

PENGGUNAAN TEKNIK SPEKTROFOTOMETRI UNTUK MENGUKUR KONSENTRASI PROTEIN

Ingatlah dari bahan kuliah spektrofotometri: $A = \epsilon dc$
 dimana c = konsentrasi larutan itu (satuan adalah M),
 ϵ = koefisien absorpsi molar ($M^{-1}cm^{-1}$),
 d = panjang larutan yang dilalui cahaya (cm)
 A = serapan

Ingatlah pula Hukum Beer-Lambert, untuk larutan protein standard (LPS) $A_{LPS} = \epsilon dc_{LPS}$
 menyusun kembali: $A_{LPS} / c_{LPS} = \epsilon d$ (persamaan 1)

Sama juga dengan LP_x $A_{LP_x} = \epsilon dc_{LP_x}$ dan $A_{LP_x} / c_{LP_x} = \epsilon d$ (persamaan 2)

Dari persamaan 1 dan 2 kita bisa menulis

$$A_{LPS} / c_{LPS} = A_{LP_x} / c_{LP_x}$$

menyusun kembali: $c_{LP_x} = A_{LP_x} \cdot c_{LPS} / A_{LPS}$ (persamaan 3)

Akibatnya, Anda bisa menghitung c_{LP_x} ketika Anda sudah mengetahui nilai A_{LP_x} , c_{LPS} and A_{LPS} .

Cara Kerja:

Alat dan bahan yang digunakan

2 beaker (100mL)	tabung reaksi bersih yg besar	rak tabung reaksi
pipet Mohr	pipet otomatis	akuades
timbangan	otomatic multi-stirrer	spidol
spektrofotometer	kuvet plastik	Cu SO ₄ 5H ₂ O
larutan protein M, S, plasma G _p , G _s , E _p & E _s		K- Na-tartrate
larutan protein standard (2 g/ml)		sampel DNA
sampel protein (plasma)		NaOH

Untuk buat 100ml **REAGENSIA BIURET**:

Larutan pertama: 0,24g Cu SO₄ 5H₂O dan 0,47g K-Na-tartat dilarutkan dalam 50 ml akuades.

Larutan kedua: 2,4g NaOH dilarutkan dalam 20 ml akuades

Masukkan larutan kedua ke dalam larutan pertama. Aduk rata dan tambahkan akuades hingga volume menjadi 100 ml.

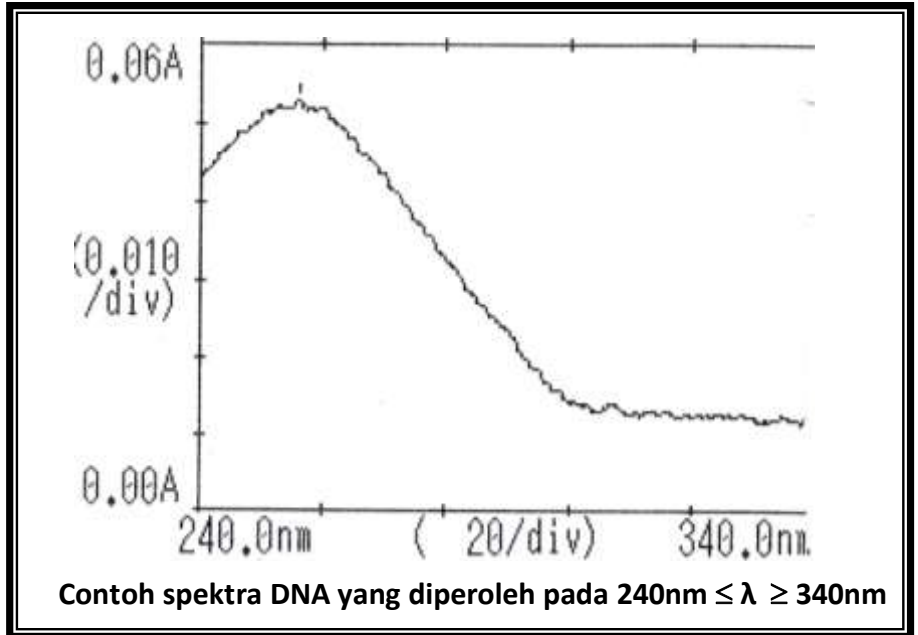
Mengukur Konsentrasi Protein dengan Reagensia Biuret

- 1) Sediakan 9 tabung reaksi.
- 2) Pada tabung pertama masukkan 0,25ml akuades dan 0,75 ml reagensia Biuret. Inilah sebagai **blanko**.
- 3) Pada tabung kedua masukkan 0,25ml larutan standar protein dan 0,75 ml reagensia Biuret. Inilah sebagai **standar**.
- 4) Pada enam tabung yang berikutnya siapkan sampel-sampel protein darah (M, S, G_s, G_p, E_s, E_p) dengan caranya yang sama, yaitu 0,25mL sampel protein dicampur dengan 0,75 mL reagensia Biuret.
- 5) Kocoklah setiap tabung reaksi dan tunggu 10 menit atau lebih. Pindahkan ke kuvet plastik spektrofotometer. Masukkan kuvet² pada alat spektrofotometer supaya jarak yang dilewati cahaya 1 cm dan ukur absorpsinya pada panjang gelombang = 540nm. Ditera alat spektrofotometer dulu dengan blanko, baru mengukur absorpsi larutan protein.
- 6) Catat hasilnya

Mengukur Konsentrasi Protein atau DNA dengan Cahaya Ultraviolet (UV)

Sediakan 3 tabung reaksi.

- 1) Pada tabung 1 masukkan 2ml akuades Inilah sampel **blanko**.
- 2) Pada tabung 2 masukkan 50 µl sampel DNA dan 1,95 ml akudes. Inilah sampel DNA.
- 3) Pada tabung 3 masukkan 50 µl sampel protein (plasma) dan 1,95 ml akudes. Inilah sampel protein.
- 4) Isilah satu kuvet kuartz dengan sampel blanko. Ditera alat spektrofotometer dengan blanko sebelum Anda mengukur serapan sampel DNA.
- 5) Masukkan sampel DNA ke kuvet kuartz. Bacalah serapan (A) pada panjang gelombang (λ) antara 240 dan 340nm
- 6) Print spectrum yang diperoleh dan catat serapan sampel DNA pada λ= 260nm, λ= 280nm dan λ= 320nm.
- 7) Kembalikan sampel DNA ke tabung reaksi. Bilas kuvet kwartz dengan akuades.
- 8) Isilah kuvet kuartz dengan sampel protein.
- 9) Bacalah serapan (A) pada panjang gelombang (λ) antara 240 dan 340nm
- 10) Print spectrum yang diperoleh dan catat serapan sampel protein pada catat serapan sampel protein pada λ= 260nm; λ= 280nm; λ= 320nm.
- 11) Kembalikan sampel protein ke tabung reaksi. Bilas kuvet kwartz dengan akuades.



Perhitungan Konsentrasi Protein dan DNA

Protein: $c_{LPS} = A_{LPS} / \epsilon$ (oleh karena d= 1cm)

Nilai ε bagi protein bervariasi (tergantung pada jumlah asam amino triptofan, tirosin serta fenalamin pada protein tersebut) tapi bisa diperkirakan $\epsilon = 1$ kalau protein murni. (ϵ BSA = 0,7; ϵ antibodi $1,2 \leq \epsilon \leq 1.35$; diambil dari "Antibodies: A Laboratory Manual", E. Harlow, & D. Lane, Academic Press, New York., 1988)

DNA:

$$\text{DNA concentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{[A(260\text{nm}) - A(320\text{nm})] \times 40 \text{ (dilution factor)} \times 50 \mu\text{g/ml}}{1000 (\mu\text{l/ml})}$$

Perhitungan Kemurnian DNA:

$$\text{kemurnian DNA} = \frac{[A(260\text{nm}) - A(320\text{nm})]}{[A(280\text{nm}) - A(320\text{nm})]}$$

Kalau $A(260\text{nm})/A(280\text{nm}) = 1,8 - 2,0$, the absorption is probably due to nucleic acids.

Kalau $A(260\text{nm})/A(280\text{nm}) < 1,8$, there may be proteins and/or other UV absorbers in the sample, in which case it is advisable to re-precipitate the DNA.

Kalau $A(260\text{nm})/A(280\text{nm}) > 2,0$ indicates the samples may be contaminated should be reprecipitated with ethanol