

MENGENAL METODE ELEKTROFORESIS

Oleh

Rianta Pratiwi ¹⁾

ABSTRACT

TO KNOW THE ELECTROPHORESIS METHOD. *Since the advent of starch gel electrophoresis in 1959, the technique of electrophoresis has been increasingly used to provide useful information in a wide range of biological and medical situation. One major area has been its use as a tool for Biology Molecular and Genetic. Such as generic analysis, using enzymatic proteins as markers of variation in the underlying genes. The genetic markers are useful for the identification of individuals, population structure analysis, the delineation of species boundaries and phylogenetic reconstruction. The electrophoresis methods convenient for all those intending use electrophoresis as a tool to answer practical questions in population structure analysis, systematic or specimen identification in Biology. In times of budgeting restraint, considerations of cost in terms of money and more especially, of time, are of paramount importance. In electrophoretic work, collecting the samples in the field may be much more expensive than the electrophoresis itself. This paper includes separate parts dealing with each of electrophoresis methods and data collection (handling the samples).*

PENDAHULUAN

Seiring dengan kemajuan zaman yang semakin pesat di negara-negara berkembang akan selalu diikuti pula dengan kemajuan ilmu pengetahuan yang semakin marak di bidang teknologi. Salah satu diantaranya adalah pengembangan di bidang Biologi Molekuler. Bidang ilmu pengetahuan Biologi Molekuler ini telah dimulai pada akhir abad ke 19, setelah metode elektroforesis ditemukan dan dipakai

untuk menganalisa berbagai kegiatan penelitian di bidang Kimia, Biologi (Genetika, Taksonomi dan Bio-sistematik).

Ringkasnya metode elektroforesis ini mulai berkembang akhir abad ke 19 setelah ditemukan penelitian yang menunjukkan adanya efek dari listrik terhadap partikel-partikel atau molekul-molekul yang bermuatan listrik, dalam hal ini termasuk juga protein (PORNET, QUINCKE, HARDY. Dalm RICHARDSON dkk, 1986). Menurut PASSTEUR dkk. (1988) elektroforesis berasal dari bahasa Yunani yang

¹⁾ Balitbang Biologi Laut. Puslitbang Oseanologi-LIPI, Jakarta

mempunyai arti transport atau perpindahan melalui partikel-partikel listrik.

Kedudukan elektroforesis di dalam Ilmu Biologi Molekuler.

Seperti telah dikatakan dalam pendahuluan bahwa, metode elektroforesis telah digunakan dan dikembangkan di dalam teknik analisa untuk penelitian-penelitian di bidang biologi dan genetika. Metode tersebut berkembang sangat pesat sekali di zaman kemajuan teknologi, disebabkan karena pengerjaannya sangat sederhana dan sangat mudah. Di bidang ilmu biologi ataupun biologi molekuler, metode elektroforesis banyak digunakan untuk taksonomi, sistematik dan genetik dari hewan ataupun tumbuhan.

Metode elektroforesis baru benar-benar dipakai oleh para peneliti genetik di tahun 1957 setelah HUNTER & MOLLER mempunyai ide penelitian dengan menggunakan sifat-sifat enzim sebagai katalisator untuk memperlihatkan keberadaannya secara Kimia Histologi (Zona elektroforesis) (PASTEUR *dkk.* 1988).

Struktur dan fungsi protein.

Sebelum melakukan metode elektroforesis guna mengetahui suatu populasi ataupun sistematik dari suatu jenis hewan ataupun tumbuhan, sebaiknya didasari terlebih dahulu dengan pengetahuan mengenai biokimia protein serta pengetahuan tentang metode elektroforesis.

Bila dilihat dari struktur protein, hampir sebagian besar sel terbentuk dari protein, karena di dalam sel bahan ini mencapai lebih dari separuh berat kering sel. Protein akan menentukan bentuk dan struktur sebuah sel serta bertindak sebagai alat utama pengenalan antar molekul dan proses katalis. Walaupun DNA menyimpan informasi yang dibutuhkan untuk sebuah sel, peran langsungnya sangat kecil dalam proses-proses di dalam sel (BRUCE *dkk* 1994).

Konformasi tiga dimensi sebuah molekul protein ditentukan oleh urutan asam aminonya. Dalam hal ini struktur pelipatannya dimantapkan oleh interaksi-interaksi non-kovalen antara bagian-bagian yang berbeda dalam rantai polipeptida. Asam-asam amino dengan rantai-rantai samping yang hidrofobik cenderung menggerombol di bagian sebelah dalam molekul, dan interaksi-interaksi ikatan hidrogen lokal antara ikatan-ikatan peptids yang berdekatan menyebabkan terbentuknya **alpha helix** dan **beta sheet**.

BRUCE *dkk.* (1994) mengatakan bahwa di dalam istilah komputer, DNA dan mRNA dapat disamakan sebagai "perangkat lunak atau software" yaitu rangkaian perintah yang diterima oleh sebuah sel dari induknya. Sedangkan protein dan molekul-molekul RNA yang katalitik dapat dianggap sebagai "perangkat keras atau hardware", yakni mesin pengeksekusi program-program yang tersimpan dalam memori.

DNA dan RNA adalah rantai-rantai nukleotida yang secara kimia hampir tidak saling berbeda, sedangkan sebaliknya protein terbuat dari campuran 20 macam asam amino yang sangat berlainan, masing-masing dengan sifat kimianya yang khas. Keragaman inilah yang memungkinkan sifat kimia yang serba canggih dimiliki oleh setiap protein, dan ini diduga dapat menjelaskan mengapa evolusi telah memilih protein dari pada molekul RNA sebagai katalisator yang terbesar reaksinya di dalam sel (BRUCE *dkk* 1994 dan RICARDSON *dkk.* 1986).

Menurut SCHULZ & SCHIRMER(1979) ada 16 asam amino yang berbeda yang digunakan oleh hewan, dan masing-masing asam amino tersebut mempunyai rantai samping yang berbeda pula. Rantai-rantai tersebut sangat berbeda dalam ukuran, bentuk, dan perintah. Perintah tersebut dapat positif, negatif atau netral, bervariasi untuk asam amino yang berbeda dan juga akan bervariasi dengan pH untuk setiap asam amino.

Sedangkan fungsi biologi sebuah protein menurut BRUCE *dkk.* (1994) dan RICHARDSON *dkk.* (1986) bergantung pada sifat-sifat kimia rinci di permukaannya. Tempat-tempat pengikatan yang berupa rongga-rongga di permukaan protein dibentuk oleh penempatan rantai-rantai samping asam amino secara tepat melalui pelipatan protein. Dengan mengikat sangat kencang molekul-molekul antara pada reaksi-reaksi yang tidak mantap, enzim-enzim mengkatalis perubahan-perubahan kimia pada molekul-molekul substrat yang terikat, sering kali dengan bantuan molekul-molekul ko-enzim yang kecil dan terikat kencang untuk menambah kecanggihan kimiawinya. Laju-laju reaksi enzim sering dibatasi oleh difusi namun dapat ditingkatkan bila enzim dan substratnya dikurung dalam kompartement kecil yang sama.

Protein alosterik dapat berubah-ubah bentuk bila ada ligan (sebuah molekul protein mengikat sebuah molekul lain, maka molekul kedua disebut dengan ligan) yang terikat pada permukaannya. Perubahan yang ditimbulkan oleh sebuah ligan sering berpengaruh terhadap pengikatan ligan yang lain, karena itu membentuk suatu mekanisme untuk pengaturan berbagai proses dalam sel. Perubahan-perubahan protein seperti itu dapat dibuat terarah apabila diberi energi kimia tambahan. sebagai contoh, apabila ATP, protein-protein dapat melakukan kerja yang bermanfaat misalnya membangkitkan gaya mekanik atau memompa ion-ion agar dapat memintas sebuah membran. "Mesin-mesin protein" yang sangat efisien dapat dibentuk dengan cara menyertakan protein-protein yang selalu bergerak ke dalam kompleks-kompleks multienzim; kompleks protein semacam ini tampaknya berfungsi menyelenggarakan berbagai reaksi biologi yang utama BRUCE *dkk.* (1994) dan RICHARDSON *dkk.* (1986).

Difinisi Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul (TITRAWANI 1996). Pemisahan dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran berat molekul dan muatan listrik yang dikandung oleh makro-molekul tersebut. Bila arus listrik dialirkan pada suatu medium penyangga yang telah berisi protein plasma maka komponen-komponen protein tersebut akan mulai bermigrasi (RICARDSON *dkk.* 1986).

Menurut STENESH dalam TITRAWANI (1996) teknik elektroforesis dapat dibedakan menjadi dua cara, yaitu : elektroforesis larutan (moving boundary electrophoresis) dan elektroforesis daerah (zone electrophoresis). Pada teknik elektroforesis larutan, larutan penyangga yang mengandung makro-molekul ditempatkan dalam suatu kamar tertutup dan dialiri arus listrik. Kecepatan migrasi dari makro-molekul diukur dengan jalan melihat terjadinya pemisahan dari molekul (terlihat seperti pita) di dalam pelarut. Sedangkan teknik elektroforesis daerah adalah menggunakan suatu bahan padat yang berfungsi sebagai media penunjang yang berisi (diberi) larutan penyangga.

Media penunjang yang biasa dipakai adalah gel agarose, gel pati, gel poliakrilamida dan kertas selulose poliasetat. Adapaun menurut SARGENT & GEORGE (1975) elektroforesis daerah disebut sebagai elektroforesis gel dengan dua buah model yaitu horizontal dan vertikal. Metode yang biasa digunakan adalah model horizontal, karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu peralatan yang digunakan sangat sederhana, relatif murah dan pemisahan untuk enzim tertentu dapat menghasilkan pemisahan yang lebih baik.

Kegunaan Metode Elektroforesis

Telah disebutkan di atas bahwa pola protein tertentu dari satu spesies hewan berbeda, secara elektroforesis akan memperlihatkan pola protein yang berbeda pula pada hewan lainnya. Faktor tersebutlah yang menyebabkan pola protein dapat digunakan untuk membedakan spesies hewan. Perbedaan pola protein inilah yang seringkali digunakan sebab untuk membedakan populasi secara tepat kadangkala tidak dapat dilakukan apabila hanya menggunakan pengamatan melalui morfologis saja. Fenomena ini pula yang menyebabkan metode elektroforesis banyak dilakukan untuk pengamatan taksonomi, sistematik dan genetik serta untuk mengidentifikasi spesies hewan maupun tumbuhan (bio-sistematik). Dapat pula digunakan untuk melihat phylogenetic reconstruction (rekonstruksi secara Filogenetik) dari suatu jenis hewan atau tumbuhan.

Elektroforesis

Sebelum dilakukan percobaan sebaiknya disiapkan dahulu alat dan bahan kimia yang akan digunakan. Alat yang biasa digunakan adalah tabung Eppendorf, mikropipet, tip, mortat, tabung Erlenmeyer, gelas ukur, penangas air (dengan suhu 80°C), magnetic stirrer, magnetic bar, sentrifuga, pinset, timbangan, pompa vacuum, cetakan gel 20 x 16 x 1 cm³, timer, meja pendingin, pembungkus plastik, freezer, kawat halus untuk memotong gel, inkubator, power supply, pisau, penggaris, spidol, kantong plastik tebal untuk menyimpan gel setelah pewarnaan, nampan plastik, spons dan alat-alat tulis.

Sedangkan untuk bahan kimia yang digunakan, tergantung dari hewan atau tumbuhan enzim apa yang akan diuji. Seperti misalnya larutan pengeksktra yang digunakan untuk jenis udang-udangan berdasarkan DICKSON *dkk*, (1983) adalah menggunakan sistem enzim Esterase (EST), dan Malat dehidrogenase (MDH). WIKNESWARI (1995) menggunakan Malik Enzim (ME), serta

CHELIAK & PITEL (1984) menggunakan Phosphat glukosa isomerase (PGI) dan lain sebagainya. Untuk menentukan sistem enzim tersebut sebelumnya dilakukan uji optimalisasi terlebih dahulu terhadap hewan yang akan diujikan.

Cara kerja terdiri dari beberapa tahap yaitu: 1. ekstraksi enzim, 2. pembuatan gel pati, 3. penempatan sampel, 4. proses elektroforesis, 5. visualisasi sistem enzim, 6. observasi gel dan 7. Metode analisis.

1. Ekstraksi enzim

Setelah sample dibersihkan ditempatkan di dalam mortar dan diberi larutan pengeksktrak sebanyak + 200 µ (tergantung dari banyak, sedikitnya sampel atau besar kecilnya sampel). Kemudian sampel digerus hingga halus. Penggerusan dilakukan pada kondisi dingin (+4°C) dan dilakukan di dalam meja pendingin, agar suhu tetap konstan. Hasil gerusan tersebut dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan kemudian dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang didapat dipisahkan dari endapan, yang selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan disimpan dalam lemari pendingin (Freezer) dengan suhu sekitar -70°C.

2. Pembuatan gel pati.

Pembuatan gel pati biasanya bermacam-macam. Ada yang berasal dari pati kentang, dan lain sebagainya. Setelah ditentukan banyaknya pati, maka diberikan larutan buffer morfolin sitrat dengan pH 6.1 sebanyak 350 ml di dalam labu erlenmeyer 1000 ml. Campuran tersebut kemudian dipanaskan dalam penangas air dengan suhu $\pm$ 80 °C, selama 25 menit. Panaskan lagi dengan magnetic bar dan diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer selama 5 menit hingga mengental membentuk gel yang bening.

Setelah gel mendidih, dilakukan pengisapan gelembung udara dengan cara diisap dengan "water jet pump" dan setelah

dingin, gel dituangkan ke dalam cetakan gel yang berukuran 20 x 16 x 1 cm³ hingga rata dan biarkan mengeras pada suhu kamar lebih kurang 60menit.

3. Penempatan sampel

Gel dilepaskan dari cetakan gel dengan cara mengiris keliling tepi gel dengan menggunakan pisau. Bagian ujung gel diiris kira 2 cm dari salah satu tepinya yaitu dari arah kotada yang dipakai sebagai penyimpan ekstra enzim.

Ekstrak enzim yang akan diuji dikeluarkan dari freezer dan biarkan sebentar hingga mencair. Pengambilan ekstrak enzim dilakukan dengan cara mencelupkan kertas saring berukuran 6x15 mm ke ekstrak enzim. Potongan kertas saring yang telah berisi ekstrak enzim diletakkan dengan posisi tegak lurus ke celah irisan gel. Jarak antara celah 1-1.5 mm. Sebagai indikator adanya pergerakan maka pada celah irisan gel tersebut diberikan sedikit biru brom fenol.

4. Proses elektroforesis

Gel yang telah siap kemudian diletakkan secara horizontal di atas kotak elektroforesis yang telah berisi larutan penyangga elektroda. Proses ini dilakukan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4 °C.

Kedua sisi gel diberi spons yang telah dibasahi dengan larutan penyangga elektroda sebagai jembatan antar larutan penyangga elektroda dengan gel. Setelah itu gel ditutup dengan plastik dan di atas gel tersebut diberi gel yang dingin. Proses elektroforesis dijalankan dengan memberi daya listrik pada gel. Pemberian daya listrik disesuaikan dengan sampel yang akan digunakan, misalnya sebesar 50 - 70 μ A, 50-60 μ A atau 45-55 μ A selama kurang lebih 3 jam.

Setelah terlihat bahwa biru brom fenol mencapai titik yang berjarak $\pm$ 3 cm dari ujung gel, maka proses elektroforesis dihentikan. Bagian gel yang tidak terpakai dipotong,

sedangkan potongan gel yang menjadi tempat migrasi enzim diiris tipis secara horizontal dengan menggunakan gergaji yang berkawat tipis. Gel diiris menjadi beberapa lembar gel yang kemudian setiap lembar diletakkan dalam wadah plastik, untuk selanjutnya diwarnai sesuai enzim yang akan dianalisis.

5. Visualisasi sistem enzim

Visualisasi sistem dilakukan dengan pewarna biokimia. Dengan komposisi yang telah ditentukan sebelumnya.

6. Metode analisis

Dalam hal ini cara menganalisa hasil pita dari elektroforesis tersebut sangat tergantung dari topik apa yang akan diteliti. Hasil visualisasi enzim berupa bintik atau noda yang disebut pola pita (bandmorp). Macam pola pita dibedakan atas tipe pola pita yang terbentuk. Semua tipe pola pita yang berbentuk diinterpretasikan sebagai lokus isozim dan alel yang kemudian dijadikan dasar dalam pengukuran parameter-parameter yang ada dalam suatu populasi (NEI 1977; BROWN & WEIR 1983; ROTHE 1995). Lokus isozim adalah struktur gen yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim pengkatalisis reaksi biokimia tertentu, sedangkan alel adalah salah satu dari dua atau lebih bentuk gen yang dapat muncul pada satu lokus (SUZUKI *dkk.* 1993).

Metode analisis dapat dilakukan dengan beberapa cara misalnya metode analisis ekspresi alel, atau metode analisis fenetik dan lain sebagainya.

Sedangkan untuk menangani sampel dari mulai pengambilan di lapangan hingga penyimpangan dapat diterangkan sebagai berikut:

1.Koleksi Sampel

Agar proses elektroforesis dapat berhasil dengan baik, tidak lepas dari proses pengambilan sampel di lapangan. Untuk pengambilan sampel sangat diperlukan

pengertian dan pengetahuan yang benar terhadap metode serta sampling yang digunakan. Disamping juga pengetahuan mengenai dasar bio-kimia dari protein. Karena proses elektroforesis sangat berpengaruh dengan jaringan-jaringan dan protein yang terdapat pada hewan koleksi.

Sampel yang akan diambil sedapat mungkin harus segar atau untuk hewan diusahakan agar tetap hidup dan tidak boleh diawetkan dengan menggunakan bahan pengawet alkohol ataupun formalin. Atau apabila hewan tersebut mati, maka sebaiknya disimpan dalam bentuk dingin atau membeku (masukkan dalam ice box yang diberi dry es atau masukkan ke dalam larutan nitrogen cair).

2. Penanganan dan Penyimpanan Sampel

Apabila telah diperoleh sampel yang diinginkan, maka sampel segera dibawa ke laboratorium untuk disimpan ke dalam freezer dengan suhu -50°C. Sampel-sampel tersebut dapat disimpan dalam jangka waktu panjang, hingga proses elektroforesis siap dilakukan. Sebelum dimasukkan ke dalam freezer, sampel disimpan dalam kotak plastik atau bila dalam bentuk jaringan atau supernatan dapat dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf.

DAFTAR PUSTAKA

- BROWN, A.H.D dan B.S. WEIR 1983. Measuring Variability in Plant Population. *In* : S.D. TANKSLEY and T. J. ORTON (eds.), *Isozymes in plant Genetics and Breeding*. Part A. Elsevier Science Publisers, Amsterdam: 219 pp.
- BRUCE, A., D. BRAY., J. LEWIS, M. RAFF., ROBERTS dan J.D. WATSON 1994. *Biologi Molekuler Sel Mengenai Sel*. Edisi kedua PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta: 346 hal.
- CHELIAK, W. M dan J. A. PITEL 1984. Techniques for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Species. Information Report PI - X - Y2. Petawawa National Forestry Institute. Canadian Forestry Service Agriculture Canada : 127 pp.
- DICKSON, R, SIEGMUND., S. SCHNEIDER, H. J. LINZEN, B. GIELENS, C. PREAUX., G. LONTIE., R. KELLERMANN dan J. F. LOTTSPEICH 1983. Complete Amino Acid sequence of a Functional Unit from a Molluscan Hemocyanin (*Helix pomatia*). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368 : 617 pp.
- NEI, M. 1977. F-Statistic and Analysis of Gen Diversity in Subdivided Populations. *Ann. Hum. Genet.* 41:255.
- PASTEUR, N, G. PASTEUR., F. BONHOMME., J. CATALAN., J. BRITTON. dan DAVIDIAN., 1988. *Practical Isozyme Genetics*. Laboratory of Ecological Genetics, University of Montpellier 2. France: 54 pp.
- RICHARDSON, B. J, P. R. BAVERSTOCK and M. ADAMS 1986. *Allozyme Electrophoresis*. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies. Academic Press, Inc. San Diego : 410 pp.
- ROTHER, G. M. 1995. *Electrophoresis of Enzymes*. Springer - Verlag. Berlin Heidelberg: 278 pp.
- SARGENT, J. R. dan S. G. GEORGE 1975. *Methods in Zone Electrophoresis* BDH Chemical LTD. Poole England: 219 pp.

- SCHULZ, G. E dan R.H. SCHIRMER 1979. Principles of Protein Structure. New York. Springer: 23.
- SUZUKI, D.T.J., A.I GRIFFITHS., J.H. MILLER dan R.C. LEWOTIN 1993. *An Introduction to Genetic Analysis*. W.H. Freeman and Co, New York: 11.
- TITRAWANI 1996. Biodiversiti Kodok Genus Rana Ditinjau dari Morfologi, Kariotip dan Pola Protein di Kodya Sawahlunto. Program Pasca Sarjana. Institute Pertanian Bogor: 76 hal.
- WIKNESWARI, R., 1995. Development of Biochemical Genetic Marker for Tropical Rainforest Species. *Proc. Malaysia. Biochem. Soc. Cont.* 16:6.