

Perbandingan Metoda Pewarnaan Elektroforesis Dengan Menggunakan Gel Red (*Pre-Cast, Direct-Staining dan Post-Staining*)

Salsa Novela Azalia¹⁾, Afifatul Achyar¹⁾, Ira Wahyuni²⁾

¹⁾Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang

²⁾Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas

Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Barat, Kecamatan Padang Utara, Kota Padang

Email: salsanvla18@gmail.com

ABSTRAK

Metode pemisahan molekul berdasarkan panjang maupun besar molekul dengan arus listrik disebut dengan elektroforesis. Prinsip dasar elektroforesis adalah pergerakan molekul bermuatan atau ion melalui medium semi solid di bawah pengaruh suatu medan listrik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metoda pewarnaan elektroforesis yang terbaik dalam menggunakan GelRed dalam pewarnaannya. Metode yang dilakukan adalah membandingkan metoda *Pre-Cast, Direct-Staining dan Post-Staining*. Hasil yang didapatkan pada penelitian ini adalah metode yang menghasilkan pita DNA yang jelas yaitu metode *direct-staining*.

Kata kunci : Elektroforesis, *Pre-Cast, Direct-Staining, Post-Staining*

PENDAHULUAN

Metode pemisahan molekul berdasarkan panjang maupun besar molekul dengan arus listrik disebut dengan elektroforesis. Di dalam dunia biologi molekuler, elektroforesis digunakan untuk memisahkan molekul DNA, RNA, maupun protein. Pemisahan DNA diakibatkan adanya gugus fosfat yang mengandung muatan listrik negatif (-). Apabila suatu molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, seperti gel agarosa, lalu dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Mushlih, 2019).

Teknik elektroforesis ditemukan sekitar abad ke 19 dimana pengembangannya secara lebih signifikan dilakukan pada tahun 1956 oleh Hunter dan Moller. Mereka melakukan penelitian tentang sifat-sifat enzim sebagai katalisator untuk melihat pengaruh kimia pada perkembangannya (Harahap, 2018). Elektroforesis merupakan cara yang efektif untuk memisahkan fragmen DNA dengan berbagai ukuran (Badriyya & Achyar, 2021).

Prinsip dasar elektroforesis adalah pergerakan molekul bermuatan atau ion melalui medium semi solid di bawah pengaruh suatu medan listrik. Elektroforesis dapat digunakan untuk mengetahui ukuran DNA dengan menggunakan DNA marker yang sudah diketahui ukurannya. DNA marker ini berfungsi sebagai pembanding sehingga bisa diketahui perkiraan ukuran DNA sampel. Jika molekul yang bermuatan negatif (DNA) dilewatkan melalui gel agarosa, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke

kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif, sehingga elektroforesis dapat memisahkan DNA berdasarkan ukuran panjangnya (Yuwono, 2006).

Elektroforesis terdiri atas beberapa komponen utama yaitu larutan elektrolit yang berfungsi sebagai pembawa komponen. Biasanya, ini terdiri dari larutan buffer dengan pH yang sesuai dengan karakteristik senyawa yang akan dipisahkan. Media pemisah adalah tempat dimana proses pemisahan dilakukan. Media pemisah ini terdiri dari berupa kertas (selulosa asetat, selulosa nitrat), gel poliakrilamid, dan agar. Hal terpenting berikutnya adalah perangkat listrik yang dapat menghubungkan alat pemisah ke sumber listrik seperti baterai dan dapat bertindak sebagai sumber energi pada rangkaian alat (Harahap, 2018).

Pada elektroforesis dapat dilakukan berbagai metode pada proses pewarnaannya. Metode pre-cast merupakan suatu metode proses pewarnaan dimana agarosa yang dicampur dengan Gelred. Selanjutnya, metode staining yaitu metode yang digunakan dengan menambahkan GelRed pada DNA ladder maupun DNA Sampel yang akan digunakan. Metode post-staining, merupakan metode pada proses pewarnaan yang dilakukan setelah proses elektroforesis berakhir (Biotium, n.d.-b, n.d.-a).

METODE PENELITIAN

Kegiatan kerja praktek dilaksanakan pada tanggal 22 juni- 22 juli 2023 dan dilaksanakan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat. Pada Penelitian ini dilakukan dengan elektroforesis dengan tiga metode yang yaitu *Pre-Cast*, *Direct-Staining* dan *Post-Staining*. Alat yang digunakan pada elektroforesis adalah gelas ukur, timbangan analitik, mesin elektroforesis, *microwave*, *plastic frame*, sisir sumur dan mikropipet. Bahan yang digunakan yaitu bubuk agarosa , *buffer* TBE 0,5x, GelRed Biotium, DNA ladder 50 bp, DNA sampel, *loading dye*.

Prosedur kerja

a. Elektroforesis dengan metode *pre-cast*

Analisis produk hasil PCR dilakukan dengan teknik elektroforesis (Afif & Putri., 2019). Teknik ini menggunakan menggunakan gel agarosa 1,5%, dimana gel agarosa ditimbang sebanyak 1,5 g, lalu dimasukkan kedalam larutan TBE 0,5X sebanyak 100 mL. Selanjutnya, larutan agarosa dipanaskan di oven selama 2 menit sampai terlihat mendidih. Tunggu hingga suhu sekitar 45 atau 50 C dan masukkan GelRed kedalam tabung. Pastikan homogen dengan cara digoyang goyang. Kemudian, agarosa dituang ke cetakan dan dipasang sisir pembuat sumur di cetakan. Lalu diamkan gel agarosa hingga mengeras. Setelah mengeras, gel agarosa dimasukkan ke dalam alat elektroforesis. Kemudian larutan TBE 0,5X dituang ke dalam alat elektroforesis sampai gel agarosa

terendam. Selanjutnya DNA ladder dipipet ke sumur dengan komposisi ladder 50 bp sebanyak 5 µl dan loading dye sebanyak 5 µl dan DNA sampel 5 µl. Setelah DNA ladder dan juga sampel sudah masuk ke dalam sumur, elektroforesis dirunning selama 50 menit pada tegangan 110 volt. Kemudian hasil elektroforesis kemudian diamati di bawah UV Transilluminator (Handayani & Putri, 2021).

b. Elektroforesis dengan metode *direct-staining*

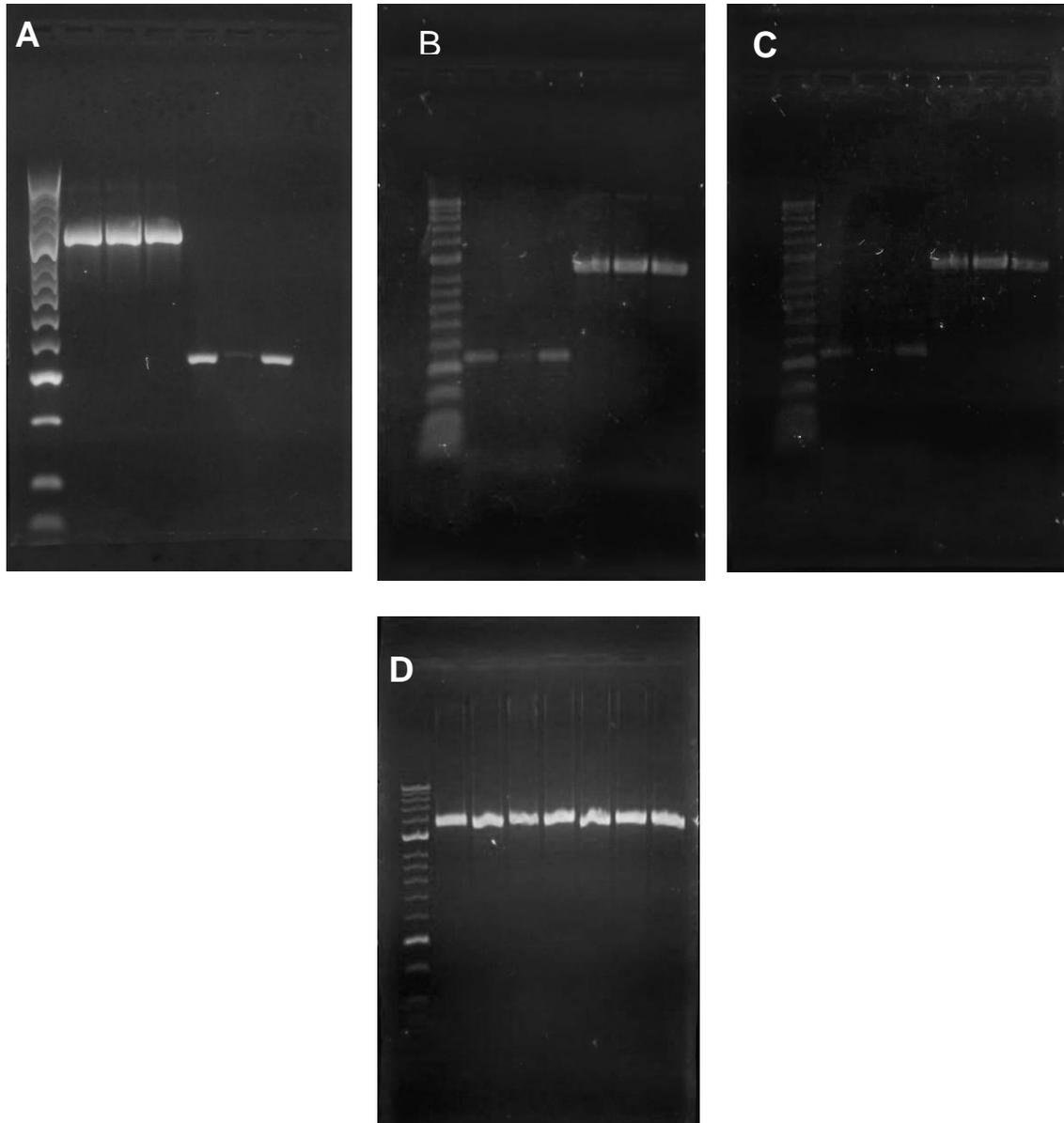
Produk PCR divisualisasikan dengan elektroforesis yang menggunakan gel agarosa 1,5%, dimana gel agarosa ditimbang sebanyak 1,5 g, lalu dimasukkan kedalam larutan TBE 0,5X sebanyak 100 mL. Selanjutnya, larutan agarosa dipanaskan di oven selama 2 menit sampai terlihat mendidih. Kemudian, agarosa dituang ke cetakan dan dipasang sisir pembuat sumur di cetakan. Lalu diamkan gel agarosa hingga mengeras. Setelah mengeras, gel agarosa dimasukkan ke dalam alat elektroforesis. Kemudian larutan TBE 0,5X dituang ke dalam alat elektroforesis sampai gel agarosa terendam. Selanjutnya DNA ladder dipipet ke sumur dengan komposisi GelRed 1:1000 5 µl, ladder 50 bp sebanyak 5 µl dan loading dye sebanyak 5 µl . Untuk DNA sampel, dicampur sebanyak 5 µl gel red dan 5 µl sampel DNA. Setelah DNA ladder dan juga sampel sudah masuk ke dalam sumur, elektroforesis dirunning selama 50 menit pada tegangan 110 volt. Kemudian hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan UV-transilluminator.

c. Elektroforesis dengan metode *post-staining*

Produk PCR divisualisasikan dengan elektroforesis yang menggunakan gel agarosa 1,5%, dimana gel agarosa ditimbang sebanyak 1,5 g, lalu dimasukkan kedalam larutan TBE 0,5X sebanyak 100 mL. Selanjutnya, larutan agarosa dipanaskan di oven selama 2 menit sampai terlihat mendidih. Kemudian, agarosa dituang ke cetakan dan dipasang sisir pembuat sumur di cetakan. Lalu diamkan gel agarosa hingga mengeras. Setelah mengeras, gel agarosa dimasukkan ke dalam alat elektroforesis. Kemudian larutan TBE 0,5X dituang ke dalam alat elektroforesis sampai gel agarosa terendam. Selanjutnya DNA ladder dipipet ke sumur dengan ladder 50 bp sebanyak 5 µl dan loading dye sebanyak 5 µl dan DNA sampel sebanyak 5 µl. Setelah DNA ladder dan juga sampel sudah masuk ke dalam sumur, elektroforesis dirunning selama 50 menit pada tegangan 110 volt. Selanjutnya, untuk membuat larutan pewarnaan ditambahkan buffer TBE 0,5X sebanyak 50 mL dan 5 mL GelRed waktu pewarnaan selama 30 menit hingga 1 jam. Kemudian Gel hasil elektroforesis diamati pada UV Transluminator dan didokumentasikan (Ahda *et al.*, 2012).

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil Elektroforesis



Gambar 1. Hasil elektroforesis: (A) metode pre-cast, (B) metode post-staining pewarnaan 1 jam, (C) metode post-staining pewarnaan 30 menit, (D) metode direct-staining

Elektroforesis merupakan suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul dalam dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, dan besar muatan dari molekul (Fuad et al., 2016). Pada DNA hasil elektroforesis gel agarosa, molekul DNA dianalisis berdasarkan letaknya setelah mengalami migrasi pada proses elektroforesis tersebut. DNA yang akan dianalisa dibandingkan dengan DNA marker atau DNA yang telah diketahui (Anam et al., 2021).

Pada gambar 1 dapat dilihat perbandingan dari hasil elektroforesis yang dilakukan dengan berbagai metode. Pada gambar 1A dapat dilihat bahwa pemisahan DNA ladder pada agarosa dengan konsentrasi 1,5% dengan metode pre-cast kurang baik dan untuk pita DNA yang dihasilkan juga kurang baik. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi dan ukuran dari pita DNA mempengaruhi migrasi yang terjadi pada gel agarosa yang telah dicampurkan dengan GelRed. Gelred yang ditambahkan ke dalam agarosa akan membentuk matriks pemisahan yang pada setiap bagian matriksnya terdapat molekul tersebut. Berdasarkan hal tersebut, mengakibatkan interkalasi yang kuat antara DNA yang melalui matriks berisi Gelred tersebut sehingga terjadi retardasi migrasi DNA yang berlebihan.

Pada Gambar 1B dapat dilihat bahwa pemisahan DNA ladder dan DNA sampel pada agarosa dengan konsentrasi 1,5% dengan metode post-staining dengan pewarnaan selama 1 jam pemisahan yang terjadi cukup baik pita DNA terlihat cukup tegas. Sementara itu, pada gambar 1C dapat dilihat bahwa pemisahan DNA ladder dan DNA ladder pada agarosa dengan konsentrasi 1,5% dengan metode post-staining dengan pewarnaan selama 30 menit pemisahan yang terjadi cukup baik, tapi tidak terlihat tegas. Metode post-staining ini memiliki beberapa kekurangan diantaranya memerlukan waktu yang lama serta menggunakan GelRed yang banyak. Berdasarkan hal tersebut, untuk mengatasi hal tersebut dapat dilakukan optimasi volume GelRed terlebih dahulu.

Pada Gambar 1D pemisahan DNA ladder dan DNA sampel pada agarosa dengan konsentrasi 1,5% dengan metode direct-staining menghasilkan pemisahan yang terjadi sangat baik dibandingkan dengan metode sebelumnya. Hal ini dapat dilihat dari pita DNA yang terlihat tegas serta DNA marker yang dihasilkan juga terlihat tegas. Metode ini juga lebih baik digunakan karena tidak menggunakan GelRed yang banyak serta waktu yang digunakan tidak terlalu lama.

DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke arah anoda yang bermuatan positif. DNA dengan berat molekul yang kecil akan bergerak lebih cepat menuju anoda dibandingkan dengan DNA dengan berat molekul yang besar (Azizah & Azhar, 2022). Terbentuknya pita DNA menunjukkan bahwa DNA dapat dilanjutkan untuk proses sekuensing (Putri, 2019).

Pewarna yang paling umum untuk mendeteksi DNA dan RNA dalam gel adalah etidium bromide (Williams, 2001). Pada penelitian ini, pewarna yang digunakan adalah

GelRed. GelRed merupakan pewarna yang paling sensitif dan aman untuk digunakan dengan eksitasi sinar UV (Haines et al., 2015). Selain itu, etidium bromide merupakan mutagen karena dapat berinteraksi dengan DNA double helix yang terdapat pada manusia dan penggunaannya juga harus dilakukan oleh operator yang memiliki pelatihan yang cukup dalam menangani etidium bromida (Lee et al., 2012; Borst, 2005).

PENUTUP

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa metode yang menghasilkan pita DNA yang jelas adalah metode direct-staining. Selain itu, metode direct-staining juga memiliki keuntungan yaitu dapat menghemat GelRed yang digunakan serta waktu yang diperlukan selama proses pewarnaan juga lebih efisien.

REFERENSI

- Afif, R., & Putri, D. H. (2019). 16S rRNA Gene Amplification Of Endophytic Bacteria Which Produces Antimicrobial Compounds. *Serambi Biologi*, 4.
- Ahda, Y., Rozi Muharni, I., & Hilda Putri, D. (2012). Kualitas Dna Hasil Isolasi Dari Beberapa Bagian Batang Rambut Untuk Bahan Analisis Dna Forensik. *Eksakta*, 1, 88–92.
- Anam, K., Cahyadi, W., Azmi, I., Senjarini, K dan Rike Oktarianti. (2021). Analisis Hasil Elektrofosis DNA dengan *Image Processing* Menggunakan Metode *Gaussian Filter*. *Indonesian Journal of Electronics and Instrumentation Systems (IJEIS)*. Vol.11, No.1, pp. 37-48.
- Azizah, A., & Azhar, M. (2022). Identifikasi Gen 16S rRNA Bakteri Asam Laktat UBC-DTK-01 dari Dadih. *Periodic*, 11(2), 31-35.
- Badriyya, E., & Achyar, A. (2021). Primer Design of SNP rs4506565 Transcription Factor 7 like 2 (TCF7L2) Gene to Detect Type-2 Diabetes Mellitus. In *2nd International Conference on Contemporary Science and Clinical Pharmacy 2021 (ICCSCP 2021)* (pp. 197-202). Atlantis Press.
- Biotium. (n.d.-a). GelRed® & GelGreen® - DNA Stains | EtBr Alternatives | Biotium, Inc. 2018.
- Biotium. (n.d.-b). GelRed® and GelGreen® troubleshooting. 2018.
- Borst, P. (2005). Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: How it started. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 57(11), 745–747. <https://doi.org/10.1080/15216540500380855>.
- Fuad, A.R.M., Ulfin, I dan Ferdy Kurniawan. (2016). Penggunaan Agar-agar Komersial

- sebagai Media Gel Elektroforesis Pada Zat Warna Remazol: Pengaruh Komposisi Buffer, pH Buffer dan Konsentrasi Media. *JURNAL SAINS DAN SENI ITS*. Vol. 5 No. 2: 130-133.
- Haines, A. M., Tobe, S. S., Kobus, H. J., & Linacre, A. (2015). Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 36(6), 941–944. <https://doi.org/10.1002/elps.201400496>
- Handayani, S. O., & Putri, D. H. (2021). Comparison of Fenol-Kloroform Method and Mini-Prep CTAB Method for Chili (*Capsicum annum* L.) Plant DNA Isolation. *Jurnal Serambi Biologi*, 6(2), 37-41.
- Harahap, M. R. (2018). Elektroforesis: Analisis elektronika terhadap biokimia genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1). <https://doi.org/10.22373/crc.v2i1.3248>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Mushlih, M. (2019). Buku Ajar Mata Kuliah Biologi Molekuler “Aplikasi Dasar Di Dunia Kesehatan.” In Buku Ajar Mata Kuliah Biologi Molekuler “Aplikasi Dasar Di Dunia Kesehatan.” <https://doi.org/10.21070/2019/978-623-6081-07-5>
- Putri, D. H. (2019). Analysis Internal Primer Of Genes 16s Rrna Endophytic Bacteria Producing Compound Antimicrobial For Sequencing. *Serambi Biologi*, 4.
- Williams, L. R. (2001). Staining nucleic acids and proteins in electrophoresis gels. *Biotechnic and Histochemistry*, 76(3), 127–132. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.127.132>
- Yuwono, T. (2006). *Biologi molekuler*. Jakarta: Erlangga
- Zhang, J. H., Wang, F., & Wang, T. Y. (2011). A simple and effective SuperBuffer for DNA agarose electrophoresis. *Gene*, 487(1). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.05.018>