

Laporan Praktikum

ISOLASI DNA MANUSIA (EPITHELIAL MULUT DAN DARAH)

Oleh: Jenny Novina Sitepu – Liza Mutia

Waktu Praktikum:

Kamis, 01 November 2012

Jam 08.00 – 12.00 WIB

I. Tujuan Praktikum :

1. Mengerti metode umum mengisolasi DNA
DNA dapat diisolasi dari setiap bagian makhluk hidup yang mengandung inti sel.
Langkah-langkah yang harus diikuti dengan jaringan apapun adalah:
 - Pengumpulan/panen sel-sel (*cell harvest*)
 - Pemecahan sel-sel (*cell lysis*)
 - Pencernaan protein agar asam nucleat dilepaskan (*protein digestion*)
 - Pengendapanan DNA (*DNA precipitation*)
2. Mengisolasi DNA dari sel-sel epitelial mulut
Salah satu sel yang mudah diambil adalah sel-sel epitelial mulut. Sel-sel dipanen dengan cara menggosok-gosok mukosa pipi dan berkumur.
3. Mengisolasi DNA dari darah
Darah yang digunakan adalah darah vena yang telah diberi antikoagulan.

II. Metode Praktikum

1. Isolasi DNA dari sel-sel epitel mulut

Alat dan Bahan yang digunakan:

Minuman isotonik	Waterbath	pH meter	Akuades
Batang kayu	EDTA	Tabung reaksi	Mikrosentrifus
Timbangan digital	TRis	Spidol	SDS
Mikrosentrifus	NaCl	Vortex	Etanol dingin
Beaker	Stok Proteinkinase K (100g ml)	1 N HCl	Pipet Mohr

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

Satu kelompok meja menyiapkan 100mL minuman isotonik yang cukup untuk semua kebutuhan praktikum ini.

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

Satu kelompok meja menyiapkan 50mL buffer Tris EDTA yang cukup untuk semua kebutuhan praktikum ini. Berat molekul Tris =121,1 g/mol; EDTA = 292,2 g/mol.

Tentukan pHnya dengan 1 N HCl

Simpan di dalam botol bersih pada temperatur ruangan.

- ➔ Pada praktikum, larutan buffer Tris-EDTA telah disiapkan oleh pembimbing dan asisten praktikum.

Teknik Isolasi DNA dari sel-sel epitelial

A. Panen sel-sel

1. Dengan batang kayu, gosok bagian dalam pipi selama 30 detik. Jangan ditelan.
2. 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.

B. Lisis sel-sel dan pencernaan protein

1. Tentukan waterbath pada temperatur 56C.
 2. Dengan pipet Mohr, ambil 1,5 mL larutan sel ke dalam tabung mikrosentrifus.
 3. Dengan sampel orang lain sebagai keseimbangan, sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 10,000rpm. Buanglah supernatant dan tambah larutan sel Anda lagi.
 4. Ulangi langkah 5 dan 6 dua kali lagi supaya endapan semakin banyak.
 5. Tambah 1 mL buffer Tris-EDTA.
 6. Vortex sampel selama 30 detik (endapan sudah hancur).
 7. Tambahkan 50µL Proteinase K dan biarkan di waterbath(56C) selama 10 menit
- ➔ **Didapatkan larutan berwarna putih yang tampak berserat-serat.**

C. Pengendapan DNA

1. Tambahkan 100µL NaCl, 2,5M. 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 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.
 → **Didapatkan endapan seperti serat benang yang merupakan DNA dari sel epithelial mulut. DNA ini akan digunakan pada praktikum berikutnya.**

Isolasi DNA dari darah

Alat dan bahan yang diperlukan:

Darah (1cc)	Larutan RNAase	Anti-koagulan
Isopropanol	Larutan sel lisis	70% etanol
Larutan nuklei lisis	Larutan rehidrasi DNA	Larutan " <i>protein precipitation</i> "
Waterbath	Tabung mikrosentrifus	Mikrosentrifus
Vortex	Kertas absorben	Pipet tetes

Teknik Isolasi DNA dari darah

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 µl 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 µl 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. Optional: Tambahkan larutan RNAase 1,5 μ l dan bolak-balikkan tabung 2-5 kali untuk mencampurnya. Inkubasikan pada 37°C selama 15 menit dan kemudian dinginkan pada temperatur ruangan.
 11. Tambahkan larutan "*protein precipitation*" sebanyak 100 μ l kedalam larutan yang diperoleh pada langkah 9 atau 10 dan vortex dengan kuat selama 10-20 detik. Gumpalan protein yang kecil mungkin akan terlihat.
 12. 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.
 13. Pindahkan supernatannya kedalam tabung Eppendorf steril yang berisi 300 μ l isopropanol (temperatur ruangan).
 14. Tabung dibalikkan perlahan-lahan supaya larutan bercampur dan akan terlihat massa seperti benang-benang putih (DNA-strands).
 15. 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.
 16. 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 15 diatas.
 17. Dengan hati-hati aspirasikan etanol (menggunakan pipet). Jangan sampai pelletnya terbuang! Letakkan tabung secara terbalik diatas kertas absorben dan keringkan di udara selama 10-15 menit.
 18. Tambahkan 100 μ l larutan rehidrasi DNA dan rehidrasi DNANYA 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.
 19. DNA disimpan pada temperatur 2-8°C atau untuk jangka panjang pada -20°C
- Didapatkan pellet yang mengandung DNA dari darah pada dasar tabung. DNA dari darah ini akan digunakan pada praktikum berikutnya.**

ISOLASI PROTEIN DARI DARAH

Oleh: Jenny Novina Sitepu – Liza Mutia

Waktu Praktikum:

Kamis, 08 November 2012

Jam 08.00 – 12.00 WIB

I. Tujuan Praktikum :

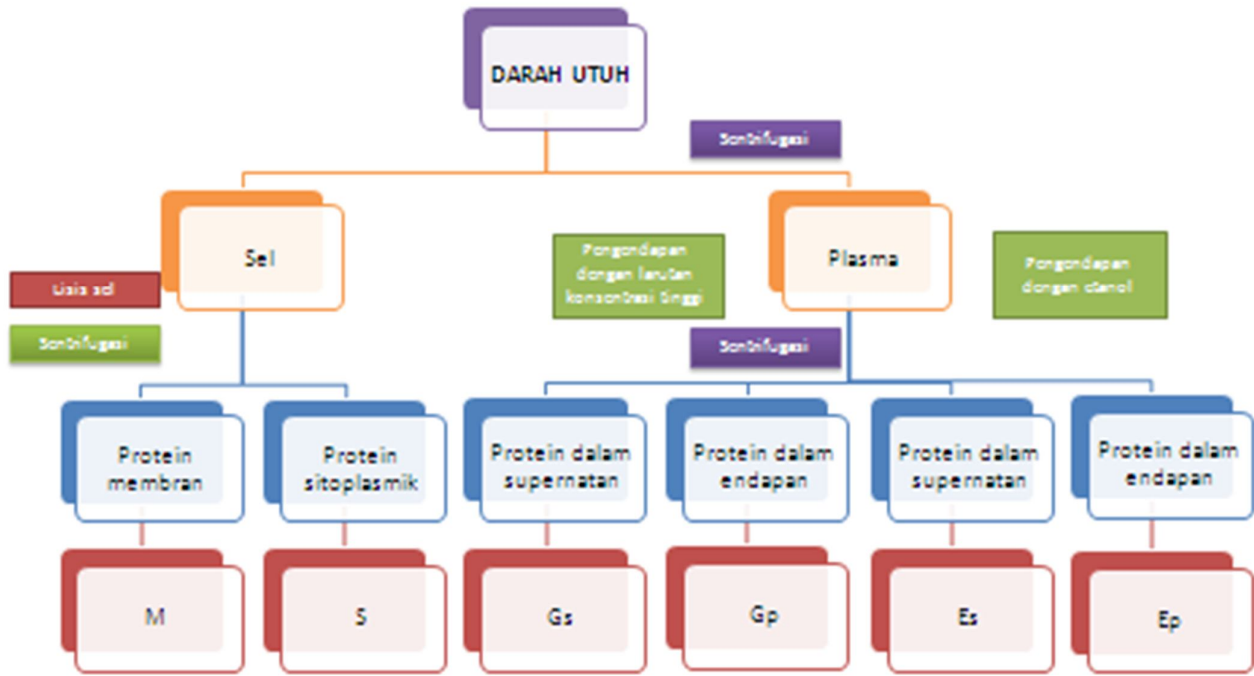
1. Mengerti teknik sentrifugasi untuk pemisahan bagian-bagian darah
Teknik sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan bagian-bagian darah, yaitu sel darah dan plasma darah, memisahkan protein plasma dari protein intraselular dan protein membran maupun dari bagian sel lain.
2. Mengerti teknik biokimia umum lain yang penting dalam proses isolasi protein
Selain sentrifugasi, teknik yang penting dalam proses isolasi protein adalah pengendapan. Teknik pengendapan yang digunakan pada praktikum ini adalah pengendapan protein dengan larutan garam konsentrasi tinggi (*salting out*) dan pengendapan protein dengan etanol (*alcohol precipitation*).

II. Mengisolasi Protein dari Darah

Teknik yang digunakan pada praktikum ini terdiri dari empat tahap, yaitu:

1. Pemisahan sel-sel darah dari plasma darah
2. Isolasi protein-protein dari sel-sel darah
3. Pengendapan protein plasma dengan larutan garam berkonsentrasi tinggi
4. Pengendapan protein plasma dengan etanol

Secara skematis, prosedur praktikum isolasi protein darah ditunjukkan pada skema berikut ini.



Dari sentrifugasi darah yang pertama, sel-sel darah akan terpisah dengan plasma darah. Sel darah adalah bagian yang mengendap pada dasar tabung sentrifus, sedangkan supernatannya adalah plasma darah. Endapan (bagian sel) ditambahkan buffer hemolysis agar sel-sel darah lisis kemudian disentrifugasi lagi sehingga terpisah antara supernatant dan endapan. Bagian supernatant merupakan protein sitoplama. Bagian endapan kemudian ditambahkan lagi buffer hemolysis dan disentrifugasi, bagian bawah dan endapan hasil sentrifugasi ini merupakan protein membrane.

Selain memisahkan protein sitoplasmik dan protein membrane dari sel darah, pada praktikum ini juga dipisahkan protein-protein yang terdapat dalam plasma. Pemisahan protein tersebut dilakukan dengan cara pengendapan plasma dalam larutan garam berkonsentrasi tinggi (NH₄)₂SO₄ dan etanol, kemudian disentrifugasi. Dari proses tersebut diperoleh protein dalam supernatan (Gs dan Es) dan protein dalam endapan (Gp dan Ep).

TEKNIK PCR, ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS POLYACRILAMIDE GEL ELEKTROFORESIS (SDS PAGE)

Oleh: Jenny Novina Sitepu – Liza Mutia

Waktu Praktikum:

Kamis, 22 November dan 06 Desember 2012

Jam 08.00 – 17.00 WIB

I. Tujuan Praktikum :

1. Mengerti dan memahami teknik PCR
Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik yang digunakan untuk memperbanyak fragmen DNA sehingga mudah dianalisa.
2. Mengerti prinsip dasar elektroforesis
Protein-protein atau asam nukleat dapat dipisahkan satu dari yang lain atas dasar perbedaan muatan listrik.
3. Melatih teknik elektroforesis agarose dengan sampel-sampel DNA yang diperoleh dari sel epitelial mulut manusia
Elektroforesis agarose dapat digunakan untuk memisahkan asam nukleat (atau fragmennya) yang bermuatan negatif sesuai dengan arus listrik. Pada sistem elektroforesis tersebut, agarose merupakan bahan media yang berfungsi sebagai alas/ medium pemisah yang diletakkan antara anode dan katode alat elektroforesis. Medium pemisah tidak bergerak (fase stationer). Molekul yang ingin dipisahkan diletakkan pada medium pemisah dan dibawa sesuai dengan muatan listrik oleh karena medium pemisah direndam dengan larutan ionik.
4. Menggunakan teknik SDS-PAGE untuk memisahkan protein-protein darah
Protein-protein dapat dipisahkan berdasarkan berat molekul. SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis*) adalah teknik elektroforesis yang sering digunakan dalam analisis protein di laboratorium.

II. Teknik PCR

Total sampel yang digunakan pada praktikum ini adalah 16 sampel sehingga untuk pembuatan larutan mix solution yang digunakan adalah:

	1 sampel	16 sampel
1. Forward Primer	0,25 µL	4 µL
2. Reverse Primer	0,25 µL	4 µL
3. dNTP's	0,50 µL	8 µL
4. 10 x Buffer	0,25 µL	4 µL
5. Taq Polimerase	0,125 µL	2 µL
6. Aquabidest (23-1,375)	23,625 µL	403 µL
Jumlah	25 µL	425 µL

Larutan DNA sampel (2 µL) + 25 µL larutan mix solution disusun dalam Thermal Cycler kemudian PCR dijalankan sekitar 2 jam.

Sebagai control negatif : 25 µL larutan mix solution, tanpa penambahan DNA sampel.

Elektroforesis Agarose

Catatan:

Pada praktikum ini, larutan 1X TBE yang disiapkan sebanyak 500ml atau setengah kali dari jumlah yang dicontohkan dalam panduan praktikum sehingga bahan-bahan yang digunakan adalah setengah kalinya. Larutan agarose 0,8% yang dibuat sebanyak 40 ml, sehingga agarose yang digunakan bukan 1g tapi 0,32g menurut perhitungan:

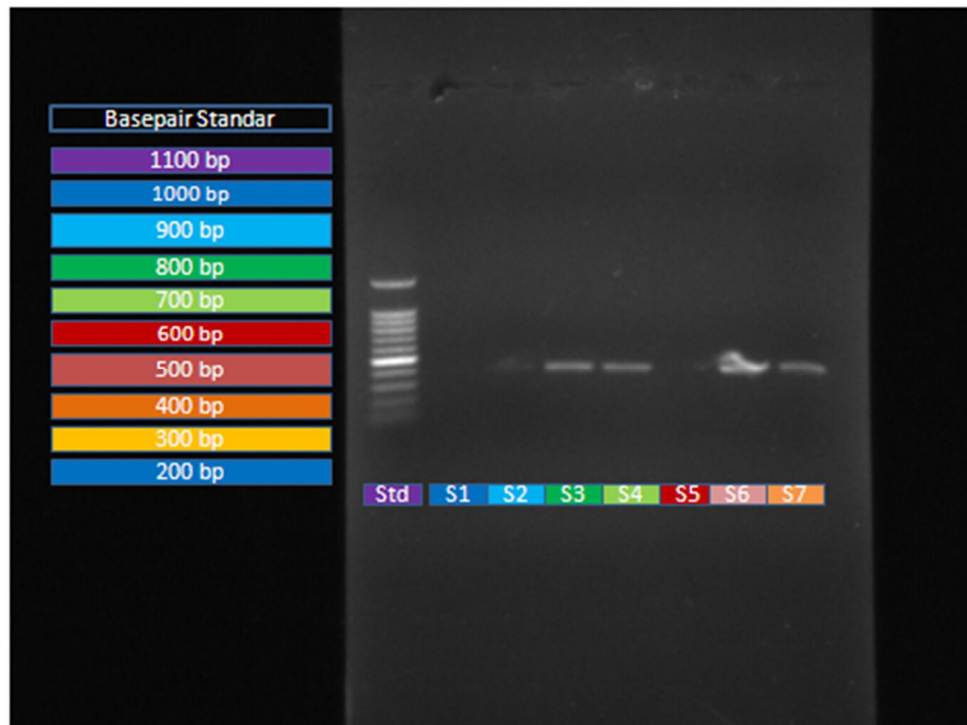
$$\frac{0,8}{100} \times 40 = 0,32g$$

DNA yang diperiksa adalah DNA dari sel epithelial mulut manusia. Pada pewarnaan DNA, 8 µL DNA dari sel epithelial dicampur dengan 2 µL pewarna DNA di atas parafilm dan langsung semuanya (10 µL) dimasukkan ke dalam sumur gel agarose.

Cara kerja:

1. Siapkan casting tray, pasang comb pada pertengahan tray, kemudian tuangkan 40 ml agarose 0,8% ke dalam casting tray.
2. Bila gel sudah beku, lepaskan comb secara hati-hati.
3. Letakkan gel di dalam elektroforesis tank yang sudah berisi larutan 1X TBE. Perhatikan cara meletakkannya. Elektroforesis tank dapat diisi dengan 3 casting gel.
4. Tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel-gel terbenam seluruhnya.
5. Untuk mewarnai DNA manusia, campur 10µl DNA dari sel epitelial dengan 10µl perwarna DNA di atas parafilm dan langsung masukan semuanya (20µl) ke sumur gel. Kemudian, dengan parafilm baru lagi, campur 10µl DNA dari sel darah dengan 10µl perwarna DNA di atas parafilm dan langsung masukan semuanya (20µl) ke sumur gel. Catat posisi dan urutan sampel grup Anda pada halaman hasil praktikum ini.
6. Nyalakan mesin elektroforesis selama 90 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. Gambarkan pada halaman hasil praktikum ini hasil yang diperoleh.
9. Pindahkan ke alat "UV reader" supaya hasilnya lebih jelas lagi. Foto hasilnya.

Foto Hasil PCR dan Elektroforesis Agarose



Gambar 1. Foto Hasil PCR dan Elektroforesis pada Medium Agarose

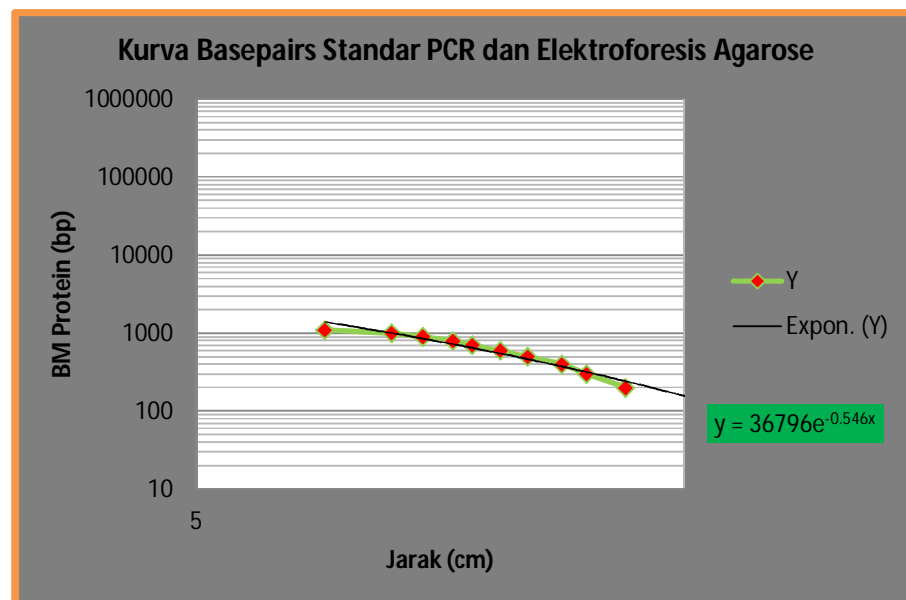
Keterangan gambar:

- Std : Marker
- S1 : Kontrol
- S2 : Epitel Jenny
- S3 : Darah Liza
- S4 : Epitel Liza
- S5 : Epitel Paska
- S6 : Epitel Selly
- S7 : Epitel Jenny

Dari gambar di atas dapat dilihat bahwa pada sumur control tidak tampak adanya band DNA karena memang tidak mengandung DNA. Pada sampel 3, 4, 6, dan 7 band DNA terlihat jelas sedangkan pada sampel 2 dan 5 band DNA tidak terlalu jelas. Band yang jelas menunjukkan bahwa banyak DNA yang terisolasi.

Tabel 1. Jarak Band dan Basepairs Standar PCR dan Elektroforesis Agarose

Band	Jarak Band (cm)	Basepairs
Band 1	6	1100
Band 2	6.6	1000
Band 3	6.9	900
Band 4	7.2	800
Band 5	7.4	700
Band 6	7.7	600
Band 7	8	500
Band 8	8.4	400
Band 9	8.7	300
Band 10	9.2	200



Gambar 2. Kurva Basepairs Standar PCR dan Elektroforesis Agarose

Tabel 2. Jarak Band dan Basepairs Protein Sampel PCR dan Elektroforesis Agarose

Sampel	Jarak Band (cm)	Basepair
Epitel Jenny	8,1	490
Darah Liza	8,2	459
Epitel Liza	8,2	459
Epitel Paska	*	*
Epitel Selly	8,1	490
Epitel Jenny	8,1	490

* Band DNA tidak terlihat

Pembahasan

1. Pada sampel 3, 4, 6, dan 7 band DNA terlihat jelas sedangkan pada sampel 2 dan 5 band DNA tidak terlalu jelas. Tidak terlihatnya band DNA pada sampel 5 menu dapat disebabkan karena sedikitnya jumlah DNA yang terisolasi ini. Hal ini dapat disebabkan kesalahan dalam pengambilan sel ephitelial mulut, sedangkan pada sampel S2 mungkin disebabkan karena kesalahan dalam pengisian sumur agarose (kebocoran) karena pada S7 yang menggunakan sampel yang sama band DNA terlihat jelas. Band yang jelas menunjukkan bahwa banyak DNA yang terisolasi.
2. Pada foto hasil elektroforesis agarose di atas terlihat bahwa jarak antara band-band DNA sangat dekat. Hal tersebut dapat disebabkan karena waktu yang digunakan untuk elektroforesis singkat. Terlihat dari band-band DNA hanya sampai setengah dari medium agarose. Untuk memperjelas hasil band-band DNA seharusnya dilakukan elektroforesis dilakukan lebih lama sampai band-band DNA hampir mencapai ujung dari medium agarose.
3. Dari pengamatan selama praktikum, pada proses elektroforesis pergerakan DNA ke katode terlihat lambat. Hal ini ditunjukkan oleh pemanjangan band DNA yang sangat lambat dimana waktu elektroforesis sudah diperpanjang 3x namun band DNA belum mencapai ujung medium agarose. Hal ini dapat terjadi karena konsentrasi medium lebih tinggi dari seharusnya yang dapat disebabkan karena kesalahan dalam menimbang bubukagarose yang digunakan pada praktikum ini.
4. Band DNA sampel yang diperiksa umumnya terdapat pada daerah antara dengan band ke-7 dari marker dengan band ke-8. Band ke-7 marker adalah 500 bp dan band ke-8 adalah 400. Hal ini menunjukkan nilai basepairs DNA sampel adalah antara 400 sampai dengan 500. Nilai basepairs yang diperoleh dari persamaan sesuai dengan gambaran berat molekul dari foto hasil elektroforesis yaitu 490 dan 459, berada di antara 400 dan 500. Hal ini menunjukkan persamaan dari hasil elektroforesis agarose dapat digunakan sebagai persamaan standar.

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

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.

Persiapan sampel-sampel protein

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. ****Kerjakan langkah ini di fumehood****. Tambah 450 μ L buffer sampel dan 25 μ L -merkaptioetanol 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.

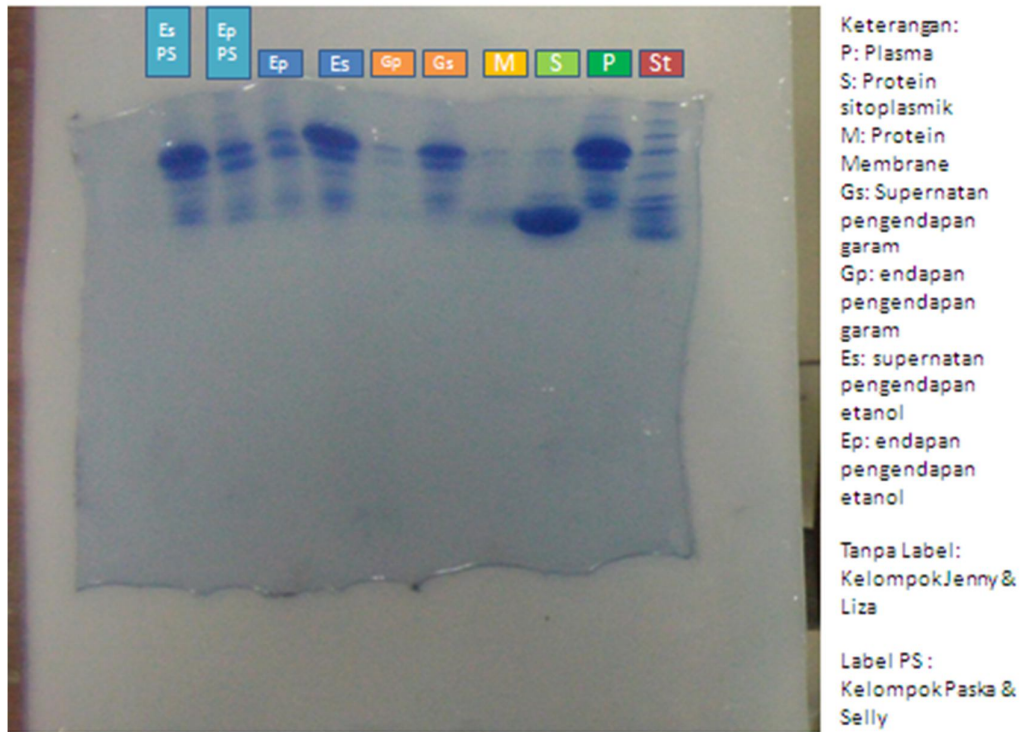
Loading and running the gel

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).

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 (catat petanda yang Anda buat supaya ingat).
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.

Foto Hasil PCR dan Elektroforesis Polyacrylamide Gel

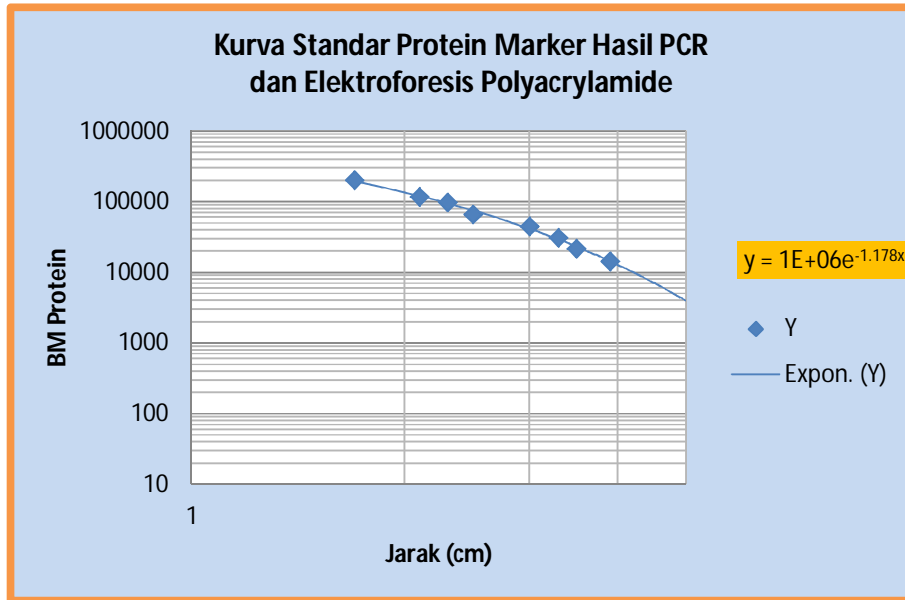


Gambar 3. Foto Hasil PCR dan Elektroforesis Polyacrylamide Gel

Dari gambar di atas terlihat bahwa band-band DNA sampel belum terpisah dengan baik (masih berdempet) sehingga sulit untuk diinterpretasikan. Namun, sekilas dapat dilihat bahwa band-band dari protein sejenis dengan teknik yang pengendapan yang sama memiliki pola band yang sama. Misalnya, protein Es kelompok Jenny-Liza dengan Es dari kelompok Paska-Selly memiliki pola yang sama, yakni memiliki band yang tebal pada band ke-4 (daerah Bovine serum albumin pada marker).

Tabel 3. Jarak Band dan Berat Molekul Protein Marker Hasil PCR dan Elektroforesis SDS-PAGE

Nama Protein	Jarak Band (cm)	BM Protein
Myosin	1.7	200,000
β -Galactosidase	2.1	116,250
Glycogen phosphorilase b	2.3	97,400
Bovine serum albumin	2.5	66,200
Ovalbumin	3	45,000
Carbonicanhydrase	3.3	31,000
Soybean trypsin inhibitor	3.5	21,500
Lysozyme	3.9	14,400



Gambar 4. Kurva Standar Protein Marker Hasil PCR dan Elektroforesis Polyacrylamide

Tabel 4. Jarak Band, Berat Molekul dan Jenis Protein Sampel Elektroforesis SDS-PAGE

Sampel	Band 1	Band 2	Band 3	Band 4	Band 5	Band 6	Band 7	Band 8
Plasma	1.7 200.000 Myosin	2.1 116250 β-Galaktosidase	2.3 97400 Phosphorylase b	2.5 66200 Bovine	3 4500 Ovalbumine	3.3 31000 Carbonic Anhydrase	3.5 21500 Trypsin	- - -
Protein sitoplasmik (S)	-	-	-	2.5 66200 Bovine	3 4500 Ovalbumine	-	3.5 21500 Trypsin	- - -
Protein Membrane (M)	-	-	-	2.5 66200 Bovine	3 4500 Ovalbumine	-	3.5 21500 Trypsin	- - -
Protein supernatant teknik pengendapan larutan garam (Gs)	1.7 200.000 Myosin	2.1 116250 β-Galaktosidase	2.3 97400 Phosphorylase b	2.5 66200 Bovine	3 4500 Ovalbumine	3.3 31000 Carbonic Anhydrase	3.5 21500 Trypsin	- - -
Protein endapan teknik pengendapan larutan garam (Gp)	-	-	-	2.5 66200 Bovine	3 4500 Ovalbumine	-	3.5 21500 Trypsin	- - -
Protein supernatant teknik pengendapan larutan etanol (Es)	1.7 200.000 Myosin	2.1 116250 β-Galaktosidase	2.3 97400 Phosphorylase b	2.5 66200 Bovine	3 4500 Ovalbumine	3.3 31000 Carbonic Anhydrase	3.5 21500 Trypsin	- - -
Protein endapan teknik pengendapan larutan etanol Ep	1.7 200.000 Myosin	2.1 116250 β-Galaktosidase	2.3 97400 Phosphorylase b	2.5 66200 Bovine	-	-	3.5 21500 Trypsin	- - -

Protein endapan teknik pengendapan larutan etanol grup PS (Ep PS)	1.7 200.000 Myosin	2.1 116250 β -Galaktosidase	2.3 97400 Phosphorylase b	2.5 66200 Bovine	-	-	3.5 21500 Trypsin	-
Protein supernatant teknik pengendapan larutan etanol grup PS (Es PS)	1.7 200.000 Myosin	2.1 116250 β -Galaktosidase	2.3 97400 Phosphorylase b	2.5 66200 Bovine	3 4500 Ovalbumine	3.3 31000 Carbonic Anhydrase	3.5 21500 Trypsin	-

Tabel 5. Jarak Band dan Berat Molekul Sampel berdasarkan Persamaan

Sampel	Jarak Band (cm)	BM Protein (kD)
Plasma	2.7	80,640
Protein sitoplasmik (S)	3.7	4,400
Protein Membrane (M)	2.7	80,640
Protein supernatant teknik pengendapan larutan garam (Gs)	2.7	80,640
Protein endapan teknik pengendapan larutan garam (Gp)	2.7	80,640
Protein supernatant teknik pengendapan larutan etanol (Es)	2.7	80,640
Protein endapan teknik pengendapan larutan etanol Ep	3	57,768
Protein endapan teknik pengendapan larutan etanol grup PS (Ep PS)	3	57,768
Protein supernatant teknik pengendapan larutan etanol grup PS (Es PS)	2.7	80,640

*Untuk perhitungan di atas band yang digunakan adalah band yang paling tebal dari masing-masing sampel

Pembahasan

1. Pada foto hasil elektroforesis polyacrylamide di atas terlihat bahwa jarak antara band-band DNA sangat dekat. Hal tersebut dapat disebabkan karena waktu yang digunakan untuk elektroforesis singkat. Terlihat dari band-band DNA hanya sampai setengah dari medium agarose. Untuk memperjelas hasil band-band DNA seharusnya dilakukan elektroforesis dilakukan lebih lama sampai band-band DNA hampir mencapai ujung dari medium polyacrylamide.
2. Band-band dari protein sejenis dengan teknik yang pengendapan yang sama memiliki pola band yang sama. Misalnya, protein Es kelompok Jenny-Liza dengan Es dari kelompok Paska-Selly memiliki pola yang sama, yakni memiliki band yang tebal pada band ke-4 (daerah Bovine serum albumin pada marker). Demikian juga dengan band DNA sampel P (Plasma darah).
3. Ep kelompok Jenny-Liza memiliki pola band yang sama dengan Ep dari kelompok Paska-Selly. Kedua sampel memiliki pola yang tebal pada band

ke-4 (daerah Bovine serum albumin pada marker) dan band ke-5 (daerah Ovalbumin pada marker). Dari hal tersebut dapat diinterpretasikan bahwa protein yang diisolasi dari kedua sampel adalah sama yaitu Bovine serum albumin dan Ovalbumin.

4. Hasil berat molekul sampel protein yang diperoleh dari persamaan tidak sesuai dengan perkiraan berat molekul yang diperoleh dari gambar hasil elektroforesis Polyacrylamide. Misalnya, protein sampel P (plasma). Pada gambar terlihat bahwa protein plasma terletak pada daerah antara band ke-4 (daerah Bovine serum albumin pada marker) dan band ke-5 (daerah Ovalbumin pada marker) atau pada BM antara 45000 dan 66200. Sedangkan dari rumus didapatkan nilai BM sebesar 80.640. Hal ini menunjukkan rumus dari kurva elektroforesis polyacrylamide tidak dapat digunakan untuk menghitung berat molekul sampel. Ini dapat disebabkan karena letak band tidak akurat karena belum terpisah seperti yang seharusnya.

III. Kesimpulan

1. Jarak band-band DNA pada kedua teknik elektroforesis yang dilakukan pada praktikum ini terlalu dekat. Hal ini mungkin disebabkan waktu elektroforesis masih terlalu singkat, konsentrasi medium yang digunakan tidak sesuai atau kesalahan pada alat elektroforesis sendiri sehingga DNA bergerak lambat pada medium.
2. Pada elektroforesis agarose, band DNA sampel yang diperiksa berada pada daerah antara band ke-7 (Soybean trypsin inhibitor, BM 21500) dan band ke-8. dan band ke-8 (Lysozyme, BM 14400). Hal ini menunjukkan berat molekul DNA sampel adalah antara 14400 sampai dengan 21500.
3. Band-band dari protein sejenis dengan teknik yang pengendapan yang sama memiliki pola band yang sama. Protein Es kelompok Jenny-Liza dengan Es dari kelompok Paska-Selly memiliki pola yang sama, yakni memiliki band yang tebal pada band ke-4 (daerah Bovine serum albumin pada marker). Demikian juga dengan dengan sampel Ep kedua kelompok.
4. Persamaan yang diperoleh dari perbandingan jarak band dan berat molekul yang diperoleh pada elektroforesis agarose dapat digunakan sebagai persamaan standar untuk menghitung berat moleku protein.
5. Persamaan yang diperoleh dari perbandingan jarak band dan berat molekul marker yang diperoleh dari elektroforesis Polyacrylamide tidak dapat digunakan sebagai rumus standard untuk memprediksi berat molekul sampel karena hasil yang diberikan jauh berbeda dengan gambaran berat molekul yang ditunjukkan pada foto hasil elektroforesis. Ini dapat disebabkan karena letak band tidak akurat karena belum terpisah seperti yang seharusnya.

IV. Saran :

1. Bahan yang digunakan untuk pembuatan agarose dan jumlah agarose yang dibuat sebaiknya disesuaikan dengan panduan. Pada praktikum ini, agarose hanya dibuat untuk 40ml.
2. Casting tray Polyacrylamide yang digunakan dalam praktikum sebaiknya ditambah sehingga praktikum dapat dilakukan sekaligus oleh semua praktikan kelompok pagi.
3. Persiapan bahan, gel dan alat elektroforesis sebaiknya dilakukan lebih awal dan lebih baik sehingga proses elektroforesis dapat dimulai lebih awal sehingga durasi elektroforesis lebih panjang. Dengan demikian, jarak band-band DNA hasil elektroforesis yang diperoleh akan lebih panjang.