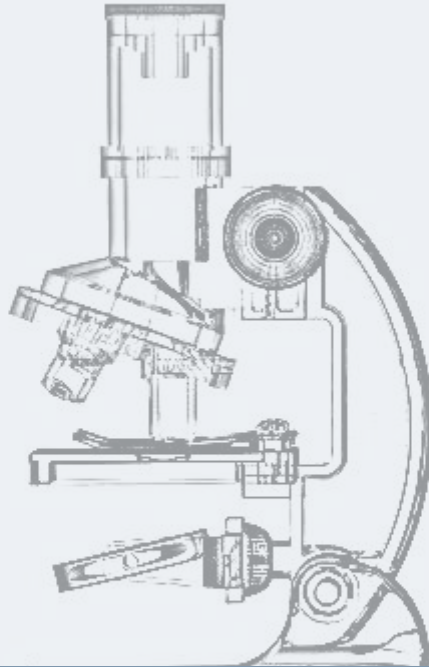


# Seri Genomik dan Protein

*Lantip Rujito*



BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM

LAB RISET FK UNSOED

2016

# BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM LAB RISET FK UNSOED

Oleh  
Lantip Rujito

Cetakan pertama, 2016

---

Hak Cipta dilindungi Undang undang

Dilarang memperbanyak, mencetal dan menerbitkan sebagian atau seluruh isi buku dengan cara dan bentuk apapun tanpa seijin pengarang

## Kata Pengantar

Alhamdulillah penulis haturkan kepada Allah SWT yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan salah satu tugas pengajaran, dalam hal ini adalah penerbitan Buku Petunjuk Praktikum Lab Riset FK Unsoed. Penulisan ini dilandasi belum adanya panduan praktikum yang dapat menjadi pegangan bagi mahasiswa maupun peneliti pemula yang menggunakan peralatan Lab Riset di FK Unsoed. Buku ini bukan dimaksudkan sebagai rujukan para peneliti yang telah mahir dalam menggunakan peralatan laboratorium, khususnya laboratorium genomik, analisa protein, mikroteknik, maupun kimia klinik.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari kata sempurna. Saran dan kritik dapat dialamatkan kepada penulis untuk perbaikan buku di masa mendatang. Akhir kata, semoga penulisan Buku Petunjuk Praktikum ini dapat bermanfaat bagi mahasiswa maupun rekan-rekan peneliti lainnya.

Purwokerto, Januari 2016

Dr. dr. Lantip Rujito,MSi.Med

## Daftar Isi

Kata Pengantar .....	2
Seri Genomik .....	4
Isolasi DNA Total .....	4
Isolasi DNA Mitokondria.....	7
Isolasi RNA .....	10
Desain primer untuk PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	13
Teknik PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	14
DNA Elektroforesis .....	16
Visualisasi Hasil Elektroforesis .....	18
PCR RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ) .....	19
ARMS ( <i>Amplification Refractory Mutation Scanning</i> ) .....	20
<i>Multiplexing</i> PCR .....	22
<i>Nested</i> PCR.....	23
Seri Proteomik .....	25
Isolasi Protein .....	25
SDS PAGE ( <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ) .....	27
<i>Western Blot</i> .....	33
Immunohistokimia.....	36
ELISA ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ) .....	38
Kontak Informasi .....	42
Kantor .....	42

## Isolasi DNA Total

### Pendahuluan

Dalam pekerjaan laboratorium yang menggunakan materi genetik, isolasi DNA adalah langkah awal yang harus dikerjakan untuk maju ke dalam tahap selanjutnya. DNA adalah materi genetik yang terdapat di bagian inti sel dan mitokondria pada semua sel eukariotik termasuk sel manusia. Secara prinsip isolasi DNA dikerjakan dengan teknik pemecahan dinding sel dan dinding inti sel untuk mendapatkan akses DNA, kemudian dilakukan pemisahan dari materi-materi sel lainnya seperti protein, karbohidrat, maupun lipid untuk kemudian dilakukan pemurnian.

### Alat

Alat yang dibutuhkan minimal adalah sebagai berikut :

1. Tabung Falcon
2. Microtube 2ml
3. Micropipet 10. 100. 1000 ul
4. Centrifuge
5. Waterbath
6. Incubator
7. Pada beberapa teknik dengan kit memerlukan microtube dengan filter

### Bahan

Bahan yang dibutuhkan tergantung dari provider atau manufaktur. Namun secara umum bahan yang disediakan akan berisi reagen sebagai berikut :

1. Detergen basa : umumnya dari golongan Tris-EDTA. Tris berguna untuk mendenaturasi protein, sedangkan EDTA berguna untuk mengurangi stabilitas membran sel dengan mengikat ion Magnesium. Beberapa provider menambahkan SDS untuk

2. membantu lisis sel dan mengurangi aktivitas enzim nuklease. Pada metode Salting Out lisis buffer terdiri atas : 1550mM NH<sub>4</sub>Cl 82 gram, 100 mM KHCO<sub>3</sub> 10 gram, 10 mM EDTA 3,7 gram, Aquadest steril 1 liter adjust pH 7,4
3. NaCl : sebagai bahan penetral gula fosfat DNA
4. Proteinase K : sebagai bahan degradasi protein membran maupun polipeptida dalam sitoplasma
5. RNAse : untuk memperoleh kemurnian DNA yang tinggi beberapa vendor menambahkan enzim ini untuk mendegradasi RNA.
6. Isopropanol dingin : untuk mengendapkan DNA
7. Etanol 70 % : untuk meningkatkan kemurnian DNA dengan mengendapkan garam-garam yang larut pada presipitasi sebelumnya.

#### Cara kerja

Cara kerja bergantung pada suplai kit yang diberikan oleh manufaktur. Namun prinsip dasarnya adalah sejenis. Isolasi DNA yang menggunakan Kit secara teknik tinggal mengikuti intruksi dari label manufaktur

Berikut adalah metode manual "Salting Out" yang umum dan baik dalam menghasilkan konsentrasi DNA.

1. *Whole blood* sebanyak 3-5 ml dimasukkan ke dalam falcon 50 ml, ditambah lisis buffer 1x45 ml.
2. Larutan kemudian disentrifuse dengan putaran 4000 rpm selama 20 menit 4°C, hasil supernatant kemudian dibuang.
3. Langkah 1-3 diulangi sampai supernatan terlihat bersih (cuci 3x)
4. Pellet hasil sentrifuse kemudian ditambah dengan lisis buffer 3 ml dan ditambah SDS 10% 200 ul
5. Proteinase K 10 mg/ml sebanyak 20 ul kemudian ditambahkan kedalam larutan dan divortex.
6. Larutan diinkubasi dalam waterbath *overnight* 56°C
7. Hari berikutnya, NaCl jenuh (6M) tambahkan sebanyak 1,5-2 ml dan divortex.

8. Larutan kemudian disentrifuse 4000 rpm selama 15 menit pada suhu 25°C.
9. Supernatant kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam falcon 15 ml
10. Tambahkan ethanol absolute dingin (2:1) dan tabung dibolak-balik dengan lembut.
11. DNA akan terlihat seperti kabut, kemudian diambil dan dimasukkan dalam *safe lock tube*, dan ditambahkan ethanol 70% 1 ml
12. Larutan kemudian divortex, dan disentrifuse 4000 rpm.
13. Ethanol dibuang dan kemudian dikeringkan.
14. Setelah kering, ditambahkan TE buffer 100-200 ul (tergantung besar kecilnya DNA)
15. Inkubasi 37°C overnight sampai benar-benar larut
16. Ukur konsentrasi DNA dengan spektrofotometer.
17. Simpan dalam -20 °C dalam microtube 2 ml.

Berikut disampaikan cara kerja untuk isolasi DNA dengan menggunakan salah satu Kit (QIAamp minikit DNA).

1. Siapkan 5-10 cc *whole blood* dalam tabung reaksi 20-30 cc dan
2. Letakkan dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml atau 2 ml
3. Tambahkan 180 ul Buffer ATL (untuk melisiskan)
4. Tambahkan 20 ul Proteinase K
5. Vortex selama 5-10 detik
6. Inkubasi pada suhu 56°C selama 3 jam atau satu malam, sambil divortex setiap jam
7. Segera sentrifuse 3000 rpm selama 20 detik
8. Tambahkan 200 ul Buffer AL (untuk mengikat)
9. Vortex selama 15 detik
10. Inkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit
11. Segera sentrifuse 3000 rpm selama 20 detik
12. Tambahkan 200 ul etanol absolute (96-100%), vortex selama 15 detik
13. Pindahkan larutan ke QIAamp Spin Colomb
14. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit, pindahkan supernatant, buang filtrate
15. Tambahkan 500 ul Buffer AW-1 (untuk mencuci)

16. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit, pindahkan supernatant, buang filtrate
17. Tambahkan 500 ul Buffer AW-2 (untuk mencuci)
18. Sentrifuse 13.000 rpm selama 3 menit, pindahkan supernatant, buang filtrate
19. Sentrifuse lagi 13.000 rpm selama 1 menit,
20. pindahkan supernatant, buang filtrate, ganti dengan Evendorf
21. Tambahkan 200 ul Buffer AE (untuk mengencerkan)
22. Inkubasi dalam suhu ruang selama 1 menit
23. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit sebagai eluen I
24. Tambahkan 200 ul Buffer AE,
25. Inkubasi selama 5 menit
26. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit sebagai eluen II
27. Eluen disimpan dalam suhu 4°C selama 3 hari supaya homogen, baru dipindah pada suhu -20°C  
dibagi 2 = 50ul untuk DNA kerja, sisanya untuk disimpan

### Isolasi DNA Mitokondria

#### Pendahuluan

Pada beberapa penelitian molekuler, DNA mitokondria (mtDNA) adalah salah satu kajian yang saat ini sedang berkembang sangat pesat. Keberadaannya di sitoplasma sel menjadikan isolasi mtDNA nampak lebih *tricky*, namun kuantitas mtDNA bergantung pada jaringan, injuri, dan faktor eksterna seperti radiasi, oksidasi, dll. Pada isolasi mtDNA perlu adanya pemisahan atau permurnian dari material inti sel.

#### Alat

Alat yang dibutuhkan minimal adalah sebagai berikut :

1. Tabung Falcon
2. Microtube 1,5 atau 2ml



3. Micropipet 10. 100. 1000 ul
4. Dounce-type glass homogenizer
5. Centrifuge
6. Freezer dan atau Liquid nitrogen

#### Bahan

Bahan yang digunakan adalah :

1. Medium homogenisasi (0.32 M Sucrosa, 1 mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.8)
2. Lisis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS, and 0.2 mg/ml Proteinase K).
3. buffer-saturate phenol
4. Isopropanol 100%
5. Phenol
6. Glikogen
7. Kloroform 80%

#### Cara kerja

##### 1. Isolasi mitokondria dari jaringan

1. Dinginkan medium untuk homogenisasi (0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.8) dan dounce homogenizers pada suhu 4°C.
2. Masukkan kurang lebih 200 mg jaringan ke Dounce-type glass homogenizer dan tambahkan 5 ml). Pukul atau tekan-tekan dengan ringan jaringan tadi untuk memecah jaringan, lalu lanjutkan dengan adukan yang lebih ketat untuk membuat larutan yang homogen.
3. Transfer homogenate ke dalam tabung 15ml centrifuge dan spin selama 10 menit pada 1000g dan suhu 4°C. (hasil pellet adalah fraksi nuclear atau inti sel)

4. Tampung homogenate ke tabung baru dan spin kembali 10 menit dengan 1000g suhu 4°C untuk menghilangkan sisa-sisa material inti sel.
  5. Transfer supernatan ke dalam 3 fresh 1.5 atau 2.0 ml tabung microcentrifuge dan spin selama 20 menit, 13000g dan suhu 4°C. (Hasil pellet adalah fraksi kasar mitokondria).
  6. Buang supernatan kemudian pellet di resuspend dalam 1.5 ml medium homogenisasi dan spin selama 10 menit, 13000g pada suhu 4°C.
  7. Simpan hasil dalam liquid nitrogen -80°C atau lanjutkan ke tahap isolasi mtDNA.
- 
2. Isolasi DNA Mitokondria
    1. Resuspend mitochondrial pellet dalam 600µl lysis buffer
    2. Inkubasi dalam 55°C selama 60 menit atau sampai lysat menjadi jernih
    3. Tambahkan jumlah yang sama buffer-saturate phenol, campur dengan mebolak-balikan tabung kemudian sentrifus selama 5 menit pada 13000g, suhu 4°C.
    4. Transfer lapisan bagian atas ke dalam tabung baru, tinggal atau buang lapisan bawah.
    5. Tambahkan phenol dalam jumlah yang sama, campur dengan bolak-balik tabung, lalu sentrifus selama 5 menit pada 13000g, suhu 4°C.
    6. Transfer lapisan atas ke dalam tabung baru.
    7. Tambahkan kloroform sejumlah yang sama, campur dan sentrifus selama 10 menit pada 13000g, suhu 4°C.
    8. Transfer lapisan atas ke dalam tabung baru.
    9. Tambahkan isopropanol dan 30µg Glikogen, campur dan sentrifus selama 15 menit pada 13000g, suhu 4°C.
    10. Buang supernatan dan biarkan kering selama kurang lebih ~1 jam, atau sampai tidak ada droplet yang terlihat.

11. Resuspend mtDNA dalam 50-100 $\mu$ l of 10mM Tris, pH 8.0 dan simpan dalam suhu -20.

Beberapa manufaktur telah menyediakan reagent atau kit yang khusus untuk isolasi mt DNA. Secara prinsip tahap dan jenis perlakuan adalah sama, pengembangan reagent molekuler dari masing-masing manufaktur memungkinkan perlakuan dan waktu yang lebih ringkas.

### Isolasi RNA

#### Pendahuluan

Isolasi RNA penting dilakukan ketika peneliti bermaksud untuk mengukur suatu kuantitas ekspresi gen tertentu. Ekspresi mRNA menunjukkan tingkat ekspresi gen tertentu yang akan ditranslasikan dalam level protein. Ekspresi mRNA adalah spesifik atau *localized*, artinya ekspresi gen tersebut akan berbeda pada jaringan tubuh yang berbeda. Hal ini sesuai dengan tingkat kebutuhan protein dari gen tersebut dalam jaringan tersebut. Protein terkait neurotransmitter akan banyak diekspresi di jaringan syaraf daripada di jaringan darah. Begitu juga analogi protein yang lainnya. Prinsip dasar isolasi RNA adalah pemecahan sel, presipitasi RNA dan menghilangkan kontaminan DNA. RNA yang didapat kemudian dapat dilakukan analisis lanjutan seperti Northern Blot, cDNA conversion, dan *real time* PCR.

#### Alat

Alat yang dibutuhkan adalah :

1. Tabung Falcon
2. Microtube 2ml
3. Micropipet 10. 100. 1000 ul
4. Centrifuge
5. Dounce-type glass homogenizer
6. Waterbath
7. Incubator

## Bahan

Bahan yang dibutuhkan adalah :

1. Trizol
2. Chloroform absoult
3. Isopropyl alkohol
4. 75% Ethanol
5. RNase-free water or 0.5% SDS solution
6. DEPC water
7. DNase (Kit)
8. Qiagen's Rneasy Protocol Kit

## Cara kerja

Penting untuk dilakukan adalah segera memasukan jaringan yang akan diekstraksi ke dalam freezer -80 atau nitrogen cair untuk menjaga stabilitas RNA sebelum dilakukan pengerjaan isolasi. Disarankan segera dilakukan isolasi ketika masih dalam keadaan segar.

1. Homogenisasi jaringan dengan Dounce-type glass homogenizer. Pada waktu yang sama transfer paling sedikit 1mL TRIZOL / 100mg jaringan kedalam tabung falcon lainnya.
2. Pindahkan dengan spatula free RNase hasil homogenisasi ke dalam tabung Trizol. Vortek dengan lembut sampai homogen. Pada kultur sel, sel-sel tinggal diresuspend dengan medium Trizol sampai homogen. Tinggalkan selama 5 menit dalam temperatur ruang.
3. Tambahkan 200 kloroform untuk setiap 1 ml Trizol yang digunakan. Vortek 15 detik dan diamkan 3 menit dalam suhu ruang. Kemudian disentrifuse 15 menit 12000g, suhu 3C.
4. Hasil sentrifuse adalah 3 lapisan dengan bagian atas jernih. Pindahkan lapisan bagian atas dengan hati-hati tanpa terkontainasi lapisan lainnya ke dalam tabung baru. Tambahkan 500 ml isopropanol untuk setiap 1 ml Trizol yg digunakan pada waktu awal ke dalam tabung baru tersebut.

5. Sentrifuse tabung baru tersebut 10 menit 12000g, suhu 3C  
Kemudian buanglah supernatan.
6. Cucilah pellet RNA tersebut dengan 80% EtOH per 1 ml Trizol yg  
digunakan pada waktu awal. Vortek selama 15 detik. Sentrifuse 5  
menit pada 7500g, suhu 3C.
7. Buanglah supernatan hasil sentrifuge dan biarkan kering selama  
kurang lebih 3 menit. Kemudian pindahkan tabung ke hot block  
70°C dan biarkan 2-3 menit.
8. Kemudian dissolve pellet dengan 81 ul DEPC water.
9. Tambahkan enzim DNase sesuai petunjuk manufaktur (umumnya  
2 ul dalam 8 ul lauratn buffer)  
Vortek dan spin cepat kemudian di inkubasi selama 25 menit suhu  
42C
10. Tambahkan 350ul Buffer RLT (with BME-10ul/ml Buffer RLT).
11. Tambahkan 250ul 100% EtOH.
12. Pindahkan semua isi ke RNeasy column dan spin kecepatan  
penuh selama 1 menit.
13. Pindahkan kembali hasil spin ke kolom RNeasy baru column dan  
spin kecepatan penuh selama 1 menit.
14. Pindahkan hasil ke collection tube 2 ml baru.
15. Tambahkan 750ul Buffer RPE dan spin kecepatan penuh selama  
1 menit
16. Buang flow through dan tambahkan 750ul Buffer RPE dan spin  
kecepatan penuh selama 1 menit .
17. Buang flow through dan dan spin kecepatan penuh selama 1 menit
18. Transfer column ke dalam 1.5ml Eppendorf tube.
19. Tambahkan 56ul DEPC H<sub>2</sub>O dan biarkan selama 2 menit.
20. Spin penuh selama 2 menit
21. Buang kolom dan transfer tube ke dalam es dan hitung kuantifikasi  
RNA dengan Nanodrop.

Catatan : berbagai vendor atau manufaktur molekuler banyak menyediakan *RNA isolation Kit* yang spesifik untuk berbagai jaringan. Penggunaan kit yang sesuai akan menghasilkan kuantitas dan kualitas RNA yang dihasilkan.

## Desain primer untuk PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

### Pendahuluan

Untuk mendapatkan produk PCR yang baik, diperlukan desain primer yang optimal sehingga mampu berinkooperasi dengan enzim polimerase dalam menggandakan sekuen DNA yang dibutuhkan. Primer yang baik harus memiliki beberapa syarat diantaranya adalah : panjang basa oligonukleotida antara 18-24 basa, basa G dan C kurang lebih 50 %, tidak ada basa yang komplemen untuk menghindari primer dimer atau hairpin, kemudian memiliki suhu melting ( $T_m$ ) yang sebanding.

### Alat

Desain primer saat ini dapat digunakan berbagai aplikasi versi web, software yang berbayar maupun *free access*. Pada desain primer kali ini kita gunakan primer3 yang berbasis web, melalui <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

Bahan : tidak ada bahan

Cara kerja :

1. Buka situs <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.	<a href="#">Checks for mispriming in template.</a>	<a href="#">discrimer</a>	<a href="#">Primer3 Home</a>
	<a href="#">Primer3plus interface</a>	<a href="#">cautions</a>	<a href="#">FAQ/WIKI</a>

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtm -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINES, etc.) or use a [Mitochondrion Library \(repeat library\)](#). | [W/HE](#)

Pick left primer, or use left primer below   
  Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below   
  Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)

**Sequence Id.**  A string to identify your output.  
**Targets.**  E.g. 50.2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [ and ] e.g. .ATCT[CCCC]TCAT. means that primers must flank the central CCCC.  
**Included**  E.g. 401.7 68.3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and > e.g. <ATCT-CCCC-TCAT. forbids primers in the central CCCC.  
**Repeat**

**Product Size Ranges** 150-250 100-300 301-400 401-500 501-600 601-700 701-850 851-1000

Number To Return  Max % Stability   
 Max Repeat Mispriming  Pair Max Repeat Mispriming   
 Max Template Mispriming  Pair Max Template Mispriming

2. Masukkan sekuen dari gen yang diinginkan yang di dapat dari situs Genebank, NCBI atau yang lainnya. Pastikan sekuen tersebut mengandung urutan basa yang akan digandakan.



Alat :

1. Mesin PCR
2. Micropipet 10,100,1000 ul
3. Micro tube 200 ul atau 500 ul
4. Vortex
5. Micro spin

Bahan :

1. DNA template hasil isolasi DNA
2. Primer
3. PCR buffer
4. Mix PCR buffer
5. Enzim *taq polymerase*
6. dNTP
7. free DNase water

Tata cara :

1. Master mix PCR dibuat dengan campuran standard sebagai berikut :
  - a. 10 X buffer (sesuai supplier) 2,5  $\mu$ l
  - b. dNTP mix 2,5 mM 2,5  $\mu$ l
  - c. *Taq polymerase* sesuai supplier (5 U/ $\mu$ l/ atau sesuai petunjuk supplier) 0.25  $\mu$ l
  - d. Primer forward 2 ul, primer reverse 2 ul
  - e. Air steril up to 25  $\mu$ l

Master mix dibuat untuk 25-30 reaksi PCR atau sesuai yang diperlukan. Template DNA yang digunakan adalah DNA (25-50 ng/ $\mu$ l) sebanyak 2,5  $\mu$ l. Pipetting dilakukan dengan pipet terkalibrasi dan sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan. Pada beberapa kondisi tertentu, konsentrasi MgCl<sub>2</sub> kadang perlu ditambahkan.



2. Master mix dan reagen selalu diletakkan di atas rak es atau pendingin.
3. *Taq Polymerase* selalu di simpan di lemari es sampai siap untuk digunakan kembali.
4. Master mix kemudian di vortex sebentar.
5. Setiap tabung PCR di isi dengan master mix dan diatur sesuai dengan kode sample dalam form. Sertakan selalu kontrol positif dan kontrol negatif dalam setiap *running* PCR.
6. Template DNA dimasukkan ke dalam tabung reaksi PCR kurang lebih 2-5 ul (konsentrasi DNA 100 ng/ul) sesuai dengan kode yang dibuat.
7. Masukkan tabung reaksi ke dalam mesin PCR dengan kondisi siklus:
  - a. denaturasi awal pada suhu 95°C (5 menit)
  - b. kemudian denaturasi (30-35 siklus) pada suhu 94°C (30 detik)
  - c. *annealing* pada suhu 54°C (30 detik)
  - d. ekstensi pada suhu 71°C (30 detik)
  - e. ekstensi akhir 72°C (5 menit),
  - f. suhu akhir reaksi 4 ° C.
8. Optimalisasi mungkin diperlukan dengan mengatur ulang suhu reaksi dan komponen master mix. Optimalisasi terutama suhu *annealing* dengan melihat susunan primer.

## DNA Elektroforesis

### Pendahuluan

DNA dapat divisualisasi keberadaanya dengan melajukan dalam media yang dialiri dengan gelombang listrik. DNA yang bermuatan negatif akan melaju ke arah kutub yang bermuatan positif.

Alat :

1. Aparatus elektroforesis
2. Microwave atau Hotplate with magnetik stirer
3. Micropipete 10,100ul
4. Glove

Bahan :

1. DNA atau PCR produk atau RFLP produk
2. Agarose atau poliacrilamid
3. TAE atau TBE buffer
4. DNA loading dye
5. Ethidium bromide atau SYBR green.

Cara kerja

1. Setiap langkah di bawah harus dikerjakan dengan menggunakan sarung tangan. Cara membuat gel elektroforesis. Untuk membuat gel 2 % siapkan 2 gram agarose, kemudian larutkan dalam 100 ml TBE buffer 1 X. Tambahkan ethidium bromide. Sesuaikan dengan konsentrasi dan banyaknya larutan yang diperlukan. Presentase gel agarose yang direkomendasikan, adalah sebagai berikut:
  - a. 0,5% agarose untuk fragmen DNA berukuran 1000-30.000pb
  - b. 0,7% agarose untuk fragmen DNA berukuran 800-12.000pb
  - c. 1,5% agarose untuk fragmen DNA berukuran 200-3.000pb
  - d. 2,0% agarose untuk fragmen DNA berukuran 50-20.000pb
2. Larutan agarose kemudian dipanaskan dalam microwave atau hotplate stirer sampai larut sempurna (jernih).
3. Tuangkan dalam cetakan gel agarose yang sudah diberi sisir untuk membuat sumuran. Tunggu sampai kental dan keluarkan dari cetakan.
4. Masukkan TAE atau TBE buffer 1 X kedalam aparatus elektroforesis sampai batas atas, kemudian masukan gel agarose ke dalam aparatus sampai tenggelam.
5. Masukkan DNA sample yang telah ditambah loading dye serta DNA ladder ke dalam sumuran dengan micropipet.

6. Tutuplah aparatus dan aturlah laju listrik (umumnya 100 v dalam 30-40 menit). Periksa laju DNA dengan melihat laju DNA loading dye.

## Visualisasi Hasil Elektroforesis

### Pendahuluan

DNA hasil elektroforesis dapat divisualisasi dengan dua cara yaitu menggunakan ethidium bromide atau SYBR Green. Ikatan zat tersebut dengan DNA dapat dilacak karena mereka berpendar ketika dipapar dengan sinar UV.

### Alat :

1. Gel Doc Aparatus
2. Glove

### Bahan :

Tidak ada bahan

### Cara kerja

1. Pastikan gel doc aparatus dalam keadaan off sebelum memulai pekerjaan.
2. Masukkan gel agarose hasil dari elektroforesis ke dalam aparatus Gel doc system, dengan arah DNA ladder disebelah kiri.
3. Tutuplah UV chamber dengan sempurna, kemudian *switch on* gel doc aparatus.
4. Simpan hasil visualisasi dengan mengambill gambar melalui kamera yang berada di bagian atas aparatus.

## PCR RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

### Pendahuluan

RFLP adalah salah satu teknik genotyping dengan memanfaatkan enzim restriksi yang dapat mengenali perubahan basa dalam suatu sekuen. RFLP lazim dilakukan setelah penggandaan sekuen DNA melalui teknik PCR.

### Alat

1. Micropipet 1,10,100 ul
2. Waterbath dengan pengatur suhu atau incubator
3. Microtube

### Bahan

1. Enzim restriksi
2. Buffer enzim
3. DNA template or produk PCR
4. Milli Q water

### Cara kerja :

1. Sebelum melakukan kerja, masukan DNA template, Enzim dan buffer ke dalam wadah serutan es,
2. Buatlah mix larutan dalam microtube dengan pipet sesuai dengan komposisi :  
DNA sample – 15.0 µl  
10X Assay Buffer – 3.0 µl  
Milli Q water – 10.0 µl  
Enzim restriksi (misal EcoRI) –1.0 µl
3. Dalam setiap pengerjaan, enzim ditambahkan pada akhir tahap lainnya.
4. Setelah preparing semuanya, masukan mix ke dalam waterbath atau incubator dengan suhu 37 °C selama 2-3 jam atau overnight sesuai dengan petunjuk manufaktur.

5. Setelah diinkubasi, larutan diberi loading dye kemudian dilakukan elektroforesis dan visualisasi untuk menilai hasilnya.

### ARMS (*Amplification Refractory Mutation Scanning*)

#### Pendahuluan

ARMS adalah salah satu modifikasi teknik PCR. ARMS merupakan salah satu teknik genotyping dengan memanfaatkan *mismatch* primer yang digunakan dalam teknik PCR. ARMS menggunakan 2 pasang primer yang berbeda yaitu menggunakan pasangan untuk sekuen yang normal, dan 1 pasang lagi untuk menilai perubahan basa pada sekuen tersebut.

Alat :

Sama dengan PCR

Bahan :

Sama dengan PCR

Cara kerja :

1. Perbedaan dengan PCR biasa adalah dalam desain primer. Pada ARMS dikenal primer-primer untuk mendeteksi alel normal dan perubahan basanya /SNP disebut inner primer. Kemudian outer primer adalah primer yang digunakan sebagai pasangan primer utama/inner tadi.
2. Gunakan aplikasi web <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html> untuk bantuan membuat tetraprimer ARMS.

Source sequence (up to 1,000 bases)

```
TAAAA TAGAAGTCTCCAGAAATACCATCACTGAGAAAAGCATAAGCCTGGGGTGGGTTT  
GGGGTGGGAGAGAAATAATGGAAATTATATTGGATTATATGCAATATTGTAAATTGTG  
TTCTGCTCTACAATAGACATTTTTCATGTCTTAGATATTTTGTACAACATCACCTTA  
AAAGGCGGTATTGTATGGATATACAATAATGTAATTAACCTGAACATATGGTATTACCA  
GTTTTTTCACAAGCAACCCTGCTGTATTTCTGTGCACAGATATAGTTAAATCTTGGGA  
TAAAGTCTGAAAAGTGGAAATCACTTGAACAAATGTTTTTAATGCTTGCCAAAGTGCTCT  
GGCASTGGAATTAACCTTGTAAACAATAAATAGTATTACTGAAAACAATCTTAGTCCATT  
GTTATTGTTTTACTTTAAAT
```

Position of SNP from start of sequence

Allele 1

Allele 2

Optimum primer size

Maximum primer size

3. Masukkan sekuen yang berisi SNP yang akan digunakan sebagai target ke dalam kotak inquiry. Usahakan SNP target ada dibagian tengah sekuen.
4. Isikan parameter-parameter yang diinginkan, dengan target SNP jelas disebutkan pada urutan ke berapa. Isikan alel-alel dari target SNP. Sedangkan parameter lainnya dapat mengikuti default dari program.
5. Setelah semua terisi tekan pick primer.

Maximum 3' complementarity  
3.00  
Salt concentration (mM)  
50  
Annealing primer concentration (nM)  
50  
Number of outputs  
10  
Pick primers | reset | Help

For any questions or comments, please contact [arc@soton.ac.uk](mailto:arc@soton.ac.uk)

References:  
Andrew Collins, Xiayi Ke  
Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR.  
(Article submitted for publication)

6. Hasilnya dapat diketahui seperti tersebut di bawah ini.

```
*****OUTPUT 1*****
Forward inner primer (C allele):           Melting temperature
205 AATGTAATTAAC TGAACATATGGTTAGTC 233           56

Reverse inner primer (T allele):
260 CAGCAGGGTTGCTTGTGAAAAA CTTTA 233           67

Forward outer primer (5' - 3'):
18 GAAATACCATCACTGAGAAAAGCATAAG 45           61

Reverse outer primer (5' - 3'):
382 TTTATTGTTACAAGGTTAAT TCACTGCC 355           61

Product size for C allele: 179
Product size for T allele: 243
Product size of two outer primers: 365
```

7. Pilihlah primer yang sesuai dan gunakan dalam reaksi PCR yang akan digunakan. Perhatikan kondisi primer dan suhu optimum dalam reaksi PCR.

## Multiplexing PCR

### Pendahuluan

Multiplex PCR adalah modifikasi PCR dengan mereaksikan primer-primer lebih dari 2 pasang, digunakan secara luas untuk mendiagnosa keberadaan spesies tertentu. Pada bidang virologi, multiplex PCR digunakan untuk menskrining apakah sample atau bahan biologi tertentu mengandung virus-virus yang dicurigai.

Alat : sama dengan teknik PCR

Bahan : sama dengan teknik PCR. Pada beberapa vendor menyertakan Kit yang terdiri dari primer-primer yang spesifik untuk spesies tertentu.

Tata cara :

1. Desain lah primer yang optimal sesuai dengan kebutuhan. Usahakan primer satu dengan yang lainnya tidak membentuk mispairing, dimer, atau hairpin. Usahakan primer yang dimaksud spesifik dengan spesies yang dimaksud. Gunakan selalu database terupdate di NCBI, dan gunakan *Blast* untuk melihat spesifikasi primer terhadap spesies target.
2. Primer-primer tersebut dimasukkan dalam tube reaksi yang berisi : *Taq polimerase*, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, water. Bisa menggunakan Kit dari provider-provider yang khusus untuk mereaksikan PCR Multiplex.
3. Masukkan DNA template yang didapat dari bahan biologis, misalnya : CSF, blood, plasma, urin, dll.
4. Aturilah kondisi optimum dengan melakukan optimalisasi suhu pada percobaan-percobaan awal.
5. Setelah didapat kondisi yang optimum, kemudian lakukan PCR untuk keseluruhan sample yang diteliti.
6. Visualisasikan dengan Gel Doc atau bisa menggunakan Real time PCR.

## *Nested PCR*

### Pendahuluan

Nested PCR (PCR bersarang) menggunakan dua set primer berurutan. Satu set primer pertama digunakan untuk mengamplifikasi urutan DNA di luar DNA target seperti yang diharapkan dalam standar PCR, mengamplifikasi area lain dari template. Set primer kedua ditujukan pada urutan DNA target yang berada dalam bagian interna yang telah diperkuat oleh set pertama (nested PCR). Dengan demikian, set kedua primer akan mengikat dan memperkuat duplikasi DNA target hasil PCR produk dari reaksi pertama. Keuntungan utama dari PCR adalah bahwa jika primer pertama mengikat dan memperkuat urutan DNA yang tidak diinginkan, sangat tidak mungkin bahwa set kedua primer juga akan mengikat dalam wilayah yang tidak diinginkan.

Alat : sama dengan teknik PCR

Bahan :

1. Exonuclease I
2. PCR master mix, dengan primers (2x)  
Satu set primer untuk reaksi pertama (mengikat set yang kedua)  
Satu set primer untuk reaksi kedua
3. PCR reactions dari set PCR pertama
4. pGAP kontrol plasmid DNA
5. Sterile water
6. PCR tubes
7. Microcentrifuge tubes

Cara kerja :

1. Reaksi pertama dari Nested PCR adalah sesuai dengan teknik PCR pada umumnya. Lakukan sesuai prosedur standar.
2. Pada reaksi kedua gDNA hasil reaksi PCR pertama ditambahkan enzim exonuclease untuk mendegradasi sisa primer dari reaksi PCR awal. Masukkan 1  $\mu$ l exonuclease setiap produk PCR sampel. Aduk dengan pipetting ke atas dan ke bawah.



3. Inkubasi pada suhu 37 ° C selama 15 menit.
4. Inkubasi pada suhu 80 ° C selama 15 menit untuk memanaskan menonaktifkan exonuclease
5. Beri label pada setiap tabung PCR yang sudah mendapat perlakuan exonuclease.
6. Sampel PCR pertama akan diencerkan 100 kali dalam PCR kedua. Masukkan *fresh water* 98 µl ke dalam tube baru, kemudian campurkan 2 µl produk PCR yang pertama untuk mendapatkan 100 kali pengenceran.
7. Lakukan reaksi PCR kedua dengan template DNA yang sudah diencerkan.
8. Pipet 20-25 µl PCR Mix yang sudah berisi dNTPs, Buffer, primer kedua dan *fresh water* dalam masing-masing tabung PCR baru. Tambahkan 2 µl DNA template dari reaksi pertama yang sudah diencerkan.
9. Lakukan siklus Nested PCR dengan kondisi siklus sebagai berikut :
  - a. denaturasi awal pada suhu 95°C (5 menit)
  - b. kemudian denaturasi (30-35 siklus) pada suhu 94°C (30 detik)
  - c. *annealing* pada suhu 54°C (30 detik)
  - d. ekstensi pada suhu 71°C (30 detik)
  - e. ekstensi akhir 72°C (5 menit),
  - f. suhu akhir reaksi 4 ° C.
10. Lakukan visualisasi hasil nested PCR dengan gel elektroforesis dan *UV light*.

## Isolasi Protein

### Pendahuluan

Protein adalah komponen alam yang terdapat pada semua makhluk hidup. Pada sel atau jaringan, protein umumnya bersenyawa dengan komponen lainnya seperti lemak, hidrokarbon, ataupun juga karbohidrat untuk membentuk senyawa aktif dan fungsional. Jenis protein dalam tubuh sangat bervariasi, tersusun sesuai atas fungsi seperti mioglobin, globulin, interleukin, dan lain sebagainya. Purifikasi atau isolasi protein umumnya diperlukan untuk melihat aktivitas atau mendeteksi suatu jenis protein tertentu yang dicurigai dalam proses patomekanisme penyakit. Jenis isolasi protein pun bervariasi sesuai dengan maksud dan tujuannya. Pada tingkat *advance*, isolasi protein mencapai target protein yang diinginkan.

### Alat :

1. Micropipet 1000 ul, 100 u; 10ul
2. Potter-Elvehjem homogenizer /blender
3. Analitic balance
4. Alat pemotong
5. Kolum kromatografi : Phenyl Sepharose CL 4B

### Bahan :

1. 0.2 M sucrose/5 mM imidazole-HCl, pH 7.4
2. buffer (20mM TrisHCL, 20mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>),
3. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
4. Loading buffer: 20 mM sodium phosphate (pH 7.0) yang berisi 50% ammonium sulfate
5. Elution buffer: 20 mM sodium phosphate (pH 7.0) yang berisi 0-50 % mmonium sulfate

Cara kerja :

#### Homogenisasi

1. Pisahkan jaringan yang akan ekstraksi kemudian cucuilah dengan normal salin.
2. Potonglah jaringan dalam ukuran terkecil, kemudian masukan dalam tabung, tambahkan 0.2 M sucrose/5 mM imidazole-HCl, pH 7.4) untuk mencapai 0.25% (w/v).
3. Lakukan prosedur homogenisasi dengan Potter-Elvehjem homogenizer (sampai 6 x) dan dilusi ekstraksi menjadi 12.5% (w/v) dengan homogenization buffer.

#### Fraksinasi

1. Sentrifuge sample dari hoogenisasi pada 600 g selama 10 menit suhu 4 C. Ambil supernatan dan kumpulkan dalam tabung berlabel.
2. Resuspen pellet dari perlakuan di atas dengan homogenisasi bufer dan lakukan sentrifugasi kembali 10 menit. Ambil supernatan dan kumpulkan dalam tabung berlabel.

#### Presipitasi

1. Dari supernatan di atas tambahkan secara bertahap  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sebanyak 40 % dari saturasi. Kemudian sentrifuse dengan kecepatan 12 000 x g selama 10 menit dan tambahkan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  untuk menapai saturasi 80%.
2. Presipitasi protein di resuspen dengan buffer (20mM TrisHCL, 20mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>), dan sentrifugasi 12000 rpm 10 menit.

#### Kromatografi

1. Kromatografi hasil tahap presipitasi dapat dilakukan dengan berbagai teknik seperti ion-exchange chromatography, Separation by hydrophobic interaction, Affinity chromatography, atau gel electrophoresis, dan lain sebagainya sesuai peruntukannya.
2. Pada buku ini kami pilihkan salah satu metode yaitu *hydrophobic interaction* sebagai berikut :

- a. Cuci kolom dengan (5 ml bed) with 10 x volume loading buffer.
- b. Larutkan sample protein (200 to 400 mg) dalam loading buffer dan masukan ke dalam kolom kromatografi.
- c. Cuci kolom dengan loading buffer sampai absorbansi 280 nm kembali ke bagian latar belakang (biasanya 3 - 5 volume kolom).
- d. Elusikan protein dengan 2 volume kolom untuk setiap buffer elution dengan menurunkan konsentrasi ammonium sulfat
- e. Perbarui kolom dengan tambahan air, 1 M NaCl, dan air (5 volume kolom untuk setiap sample).

### SDS PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

#### Pendahuluan

SDS PAGE adalah salah satu metode elektroforesis protein dengan memanfaatkan Sodium Dodecyl Sulphate. SDS adalah detergen yang mampu mendenaturasi protein dan menjalin ikatan dengan *uncoiled molecules*. Protein kemudian dapat dipisahkan menurut ukuran ukurannya, berat molekul dapat diestimasi dengan melihat perbandingannya dengan standar protein yang dilakukan bersama dalam satu gel.

#### Alat :

1. Glass plates
2. Spacers/pembatas
3. Comb/sisir
4. Gel caster (Hoefer, Bio-Rad)

#### Bahan :

1. Acrylamide, electrophoresis grade
2. Bisacrylamide (N,N '-methylene bisacrylamide)

3. Tris (2-hydroxymethyl-2-methyl 1,3 propanediol)
4. SDS (Sodium dodecyl sulfate or sodium lauryl sulfate)
5. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
6. Ammonium persulfate
7. 2-Mercaptoethanol
8. Glycerol
9. Bromophenol blue
10. Glycine
11. Hydrochloric acid (HCl)
12. Dithiothreitol

Cara kerja :

Membuat *Sock Solution*

*Sock Solution* adalah reagen yang digunakan untuk keperluan *stock* atau simpanan, tidak untuk keperluan sesaat.

1. 2 M Tris-HCl (pH 8.8) 1 liter: yaitu dengan menambahkan 242 gram Tris base dalam 900 ml air distilasi. Atur pH to 8.8 dengan menambahkan konsentrasi HCl perlahan sampai di dapat volume total 1 liter.
2. 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 100 ml: yaitu dengan menambahkan 12.1 gram Tris base dalam 80 ml air distilasi. Atur pH to 6.8 dengan menambahkan konsentrasi HCl perlahan sampai di dapat volume total 100 ml.
3. 10% SDS (w/v), 100 ml: 10 gram SDS ditambahkan air distilasi volume of 100 ml. Simpan dalam suhu ruang.
4. 50% glycerol (v/v), 100 ml: Tambahkan 50 ml air distilasi ke dalam 50 ml 100% glycerol.
5. 1% bromophenol blue (w/v), 10 ml: 100 mg bromophenol blue ditambahkan dalam 10 ml air distilasi. Campurlah sampai benar-benar larut.

Membuat *working solutions*

*Working solutions* adalah reagen yang digunakan untuk keperluan bekerja pada saat hari itu atau digunakan beberapa hari saja.

1. 30% acrylamide *stock solution*: larutkan 29.2 gram acrylamide dan 0.8 gram bisacrylamide dengan air distilasi sampai 100 ml. Simpan dalam suhu 4 C \*).
2. 4 x separating gel buffer, sebanyak 100 ml terdiri atas 75 ml 2M Tris-HCl (pH 8.8), dengan finalkonsentrasi 1.5 M, 4 ml 10% SDS dengan final konsentrasi 0.4%, dan 21 ml air distilasi.
3. 4x stacking gel buffer, sebanyak 100 ml tersusun atas 50 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8, 4 ml 10% SDS, serta 46 ml air distilasi
4. 10% ammonium persulfate, sebanyak 5 ml dapat dibuat dengan melarutkan 0.5 gram ammonium persulfate dalam 5 ml air distilasi. Buat Aliquot sejumlah 100 µl dalam 0.5 ml tabung microfuge dan simpan dalam suhu -20°C.
5. Electrophoresis buffer, 1 liter dibuat dengan melarutkan 3 gram Tris base, 14.4 gram glycine, 1 gram SDS, dan air distilasi sampai 1 liter (pH dipertahankan pada angka 8.3), simpan pada suhu 4 C.
6. 5x sample buffer, sebanyak 10 ml tersusun atas 0.6 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8), 5 ml 50% glycerol, 2 ml 10% SDS, 0.5 ml 2-mercaptoethanol, 1 ml 1% bromophenol blue, dan 0.9 ml air (buat aliquot dalam micro tube dan simpan pada suhu -20°C).

Catatan : \*) unpolymerized acrylamide sangat irritant dan neurotoxic, gunakan selalu sarung tangan yang kuat. Gunakan masker untuk menghindari hirupan. Sisa solusi harus dipolimerasi dan dibuang dengan sampah solid.

#### Cara kerja

##### Membuat *Gel Sandwich*.

1. Bersihkan *gel plates* dengan sabun dan keringkan.
2. Buat sandwich dengan dua gel plates dengan meletakkan *placing spacers* (0.75 atau 1.5 mm) di antara keduanya.
3. Buat atau rakitlah satu atau multiple sandwiches ke dalam *gel caster* yang sesuai. Ikuti instruksi manual atau petunjuk dari suplier alat

*Separating Gel*

1. Buatlah gel electrophoresis sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan seperti dalam tabel berikut :

Stock Solutions	Final Acrylamide Concentration in the Separating Gel										
	5	6	7	8	9	10	12	13	15	17	20
30% acrylamide/0.8% bisacrylamide	2.50	3.00	3.50	4.00	4.50	5.00	6.00	6.50	7.50	8.5	10.00
4x separating gel buffer	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
Water	8.75	8.25	7.75	7.25	6.75	6.25	5.25	4.75	3.75	2.75	1.25
10% ammonium persulfate	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Berdasar resep di atas, campurkan semua bahan kecuali ammonium persulfate dan TEMED dalam tabung erlenmeyer 250 ml. Volume masing-masing komponen tergantung dari jumlah dan konsentrasi gel yang akan dibuat.

2. Tutup labu dengan gabus karet dan buanglah gas dengan vacum selama 5-10 menit dengan melekatkan sisi tabung dengan jalur mesin vacum laboratorium.
3. Tambahkan volume ammonium persulfate dan TEMED sesuai komposisi di atas kemudian campurlah dengan cara diputar-putar. Perhatikan jangan sampai terlambat pada step ini mengingat polimerisasi mulai terjadi pada saat penambahan ammonium persulfate dan TEMED
4. Dengan hati-hati tuangkan solusi gel ke dalam aparatus sandwich yang sudah dibuat dengan pipet dengan cara menyentuhkan ujung pipet pada permukaan glass plate. Usahakan jangan sampai terjadi bubble pada saat menuangkan gel tersebut. Jangan pula isi sampai penuh kasetnya, sisakan kurang lebih 1,5 cm dari atas aparatus sandwich untuk membuat stacking gel (di atas separating gel).
5. Dengan cepat dan lembut, lapiasi dengan 100 sampai 200 ul isopropanol (untuk mini gel, dengan ketebalan 0,75 mm) di atas solusi *separating gel*. Biarkan selama 30-60 menit pada suhu ruang. Setelah terjadi polimerisasi maka nampak batas antara isopropanol dan gel. Pada tahap ini isopropanol dapat di jentikan

keluar. Setelah permukaan gel dicuci dengan 1x *separating gel* buffer, stacking gel baru dapat ditambahkan.

Note : *separating gel* dapat disimpan selama beberapa minggu pada suhu 4 C. Jika akan disimpan, gantilah isopropanol dengan 1x *separating gel* buffer kemudian di bungkus dengan parafilm atau plastik.

#### *Stacking gel*

1. Campurlah reagen berikut dalam 50 ml labu : 30% acrylamide stock solution: 0.65 ml, 4x stacking gel buffer, pH 6.8: 1.25 ml, dan distilasi air 3,05 ml. (Campuran ini dapat digunakan untuk membuat dua staking gel dengan ketebalan 0,75 mm).
2. Buang gas dengan vacuum selama 10-15 menit pada suhu ruang. Kemudian tambahkan 25 µl 10% ammonium persulfate dan 5 µl TEMED, campur dengan cara memutar labu.
3. Dengan cepat, tambahkan solusi stacking gel di atas separating gel. Isilah bagian yang kosong sepenuhnya. Kemudian secara hati-hati masukan sisir ke dalam gel sandwich. Pastikan tidak ada balon/buble yang terbentuk di antara gigi sisir. Jarak antara *separating gel* dan bagian bawah sisir kira-kira 0.5 cm. Biarkan stacking gel untuk berpolimerisasi pada suhu ruang selama 30 menit.

#### *Running Gels*

1. Setelah berpolimerisasi sisir diangkat secara hati-hati untuk membentuk sumur. Kemudian gel sandwich dimasukan ke dalam tangki elektroforesis, kemudian isilah tanki dengan elektroforesis buffer.
2. Siapkan / preparasi sampel protein dengan hati-hati. Campur dengan hati-hati sampel protein atau protein standard dengan 5x sampel buffer (rasio 4:1), pada tabung eppendorf (untuk 10 sumuran dan ketebalan 0,75 mm : 20 ul sampel protein dan 5 ul sampel buffer dicampur).



3. Panaskan campuran dengan suhu 100°C selama 2 sampai 5 menit. Spin down dan sampel siap diloaded ke dalam sumur.
4. Loading sampel dengan pipet. Hindari membuat buble dalam loading sampel. Jangan lupa masukan standard protein dengan berat protein yang sesuai.
5. Tancapkan stop kontak listrik dengan tegangan 220. Setting voltase 100-150 v dan waktu running kurang lebih 20-30 menit sesuai dengan kebutuhan.
6. Jika loading buffer sudah sampai pada bagian ujung annoda, matikan listrik dan lepaskan gel sandwich sedemikian rupa sehingga urutan sampel dikenali dengan benar.
7. Hati-hati menggeser salah satu spacer jangan sampai merusak gel. Tandai salah satu sudut gel dengan cara memotongnya dan pastikan urutan sumur sesuai dengan urutan sampel dalam logbook. Gel yang sudah lepas dapat dilanjutkan ke tahap pewarnaan.

*Pewarnaan silver (silver diamine)*

Reagen yang diperlukan :

1. *Gel fixation solution*: 20% (w/v) trichloroacetic acid solution.
2. *Sensitization solution*: 10% (w/v) glutaraldehyde solution.
3. *Silver diamine staining solution*: bahannya yaitu 4 ml silver nitrate 20%, 21 ml NaOH 0.36% dan 1.4 ml ammonia 35%. Campuran tersebut akan menghasilkan presipitate coklat. Tambahkan sedikit ammonia untuk melarutkan precipitate. Dilusikan solusi tersebut dengan 100 ml air distilasi. Campuran harus digunakan dalam waktu 5 menit)
4. *Developing solution*: campurkan 2.5 ml asam sitrat 1% dan 0.26 ml Formaldehide 36 %. Dilusi dengan tambahan 500 ml air distilasi.
5. *Stopping solution*: 40% ethanol dan 10% asam sitrat dalam air.
6. *Destaining solution*: 0.3% (w/v) potassium ferricyanide/0.6% (w/v) sodium thiosulfate/0.1% (w/v) sodium carbonate.

*Prosedur pewarnaan*

1. Setelah proses elektroforesis, gel diinkubasi dalam 200 ml *fixing solution* selama paling sedikit 1 jam. Pada persentase gel yang tinggi, dibutuhkan waktu fixasi yang lebih lama atau overnight.
2. Cucilah gel dua kali selama 30 menit (2 x 30 menit) dengan 200 ml 40% ethanol/10% asam asetat.
3. Rehidrasi gel dengan air selama 2 x 20 menit.
4. Kemudian gel diinkubasi dengan *sensitizing solution* selama 30 menit.
5. Cucilah gel dengan air selama 3 x 20 menit.
6. Inkubasi gel dalam *staining solution* selama 30 menit. (catatan: buanglah silver diamine setelah perlakuan 1 N HCl.)
7. Cuci gel dengan air selama 3 x 5 menit.
8. Inkubasi gel dalam *developing solution* sampai terlihat protein seperti zone coklat dalam gel (kurang lebih 10 menit warna coklat akan terlihat)
9. Setelah terwanai hentikan proses pewarnaan dengan *stopping solution*.
10. Untuk menghilangkan pewarnaan, cuci gel dengan air selama 5 menit dan inkubasi gel dalam *destaining solution* sampai warna menghilang, lalu cucilah dengan *stopping solution*.

*Western Blot*

Pendahuluan

Western blot adalah teknik deteksi protein dengan mentransfer protein atau glikoprotein hasil elektroforesis PAGE ke membran deteksi. Membran ini umumnya dapat berupa nitrocelulosa dan PVDF (polyvinylidene difluoride), membran yang lain dapat berupa nylon atau carboxymethyl cellulose.

Alat :

1. Western transfer apparatus
2. Power supply

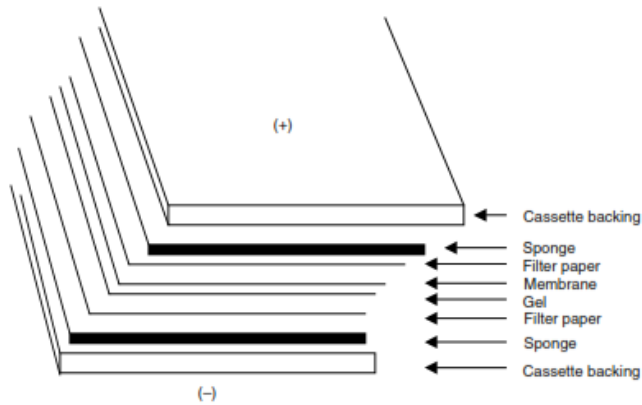
3. Gel-membrane sandwich cassette
4. Sponges
5. Whatman 3MM paper
6. Blotting membrane (for example, PVDF)
7. Magnetic stirrer
8. Cooling water circulator
9. Plastik atau nampan gelas untuk membuat gel-membrane sandwich

Bahan :

1. Towbin transfer buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol
2. Methanol.

Cara kerja :

1. Setelah proses SDS-PAGE, rendam gel dalam Towbin buffer selama 20 menit dalam temperatur ruang.
2. Isilah kurang lebih 2/3 transfer apparatus dengan transfer buffer dan dinginkan pada suhu 10°C dengan cold-water circulator.
3. Potong membran PVDF sedikit lebih besar dari gel. Rendam membran di dalam 100% metanol selama beberapa menit (PVDF tidak akan basah langsung di Towbin buffer). Inkubasi membran dalam transfer buffer selama 10 sampai 15 menit .
4. Potong dua lembar kertas Whatman 3mm sedikit lebih besar dari membran dan rendam dalam transfer buffer. Tinggalkan gel, membran, dan kertas dalam transfer penyangga sampai sandwich terbentuk.
5. Buka kaset yang kosong dan letakan pada nampan. Rakitlah gel-membrane sandwich seperti nampak dalam gambar. Untuk mempersiapkan sandwich, letakkan spons (sebelum direndam dalam transfer buffer) di atas salah satu penyangga kaset.



6. Tempatkan satu kertas filter di atas spons. Tempatkan gel di atas filter kertas. Sekarang lapisilah dengan hati-hati membran di atas gel, jangan sampai membentuk gelembung gas (hapus gelembung yang terbentuk). Perhatikan juga jangan sampai kering spons, gel, atau membran selama perakitan. Isikan beberapa mililiter transfer buffer di dalam nampan.
7. Tempatkan kertas filter kedua di atas membran dan yang terakhir spons kedua di atas kertas filter. Kuncilah kaset dan tempatkan pada transfer apparatus, dengan sisi membran ke arah anoda serta sisi gel menghadap katoda. Tambahkan transfer buffer jika diperlukan. Tutup kembali elektroforesis apparatus dan hubungkan elektroda dengan catu daya.
8. Running proses transfer pada arus 60 sampai 80 volt atau 0,4 ampere selama 60 sampai 99 menit. Secara umum protein-protein di atas 100 kDa dapat ditransfer dengan baik pada kondisi transfer tersebut.
9. Pada akhir transfer, matikan listrik dan lepaskan kaset dari transfer apparatus. Pisahkan membran dari gel dan tandai sisi membran dimana protein bergerak. Membran sekarang sudah siap untuk immunodetection atau deteksi lainnya. Perlakukan Towbin buffer sebagai MeOH yang merupakan sampah berbahaya. Walaupun

begitu, Towbin buffer dapat digunakan kembali sampai 3 kali penggunaan.

Pewarnaan dengan *Coomassie Brilliant Blue*

Bahan :

1. *Staining solution* : 0,1% (w / v) Coomassie Brilliant Blue dalam 40% metanol / 10% asam asetat
2. *Destaining solution*: 40% metanol / 10% asam asetat

Cara kerja :

1. Cat membran dengan larutan pewarna (*staining solution*) selama 1 sampai 5 menit, sampai nampak protein yang dimaksud.
2. De-stain dengan *Destaining solution* sampai latar belakang menjadi bersih.
3. Bilas membran dengan air, kemudian periksa hasilnya.

## Immunohistokimia

Pendahuluan

Pada teknik immunohistokimia, protein dideteksi pada jaringan atau irisan jaringan atau sel dengan menggunakan prinsip antibodi-antigen. Teknik ini menggabungkan pengetahuan teknik anatomi, histologi, patologi anatomi, dan pewarnaan. Jaringan dipotong dengan mikrotom, kemudian protein dalam sel dideteksi dengan prinsip immuno staining.

Alat :

1. Mikrotom
2. Cassete embedding
3. Blok parafin
4. Staining apparatus
5. Mikroskop (cahaya atau fluorescene)

Bahan :

1. Formaldehide 40 %

2. Alkohol, methanol, ethanol 50%, 70 %, 95%
3. Xylene
4. Larutan PBS
5. Air distilasi.
6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%
7. Avidin 0,1 %
8. Biotin 0,01 %
9. Primer antibody sesuai dengan protein yang akan diteliti
10. Secondary antibody untuk pewarnaan.

Cara kerja :

1. Fixasi jaringan atau organ yang akan dilihat dengan formaldehid 40 %
2. Dehidrasi jaringan dengan ethanol 50 %, 70 %, dan 95 % masing-masing 1-2 jam pada suhu 4 C.
3. Kemudian celupkan dalam alkohol absolut 3 x masing masing selama 1 jam pada temperatur ruang.
4. Kemudian celupkan dalam xylene 2 x masing-masing selama 30 menit suhu ruang.
5. Kemudian di *embed* dalam paraffin wax untuk dipotong dengan mikrotom atau disimpan.
6. Dari parafin wax potonglah jaringan sesuai potongan yang diinginkan (sagital, melintang atau diagonal) dengan ketebalan minimal, kemudian tempatkan di atas slide glass.
7. Lakukan *de-waxing* slide dengan prosedur pencelupan :
  - a. Xylene, 20 menit.
  - b. Xylene, 5 menit.
  - c. 100% ethanol, 3 kali dengan 3 menit setiap celup.
  - d. 95% ethanol dalam *distilled water*, 3 menit.
  - e. 70% ethanol dalam *distilled water*, 3 menit
  - a. Distilled water, 3 kali dengan 1 menit setiap celup.
  - b. Bilas dalam larutan PBS sebelum dilakukan immunostaining.
8. Inhibisi endogenous peroxidase dengan 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 3-5 menit. Kemudian bilas dengan air distilasi.

9. Inhibisi aktivitas endogenous avidin-biotin (jika perlu) dengan avidin 0,1% 20 menit suhu ruang. Bilas dengan PBS, kemudian inkubasi 0,01% biotin 20 menit suhu ruang, kemudian bilas dengan PBS.
10. Slide kemudian dipapar atau diinkubasi dengan primer antibodi (unlabeled primary antibody) selama 1 jam.
11. Bilas dengan PBS 3 kali, masing-masing 5 menit.
12. Kemudian diinkubasi dengan labeled secondary antibody (flurochrome atau fluorescene).
13. Bilas dengan PBS 3 kali, masing-masing 5 menit.
14. Preparat kemudian dilihat dibawah mikroskop untuk pengamatan.

### ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

#### Pendahuluan

ALISA adalah salah satu assay protein menggunakan enzim terlabel antibodi. Prinsip utama adalah reaksi antigen-antibodi. Ikatan antigen-antibodi dapat dilabel dengan enzim tertentu yang membawa probe/penanda yang dapat divisualisasikan untuk melihat kuantifikasi protein tersebut pada absorbansi panjang gelombang tertentu.

#### Alat :

1. Microplate reader atau ELISA reader
2. Microplate washer atau ELISA reader
3. Inkubator (microplate inkubator shaker atau non shaker)

#### Bahan :

Secara umum ELISA kite terdiri atas komponen reagen :

1. Microplate yang sudah terkonjugasi (Antibody-coated 96-well)
2. Detection antibody (biasanya biotinylated)
3. Standard atau kontrol

4. HRP/Horse Radise Peroxidase terkonjugasi (antibody atau streptavidin)
5. Diluent buffers
6. Wash buffer
7. Chromogenic substrate atau substrat pewarna (usually TMB)
8. Stop solution
9. Plate covers
10. Air Distilasi atau air deionized
11. Sampel

Cara kerja :

Preparasi sampel.

1. Jika yang dibutuhkan adalah serum, maka darah tanpa antikoagulan dibiarkan dalam suhu ruang sampai terbentuk lapisan serum di atas lapisan sel. Ambilan dengan pipet secara hati-hati. Sampel siap digunakan.
2. Jika yang dibutuhkan adalah plasma, darah dengan antikoagulan (EDTA) disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm 10 menit, kemudian lapisan plasma di atas lapisan sel diambil dengan pipet secara hati-hati. Sampel siap digunakan.

Coating antibodi.

1. Jika microplate yang digunakan belum dicoated dengan antibodi dari supplier, maka kita harus melapisi/coated microplate tersebut secara manual.
2. Simpan reagen coated antibodi dalam suhu ruang.



3. Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  of diluted capture antibody pada setiap sumuran plate. Tutup plate dan inkubasi 4C semalaman.
4. Kembalikan ke suhu ruang dan aspirasi likuid dari sumuran.
5. Cuci 4 x..
6. Tambahkan 200  $\mu\text{L}$  blocking buffer pada setiap sumuranl. Tutuo plate dan biarkan dalam suhu ruang selama 1 jam
7. Aspirasi cairan dalam sumuran dan buang. Microplate siap digunakan.

*Working prosedure*

1. Semua regen yang akan digunakan diletakkan dalam suhu ruang. Goyang atau mix dengan lembut semua reagen yang akan digunakan.
2. Tambahkan 50-100  $\mu\text{L}$  standard dan sampel pada sumuran. Tutup plate dan inkubasi dalam suhu ruang selama 2 jam (waktu ini mungkin berbeda pada protein yang berbeda dan suplier yang berbeda).
3. Campurlah secara menyeluruh dengan cara aspirasi dan tuang kembali dari cairan disumuran tadi, kemudian buanglah sisa cairan.
4. Cucilah sumuran 4 x menggunakan automated 96-well plate washer (tersedia di lab riset).
5. Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  cairan deteksi antibodi pada sumuran. Tutuplah plate dan inkubasi dalam suhu ruang 1 jam.
6. Campurlah secara menyeluruh dengan aspirasi dan tuang kembali dari cairan disumuran tadi, kemudian buanglah sisa cairan.

7. Cucilah sumuran 4 x menggunakan automated 96-well plate washer.
8. Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  cairan dilusi yang terkonjugasi HRP pada setiap sumuran. Tutuplah plate dan inkubasi dalam suhu ruang 30 menit.
9. Campurlah secara menyeluruh dengan cara aspirasi dan tuang kembali dari cairan disumuran tadi, kemudian buanglah sisa cairan.
10. Cucilah sumuran 4 x menggunakan automated 96-well plate washer.
11. Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  chromogenic substrate pada setiap sumuran.
12. Biarkan substrat pewarna membangun ikatan pada suhu ruang yang gelap selama 30 menit.
13. Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  stop solution pada setiap sumuran. Akan terjadi perubahan warna (umumnya dari biru ke kuning).
14. Plate harus dibaca maksimal 30 menit pada kondisi stop solution. Bacalah absorbansi setiap suuran sesuai petunjuk suplier (umumnya 450 dan 550 nm). Kurangilah nilai hasil 550 nm dari nilai hasil 450 nm untuk memperbaiki ketidaksempurnaan pembacaan microplate.
15. Gunakan perangkat lunak statistik kurva-pas untuk plot empat parameter logistik kurva fit dengan standar dan kemudian menghitung hasil untuk sampel uji.

Kontak Informasi

Lantip Rujito

**Tel** 081548803168

**Fax** 0281624990

[l.rujito@unsoed.ac.id](mailto:l.rujito@unsoed.ac.id)

Kantor

Fakultas Kedokteran  
Universitas Jenderal Soedirman  
Purwokerto

**Tel** 0281 622022

**Fax** 0281 624990

[riset.fk.unsoed.ac.id](http://riset.fk.unsoed.ac.id)



