

LAPORAN PRAKTIKUM
ISOLASI DNA, ISOLASI PROTEIN DARAH, PCR, DAN ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS PAGE

NAMA PRAKTIKAN : Amirul Hadi

Barlian

GRUP PRAKTIKAN : Grup Pagi

HARI/TGL. PRAKTIKUM : Kamis, 7 November 2013

Kamis, 14 November 2013

Kamis, 21 November 2013

Kamis, 28 November 2013

Jumat, 29 November 2013

TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mahasiswa mampu Melakukan isolasi DNA dari darah dan dari sel epitelum.
2. Mahasiswa mampu Memahami prinsip dasar Isolasi DNA,PCR, Elektroforesis Agarose dan Elektroforesis SDS-Page .
3. Mahasiswa mampu Menggunakan alat elektroforesis dengan benar untuk membaca nilai base-pair fragment DNA.
4. Mahasiswa mampu Mengolah data yang diperoleh dari kegiatan praktikum untuk memperoleh nilai base-pair fragment DNA.
5. Mahasiswa Mengerti teknik sentrifugasi untuk pemisahan sel darah dengan plasma darah.
6. Mahasiswa Menggunakan alat elektroforesis dengan benar untuk membaca nilai berat molekul protein dari darah.
7. Membuat dan menginterpretasi hasil praktikum dasar Isolasi DNA,PCR, Elektroforesis Agarose dan Elektroforesis SDS-Page baik berupa grafik maupun kesimpulan secara menyeluruh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Hasil I : Praktikum Isolasi DNA

Tampak gambaran benang-benang halus seperti gumpalan awan putih dan tipis merupakan gambaran dari Untaian DNA yang terdapat didalam tabung.

Hasil II : Praktikum Isolasi protein darah

<i>Bagian A</i>	<i>Supernatan</i>	<i>Pengendapan</i>
Jumlah/warna	Jumlah : 1,5 mL Warna : kekuningan	Jumlah : 3,5 mL Warna : kemerahan
Pengamatan yang lain	Diambil 500 µL untuk sampel plasma, 500 µL untuk bagian C dan 500 µL untuk bagian D	Dilanjutkan ke bagian B
<i>Bagian B</i>	<i>Supernatan</i>	<i>Pengendapan</i>
Jumlah/warna	Jumlah : 7 mL Warna : seperti susu putih kekuningan	Jumlah : 1 mL Warna : merah
Pengamatan yang lain	Diambil 1 mL untuk sampel protein sitoplasmik (S)	Setelah ditambah 7 mL buffer hemolisis, diambil 2 mL cairan terbawah berserta endapan untuk sampel protein membran (M), setelah disentrifus buang supernatannya dan ditambah 500 µL buffer hemolisis
<i>Bagian C</i>	<i>Supernatan</i>	<i>Pengendapan</i>
Jumlah/warna	Jumlah : 0,65 mL Warna : kuning	Jumlah : 0,1 mL Warna : kuning gelap
Pengamatan yang lain	Diambil 500 µL untuk sampel protein supernatan garam tinggi (Gs)	Diambil untuk sampel protein pengendapan garam tinggi (Gp) dan ditambah dengan 500 µL buffer hemolisis
<i>Bagian D</i>	<i>Supernatan</i>	<i>Pengendapan</i>
Jumlah/warna	Jumlah : 1,2 mL Warna : kuning	Jumlah : 0,25 mL Warna : putih
Pengamatan Yang Lain	Diambil seluruh supernatan untuk sampel protein supernatan etanol (Es)	Diambil untuk sampel protein pengendapan etanol (Ep) dan ditambah dengan 500 µL buffer hemolisis

Note :

Sampel darah diambil dari Amirul hadi, jenis kelamin laki-laki,jumlah darah yang diambil 5ml dan waktu pukul 08.00 WIB.

Hasil III : Praktikum PCR dan Elektroforosis Agarose

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

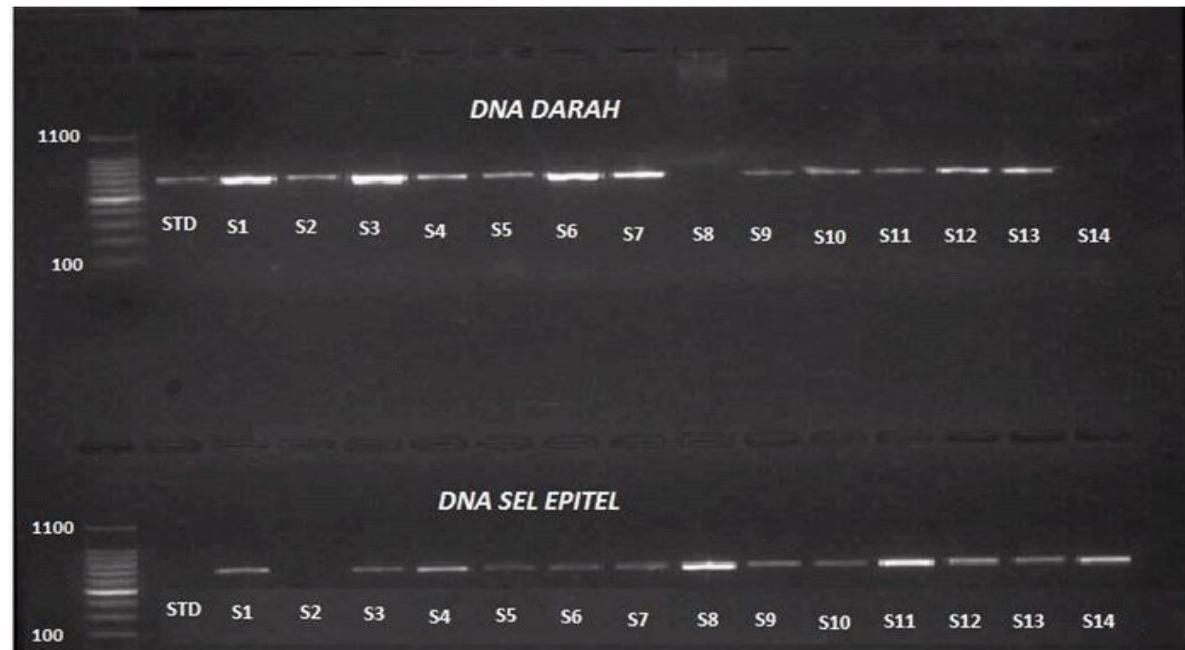


Foto Hasil Elektroforesis Agarose sel darah dan sel epitel

Keterangan

SAMPEL DNA DARAH	SAMPEL DNA EPITEL
STD : Standar	STD : Standar
S1 : Kontrol	S1 : Kontrol
S2 : Seri	S2 : Seri
S3 : Amirul	S3 : Amirul
S4 : Deby	S4 : Deby
S5 : Adit	S5 : Adit
S6 : Ichwan	S6 : Ichwan
S7 : Ramadhan	S7 : Ramadhan
S8 : Melviana	S8 : Melviana
S9 : Barlian	S9 : Barlian
S10 : Maya	S10 : Maya
S11 : Yunus	S11 : Yunus
S12 : Yuni	S12 : Yuni
S13 : Ade	S13 : Ade
S14 : Ferry	S14 : Ferry
S15 : Nita	S15 : Nita

Hasil IV : Praktikum Elektroforesis SDS-Page

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), Kemudian dilanjutkan teknik Elektroforesis SDS-Page dengan hasil seperti dibawah ini :

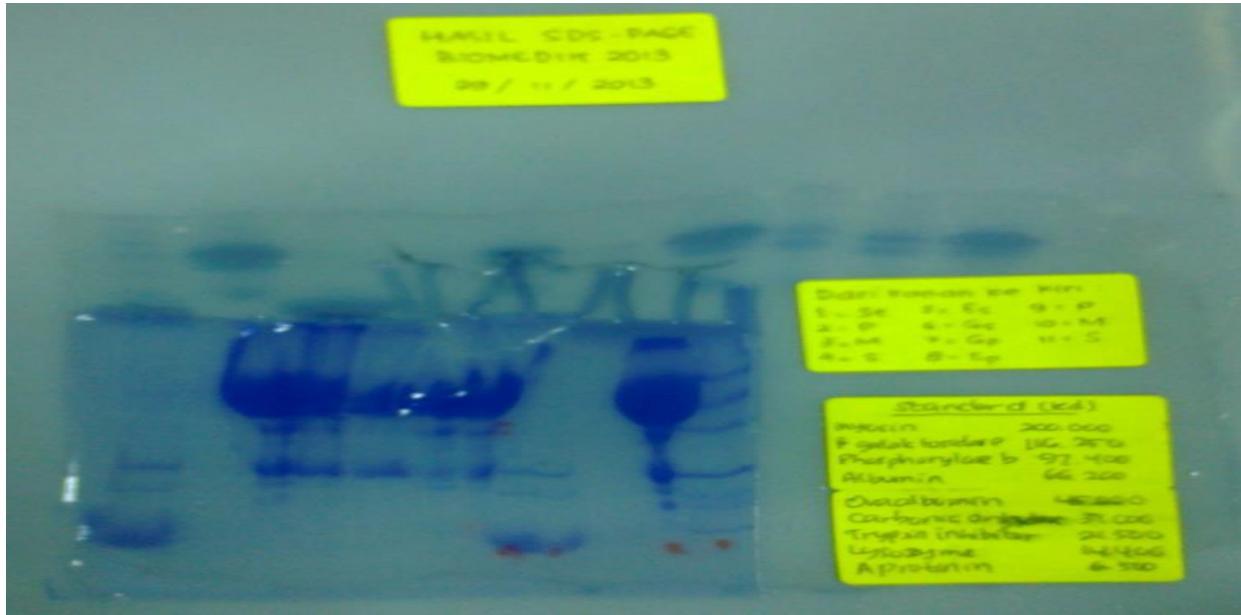


Foto Hasil Elektroforesis SDS-PAGE darah

Keterangan :

Dari kanan ke kiri berturut-turut S1 : Marker S2 : Protein Plasma S3 : Protein Membran S4 : Protein Sitoplasmik S5 : Protein Supernatan Etanol S6 : Protein Supernatan Garam Tinggi S7 : Protein Pengendapan Garam Tinggi S8 : Protein Pengendapan Etanol S9 : Protein Plasma S10 : Protein Membran S11 : Protein Sitoplasmik.

PEMBAHSASAN

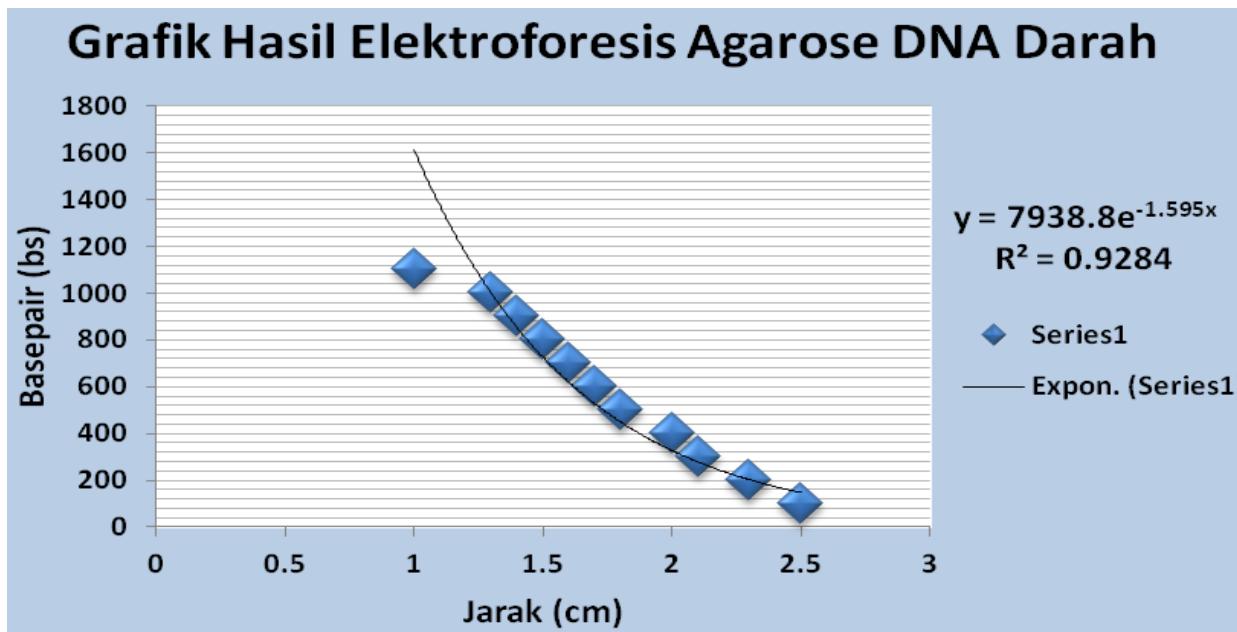
Praktikum Isolasi DNA, PCR, dan Elektroforesis Agarose DNA

Setelah semua tahapan selesai dilakukan maka untuk langkah selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap DNA standar pada gambaran elektroforesis DNA sehingga didapatkan hasil seperti tabel di bawah ini :

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

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



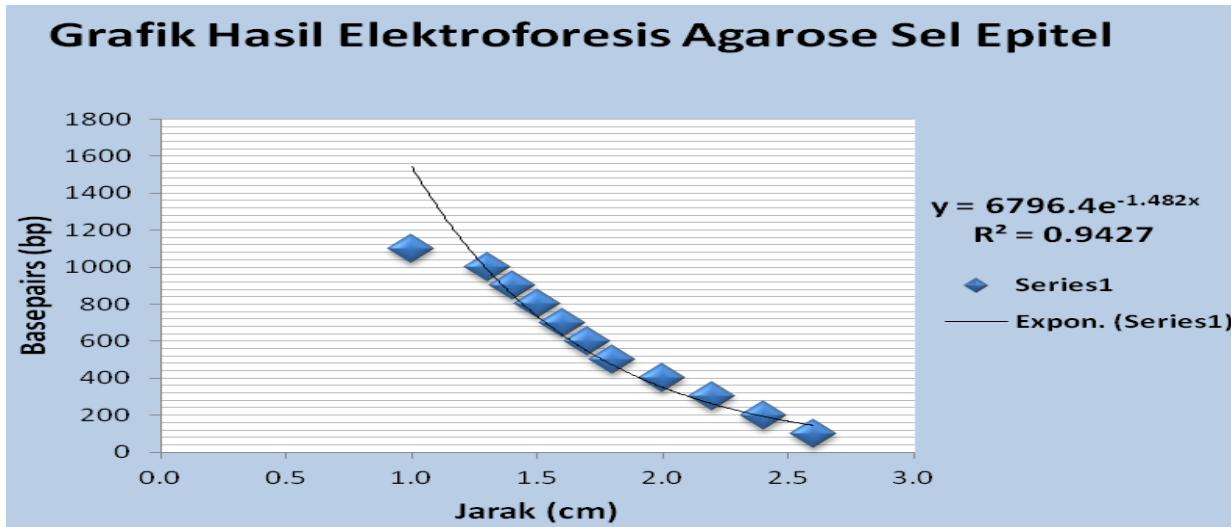
Grafik Hasil Elektroforesis Agarose DNA Darah

Berdasar grafik di atas diperoleh persamaan / expnen $y = 7938.e-1.59x$ yang dapat digunakan untuk menghitung base-pair sampel DNA darah. (Base-pair tidak memiliki bilangan desimal sehingga harus digenapkan).

DNA Epitel sel Mukosa

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

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



Grafik Hasil Elektroforesis Agarose Sel Epitel

Berdasar grafik di atas diperoleh persamaan / expnen $y = 6796.e-1.482x$ yang dapat digunakan untuk menghitung base-pair sampel DNA Epitel sel mukosa. (Base-pair tidak memiliki bilangan desimal sehingga harus digenapkan).

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.

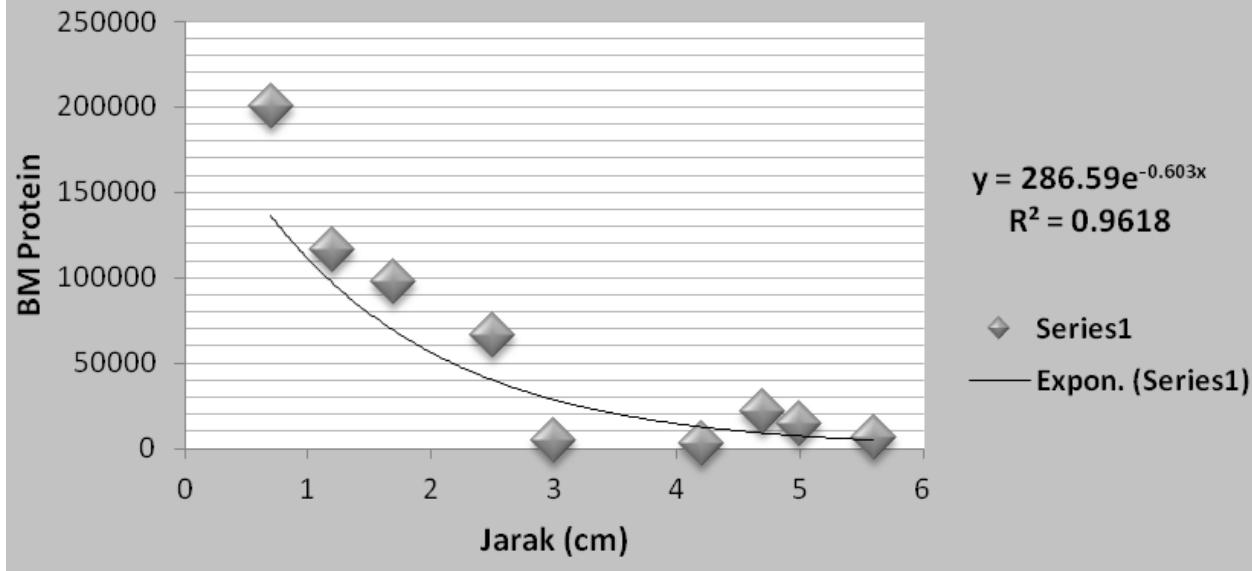
Berdasar grafik di atas diperoleh persamaan $y = 7938.e-1.59x$ pada DNA darah dan $y = 6796.e-1.48x$ DNA sel epithel.

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.

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

Grafik Standar Protein Marker Hasil PCR dan Elektroforesis SDS-PAGE



Grafik Standar Protein Marker Hasil Elektroforesis SDS-PAGE

Sampel	Band 1	Band 2	Band 3	Band 4	Band 5	Band 6	Band 7	Band 8
Plasma	0,7 200.000 Myosin	-	-	2,6 66.200 Albumin	3,2 45.000 Ovalbumin	4,2 31.000 Carbonic anhydrase	4,7 21.500 Tripsin inhibitor	5,0 14.400 Lysozim
Protein Sitoplasmik(S)	0,3 200.000 Myosin	-	-	2,2 66.200 Albumin	-	4,1 45.000 Ovalbumin	4,8 21.500 Tripsin inhibitor	-
Protein Membrane (M)	-	-	-	2,6 66.200 Albumin	3,1 45.000 Ovalbumin	4,5 31.000 Carbonic anhydrase	4,7 21.500 Tripsin inhibitor	5,1 14.400 Lysozim
Protein supernatant teknik Pengendapan lar garam (Gs)	-	-	-	-	3,2 45.000 Ovalbumin	4,2 31.000 Carbonic anhydrase	4,7 21.500 Tripsin inhibitor	-
Protein Endapan teknik pengendapan lar garam (Gp)	-	-	-	2,3 66.200 Albumin	-	4,4 31.000 Carbonic anhydrase	-	-
Protein Supernatan teknik pengendapan lar Etanol (Es)	-	-	-	2,5 66.200 Albumin	3,1 45.000 Ovalbumin	4,3 31.000 Carbonic anhidrase	4,6 21.000 Tripsin inhibitor	-

Protein endapan teknik pengendapan lar Etanol (Ep)	-	-	-	2,7 66.200 Albumin	-	4,3 31.000 Carbonic anhydrase	-	-
---	---	---	---	-----------------------------------	---	--	---	---

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.

KESIMPULAN

1. Dalam melakukan percobaan ini membutuhkan ketelitian yang tinggi karena kesalahan sedikit saja dapat mengakibatkan kesalahan interpretasi hasil percobaan.
2. Teknologi PCR digunakan untuk memperbanyak sampel DNA.
3. Analisa elektroforesis gel agarose merupakan metode standar untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi dan purifikasi dari molekul DNA/RNA, baik untuk pemisahan untai tunggal atau untai ganda molekul DNA. Molekul-molekul tersebut akan bermigrasi menuju kutub positif atau kutub negatif berdasarkan muatan yang terkandung di dalamnya.
4. Secara kasat mata dapat dilihat bahwa DNA yang diperoleh dari darah lebih banyak daripada DNA dari hasil isolasi sel epitel.
5. 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.
6. Berat molekul protein sampel elektroforesis SDS-PAGE dihitung -berdasarkan persamaan $y = 286.59e0.603x$.
7. Protein sitoplasmik dan protein membran memiliki lebih banyak jenis protein dibandingkan sampel protein yang lain.
8. Hasil elektroforesis SDS-PAGE semua sampel protein mengandung jenis protein standar carbonic anhydrase .

9. Memasukkan marker ke dalam sumur kurang hati-hati karena kurangnya waktu saat dilakukan proses elektroforesis akibatnya Marker pada elektroforesis agarose bertumpuk.
10. Dari marker dapat dibuat grafik persamaan eksponen untuk kemudian dapat dihitung base-pair fragmen DNA sampel.
11. Dari marker dapat dibuat grafik persamaan eksponen untuk kemudian dapat dihitung berat molekul masing-masing protein yang terdapat pada sampel.

SARAN

1. Pada saat praktikum elektroforesis SDS-PAGE Waktu yang digunakan untuk sebaiknya ditambah agar semua protein benar-benar terpisah.
2. Sebaiknya peralatan ditambah sehingga memudahkan untuk melakukan kegiatan praktikum dan praktikan juga dapat lebih memahami proses praktikum.
3. Gunakan standar keselamatan laboratorium untuk menghindari zat yang bersifat karsinogenik.
4. Laporan sebaiknya dibuat setiap praktikum