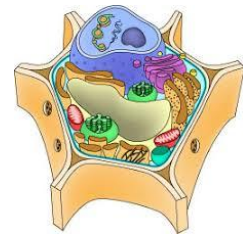


BUKU PRAKTIKUM BIOLOGI SEL



**Oleh :
Sri Widyarti**

**Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya
Malang 2018**

DAFTAR ISI

	Halaman
Daftar Isi	1
Kata Pengantar	2
Petunjuk Membuat <i>Student Laboratory Notebook</i>	3
Cara Menyusun Laporan Praktikum	4
Tata Tertib Praktikum	6
Praktikum 1. Fraksionasi dan Analisa Komponen Seluler	8
Praktikum 2. Solubilitas Lipid pada Membran	14
Praktikum 3. Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan DPPH	17
Praktikum 4. Interaksi Protein-Ligan	19
Praktikum 5. Efek Perlakuan Fisiko-kimia pada <i>cell death</i>	21
Lampiran	23

KATA PENGANTAR

Praktikum Biologi Sel merupakan salah satu praktikum yang mendasari praktikum pada mata praktikum yang lain seperti Praktikum Teknik Analisa Biologi Molekuler, Praktikum Kultur Jaringan dan Sel Hewan serta Praktikum Imunologi. Petunjuk Praktikum Biologi Sel ini disusun sejak tahun akademik 2004/2006 yang saat itu hanya memuat tiga materi. Setiap dua tahun, materi praktikum mengalami penambahan dan penyempurnaan. Untuk memudahkan praktikan dalam merekam setiap langkah praktikum dengan teliti, Petunjuk Praktikum Biologi Sel edisi tahun 2012 dilengkapi dengan petunjuk membuat *student laboratory notebook* dan laporan praktikum. Pada edisi tahun 2013, materi baru yang ditambahkan adalah uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH. Pada tahun 2015, materi Teknik Kontras Mikroskop dihapus karena dalam kurikulum 2015 disediakan mata kuliah pilihan Mikroskopi, sedangkan materi yang ditambahkan adalah solubilitas lipid pada membran. Penyempurnaan ini diharapkan selain bahwa praktikum lebih mengena pada sasaran pembelajaran juga memperkaya kajian Biologi Sel.

Malang, 17 September 2018
Penyusun

PETUNJUK MEMBUAT STUDENT LABORATORY NOTEBOOK

Student laboratory notebook (selanjutnya disebut *labnote*) adalah buku catatan untuk mendeskripsikan eksperimen secara sangat detail dan perekaman data mentah (*raw data*) yang mencantumkan **prosedur praktikum, alat dan bahan praktikum, hasil praktikum serta kendala yang terjadi**. Laporan sementara yang berlaku selama ini, fungsinya digantikan oleh *labnote*. *Labnote* dimaksudkan untuk melatih ketrampilan mahasiswa dalam menulis *research notebook* pada saat penelitian tugas akhir skripsi di Jurusan Biologi.

Salah satu aspek penting dalam penelitian yaitu **hasil yang diperoleh dan prosedur atau tahapan** bagaimana hasil penelitian tersebut didapatkan. Prosedur suatu penelitian harus bersifat *repeatable* yaitu bisa diulang pada waktu dan oleh peneliti yang berbeda dengan hasil yang sama. Oleh karena itu, prosedur penelitian harus direkam secara rinci, teliti dan lengkap agar bisa dipahami dan dilakukan oleh orang lain secara tepat. Prinsip yang dipakai dalam menulis *research notebook* yaitu (1) “*jangan mengandalkan ingatan (memory)*” karena ingatan dapat hilang seiring dengan waktu; (2) mencatat segala hal yang dikerjakan berkenaan dengan kondisi sampel penelitian. Terkait dengan hal tersebut, seorang peneliti harus menjalankan standart yang ditetapkan dalam GLP (*good laboratory practice*). Salah satu ketetapan GLP adalah adanya rekaman tahapan pekerjaan dan hasilnya. *Research notebook* menjadi solusi untuk mendapatkan bukti bila suatu saat terjadi konflik dalam *property rights* (hak kepemilikan). *Laboratory notebook* yang dimiliki oleh laboratorium dalam suatu industri harus mencatat secara detail tentang nomor dan lot pembuatan reagensia, tanggal pembuatan dan nama personalia yang membuat. Setiap halaman dari *labnote* diberi nomer, tanggal yang disertai tandatangan peneliti dan supervisi.

Pencatatan dalam *labnote* tidak diperlukan detail seperti itu, namun paling tidak memenuhi kebutuhan minimum sebagai berikut.

1. Menggunakan *single bound-page notebook*, jangan menggunakan *loose notepaper*.
2. Mencantumkan nama dan tanggal praktikum.
3. Mencatat segala sesuatu yang dikerjakan.
4. Mencatat segala sesuatu yang dipergunakan dalam mengerjakan praktikum (bahan, alat, nama spesimen). Selalu ingatlah bahwa orang lain harus dapat mengulangi apa yang Saudara kerjakan dengan membaca catatan Saudara.
5. Prosedur praktikum yang tercantum dalam buku petunjuk praktikum bisa dipakai sebagai rujukan dengan mencantumkan beberapa perubahan sesuai dengan yang dikerjakan.
6. Mencatat secara rinci seperti jenis larutan, seri pengenceran, dan volume.
7. Data hasil pengamatan dibuat secara sistematis
8. Hasil pengamatan yang berupa foto atau grafik bisa ditempel.
9. Sangat penting untuk menuliskan detail dari setiap pengamatan.

CARA MENYUSUN LAPORAN PRAKTIKUM

Laporan praktikum ditulis sesuai format standart yang ditentukan dan disusun secara terorganisasi (runut, integratif dan komprehensif). Penyusunan laporan praktikum dimaksudkan untuk melatih ketrampilan mahasiswa dalam menjelaskan mengapa praktikum ini dilakukan (**latar belakang**), apa yang dikerjakan (**bahan, alat dan metode**), bagaimana hasilnya (**hasil**), signifikansi dari hasil (**pembahasan**), dan sumber referensi yang membantu peletakan kerangka konsep dan interpretasi data (**daftar pustaka**).

Penyusunan laporan praktikum harus didahului dengan persyaratan sebagai berikut.

1. *Labnote* sudah ditulis detail.
2. Laporan praktikum merupakan *original work*. Meskipun praktikum dilakukan secara kelompok, namun laporan praktikum harus dikerjakan secara individu. Plagiarism akan menyebabkan pengurangan nilai laporan.
3. Laporan praktikum diketik rapi dan diusahakan tidak ada kesalahan pengetikan. Kesalahan dalam pengetikan merupakan indikasi awal adanya ketidaksungguhan dalam bekerja.

Format Laporan Praktikum

- (i) Halaman Judul
- (ii) Abstrak
- (iii) Pendahuluan
 - a. Paparan ringkas dari latar belakang dan kajian teori yang mendasari praktikum, pentingnya praktikum ini dilakukan, dan hipotesis (bila ada).
 - b. Materi untuk menyusun latar belakang dapat diperoleh dari buku, artikel, petunjuk praktikum atau internet (dari situs yang bisa dipercaya (*reliable sites*)). Informasi yang bukan merupakan pengetahuan umum harus disertai dengan referensi yang memadai.
- (iv) Tujuan

Tujuan berisi kalimat pendek untuk menjawab mengapa praktikum ini dikerjakan.
- (v) Metode

Tahapan praktikum ditulis dengan kalimat sendiri dalam bentuk paragraf (tidak *copy-paste* dari petunjuk praktikum).
- (vi) Hasil dan Pembahasan
 - a. Hasil praktikum berupa data yang disajikan sesuai tujuan praktikum.
 - b. Data praktikum dapat berupa gambar, angka, grafik atau tabel yang disertai dengan interpretasi data. "***What you see, what you think you see, and what you think it means***"
 - c. Gambar dan tabel harus diberi nomor dan judul. Judul tabel diletakkan di atas tabel, sedangkan judul gambar diletakkan di bawah gambar. Kolom dan lajur pada tabel diberi nama. Sumbu x dan y pada gambar grafik diberi nama dan unit satuannya.
 - d. Pembahasan hendaknya memberikan kesimpulan umum tentang hasil dari jawaban terhadap pertanyaan yang terdapat dalam latar belakang dan tujuan praktikum. Poin pembahasan bisa meliputi

- i. kajian teori yang menjelaskan data yang diperoleh,
- ii. penjelasan hasil yang tidak diprediksikan atau tidak konsisten
- iii. rujukan studi lain yang sesuai
- iv. menyampaikan pemikiran apa yang akan dikerjakan bila praktikum ini dilanjutkan sampai pada jenjang penelitian.
- v. menyampaikan pemikiran apa (misalnya metode, bahan atau alat) yang akan dirubah bila eksperimen ini dilakukan lagi.

(vii)Daftar Pustaka

- a. Suatu pernyataan yang merupakan suatu pengetahuan umum tidak perlu dicantumkan referensinya (seperti berat molekul, nama spesies, komposisi larutan)
- b. Hati-hati menggunakan informasi yang berasal dari website yang tidak resmi. Website personal tidak valid dipakai sebagai referensi.
- c. Referensi yang tertulis dalam daftar pustaka harus tercantum dalam naskah (contoh: Richard & Pâques, 2000; Pâques dkk., 1998)
- d. Penulisan daftar pustaka mengikuti ketentuan berikut ini.

Journal: Author. Tahun. Judul. Nama Journal volume(issue), halaman.

Contoh: Morehouse, S.I., Tung, R.S., Rodriguez, J.-C., Whiting, J.R. & Jones, V.R. 1993. Statistical evidence for early extinction of reptiles due to the K/T event. *Journal of Paleontology* 17(4), 198-209.

Book: Author. Tahun. Judul. Edition number. Edition series, editor. Issue. Number of volumes. Publisher, city.

Contoh: Billoski, T.V. 1992. Introduction to Paleontology. 2nd ed. Trans. A. Translator. Series on Paleontology, edited by B.T. Jones, 6. 12 vols. Institutional Press, New York.

Book with referred Chapter: Author. Tahun. Judul. In: book editors (Eds), book title, edition pages. Volume. Number of volumes. Publisher, City.

Contoh: Grosjean, F.O. & Schneider, G.A. 1990. Greenhouse hypothesis: Effect on dinosaur extinction. Trans. M.A. Caterino. In: N.R. Smith and E.D. Perrault (Eds), Extinction, 3rd ed., pp. 175-189. Vol. 2. 5 vols. Barnes and Ellis, New York.

Website: Author. Tanggal. Judul halaman atau artikel (web site).

Contoh: Gutkind, J. S. (2000). Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors (<http://www.stke.org>).

(viii) Lampiran.

Menampilkan perhitungan, informasi detail tentang alat yang digunakan, dan jawaban pertanyaan yang diminta pada buku petunjuk praktikum.

TATA TERTIB PRAKTIKUM

SEBELUM PRAKTIKUM

- Setiap praktikan menyiapkan *labnote* (berisi daftar bahan dan alat yang dipakai, prosedur praktikum dalam bentuk *flowchart*, dan tabel untuk data)
- Setiap praktikan menyiapkan tiket masuk yang memuat isi laporan praktikum dengan format sebagai berikut.

COVER LAPORAN PRAKTIKUM berisi

JUDUL PRAKTIKUM

TANGGAL PRAKTIKUM

NAMA DAN NIM PRAKTIKAN

KELOMPOK

LEMBAR PERNYATAAN (ditulis dengan ballpoint dengan menyalin isi berikut)

Yang bertanda tangan di bawah ini
 Nama :
 NIM :
 Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa isi dari laporan yang ditulis berikut ini merupakan murni dari hasil pemikiran saya dan tidak ada unsur *plagiat*.

Malang, tgl-bulan-tahun
 Yang menyatakan,

(tanda tangan)

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Dasar teori (Nilai 15)

1.2. Tujuan (Nilai 2)

BAB II METODE (Nilai 5)

Memuat prosedur kerja yang disusun dalam bentuk paragraf

Laporan tersebut diketik pada kedua sisi (bolak balik) kertas A5, menggunakan font Arial Narrow 10, spasi 1. Laporan bisa disampaikan dalam bentuk *hard copy* atau *soft copy* (sesuai kesepakatan dengan asisten). Laporan dalam bentuk *soft copy* disampaikan dalam USB atau CD dan dikoordinasikan dalam kelompok.

SELAMA DAN SESUDAH PRAKTIKUM

- Perubahan prosedur atau bahan dan alat yang digunakan dicantumkan dalam *labnote*.
- Hasil pengamatan dan atau penghitungan langsung dituliskan atau digambarkan pada *labnote* selama praktikum berlangsung dan harus mendapat persetujuan (acc) dari asisten yang bertugas.

- Setiap kelompok atau mahasiswa wajib mengganti alat yang rusak atau hilang selama dipinjam sebelum ujian akhir praktikum (UAP).

LAPORAN PRAKTIKUM

- Laporan bisa disampaikan dalam bentuk *hard copy* atau *soft copy* (sesuai kesepakatan dengan asisten). Laporan dalam bentuk *soft copy* disampaikan dalam USB atau CD dan dikoordinasikan dalam kelompok.
- Laporan praktikum dibuat dengan melengkapi isi *tiket masuk* (yang telah dibuat sebelumnya) dengan tambahan sebagai berikut

ABSTRAK

(Nilai 10) Diletakkan setelah lembar pernyataan

DAFTAR PUSTAKA

(Nilai 5)

(Minimal 3 referensi berbahasa Inggris terdiri dari 2 referensi dalam bentuk *text book*, 1 referensi dalam bentuk *jurnal*. Bukti pustaka berupa *jurnal* disertakan dalam lampiran yang memuat halaman judul dan *statement* yang diacu)

LAMPIRAN

(Nilai 15)

JAWABAN PERTANYAAN

- Setiap praktikan membuat laporan dan dikumpulkan satu minggu setelah suatu materi praktikum selesai. Hari dan jam pengumpulan ditentukan secara *conditional*.
- Setiap kelompok membuat abstrak laporan dalam bahasa Inggris dan dikumpulkan pada saat praktikum berikutnya kepada asisten penanggung jawab materi.
- Bagi praktikan yang tidak mengumpulkan laporan praktikum secara lengkap sesuai topik, tidak diperkenankan mengikuti ujian akhir praktikum (UAP).
- Bagi praktikan yang diketahui **PLAGIAT** nilai akhir laporan dikurangi 50 poin.
- Keterlambatan pengumpulan laporan diberi toleransi maksimal 3 jam dengan kompensasi pengurangan nilai 10 point setiap jam terlambat. Setelah melewati batas 3 jam, praktikan dianggap tidak membuat laporan.

LAIN-LAIN

- Praktikan yang mendapatkan nilai post-test kurang dari 60 berturut-turut sebanyak dua kali, harus mendapatkan izin dari koordinator praktikum sebagai syarat mengikuti praktikum selanjutnya.

CARA PENILAIAN PRAKTIKUM

Nilai akhir praktikum merupakan gabungan dari nilai test (pre atau post), nilai laporan, nilai keaktifan, nilai ujian akhir praktikum dengan proporsi sebagai berikut :

$$\{ (1 \times \text{test}) + (1 \times \text{nilai keaktifan}) + (1 \times \text{labnote}) + (1,5 \times \text{laporan}) + (2 \times \text{UAP}) \} : 6,5$$

Malang, 17 September 2019
 Koordinator Praktikum Biologi Sel
 Ttd
 Dr. Dra. Sri Widyarti, MSi.

PRAKTIKUM 1 FRAKSINASI DAN ANALISA KOMPONEN SELULER

DASAR TEORI

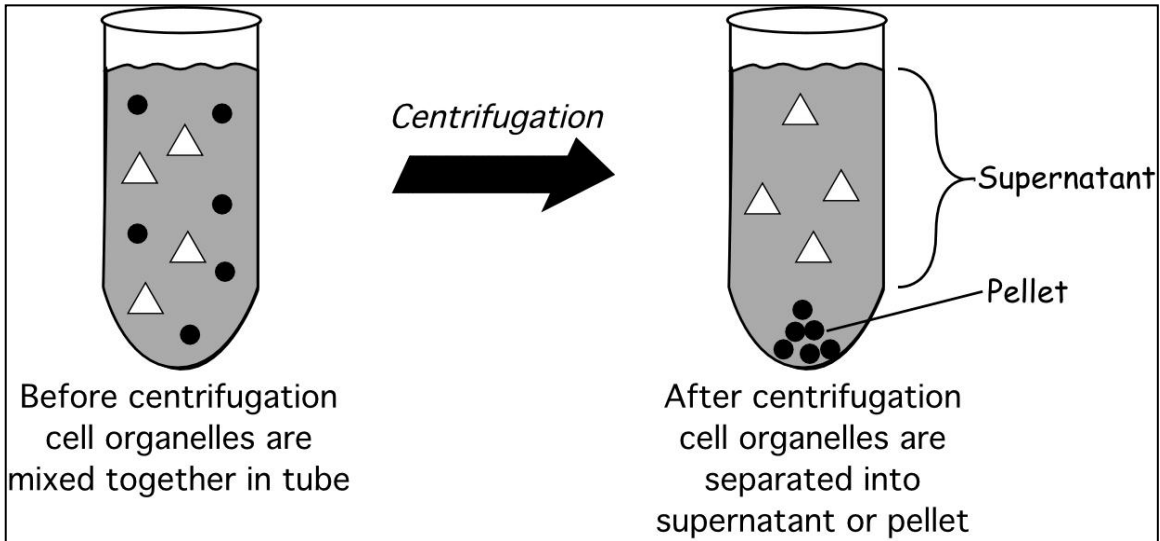
Pengamatan komponen seluler dapat dilakukan melalui dua cara. Cara pertama yaitu dengan membuat preparat basah atau preparat permanen. Untuk preparat basah, irisan jaringan dengan ketebalan kurang dari 10 μm (bisa diwarnai atau tidak diwarnai) langsung ditempelkan pada cover gelas dan diamati menggunakan mikroskop. Untuk preparat permanen, jaringan melalui beberapa proses antara lain yaitu fiksasi, dehidrasi, embedding, pengirisan (memakai mikrotom), *affixing* atau penempelan pada obyek gelas, pewarnaan, mounting atau penutupan cover gelas, kemudian baru diamati menggunakan mikroskop.

Cara kedua pengamatan komponen seluler yaitu dengan fraksionasi sel yang dilakukan melalui dua tahap yaitu: (1) homogenasi (pemisahan sel dari jaringan penyusunnya serta pelepasan organel dari selnya), dan (2) sentrifugasi (pemisahan organel sel berdasarkan ukurannya) yang bisa dilakukan beberapa tahap tergantung kebutuhan.

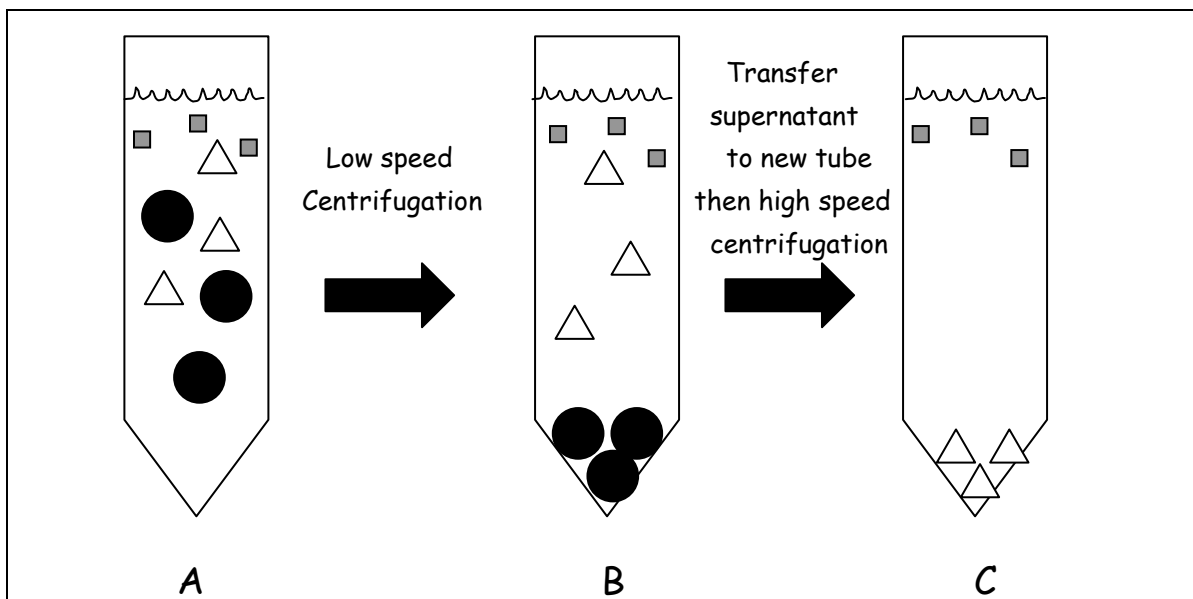
Fraksionasi sel digunakan untuk mempelajari sifat biokimia dan fisiologi organel sel di luar sel. Dasar metode yang digunakan untuk mengisolasi organel dikembangkan pada tahun 1930-an oleh A. Claude, R.R. Bensley dan N.L. Hoerr untuk isolasi mitokondria, dan S. Granick untuk isolasi kloroplas. Prosedur dasar fraksionasi sel dimulai dengan homogenasi untuk menghancurkan membran plasma dan atau dinding sel untuk mengeluarkan sitoplasma; dan kemudian dilanjutkan sentrifugasi untuk memisahkan organel sel. Kemurnian tiap fraksi dikonfirmasi menggunakan mikroskop atau menggunakan marker biokimia.

Sebelum dilakukan fraksinasi sel, jaringan harus dipotong atau dicacah menjadi potongan-potongan kecil dan dilakukan dalam larutan bufer isotonik. Untuk mempertahankan integritas organel sel dan viabilitas enzim, prosedur fraksinasi dilakukan dalam kondisi dingin (maksimal suhu 10° C). Suspensi sel hasil homogenasi dinamakan homogenat. Untuk jaringan tertentu, homogenasi dilakukan menggunakan mortar dan pestle dengan bantuan pasir kuarsa. Sesudah homogenasi, komponen sel bisa dipisahkan berdasarkan ukuran, bentuk, sifat kimia atau densitasnya menggunakan sentrifus.

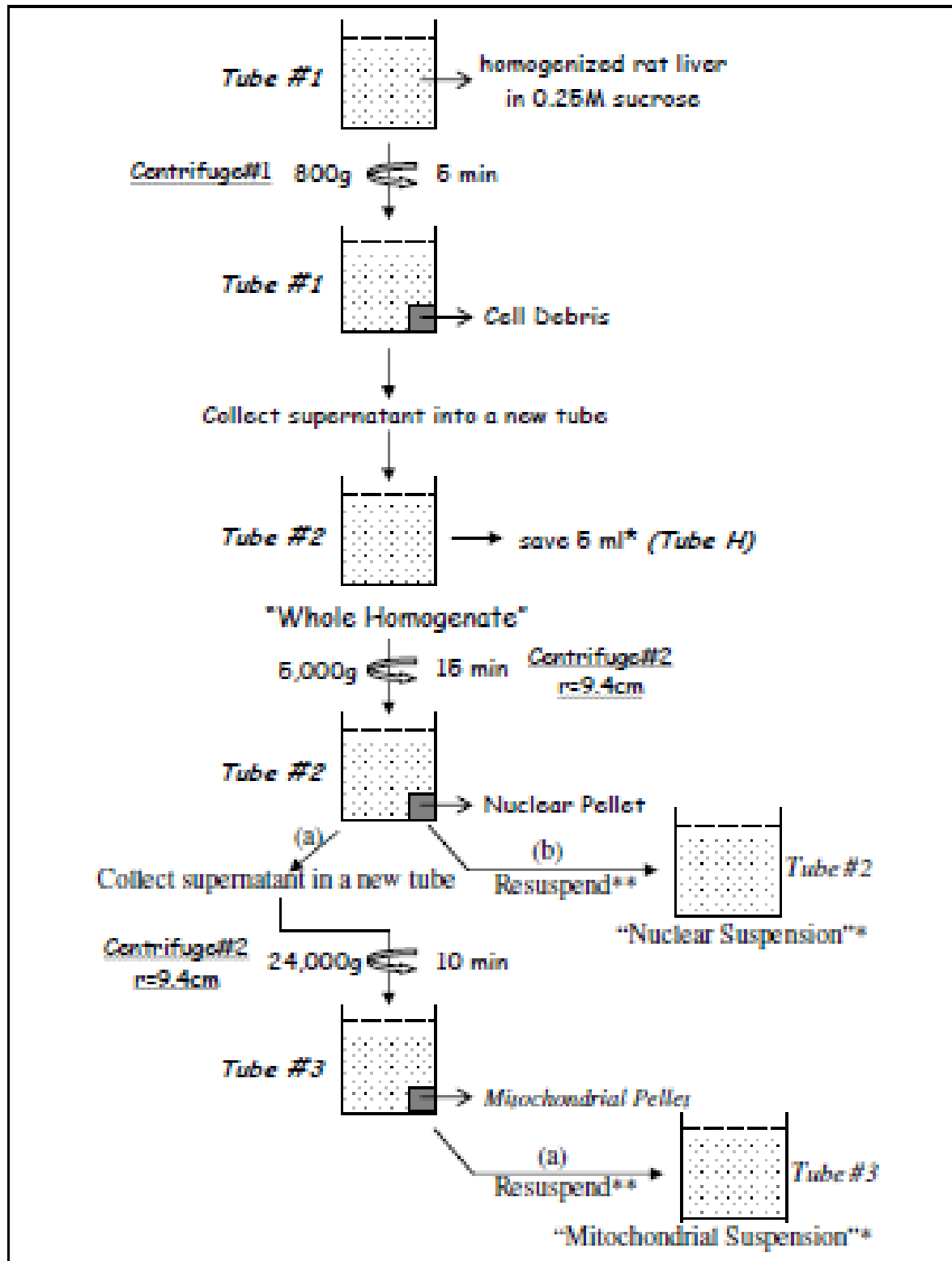
Dalam praktikum ini, homogenat disentrifugasi menggunakan teknik ***differential centrifugation***. Organel atau partikel yang mempunyai densitas lebih besar daripada buffer sentrifugasi, dan partikel yang mempunyai ukuran dan bentuk yang lebih besar akan bergerak ke dasar tabung sentrifus pada kecepatan yang berbeda bila ditempatkan pada gaya sentrifugal. Partikel dengan densitas lebih besar akan mengendap lebih cepat daripada partikel yang lebih kecil. Tahap pertama *differential centrifugation* memisahkan homogenat dengan debris sel, sehingga belum menghasilkan organel yang spesifik (Gambar 1). Tahap kedua sentrifugasi dilakukan pada kecepatan yang lebih tinggi dan durasi sentrifugasi yang lebih lama (Gambar 2 dan Gambar 3).



Gambar 1. Tahap pertama *differential centrifugation*. Sesudah sentrifugasi organel sel terpisah ke dalam dua zona yaitu supernatan dan pelet tergantung dari masanya.



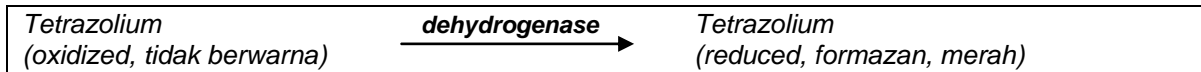
Gambar 2. Diagram *differential centrifugation*.



Gambar 3. Tahapan fraksinasi sel Menggunakan *differential centrifugation*

Analisa komponen seluler pada praktikum ini dilakukan pada mitokondria menggunakan tetrazolium chloride (TTC) untuk mendeteksi adanya aktivitas enzim

dehidrogenase (diperankan oleh coenzim NADH) yang dihasilkan mitokondria. Enzim ini bekerja dengan mengambil ion hidrogen dan elektron (proton). Mitokondria dalam suspensi akan menghasilkan ion hidrogen dan elektron (proton) yang akan bereaksi dengan TTC, sehingga TTC berubah bentuk dari teroksidasi (tidak berwarna) menjadi tereduksi (membentuk formazan berwarna merah).



TUJUAN

1. Memisahkan komponen seluler tumbuhan berdasarkan ukurannya dengan sentrifugasi.
2. Menganalisa keberadaan mitokondria menggunakan TTC
3. Mengenalkan teknik sentrifugasi sebagai salah satu teknik mempelajari sel

BAHAN

- biji *Pisum sativum* (sudah direndam semalam dalam sucrose 0,25 M dingin)
- 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride atau tetrazolium chloride (TTC) 0,05 - 1 % (dibuat dalam 0,05 M potassium phosphate bufer pH 7,4)
- bufer sukrosa (0,25 M) dingin (dibuat dalam 0,05 M potassium phosphate bufer pH 7,4)
- IKI (iodin)

ALAT

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - tabung sentrifus 15 ml - kain kasa (<i>cheesecloth</i>) - obyek + cover gelas - rak tabung reaksi - <i>iced bath</i> - gelas beaker 250 ml - karet gelang | <ul style="list-style-type: none"> - <i>refrigerated centrifuge</i> - blender - tabung reaksi - <i>water bath 37⁰ C</i> - mikroskop cahaya biasa - obyek dan cover gelas - parafilm |
|---|---|

PROSEDUR

1. Homogenasi
 - a. Biji *Pisum sativum* (kering) sebanyak 5 g direndam semalam dalam 25 ml bufer sukrosa dingin.
 - b. Kemudian diblender selama 2-3 menit dalam kondisi dingin. Proses ini dinamakan homogenasi. Hasilnya dinamakan homogenat (H).
2. Filtrasi
 - a. Siapkan 3-4 lembar kain kasa di atas beaker gelas, kemudian ikat dengan karet gelang. Letakkan beker gelas ke dalam *ice-water bath*.
 - b. Tuang homogenat di atas kanin kasa. Sisa homogenat yang tertinggal di kain kasa dinamakan residu (R). Cairan yang dihasilkan dari prosedur filtrasi ini dinamakan filtrat (F). Peras sisa air dalam residu menggunakan kain kasa. Residu disimpan untuk analisa selanjutnya.

3. Sentrifugasi

- a. Aduk filtrat di dalam beker gelas kemudian tuang ke tabung sentrifus sampai skala 10 ml, sentrifus pada kecepatan 200 g selama 3 menit pada suhu 4° C.
- b. Hasil sentrifugasi berupa padatan yang berada di dasar tabung sentrifus dinamakan pelet (P1), sedangkan yang berupa cairan dinamakan supernatan (S1). Pindahkan atau tuang S1 ke dalam tabung sentrifus baru (hati-hati jangan sampai P1 ikut tertuang). P1 disimpan untuk analisa selanjutnya.
- c. Sentrifus S1 pada kecepatan 1.400 g selama 12 menit pada 4° C.
- d. Pelet (P2) yang diperoleh diperkirakan mengandung nukleus dan kloroplas. Supernatan (S2) diperkirakan mengandung mitokondria, ribosom dan partikel subseluler lainnya yang berukuran sangat kecil. Keberadaan mitokondria akan dibuktikan pada eksperimen selanjutnya.

4. Pengujian aktivitas mitokondria pada S2

- a. Pindahkan atau tuang S2 ke dalam tabung reaksi, letakkan dalam *ice bath*.
- b. Resuspensi P2 dengan menambahkan 3 ml bufer sukrosa, pipeting pelan-pelan untuk membentuk suspensi P2, letakkan dalam *ice bath*.
- c. Siapkan tiga tabung reaksi dan tandai dengan label A, B dan C. Masukkan 3 ml bufer sukrosa ke dalam tabung A, 3 ml S2 ke dalam tabung B, dan 3 ml suspensi P2 ke dalam tabung C.
- d. Masing-masing tabung ditambahkan 2 ml tetrazolium, kemudian tutup dengan parafilm, homogenkan dengan cara *inverting*, inkubasi ke dalam *water bath* 37° C selama 30 menit – semalam (12 jam).

	A	B	C
Bufer Sukrosa	3 ml	-	-
TTC 1%	2 ml	2 ml	2 ml
S2	-	3 ml	-
Suspensi P2	-	-	3 ml
Total	5 ml	5 ml	5 ml
Hasil

- e. Amati dan catat warna yang terbentuk pada masing-masing tabung pada lembar pengamatan.

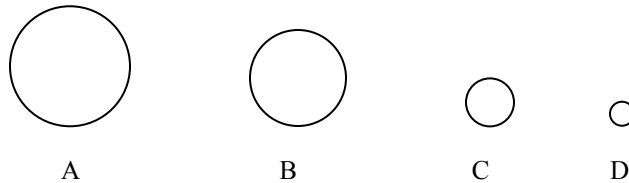
5. Pengamatan komponen sel hasil fraksinasi menggunakan mikroskop

- a. Ambil sedikit R1 menggunakan tusuk gigi, letakkan pada cover gelas, tetesi dengan air, kemudian aduk dengan tusuk gigi, tutup dengan cover gelas, amati di bawah mikroskop perbesaran 10x dan 400x. Apakah yang Saudara dapat amati di bawah mikroskop.
- b. Teteskan 1 tetes IKI pada ujung cover gelas, dan biarkan IKI mewarnai fragmen pada R1 sampai terbentuk warna biru gelap. amati di bawah mikroskop perbesaran 10x dan 400x. Apakah yang Saudara dapat amati di bawah mikroskop.

- c. Lakukan prosedur 5a - 5b di atas pada suspensi P1 dan P2. Penambahan IKI dilakukan secara langsung pada suspensi P1 dan P2 sebelum ditutup cover gelas. Apakah yang Saudara dapat amati di bawah mikroskop.

PERTANYAAN

1. Prosedur fraksinasi pada praktikum ini menggunakan blender untuk mendapatkan komponen seluler. Mengapa tidak digunakan teknik osmosis ?
2. Mengapa sel tanaman lebih sulit dihancurkan (*disrupt*) dibandingkan sel hewan ? Apa tujuan sentrifugasi ?
3. Setelah *differential centrifugation*, organel tersebar pada supernatan dan pelet. Jelaskan mengapa hal tersebut terjadi.
4. Pemakaian *differential centrifugation* untuk pemisahan komponen seluler dilakukan melalui beberapa tahapan sentrifugasi. Apa perbedaan antara sentrifugasi yang pertama dengan sentrifugasi yang kedua dan ketiga ?
5. Lingkaran berikut mewakili organel A, B, C dan D yang mempunyai ukuran berbeda.



Saudara adalah peneliti yang tertarik untuk mendapatkan organel C menggunakan *differential centrifugation*. Pada sentrifus pertama, Saudara akan mendapatkan organel pada pelet. Supernatan yang diperoleh kemudian dilakukan sentrifugasi kedua dengan kecepatan lebih tinggi. Saudara akan mendapatkan organel pada pelet, sedangkan organel dalam supernatan.

6. Pengamatan mitokondria dilakukan secara kimiawi menggunakan yang bekerja dengan cara Mengapa pengamatan mitokondria pada praktikum ini tidak menggunakan mikroskop ?

PRAKTIKUM 2

SOLUBILITAS LIPID PADA MEMBRAN

DASAR TEORI

Membran plasma sebagai membran lipid mempunyai fungsi vital antara lain sebagai pemisah sel dari lingkungannya. Dengan adanya membran plasma, maka kandungan sitoplasma dapat dipertahankan pada tempatnya. Sebagai pengatur keluar masuknya nutrisi, membran fosfolipid hanya dapat dilewati oleh molekul tertentu berukuran kecil dan bersifat **non**polar. Kecepatan masuknya molekul tersebut ditentukan antara lain oleh sifat hidrofobisitas, konsentrasi, dan berat molekul pelarut.

Tingkat hidrofobisitas suatu pelarut ditentukan berdasarkan nilai koefisien partisi (*partition coefficient* atau *distribution coefficient*). Nilai koefisien partisi suatu obat, misalnya, dapat dipakai untuk memperkirakan distribusinya dalam tubuh. Obat dengan nilai koefisien partisi tinggi lebih mudah masuk atau menembus kompartemen yang dibatasi oleh membran fosfolipid. Sedangkan, obat yang bersifat hidrofilik mempunyai nilai koefisien partisi rendah akan bersirkulasi pada kompartemen hidrofilik seperti serum darah.

Pada praktikum ini digunakan model membran plasma dari tonoplas, yaitu vakuola besar pada tanaman. *Beet root* tersusun dari sel-sel yang mengandung pigmen betacyanin pada vakuolanya. Kerusakan yang terjadi pada membran tonoplas dan membran plasma akan menyebabkan betacyanin ke luar sel. Fenomena ini bisa diamati menggunakan spektrofotometer atau mikroskop.

TUJUAN

1. Membuktikan **sifat** membran plasma
2. Menentukan laju penetrasi berbagai pelarut organik

BAHAN

Beet root segar; pelarut organik: 22 M methanol, 8.5 M ethanol, 3 M n-propanol dan 1.1 M n-Butanol; aquades

ALAT

Cutter, pipet tetes, obyek dan cover gelas, pencatat waktu, mikroskop cahaya biasa, portable mikrotom, *cork bor*.

PROSEDUR

1. *Beet root* dilubangi menggunakan *cork bor* untuk mendapatkan potongan silinder dengan diameter yang seragam. Kemudian potongan tersebut diiris tipis menggunakan portable mikrotom dengan ketebalan 3 μm . Masukkan irisan tersebut ke dalam beker gelas yang berisi aquades untuk membilas pigmen yang keluar. Masing-masing irisan dibagi menjadi 4 bagian sama besar.
2. Seperempat irisan yang didapat diletakkan pada obyek gelas, dan ditutup dengan cover gelas, diamati pada perbesaran lemah (x5 atau x10). Keberadaan pigmen

- diamati lokasinya di dalam jaringan. Area di luar jaringan tampak jernih. Hal ini menandakan bahwa pigmen masih “terkunci” di dalam tonoplast.
- Sambil mengamati potongan *beet root* menggunakan mikroskop, pada tepi cover gelas tetesi dengan pelarut organik sampai potongan sampel terendam tetapi larutan tidak sampai tumpah. Area di sekitar jaringan diamati perlahan-lahan akan berwarna merah, sedangkan sel dalam jaringan perlahan-lahan menjadi jernih. Hal ini menandakan bahwa pigmen keluar dari tonoplast.
 - Prosedur 2 dan 3 diulangi untuk seperempat potongan yang lain. Pencatatan waktu dimulai segera pada saat pelarut organik menyentuh jaringan. Pencatatan waktu dihentikan segera setelah ada warna merah di luar jaringan (tidak perlu menunggu seluruh pigmen keluar dari sel). Catat waktu tersebut (dalam satuan menit) dalam tabel pengamatan.
 - Prosedur 1, 2, 3 dan 4 diulangi dengan pelarut yang diencerkan $\frac{1}{2}$ dan $\frac{1}{4}$ kali.
 - Tuliskan data Saudara pada tabel pengamatan seperti contoh pada Tabel 1. Hitung kecepatan atau laju penetrasi pelarut organik yaitu dengan membagi waktu (prosedur nomor 4) dengan konsentrasi pelarut (dalam molar).
 - Plot laju penetrasi (sumbu X) setiap pelarut organik terhadap konsentrasi pelarut (sumbu Y).
 - Plot laju penetrasi tersebut terhadap koefisien **partisi** (atau *relative miscibility*).

Tabel 1. Tabel Pengamatan Koefisien Penetrasi

Pelarut Organik	Pengenceran	Konsentrasi	Durasi melewati membran (detik)		Laju Penetrasi (konsentrasi /detik)
			Ulangan ke	Rerata	
Methanol	Stok Awal	22 M	1		
			2		
			3		
	$\frac{1}{2}$ x	11 M	1		
			2		
			3		
	$\frac{1}{4}$ x	5.5 M	1		
			2		
			3		
Ethanol	Stok Awal	8.5 M	1		
			2		
			3		
	$\frac{1}{2}$ x	4.25 M	1		
			2		
			3		
	$\frac{1}{4}$ x	2.13 M	1		
			2		
			3		

Pelarut Organik	Pengenceran	Konsentrasi	Durasi melewati membran (detik)		Laju Penetrasi (konsentrasi /detik)
			Ulangan ke	Rerata	
n-Propanol	Stok Awal	3 M	1		
			2		
			3		
	½ x	1.5 M	1		
			2		
			3		
	¼ x	0.75 M	1		
			2		
			3		

 Tabel 2. Koefisien Partisi (*Partition coefficient*) berbagai pelarut organik

Pelarut organik	Rumus	Berat molekul	<i>Partition coefficient</i>
Methanol	CH ₃ OH	32,04	0,01
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	46,07	0,03
n-propanol	C ₃ H ₇ OH	60,09	0,13

PERTANYAAN

1. Dikaitkan dengan hasil percobaan di atas, jelaskan bagaimana peran membran plasma.
2. Jelaskan bagaimana mekanisme methanol, ethanol dan propanol terhadap kerusakan membran sel ?
3. Jelaskan apa yang terjadi bila membran plasma mengalami kerusakan karena dedahan bahan toksik secara terus menerus ?

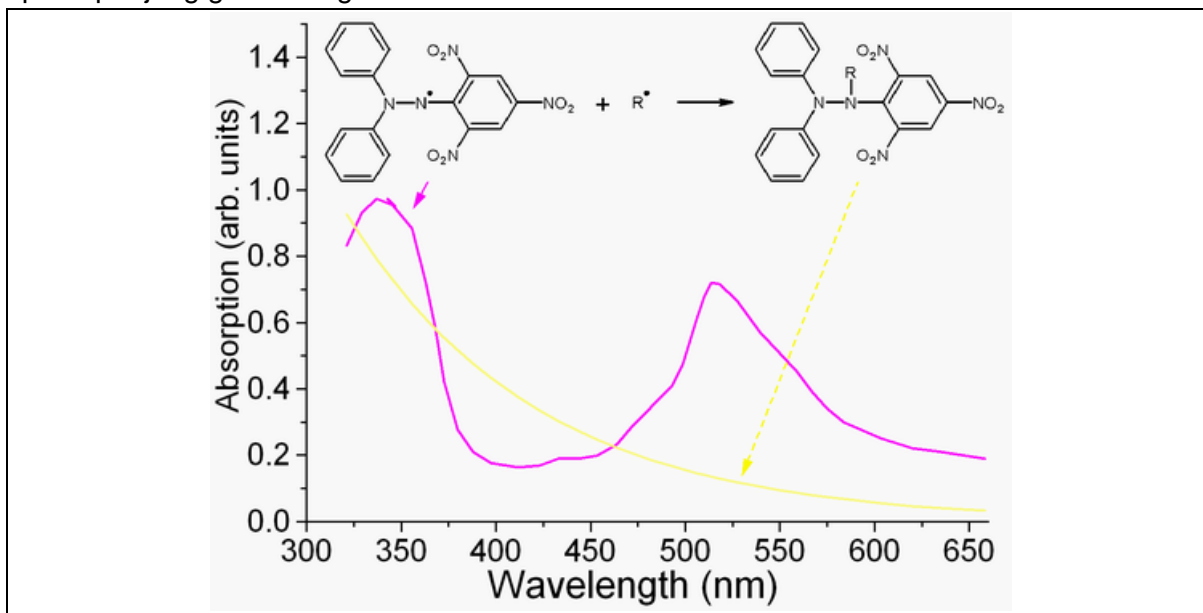
PRAKTIKUM 3

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN DPPH

DASAR TEORI

Antioksidan merupakan senyawa kompleks atau tunggal yang mempunyai kemampuan menghambat reaksi berantai peroksidasi lipid atau menghambat pembentukan radikal bebas. Penghambatan reaksi berantai radikal bebas dapat diminimalkan dengan pemberian atom hidrogen. Senyawa aktif polifenol dari tanaman mempunyai kemampuan sebagai antioksidan, sehingga banyak dipakai dimanfaatkan untuk menurunkan radikal bebas dalam tubuh.

DPPH atau di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium merupakan radikal bebas stabil. Larutan DPPH dalam bentuk radikal berwarna ungu-kemerahan (lembayung atau *deep purple*) dengan panjang gelombang maksimal 517-520 nm. Dalam kondisi tereduksi oleh antioksidan atau molekul reduktor lain, DPPH menjadi tidak berwarna atau kuning muda. Kekuatan antioksidan suatu senyawa atau bahan aktif ditentukan oleh kemampuannya untuk menarik atau mengambil elektron dari DPPH (DPPH menjadi tereduksi). Semakin banyak elektron yang hilang, absorbansi DPPH semakin rendah pada panjang gelombang 517-520 nm.



Gambar 5. Panjang Gelombang Maksimal DPPH radikal dan tereduksi

TUJUAN

1. Membandingkan kemampuan antioksidan suatu senyawa menggunakan uji DPPH dengan menghitung nilai IC_{50} .
2. Mengenalkan teknik untuk membuktikan adanya perpindahan elektron antar molekul

BAHAN

- larutan DPPH
- ascorbic acid 1.5 mM
- kafein 3 mM
- aspirin 2 mM

ALAT

Tabung reaksi, kuvet, mikropipet, spektrofotometer

PROSEDUR

1. Buatlah rangkaian tabung reaksi seperti tabel berikut ini untuk setiap sampel uji.

No Tabung	Vol. Sampel Uji (µL)	Konsentrasi Sampel Uji (mM)	Vol. Pelarut Sampel Uji (µL)	Vol DPPH (µL)	Absorbansi	% scavenging
1	0		100	1000		
2	30		70	1000		
3	60		40	1000		
4	100		0	1000		

2. Tabung diinkubasi selama 30 menit pada kondisi gelap
4. Dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 520 nm menggunakan spektrofotometer.
5. Persentase scavenging sampel uji di setiap tabung dihitung menggunakan rumus berikut

$$\% \text{ scavenging} = \left\{ \frac{(A_{\text{kontrol neg}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{kontrol neg}}} \right\} \times 100\%$$

6. Lakukan prosedur No 1 – 5 untuk setiap sampel uji dengan pengulangan sebanyak tiga kali.
7. Pada setiap sampel uji buatlah grafik dengan memplotkan konsentrasi sampel uji pada sumbu X dan % scavenging pada sumbu Y. Carilah rumus regresinya. Dari rumus regresi tersebut, tentukan IC₅₀ masing-masing sampel uji yaitu konsentrasi bahan uji yang mempunyai kemampuan scavenging 50%. Nilai IC₅₀ ini dinamakan kemampuan antioksidan.
8. Buatlah grafik batang yang membandingkan IC₅₀ semua bahan uji. Satuan dari nilai IC₅₀ berupa konsentrasi bahan uji. IC₅₀ lebih rendah mempunyai kemampuan antioksidan lebih tinggi. Manakah bahan uji yang mempunyai kemampuan antioksidan paling tinggi.
9. Berikan suatu kesimpulan, sampel uji manakah yang mempunyai kemampuan antioksidan lebih tinggi.

PRAKTIKUM 4 INTERAKSI PROTEIN-LIGAN

DASAR TEORI

Proses utama yang terjadi dalam sel pada hakekatnya merupakan reaksi biokimia yang dinamik dengan melibatkan interaksi antar molekul. Sebagai contoh interaksi antara hormon dengan reseptor spesifiknya, enzim dengan substrat spesifiknya, antigen dengan antibodi, serta obat dengan plasma protein darah sebagai *carrier*-nya. Interaksi tersebut melibatkan ligan (L) yaitu molekul kecil yang terikat pada makromolekul (M) untuk membentuk kompleks LM. Interaksi L dan M terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu (1) Interaksi terbentuk karena adanya ikatan nonkovalen dan ikatan lemah seperti ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, gaya van der Waals, dan gaya elektrostatik, dan (2) Ikatan antar molekul yang berinteraksi sangat dekat, selektif, spesifik dan kompatibel.

Afinitas pengikatan antara L dan M dinyatakan sebagai konstanta pembentukan atau K_f yaitu perbandingan antara $[LM]$ dengan $[L]$ dikalikan $[M]$. Ada berbagai teknik pengukuran dinamika interaksi ligan-makromolekul, yaitu dialisis equilibrium, metode diferensial yaitu dengan mengukur absorbansi atau fluoresen. Praktikum ini digunakan metode diferensial spektrum absorbansi menggunakan Coomassie Blue. Pada metode ini, Coomassie Blue (CBB) berfungsi sebagai ligan yang mengikat dan mewarnai protein. Dalam kondisi tidak terikat protein, CBB mempunyai absorbansi maksimal antara 575-625 nm. Ketika CBB terikat pada protein akan terbentuk kompleks LM dengan absorbansi maksimal 596 nm. Peningkatan konsentrasi pada absorbansi 596 nm berkorelasi dengan konsentrasi protein. Perubahan absorbansi ini disebabkan karena kompleks LM yang terbentuk. Makromolekul protein yang dalam praktikum ini yaitu ovalbumin.

TUJUAN

Mempelajari dinamika pengikatan CBB sebagai ligan pada ovalbumin sebagai makromolekul untuk mendapatkan pemahaman tentang sifat fisikokimiawi interaksi ligan-makromolekul.

BAHAN

Larutan Ovalbumin (20 mg/ml) dalam aquadest; Coomassie Brilliant Blue G-250 dan pelarutnya, *plastic wrap*

ALAT

Mikropipet dan tip, cuvet 3 ml berbahan dasar gelas, Spektrofotometer UV-Vis, tabung reaksi

PROSEDUR

1. Spektrofotometer dinyalakan, kemudian set pada panjang gelombang 596 nm.
2. Siapkan larutan seperti yang tertera pada tabel di bawah ini untuk mengukur absorbansi. Semua reagen disiapkan dalam suhu ruang. Siapkan setiap larutan dalam tabung reaksi yang sudah diberi label nomor.

Reagen	Tabung Reaksi No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CBB G-250 (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Larutan Ovalbumin 20 mg/ml (ml)	0	0.025	0.05	0.10	0.20	0.40	0.60	0.80	1.0
Aquadest (ml)	1.0	0.975	0.95	0.90	0.80	0.60	0.40	0.20	0.0
Volume Total (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3	3

3. Tutup tabung reaksi menggunakan *plastic wrap*, kemudian tabung dibolak-balik beberapa kali dengan hati-hati jangan sampai terbentuk busa. *Busa akan menyebabkan protein terdenaturasi.*
4. Inkubasi semua tabung pada suhu ruang selama 15 menit
5. Untuk pengukuran pada spektrofotometer, tuang larutan pada tabung reaksi ke cuvet sebagai kontrol negatif (tidak diisi sampel)

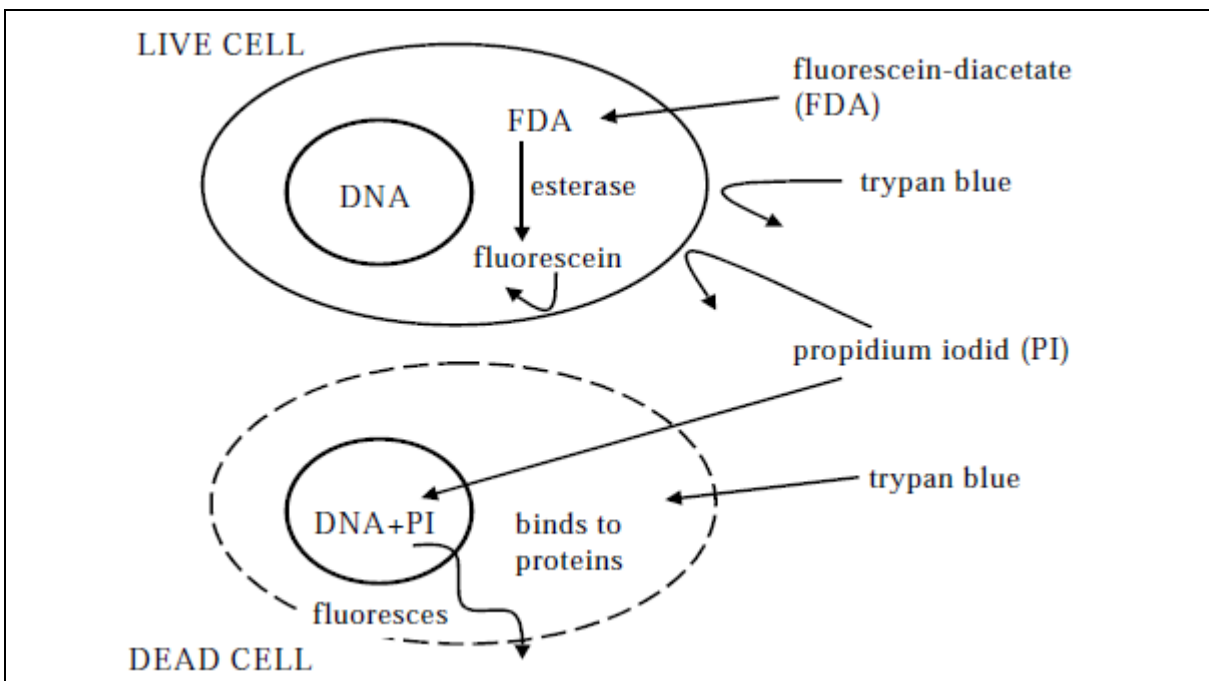
PRAKTIKUM 5
EFEK PERLAKUAN FISIOKIMIA PADA *CELL DEATH*

DASAR TEORI

Living system dalam sel merupakan suatu kesimbangan dinamik dengan lingkungannya. Sel mempunyai sistem regulasi untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungannya. Namun demikian, bila stres lingkungan melebihi ambang batas kemampuan regulasi sel, maka akan menyebabkan *cell injury* yang berdampak pada gangguan metabolisme atau kerusakan membran. Gangguan metabolisme mengakibatkan penurunan produksi ATP, sehingga *ATP-dependent activity* terganggu. *Cell injury* bisa bersifat reversibel atau irreversibel. Bila kerusakan membran plasma bisa diperbaiki maka *cell injury* bisa reversibel. Bila kerusakan terjadi pada protein dan lipid serta produksi ATP rendah dalam waktu lama, maka *cell injury* bersifat irreversibel dan menyebabkan kematian sel (*cell death*).

Terdapat berbagai teknik untuk menentukan atau menganalisa kematian sel, antara lain deteksi melalui pewarnaan (*staining*) yang berbasiskan permeabilitas membran dan berbasiskan aktivitas mitokondria. Metode staining tersebut (Gambar 6) menggunakan PI (propidium iodide), EtBr (ethidium bromide), trypan blue, FDA (fluorescein-diacetate), dan *radioactive chrome* (⁵¹Cr).

Praktikum ini menggunakan metode tryphan blue untuk menentukan *cell death*., sedangkan suhu dan dedahan bahan kimia dipakai sebagai stimulus *cell injury*.



Gambar 6. Mekanisme Penentuan Kematian Sel menggunakan basis permeabilitas membran

TUJUAN

1. Mengamati efek stres fisikokimia pada kematian sel
2. Mengenalkan teknik untuk menentukan kematian sel

BAHAN

Suspensi sel, sodium azide 0.5 %, PBS, air desilasi

ALAT

Refrigerated centrifuge, mikropipet, mikroskop bidang terang, obyek gelas, cover gelas, tabung Eppendorf, counter

PROSEDUR

1. Suspensi sel disentrifugasi pada kecepatan 400 g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Pelet diresuspensi dengan PBS.
2. Siapkan 4 tabung Eppendorf dan beri label 1, 2, 3 dan 4.
3. Setiap tabung Eppendorf diisi dengan 1 ml suspensi sel (dengan konsentrasi sel 10^7 sel/ml)
 - Tabung 1** : (sebagai **kontrol**) diinkubasi dalam *water bath* suhu 37 °C selama 40 menit.
 - Tabung 2** : suspensi ditambah ditambah **sodium azide (NaN₃) 0.5 %** kemudian diinkubasi dalam *water bath* suhu 37 °C selama 40 menit.
 - Tabung 3** : suspensi sel dimasukkan ke dalam **freezer** selama 20 menit, kemudian diinkubasi dalam *water bath* suhu 37 °C selama 40 menit.
 - Tabung 4** : suspensi ditambah 0.5 ml **air destilasi** kemudian diinkubasi dalam *water bath* suhu 37 °C selama 40 menit.
4. Setelah perlakuan, rendam Eppendorf dalam *ice bath*.
5. Setiap tabung Eppendorf ditambahkan 1.5 ml trypan blue 0.4 %.
6. Ambil 0.5 ml suspensi dan teteskan pada obyek gelas dan tutup dengan cover gelas, kemudian amati di bawah mikroskop (perbesaran x100) dan hitung jumlah sel dengan trypan blue positive (sel mati) dan trypan blue negatif (sel hidup) untuk setiap 50 sel.
7. Catat penghitungan Saudara pada Tabel seperti contoh berikut.

No Tabung	Perlakuan	Ulangan	Jumlah sel			
			Trypan blue (+)	Rerata	Trypan blue (-)	Rerata
1	Kontrol	1				
		2				
		3				
2	Sodium azide	1				
		2				
		3				
3	Suhu	1				
		2				
		3				
4	Air destilasi	1				
		2				
		3				

TECH TIP # 40



Convert between times gravity (×g) and centrifuge rotor speed (RPM)

TR0040.1

Introduction

Certain procedures necessitate precise centrifugation conditions, which must be specified in terms of relative centrifugal force (RCF) expressed in units of gravity (times gravity or ×g). Many microcentrifuges only have settings for speed (revolutions per minute, RPM), not relative centrifugal force. Consequently, a formula for conversion is required to ensure that the appropriate setting is used in an experiment. The relationship between RPM and RCF is as follows:

$$g = (1.118 \times 10^{-5}) R \cdot S^2$$

Where *g* is the relative centrifugal force, *R* is the radius of the rotor in centimeters, and *S* is the speed of the centrifuge in revolutions per minute. Values of RCF in units of times gravity (×g) for common microcentrifuge rotor radii appear in the following conversion table. As an example, centrifugation of a sample at 5,000 RPM in a microcentrifuge that has a rotor with a radius of 7 cm will deliver a centrifugal force of 1,957 ×g.

Centrifugation speed and time often are not critical factors in routine sample-handling procedures involving a benchtop microcentrifuge. Usually, as long as speed and time are sufficient to ensure that cells, debris or resin are pelleted effectively, it does not matter if the speed is faster or the time longer than necessary. For this reason, many protocols do not specify a particular centrifugal force to be applied but instead indicate some general guideline such as “centrifuge at high speed for 1 minute.”

Conversion Table

Speed (RPM)	Rotor Radius (from center of rotor to sample) in centimeters														
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1000	45	56	67	78	89	101	112	123	134	145	157	168	180	192	204
1500	101	126	151	176	201	226	252	277	302	327	352	377	402	427	452
2000	179	224	268	313	358	402	447	492	537	581	626	671	716	761	806
2500	280	349	419	489	559	629	699	769	839	908	978	1048	1118	1188	1258
3000	402	503	604	704	805	906	1006	1107	1207	1308	1409	1509	1610	1710	1811
3500	548	685	822	959	1096	1233	1370	1507	1643	1780	1917	2054	2191	2328	2465
4000	716	894	1073	1252	1431	1610	1789	1968	2147	2326	2504	2683	2862	3041	3220
4500	906	1132	1358	1585	1811	2038	2264	2490	2717	2943	3170	3396	3623	3850	4076
5000	1118	1398	1677	1957	2236	2516	2795	3075	3354	3634	3913	4193	4472	4752	5031
5500	1353	1691	2029	2367	2706	3044	3382	3720	4058	4397	4735	5073	5411	5750	6088
6000	1610	2012	2415	2817	3220	3622	4025	4427	4830	5232	5635	6037	6440	6842	7245
6500	1889	2362	2834	3306	3779	4251	4724	5196	5668	6141	6613	7085	7558	8030	8503
7000	2191	2739	3287	3835	4383	4930	5478	6026	6574	7122	7669	8217	8765	9313	9861
7500	2516	3144	3773	4402	5031	5660	6289	6918	7547	8175	8804	9433	10062	10691	11320
8000	2862	3578	4293	5009	5724	6440	7155	7871	8586	9302	10017	10733	11448	12163	12878
8500	3231	4039	4847	5654	6462	7270	8078	8885	9693	10501	11309	12116	12924	13732	14540
9000	3622	4528	5433	6339	7245	8150	9056	9961	10867	11773	12678	13584	14489	15395	16300
9500	4036	5045	6054	7063	8072	9081	10090	11099	12108	13117	14126	15135	16144	17153	18162
10000	4472	5590	6708	7826	8944	10062	11180	12298	13416	14534	15652	16770	17888	19006	20124
10500	4930	6163	7396	8628	9861	11093	12326	13559	14791	16024	17256	18489	19722	20954	22187
11000	5411	6764	8117	9469	10822	12175	13528	14881	16233	17586	18939	20292	21645	22998	24351
11500	5914	7393	8871	10350	11828	13307	14786	16264	17743	19221	20700	22178	23657	25135	26614
12000	6440	8050	9660	11269	12879	14489	16099	17709	19319	20929	22539	24149	25759	27369	28979
13000	7558	9447	11337	13226	15115	17005	18894	20784	22673	24562	26452	28341	30231	32120	34010
13500	8150	10188	12225	14263	16300	18338	20376	22413	24451	26488	28526	30563	32601	34639	36677
14000	8765	10996	13148	15339	17530	19722	21913	24104	26295	28487	30678	32869	35060	37251	39442

Current versions of product instructions are available at www.thermo.com/plence. For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.
 © 2009 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Unless otherwise indicated, all trademarks are property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Printed in the USA.