

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Perkembangan teknologi di bidang kesehatan saat ini mengalami kemajuan yang pesat, terutama dalam metode pemeriksaan laboratorium yang terus dikembangkan untuk meningkatkan kecepatan, akurasi, serta tingkat spesifitas dan sensitivitas diagnostik. Salah satu pendekatan yang banyak digunakan adalah teknik biologi molekuler, seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR), yang merupakan metode *in vitro* untuk mengamplifikasi fragmen DNA secara enzimatik. Proses PCR berlangsung dalam siklus berulang yang terdiri dari tahap denaturasi, annealing dan ekstensi yang memungkinkan amplifikasi DNA. Setelah dilakukan proses PCR maka selanjutnya hasil PCR perlu analisis dengan menggunakan elektroforesis (Mushlih, 2019).

Elektroforesis adalah teknik memisahkan, mengidentifikasi dan memurnikan fragmen molekul DNA berdasarkan ukurannya dengan kemampuan berpindah melalui medium konduktif, biasanya berupa larutan buffer dengan menggunakan muatan listrik. Elektroforesis melalui gel agarosa merupakan teknik pemisahan yang sederhana, cepat dan tepat memisahkan molekul yang diinginkan. Larutan elektrolit sangat diperlukan dalam metode elektroforesis gel, berfungsi sebagai pengantar arus listrik dalam elektroforesis. Larutan elektrolit yang biasa digunakan adalah buffer. Larutan bufer berperan sebagai media pendukung yang dapat mempengaruhi kecepatan gerak senyawa karena ion pembawanya bermuatan. Kekuatan ion yang tinggi dalam buffer akan meningkatkan panas sehingga aliran listrik menjadi maksimal, dan dapat mempercepat gerakan molekul pada sampel (Fuad et al., 2016).

Kinerja Elektroforesis dipengaruhi oleh kekuatan ionik, karakteristik pH dan komposisi buffer. Dalam elektroforesis gel terdapat dua material dasar yang disebut fase diam dan fase bergerak (eluen). Fase diam berfungsi menyaring objek yang akan dipisah, sementara fase bergerak berfungsi membawa objek yang akan dipisah, pada fase bergerak akan ditambahkan

larutan penyangga (buffer) untuk menjaga kestabilan objek elektroforesis. Asam tris asetat (TAE) dan asam tris borat etilen diamintetraasetat (TBE) merupakan 2 buffer yang paling umum digunakan dalam elektroforesis gel agarosa. Akan tetapi buffer ini memiliki kapasitas buffer yang relatif lebih rendah dan waktu elektroforesis yang lebih lama. Meskipun kapasitas buffer TBE lebih baik daripada TAE, terutama untuk fragmen DNA kurang dari 1 kb, buffer ini dapat dengan mudah menghasilkan elektroosmosis tinggi selama elektroforesis dan memiliki laju pemulihan DNA yang lebih rendah. Dalam beberapa penelitian terbaru, muncul inovasi berupa SuperBuffer, yang mampu meningkatkan efektivitas pemisahan pita DNA dengan hasil yang lebih jelas, efisiensi pemulihan lebih tinggi, bahan mudah didapatkan, biaya yang lebih ekonomis, dan kemudahan dalam pembuatannya, dimana kandungan buffer ini terdiri dari NaOH, Asam borat dan Aquadest (Al-Daim, 2023). Asam borat berperan sebagai ion penghantar yang membantu menjaga keseimbangan ion H^+ dan OH^- yang dihasilkan oleh elektroda. Peran ini berkaitan dengan fungsi buffer dalam mempertahankan kestabilan pH selama migrasi fragmen DNA (Dwynda & Zainul, 2018)

Dalam penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Al-Daim, 2023) disebutkan bahwa SuperBuffer menjadi pilihan buffer elektroforesis yang paling baik, hasil pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa pita DNA 100 bp dan 1 kb dengan konsentrasi gel agarosa 1% dan 2% tervisualisasi dengan baik dibawah transluminator UV, buffer ini mudah digunakan, mudah disiapkan dan sesuai dengan fragmen DNA besar, keunggulan buffer ini bisa menggunakan tegangan listrik mencapai 25V/cm dalam waktu 10 menit sehingga menghasilkan lebih sedikit panas dibandingkan dengan buffer TAE yang memerlukan durasi elektroforesis yang lebih lama. Hal ini sejalan dengan penelitian (Zhang et al., 2011) yang menjelaskan bahwa SuperBuffer merupakan buffer elektroforesis yang sederhana, ekonomis, dan efektif. Tegangan SuperBuffer dapat mencapai 20–25 V/cm, dapat digunakan dengan konsentrasi gel agarosa yang lebih rendah yaitu 0,8% kemudian resolusi dan efisiensi pemulihan DNA lebih tinggi daripada buffer TAE/TBE, pada penelitian ini menjelaskan bahwa SuperBuffer dapat digunakan kembali

sebanyak 5 kali, hasilnya sebanding dengan buffer yang baru disiapkan, resolusi perbedaannya sangat kecil, sehingga peneliti menyarankan untuk menggunakan SuperBuffer sebagai alternatif pengganti buffer TAE dalam elektroforesis gel agarosa. Untuk memvisualisasikan hasil pita DNA diperlukan pewarna, penelitian sebelumnya menggunakan pewarna etidium bromida (EtBr), namun pewarna ini diketahui memiliki sifat mutagenik yang berbahaya. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan menggunakan pewarna GelRed, sebagai pewarna alternatif untuk pewarnaan DNA yang lebih aman, selain bersifat *non mutagenic*, dan *non cytotoxic*, GelRed memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, produk botium merekomendasikan penggunaannya dengan perbandingan 1:10⁴. Namun pada penelitian yang dilakukan oleh (Artati, 2013) menunjukkan bahwa GelRed dalam larutan gel agarosa dengan perbandingan 1:6 x 10⁴ masih mampu memvisualisasikan hasil PCR dengan baik, Kemudian Pada penelitian (Nataprawira et al., 2022) menjelaskan bahwa GelRed mempengaruhi migrasi DNA pada gel agarosa. Migrasi DNA tersebut dipengaruhi oleh jenis buffer yang digunakan, konsentrasi agarosa, ukuran DNA, konsentrasi DNA, dan metode yang digunakan. Sehingga GelRed bisa digunakan untuk alternatif pengganti pewarna etidium bromida.

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik untuk membandingkan efektivitas larutan SuperBuffer dengan buffer TAE pada proses elektroforesis, menggunakan pewarna GelRed. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi sebagai alternatif pemilihan buffer yang optimal dalam elektroforesis.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana perbandingan efektivitas larutan SuperBuffer dengan buffer TAE (*Tris-Acetate-EDTA*) pada proses elektroforesis?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan umum

Mengetahui perbandingan efektivitas larutan SuperBuffer dengan buffer TAE (*Tris-Acetate-EDTA*) pada proses elektroforesis

2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui kemampuan pemisahan pita DNA menggunakan larutan SuperBuffer berdasarkan lama waktu elektroforesis 10, 30, 60 menit dengan voltase 25 V dan 100 V
- b. Mengetahui kemampuan pemisahan pita DNA menggunakan larutan buffer TAE (*Tris-Acetate-EDTA*) berdasarkan lama waktu elektroforesis 10, 30, 60 menit dengan voltase 25 V dan 100 V
- c. Menganalisis perbandingan efektivitas larutan SuperBuffer dengan buffer TAE (*Tris-Acetate-EDTA*) berdasarkan variasi waktu dan voltase pada proses elektroforesis.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini memberikan manfaat teoritis terkait dengan efektivitas SuperBuffer sebagai alternatif pengganti buffer TAE pada proses elektroforesis gel agarosa.

2. Manfaat Aplikatif

a. Bagi peneliti

Peneliti dapat mengembangkan diri dan mengaplikasikan ilmu yang diperoleh di kampus terkait dengan bidang biologi molekuler dalam bentuk penelitian perbandingan efektivitas larutan SuperBuffer dengan buffer TAE (*Tris-Acetate-EDTA*) pada proses elektroforesis.

b. Bagi Institusi Pendidikan

Memberikan referensi terkait dengan SuperBuffer sebagai alternatif buffer TAE pada proses elektroforesis agarosa yang diharapkan nantinya dapat diaplikasikan dalam pembelajaran yang ada di Jurusan Teknologi Laboratorium Medis terutama pada bidang Biologi Molekuler.

E. Ruang Lingkup

Bidang keilmuan penelitian ini adalah bidang Biologi Molekuler. Jenis penelitian bersifat eksperimental, dengan desain penelitian yaitu Rancangan Acak Lengkap. Variabel bebas berupa SuperBuffer dan buffer TAE dengan variasi lama waktu dan voltase elektroforesis, sedangkan variabel terikat berupa kemampuan pemisahan pita DNA. Rancangan penelitian ini dibuat

dengan memberikan perlakuan berupa variasi waktu elektroforesis yang digunakan yaitu 10, 30, 60 menit dengan voltase elektroforesis 25 V dan 100 V, dengan konsentrasi buffer yang sama yaitu konsentrasi 50x, sampel penelitian yang digunakan adalah DNA ladder 100 bp. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis pada bulan Mei-Juni 2025. Analisa data yang digunakan adalah analisa statistik dengan menggunakan uji *Independent T-Test*.