

SENSITIVITAS GEL RED SEBAGAI PEWARNA DNA PADA GEL ELEKTROFORESIS

Diah Artati

*Balai Penelitian Pemuliaan Ikan
Jl. Raya Sukamandi No. 2, Subang 41256*

ABSTRAK

Hasil dari analisis DNA dapat dimonitor melalui proses elektroforesis. Elektroforesis DNA merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran berat molekul dan struktur fisik molekulnya. Molekul DNA bermuatan negatif sehingga di dalam medan listrik akan bermigrasi melalui matriks gel menuju kutub positif (anoda). Visualisasi DNA dilakukan di bawah paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dahulu gel dalam pembuatannya ditambahkan pewarna. Pewarna yang biasa digunakan adalah ethidium bromide (EB). EB bersifat karsinogenik dan mutagenik. Kesadaran mengenai keamanan, telah mendorong pemilihan bahan yang aman dan ramah bagi personal laboratorium dan lingkungan. Pada kegiatan di bidang biologi molekuler sekarang tersedia alternatif pengganti ethidium bromide (EB) yang diklaim lebih aman, salah satunya yaitu gel *red*. Penggunaan gel *red* (stok 10.000x *in water*) pada larutan gel agarosa yang direkomendasikan dari produk adalah 1:10⁴. Pada kegiatan percobaan ini dilakukan elektroforesis gel dengan tingkat perbandingan gel *red* yang berbeda-beda yaitu 1:10⁴, 1:1,5x10⁴, 1:3x10⁴, dan 1:6x10⁴. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mengetahui tingkat sensitivitas gel *red* sebagai pewarna DNA pada gel elektroforesis. Hasil elektroforesis menunjukkan penggunaan gel *red* pada larutan gel agarosa sebesar 1:6x10⁴ masih bisa memvisualisasikan hasil PCR dengan baik.

KATA KUNCI: DNA, gel red, elektroforesis

PENDAHULUAN

Elektroforesis gel merupakan suatu teknik analisis penting dan sangat sering dipakai dalam bidang biokimia dan biologi molekuler. Secara prinsip, elektroforesis DNA merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran berat molekul dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan antara lain agarosa. Elektroforesis gel agarosa dapat dilakukan untuk memisahkan sampel DNA dengan ukuran dari beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa (bp) (Pramono, 2012).

Dalam kegiatan biologi molekuler, elektroforesis merupakan salah satu cara untuk memvisualisasikan keberadaan DNA, plasmid, dan produk PCR. DNA dapat dilihat secara langsung dan dapat ditentukan ukurannya berdasarkan migrasinya pada gel agarosa maupun gel poliakrilamid. Migrasi DNA dalam gel disebut sebagai elektroforesis. Untuk dapat divisual-

isasikan, maka DNA yang terdapat pada gel diwarnai, kemudian dilihat di atas sinar ultraviolet. Pewarna yang biasa digunakan adalah ethidium bromida (EB). EB dapat menangkap sinar ultraviolet sehingga pendaran sinar UV ini dapat terlihat. Ethidium mengikat molekul DNA, sehingga molekul DNA dapat terlihat ketika dilihat di atas sinar ultraviolet. Kekurangan dari EB adalah sifatnya yang karsinogenik dan mutagenik sehingga dapat membahayakan manusia dan lingkungan. Kesadaran mengenai keamanan, telah mendorong pemilihan bahan yang aman dan ramah bagi personal laboratorium dan lingkungan. Pada kegiatan di bidang biologi molekuler sekarang tersedia alternatif pengganti ethidium bromide (EB) yang diklaim lebih aman, yaitu gel *red*. Pada kegiatan percobaan ini dilakukan elektroforesis gel dengan konsentrasi gel *red* yang berbeda-beda dengan tujuan untuk mengetahui tingkat sensitivitas gel *red* sebagai pewarna DNA pada gel elektroforesis.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam kegiatan ini antara lain: larutan *buffer* TAE 10x, aquades, agarosa, gel *red* 10.000x *in water* (biotium), *amplicon* KHV dan β -actin ikan lele, *loading dye* (vivantis), dan VC 100 bp DNA Ladder Plus, RTU, 50 μ g (vivantis). Alat-alat yang digunakan terdiri atas: erlenmeyer, mikropipet, timbangan analitik, *hot plate*, perangkat mini horisontal elektroforesis, dan gel doc transilluminator.

Metode

Elektroforesis Gel Agarosa

Membuat 1 liter larutan *buffer* TAE 1x dengan cara mencampurkan 100 mL TAE 10x dengan 900 mL aquades. Sebagian larutan TAE 1x digunakan untuk mengisi tanki elektroforesis. Membuat gel agarosa 2% dengan cara menimbang agarosa 0,6 g untuk dilarutkan ke dalam *buffer* TAE 1x sebanyak 30 mL.

Larutan agarosa dididihkan hingga larut sempurna. Setelah mendidih tambahkan gel *red* 10.000x *in water* (biotium), sebanyak 3 μ L untuk gel agarosa dengan perbandingan gel *red* 1:10⁴, 2 μ L untuk gel agarosa dengan perbandingan gel *red* 1:1,5x10⁴, 1 μ L untuk gel agarosa dengan perbandingan gel *red* 1:3x10⁴ dan 0,5 μ L untuk gel agarosa dengan perbandingan gel *red* 1:6x10⁴. Pemeriksaan hasil PCR dilakukan dengan cara memasukkan 3 μ L *amplicon* yang telah dicampur dengan *loading dye* (vivantis) 1 μ L ke dalam sumur-sumur agarosa gel 2%.

Pada kegiatan ini, *amplicon* yang digunakan adalah KHV yang desain primernya muncul pada ukuran 290 bp dan β -actin ikan lele yang desain primernya muncul pada ukuran 300 bp. Sebagai penanda (*marker*) digunakan VC 100 bp DNA Ladder Plus, RTU, 50 μ g (vivantis) sebanyak 2 μ L. Setelah itu, dilakukan elektroforesis 60 volt, 400 mA selama 60 menit. Agarosa gel difoto dengan pencahayaan ultraviolet menggunakan gel doc transilluminator.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil elektroforesis menunjukkan penggunaan gel *red* pada larutan gel agarosa sebesar 1:6x10⁴ masih bisa memvisualisasi-

kan hasil PCR dengan baik. Elektroforesis hasil PCR KHV dan β -actin ikan lele dengan menggunakan perbandingan gel *red* yang berbeda-beda disajikan pada Gambar 1.

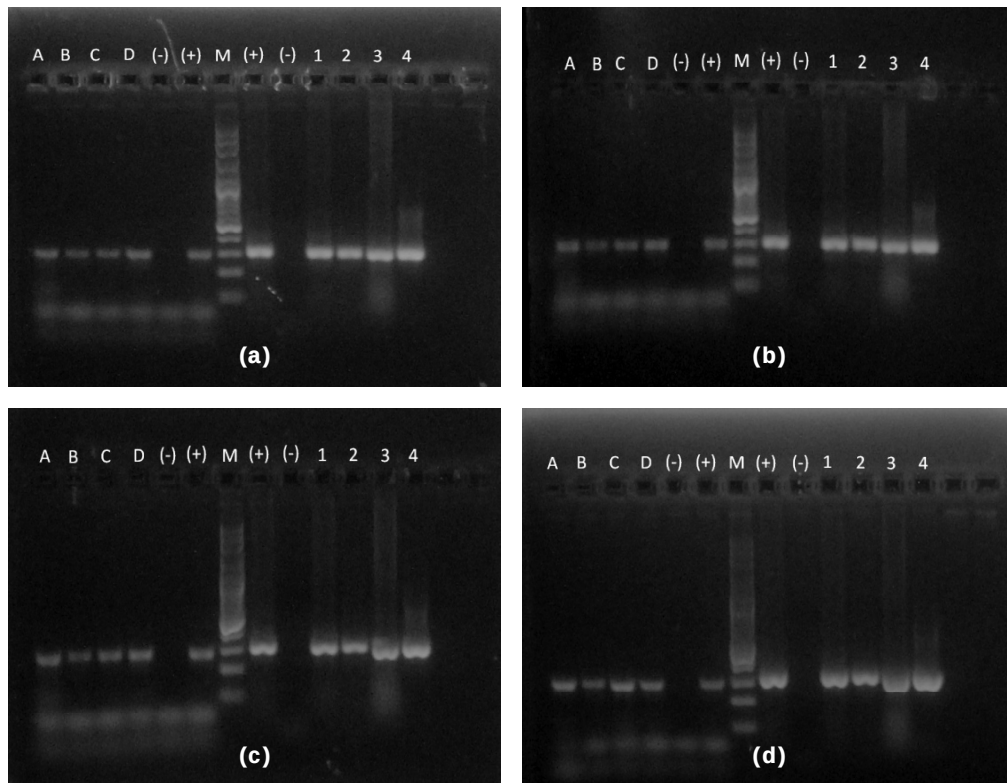
Pada Gambar 1 terlihat hasil elektroforesis gel hasil PCR KHV dan β -actin dengan perbandingan gel *red* 1:10⁴, 1:1,5x10⁴, 1:3x10⁴, dan 1:6x10⁴ tidak menunjukkan hasil yang berbeda. Masing-masing hasil pengujian masih bisa memvisualisasikan hasil PCR dengan baik (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa gel *red* memiliki tingkat sensitivitas tinggi. Penggunaan gel *red* yang direkomendasikan dari produk (biotium) adalah 1:10⁴. Dengan adanya percobaan ini, maka penggunaan gel *red* diharapkan bisa lebih efisien tanpa mempengaruhi kualitas hasil pengujian.

Sampel yang digunakan pada elektroforesis dengan perbandingan gel *red* 1:10⁴, 1:1,5x10⁴, 1:3x10⁴, dan 1:6x10⁴ adalah sampel hasil PCR KHV yang desain primernya muncul pada ukuran 290 bp dan sampel hasil PCR β -actin ikan lele yang desain primernya muncul pada ukuran 300 bp. Pada Gambar 1 menunjukkan sampel A, B, C, dan D (sampel KHV) muncul pita pada ukuran 290 bp. Sampel 1, 2, 3, dan 4 (sampel β -actin ikan lele) muncul pita pada ukuran 300 bp. Menurut Wilson & Walker (2000), berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen molekul DNA standar (DNA marker) yang telah diketahui ukurannya.

Sebelum dilakukan elektroforesis, suspeni DNA terlebih dahulu harus ditambahkan *loading buffer* (dye), yang berfungsi untuk menambah densitas, sehingga DNA akan selalu berada di dasar sumur. Menurut Suharsono & Widyastuti (2006), *loading buffer* (dye) juga berfungsi sebagai pewarna untuk memudahkan meletakkan sampel DNA ke dalam sumur, agar dapat bergerak ke arah anoda dengan laju yang dapat diperkirakan sehingga dapat digunakan sebagai tanda migrasi DNA.

Pewarna yang biasa digunakan dalam *loading buffer* (dye) adalah bromophenol blue dan xylene cyanol. Pembacaan pita DNA yang telah dibandingkan dengan DNA standar di atas lampu UV dilakukan untuk menganalisis kuantitas jumlah DNA. Pada kegiatan ini, elektroforesis gel dilakukan menggunakan alat mini horisontal elektroforesis merk Bio Rad.

Elektroforesis gel merupakan teknik memisahkan fragmen DNA berdasarkan



Gambar 1. (a) Elektroforesis gel hasil PCR KHV dan β -actin dengan penggunaan gel red $1:10^4$; (b) Elektroforesis gel hasil PCR KHV dan β -actin dengan penggunaan gel red $1:1,5 \times 10^4$; (c) Elektroforesis gel hasil PCR KHV dan β -actin dengan penggunaan gel red $1:3 \times 10^4$; (d) Elektroforesis gel hasil PCR KHV dan β -actin dengan penggunaan gel red $1:6 \times 10^4$. (A, B, C, D = Sampel KHV; (-) = Kontrol negatif; (+) = Kontrol positif; M = Marker; dan 1, 2, 3, 4 = Sampel β -actin)

ukurannya. Di mana jika sentrifugasi berarti memisahkan molekul menggunakan gravitasi sementara elektroforesis gel berarti memisahkan molekul dengan menggunakan listrik. Prinsip kerja elektroforesis gel dimulai saat makromolekul yang bermuatan listrik ditempatkan pada medium berisi tenaga listrik. Molekul-molekul tersebut akan bermigrasi menuju kutub positif atau kutub negatif berdasarkan muatan yang terkandung di dalamnya (Bowen 2000). Molekul-molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul-molekul yang bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda) (Klug & Cummings, 1994).

DNA merupakan molekul bermuatan negatif, sehingga bila diletakkan dalam medan listrik, DNA akan bermigrasi dari kutub negatif

ke kutub positif. Menurut Anam (2010), kecepatan migrasi ditentukan oleh ukuran molekul DNA, persentase/kepadatan gel yang dilalui DNA dan arus listrik yang diberikan untuk memigrasikan molekul DNA. Semakin kecil ukurannya, DNA akan semakin cepat bermigrasi. Semakin rapat media yang digunakan, semakin tinggi persentasenya, maka semakin lambat DNA bermigrasi. Semakin besar arus yang diberikan, maka semakin cepat DNA bermigrasi.

Visualisasi DNA dilakukan di bawah paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dahulu gel dalam pembuatannya ditambahkan gel red sebagai pewarna DNA. Gel red memiliki beberapa kelebihan dibandingkan EB, yaitu bersifat *non mutagenic* dan *non cytotoxic*, lulus uji keamanan lingkungan sehingga dapat langsung dibuang ke saluran pembuangan,

lebih sensitif dibanding EB, stabil dalam suhu ruang untuk penyimpanan jangka panjang, dan mudah dalam penggunaannya karena prosedurnya yang sangat sederhana (Biotium, 2013).

KESIMPULAN

Penggunaan gel *red* pada larutan gel agarosa sebesar $1:6 \times 10^4$ masih bisa memvisualisasikan hasil PCR dengan baik.

DAFTAR ACUAN

- Anam, K. 2010. Laporan I (Isolasi dan Pemetaan DNA Plasmid). Institut Pertanian Bogor.
- Biotium. 2013. www.biotium.com. Diakses tanggal 21 Mei 2013 pukul 16.25 WIB.
- Bowen, R. 2000. Principles of gel electrophoresis. <http://www.vivo.colostate.edu>. 21 Mei 2013 pukul 16.40 WIB. 4 hlm.
- Klug, W.S. & Cummings, M.R. 1994. Concept of genetics. 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs: xvi + 773 pp.
- Pramono, H. 2012. Elektroforesis Gel Agarosa. <http://02bios2unsoed.wordpress.com/tentang/acara-praktikum/3-elektroforesis-dna/>. Diakses tanggal 21 Mei 2013.
- Suharsono & Widyastuti. 2006. Penuntun Praktikum Pelatihan Teknik Pengklonan Gen. Pusat Penelitian Sumber Daya Hayati dan Bioteknologi. IPB.
- Wilson, K. & Walker, J. 2000. Principles and Techniques of Practical Biochemistry 5th Edition, Cambridge University Press, Cambridge.