

PRAKTIKUM ISOLASI DNA DAN TEKNIK PCR

- Tujuan:**
- Mengerti metode umum mengisolasi DNA
 - Mengisolasi DNA dari buah dan sel-sel epitelial mulut
 - Mengerti dan mempraktek teknik PCR dengan sampel DNA manusia

**Kegiatan praktikum ini diadaptasi dari bahan:*

- Hearn R.P. & Arblaster K.E., 2010, *DNA extraction techniques for use in education*, di dalam *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **38** (3) pp 161-166.
- Bagian Biokimia FKUI, 2000, *Isolasi dan pemisahan protein*, di dalam *Biokimia Eksperimen Laboratorium*, Widya Medika, Jakarta 10042 pp13-34.
- <http://sciencebiotech.net/mengenal-pcr-polymerase-chain-reaction/>

Pendahuluan: DNA dapat diisolasi dari jaringan apapun yang mempunyai sel inti. 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*)

Pada praktikum ini, DNA akan diisolasi dari beberapa macam buah dan kemudian dari “jaringan” Anda sendiri, yaitu sel-sel epitelial mulut.

PCR (polimer chain reaksi) akan dilaksanakan dengan sampel DNA manusia.

Pada praktikum elektroforesis Anda akan periksa hasil isolasi DNA dari buah dan hasil PCR DNA orang dengan teknik elektroforesis agarose.

Bagian A – ISOLASI DNA DARI BUAH

Alat dan bahan yang digunakan

NaCl	sabun cuci piring	papain	akuades
timbangan digital	buah ~50gr	pisau	blender
kertas saring	flask Erlenmeyer	funnel	stel & klem
pipet Mohr	tabung reaksi	etanol dingin	batang kaca
rak tabung reaksi	spidol	tabung mikrosentrifus	mikrosentrifus

Larutan Detergent – Per sampel buah kita perlu 125ml dan resep di bawah ini untuk 125ml.

- Tambahkan 1,5 gr NaCl, 12,5mL sabun cuci piring, 0,5gr papain (semacam protease) dalam satu beaker dan tambah akudes sampai 125 ml. Aduk dengan baik.

Sampel-sampel DNA dari buah – cara kerja

Buah yang dibawa (kira-kira 50gr) dihancurkan dalam blender dengan larutan detergent (125ml)

- Saringlah dengan kertas saringan dan kumpulkan eluant di flask erlenmeyer. Pakailah stel dan klem.
- 4 ml eluant dipindahkan ke tabung reaksi yang bersih. Dengan hati-hati (supaya etanol tidak bercampur dengan eluant) tambahkan 4 ml etanol dan biarkan 5 menit.
- DNA akan menggumpal di batasan eluant dan etanol (kelihatan seperti benang putih)
- DNA diambil dengan batang kaca atau besi dan masukkan ke dalam 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 terlihat sebagai endapan. Buanglah supernatant.

5. Simpan di bawah 0°C.

Bagian B – ISOLASI DNA DARI SEL-SEL EPITELIAL (setiap mhs menyiapkan sampel masing-masing)

Alat dan bahan yang digunakan

minuman isotonik	batang kayu	beaker	pH meter	akuades
timbangan digital	pipet Mohr	waterbath	tabung reaksi	mikrosentrifus
Tris	1 N HCl	EDTA	spidol	SDS
stok proteinase K (100µg/ml)		NaCl	vortex	etanol dingin
tabung mikrosentrifus				

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.

Persiapan buffer 2,5M NaCl; 50mL.

Satu kelompok meja menyiapkan 50mL 2,5 M NaCl yang cukup untuk semua kebutuhan praktikum ini. Berat molekul NaCl = _____g/mol

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

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

C. Pengendapan DNA

10. Tambahkan 100 μ L NaCl, 2,5M. Aduk dengan cara mebolak-balikkan tabungnya.
11. Transfer semua ke tabung reaksi yang bersih dan kering dengan hati-hati biar tidak banyak buih-buih..
12. Dengan hati-hati tambahkan 1 mL etanol dingin supaya batasnya jelas.
13. Diamkan selama 5 menit
14. DNA akan menggumpal di batasan buffer dan etanol (kelihatan seperti benang putih)
15. 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.
16. Simpan di bawah 0°C

HASIL PRAKTIKUM ISOLASI DNA DAN ELEKTROFORESIS AGAROSE

Observasi Anda pada praktikum ini:

Lampiran – ISOLASI DNA DARI DARAH

Alat dan bahan yang digunakan

darah (1cc)	larutan RNAase	anti-koagulan
isopropanol	larutan sel lisis	70% etanol
larutan nuklei lisis	larutan rehidrasi DNA	larutan “ <i>protein precipitation</i> ”
water bath	tabung mikrosentrifus	mikrosentrifus
vorteks	kertas absorben	pipet tetes

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 ke dalamnya.
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 µl 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 µl 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 (13.000 - 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 µl 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 (13.000 - 16.000 x g) selama 1 menit pada temperatur ruangan. DNA akan terlihat sebagai pellet kecil yang putih.
16. Buang supernatant dan tambahkan 300 µl 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 terbang! Letakkan tabung secara terbalik diatas kertas absorben dan keringkan di udara selama 10-15 menit.
18. Tambahkan 100 µl 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