

The Effect of Polyacrilamide Gel Electrophoresis Duration on separation of Cassava SSR PCR Fragments

Nur Ayu Ramadanti¹, Dwi Hilda Putri¹, Hartati²

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Padang
Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Barat Padang, 25131

²Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong, Bogor

Email: tatiktikta@yahoo.com

Abstract. DNA bands formed from the results of electrophoresis with Polyacrilamide gel are considered as 1 character representing 1 allele. PCR products produce multiple bands (multy bands), which indicates that there are multi alleles in the sample. Electrophoresis is a chemical analysis method based on the movement of charged protein molecules in the electric field. Separation is carried out based on differences in the size of the molecular weight and the electric charge contained by the macro-molecule. In addition, the effect of gel concentration, buffer and electrophoresis time also has a role in the results of electrophoresis. This study was conducted to compare the best separation time for acrilamide gel electrophoresis with the results of cassava DNA amplification. The materials used in this study are two cassava varieties, namely: Adira IV 1, Adira IV 2, Adira IV 3, Carvita 25 1, Carvita 25 2, and Carvita 25 3. Using electrophoresis by poly-acrilamide gel with two different time effects: 1 hour 30 minutes and 3 hours. The results of electrophoresis with 3 hours gave better results of DNA visualization compared to 1 hour 30 minutes.

Kata kunci : Elektroforesis, DNA, Waktu



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2019 by author

1. PENDAHULUAN

Ubi kayu (*Manihot utilissima*.) memiliki peran yang besar di negara berkembang. Bahan makanan ini dapat dikembangkan menjadi berbagai jenis makanan pokok serta juga penting untuk industri pakan, tekstil, bioetanol, kertas, lem, dan *biorefinery* (Hartati et al. 2012). Ubi kayu merupakan tanaman yang memiliki kelebihan dan kekurangan, untuk itu diperlukan eksploitasi keunggulan genetik dan pemuliaan tanaman untuk meningkatkan keunggulan dan produktifitas varietas tanaman ini (Kurniawati dan Hartati 2017).

Informasi keberagaman genetik tanaman pada tingkat individu maupun populasi perlu diketahui, sebagai dasar pertimbangan dalam menyusun strategi konservasi, pemuliaan tanaman, pengelolaan dan pemanfaatan sumber daya genetik tanaman secara

berkelanjutan. Penilaian keragaman genetik tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan marka morfologi, biokimia, dan molekuler DNA. Teknik penanda molekuler telah terbukti menjadi alat yang kuat untuk mengidentifikasi spesies tanaman, varietas, klon, individu dan populasi. Umumnya deteksi molekuler menggunakan teknik PCR sebagai salah satu tahapan dalam proses analisis (Zulfahmi 2013).

Salah satu deteksi penanda molekuler yang banyak digunakan adalah metode *Simple Sequence Repeat* (SSR). Metode ini menganalisis pengulangan nukleotida tandem pendek yang diketahui memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi. Penanda SSR mudah dideteksi, sangat informatif, stabil, dan relatif murah digunakan dalam penelitian. (Sharp dan J 2001). Analisis penanda molekuler tanaman menggunakan metode SSR akan menghasilkan banyak pita DNA, yang menunjukkan variasi alel pada suatu tanaman. Pita DNA ini biasanya dianalisis menggunakan teknik elektroforesis. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Mba *et al.* (2001) menemukan sejumlah marka SSR ubi kayu diantaranya 186 buah, 124 buah (Raji *et al.* 2009), dan 2190 buah (Supajit *et al.* 2011).

Untuk memisahkan pita-pita DNA yang banyak dan memiliki perbedaan ukuran yang sangat kecil, dibutuhkan teknik elektroforesis yang tepat. Elektroforesis adalah suatu cara memisahkan molekul yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Elektroforesis *Gel Poliakrilamide* merupakan metode elektroforesis yang tepat digunakan, karena menurut Saputra and F. Rahman (2014) matriks *Polyacrilamide* memiliki kemampuan untuk melakukan separasi atau penyebaran molekul yang lebih kecil dibandingkan dengan gel agarose.

Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti lama elektroforesis, bentuk dan ukuran DNA, besar muatan listrik dan sifat kimia dari molekul. Penelitian yang dilakukan oleh Saputra dan Rahman (2014) membutuhkan kondisi elektroforesis 200 v dalam waktu 60 menit untuk memisahkan pita-pita DNA kurang dari 50Kbp. Selanjutnya, penelitian yang dilakukan oleh Wicaksono *et al.* (2017) melakukan elektroforesis gel *Polyacrilamide* PCR SSR dengan kondisi 3000 v dalam waktu 2.5 jam. Penelitian ini akan melakukan analisis variasi genetika ubi kayu menggunakan primer SSR 181. Lamanya elektroforesis menggunakan pasangan primer ini belum diketahui. Oleh karena itu, dilakukan penelitian yang bertujuan untuk menentukan lamanya waktu pemisahan DNA hasil amplifikasi primer SSR DNA ubi kayu menggunakan teknik elektroforesis gel acrilamide.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan

Penelitian ini menggunakan DNA yang diisolasi dari dua varietas DNA ubi kayu, yaitu Adira IV dan Carvita25. Isolasi DNA untuk masing-masing varietas diulang sebanyak tiga kali.

2.2 Metode

2.2.1 Amplifikasi DNA Dengan Primer ISSR

Sepasang primer SSRY 181 digunakan untuk amplifikasi DNA ubi kayu varietas Adira IV dan Carvita 25 yang memiliki motif pengulangan sekuen tertentu seperti yang dilaporkan oleh Mba *et al.* (2001). Reaksi amplifikasi dilakukan mengikuti protokol yang dilakukan oleh Mba *et al.* (2001) dengan volume akhir berisi 10 μ l, yaitu: 1,0 μ l DNA (10ng / μ l); 1,0 μ l 10x buffer PCR yang mengandung 20 mM MgCL₂ (Promega), 0,8 μ l dNTPs (2,5 mM masing-masing), 0,25 μ l polimerase TaqDNA (Promega; 5 u / μ l), 1,25 μ l dari primer forward dan reverse (1 μ M masing-masing) dan 5,0 μ l ddH₂O.

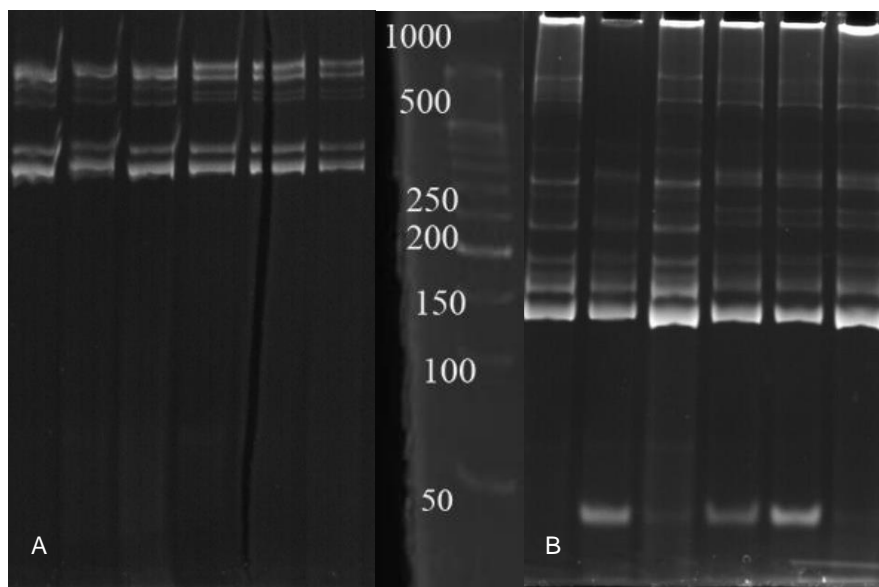
Program *running* PCR mengikuti prosedur Yu *et al.* (2011) dengan sedikit modifikasi, yakni : pra denaturasi 94 °C selama 2 menit, dilanjutkan 35 siklus meliputi denaturasi 94 °C selama 30 detik, *annealing* 55 °C selama 1 menit, *extention* 72 °C selama 1 menit, dan terakhir *post extention* 72 °C selama 5 menit.

2.2.2 Visualisasi Hasil PCR menggunakan Electroforesis Gel *Polyacrilamide*

Kegiatan visualisasi hasil PCR menggunakan gel *Polyacrilamide sequi-Gen GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell* BIORAD. Gel akrilamid 12 % dibuat dengan menghomogenkan terlebih dahulu urea, *aquabidest* steril, buffer TBE 5 x dan akrilamid/bis 30 % (29:1) sampai larutan berwarna bening. APS 10 % dan TEMED ditambahkan ke dalam larutan yang sudah tercampur merata kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditunggu hingga mengeras selama 30-90 menit. Saat gel poliakrilamid sudah mengeras dimasukkan ke dalam tangki elektroforeis yang di isi penuh dengan larutan TBE 0,5 x. DNA dimasukan sebanyak 4 μ l ke dalam masing-masing sumur. *Running* elektroforesis dilakukan dengan dua perlakuan untuk membandingkan hasil pemisahan DNA , yaitu selama 1,5 jam dan kedua selama 3 jam pada 70volt.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Produk PCR menggunakan primer SSR 181 dianalisis menggunakan gel *Polyacrilamidee* 12%. Elektroforesis dilakukan dengan dua waktu perlakuan, untuk membandingkan hasil pemisalan DNA. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR menggunakan primer SSR 181 (a) Elektroforesis gel akrilamide dalam waktu 1,5 jam, (b) Elektroforesis gel akrilamide dalam waktu 3 jam

Simple Sequence Repeat merupakan pengulangan nukleotida tandem pendek dan dikenal dengan tingkat polimorfisme yang tinggi (Sharp dan J 2001). Marka SSR terdiri dari *sequence* DNA dengan unit ulangan yang pendek (1-6 bp), merupakan tipe umum repetitif DNA yang sering disebut juga dengan mikrosatelit (Singh 2008). Variabilitas mikrosatelit terjadi karena variasi dalam jumlah ulangan pada *sequence* intinya. Tingkat variabilitas berkorelasi positif dengan panjang ulangan. Mikrosatelit sangat bermanfaat sebagai penanda genetik karena bersifat kodominan, memiliki polimorfisme alel sangat tinggi, lokasinya yang berdistribusi pada seluruh genom, mampu mendeteksi keragaman genetik pada tanaman yang memiliki tingkat kekerabatan yang dekat dan ekonomis dalam pengujiannya. Analisis SSR merupakan alat bantu yang sangat akurat untuk membedakan genotip, evaluasi kemurnian benih, pemetaan, dan seleksi genotip untuk karakter yang diinginkan (McCouch *et al.* 2002).

Pita-pita DNA yang terbentuk dari hasil elektroforesis dengan gel *Polyacrilamide* dianggap sebagai 1 karakter yang mewakili 1 alel. Produk PCR menghasilkan pita-pita yang banyak (*multy band*), yang menandakan adanya multi alel pada sampel. Terlihat

adanya beberapa variasi pola pita DNA yang terbentuk pada masing-masing sampel yang diamplifikasi dengan primer yang sama.

Hasil penelitian menunjukkan elektroforesis dengan gel *Polyacrilamide* dengan perbedaan waktu *running* elektroforesis. Separasi hasil elektroforesis dengan waktu 1,5 jam dan voltase 70 Volt menunjukkan Pita DNA muncul pada ukuran kurang dari 250-1000 bp. Sedangkan hasil elektroforesis dengan waktu 3 jam dan 70 Volt menghasilkan hasil amplifikasi DNA kurang dari 50-1000 bp. Hal ini menunjukkan elektroforesis dengan waktu 3 jam dan 70 V menghasilkan pita yang dapat diskor dengan baik dibandingkan dengan hasil elektroforesis dalam waktu 1.5 jam 70volt. Penelitian yang dilakukan oleh SaputradanRahman (2014) membutuhkan kondisi elektroforesis 200 v dalam waktu 60 menit sedangkan penelitian oleh Wicaksono *et al.* (2017) melakukan elektroforesis gel *Polyacrilamide* PCR SSR dengan kondisi 3000 v dalam waktu 2.5 jam.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil perbandingan waktu elektroforesis yang dilakukan pada hasil amplifikasi DNA ubi kayu, waktu yang paling baik hasilnya adalah elektroforesis selama 3 jam. Berdasarkan hasil yang ditampilkan memiliki hasil separasi DNA yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Hartati, S., et al. (2012). Karakter Umbi Dan Nutrisi Tujuh genotif Ubi Kayu (*Manihot esculenta*). *Agricola* 2: 101-110.
- Kurniawati, S. and S. Hartati (2017). Optimasi suhu aneling primer degenerate untuk mengamplifikasi fragmen gen arginine decarboxylase (Adc) genom ubi kayu lokal maluku tenggara. *IJOB* 1(58-63).
- Mba, et al. (2001). Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theoretical Applied Genetics* 102(1): 21-31.
- McCouch, et al. (2002). Development and aping of 2240 ner SSR marker for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA research* 9: 257-279.
- Raji, et al. (2009). Gene-based microsatellites for cassava (*Manihot esculenta* Crantz): prevalence, polymorphisms, and cross-taxa utility. *BMC plant biology* 9(1): 118.
- Saputra and F. Rahman (2014). Aplikasi Metode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) untuk Mengidentifikasi Sumber Gelatin pada Kapsul Keras.

- Sharp, M. and H. P. J (2001). Targeted Development of Informative Microsatelite (SSR) markers. *Nucleid Acid Reseaerch* 29(8): 44.
- Singh, R.Ting, R. Rozana, S. G . Tan. L. E. T. Low (2008). Exploiting an oil palm EST the development of gene-derived and their exploitation for assesment of genetic diversity. *biologia* 63: 1-9.
- Supajit, S., et al. (2011). SSR and EST-SSR-based genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical Applied Genetics* 122(6): 1161-1170.
- Wicaksono, A., et al. (2017). Genetic Diversity Analysis of 28 Cacao Collections (*Theobroma cacao* L.) Based on SSR Markers. 4(1): 13-22.
- Zulfahmi (2013). Penandaan DNA untuk analisis genetik tanaman. *jurnal agroteknologi* 3: 41-52.