

## OPTIMASI GELRED SEBAGAI PEWARNA DNA DALAM BIOLOGI MOLEKULER

Sari M. Dewi Nataprawira<sup>1</sup>, Erick Sidarta<sup>2</sup>, Arlends Chris<sup>3</sup>

Departemen Histologi, Universitas Tarumanagara<sup>1,3</sup>

Departemen Biologi Universitas Tarumanagara<sup>2</sup>

Email: sarid@fk.untar.ac.id, ericksi@fk.untar.ac.id, arlendsc@fk.untar.ac.id

### Abstrak

Pewarnaan DNA merupakan sebuah proses penting dalam elektroforesis gel agarosa. Proses ini memungkinkan penggunaannya untuk melihat pita asam deoksiribonukleotida (DNA) hasil dari proses amplifikasi oleh teknik polymerase chain reaction (PCR) ataupun modifikasinya seperti metode restriction fragment length polymorphism (RFLP). Pewarna DNA yang umum digunakan dalam proses tersebut adalah ethidium bromide yang memiliki bahaya karena bersifat mutagenik. Pewarna DNA Gelred merupakan alternatif untuk ethidium bromide yang dinilai memiliki tingkat keamanan yang lebih baik untuk penggunaannya. Penelitian ini bertujuan untuk melihat kemampuan Gelred sebagai pewarna DNA, cara terbaik untuk menggunakannya serta melihat sensitivitasnya. Pada penelitian ini 100-1000 bp DNA Ladder dengan konsentrasi berbeda digunakan sebagai penanda untuk membandingkan metode terbaik (pre-cast, post-staining dan pre-loading/pre-staining) untuk menggunakan Gelred. Selain itu dua buffer elektroforesis umum (TAE dan TBE) digunakan untuk membandingkan hasil pewarnaan DNA. Hasil dari penelitian ini didapatkan bahwa Gelred mempengaruhi migrasi DNA pada gel agarosa. Migrasi tersebut juga dipengaruhi oleh jenis buffer yang digunakan, konsentrasi agarosa, ukuran DNA, konsentrasi DNA dan metode yang digunakan (pre-cast, post-staining atau pre-loading/pre-staining). Metode terbaik untuk mendapatkan hasil visualisasi yang tajam adalah metode pre-cast dengan buffer TAE, dengan kelemahannya adalah konsentrasi dan panjang DNA sangat mempengaruhi visualisasi. Metode yang paling stabil untuk digunakan adalah metode pre-loading/pre-staining dengan buffer TAE dengan kelemahan visualisasi pita DNA yang dihasilkan tidak setajam metode pre-cast. Menurut hasil penelitian ini peneliti menyarankan penggunaan metode pre-loading/pre-staining dengan buffer TAE apabila menggunakan Gelred yang disebabkan oleh efisiensi dan kecepatan proses.

**Kata Kunci:** Gelred, Pre-Cast, Pre-Loading, Pre-Staining, Elektroforesis, Agarose.

### Abstract

*DNA staining is an essential process when using agarose gel electrophoresis to visualize DNA band. This process is used when the user needs to visualize the amplified DNA band after polymerase chain reaction (PCR) method or its modified*

How to cite:	Nataprawira, Dewi et al., (2022) Optimasi Gelred sebagai Pewarna DNA dalam Biologi Molekuler, <i>Syntax Literate : Jurnal Ilmiah Indonesia</i> (7)12, <a href="http://dx.doi.org/10.36418/syntax-literate.v7i12.9981">http://dx.doi.org/10.36418/syntax-literate.v7i12.9981</a>
E-ISSN:	2548-1398
Published by:	Ridwan Institute

*methods such as restriction fragment length polymorphism (RFLP). The most commonly used DNA staining is ethidium bromide which also known has mutagenic effect. Gelred is offered as an alternative to ethidium bromide which offer safety to the user. This study was aimed to investigate the capabilities of Gelred as DNA staining, the best method of staining using Gelred, and determine the sensitivity of the Gelred. In this study, 100-1000 bp DNA ladder with different dilution were used as marker to compare different staining method (pre-cast, post-staining and pre-loading/pre-staining). This study showed that Gelred affect DNA migration in agarose gel electrophoresis. The DNA migration also affected by the buffer used, agarose gel concentration, DNA size and concentration and the method used for staining. The best method which gave a sharp contrast band was pre-cast method using TAE buffer, although it need optimization for DNA concentration used for visualization. The most stable method was pre-loading/pre-staining using TAE buffer, although the DNA visualization was not as sharp as pre-cast method. The author recommended the use of pre-loading/pre-staining method with TAE buffer when using Gelred for efficiency and fast result.*

**Keywords:** *Gelred, Pre-Cast, Pre-Loading, Pre-Staining, Elektrophoresis, Agarose.*

## **Pendahuluan**

Teknik PCR dan gel elektroforesis merupakan teknik yang tidak bisa dipisahkan. Hal ini karena hasil dari teknik PCR berupa *amplicon*, yaitu DNA yang telah diperbanyak oleh teknik PCR, harus dibaca dengan melakukan gel elektroforesis.(Williams, 2001) Dalam melakukan gel elektroforesis, agarosa murni, buffer, aliran listrik, pemberat DNA dan pewarna yang mampu berinterkalasi dengan DNA merupakan hal yang dibutuhkan untuk melakukan proses tersebut (J. Sambrook i D. W. Russell, 2001). Dari bahan-bahan yang telah disebutkan diatas, pewarna yang mampu berinterkalasi dengan DNA merupakan bahan kimia yang paling berbahaya terhadap operator yang bekerja.(Debroy et al., 2022) Salah satu pewarna yang mampu berinterkalasi dengan DNA yang sering dipakai di laboratorium DNA adalah ethidium bromide.(Lee et al., 2012b)

Ethidium bromide merupakan mutagen karena dapat berinterkalasi dengan DNA utas ganda yang terdapat pada manusia. Adanya interkalasi tersebut dapat mengakibatkan gangguan dalam proses biologis dari suatu sel seperti replikasi DNA dan transkripsi. Di dalam laboratorium yang bergerak di bidang rekayasa DNA, ethidium bromide merupakan senyawa yang populer digunakan karena harganya yang murah, stabil dan memiliki sensitivitas yang tinggi dalam proses visualisasi DNA.(Lee et al., 2012a) Dalam penggunaannya, operator yang bekerja harus memiliki pelatihan yang cukup untuk menangani ethidium bromide. Selain itu, operator juga harus mampu mengolah limbah yang dihasilkan dari ethidium bromide tersebut sebelum dibuang (Borst, 2005).

Sekarang ini, telah banyak alternatif dari ethidium bromide yang dapat digunakan untuk visualisasi hasil elektroforesis DNA seperti FAST BLAST(Choi et al., 2010),

SYBRSAVE(Scientific, n.d.), GELRED, GELGREEN(Haines et al., 2015) dan lainnya. Sekalipun tidak dapat menandingi harga dari ethidium bromide, Gelred diklaim memiliki keunggulan daripada ethidium bromide seperti memiliki sensitivitas yang lebih tinggi, aman untuk pekerjaannya dan pengolahan limbah yang tidak berbahaya (Biotium, n.d.-a; Haines et al., 2015). Sekalipun demikian, Gelred juga memiliki kelemahan seperti mengganggu mobilitas dari DNA ketika dilakukan proses elektroforesis. Pada penelitian sebelumnya, hasil dari elektroforesis DNA dengan menggunakan Gelred mengakibatkan retardasi yang berlebihan dari DNA yang dielektroforesis menggunakan agarosa yang dicampur dengan Gelred (metode *pre-cast*). Hal tersebut mengakibatkan kemunculan pita-pita yang tidak rata sehingga menyulitkan untuk dilakukan analisis. Beberapa saran telah diajukan oleh pembuat untuk melakukan beberapa variasi konsentrasi agar, penggunaan buffer TBE, menggunakan metode *post-staining* dan bahkan variasi konsentrasi dari Gelred yang digunakan. Sebuah komunikasi singkat oleh Huang et al. bahkan menyarankan metode *pre-loading* untuk digunakan dengan Gelred (Huang et al., 2010).

Berdasarkan yang telah dipaparkan sebelumnya, Gelred merupakan alternatif yang menarik untuk digunakan selain ethidium bromide. Akan tetapi, faktor-faktor yang mempengaruhi laju mobilitas dalam penggunaan Gelred belum diinformasikan. Penelitian ini bertujuan melihat kemampuan Gelred sebagai pewarna DNA, faktor yang mempengaruhi penggunaan Gelred seperti konsentrasi DNA dan ukuran DNA, metode terbaik untuk digunakan dengan Gelred dan sensitivitasnya.

## **Metode Penelitian**

### **1. Sampel uji**

Sampel yang digunakan adalah DNA ladder dengan ukuran 100 – 1000 bp (PCR Ranger, kode katalog 11400, Norgen Biotek, Kanada)

### **2. Elektroforesis dengan metode *pre-cast***

Agarosa dengan konsentrasi 2% dan 1% dibuat dengan menggunakan buffer TAE 1X dan TBE 1X sebagai pelarut dan ditambahkan 1% Gelred sebelum dicetak. DNA ladder dimasukkan dengan berbagai konsentrasi yaitu: 1X (tanpa pengenceran), 0.8X, 0.6X, 0.4X, 0.2X dan 0.1X dan dielektroforesis dengan kondisi 80 A selama 50 menit.

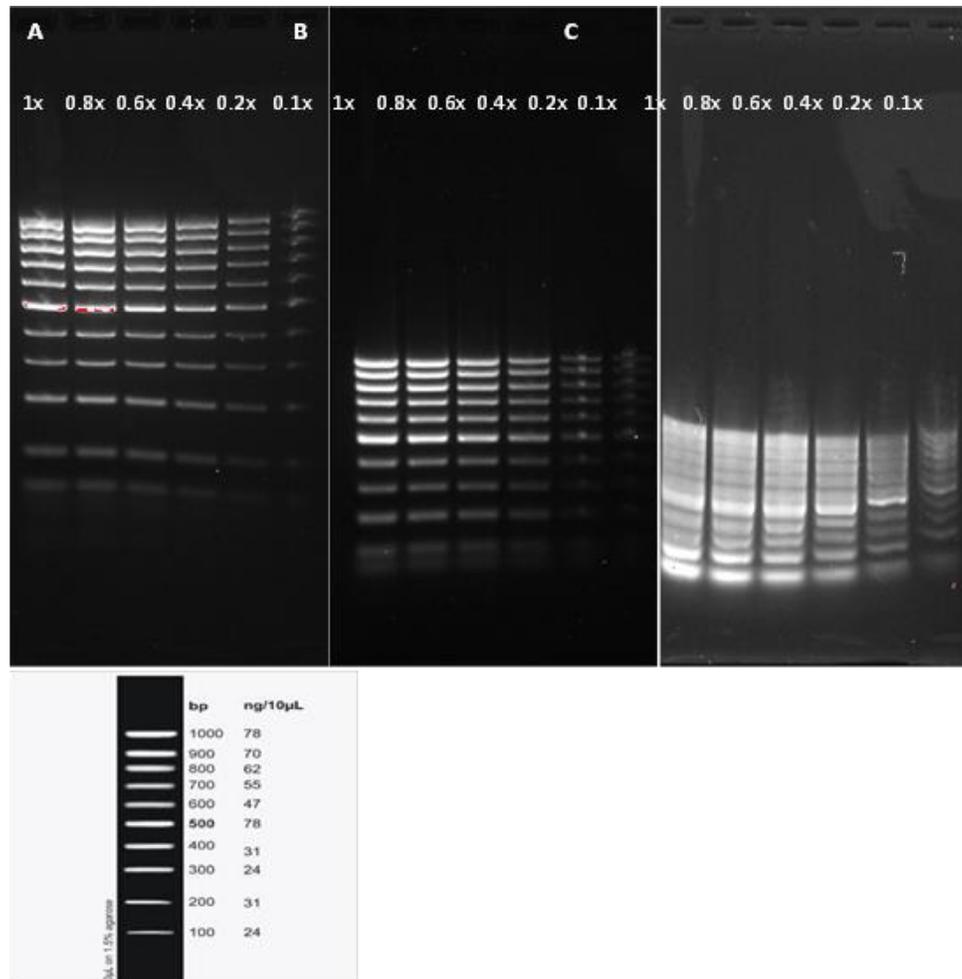
### **3. Elektroforesis dengan metode *post-staining***

Agarosa dengan konsentrasi 2% dengan buffer TAE 1X sebagai pelarut dibuat tanpa menambahkan Gelred. DNA ladder dimasukkan dengan berbagai konsentrasi yaitu: 1X (tanpa pengenceran), 0.8X, 0.6X, 0.4X, 0.2X dan 0.1X dan dielektroforesis dengan kondisi 80 A selama 50 menit. Setelah elektroforesis dilakukan pewarnaan dengan merendam agar hasil elektroforesis dalam larutan berisi Gelred 3X pada alat orbital shaker selama 30 menit.

### **4. Elektroforesis dengan metode *pre-loading/pre-staining***

Agarosa dengan konsentrasi 2% dengan buffer TAE 1X dan TBE 1X sebagai pelarut dibuat tanpa menambahkan Gelred. DNA ladder dengan berbagai konsentrasi yaitu: 1X (tanpa pengenceran), 0.8X, 0.6X, 0.4X, 0.2X dan 0.1X ditambahkan 2  $\mu$ l Gelred dengan berbagai pengenceran yaitu tanpa pengenceran, 50X pengenceran dan 100X pengenceran dan dielektroforesis dengan kondisi 80 A selama 50 menit.

## Hasil dan Pembahasan



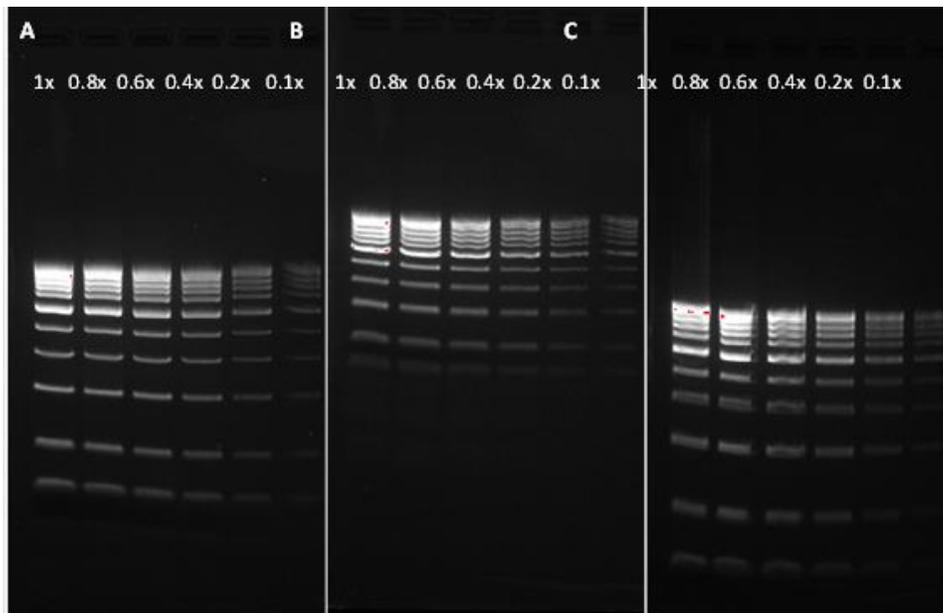
**Gambar 1. Hasil elektroforesis: (A) 2% agarose metode pre-cast, (B) 1% agarose metode pre-cast, (C) 2% agarose metode post-staining, (D) keterangan DNA Ladder yang digunakan (<https://norgenbiotek.com/product/pcr-sizer-100-bp-dna-ladder>).**

Pada gambar 1 dapat dilihat perbandingan dari hasil elektroforesis yang dilakukan dengan berbagai variasi. Pada gambar 1A dapat dilihat bahwa pemisahan DNA ladder pada agarosa dengan konsentrasi 2% dengan metode *pre-cast* kurang baik untuk pita DNA

berukuran 700 sampai 1000 bp (*base pair* – pasang basa) dengan konsentrasi sesuai rekomendasi produk. Sementara proses pemisahan yang baik terjadi pada DNA ladder yang semakin diencerkan sampai ke konsentrasi DNA ladder 0.2X nya. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi dan ukuran dari pita DNA mempengaruhi migrasi yang terjadi pada gel agarosa yang telah dicampurkan dengan Gelred. Dari percobaan ini dapat dilihat bahwa pada konsentrasi agarosa 2% dengan metode *pre-cast*, pita DNA yang digunakan untuk menganalisa harus berada pada kondisi konsentrasi maksimal 78 ng/ml untuk ukuran 100 – 500 bp dan 31.2 ng/ml untuk ukuran 700 – 1000 bp.

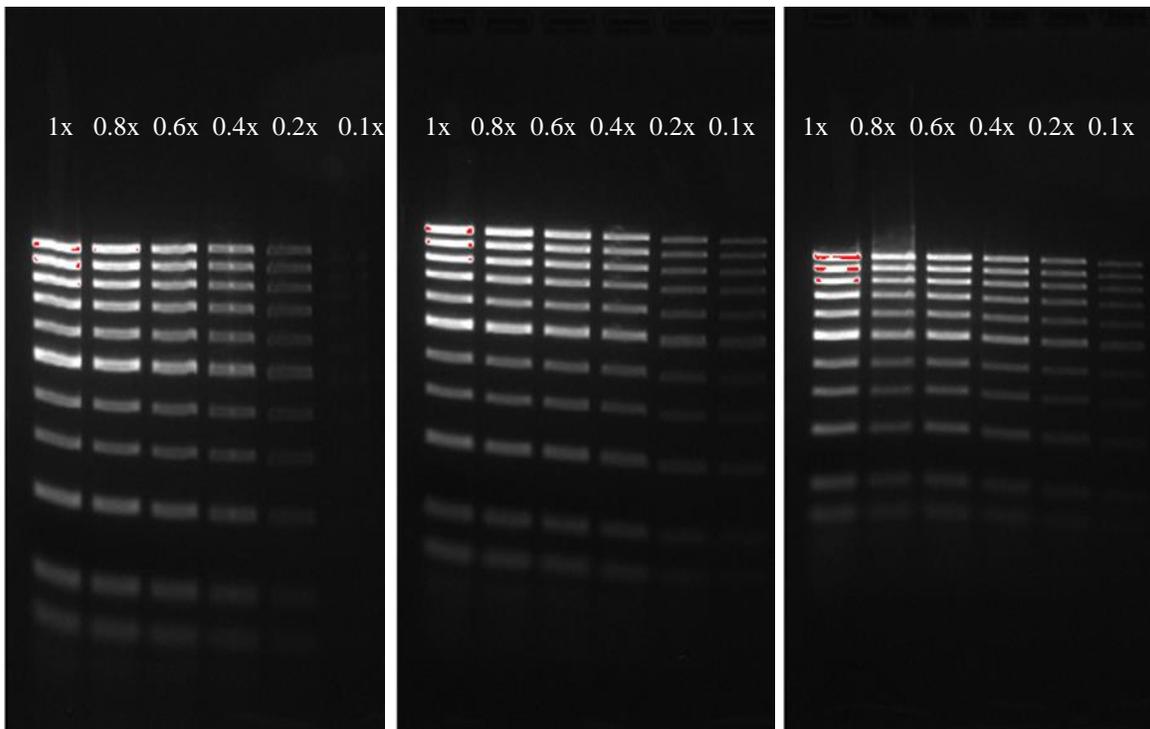
Pada gambar 1B dapat dilihat pemisahan DNA ladder yang baik pada agarosa dengan konsentrasi 1% pada kondisi DNA ladder tanpa pengenceran sampai diencerkan 0.4X. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi agarosa juga mempengaruhi migrasi DNA pada metode *pre-cast*. Salah satu penjelasan mengenai proses migrasi ini dapat disebabkan oleh struktur dari Gelred itu sendiri, Gelred terdiri dari dua subunit ethidium bromide yang dihubungkan oleh spacer oksigen.(Crisafuli et al., 2015; Huang et al., 2010) Hal ini membuat Gelred memiliki ukuran yang besar dan juga yang memberikan manfaat keamanan pengguna seperti kemampuannya untuk tidak menembus kulit. Gelred yang ditambahkan ke dalam agarosa akan membentuk matriks pemisahan yang pada setiap bagian matriksnya terdapat molekul tersebut. Hal ini mengakibatkan interkalasi yang kuat antara DNA yang melalui matriks berisi Gelred tersebut sehingga terjadi retardasi migrasi DNA yang berlebihan.

Salah satu saran yang dianjurkan oleh vendor dari produk adalah menggunakan metode *post-staining*, yaitu sebuah metode dimana proses pewarnaan dilakukan setelah proses elektroforesis berakhir.(Biotium, n.d.-b, n.d.-a) Proses ini nampaknya dibuat untuk mengatasi masalah migrasi DNA pada metode *pre-cast*. Akan tetapi, pada penelitian ini dapat dilihat (gambar 1C) bahwa pemisahan yang terjadi sekalipun cukup baik, pita DNA tidak terlihat tegas. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya perlakuan *staining* dimana agarosa didiamkan dalam larutan pewarna berisi Gelred selama 30 menit. Perlakuan tersebut mengakibatkan DNA yang sudah tidak bergerak oleh proses tarikan listrik berdifusi ke sekitarnya. Pada gambar 1 juga dapat dilihat bahwa perbedaan jarak migrasi antara metode *pre-cast* dengan *post-staining* yang membuktikan bahwa Gelred yang terdapat di dalam agarosa mempengaruhi migrasi DNA.



**Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA ladder pada menggunakan buffer TBE: (A) 2% agarosa metode pre-cast, (B) 1% agarosa metode pre-cast, (C) 2% agarosa metode pre-loading/pre-staining dengan 100X pengenceran Gelred.**

Pada gambar 2 dapat dilihat hasil elektroforesis menggunakan buffer TBE. Buffer ini merupakan buffer umum yang menjadi alternatif TAE. Salah satu keunggulan buffer TBE ini adalah kemampuannya untuk migrasi DNA yang lebih cepat. Hal ini dapat terlihat dari kecepatan migrasi DNA ladder yang lebih cepat jika dibandingkan dengan buffer TAE. Pada elektroforesis menggunakan buffer TBE settingan elektroforesisnya adalah 20 menit dengan kekuatan 50 Ampere. Akan tetapi dapat dilihat dari gambar 2 bahwa pemisahan untuk DNA dengan ukuran antara 600 – 1000 bp kurang baik. Hal ini menunjukkan bahwa TBE jauh lebih baik digunakan untuk DNA yang berukuran dibawah 600 bp. Hasil ini juga didukung oleh Miura et al. yang menyatakan bahwa TBE jauh lebih baik untuk pemisahan DNA dalam ukuran kecil (Y et al., 1999).



**Gambar 3. Elektroforesis DNA ladder pada 2% agarosa dengan metode pre-loading/pre-staining menggunakan buffer TAE: (A) tanpa pengenceran Gelred, (B) 50X pengenceran Gelred, (C) 100X pengenceran Gelred.**

Pada gambar 3 dapat dilihat hasil pemisahan yang baik dari DNA ladder yang digunakan dengan metode *pre-loading/pre-staining*. Pada metode ini DNA yang diujikan dicampur terlebih dahulu dengan Gelred dan dilakukan elektroforesis. Pengenceran dari pewarna Gelred yang digunakan, 50X dan 100X, tidak mempengaruhi sensitivitas dari pembacaan pita DNA. Akan tetapi, apabila dibandingkan dengan metode *pre-cast*, pita DNA dari metode *pre-loading/pre-staining* terlihat tidak setajam metode *pre-cast*. Hal ini akan sangat berpengaruh apabila terdapat dua pita yang memiliki ukuran yang tidak terlalu jauh berbeda sehingga akan mempersulit pembacaan hasil. Metode *pre-loading/pre-staining* telah disarankan oleh Hall, sekalipun tidak termasuk dalam troubleshooting oleh vendor, mengingat efisiensi penggunaan yang lebih sedikit daripada yang disarankan. (Hall, 2020) Pada penelitian ini, dapat dilihat juga kestabilan metode ini dalam semua konsentrasi DNA yang dilakukan.

### **Kesimpulan**

Pewarna DNA Gelred merupakan alternatif baru dari ethidium bromide yang dapat digunakan dalam pewarnaan DNA. Dalam penelitian ini nampak bahwa migrasi DNA menggunakan Gelred dipengaruhi oleh jenis buffer yang digunakan, konsentrasi agarosa,

ukuran DNA, konsentrasi DNA dan metode yang digunakan (pre-cast, post-staining atau pre-loading/pre-staining). Untuk mendapatkan visualisasi pita DNA yang tajam, metode terbaik adalah metode pre-cast dengan kelemahannya adalah perlunya optimasi konsentrasi agarosa, ukuran DNA dan konsentrasi yang digunakan. Sementara itu metode yang paling stabil untuk digunakan adalah metode pre-loading/pre-staining dengan kelemahan visualisasi pita DNA yang dihasilkan tidak setajam metode pre-cast. Buffer terbaik menurut penelitian ini adalah buffer TAE yang dapat memberikan perbedaan yang jelas untuk visualisasi pita DNA dengan ukuran dari 100 -1000 bp.

Peneliti menyarankan untuk menggunakan metode pre-loading/pre-staining dengan konsentrasi Gelred yang sudah encerkan 50x untuk setiap amplicon yang akan dielektroforesis dan penggunaan buffer TAE.

## BIBLIOGRAFI

- Biotium. (n.d.-a). *GelRed® & GelGreen® - DNA Stains | EtBr Alternatives | Biotium, Inc.* 2018.
- Biotium. (n.d.-b). *GelRed® and GelGreen® troubleshooting.* 2018.
- Borst, P. (2005). Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: How it started. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 57(11), 745–747. <https://doi.org/10.1080/15216540500380855>.
- Choi, H. J., Ko, M., & Ahn, J. H. (2010). DNA fingerprinting using PCR: a practical forensic science activity. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/00219266.2008.9656148*, 43(1), 41–44. <https://doi.org/10.1080/00219266.2008.9656148>.
- Crisafuli, F. A. P., Ramos, E. B., & Rocha, M. S. (2015). Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain. *European Biophysics Journal : EBJ*, 44(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S00249-014-0995-4>.
- Debroy, A., Yadav, M., Dhawan, R., Dey, S., & George, N. (2022). DNA dyes: toxicity, remediation strategies and alternatives. *Folia Microbiologica*, 67(4), 555–571. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-00963-8>.
- Haines, A. M., Tobe, S. S., Kobus, H. J., & Linacre, A. (2015). Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 36(6), 941–944. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201400496>.
- Hall, A. C. (2020). A comparison of DNA stains and staining methods for Agarose Gel Electrophoresis. *BioRxiv*, 568253. <https://doi.org/10.1101/568253>.
- Huang, Q., Baum, L., & Fu, W. L. (2010). Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical Laboratory*, 56(3–4), 149–152.
- J. Sambrook i D. W. Russell. (2001). Molecular cloning : a laboratory manual, III. In *Red. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.* <https://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2012.01075>.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012a). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62. <https://doi.org/10.3791/3923>.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012b). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 62, 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>.

Sari M. Dewi Nataprawira, Erick Sidarta, Arlends Chris

Scientific, T. (n.d.). *SYBR Safe Frequently Asked Questions / Thermo Fisher Scientific - ID*. 2018.

Williams, L. R. (2001). Staining nucleic acids and proteins in electrophoresis gels. *Biotechnic and Histochemistry*, 76(3), 127–132. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.127.132>.

Y, M., H, W., & T, K. (1999). TBE, or not TBE; that is the question: Beneficial Usage of Tris-Borate for Obtaining a Higher Resolution of Small DNA Fragments by Agarose Gel Electrophoresis. *Nagoya Medical Journal*, 43(1), 1–6.

---

**Copyright holder:**

Sari M. Dewi Nataprawira, Erick Sidarta, Arlends Chris (2022)

**First publication right:**

Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia

**This article is licensed under:**

