung mikrosentrifus (2ml) yang bersih dan kering. Tandai tabung dengan “Plasma” dan letak di dalam es. ini merupakan sampel plasma

- d. Dengan hati -hati buang sisa supernatan ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan pipet tetes
- e. Ditambahkan 6ml buffer cuci yang dingin ke tabung sentrifus klinik tersebut. Tutup dan vortex pelan - pelan agar sel-sel bercampur rata dengan buffer
- f. Pakailah tabung sentrifus klinik lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selama 5 menit
- g. Dengan hati - hati buang supernatant ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan pipet tetes
- h. Kemudian diulangi langkah 'f – g' sekali lagi. Endapan yang diperoleh merupakan sel-sel darah merah

3. Isolasi protein – protein dari sel –sel darah

- a. Pada tabung sentrifus klinik yang berisi sel- sel darah, tambahkan 6ml buffer hemolisis yang dingin
- b. Tutup dan vortex kuat
- c. Pakai tabung sentrifus klinik yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selama 10 menit
- d. Dengan hati-hati ambil 1 ml supernatan dari atas tabung sentrifus klinik dan masukkan ke dalam tabung reaksi mikrosentrifus yang 2ml. Tandai tabungnya dan letak di dalam es. Inilah merupakan sampel protein sitoplasmik (S). Langsung simpan diatas kulkas
- e. Buang $\pm$ 5ml supernatant lagi ke dalam tempat buangan dengan pipet tetes
- f. Tambahkan 7ml buffer hemolisis yang dingin. Vorteks hingga kuat
- g. Pakai tabung sentrifus klinik yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selam 10 menit
- h. Buanglah supernatant ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan hati– hati. 2ml yang paling bawah (termasuk pengendapan kalau ada) ditransfer ke tabung mikrosentrifus yang 2 ml sudah ditandai. Ini merupakan sampel protein membrane (M)

- i. Pakai tabung sentrifus yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus supaya hinge ke tengah alat. Putar selama 30 menit pada kecepatan 14.000 rpm
- j. Setelah 30 menit keluarkan tabung mikrosentrifus dengan hati – hati, akan terlihat endapan yang cukup halus. Kemudian buang supernatant ke tempat buangan cairan biologis. Tambahkan 500µl buffer hemolisis/cuci dan tutup tabung

4. Pengendapan protein plasma dengan larutan garam berkonsentrasi tinggi

- a. Pada tabung mikrosentrifus 1,5 ml tambahkan 250µl larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang jenuh. Tambahkan 500µl sampel plasma dari tabung yang disimpan tadi
- b. Tutup dan vortex kuat sebentar. Biarkan diam selama 5 menit di temperatur ruangan
- c. Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi
- d. Dengan hati - hati transfer 500µl supernatant ke tabung reaksi mikrosentrifus lain yang sudah ditandai. Letakkan di atas es. Inilah menjadi sampel protein supernatant garam tinggi (GS). Langsung simpan di bagian atas kulkas
- e. 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
- f. Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi
- g. Buanglah supernatant dan keringkan bagian di atas endapannya dengan tisu. Inilah merupakan sampel protein pengendapan garam tinggi (GP). Tambah 500µl buffer hemolisis dan simpan di bagian atas kulkas

5. Pengendapan protein plasma dengan etanol

- a. Pada tabung mikrosentrifus 1,5ml tambahkan 250µl etanol absolute yang dingin. Tambahkan 500µl sampel plasma dari tabung yang disimpan tadi
- b. Tutup dan vortex kuat sebentar. Biar diam selama 5 menit di atas es

- c. Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi
- d. Dengan hati – hati tdan jagalah supaya tabung mikrosentrifus transfer supernatan ke tabung reaksi mikrosentrifus lain yang sudah ditandai. Tambah 1ml etanol 50% dan campur dengan baik dengan pipet otomatis jagalah supaya tabung mikrosentrifus sedingin (kerjakan di atas es)
- e. Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi
- f. Buanglah supernatant dan keringkan bagian di atas endapannya dengan tisu. Inilah merupakan sampel protein pengendapan garam tinggi (EP). Tambah 500µl buffer hemolisis dan simpan di bagian atas kulkas
- g. Tentukan waterbath pada temperatur 65C.
- h. Dengan pipet otomatis, ambil 1,5 mL larutan sel ke dalam tabung efendorf.
- i. Dengan sampel orang lain sebagai keseimbangan, sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 10,000rpm. Buanglah supernatant dan tambah larutan sel Anda lagi.
- j. Ulangi langkah e dan f dua kali lagi supaya endapan yang didapat semakin banyak.

Hasil Pengamatan

Dari proses di atas didapatkan 6 sampel yaitu Protein Membran (M), protein sitoplasmik (S), Protein dalam supernatan yang diendapkan dengan larutan garam tinggi (Gs), protein dalam pengendapan yang diendapkan dengan larutan garam tinggi (Gp), protein dalam supernatan yang diendapkan dengan etanol (Es) dan protein dalam pengendapan yang diendapkan dengan etanol.

TEHNIK PCR DAN ELEKTROFORESIS

Prinsip Kerja

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 fragmentnya yang bermuatan negative sesuai dengan arus listrik. Pada sistem elektroforesis tersebut, agarose merupakan bahan media yang berfungsi sebagai alas atau medium pemisah yang diletakkan diantara anoda dan katoda alat elektroforesis. Medium pemisah tidak bergerak atau fase stationer. Molekul yang ingin dipisahkan diletakkan pada medium pemisah dan dibawa sesuai dengan muatan listrik oleh karena medium pemisah direndam dengan larutan ionic. Molekul yang besar bergerak lebih lambat daripada molekul lebih kecil. Gel agarose disiapkan dengan etidium bromide yang mengikat DNA dan menampilkan warna orange apabila disinari dengan cahaya ultraviolet.

SDS –PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrilamid gel electroforesis) adalah tehnik elektroforesis yang sering digunakan dalam analisis protein laboratorium. Sampel protein denaturasi (dipanaskan) dan dicampur dengan SDS (yang merupakan detergen yang anionik) dengan akibat kompleks protein –detergen itu bermuatan negative dan protein yang lebih besar mempunyai muatan negative yang lebih besar. Kompleks protein detergen itu akan dibawa oleh medan listrik kearah kutub positif (Anoda). Gel akrilamid berfungsi sebagai dasar atau alas atas gerakan sampel protein. Konsentrasi akrilamid menentukan protein SDS.

Alat dan bahan

Persiapan bahan PCR

1. PCR mixture dengan kappa untuk TNF β (LT α)

1st PCR

10 x PCR Buffer	:	5 μ l $\rightarrow$ 5	x	13	=	65 μ l
dNTP 10Mm	:	0,5 μ l $\rightarrow$ 0,5	x	13	=	6,5 μ l
MgCl ₂ 25Mm	:	1 μ l $\rightarrow$ 1	x	13	=	13 μ l
Primer F (forward)	:	0,25 μ l $\rightarrow$ 0,25	x	13	=	3,25 μ l
R(mMif migration)	:	0,25 μ l $\rightarrow$ 0,25	x	13	=	3,25 μ l
Taq polymerase	:	0,2 μ l $\rightarrow$ 0,2	x	13	=	2,6 μ l
Dd H ₂ O	:	15,3 μ l $\rightarrow$ 15,3	x	13	=	198,9 μ l
Template DNA	:					= 2,5 μ l
Total	:					= 292,5 / 13 = 22,5 μ l per tube

Alat dan Bahan

Tabel 4. Alat dan Bahan Teknik PCR dan Elektroforesis

7 Sampel protein darah dari minggu lalu	Sampel DNA sel epitel	Etanol absolute, dingin	Biru bromfenol	Vorteks
Sarung tangan	Pewarna DNA (Kristal violet dalam 20% gliserol)	Gel poliakrilamid–SDS 10%	Pipet tetes	β -merkaptotanol
Tempat buangan cairan biologis	Alat elektroforesis agarose	Isobutanol	Alat elektroforesis	Tris
Water bath	Tabung mikrosentrifus (1,5ml)	Protein standart SDS-PAGE	Power Supply	DTT
Mikrosentrifus	Erlemeyer flask	1 N HCl	Beaker	SDS
Pipet Mohr	pH meter		Hamilton Syringe	Agar 2%
Na ₂ HPO ₄	EDTA	Larutan Pewarna	Spidol	Tisu
Gliserol	Asam borik	Larutan pencuci	Penggaris	Agarose
Water bath				

Prosedur Kerja:

Selanjutnya,

- Sediakan 13 tabung PCR (steril) dipipetkan sebanyak 22,5µl Mix Solution masukan ke masing-masing tabung PCR
- Tambahkan 2µl larutan DNA sampel, kemudian vortex
Jangan lupa mengikutsertakan kontrol negative dalam setiap menjalankan PCR (control negatif = tabung PCR hanya berisikan Mix solution, tanpa penambahan larutan DNA sampel)
- Tambahkan 50 µl Mineral oil
- Tabung ditutup rapat dan susun di dalam rak/blok alat Thermal cycler
- Atur program untuk menjalankan PCR

Bagian A:**Elektroforesis Gel Agarose**

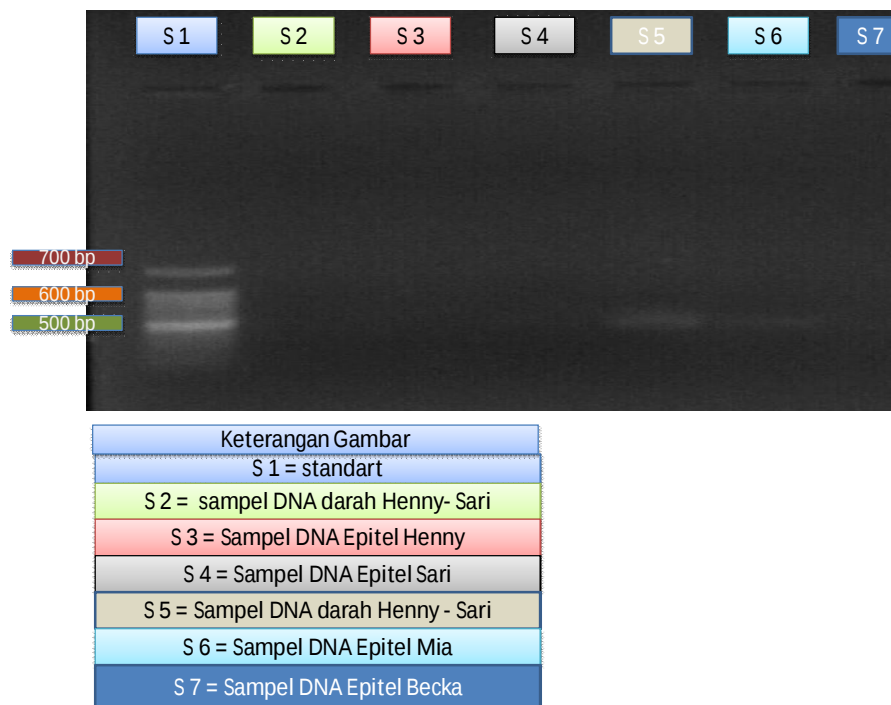
1. Setiap mahasiswa menyiapkan casting tray masing-masing. Pasang satu comb (sisir) pada pertengahan tray (plat cetakan) dan satu sisir lagi pada ujungnya
2. Tuangkan 40ml 0,8% agarose ke casting tray anda

Cara kerja Elektroforesis:

- Bila gel sudah beku, lepaskan comb dengan hati-hati
- Letakan gel di dalam elektroforesis tank yang sudah berisi lautan 1x TBE. Perhatikan cara meletakkannya. Elektroforesis tank dapat diisi dengan 3 casting gl
- Untuk mewarnai DNA manusia, campur 10 µl DNA dari sel epiteal dengan 10 µl pewarna DNA di atas parafilm dan langsung masukkan semuanya ke dalam sumur gel. Kemudian, dengan parafilm baru lagi, campur 10 µl DNA dari sel darah dengan 10 µl pewarna DNA di atas parafilm dan langsung masukkan semuanya (20 µl) ke sumur gel. Catat posisi dan urutan sampel group anda
- Nyalakan mesin elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 90 V. Sampel-sampelnya akan mulai bergerak ke katode,(DNA bermuatan negative)
- Matikan mesin elektroforesis secara sempurna
- Dengan sangat hati-hati keluarkan gel dan letakan pada tray yang disediakan

- Pindahkan ke alat UV reader supaya hasilnya lebih jelas

Hasil PCR dari DNA Epitel



Gambar 2. Hasil PCR DNA Epitel (Agarose)

Analisa:

1. Tampilan band standart pada sumur 1 belum sepenuhnya terpisah. Pada gambar dapat terlihat 3 band yang jelas

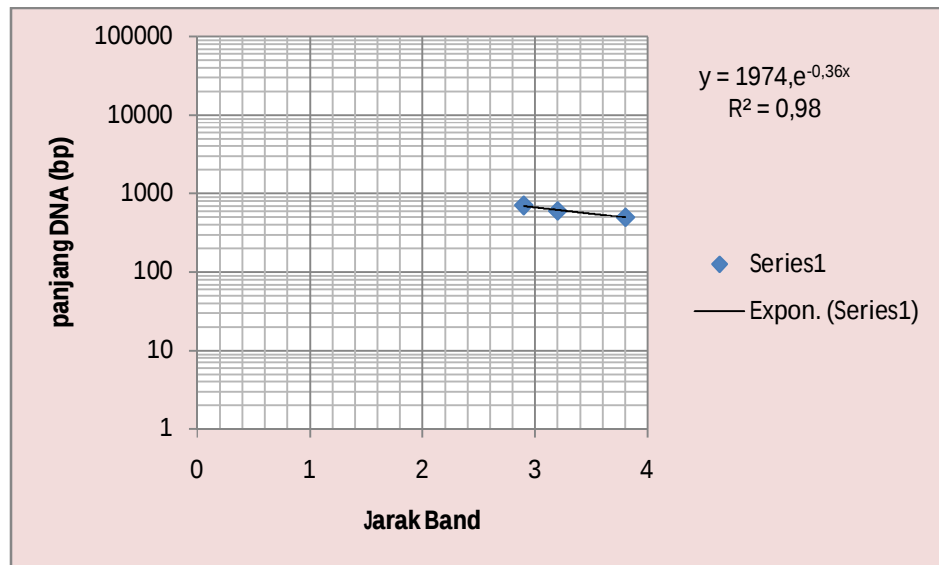
Pada standart: Band 1 dengan 700 bp berjarak 2,9 cm dari sumur

Band 2 dengan 600bp berjarak 3,2 cm dari sumur

Band 3 dengan 500bp berjarak 3,8 cm dari sumur

Sehingga dapat dibuat grafik dan diperoleh persamaan dibawah ini

Grafik Standart DNA Epitel dan Darah



Gambar 3. Grafik PCR Standart DNA Epitel Darah

2. Dari grafik hasil PCR Standart DNA Epitel dan Darah didapat persamaan eksponensial yaitu:

$$Y = 1974. e^{-0.36x}$$

Berdasarkan persamaan inilah, kita mencari basepare band yang tampil pada sumur 5 dan sumur 6 (hanya tampak 2 band saja).

Band pada sumur 5: jarak ke sumur = 3.8 cm → didapat 493,04 bp

Band pada sumur 6: jarak ke sumur = 3,7 cm → didapat 514,46 bp

3. Band pada sumur 5 menunjukkan DNA darah pada manusia. Ini seharusnya juga ditampilkan pada sumur 2 karena sama- sama berasal dari DNA darah pada manusia, tetapi band ini tidak muncul pada sumur 2
4. Band pada sumur 6 menunjukkan DNA epitel pada manusia. Ini seharusnya juga ditampilkan pada sumur 3, 4, dan 7, tetapi band ini tidak muncul pada sumur tersebut.
5. Pada sumur 2, 3, 4 dan 7 tidak memperlihatkan adanya band DNA. Kemungkinan hal ini terjadi karena kesalahan pada saat memasukan sampel ke dalam sumur (cara memasukan yang terlalu dalam sehingga sampel keluar dari sumur) atau proses isolasi DNA yang tidak benar sehingga tidak ada DNA yang terisolasi.

Bagian B:

Elektroforesis gel Akrilamid

Persiapan gel akrilamid (Gel Pemisah dan Gel Penumpuk)

Tabel 5. Bahan Pembuatan Gel Pemisah dan Gel Penumpuk

	Gel Pemisah	Gel Penumpuk
Akrilamid	(1880 μ l) 1,88ml	(360 μ l) 0,36ml
0,5 M Tris HCl Ph 8,6	(1280 μ l) 1,28ml	
0,5 M Tris HCl Ph 6,8		(240 μ l) 0,24ml
Aquadest	(1930 μ l) 1,93ml	(700 μ l) 0,7ml
SDS 10%	(5,6 μ l) 0,056ml	(10 μ l)
Aps	(3,8 μ l) 0,377ml	(7,2 μ l)
TEMED	(3,8 μ l) 0,377ml	(1 μ l)

Perhitungan plate pada elektroforesis akrilamid:

Plate: $10 \times 10 \times 0,2 = 20$

Spacer: $1 \times 10 \times 0,1 = 1$

Vol. Aktif: $8 \times 8,5 \text{ cm}$

Comb/Penumpuk = 1,5 cm

p.l .t = $8 \times 0,1 \times 1,5 \text{ cm}$

$$= 1,2 \text{ cm}^3$$

$$= 1,2 \text{ ml}$$

Akrlamid = 6,5 cm

$$\text{p.l.t} = 8 \times 0,1 \times 6,5 \text{ cm}$$

$$= 5,2 \text{ cm}^3$$

$$= 5,2 \text{ ml}$$

Prosedur kerja:

1. Bersihkan plat kaca dengan akuades dan etnol (70%)
2. Susun lempeng kaca serta spacer, celah antara lempeng dengan spacer ditutup dengan agar 2% secukupnya
3. Untuk menyiapkan gel poliakrilamid –SDS 10%, sediakan gel pemisah terlebih dahulu
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 agar batas antar gel dapat terbentuk dengan baik. Biarkan gel pemisah berpolimerisasi, tuangkan campuran gel penumpuk di atasnya. Sisipkan sisir plastik (pembentuk sumur sampel). Biarkan hingga gel penumpuk berpolimerisasi
5. Setelah gel penumpuk berpolimerisasi, lepas sisir dari bagian atas dan klem serta spacer bagian bawah
6. Letakkan lempeng kaca yang berisi gel secara vertical pada alat elektroforesis dan kemudian klem. Isi tempat dapar dengan dapar elektroda. Buanglah gelembung pada bagian bawah gel

Persiapan sampel-sampel protein

1. Pakailah sarung tangan dan tehnik keselamatan dilaboratorium yang benar
2. Tentukan waterbath pada temperature 100°C
3. Siapkan 7 tabung mikrosentrifus dan tandai dengan Plasma, M, S, GS, GP, ES, EP, dan keluarkan 7 sampel protein darah yang disimpan sebelumnya

4. Tambahkan 450µl buffer sampel ke dalam tabung P, S, ES, sementara itu pada tabung M,GP, EP, ditambahkan sebanyak 900 µl larutan buffer
5. Tutup dan vortex pelan –pelan supaya endapannya dicampur rata dengan buffer
6. Masukkan semua tabung mikrosentrifus ke dalam waterbath yng mendidih. Biarkan selama 5 menit
7. Tentukan bahwa tabung mikrosentrifus berkesinambungan dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan 14.000 rpm

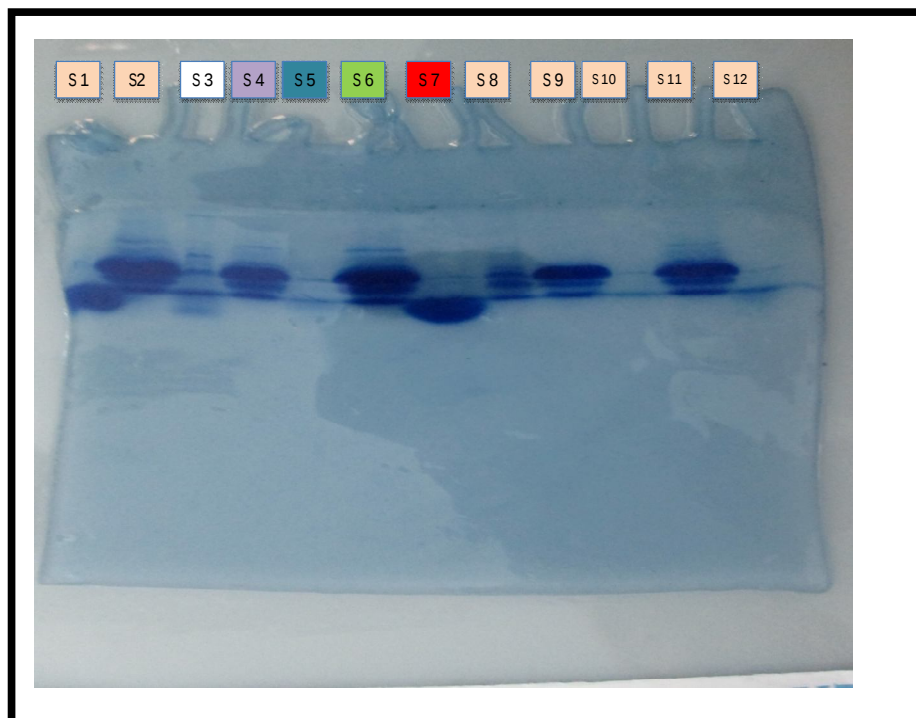
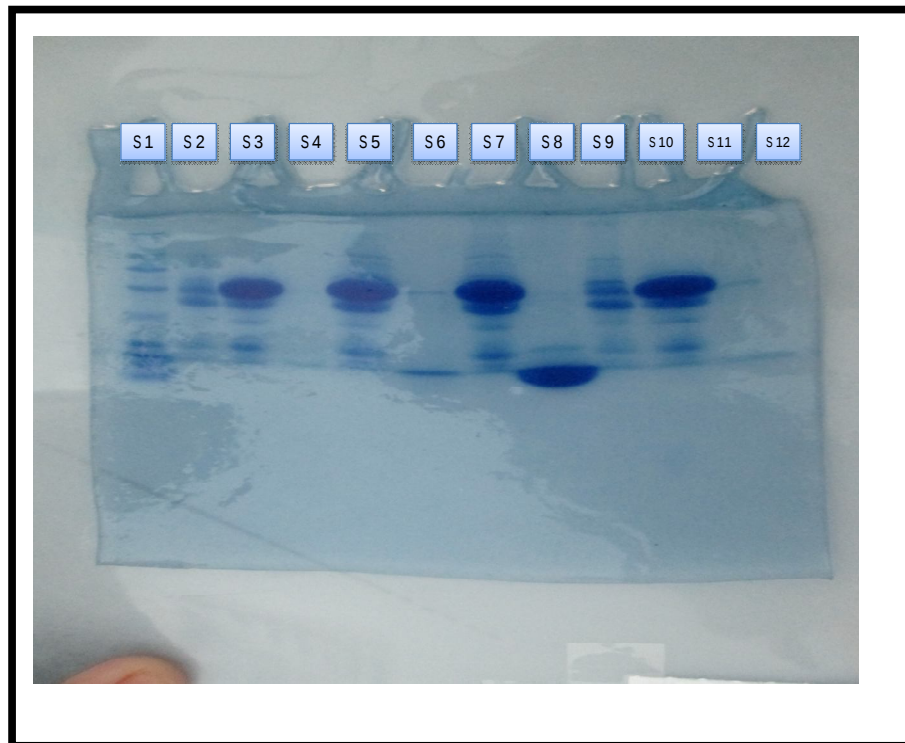
Loading and Running Gel

1. Masukkan 10 µl sampel protein (yaitu Plasma, M,S, EP,GS,ES,GP) ke dalam masing-masing sumur dengan pipet otomatis atau dengan Hamilton Syringe. Pada sumur yang terakhir masukkan 10 µl 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)

Pewarnaan Gel

1. Setelah waktu menjalankan pemisahan protein selesai , matikkan 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 kacar dari gel. Potong gel pada batas antara gel penumpuk dan gel pemisah. Tandai salah satu ujungnya gel (Catat petanda yang anda buat)
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 molekulprotein sampel, ukur jarak pita-pita protein sampel serta pita-pita protein petanda dari batas gel pemisah. Masukkan hasil pada tabel

Hasil elektroforesis Akrilamid



Gambar 4. Hasil elektroforesis akrilamid

Keterangan:**S 1** = S (Protein sitoplasmik)**S2** = P(Plasma)**S3** = Std (Standart)**S4** = GS (Protein dalam supernatant, dengan garam tinggi)**S5** = M (Protein membran)**S6** = P (Plasma)**S7** = S (Plasma)**S8** = EP (Protein dalam pengendapan, dengan etanol)**S9** = ES (Protein dalam supernatant, dengan etanol)**S10** = GP (Protein dalam pengendapan, dengan garam tinggi)**S11** = GS (Protein dalam supernatant, dengan garam tinggi)**S12** = Protein Membran**Tabel 6. Berat Molekul Protein Standart (kilodalton)**

No.	Protein	Berat Molekul (kD)
1.	Myosin	200.000
2.	β -Galaktosidase	116.250
3.	Phosphorylase b	97.400
4.	Albumin	66.200
5.	Ovalbumin	45.000
6.	Carbonic Anhydrase	31.000
7.	Trypsin Inhibitor	21.500
8.	Lysozim	14.400
9.	Abrotinin	6.500

Hasil dan Pembahasan:

1. Berdasarkan hasil elektroforesis didapat tampilan band – band pada setiap sumur. Pada sumur standart diukur jarak masing-masing band ke sumur untuk mendapatkan suatu persamaan yang dipakai untuk menghitung berat molekul protein.

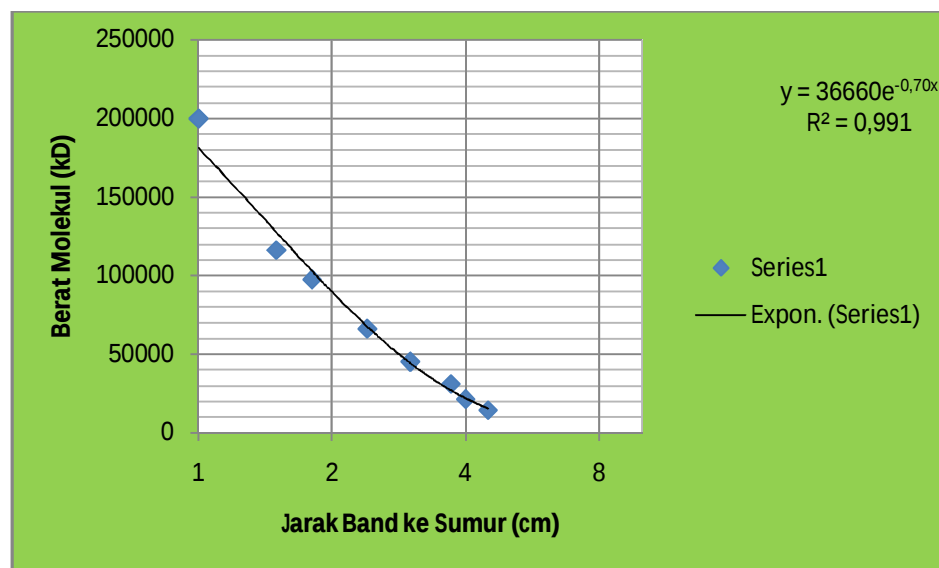
Tabel 7. Pengukuran Band Standart

Band	Jarak ke Sumur (cm)	Berat Molekul (kD)	Protein
1.	1	Myosin	200.000
2.	1,5	β -Galaktosidase	116.250
3.	1,8	Phosporylase b	97.400
4.	2,4	Albumin	66.200
5.	3	Ovalbumin	45.000
6.	3,7	Carbonic Anhydrase	31.000
7.	4,5	Trypsin Inhibitor	21.500

Dari hasil tabel pengukuran band standart diperoleh grafik dengan persamaan sebagai berikut:

$$Y = 3666e^{-0,70x}$$

Grafik Hasil Elektroforesis Protein Darah dengan Akrilamid



Gambar 5. Grafik Hasil Elektroforesis Protein Darah dengan Akrilamid

Berdasarkan persamaan inilah seharusnya kita mengukur berat molekul masing – masing band (band 1-7) akan tetapi jika dimasukkan nilai pengukuran band sampel tidak diperoleh berat molekul yang diharapkan.

Tabel 8. Data Hasil Perhitungan Berat Molekul Protein Pada Sumur 2

Sumur	Band yang muncul	Jarak(cm)	Berat Molekul (kD)	Protein yang muncul
Protein Plasma	1	1,7	57432,8	
	2	2	71069	

Dari tabel di atas diperlihatkan bahwa perhitungan berat molekul tidak sesuai dengan standart yang diinginkan. Seharusnya semakin dekat jarak band ke sumur maka berat molekul semakin kecil. Hal ini juga terlihat pada sumur yang lain. Sehingga persamaan yang diperoleh dari perhitungan band standart tidak dapat dipakai untuk perhitungan band sampel. Ini terjadi karena ada kesalahan pada saat pembuatan plate sehingga pemisahan band – band protein tidak sesuai dan menghasilkan jarak yang tidak dapat digunakan untuk mengukur berat molekul.

SARAN:

1. Sebaiknya sebelum melakukan praktikum dilakukan pengarahan persiapan bahan-bahan praktikum agar tidak terjadi kesalahan pada saat praktikum
2. Isolasi DNA sebaiknya dilakukan dengan baik sehingga hasil yang diperoleh setelah sampel di PCR dan dielektroforesis sesuai dengan yang diharapkan
3. Prosedur pelaksanaan praktikum khususnya PCR dan Elektroforesis dilakukan sesuai waktu yang seharusnya karena sangat mempengaruhi hasil dari praktikum tersebut.