

PRAKTIKUM ELEKTROFORESIS AGAROSE SERTA SDS-PAGE

(SDS PolyAcrilamide Gel Elektroforesis)

- Tujuan:** i) Mengerti prinsip dasar elektroforesis
ii) Melatih teknik elektroforesis agarose dengan sampel-sampel DNA yang diperoleh dari buah dan dari jaringan manusia.
iii) Menggunakan teknik SDS-PAGE untuk memisahkan protein-protein darah.

**Kegiatan praktikum ini diadaptasi dari bahan:*

- Bagian Biokimia FKUI, 2000. Pemisahan protein dengan elektroforesis gel poliakrilamid-SDS. *Biokimia Eksperimen Laboratorium* Jakarta: Widya Medika, pp36-44
- Mordacq, J.C. & Ellington R.W. 1994. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of blood proteins. *Tested Studies For Laboratory Teaching* 15:15-44

Pendahuluan:

Protein-protein atau asam nukleat dapat dipisahkan satu dari yang lain atas dasar perbedaan muatan listrik. Pada hari ini, Anda akan diperlihatkan hasil elektroforesis DNA dengan teknik elektroforesis agarose dan memisahkan protein-protein yang sudah diisolasi dari darah dengan SDS-PAGE.

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. Molekul yang besar bergerak lebih lambat dari pada molekul lebih kecil. Gel agarose disiapkan dengan ethidium bromide yang mengikat dengan DNA (*intercalater*) dan diperlihatkan warna oranye kalau disinarkan dengan cahaya UV.

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. Sampel protein denaturasi (dipanaskan) dan dicampur dengan SDS (yang merupakan detergen yang anionik) dengan akibat kompleks protein-detergen itu bermuatan negatif dan protein yang lebih besar mempunyai muatan negatif yang lebih besar.. Kompleks protein-detergen itu akan dibawa oleh medan listrik ke arah kutub positif (anoda). Gel akrilamide berfungsi sebagai dasar atau alas atas gerakan sampel protein. Konsentrasi akrilamide menentukan ukuran pori-pori gel dan ukuran pori-pori gel menentukan jarak yang ditempuh oleh kompleks protein-SDS. Jadi berapa faktor harus ditentukan untuk memaksimalkan pemisahan protein-protein melalui teknik SDS-PAGE (antara lain: kadar SDS, konsentrasi gel akrilamide dan ukuran gelnya, kemurnian sampel protein dan jumlah sampel yang diletakkan pada gel; voltage yang digunakan pada alat elektroforesis dan selama medan listrik dihidupkan).

Cara Kerja:

Alat dan Bahan:

7 sampel protein darah dari minggu yg lalu		Tris
sampel DNA sel epitelial	Protein standard SDS-PAGE	DTT
perwarna DNA (crystal violet dalam 20% gliserol)		sampel DNA buah
sarung tangan	1 N HCl	SDS
tempat buang cairan biologis	pipet otomatis	agar 2%
water bath	biru bromfenol	Na ₂ HPO ₄
mikrosentifus	pipet tetes	gliserol
akuades		EDTA
alat elektroforesis agarose		asam borik
tabung mikrosentrifus (1,5ml)	alat elektroforesis	larutan pewarna
pipet Mohr	power supply	larutan pencuci
Erlenmeyer flask	beaker	spidol
pH meter	Hamilton syringe	penggaris (mm)
etanol absolute, dingin	vorteks	tisu
gel poliakrilamide – SDS 10%	β-merkaptioetanol	agarose
isobutanol	kertas grafik semi-log	water bath

Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

1. **1X TBE** - setiap kelompok siapkan 1000mL (resep dibawah ini utk 1000ml)
10.8 g Tris, 5.5 g asam borik acid, 0.74 g EDTA dimasukkan ke dalam beaker 1000 ml.
Tambahkan 900mL akuades dan aduk dengan magnetic stirrer sampai larut. Tambahkan akuades sampai volume larutan sama dengan 1 L. Simpan di dalam botol bersih pada temperatur ruangan (bisa disimpan selama beberapa bulan).
2. **0.8% Agarose** - setiap kelompok siapkan agarose secukupnya untuk anggotanya (perlu 40ml/casting tray) – resep di bawah ini utk 125ml.
****Hati-hati dengan ethidium bromide – pakailah sarung tangan*****
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 secara gerakan flask. Dipanaskan sampai mendidih dan larutan jernih. Dinginkan sampai ~60° dan tambahkan 12µL larutan ethidium bromide/casting tray.
3. **Larutan Dapar Sampel** (50mM Tris-HCl pH 6,8; 10%(v/v) gliserol; 1% (b/v) SDS; 0,01% (b/v) biru bromfenol).
4. **Larutan Dapar Elektroda** (250mM Tris-HCl pH 6,8; 1,8M glisin; 1% (b/v) SDS).
5. **Larutan Pewarna** (0,15% Coomassie Brilliant Blue R-250; 250mL metanol; 50mL asam asetat; akuades sampai 500mL)
6. **Larutan Pencuci** (50mL metanol; 75mL asam asetat; akuades sampai 1000mL)

Bagian A – ELEKTROFORESIS GEL AGAROSE

1. Setiap mhs 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 alat elektroforesis:

1. Bila gel sudah beku, lepaskan comb secara hati-hati.
2. Letakkan gel di dalam elektroforesis tank yang sudah berisi larutan 1X TBE. Perhatikan cara meletakkannya. Elektroforesis tank dapat disii dengan 3 casting gel.
3. Tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel-gel terbenam seluruhnya.
4. Untuk mewarnai DNA buah, tambahkan 100µl perwarna DNA (crystal violet dalam 20% gliserol) pada DNA yang disimpan dari minggu yang lalu di tabung mikrosentrifus
5. Gunakan mikropipet untuk menghisap 20µL sampel DNA buah dan secara hati-hati masukkan ke dalam “well”/sumur tertentu. Pada saat memasukkannya, pastikan ujung dari tip sudah sedikit masuk pada lubang well gel elektroforesis. Catat posisi dan urutan sampel grup Anda pada halaman hasil praktikum ini.
6. 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.
7. Nyalakan mesin elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 90V. Sampel-sampelnya akan mulai bergerak ke katode, (DNA bermuatan negatif)
8. Matikan mesin elektroforesis secara sempurna.
9. Dengan sangat hati-hati keluarkan gel dan letakan pada tray yang disediakan. Gambarkan pada halaman hasil praktikum ini hasil yang diperoleh.
10. Pindahkan ke alat “UV reader” supaya hasilnya lebih jelas lagi. Foto hasilnya.

SDS PAGE

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.

****Pakai sarung tangan dan hati-hati dengan bahan yang berisi akrilamide****

****Janganlah menambah ammonium persulfat serta TEMED sebelum Anda siap menuangkan campuran akrilamide ke dalam plat kaca yang sudah disiapkan oleh karena bahan tersebut berfungsi sebagai katalyst polimerisasi akrilamide****

bahan	gel pemisah (tabung reaksi 1)	gel penumpuk (tabung reaksi 2)
akrilamide 30%/bisakrilamide 0,8%	5 mL	3,05 mL
1,5M Tris-HCl pH=8,6	3,4 mL	---
1,5M Tris-HCl pH=6,8	---	2,0mL
akuades	5,1mL	4,65mL
SDS 10%	148 μ L	85 μ L
amonium persulfat 10%	100 μ L	75 μ L
TEMED	10 μ L	7,5 μ L

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. Singkirkan gelembung udara pada bagian bawah gel.

Bagian B: Persiapan sampel-sampel protein (sampel-sampel protein akan disiapkan petugas lab)

- 1) Pakailah sarung tangan dan teknik keselamatan di laboratorium yang benar.
- 2) Tentukan waterbath pada temperatur 100°C.
- 3) Keluarkan 6 sampel protein darah kalian (yaitu M, S, G_S, G_P, E_S, E_P) dari kulkas.
- 4) Siapkan 3 tabung mikrocentrifus lagi dan tandai dengan S₂, G_S2, E_S2. Tambah 450 μ L buffer sampel dan 25 μ L β -merkaptotanol ke setiap tabung tersebut. Transfer 50 μ L sampel protein S, G_S dan E_S ke tabung mikrosentirfus S₂, G_S2, dan E_S2 masing-masing.
- 5) Pada sampel protein M, G_P dan E_P, tambah 900 μ L buffer dan 25 μ L β -merkaptotanol sampel ke setiap tabung tersebut.
- 6) Tutup dan vorteks pelan-pelan supaya endapannya dicampur rata dengan buffer.
- 7) Masukkan 6 tabung mikrosentrifus (yaitu M, 2S, G_S2, G_P, E_S2, E_P) ke dalam waterbath yang mendidih. Biarkan 5 menit.
- 8) Tentukan bahwa tabung mikrosentrifus berkeselimbangan dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan 14.000 rpm.

Bagian C: Loading and running the gel

1. Masukkan 10 μ L sampel protein (yaitu M, 2S, G_s2, G_p, E_s2, E_p) 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).

Bagian D: 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. Masukkan hasil pada tabel di halaman hasil praktikum ini.

Laporan Isolasi DNA dan Elektroforesis Agarose atau Isolasi Protein serta SDS-PAGE:

Buat laporan praktikum, dan isi tujuannya, dengan kata-kata sendiri.

Buat 2 grafik (semi-log) dari data yang disediakan (satu utk elektroforesis protein dan satu utk elektroforesis fragmen asam nukleat)

Terangkan hasil yang Anda dapat serta kesimpulannya.

Berikanlah saran atas praktikum ini dan usulan supaya untuk praktikum selanjutnya lebih baik lagi.

Jawablah pertanyaan berikut untuk laporan Isolasi DNA/elektroforesis agarose:

1. Apakah ada perbedaan antara hasil yang diperoleh dari setiap macam buah? Antara hasil DNA buah dan DNA manusia? Sebutkan dua atau tiga alasan untuk perbedaan tsb.
2. Bandingkan cara kerja untuk mengisolasi DNA dari buah dan DNA dari sel epitelial. Sebutkan langkah-langkah yang sama dan langkah-langkah yang berbeda.
3. Apakah yang terjadi antara DNA dan etanol yang menyebabkan asam nukleat naik dari eluant buah?

Yang khusus untuk laporan Isolasi Protein/ SDS-PAGE

1. Foto hasil gel dan masukkan foto tersebut dalam laporan Anda. Berikan beberapa komentar atas apa yang terlihat pada foto gel.
2. Buat kurva standar protein petanda pada kertas grafik semilog dengan sumbu x (linear) adalah jarak (mm atau cm) pita-pita protein petanda dari batas atas gel pemisah dan sumbu y (semi-log) adalah berat molekul protein-protein petanda.
3. Dengan menggunakan kurva standar protein petanda, tentukan berat molekul pada pita-pita yang dilihat pada protein sampel M, 2S, G_s2, G_p, E_s2, dan E_p.