

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

## OPTIMASI PERFORMA *DNA MARKER* PADA ELEKTROFORESIS GEL

Diah Artati dan Dini Sahfitri Lubis

Balai Riset Pemuliaan Ikan

Jl. Raya 2 Pantura Sukamandi, Patokbeusi, Subang 41263, Jawa Barat

E-mail: [publikasi.bppi@gmail.com](mailto:publikasi.bppi@gmail.com)

### ABSTRAK

Elektroforesis adalah pemisahan komponen bermuatan listrik berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam suatu medan listrik. Elektroforesis terutama digunakan untuk mengamati hasil dari DNA (*deoxyribonucleic acid*) yang diamplifikasi. Untuk memudahkan pembacaan ukuran DNA target dalam elektroforesis diperlukan adanya *DNA marker*. Kendala-kendala penggunaan *DNA marker* dalam elektroforesis di antaranya adalah separasi fragmen *DNA marker* yang kurang sempurna, fragmen yang tipis atau kurang tegas dan bentuk fragmen yang tidak lurus, sehingga menyulitkan pembacaan. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji coba dengan memberikan perlakuan beberapa faktor yang memengaruhi hasil elektroforesis untuk mengetahui komposisi yang tepat agar diperoleh performa fragmen *DNA marker* yang optimum. Kegiatan optimasi performa *DNA marker* ini dilakukan dengan cara memasukkan sampel *DNA marker* dengan volume 0,50  $\mu\text{L}$ ; 0,75  $\mu\text{L}$ ; 1,00  $\mu\text{L}$ ; 1,25  $\mu\text{L}$ ; dan 1,50  $\mu\text{L}$  ke dalam sumur-sumur gel agarosa 2% yang telah diwarnai *peqGREEN* dengan konsentrasi 60.000x *in water* (0,5  $\mu\text{L}/30$  mL), 40.000x *in water* (0,75  $\mu\text{L}/30$  mL), 30.000x *in water* (1  $\mu\text{L}/30$  mL), dan 24.000x *in water* (1,25  $\mu\text{L}/30$  mL), kemudian dilakukan elektroforesis pada arus listrik 400 mA dengan tegangan listrik 80 volt selama 30 menit, 70 volt selama 45 menit, dan 60 volt selama 60 menit. Hasil uji coba ini menunjukkan bahwa volume optimum *DNA marker* yang dapat menghasilkan visualisasi fragmen-fragmen DNA secara jelas berkisar 0,75-1,25  $\mu\text{L}$ . Pewarna *peqGREEN* dengan konsentrasi 60.000x *in water* sudah dapat mewarnai fragmen DNA dengan jelas. Separasi antar-fragmen DNA terlihat jelas dan tegas pada saat elektroforesis dilakukan dengan tegangan listrik 70 volt selama 45 menit dan 60 volt selama 60 menit.

**KATA KUNCI:** *DNA marker*; elektroforesis; volume; konsentrasi pewarna; tegangan listrik

### PENDAHULUAN

Salah satu metode pemisahan campuran yang sering digunakan dalam bidang biologi molekuler adalah elektroforesis gel. Elektroforesis adalah teknik pemisahan molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam suatu medan listrik (Holme & Hazel, 1998). Kecepatan pergerakan tersebut tergantung dari muatan, bentuk, dan ukuran molekul. Objek yang berukuran molekul lebih besar akan berpindah lebih lambat.

Elektroforesis terutama digunakan untuk mengamati hasil dari DNA (*deoxyribonucleic acid*) yang diamplifikasi. Hasil elektroforesis yang terlihat adalah terbentuknya pita (*band*) yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi dan menunjukkan potongan-potongan jumlah pasangan basanya (bp = *base pair*) (Klug & Cummings, 1994). Pada umumnya dikenal dua jenis gel dalam elektroforesis gel, yaitu agarosa dan poliakrilamida. Gel agarosa dapat digunakan untuk memisahkan DNA yang berukuran lebih dari 100 bp, sedangkan untuk memisahkan DNA yang berukuran

lebih pendek dapat digunakan gel poliakrilamida (Wilson & John, 1994). Gel agarosa memiliki beberapa kelebihan, antara lain teknik preparasi gel yang sederhana dan cepat, serta bersifat non-toksik.

Berat molekul suatu fragmen DNA target dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen DNA standar yang telah diketahui ukurannya sebagai penanda (*DNA marker* atau *DNA ladder*) (Martin, 1996). *DNA marker* umumnya dibuat dari hasil pemotongan suatu plasmid dengan enzim restriksi yang menghasilkan beberapa fragmen DNA (Soehardjo, 2003). Fragmen-fragmen DNA yang memiliki ukuran molekul sama akan memiliki elektromobilitas yang sama dan menempuh jarak migrasi yang sama pula (Gilbert, 2016). Posisi molekul yang terseparasi pada gel dapat dideteksi dengan adanya pewarna.

Performa fragmen *DNA marker* yang baik akan sangat membantu memudahkan pembacaan hasil fragmen-fragmen DNA yang diamplifikasi. Namun demikian, terdapat beberapa kendala penggunaan *DNA*

marker yang ditemui dalam elektroforesis, antara lain separasi fragmen-fragmen DNA marker yang kurang sempurna, fragmen yang tipis atau kurang tegas dan bentuk fragmen yang tidak lurus (*smile effect*), sehingga menyulitkan pembacaan. Kendala-kendala tersebut perlu ditindaklanjuti dengan cara mencoba memberikan beberapa perlakuan faktor-faktor yang memengaruhi hasil elektroforesis. Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui komposisi komponen elektroforesis yang tepat untuk mendapatkan performa fragmen DNA marker yang optimum.

## BAHAN DAN METODE

Kegiatan optimasi performa DNA marker dalam elektroforesis gel ini dilakukan di Laboratorium Pengujian Balai Penelitian Pemuliaan Ikan (BPPI) Sukamandi. Sampel uji DNA marker yang digunakan adalah VC 100 bp DNA ladder plus, RTU 50 µg (Vivantis), sedangkan sebagai pewarna digunakan *peqGREEN* (peqlab). Proses elektroforesis dilakukan menggunakan alat elektroforesis horizontal mini (Mini-Sub Cell GT Systems, Bio Rad), dengan media berupa gel agarosa 2% (Vivantis).

Perlakuan yang diberikan dalam uji performa DNA marker dalam elektroforesis gel agarosa 2% ini berupa perbedaan volume DNA marker, konsentrasi pewarna *peqGREEN*, tegangan listrik, dan lama waktu proses elektroforesis. Uji performa DNA marker dilakukan dengan cara memasukkan sampel DNA marker dengan volume bervariasi, yaitu 0,50 µL; 0,75 µL; 1,00 µL; 1,25 µL; dan 1,50 µL ke dalam sumur-sumur gel agarosa 2% yang telah diwarnai *peqGREEN* dengan konsentrasi bervariasi, yaitu 60.000x *in water* (0,5 µL/30 mL), 40.000x *in water* (0,75 µL/30 mL), 30.000x *in water* (1 µL/30 mL), dan 24.000x *in water* (1,25 µL/30 mL), kemudian dilakukan elektroforesis dengan tegangan listrik bervariasi, yaitu 80 volt selama 30 menit, 70 volt selama 45 menit, dan 60 volt selama 60 menit, dengan arus listrik sebesar 400 mA. Hasil-hasil elektroforesis divisualisasikan dengan alat dokumentasi gel UV transiluminator (UVB).

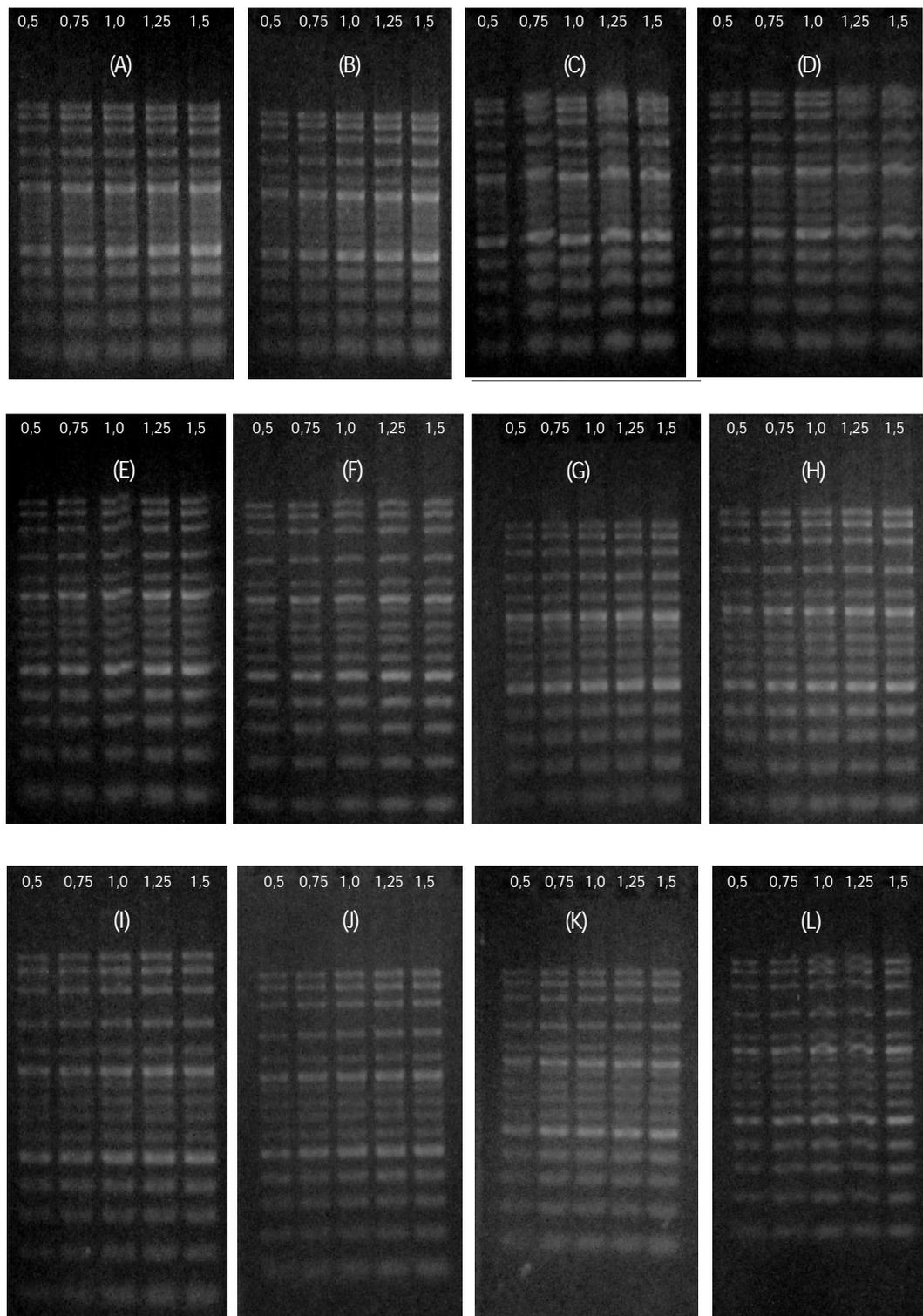
## HASIL DAN BAHASAN

Visualisasi hasil elektroforesis gel dari perlakuan perbedaan volume DNA marker, konsentrasi pewarna *peqGREEN*, tegangan listrik, dan lama waktu proses elektroforesis dalam kegiatan uji performa DNA marker ini disajikan pada Gambar 1. Hasil elektroforesis tersebut menunjukkan terdapat 15 fragmen, dengan ukuran terendah 100 bp dan ukuran tertinggi 3.000 bp. Ukuran fragmen DNA tersebut sesuai dengan ukuran fragmen DNA yang disebutkan dalam spesifikasi produknya.

Hasil visualisasi proses elektroforesis dalam uji coba ini (Gambar 1) menunjukkan bahwa volume DNA marker sebanyak 0,5 µL sudah dapat divisualisasikan, namun fragmen DNA yang muncul masih tampak tipis. Volume optimum DNA marker yang dapat menghasilkan visualisasi fragmen-fragmen DNA secara relatif jelas adalah 0,75-1,25 µL. Pewarna *peqGREEN* dengan konsentrasi 60.000x *in water* sudah cukup untuk mewarnai fragmen DNA dengan jelas. Menurut spesifikasi produknya, penggunaan pewarna *peqGREEN* dalam elektroforesis gel direkomendasikan dengan konsentrasi 20.000x *in water*. Namun demikian, hasil kegiatan ini menunjukkan bahwa konsentrasi 60.000x *in water* masih dapat menghasilkan visualisasi fragmen DNA dengan baik tanpa mengurangi kualitas hasil pengujian.

Separasi antar-fragmen DNA terlihat jelas dan tegas pada saat elektroforesis dilakukan dengan tegangan listrik sebesar 70 volt selama 45 menit (Gambar 1E, 1F, 1G, dan 1H) dan tegangan listrik sebesar 60 volt selama 60 menit (Gambar 1I, 1J, 1K, dan 1L). Penggunaan tegangan listrik dalam elektroforesis gel perlu diperhatikan, karena tegangan listrik yang terlalu besar dapat mengakibatkan panas yang dapat mengubah bentuk fragmen DNA. Tegangan listrik yang terlalu besar dapat menyebabkan terjadinya *smile effect*, seperti pada Gambar 1C dan 1D. Elektroforesis dengan perlakuan tegangan listrik pada 70 volt selama 45 menit dan volume DNA marker 1,00 µL juga terdapat *smile effect*, sedangkan pada volume DNA marker yang lain tidak terjadi (Gambar 1E). Hal ini bisa disebabkan karena kepadatan gel yang tidak sempurna, sehingga gel menjadi rusak. *Smile effect* dapat terjadi karena beberapa faktor, di antaranya kepadatan gel agarosa yang tidak merata (tidak seragam), adanya kotoran dalam gel agarosa dan perubahan arah medan listrik (Cramer & Westermeier, 2012).

Hasil pemisahan fragmen-fragmen DNA marker pada elektroforesis dengan perlakuan tegangan listrik 80 volt selama 30 menit (Gambar 1A, 1B, 1C, dan 1D) terlihat belum sempurna, yakni fragmen-fragmen DNA berukuran 600 bp, 700 bp, 800 bp, dan 900 bp yang masih relatif menempel satu sama lain. Hal tersebut dapat disebabkan karena ukuran molekulnya yang besar, tetapi waktu yang diberikan untuk proses elektroforesis terlalu singkat, sehingga memengaruhi laju migrasinya (elektromobilitas). Semakin besar ukuran molekul, elektromobilitasnya semakin kecil. Menurut Switzer *et al.* (1999), semakin besar muatan molekul, maka semakin besar pula elektromobilitasnya. Selain besar muatan dan ukuran molekul, topologi atau bentuk molekul juga memengaruhi elektromobilitas suatu molekul.



Gambar 1. Hasil visualisasi elektroforesis dari 0,50  $\mu\text{L}$ ; 0,75  $\mu\text{L}$ ; 1,00  $\mu\text{L}$ ; 1,25  $\mu\text{L}$ ; dan 1,50  $\mu\text{L}$  DNA marker dalam gel agarosa 2% yang diberi pewarna *peqGREEN* 60.000x *in water* pada 80 volt selama 30 menit (A), pewarna *peqGREEN* 40.000x *in water* pada 80 volt selama 30 menit (B), pewarna *peqGREEN* 30.000x *in water* pada 80 volt selama 30 menit (C), pewarna *peqGREEN* 24.000x *in water* pada 80 volt selama 30 menit (D), pewarna *peqGREEN* 60.000x *in water* pada 70 volt selama 45 menit (E), pewarna *peqGREEN* 40.000x *in water* pada 70 volt selama 45 menit (F), pewarna *peqGREEN* 30.000x *in water* pada 70 volt selama 45 menit (G), pewarna *peqGREEN* 24.000x *in water* pada 70 volt selama 45 menit (H), pewarna *peqGREEN* 60.000x *in water* pada 60 volt selama 60 menit (I), pewarna *peqGREEN* 40.000x *in water* pada 60 volt selama 60 menit (J), pewarna *peqGREEN* 30.000x *in water* pada 60 volt selama 60 menit (K), dan pewarna *peqGREEN* 24.000x *in water* pada 60 volt selama 60 menit (L).

## KESIMPULAN

Performa DNA marker yang digunakan pada elektroforesis gel agarosa 2% menunjukkan performa yang baik dan efektif pada volume 0,75  $\mu$ L dan konsentrasi pewarna *peqGREEN* 60.000x *in water*, dengan tegangan listrik 70 volt selama 45 menit.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Manajemen Laboratorium Pengujian BPPI Sukamandi dan Tim Pemeriksa Makalah (TPM) atas bantuan dan bimbingannya selama penyusunan makalah ini.

## DAFTAR ACUAN

Cramer, R. & Westermeier, R. (2012). *Difference gel electrophoresis (DIGE)*. Humana Press Inc. New York, 401 pp.

Gilbert, S.F. (2016). *Development biology*. Eleventh edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland, 810 pp.

Holme, D.J. & Hazel, P. (1998). *Analytical biochemistry*. Pearson Education Limited. England, 504 pp.

Klug, W.S. & Cummings, M.R. (1994). *Concepts of genetics*. 4th edition. Prentice Hall. Englewood, 779 pp.

Martin, R. (1996). *Gel electrophoresis: nucleic acids*. Bios Scientific Publisher. Oxford, 175 pp.

Soehardjo, I.N. (2003). *PCMV-b-Gal sebagai bahan baku pembuatan marker DNA yang mudah dan murah*. Diakses 3 Juni 2009 dari <http://www.adln.lib.unair.ac.id>.

Switzer, R.L., Liam, F., & Garrity. (1999). *Experimental biochemistry, theory and exercises in fundamental methods*. Third edition. WH Freeman, 450 pp.

Wilson, K. & John, M.W. (1994). *Principles and techniques of practical biochemistry*. Cambridge University Press. UK, 760 pp.