

Laporan Praktikum  
Isolasi DNA, Teknik PCR dan Elektroforesis Agarose

Hari / Tanggal Praktikum : Kamis / 28 April - 09 Juni 2016  
Nama Praktikan : Binayanti Nainggolan  
Yuliandriani Wannur Azah  
Pukul : 10.00 – 14.00 wib

**A. TUJUAN PRAKTIKUM**

1. Mengerti metode umum mengisolasi DNA
2. Mampu mengisolasi DNA dari sel darah dan epitel mulut
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 praktikum untuk memperoleh base pair fragment DNA
5. Mengumpulkan data dari hasil praktikum
6. Membuat dan menginterpretasi grafik.

**B. PENDAHULUAN**

DNA adalah asam nukleat yang mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis seluruh bentuk kehidupan. DNA terdapat di nukleus, mitokondria, dan kloroplas. Ada perbedaan di antara ketiga lokasi DNA ini, yaitu: DNA nukleus berbentuk linear dan berhubungan sangat erat dengan protein histon, sedangkan DNA mitokondria dan kloroplas berbentuk sirkular dan tidak berhubungan dengan protein histon.

DNA memiliki struktur double helix, yang mengandung komponen-komponen gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, dan pasangan basa. Satu sel memiliki DNA yang merupakan materi genetik dan akan diturunkan pada keturunannya.

DNA dapat diisolasi, baik pada manusia maupun tumbuhan. Isolasi DNA merupakan langkah tepat untuk mempelajari DNA. Prinsipnya ada dua, yaitu :

a. 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. Tehnik sentrifugasi dilakukan oleh mesin yaitu mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi. Hasil sentrifugasi akan menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah, yaitu supernatan di bagian atas dan pelet di bagian bawah.

b. Presipitasi

Merupakan langkah yang dilakukan untuk mengendapkan suatu komponen dari campuran.

Langkah-langkah isolasi DNA:

- a. Pengumpulan sel-sel
- b. Pemecahan sel (lisis sel) dan pencernaan protein
- c. Pengendapan DNA

Pada praktikum ini, DNA akan diisolasi dari sel darah dan epitelial mulut.

### C. CARA KERJA TEKNIK ISOLASI

#### I. Isolasi dari sel darah

Alat dan bahan

Darah (1cc)	Larutan RNAase	Anti – koagulan
Isopropanol	Larutan sel lisis	Etanol 70%
Larutan nuclei lisis	Larutan rehidrasi DNA	Larutan “ <i>protein precipitation</i> ”
Water bath	Tabung mikrosentrifus	Mikrosentrifus
Vortex	Kertas absorben	Pipet tetes

1. Gunakan tabung mikrosentrifus 1,5 ml yang steril → isi dengan 1 mg anti-koagulan (EDTA, atau heparin) → masukkan 1 ml darah ke dalamnya.
2. Goyangkan tabung mikrosentrifus perlahan agar darah dan anti-koagulan

bercampur dengan baik.

3. Gunakan satu tabung mikrosentrifus steril lagi → masukkan 900  $\mu\text{L}$  larutan sel lisis
4. Ambil 300  $\mu\text{l}$  darah dari tabung mikrosentrifus pertama → masukkan ke dalam tabung kedua → bolak-balikkan tabung 5-6 kali supaya cairannya bercampur baik.
5. Inkubasikan 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 kecepatan 13.500 rpm selama 2 menit pada temperatur ruang.
7. Supernatant dibuang sebanyak mungkin (hati-hati! Jangan sampai pellet putih ikut terbang) → sekitar 10-20  $\mu\text{l}$  cairan residu akan tertinggal dalam tabung tersebut
8. Tabung divortex dengan kuat (10-15 detik) → agar sel-sel darah putih tersuspensi kembali.
9. Tambahkan 300  $\mu\text{l}$  larutan nuklei lisis ke dalam tabung tersebut (di langkah ke-8). → campurkan dengan menggunakan pipet sebanyak 5-6 kali untuk melisis sel-sel darah putih → larutan 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  $\mu\text{l}$  ke dalam larutan di langkah 9 atau 10 → vortex dengan kuat selama 10-20 detik → gumpalan protein yang kecil mungkin akan terlihat.
11. Sentrifugasi pada kecepatan 13.500 rpm selama 3 menit (pada temperatur ruangan) → pellet protein yang berwarna coklat tua akan terlihat.
12. Pindahkan supernatant ke dalam tabung Eppendorf steril yang berisi 300  $\mu\text{l}$  isopropanol (temperatur ruangan).
13. Tabung dibalikkan perlahan-lahan → supaya larutan bercampur → akan terlihat massa seperti benang-benang putih (DNA).
14. Sentrifugasi pada kecepatan 13.500 rpm selama 1 menit pada temperatur ruangan → DNA akan terlihat sebagai pellet kecil yang putih.
15. Supernatant dibuang → tambahkan 300  $\mu\text{l}$  70% etanol (di suhu temperatur ruangan). → bolak-balikkan tabung perlahan beberapa kali untuk mencuci pellet DNA → sentrifugasi lagi seperti pada langkah 15 diatas.

16. 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  $\mu$ l larutan rehidrasi DNA → DNA direhidrasi dengan menginkubasikan tabung pada 65 °C selama 30-60 menit → secara periodik, campurkan larutan dengan cara menepuk tabung perlahan.
18. DNA disimpan pada temperatur 2-8°C atau untuk jangka panjang pada -20°C

## II. Isolasi DNA dari Epitel

Alat dan bahan yang digunakan

Minuman isotonic	Beaker	Akuades
Batang kayu	Waterbath	Mikrosentrifus
Timbangan digital	EDTA	SDS
Stok proteinase K (100 $\mu$ g/ml)	NaCl	Etanol dingin
Tabung mikrosentrifus	Tris	Pipet Mohr

- a. Pengumpulan sel-sel
  1. Gosok pipi bagian dalam menggunakan batang kayu selama  $\pm$  30 detik (jangan ditelan)
  2. Ambil minuman isotonik → kumur-kumur dengan minuman isotonik sebanyak  $\pm$  10 ml, sekaligus menggosok pipi selama 1 menit → hasil berkumur ini jangan ditelan, tetapi keluarkan ke dalam beaker → ini yang menjadi larutan sel epitel yang akan diisolasi DNA nya.
- b. Lisis sel – sel
  3. Atur temperatur 56<sup>0</sup> C pada waterbath.
  4. Ambil 1,5 ml larutan sel epitelial menggunakan pipet Mohr → masukkan ke dalam tabung mikrosentrifus.
  5. Masukkan tabung mikrosentrifus dalam mesin sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 10.000rpm, dan gunakan sampel orang lain sebagai penyeimbang. Hasil sentrifus yang didapat → supernatant dibuang, kemudian tambahkan larutan sel lagi.
  6. Langkah 5 dan 6 diulang sebanyak dua kali → agar endapan (pelet) yang terbentuk semakin banyak
  7. Kemudian tambahkan 1 mL buffer Tris-EDTA ke dalam tabung mikrosentrifus.
  8. Tabung mikrosentrifus di vortex selama 30 detik (sampai endapan hancur).
  9. Selanjutnya tambahkan 50 $\mu$ L Proteinase K (enzim untuk mencerna

protein) dan masukkan dalam waterbath ( $56^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 menit

c. Pengendapan DNA

10. Masukkan  $100\mu\text{L}$  NaCl, 2,5M ke dalam tabung mikrosentrifus  $\rightarrow$  aduk isi tabung agar tercampur baik, dengan cara membolak-balikkan tabungnya.
11. Pindahkan semua isi tabung mikrosentrifus ke tabung lain yang bersih dan kering (hati-hati, agar tidak banyak muncul buih)
12. Pelan-pelan tambahkan 1 mL etanol dingin (untuk mengendapkan atau menggumpalkan DNA) agar terlihat batas jelas  $\rightarrow$  biarkan selama 5 menit.
13. DNA akan menggumpal di antara batas buffer dan etanol (terlihat ada yang melayang seperti benang putih)
14. Ambil DNA menggunakan batang kaca atau besi  $\rightarrow$  taruh di tabung sentrifugasi kecil yang bersih. (Gunakan tisu bersih untuk menghisap sisa etanol).
15. Simpan tabung mikrosentrifus kecil di lemari pendingin, pada suhu di bawah  $0^{\circ}$

Observasi pada praktikum ini:

- Awalnya pelet yang terbentuk hanya sedikit, tetapi setelah ditambahkan larutan sel epitel dan disentrifus beberapa kali, terbentuk endapan atau pelet berwarna putih di dasar tabung yang semakin banyak.
- Supernatan seharusnya dibuang sebanyak mungkin dengan hati-hati, agar pelet atau endapan tidak ikut terbuang  $\rightarrow$  bila tidak banyak supernatan yang terbuang, maka saat proses selanjutnya, volume larutan dalam tabung akan semakin banyak (berbeda dengan batas volume larutan pada kelompok lain).
- Hasil akhir didapatkan endapan atau pelet coklat di dasar tabung  $\rightarrow$  kemudian sampel disimpan dalam lemari pendingin untuk diproses di waktu praktikum selanjutnya.

#### D. ELEKTROFORESIS AGAROSE

Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

1. 1X TBE - siapkan 1000 ml dengan komposisi: 10.8 g Tris, 5.5 g asam borik acid, 0.74 g EDTA  $\rightarrow$  dimasukkan ke dalam beaker 1000 ml  $\rightarrow$  tambahkan 900 ml akuades  $\rightarrow$  aduk dengan magnetic stirrer sampai larut  $\rightarrow$  Tambahkan akuades sampai volume larutan 1 liter.  $\rightarrow$  simpan di dalam botol bersih pada temperatur ruangan.
2. 0.8% Agarose - siapkan agarose secukupnya (diperlukan 40 ml/casting tray)

dengan komposisi: 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 → panaskan sampai mendidih dan larutan jernih → kemudian dinginkan sampai 60° → tambahkan 12 µl larutan ethidium bromide/casting tray.

3. Larutan Dapar Sampel (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 10%(v/v) gliserol; 1% (b/v) SDS; 0,01% (b/v) biru bromfenol).
4. Larutan Dapar Elektroda (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 1,8 M glisin; 1% (b/v) SDS).
5. Larutan Pewarna (0,15% Coomassie Brilliant Blue R-250; 250 ml metanol; 50 ml asam asetat; akuades sampai 500 ml)
6. Larutan Pencuci (50 mL metanol; 75 mL asam asetat; akuades sampai 1000 mL)

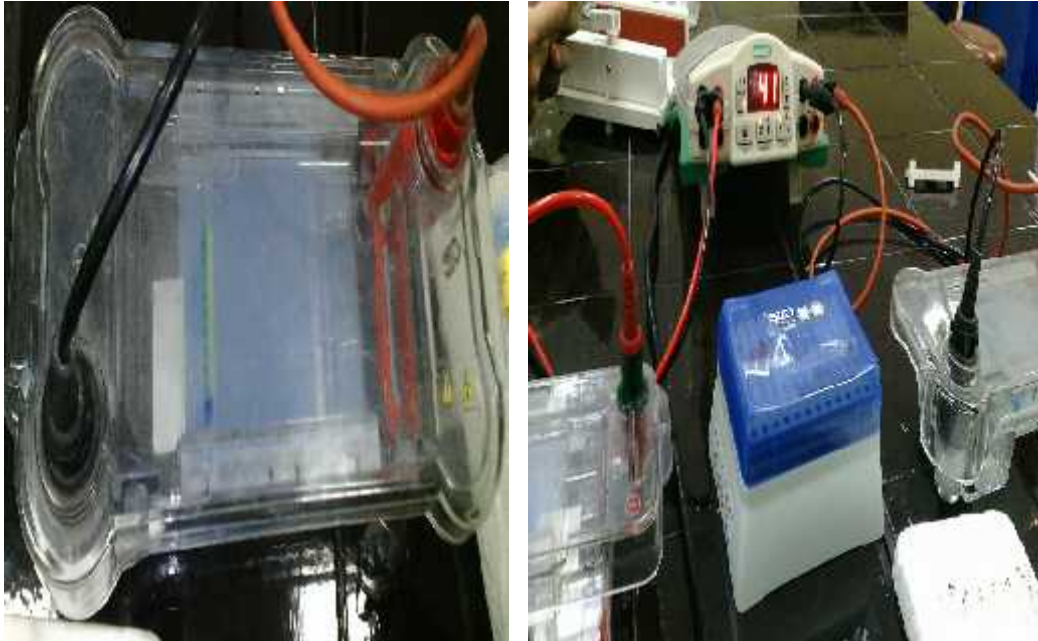
#### Elektroforesis Gel Agarose

1. Siapkan casting tray → pasang satu “comb” (sisir) pada pertengahan “tray” (plat cetakan) dan satu sisir lagi pada ujungnya..
2. Tuangkan ± 40 ml 0,8% agarose ke dalam casting tray

Cara kerja alat elektroforesis:

1. Tunggu sampai gel beku → lepaskan comb secara hati-hati.
2. Letakkan gel di dalam elektroforesis tank yang sudah berisi larutan 1X TBE → kemudian tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel terbenam.
3. Untuk mewarnai DNA epitel → campurkan 10 µl DNA epitel dengan 10 µl pewarna DNA di atas parafilm → kemudian masukkan semuanya (20 µl) ke dalam sumur gel (dalam praktikum ini tidak perlu lagi pewarnaan karena sampel dan control sudah diberi pewarnaan sebelumnya (sudah pakai loading dye)
4. Kemudian dengan parafilm baru lagi → campurkan 8 µl DNA sel darah DNA di atas parafilm → masukkan semuanya (8 µl) ke sumur gel. Begitu juga dengan sumur untuk sampel DNA sel epitel (Jangan lupa mencatat posisi dan urutan sampel-sampel DNA).
5. Hidupkan mesin elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 90 V. Sampel- sampelnya akan mulai bergerak ke katode. (karena DNA bermuatan negatif)
6. Matikan mesin elektroforesis secara sempurna
7. Keluarkan gel dengan sangat hati-hati dan letakkan pada tray yang disediakan.

8. Pindahkan ke alat “UV reader” supaya hasilnya jelas.



Gambar 1. Casting tray yang sumur – sumurnya sudah diisi marker dan sampel

## E. HASIL PRAKTIKUM ISOLASI DNA

### I. Hasil

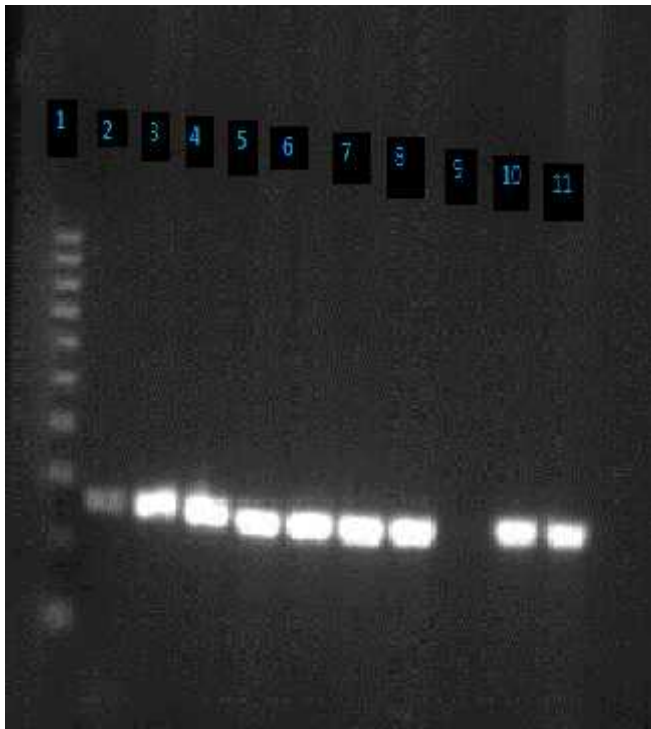
Dari hasil elektroforesis agarose sampel dan marker diperoleh data yang akan digunakan untuk menghitung basepairs sampel



Keterangan :

1. Marker
2. Marker
3. Control negative
4. Sampel 1 (Reza)
5. Sampel 2 (Siska)
6. Sampel 3 (Karin)
7. Sampel 4 (Yuli)
8. Sampel 5 (Henny)
9. Sampel 6 (Bina)
10. Sampel 7 (Rahmi)
11. Sampel 8 (Irma)
12. Sampel 9 (Dino)

Gambar 2: Hasil elektroforesis agarose dari isolasi DNA epitel mulut



Keterangan :

1. Marker
2. Control negative
3. Sampel 1 (Reza)
4. Sampel 2 (Siska)
5. Sampel 3 (Karin)
6. Sampel 4 (Yuli)
7. Sampel 5 (Henny)
8. Sampel 6 (Bina)
9. Sampel 7 (Rahmi)
10. Sampel 8 (Irma)
11. Sampel 9 (Dino)

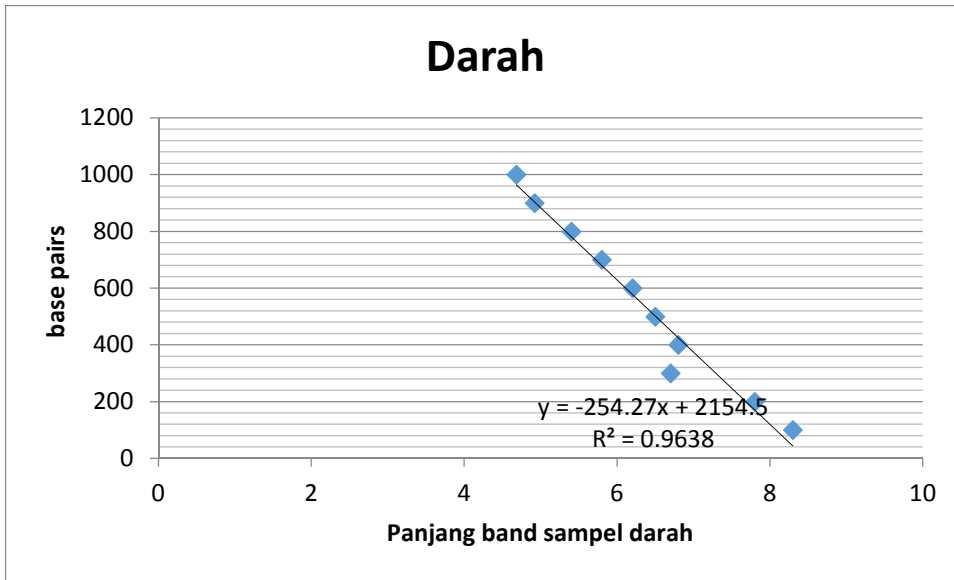
Gambar 3: Hasil elektroforesis agarose dari isolasi DNA sel darah

Dari foto hasil elektroforesis agarose dapat diukur jarak setiap band dari marker dan sampel. Data pengukuran jarak dapaat dilihat pada tabel 1 dan 2 dibawah ini :

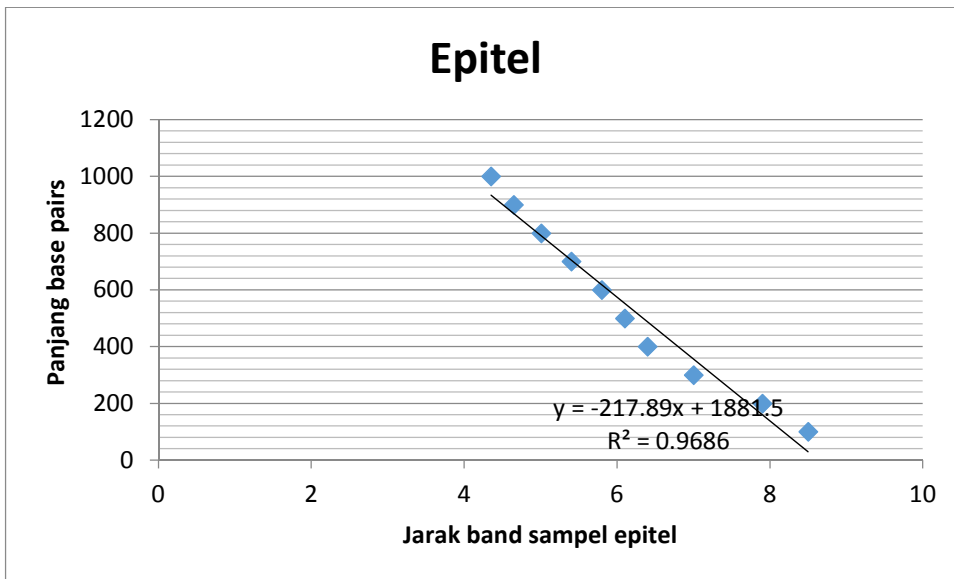
Tabel : Hasil elektroforesis agarose sel darah dan epitel

<i>Base pair</i>	<b>Jarak (cm) sampel darah</b>	<b>Jarak (cm) sampel epitel</b>
100	8,3	8,5
200	7,8	7,9
300	6,7	7
400	6,8	6,4
500	6,5	6,1
600	6,2	5,8
700	5,8	5,4
800	5,4	5,01
900	4,92	4,65
1000	4,68	4,35





Grafik 1: Diagram scattered dan garis trendline untuk marker pada agarose sampel DNA dari sel darah



Grafik 2: Diagram scattered dan garis trendline untuk marker pada agarose sampel DNA dari sel epitel

No.	Sampel	Nama	Sampel darah	Sampel epitel
			$Y = -254,27x + 2154,5$	$y = -217,89x + 1881,5$
			$R^2 = 0,9638$	$R^2 = 0,9686$

			Jarak (cm)	Panjang basepairs	Jarak (cm)	Panjang Basepairs
1.	Sampel 1	Reza	7,35	285,6155	7,25	301,7975
2.	Sampel 2	Siska	7,40	272,902		
3.	Sampel 3	Karin	7,45	260,1885		
4.	Sampel 4	Yuli	7,45	260,1885	7,25	301,7975
5.	Sampel 5	Henny	7,55	247,475	7,20	312,692
6.	Sampel 6	Bina	7,55	234,7615	7,25	301,7975
7.	Sampel 7	Rahmi			7,30	290,93
8.	Sampel 8	Irma	7,50	247,475	7,20	312,692
9.	Sampel 9	Dino	7,50	247,475	7,20	312,692

Tabel 2 : hasil jarak dan panjang base pairs pada semua sampel penelitian

## II. 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 mencetak 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 sampel (DNA) sebanyak 8 $\mu$ L, DNA yang sudah berwarna (loading dye) dimasukkan ke dalam masing-masing sumur. Setelah marker, negatif control 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 band DNA yang berasal dari epitel dan darah tetapi pada beberapa sampel tidak ditemukan hasil karena saat membuat label darah dan epitel tidak tepat dan sebagian besar nukleotidnya jatuh saat mengendapkan. Hal ini menunjukkan bahwa pada pengerjaan untuk mendapatkan DNA dari sel epitel dan darah kurang teliti, mungkin pada saat menggosok bagian dalam pipi tidak tepat atau pada saat memperoleh endapannya yang kurang baik pengerjaannya.

Berdasarkan data yang diperoleh dari hasil elektroforesis agarose diperoleh rumus untuk menghitung basepairs dari sampel. Pada sampel diketahui bervariasi jarak antara sampel (seperti pada table 2) Dalam hal ini marker yang digunakan untuk reseptor vitamin D sebesar 240 bp. Dalam hal ini tidak sesuai marker dengan sampel yang berarti tidak ada gen MMIF pada DNA yang diteliti

## **F. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **I. 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 dengan jelas.

- Setelah data diinterpretasikan ke dalam grafik diperoleh persamaan untuk sel epitel  $y = -217,89x + 1881,5$   $R^2 = 0,9686$  dan sel darah  $Y = -254,27x + 2154,5$   $R^2 = 0,963$ . Hal ini tidak sesuai dengan primer yang digunakan.

## II. Saran

- Saat praktikan mengisolasi DNA dari sel epitel dan dari darah sebaiknya lebih diperhatikan oleh supervisor sehingga kesalahan dalam pengerjaan prosedur dapat dikurangi dan DNA diperoleh dengan benar.
- Ketika melakukan praktikum disarankan supaya selalu menggunakan handsgloves, untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi terhadap hasil praktikum dan kesehatan dari praktikan
- Peralatan yang digunakan untuk praktikum sebaiknya ditambah sehingga memudahkan untuk pengerjaan praktikum dan praktikan juga lebih memahami proses praktiku

