

Penggunaan Agar-agar Komersial sebagai Media Gel Elektroforesis Pada Zat Warna Remazol: Pengaruh Komposisi Buffer, pH Buffer dan Konsentrasi Media

Atik Rohmana Maftuhatul Fuad, Ita Ulfin, Fredy Kurniawan
Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: itau@chem.its.ac.id

Abstrak—Elektroforesis gel menggunakan media agar-agar komersial untuk zat warna remazol telah dilakukan. Agar-agar komersial digunakan sebagai alternatif media elektroforesis gel untuk zat warna remazol *Brilliant Blue R*, *Red RB*, *Yellow FG*, *Turquoise Blue G* dan *Violet 5R* dengan beberapa variabel optimasi elektroforesis gel antara lain : pengaruh komposisi buffer, pH buffer, dan konsentrasi media yang dilakukan pada tegangan 150 volt selama 15 menit. Kemudian diperoleh kondisi optimal menggunakan buffer dengan komposisi $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4$. Pada pH buffer 9 didapatkan jarak migrasi terjauh untuk masing-masing zat warna RBBR, RYFG, RRRB, RTBG dan RV5R secara berturut-turut adalah : 29,11 mm; 35,40 mm; 33,40 mm; 32,07 mm; dan 31,07 mm. Pada konsentrasi 2% didapatkan jarak migrasi untuk kelima zat warna remazol paling jauh, yaitu : RBBR 29,13 mm; RYFG 34,14 mm; RRRB 31,16 mm; RTBG 30,25 mm dan RV5R 29,20 mm.

Kata Kunci—elektroforesis gel; zat warna remazol; agar-agar komersial.

I. PENDAHULUAN

Elektroforesis merupakan suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, dan besar muatan dari molekul [1]. Metode pemisahan *Gel Electrophoresis System* adalah salah satu metode yang murah dan mudah dikembangkan. Metode ini biasanya digunakan untuk pemisahan DNA dan protein. Pergerakan molekul tergantung pada beberapa faktor, yaitu : massa, bentuk molekul dan suhu, porositas dan viskositas media [2].

Larutan elektrolit sangat diperlukan dalam metode elektroforesis gel, berfungsi sebagai penghantar arus listrik dalam elektroforesis. Larutan elektrolit yang biasa digunakan adalah buffer. Pada penelitian ini digunakan larutan buffer fosfat yang sudah sering digunakan dan pertama kali digunakan oleh Jorgenson dan Luckas pada tahun 1981 [3]. Salah satu kelebihan buffer fosfat adalah area kerja buffer fosfat yang lebar yaitu dari asam sampai basa. Hal ini karena asam fosfat merupakan asam trivalen dengan nilai pKa 2,12; 7,47; dan 12,36 yang mampu mempertahankan pH [4].

Elektroforesis melalui gel agarosa atau akrilamid merupakan teknik pemisahan yang sederhana, cepat dan tepat memisahkan molekul yang diinginkan [5]. Jenis

elektroforesis gel yang lain adalah Elektroforesis Gel Poliakrilamid-SDS (SDS-PAGE) yang merupakan sebuah metode elektroforesis untuk pemisahan protein berdasarkan berat molekul. Teknik ini dilakukan dalam gel poliakrilamid yang mengandung *sodium dodecyl sulphate* (SDS). SDS adalah sebuah detergen anionik untuk menyelubungi molekul protein. [5].

Secara umum elektroforesis gel diakui sebagai metode analitik untuk pemurnian protein, dengan meletakkan sampel protein pada gel yang telah diberi pewarna seperti : amido black fast green atau yang lebih sensitif coomassie blue. Namun, metode ini memerlukan waktu hingga beberapa jam untuk proses pemisahannya. Sebuah metode untuk pewarnaan protein pada pemisahan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid dijelaskan oleh Hartman dan Udenfriend pada tahun 1969. Tetapi pada metode ini penggunaan gel dengan SDS terbatas untuk *background* berfluorescence [6].

Pada tahun 1972 Griffith memperkenalkan penggunaan *reactive dye* anionic pertama kali menggunakan remazol sebagai pewarna dalam pemisahan protein pada Poliakrilamid Gel Elektroforesis (PAGE). Pada penelitian tersebut menjelaskan prosedur untuk mereaksikan material biologi dengan zat warna *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR) dan hasil yang diperoleh adalah pemisahan protein dengan prosedur tersebut dapat divisualisasikan secara langsung. Sehingga pada penelitian ini dipilih sampel zat warna remazol yang mempunyai banyak varian dan mudah didapatkan dengan harga terjangkau untuk mengetahui kondisi optimum pada metode *Gel Electrophoresis System* sebelum diterapkan untuk pewarnaan makromolekul yang lain [7].

Remazol merupakan perarna reaktif kelompok ethilsulfonil yang memiliki muatan negatif. Jenis-jenis remazol beragam, setiap jenis memiliki struktur, muatan, dan warna yang berbeda. Lima jenis remazol (*Remazol Brilliant Blue R*, *Remazol Yellow FG*, *Remazol Red RB*, *Remazol Turquoise Blue G*, dan *Remazol Violet 5R*) yang berbeda digunakan dalam penilian ini untuk mempelajari karakteristik migrasi dari remazol dengan elektroforesis gel.

Secara umum sampel makromolekul dielektroforesis melalui beberapa jenis media. Media bertindak sebagai saringan molekuler untuk membantu dalam pemisahan molekul berdasarkan ukuran. Jenis media pendukung yang digunakan tergantung pada jenis molekul yang akan dipisahkan dan pemisahan berdasarkan muatan, berat

molekul atau keduanya [8]. Bahan yang biasa digunakan untuk pemisahan asam nukleat dan protein yaitu agarosa dan akrilamida. Barril dan Nates (2012) membandingkan sensitivitas deteksi antara agarosa dan poliakrilamida sebagai media dalam *Gel Electrophoresis System*[9]. Media gel yang digunakan pada metode ini merupakan gel transparan dalam sinar UV (Reddy and Raju, 2012). Agarosa dan poliakrilamid sulit didapatkan, oleh karena itu pada penelitian ini digunakan agar-agar batangan komersial sebagai pengganti atau alternatif media gel dalam *Gel Electrophoresis System*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh komposisi buffer fosfat, pH buffer fosfat, dan konsentrasi media agar pada elektroforesis gel untuk zat warna remazol.

II. URAIAN PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: zat warna remazol, agar-agar batangan komersial, dan buffer fosfat. Remazol yang digunakan yaitu : Remazol *Brilliant Blue R*, *Red RB*, *Yellow FG*, *Turquoise Blue G* dan *Violet 5R* dengan konsentrasi 0,01% (w/v). Buffer fosfat yang digunakan mempunyai berbagai komposisi , yaitu : NaOH + H₃PO₄; KOH + H₃PO₄; dan NaH₂PO₄.H₂O + Na₂HPO₄. Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain : serangkaian alat elektroforesis gel, *power supply*, pH meter, termometer, jangka sorong, dan AVometer.

B. Elektroforesis Zat Warna Remazol

Media agar-agar batangan komersial konsentrasi 2%; 2,5%; 3%; 3,5%; dan 4% dibuat menggunakan pelarut buffer fosfat dengan pH buffer 3 – 9. Kemudian dipanaskan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan pengadukan 600 rpm sampai homogen, dan didiamkan sampai mengeras pada cetakan berbentuk segi empat dengan ukuran 15 cm X 7,5 cm [10].

Sampel zat warna remazol 0,01% (w/v) disuntikkan pada media agar menggunakan mikro pipet 20 µL dan didiamkan selama ± 5 menit. Media agar yang telah berisi larutan sampel dimasukkan ke dalam chamber elektroforesis berisi larutan buffer fosfat. Serangkaian alat elektroforesis dihubungkan pada *power supply*, kemudian dilakukan proses elektroforesis untuk kelima zat warna remazol dengan tegangan 150 volt selama 15 menit. Setelah selesai, *power supply* dimatikan dan dilakukan pengambilan data berupa suhu buffer menggunakan, pH buffer, jarak migrasi, dan arus.

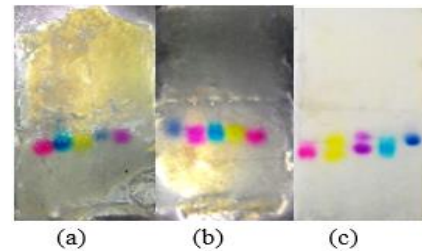
Metode elektroforesis dilakukan untuk pemisahan lima jenis larutan zat warna remazol yang dicampur dengan perbandingan 1:1, kondisi optimum dan dilakukan selama 15 menit dan 30 menit. Selain itu juga diterapkan pada pemisahan limbah tekstil. Proses elektroforesis dilakukan dengan kondisi optimum selama 15 menit dan 30 menit.

III. HASIL DAN DISKUSI

A. Pengaruh Komposisi Buffer

Larutan buffer sebagai elektrolit dalam elektroforesis gel sangat mempengaruhi hasil migrasi molekul pada sampel. Larutan elektrolit yang digunakan adalah buffer fosfat, komposisi buffer fosfat yang digunakan antara

lain : NaOH + H₃PO₄; KOH + H₃PO₄; dan NaH₂PO₄.H₂O + Na₂HPO₄. Ketika komposisi buffer terdapat basa kuat yaitu : NaOH + H₃PO₄; KOH + H₃PO₄, suhu pada sistem sangat tinggi, sehingga menyebabkan media agar pada elektroforesis gel rusak. Berdasarkan beberapa komposisi tersebut diperoleh kondisi paling optimal untuk elektroforesis gel dengan menggunakan buffer fosfat yang komposisinya terdapat garam dari asam fosfat seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis gel dengan komposisi buffer: (a) NaOH + H₃PO₄ (b) KOH + H₃PO₄ (c) NaH₂PO₄.H₂O + Na₂HPO₄

Penggunaan buffer dengan komposisi NaOH + H₃PO₄ dan KOH + H₃PO₄ sukar untuk menentukan jarak migrasi dari pita yang dihasilkan dan hasil media yang baik didapatkan dari komposisi buffer NaH₂PO₄.H₂O + Na₂HPO₄.

B. Pengaruh pH Buffer

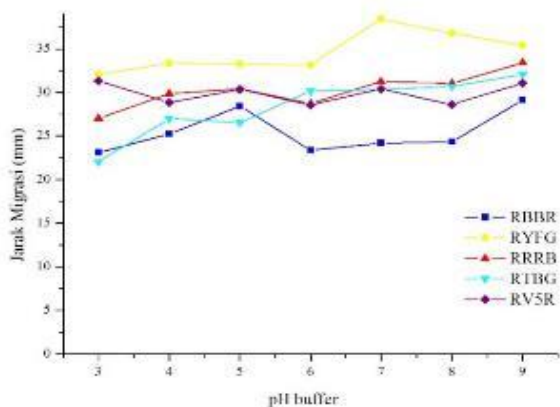
Larutan buffer sebagai elektrolit pada elektroforesis gel mempengaruhi migrasi molekul zat warna remazol. Pada pH 9 zat warna remazol mempunyai jarak migrasi terjauh kecuali remazol *yellow FG*. Adapun panjang jarak migrasi RBBR, RYFG, RRRB, RTBG dan RV5R secara berturut-turut adalah : 29,11 mm; 35,40 mm; 33,40 mm; 32,07 mm; dan 31,07 mm. Pada pH 9 rata-rata zat warna remazol mempunyai jarak migrasi terjauh, hal ini karena zat warna remazol mempunyai muatan negatif dan larutan elektrolit mempunyai pH basa dengan ion OH⁻ lebih banyak daripada ion H⁺, sehingga menarik lebih cepat molekul bermuatan negatif menuju kutub positif. Larutan bufer berperan sebagai media pendukung yang dapat mempengaruhi kecepatan gerak senyawa karena ion pembawanya bermuatan. Kekuatan ion yang tinggi dalam bufer akan meningkatkan panas sehingga aliran listrik menjadi maksimal, dan dapat mempercepat gerakan molekul pada sampel [11].

Konduktivitas larutan buffer sangat mempengaruhi hasil elektroforesis. Konduktivitas larutan merupakan kemampuan suatu larutan dalam menghantarkan arus listrik. Pada larutan kemampuan ini dilakukan oleh kation dan anion [12]. Konduktivitas larutan bergantung pada jumlah ion yang ada di dalam larutan tersebut, didefinisikan seperti pada persamaan 1. :

$$\Lambda_m = \frac{\kappa}{c} \quad (1)$$

Dari persamaan 2.2 konsentrasi elektrolit dinyatakan dalam notasi c, dan satuan untuk konduktivitas molar adalah (S.m².mol⁻¹)[13]. Λ_m dapat dinyatakan sebagai penjumlahan ion yang terdapat dalam larutan, dengan λ_+ sebagai notasi konduktivitas molar kation dan λ_- sebagai notasi konduktivitas molar anion. Maka didapatkan persamaan 2. :

$$\Lambda_m^\circ = v_+ \lambda_+ + v_- \lambda_- \quad (2)$$

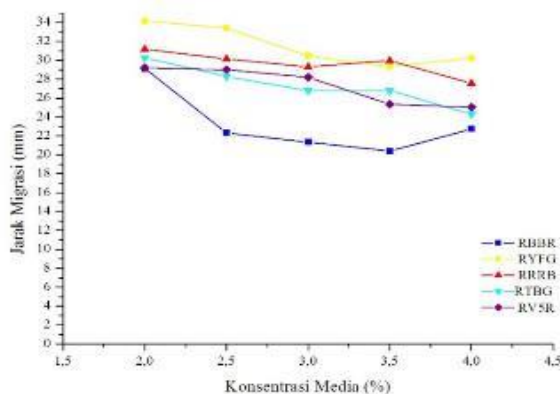


Gambar 2. Pengaruh pH larutan buffer terhadap jarak migrasi

C. Pengaruh Konsentrasi Media

Pengaruh konsentrasi media terhadap jarak migrasi zat warna ditunjukkan pada Gambar 4.5, meningkatnya konsentrasi media agar-agar akan menaikkan tingkat kekerasan, ukuran pori-pori dan keefektifan agar-agar. Semakin tinggi konsentrasi agar-agar maka ukuran pori-pori akan semakin rapat. Variasi konsentrasi agar-agar batangan komersial yang digunakan adalah 1%; 2%; 2,5%; 3%; 3,5% dan 4%. Pada konsentrasi 1% media rusak, sehingga jarak migrasi tidak dapat diukur. Kondisi media agar dengan berbagai konsentrasi setelah dilakukan proses elektroforesis ditunjukkan pada lampiran G. Hasil yang didapatkan bahwa semakin besar konsentrasi agar-agar maka jarak migrasi zat warna semakin rendah atau kecepatan migrasi zat warna semakin kecil.

Berdasarkan Gambar 3. menunjukkan pengaruh konsentrasi media terhadap jarak migrasi, dimulai dari konsentari 2%. Pemilihan konsentrasi 2% pada media sebagai kondisi optimal karena pada konsentrasi media tersebut didapatkan jarak migrasi terjauh dan kondisi media yang paling baik setelah dilakukan proses elektroforesis. Pada konsentrasi 2% hasil jarak migrasi untuk kelima zat warna remazol paling jauh, yaitu : RBBR 29,13 mm; RYFG 34,14 mm; RRRB 31,16 mm; RTBG 30,25 mm dan RV5R 29,20 mm.

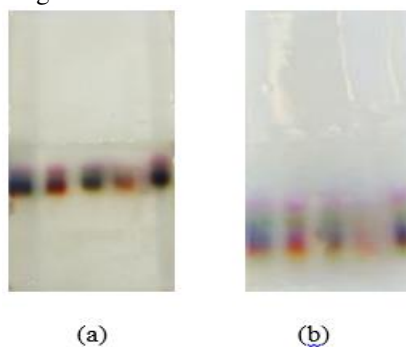


Gambar 3. Pengaruh konsentrasi media terhadap jarak migrasi

D. Elektroforesis gel campuran zat warna remazol

Lima jenis larutan zat warna remazol dicampur dengan perbandingan 1:1. Kemudian dilakukan proses elektroforesis untuk campuran lima zat warna remazol tersebut dengan kondisi optimum dan dilakukan selama 15 menit dan 30 menit. Hasil dari elektroforesis campuran kelima zat warna remazol ditunjukkan pada Gambar 4. Berdasarkan hasil elektroforesis gel campuran

zat warna remazol, pada waktu 15 menit campuran zat warna remazol belum terpisah dengan baik. Sedangkan pada waktu 30 menit campuran zat warna remazol terpisah dengan baik.



Gambar 4. Hasil elektroforesis campuran lima zat warna Remazol (a) 15 menit (b) 30 menit

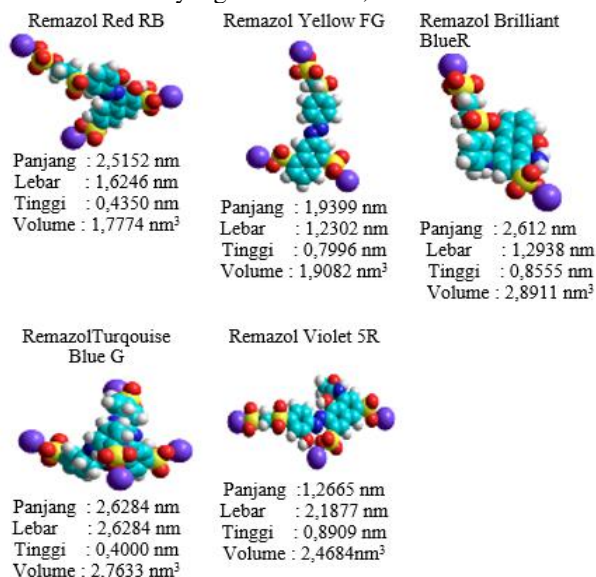
E. Elektroforesis gel limbah tekstil

Limbah tekstil yang diperoleh dari limbah industry pewarnaan batik tulis di Desa Sendang agung, Paciran, Lamongan dicoba untuk dipisahkan menggunakan elektroforesis gel dengan media agar-agar batangan komersial seperti prosedur yang dilakukan pada elektroforesis gel campuran zat warna remazol. Dari elektroforesis gel limbah tekstil diperoleh hasil seperti pada Gambar 5., yang menunjukkan bahwa limbah tekstil dapat terpisah dengan metode elektroforesis gel.



Gambar 5. Hasil elektroforesis limbah tekstil

Ukuran dan bentuk masing – masing remazol diperkirakan menggunakan software Chemdraw dan disajikan dalam Gambar 6. Ukuran remazol yang paling besar berdasarkan perhitungan panjang ikatan antar atom adalah remazol brilliant blue R yang berukuran 2,8911 nm³, sedangkan yang berukuran paling kecil adalah remazol red RB yang berukuran 1,7774 nm³.



Gambar 6. Ukuran dan bentuk remazol

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh bahwa agar-agar batangan komersial dapat digunakan sebagai alternatif media elektroforesis gel untuk zat warna remazol, dengan beberapa variabel optimasi elektroforesis gel antara lain : pengaruh komposisi buffer, pH buffer, dan konsentrasi media yang dilakukan pada tegangan 150 volt selama 15 menit. Dari beberapa variabel tersebut diperoleh kondisi optimal yaitu menggunakan buffer dengan komposisi $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4$. Pada pH buffer 9 didapatkan jarak migrasi terjauh untuk masing-masing zat warna RBBR, RYFG, RRRB, RTBG dan RV5R secara berturut-turut adalah : 29,11 mm; 35,40 mm; 33,40 mm; 32,07 mm; dan 31,07 mm. Pada konsentrasi 2% didapatkan jarak migrasi untuk kelima zat warna remazol paling jauh, yaitu : RBBR 29,13 mm; RYFG 34,14 mm; RRRB 31,16 mm; RTBG 30,25 mm dan RV5R 29,20 mm.

Pada waktu 30 menit dan kondisi optimal elektroforesis didapatkan hasil yang baik untuk pemisahan campuran kelima zat warna remazol dan limbah tekstil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Dra. Ita Ulfin, M.Si selaku dosen pembimbing I, Dr.rer.nat. Fredy Kurniawan, M.Si selaku dosen pembimbing II, Dr. Hendro Juwono, M.Si atas bimbingannya, Kalab Mikrobiologi ITS atas bantuan alat elektroforesis, dan semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Titrawani, Biodiversiti Kodok Genus Rana Ditinjau dari Morfologi, Kariotip dan Pola Protein di Kodya Sawahlunto, Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, 1996.
- [2] P. R. Reddy and N. Raju, "Gel-Electrophoresis and Its Applications - Department of Chemistry, Osmania University, Hyderabad," InTech, India, 2012.
- [3] J. .. Jorgenson and K. D. Luckas, "High-Resolution Separations based on Elektrophoresis and Electroosmosis," *Journal of Chromatography*, vol. 4, pp. 209-216, 1981.
- [4] P. Gebauer, Capillary Zone Electrophoresis in Phosphate Buffer - known or unknown, Czech Republic: Institute of Analytical Chemistry Academy of Sciences of the Czech Republic, 2000.
- [5] G. W. David, Pharmaceutical Chemistry, Glasgow: Elsevier, 2011.
- [6] I. P. Griffith, Thesis, Australian National Univercsity, Canberra: A.C.T, 1970.
- [7] I. P. Griffith, "Immediate Visualization of Proteins in Dedocyl Sulfate-Polyacrylamide Gels by Prestaining with Remazol Dyes," *Analytical Biochemistry*, pp. 402-4012, 1972.
- [8] V. Dolnik, "Capillary Zone Electrophoresis of Proteins," *Electrophoresis*, pp. 2353-2361, 1997.
- [9] P. Barril and S. Nates, "Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities," *Gel Electrophoresis Principles and Basics*, pp. 1-14, 2012.
- [10] A. Brian, Sanderson, N. Araki, J. L. Lilley, G. Guerrero and L. K. Lewis, "Modification of Gel Archiecture and TBE/TAE buffer Composition to Minimize Heating during Agarose Gel Electrophoresis," *Analytical Biochemistry*, vol. 454, pp. 44-52, 2014.
- [11] S. Soedarmadji, Teknik Analisa Biokimiawi. Edisi Pertama, Yogyakarta: Liberty, 1996.
- [12] Sukardjo, Kimia Fisika, Jakarta: Rineka Cipta, 2002.
- [13] P. Atkins and J. d. Paula, Physical Chemistry, Ninth Edition ed., Great Britain: Oxford University Press, 2010.