

LAPORAN PRAKTIKUM 5

PRAKTIKUM ISOLASI DNA DAN TEKNIK PCR

HARI/ TANGGAL PRAKTIKUM : KAMIS/ 1 November 2012

JAM : 08.00 – 11.00 WIB

Nama Praktikan : KAROLINA BR SURBAKTI (NIM: 20127008018)

LUCIA AKTALINA (NIM : 201217008002)

Tujuan:

- i) Mengerti metode umum mengisolasi DNA
- ii) Mengisolasi DNA dan sel-sel epitelial mulut
- iii) Mengerti dan mempraktek teknik PCR dengan sampel DNA manusia

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)

ISOLASI DNA DARI SEL-SEL EPITELIAL

Alat dan bahan yang digunakan

Minuman isotonic	Beaker	Ph meter	Aquadest
Batang kayu	Waterbath	Tabung reaksi	Mikrosentrifus
Timbangan digital	EDTA	spidol	SDS
Stok proteinase K(100µg/ml)	NaCl	vortex	Etanol dingin
Tabung mikrosentrifus	Tris	1 N HCl	Pipet mohr

- A. Persiapan minuman isotonik (0,9% NaCl, 5% sukrosa dalam aqua botol).
- B. Persiapan buffer Tris-EDTA (10mM Tris, 1 mM EDTA, 1% SDS; pH =8).
- C. Persiapan buffer 2,5M NaCl; 50mL.

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.

B. Lisis sel-sel dan pencernaan protein

3. Tentukan waterbath pada temperatur 56C.
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 50 μ L Proteinase K dan biarkan di waterbath(56C) 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.
16. Simpan dibawah 0C

ISOLASI DNA DARI DARAH

Alat dan bahan yang digunakan

Darah 1 CC	Larutan RNA ase	Antikoagulan
Isopropanol	Larutan sel lisis	70% etanol
Larutan nuclei lisis	Larutan rehidrasi DNA	Larutan protein precipitation
Water bath	Tabung mikrosentrifus	Nikrosentrifus
Voteks	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. Digoyangkan perlahan agar darah dan anti-koagulan bercampur dengan baik.
2. Ambil satu tabung Eppendorf steril lagi dan isikan dengan 900 μ L larutan sel lisis
3. Ambil 300 μ l darah dari tabung mikrosentrifus pertama dan masukkan ke dalam tabung kedua. Bolak-balikkan tabung 5-6 kali supaya cairannya bercampur baik.
4. 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.
5. Sentrifugasi tabung pada 13.500 rpm (13.000-16.000 x g) selama 2 menit pada temperatur ruang.
6. Buang supernatant sebanyak mungkin tanpa mengganggu pellet putih yang tampak. Lebih kurang 10-20 μ l cairan residu akan tertinggal dalam tabung tersebut.
7. Vortex tabung dengan kuat, sebentar (10-15 detik) agar sel-sel darah putih tersuspensi kembali.
8. 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.

9. 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.
10. 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.
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 sopropanol (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 15 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

Kesimpulan

1. Pada praktikum isolasi DNA dari darah, pengambilan supernatant harus hati-hati karena akan mempengaruhi sampel yang akan digunakan untuk pemeriksaan DNA. Karena untuk pemeriksaan DNA sampel yang diambil adalah leukosit (sel darah putih) sel darah tidak mempunyai inti.
2. Pada saat sentrifugasi sampel, waktu dan kecepatan sentrifugasi harus benar-benar diperhatikan.
3. Alat-alat yang digunakan harus bersih dan kering alat yang tidak kering dapat menyebabkan darah menjadi hemolisa.

LAPORAN PRAKTIKUM 6

PRAKTIKUM ISOLASI PROTEIN DARI DARAH

HARI/ TANGGAL PRAKTIKUM : KAMIS/ 8 November 2012

JAM : 08.00 – 11.00 WIB

Nama Praktikan : KAROLINA BR SURBAKTI (NIM: 20127008018)

LUCIA AKTALINA (NIM : 201217008002)

Tujuan:

1. Memahami teknik sentrifugasi untuk pemisahan bagian – bagian sel
2. Mengetahui kadar protein dari sampel darah dengan spektrofotometer

Alat dan Bahan

Jarum steril	Tabung steril untk darah	14 ml tabung sentrifus klinik
Sentrifus klinik	Pipet otomatis	2 ml abung mikrosentrifus

Mikrosentrifus	Pipet tetes	1,5 tabung mikrosentrifus
Es	vorteks	Larutan (NH ₄) ₂ SO ₄ yg jenuh
pH meter	NaCl	Larutan 50% (NH ₄) ₂ SO ₄
Tabung reaksi dan rak	Na ₂ PO ₄	Tpt membuang cairan biologis
Pipet mohr	EDTA	Etanol absolutedingin
Tissue		Spidol

Prosedur kerja:

a. Bagian A: 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 μ l plasma dibutuhkan untuk prosedur pengendapan dengan garam tinggi, 500 μ l plasma untuk pengendapan dengan etanol dan 500 μ l 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)
- ✚ Dengan hati -hati buang sisa supernatan ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan pipet tetes
- ✚ Ditambahkan 6ml buffer cuci yang dingin ke tabung sentrifus klinik tersebut. Tutup dan vortex pelan - pelan agar sel-sel bercampur rata dengan buffer
- ✚ Pakailah tabung sentrifus klinik lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selama 5 menit
- ✚ Dengan hati - hati buang supernatant ke dalam tempat buangan cairan biologis dengan pipet tetes
- ✚ Kemudian diulangi langkah 6-8 sekali lagi. Endapan yang diperoleh merupakan sel-sel darah merah

b. Bagian B: Isolasi protein – protein dari sel –sel darah

- ∴ Pada tabung sentrifus klinik yang berisi sel- sel darah, tambahkan 6ml buffer hemolisis yang dingin
- ∴ Tutup dan vortex kuat
- ∴ Pakai tabung sentrifus klinik yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selama 10 menit
- ∴ 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
- ∴ Buang ± 5ml supernatant lagi ke dalam tempat buangan dengan pipet tetes
- ∴ Tambahkan 7ml buffer hemolisis yang dingin. Vorteks hingga kuat
- ∴ Pakai tabung sentrifus klinik yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat sentrifus klinik. Putar selam 10 menit
- ∴ 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)
- ∴ Pakai tabung sentrifus yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus supaya hinge ke tengah alat. Putar selam 30 menit pada kecepatan 14.000 rpm
- ∴ 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

c. Bagian C: Pengendapan protein plasma dengan larutan garam berkonsentrasi tinggi

- Pada tabung mikrosentrifus 1,5 ml tambahkan 250 μ l larutan (NH₄)₂SO₄ yang jenuh. Tambahkan 500 μ l sampel plasma dari tabung yang disimpan tadi
- Tutup dan vortex kuat sebentar. Biarkan diam selama 5 menit ditemperatur ruangan
- Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi
- Dengan hati - hati transfer 500 μ l supernatant ke tabung reaksi mikrosentrifus lain yang sudah ditandai. Letakkan di atas es. Inilah menjadi sampel protein supernatant garam tinggi (GS). Langsung simpan dibagian atas kulkas
- Pakailah tisu untuk mengeringkan bagian atas endapannya. Tambah 1ml larutan 50% (NH₄)₂SO₄ (yang tak jenuh) dan campur baik dengan pipet tetes
- Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi
- Buanglah supernatant dan keringkan bagian di atas endapannya dengan tisu. Inilah merupakan sampel protein pengendapan garam tinggi (GP). Tambah 500 μ l buffer hemolisis dan simpan di bagian atas kulkas

d. Bagian D: Pengendapan protein plasma dengan etanol

- Pada tabung mikrosentrifus 1,5ml tambahkan 250 μ l etanol absolute yang dingin. Tambahkan 500 μ l sampel plasma dari tabung yang disimpan tadi
- Tutup dan vortex kuat sebentar. Biar diam selama 5 menit di atas es
- Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi
- 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)

- Pakai tabung mikrosentrifus yang lain, agar seimbang dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan tinggi
- 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

LAPORAN PRAKTIKUM 7

PRAKTIKUM PCR , ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS- PAGE

HARI/ TANGGAL : **Kamis /22 November 2012**
JAM : **08.00 – 11.00 WIB**
Nama Praktikan : **KAROLINA BR SURBAKTI**
LUCIA AKTALINA

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

Alat dan bahan yang dibutuhkan pada percobaan PCR

1. Forward Primer : konsentrasi 20 pmol
2. Reverse Primer : konsentrasi 20 pmol
3. dNTP's : konsentrasi akhir adalah 0,1 mM untuk setiap nukleotida (A T,G,C)

4. 10 x Buffer (10 x Konsentrasi) dengan konsentrasi MgCl₂ 1,5 mM
5. Aquabidest steril
6. Taq Polimerase : 0,125 L
7. Sample DNA dari sel sel ephitel dan darah
8. Mineral oil (untuk menghindari penguapan)
9. Therma Cyclor PCR
10. UV reader

Cara kerja PCR

- Disiapkan larutan Mix Solution
- Perhatikan penyimpanan larutan-larutan diatas, ada yang harus pada temperature -20C (Primer, dNTP's, Buffer, Taq dan bila perlu larutan DNA), oleh karena itu pada saat bekerja harus diletakan yang berisi es
- Selalu gunakan tabung dan tips yang telah disterilisasi

Contoh menyiapkan Mix Solution :

	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 µ L
4. 10 x Buffer	0,25 µL	4 µL
5. Taq Polimerase	0,125 µL	2 µL
6. Aquabidest (23-1.375)	21,625 µL	346 µL
JUMLAH	23 µL	368 µL

- Siapkan 12 tabung PCR (steril), dipipetkan sebanyak 23 L Mix Solution masukan ke masing-masing tabung PCR
- Tambahkan 2 L larutan DNA sampel, vortex

- Jangan lupa mengikutsetakan control negative dalam setiap menjalankan PCR (control negative = tabung PCR hanya berisikan Mix Solution, tanpa penambahan larutan DNA sampel)
- Tambahkan lagi sebanyak 50 L Mineral Oil
- Tabung ditutup rapat dan susun di dalam rak/blok alat Thermal Cycler
- Atur program untuk menjalankan PCR

I. ELEKTROFORESIS GEL AGAR ROSE

Larutan larutan yang perlu disiapkan;

1.1X TBE

Timbang EDTA 0,37 gr, Tris 5,4 gr, asam boric 2,75 gr dimasukkan ke dalam beaker 500 ml.

Tambahkan 100 ml aquades dan aduk dengan magnetic stirrer sampai larut, kemudian tambahkan aquades sampai volume 500 ml.

2. 0,8 % agarose X 40 ml

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 $\sim 60^\circ$ dan tambahkan 12 μ L 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; aquades sampai 500mL)

6. Larutan Pencuci

(50mL metanol; 75mL asam asetat; aquades sampai 1000mL)

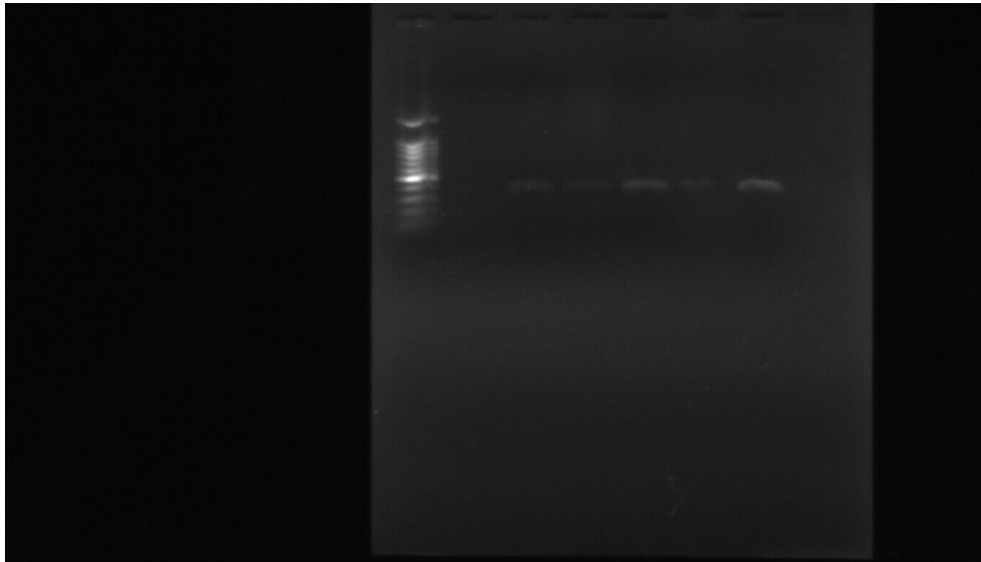
I .ELEKTROFORESIS GEL

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

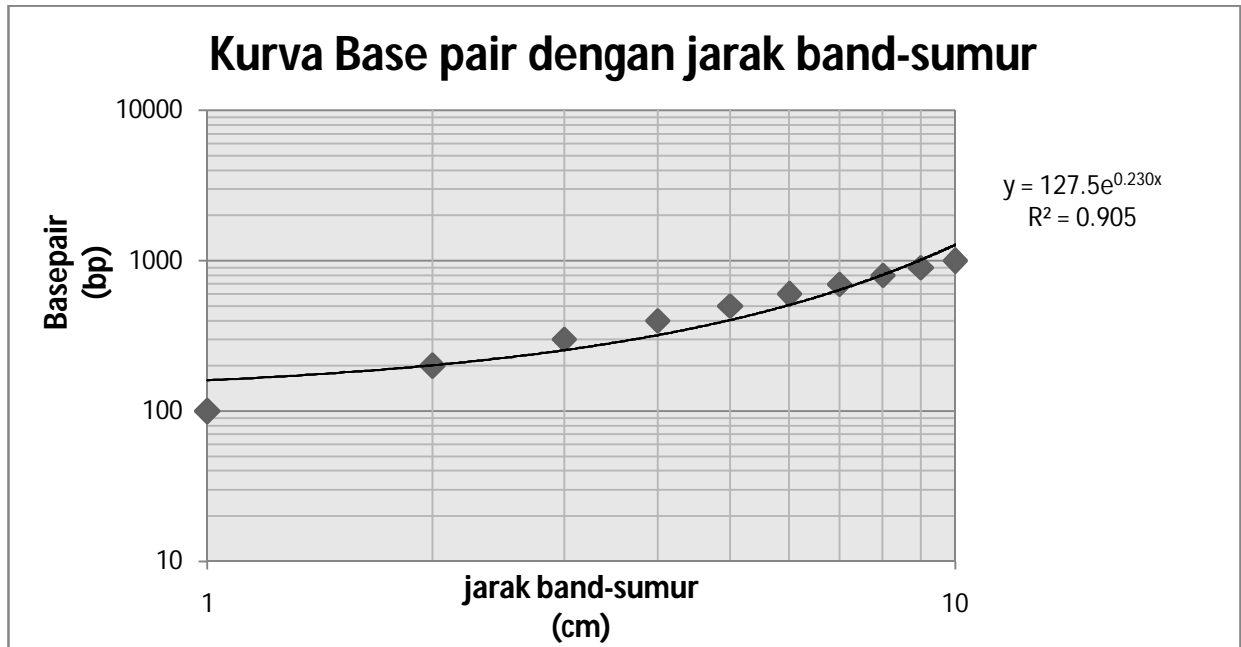
1. Cara kerja alat elektroforesis:

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
cara
2. meletakkannya. Elektroforesis tank dapat disii dengan 3 casting gel.
3. Tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel-gel terbenam seluruhnya.
4. Untuk mewarnai DNA manusia, campur 10µl DNA dari sel epitelial dengan 10µl perwarna
5. 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
6. Nyalakan mesin elektroforesis selama 30 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

HASIL ELEKTROFORESIS AGAR ROSE



Gambar 1. Hasil elektroforesis agarose



Tabel 1.1 hasil elektroforesis Marker MMIF

Marker MMIF (Bp)	Jarak Standar-sumur (cm)
100	9,4
200	9,0
300	8,3
400	7,8
500	7,3
600	6,7
700	6,5
800	6,2
900	5,7
1000	5,5

Tabel 1.2 Hasil elektroforesis Sampel

Nama sampel	Jarak sampel-sumur (cm)	Bases Pair

Epitel(sumur 1)	7,6	732,245
Darah(sumur 2)	7,7	749,283

Kesimpulan

1. Dari hasil praktikum dapat dilihat bahwa band yang terbentuk tidak jauh dari band marker MMIF yang digunakan.
2. Dari hasil praktikum rumus yang diperoleh untuk menghitung besarnya basepair sampel dengan marker ,hasilnya sangat jauh berbeda, dimana marker MMIF nilainya 360 basepair .
3. Perbedaan Hasil sampel dengan marker yang jauh berbeda dapat dipengaruhi oleh zat warna yang digunakan, dimana zat warna yang dipakai dalam praktikum ini zat warna yang sudah lama.

Saran

1. Pada saat praktikum mahasiswa memperhatikan penunutan praktikum dengan benar agar kesalahan dapat diminimalisasikan.
2. Sebaiknya praktikum PCR di tentukan waktu yang sesuai ,dan alat yang digunakan sudah tersedia dengan benar.

II SDS –POLYACRILAMIDE GEL ELEKTROFORESIS

Elektroforesis gel Akrilamid

Persiapan gel akrilamid (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 = $1,5 \text{ cm}$

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

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

$$= 1,2 \text{ ml (volume gel penumpuk)}$$

Akrilamid = $6,5 \text{ cm}$

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

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

$$= 5,2 \text{ ml (volume gel pemisah)}$$

Bagian A persiapan gel

1. Bersihkan plat kaca dengan akuades dan etanol (70%)
2. Susun lempeng kaca serta spacer. Celah antara lempeng dengan spacer ditutup dengan a gar 2% secukupnya.

3. Untuk menyiapkan gel poliakrilimide-SDS 10%, ikutilah tabel yang di atas. Siapkan gel pemisah dulu (Pakai sarung tangan dan hati-hati dengan bahan yang berisi akrilamide)
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 plastic (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

Bagian B: Persiapan sampel-sampel protein

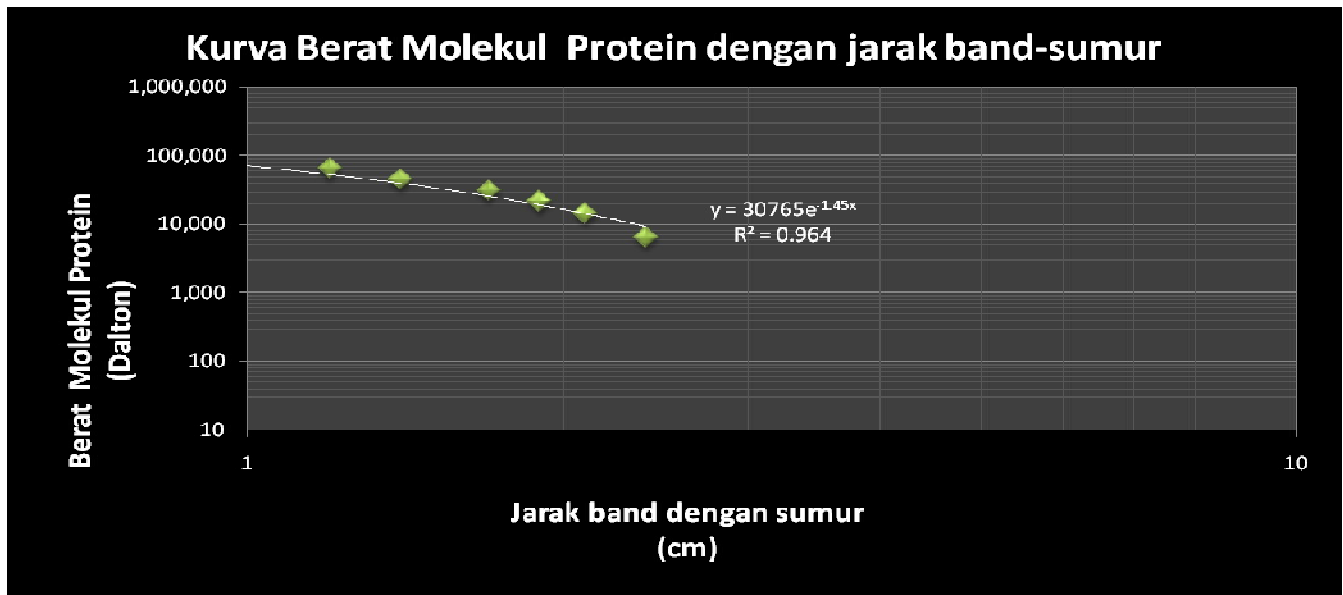
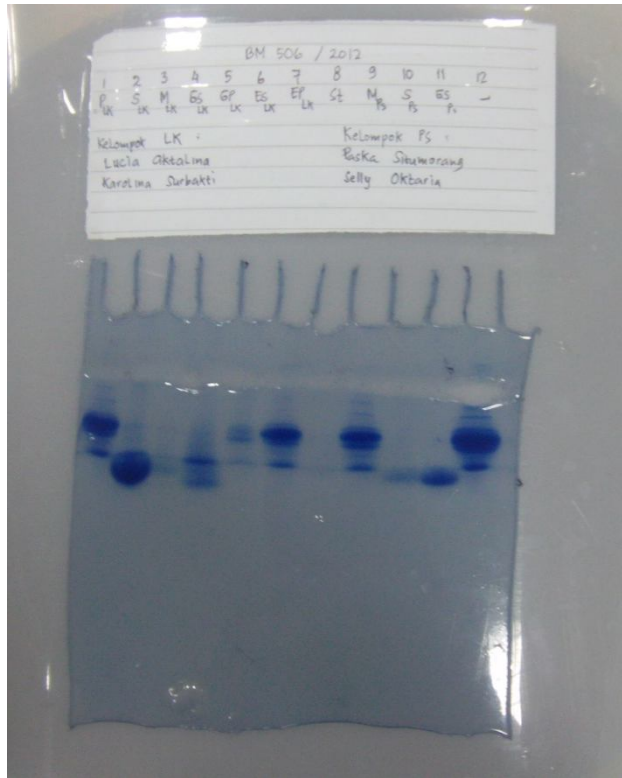
1. Pakailah sarung tangan dan tehnik keselamatan dilaboratorium yang benar
2. Tentukan waterbath pada temperature 100⁰C
3. Siapkan 7 tabung mikrosentrifus dan tandai dengan Plasma, M, S, GS, GP, ES, EP, dan keluarkan 7 sampel protein darah yang disimpan sebelumnya
4. Tambahkan 450µl buffer sampel ke 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

Bagian C: Loading and Running the gel

1. Masukkan 10 μ l 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 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 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 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.



Tabel 1.1 Hasil elektriforesis SDS Akrilamid

Nama Protein	Berat Molekul (Dalton)	Jarak standard-sumur (cm)	Sampel							
			P	S	M	Gs	Gp	Es	7	
Myosin	200,000	0.2								0
Galatosidase	116,250	0.5	0.5							
Phosphosylase	97,400	0.9								
Albumin	66,200	1.2	1,2					1,2	1,2	
Ovalbumin	45,000	1.4						1,4		
carbonicanhydrase	31,000	1.7	1,5						1,5	
trypsin inhibitor	21,500	1.9								
Lysozym	14,400	2.1	2,1				2,1			
Aprotinin	6,500	2.4		2,5	2,5	2,8			2,2	

Tabel 1.1 Hasil elektroforesis Sampel

Nama sampel	Berat Molekul (Dalton)	Nama protein
P	14900,245 5399,885 3495,154 1464,300	Galaktosidase Albumin B-galaktosidase Lysozym
S	819,859	Aprotinin
M	819,859	Aprotinin
Gs	1464,300 530.666	Lysozym Aprotinin
Gp	5399,885 4040,537	Albumin Ovalbumin
Es	5399,885 3495,154 1266,652	Albumin B-galaktosidase Aprotinin

Kesimpulan

1. Dari hasil percobaan didapat band-band yang terlihat terlalu pendek sehingga tidak sesuai dengan band pada standart .
2. Waktu elektroforesis kurang lama sehingga hasil band band tidak jelas terlihat.
3. Pada waktu memasukkan sampel mungkin terlalu dalam sehingga agar rose tertusuk, jadi sampel tidak sepenuhnya masuk kedalam sumur ,hal ini dapat mengakibatkan band band yang diinginkan tidak terbaca.
4. Dari hasil grafik, didapat rumus untuk menghitung berat molekul sampel. Akan tetapi rumus tersebut tidak dapat digunakan untuk menghitung dengan berat molekul sampel.

Saran

1. Pada praktikum ini mahasiswa diharapkan memakai alat pelindung diri seperti sarung tangan dan masker karena reagensia yang digunakan berbahaya bagi kesehatan.
2. Praktikan sebaiknya berhati hati dalam memasukkan sampel ke dalam sumur agar sampel benar benar semuanya masuk kedalam sumur.