

LAPORAN PRAKTIKUM
Isolasi DNA, Teknik PCR dan Elektroforesis Agarose
Isolasi Protein Darah dan Elektroforesis SDS-PAGE

Hari/Tanggal Praktikum : Kamis/ 07, 14, 21, dan 28 November 2013
Nama Mahasiswa : Maya Anjelir Antika dan Muhammad Yunus
Kelompok : Siang

I. Tujuan Paktikum :

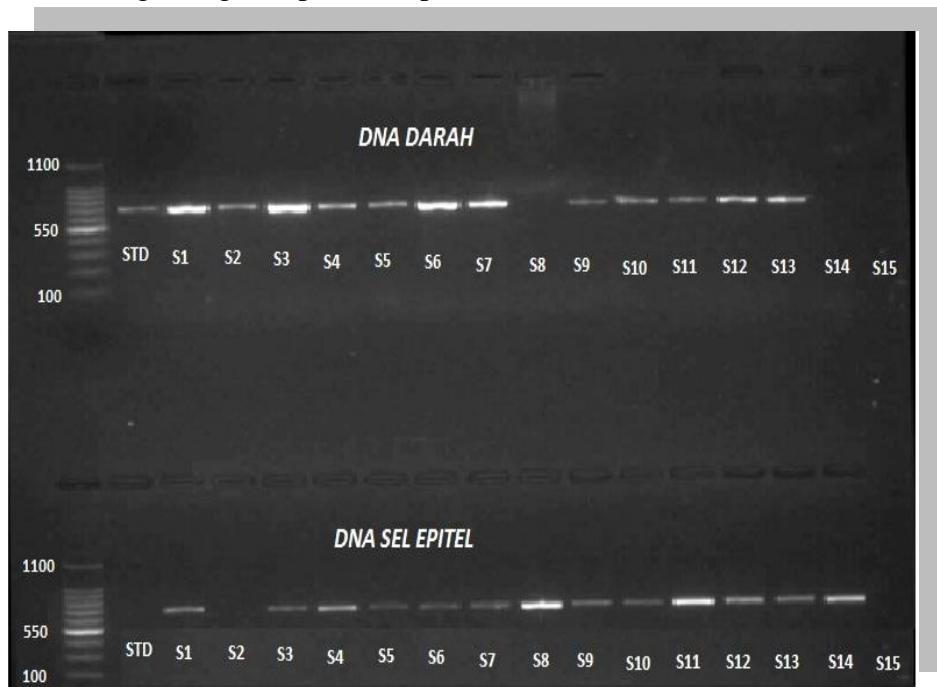
1. Mampu melakukan isolasi DNA dari darah dan sel epitel
2. Mampu menggunakan alat elektroforesis dengan benar untuk membaca nilai base pair fragment DNA
3. Mampu melakukan teknik sentrifugasi untuk pemisahan bagian-bagian sel
4. Mampu menggunakan alat elektroforesis dengan benar untuk membaca nilai berat molekul protein
5. Mampu melakukan isolasi protein dari darah

II. Hasil dan Pembahasan

2.1 Hasil

a. Hasil dari isolasi DNA darah dan sel epitel

Dari hasil elektroforesis agarose marker dan sampel diperoleh data yang akan digunakan untuk menghitung basepairs sampel.

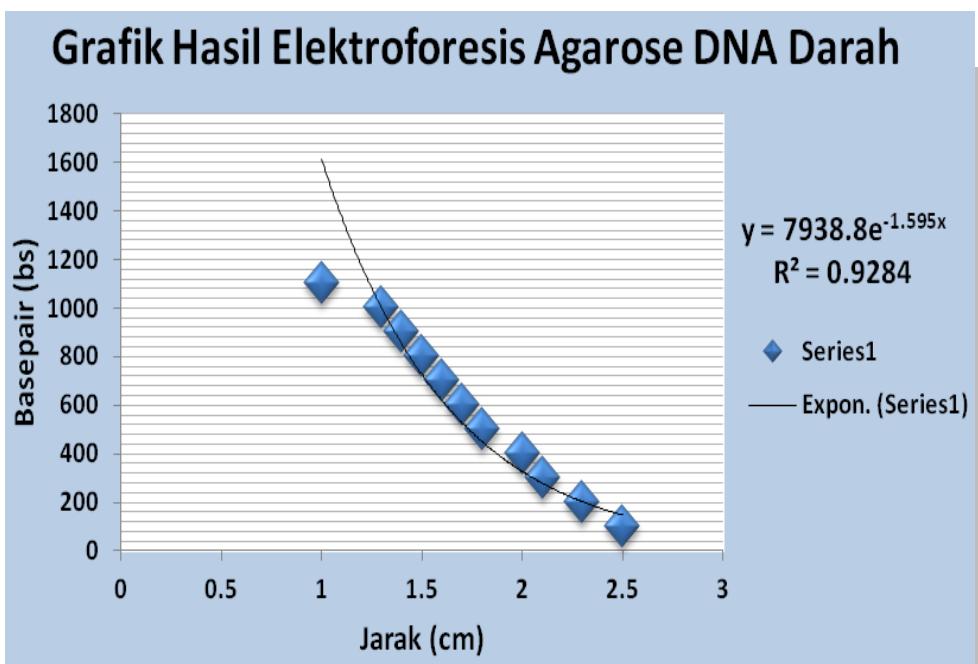


Gambar 1. Foto Hasil Elektroforesis Agarose sel darah dan sel epitel

Keterangan gambar 1 :	STD : Standar	S1 : Kontrol
	S2 : Seri	S3 : Amirul
	S4 : Debby	S5 : Adit
	S6 : Ichwan	S7 : Ramadhan
	S8 : Melviana	S9 : Barlian
	S10 : Maya	S11 : Yunus
	S12 : Yuni	S13 : Ade
	S14 : Ferry	S15 : Nita

Tabel 1. Data Jarak (cm) dan Basepairs (bp) Hasil Elektroforesis Agarose DNA Darah

Band	Jarak (cm)	Basepairs (bp)
1	1,0	1100
2	1,3	1000
3	1,4	900
4	1,5	800
5	1,6	700
6	1,7	600
7	1,8	500
8	2,0	400
9	2,1	300
10	2,3	200
11	2,5	100

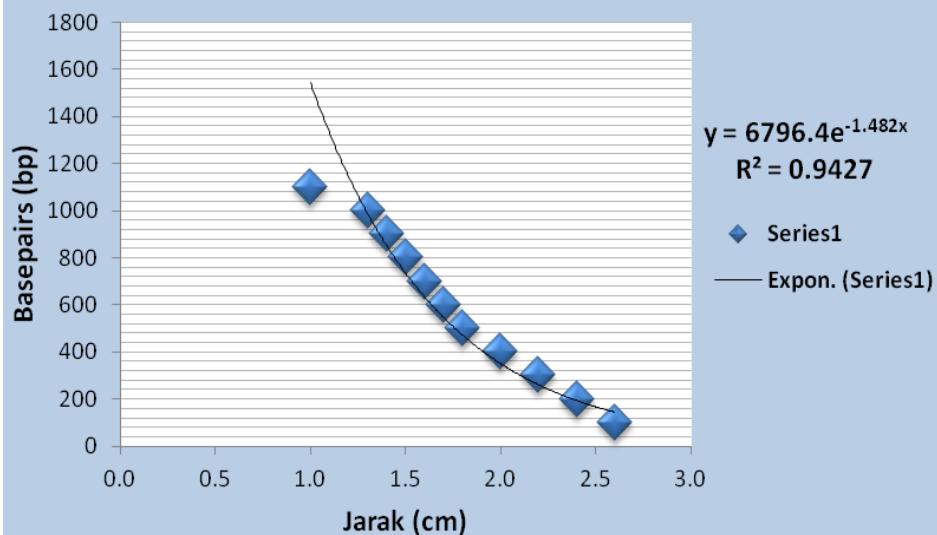


Gambar 2. Grafik Hasil Elektroforesis Agarose DNA Darah

Tabel 2. Data Jarak (cm) dan Basepairs (bp) Hasil Elektroforesis Agarose Sel Epitel

Band	Jarak (cm)	Basepairs (bp)
1	1,0	1100
2	1,3	1000
3	1,4	900
4	1,5	800
5	1,6	700
6	1,7	600
7	1,8	500
8	2,0	400
9	2,2	300
10	2,4	200
11	2,6	100

Grafik Hasil Elektroforesis Agarose Sel Epitel



Gambar 3. Grafik Hasil Elektroforesis Agarose Sel Epitel

b. Hasil dari isolasi Protein Darah

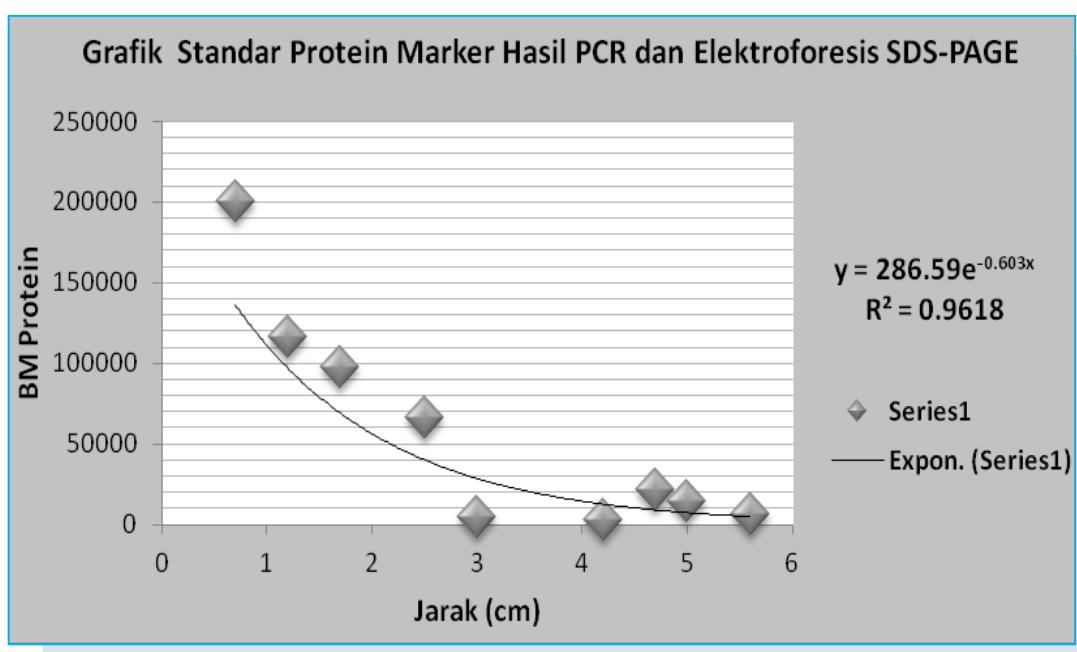
Dari isolasi protein diperoleh sampel, yaitu sampel protein membran (M), sampel protein pengendapan garam tinggi (Gp), Sampel protein supernatan garam tinggi (Gs), sampel protein supernatan etanol (Es), sampel protein pengendapan etanol tinggi (Ep) dan sampel protein sitoplasmik (S).



Gambar 4. Foto Hasil Elektroforesis SDS-PAGE darah manusia

Tabel 3. Jarak Band dan Berat Molekul Protein Marker Elektroforesis SDS-PAGE darah manusia

Jenis Protein	Jarak (cm) Band	BM Protein (kD)
Myosin	0,7	200.000
β -Galaktosidase	1,2	116.250
Glycogen phosphorilase b	1,7	97.400
Bovine serum albumin	2,5	66.200
Ovaalbumin	3,0	45.000
Carbonic anhydrase	4,2	31.000
Soybean trypsin inhibitor	4,7	21.500
Lysozyme	5,0	14.400
Aprotinin	5,6	6.500



Gambar 5. Grafik Standar Protein Marker Hasil Elektroforesis SDS-PAGE

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	0,7			2,6	3,2	4,2	4,7	5,0
	200.000	-	-	66.200	45.000	31.000	21.500	14.400
	Myosin			Albumin	Ovalbumin	Carbonic anhydrase	Tripsin inhibitor	Lysozim
Protein Sitoplasmik(S)	0,3			2,2		4,1	4,8	
	200.000	-	-	66.200	-	45.000	21.500	
	Myosin			Albumin		Ovalbumin	Tripsin inhibitor	
Protein Membrane (M)				2,6	3,1	4,5	4,7	5,1
	-	-	-	66.200	45.000	31.000	21.500	14.400
				Albumin	Ovalbumin	Carbonic anhydrase	Tripsin inhibitor	Lysozim
Protein supernatant teknik					3,2	4,2	4,7	
Pengendapan lar garam (Gs)	-	-	-	-	45.000	31.000	21.500	-
					Ovalbumin	Carbonic anhydrase	Tripsin inhibitor	
Protein Endapan teknik pengendapan lar garam (Gp)				2,3		4,4		
	-	-	-	66.200	-	31.000	-	-
				Albumin		Carbonic anhydrase		

Protein	2,5	3,1	4,3	4,6
Supernatan teknik	66.200	45.000	31.000	21.000
pengendapan lar	Albumin	Ovalbumin	Carbonic anhydrase	Tripsin inhibitor
Etanol (Es)	-	-	-	-
Protein endapan	2,7		4,3	
teknik	66.200		31.000	
pengendapan lar	Albumin	-	Carbonic anhydrase	-
Etanol (Ep)	-	-	-	-

2.2 Pembahasan

DNA dapat diisolasi dari jaringan apapun yang mempunyai inti sel. Langkah-langkah yang harus diikuti untuk memulai mengisolasi jaringan apapun adalah :

- Pengumpulan / panen sel – sel (cell harvest)
- Pemecahan sel – sel
- Pencernaan protein agar asam nukleat dilepaskan (protein digestion)
- Pengendapan DNA (DNA Precipitation)

Bahan yang digunakan, yaitu :

- Tris berperan untuk mendenaturasi protein.
- EDTA berfungsi sebagai penghancur sel dengan cara mengikat ion magnesium yang diperlukan oleh sel untuk menjaga keutuhan selubung sel secara keseluruhan.
- SDS berperan dalam melisikan membran sel juga dapat berperan dalam mengurangi aktivitas enzim nuklease yang merupakan enzim pendegradasi DNA. NaCl berfungsi sebagai bahan penetrant pada gula fosfat DNA.
- Proteinase K untuk melisikan membran pada sel darah dan mendegradasi protein globular maupun rantai polipeptida dalam komponen sel
- Larutan sel lisis untuk pelisisan sel
- Nuclei lisis untuk pelisisan nucleus/inti sel sehingga DNA dapat diperoleh.
- Enzim RNase berfungsi melisikan RNA dari ekstrak DNA. Isopropanol dingin bertujuan agar DNA tersebut mengendap/mengumpul sekaligus memisahkannya dari garam-garam mineral sisa.
- Etanol 70% berperan dalam pemurnian DNA, garam-garam yang terlibat dalam proses ekstraksi bersifat kurang larut dalam isopropanol sehingga dapat terpresipitasi bersama DNA, oleh sebab itu dibutuhkan presipitasi kembali dengan etanol setelah presipitasi dengan isopropanol untuk menghilangkan residu garam.
- Ethidium bromide/casting tray berperan dalam memberi warna/flourosense. Bahan ini bersifat karsinogenik.

Pada sumur kontrol seharusnya tidak boleh terlihat adanya DNA, ini terjadi kemungkinan penggunaan pipetnya yang telah terkontaminasi dengan DNA. Pada S8 sel darah, band terlihat hancur sehingga hanya sebagian band yang terlihat (tidak begitu jelas). Hal ini mungkin disebabkan DNA yang diperoleh hanya sepotong-sepotong saat melakukan isolasi dan mungkin saja terjadi kontaminasi. Seperti kita ketahui kulit tangan banyak mengandung nuklease sehingga apabila terkontaminasi, enzim ini dapat memotong untai

DNA yang diisolasi. Sehingga ketika kita elektroforesis band yang tampak seperti pada gambar DNA darah di atas.

Pada S14 dan S15 pada sel darah tidak menunjukkan adanya band, serta pada S3 sel epithel tidak terlihat adanya DNA, hal ini disebabkan karena sedikitnya jumlah DNA yang terisolasi, dan kesalahan dalam pengambilan sampel. Sedangkan pada band yang lainnya DNA terlihat jelas. Band yang jelas menunjukkan banyak DNA yang terisolasi dan cara melakukan isolasinya telah baik dan benar.

Berdasarkan grafik di atas diperoleh persamaan $y = 7938.e^{-1.59x}$ pada DNA darah dan $y = 6796.e^{-1.48x}$ DNA sel epithel.

Pada Foto hasil elektroforesis agarose terlihat bahwa jarak antara band-band DNA sangat dekat. Hal tersebut dapat disebabkan karena waktu yang digunakan untuk elektroforesis singkat. Untuk memperjelas hasil band-band DNA seharusnya elektroforesis dilakukan lebih lama.

SDS-PAGE adalah metode elektroforesis yang menggunakan kombinasi/perpaduan polyacrilamida dan SDS. Dalam praktikum ini migrasi protein dengan elektroforesis dilakukan pada tegangan 70 volt dan lama pemisahan kurang lebih 4 jam agar didapatkan molekul protein yang berbeda dan dapat terpisah dengan baik. Penanda migrasi ditentukan dengan pewarna coomassie brilliant blue.

Pada Foto hasil Elektroforesis polyacrilamide terlihat bahwa jarak antara band-band DNA sangat dekat. Hal tersebut dapat disebabkan karena waktu yang digunakan untuk elektroforesis sangat singkat. Terlihat dari band-band DNA hanya sampai setengah dari medium agarose. Untuk memperjelas hasil band-band DNA seharusnya dilakukan elektroforesis lebih lama sampai band-band DNA hampir mencapai ujung dari medium polyacrilamide.

Berdasarkan elektroforesis SDS-PAGE diperoleh persamaan $y = 286.59e^{-0.603x}$. Dari data dapat dilihat protein standar carbonic anhydrase dijumpai pada semua sampel protein yang dielektroforesis. Sampel protein membran dan protein plasma paling banyak ditemukan jenis protein standar.

III. Kesimpulan dan Saran

3.1 Kesimpulan

- ✓ Ketelitian dalam membuat sampel sangat dibutuhkan.
- ✓ Band DNA darah dan sel epithelial manusia hasil elektroforesis agarose berada pada kisaran 700 bp dengan persamaan $y = 7938e^{-1.59x}$ untuk DNA darah dan $y = 6796e^{-1.48x}$ untuk DNA sel epithel.
- ✓ Berat molekul protein sampel elektroforesis SDS-PAGE dihitung -berdasarkan persamaan $y = 286.59e^{0.603x}$
- ✓ Protein sitoplasmik dan protein membran memiliki lebih banyak jenis protein dibandingkan sampel protein yang lain.
- ✓ Hasil elektroforesis SDS-PAGE semua sampel protein mengandung jenis protein standar carbonic anhydrase .
- ✓ Jarak band elektroforesis agarose dan SDS-PAGE dipengaruhi oleh konsentrasi medium (agarose dan polyacrilamida), voltage dan waktu elektroforesis.

3.2 Saran

- Diharapkan praktikan memiliki ketelitian dan kemampuan dalam penggunaan alat agar hasil yang diperoleh sesuai.
- Disarankan penambahan alat dan bahan sehingga masing-masing praktikan dapat langsung melakukan percobaan secara mandiri.
- Disarankan kepada praktikan saat melakukan praktikum menggunakan standar keselamatan laboratorium untuk menghindari zat yang bersifat karsinogenik.