

Daur Ulang Limbah Gel Agarose untuk Efisiensi Reagen Elektrofesis

Rumbiwati¹, Joko Trimuratno

¹Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan UGM, Jl. Farmako, Sekip, Yogyakarta, rumbiwati@gmail.com.

Submisi: 12 September 2021; Penerimaan: 30 Desember 2021

ABSTRAK

Penggunaan gel agarose dalam penelitian molekuler untuk melihat DNA dengan elektrofesis umumnya hanya digunakan sekali pakai. Sementara itu agarose merupakan bahan mahal dan perlu waktu lama dalam pemesanan. Pada penelitian ini peneliti mencoba mendaur ulang limbah gel agarose untuk digunakan kembali dalam elektrofesis agar penggunaan agarose lebih efisien.

Ada beberapa metode daur ulang gel agarose, diantaranya dioven dengan suhu 60°C, gel akan berbentuk kering, dihaluskan dan ditimbang kembali jika akan digunakan. Metode lain gel disimpan dalam freezer hingga menjadi es. Perbedaan penelitian ini dengan penelitian yang lain adalah metode daur ulang gel agarose ini lebih sederhana. Gel agarose daur ulang disimpan dalam plastik, dimasukkan dalam kulkas suhu 4°C. Jika akan digunakan kembali gel agarose dipotong kecil-kecil dimasukkan dalam elermeyer, dipanaskan dengan suhu tinggi sekitar 190°C menggunakan microwave dalam waktu 2 menit. Metode daur ulang gel agarose ini dinilai lebih efisien karena tidak perlu lagi menimbang agarose dan menghemat pemakaian agarose baru serta mengurangi limbah laboratorium

Berdasarkan hasil penelitian dari 5 kali daur ulang gel agarose, elektrofesis dengan gel agarose daur ulang 1 kali menunjukkan Gambar paling bagus yaitu pita DNA hasil PCR jelas dan sama dengan Gambar elektrofesis menggunakan gel agarose baru (kontrol). Daur ulang ke 5 menunjukkan visualisasi Gambar elektrofesis yang tidak jelas, sehingga dapat disimpulkan daur ulang gel agarose hanya bisa dilakukan 1 hingga 4 kali ulangan. Hal ini membuktikan bahwa daur ulang gel agarose dapat digunakan kembali untuk elektrofesis dengan hasil yang bagus, sesuai target yang diinginkan.

Kata kunci: Daur ulang, gel agarose, elektrofesis.

PENDAHULUAN

Penelitian molekuler tentang diagnose suatu penyakit saat ini berkembang dengan pesat. Penelitian ini menggunakan bahan baku DNA ataupun RNA hasil isolasi, dan selanjutnya sampel diuji dengan metode PCR maupun qPCR. Uji sampel dengan metode PCR, untuk melihat gen target menggunakan gel agarose yang disebut dengan elektrofesis (Sudjadi, 2008). Bahan agarose ini merupakan bahan yang cukup mahal harganya dan perlu

waktu lama dalam pemesanan. Gel agarose untuk elektrofesis biasanya hanya digunakan sekali dan setelah itu dibuang. Dalam penelitian ini peneliti mencoba mendaur ulang gel agarose untuk dapat digunakan kembali dalam elektrofesis agar penggunaan agarose lebih efisien. Gel agarose yang sudah tidak dipakai dipanaskan kembali dengan microwave dan dicetak ulang dengan penambahan pewarna seperti floro few sebagai pewarna DNA. Untaian DNA akan rusak pada suhu 190°C, (Liebert, 2013). Diharapkan dengan pemanasan

yang tinggi pada microwave untai DNA pada gel agarose daur ulang telah rusak sehingga akan menghasilkan gel agarose baru dan siap dipakai kembali untuk elektroforesis tanpa merubah hasil yang didapat.

Tujuan dari penelitian ini adalah memanfaatkan daur ulang limbah gel agarose untuk efisiensi reagen elektroforesis, mengetahui hingga berapa kali daur ulang limbah gel agarose dapat digunakan dan mengetahui daur ulang limbah gel agarose yang paling baik untuk efisiensi reagen elektroforesis.

METODE PENELITIAN

Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif yaitu menyimpulkan hasil dari visualisasi Gambar elektroforesis yang dihasilkan.

Metode Penelitian

Alat : cetakan agarose, chamber elektroforesis, *microwave*, sentrifuse, *thermo cycler*, UV transiluminator, nano drop, mikro pipet. Bahan : agarose, *floro fiew*, TBE 1x, akuadest, kit DNA, primer gen *Ace-1* Forward 5'-CGATAACGAATGGGGAACG-3' dan *Ace-1* Reverse 5'-TCAGAGGCTCACCGAACACA-3', *gotaq green*, sampel nyamuk, tip kuning, tip biru, tip putih, tube 1,5ml, tube 0,2ml. Cara kerja: Menyiapkan alat dan bahan. Mengisolasi DNA dari sampel nyamuk. Sampel nyamuk (*Aedes sp.*) sekitar 20 ekor diisolasi DNANYA menggunakan KIT DNA *tissue* merk Genaid, kemudian hasil isolasi diukur DNANYA menggunakan nano drop. DNA diamplifikasi dengan gen *Ace-1* menggunakan primer *Ace-1 F* dan *Ace-1 R*. Total volume yang digunakan untuk amplifikasi sebanyak 30µl, yang terdiri atas DNA *template* 2µl, primer 10µM 2µl, PCR mix 15µl, dan ddH₂O 11µl.

Tahapan PCR dilakukan dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit, diikuti oleh 35 siklus pada suhu 94°C selama 2 menit, suhu 58°C selama 1 menit, 72°C selama 2 menit. *Final extension* pada 72°C selama 7 menit, (Grigoraki *et al.*, 2015). Tahap berikutnya adalah pembuatan gel agarose untuk elektroforesis.

Pada penelitian ini pembuatan gel agarose dilakukan dengan tahap sebagai berikut: Pertama membuat gel agarose menggunakan agarose baru 2% dengan cara menimbang agarose 2 gram, memasukkan agarose dalam elemeyer. Menambahkan TBE 1x dalam agarose sebanyak 100ml, Agarose dipanaskan dengan *microwave* selama 2 menit sampai larut sempurna. *Floro fiew* konsentrasi 10mg/ml ditambahkan sebanyak 5µl. Gel agarose dicetak pada cetakan agarose, ditunggu sekitar 30 menit sampai gel agarose dingin dan siap digunakan. Tahap elektroforesis, berfungsi untuk melihat hasil amplifikasi DNA dengan PCR, (Fatchiyah, *at al.*, 2011). Gel agarose dimasukkan pada chamber elektroforesis. Ditambahkan TBE 1x sampai semua gel agarose tergenang, mengatur voltase pada angka 100V. Running gel selama 30 menit. Agarose bekas selanjutnya disimpan di kulkas suhu 4°C supaya tidak kering sebelum di daur ulang. Penyimpanan agarose bisa sampai 3-6 bulan.

Hasil elektroforesis dilihat di bawah UV transiluminator dan akan menunjukkan pita pada posisi 540bp. Daur Ulang Gel agarose (tahap perlakuan penelitian). Agarose bekas elektroforesis dikeluarkan dari kulkas ditunggu sampai suhu kamar. Agarose dari simpanan yang masih berbentuk batangan dipotong kecil-kecil, dan dimasukkan dalam elemeyer sampai volume 100ml. Untuk mempertahankan kondisi agarose tetap 2% ditambahkan TBE 1x sebanyak 1ml. Agarose

dipanaskan pada *microwave* selama 2 menit. *Floro fiew* ditambahkan sebanyak 2,5µl. Gel agarose dicetak pada cetakan agarose, ditunggu sekitar 30 menit sampai gel agarose dingin dan siap digunakan. Tahap ini merupakan daur ulang agarose I. Agarose bekas selanjutnya disimpan di kulkas suhu 4°C supaya tidak kering sebelum di daur ulang yang II dan seterusnya. Pada penelitian ini daur ulang dilakukan sebanyak 5 kali (sampai hasil elektroforesis tidak kelihatan). Elektroforesis dilakukan menggunakan sampel DNA yang sama dengan sebelumnya dan gel agarose hasil daur ulang. Hasil elektroforesis dilihat di bawah UV transiluminator dan dibandingkan hasil elektroforesis menggunakan gel agarose baru dengan hasil elektroforesis menggunakan agarose daur ulang menunjukkan pita pada posisi yang sama yaitu 540bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran konsentrasi DNA dengan nano drop dapat dilihat pada Tabel 1. Pada penelitian ini dilakukan 6 kali isolasi DNA dengan sampel yang berbeda sebagai ulangan perlakuan untuk dilihat hasil elektroforesisnya. Tiap sampel terdiri dari 20 ekor nyamuk. Dilihat dari hasil pengukuran konsentrasi DNA pada table 1 menunjukkan bahwa isolasi DNA dari sampel nyamuk berhasil dengan baik. Terbukti kemurnian DNA pada masing-masing sampel berkisar antara 1,797-1,987. Artinya kemurnian DNA yang didapat masih dalam kisaran yang diinginkan yaitu 1,7-2. Konsentrasi DNA yang di dapat cukup tinggi dari masing-masing sampel berkisar antara 98,172-178,816 ng/µl. Konsentrasi ini cukup untuk mendeteksi suatu gena dengan metode PCR yang hanya membutuhkan DNA dengan konsentrasi sekitar 10-50ng/µl

Tabel 1. Hasil pengukuran konsentrasi DNA.

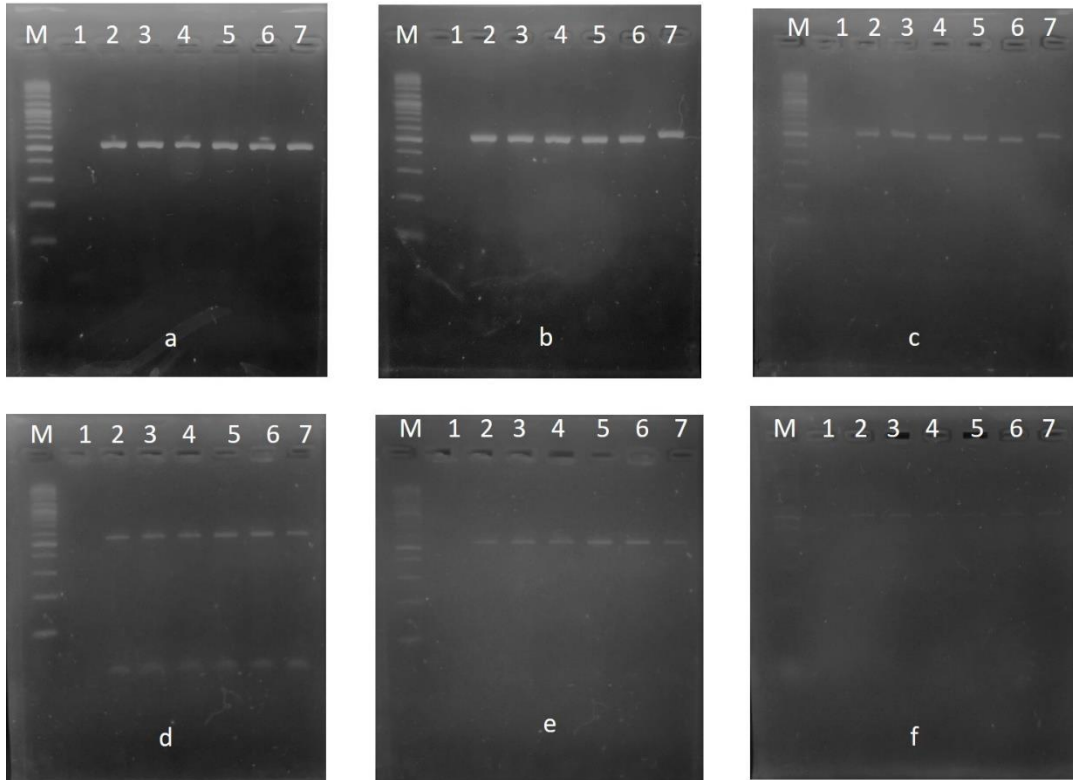
No Sampel	A260/A280	Konsentrasi DNA(ng/µl)
1	1,871	102,539
2	1,926	150,328
3	1,987	110,218
4	1,848	98,172
5	1,892	120,572
6	1,797	178,816

DNA hasil isolasi di PCR menggunakan mesin PCR dengan primer gen *Ace-1 Forward* 5'-CGATAACGAATGGGGAACG-3' dan *Ace-1 Reverse* 5'-TCAGAGGCTCACCGAACACA-3' yaitu gen resistensi yang terdapat pada nyamuk *Aedes aegypti*. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarose baru sebagai kontrol perlakuan dan gel agarose daur ulang sebagai perlakuan untuk melihat pita DNA pada target 540bp. Daur ulang gel agarose dilakukan sebanyak 5 kali sampai hasil elektroforesis tidak terbentuk pita yang diinginkan. Hasil elektroforesis dilihat di bawah UV transiluminator. Hasil elektroforesis gel agarose baru dan daur ulang dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada Gambar 1 dapat dilihat berdasarkan visualisasi elektroforesis ada perbedaan antara Gambar elektroforesis menggunakan gel agarose baru sebagai kontrol (a) dengan gel agarose daur ulang sebagai perlakuan (b,c,d,e,f). Dari 5 kali daur ulang gel agarose, daur ulang ke 5 menunjukkan visualisasi Gambar elektroforesis yang tidak jelas, sehingga dapat disimpulkan daur ulang gel agarose hanya bisa dilakukan 1 hingga 4 kali ulangan. Elektroforesis dengan gel agarose daur ulang 1 kali menunjukkan Gambar paling bagus yaitu pita DNA hasil PCR jelas dan sama dengan Gambar elektroforesis menggunakan gel agarose baru (kontrol). Hal ini membuktikan bahwa daur ulang gel agarose dapat digunakan

kembali untuk elektroforesis dengan hasil yang bagus, sesuai target yang diinginkan. Pita DNA yang terdapat dalam gel agarose akan terdegradasi ketika gel agarose daur ulang

dipanaskan dengan suhu tinggi sekitar 190°C. (Liebert ,2013). Pada metode daur ulang ini pemanasan dilakukan dengan *microwave* dalam waktu 2 menit.



Gambar 1: a: Elektroforesis agarose baru (kontrol), b: Elektroforesis daur ulang agarose 1 kali, c: Elektroforesis daur ulang agarose 2 kali, d: Elektroforesis daur ulang agarose 3 kali, e: Elektroforesis daur ulang agarose 4 kali, f: Elektroforesis daur ulang agarose 5 kali, M:Marker DNA. 1:Kontrol negatif PCR, (2-7 sampel nyamuk)

Daur ulang gel agarose pada penelitian ini hanya bisa dilakukan sampai 4 kali ulangan. Terbukti pada daur ulang gel agarose ulangan ke 5 menunjukkan visualisasi Gambar elektroforesis yang tidak jelas. Hal ini kemungkinan disebabkan karena sudah banyak sisa-sisa DNA pada gel agarose yang di elektroforesis sebelumnya. Sisa-sisa DNA ini sebagian ikut berpendar yang mengakibatkan fragmen DNA yang dielektroforesis menjadi tidak jelas, (Triwibowo, 2009).

Penelitian tentang metode daur ulang gel agarose pernah dilakukan

sebelumnya dengan cara mengeringkan gel agarose menggunakan oven suhu 60°C. Gel agarose akan berbentuk kering seperti serpihan kertas, selanjutnya serpihan ini dihancurkan sampai menjadi serbuk dan digunakan kembali seperti agarose baru sesuai konsentrasi yang diinginkan dengan menambahkan larutan buffer. (Palacious *at al.*, 2000). Penelitian serupa juga pernah dilakukan yaitu daur ulang gel agarose dengan cara gel agarose diletakkan dalam plastik dan dimasukkan dalam freezer selama 24 jam sampai menjadi es. Di dalam freezer gel akan

menjadi keras dan kering. Gel dapat digunakan kembali dengan cara gel dikeluarkan dari freezer, dipotong kecil-kecil dibiarkan pada suhu ruang dan dipanaskan kembali tanpa menambahkan buffer di dalamnya. Pembekuan gel agarose dapat menghilangkan konsentrasi etidium bromid yang bersifat toksik (racun). (Sasagawa, 2018).

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian yang lain adalah metode daur ulang gel agarose ini lebih sederhana. Gel agarose daur ulang disimpan dalam plastik dan dimasukkan dalam kulkas suhu 4°C. Jika akan digunakan kembali gel agarose dipotong kecil-kecil dimasukkan dalam elermeyer. Setiap volume 100ml gel agarose ditambahkan larutan buffer TBE 1x sebanyak 1ml. Penambahan buffer ini berfungsi untuk mempertahankan konsentrasi agarose agar tetap stabil pada waktu dipanaskan. Penelitian ini menggunakan *floro few* sebagai pewarna floresen dan ditambahkan 2,5µl konsentrasi 10mg/ml (setengah dari konsentrasi gel agarose baru) pada setiap pembuatan 100ml daur ulang gel agarose. Metode daur ulang gel agarose ini dinilai lebih efisien karena tidak perlu lagi menimbang agarose dan menghemat pemakaian agarose baru serta mengurangi limbah laboratorium.

PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Daur ulang limbah gel agarose dapat digunakan untuk tujuan efisiensi reagen elektroforesis.
2. Daur ulang limbah gel agarose dapat digunakan 1-4 kali ulangan untuk efisiensi reagen elektroforesis.
3. Daur ulang limbah gel agarose - sebanyak 1 kali akan memberikan hasil terbaik untuk efisiensi reagen elektroforesis.

Saran

Dapat dilakukan penelitian tentang daur ulang limbah gel agarose menggunakan metode dan parameter yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Bruce, A., D. Bray., J. Lewis, M. Raff., Roberts dan J.D. Watson, 1994. *Biologi Molekuler Sel Mengenai Sel*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Fatchiyah, Estri Laras Arumyngtias, Sri Widyarti, Sri Rahayu, 2011, *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Mary Ann Liebert, Inc, 2013, *DNA and Cell Biology*. Published in Volume: 32 Issue 6
- Muhammad Ridwan Harahap, 2018, *Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia dan Genetika*, Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro, Vol.2, No.1 hal. 21-26 ISSN: 2549.
- Noboru Sasagawa, 2018, *A freeze-and-thaw method to reuse agarose gels for DNA electrophoresis*, *BioScience Trends*; 12(6):627-629.
- Palacios G, Giménez C, García ED, 2000, *Recycling agarose*. *Plant Mol Biol Rep*. 18:47-4
- Sudjadi. (2008), *Bioteknologi Kesehatan*, Yogyakarta: Kanisius.
- Triwibowo Yuwono, (2009), *Biologi Molekuler*, Jakarta: Erlangga.