

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelusuran Jurnal Penelitian

Penelitian-penelitian tentang gambaran berbagai pewarna DNA dalam mewarnai DNA hasil elektroforesis pada *gel agarose* yang akan dibandingkan sebanyak lima jurnal penelitian. Penelitian-penelitian itu diperoleh dari berbagai sumber, yaitu : hasil penelitian dalam jurnal yang dimuat oleh universitas terkait dan yang diperoleh dari jurnal kesehatan Internasional. Secara umum jurnal tersebut didapatkan dengan mengunduh dari internet.

Penelitian ini mengacu pada penelitian sebelumnya, oleh karena itu perlu adanya kajian mengenai penelitian terdahulu yang sejenis sehingga bisa mengetahui hasil dan kesimpulan dari penelitian sebelumnya.

Tabel 4. 1 Hasil Penelusuran Jurnal Penelitian

No.	Jurnal	Peneliti dan Judul Penelitian	Hasil
1.	Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur	Diah Artati dan Dini Sahfitri Lubis (2017) Optimasi Performa DNA Marker pada Elektroforesis Gel	Performa DNA marker yang digunakan pada elektroforesis gel agarosa 2% menunjukkan performa yang baik dan efektif pada volume 0,75 μ L dan konsentrasi pewarna <i>peqGREEN</i> 60.000x in water, dengan tegangan listrik 70 volt selama 45 menit.

- | | | | |
|----|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2. | <i>Clinical laboratory</i> | Qing Huang,
Larry Baum,
Wei-Ling Fu

<i>Simple and Practical Staining of DNA with GelRed in Agarose Gel Electrophoresis</i> | Konsentrasi <i>Gelred</i> yang paling tinggi, yaitu <i>GelRed</i> 100x tidak mengubah mobilitas dari pita DNA. <i>GelRed</i> 100x dapat digunakan untuk menentukan ukuran fragmen DNA dengan tepat. |
| 3. | - | Krisna Abdullah (2019)

Pengaruh Lama Waktu pada Pewarnaan <i>Hematoxylin</i> sebagai Pengganti <i>Ethidium Bromide</i> untuk Visualisasi DNA Hasil Elektrforesis Gel <i>Agarose</i> | Lama kontak yang paling berpengaruh terhadap pewarnaan <i>Hematoxylin</i> yaitu 40 menit dengan nilai rata rata 3.0 |
| 4. | - | Yayah Winarti (2017)

Optimasi Penggunaan <i>Methylene Blue</i> sebagai Pengganti <i>Etidium Bromida</i> pada DNA Hasil Elektroforesis Gel <i>Agarose</i> | Konsentrasi <i>Methylen Blue</i> (0,0125%) dengan lama kontak 25 menit paling optimal dalam mewarnai DNA hasil elektroforesis pada gel agarosa |

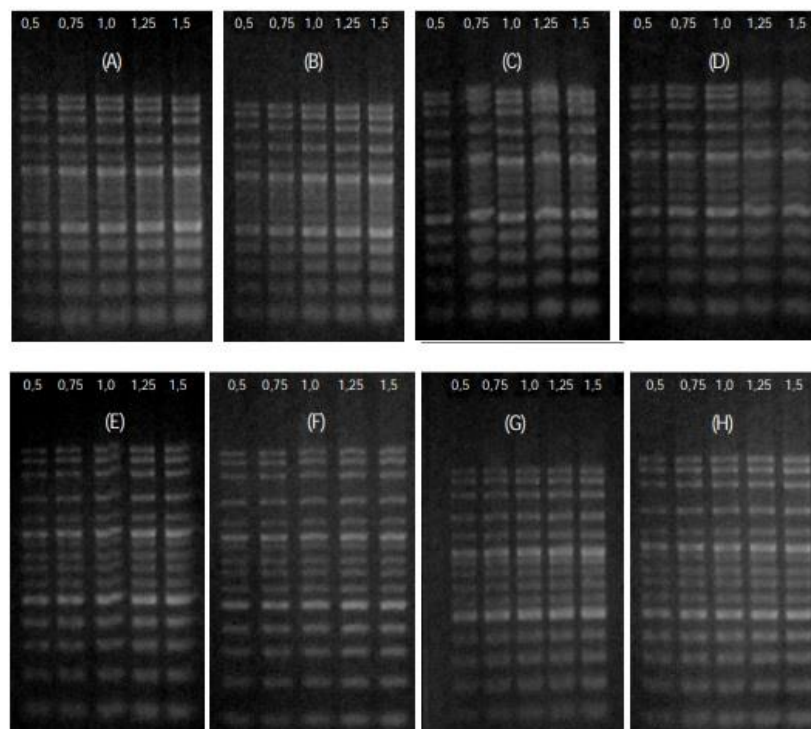
5. <i>Macro-molecules</i>	Aleksandre Japaridze, Alexander Benke, Sylvain Renevey, Carine Benadiba, Giovanni Dietler (2015)	Pewarna <i>PicoGreen</i> pada konsentrasi yang tinggi dapat meningkatkan panjang kontur DNA dan mengubah bentuk keseluruhan DNA tanpa mempengaruhi panjang persistensi. Pewarna DAPI, menyebabkan terjadinya perubahan secara signifikan pada panjang persistensi, namun panjang kontur DNA tidak berubah. Pada pewarnaan dengan DRAQ5, konsentrasi yang kecil dapat mengubah sifat fisik DNA, meningkatkan panjang total fragmen DNA dan menurunkan panjang persistensi DNA
	<i>Influence of DNA Binding Dyes on Bare DNA Structure Studied with Atomic Force Microscopy</i>	

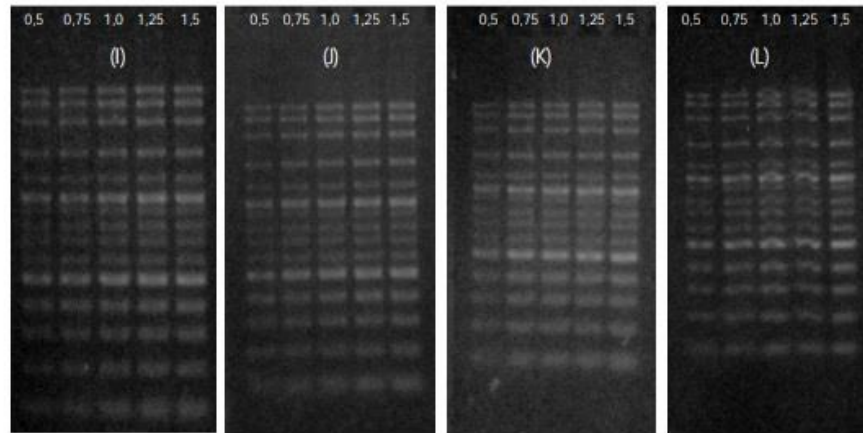
4.1.1 Hasil Jurnal Peneliti Pertama

Penelitian yang dilakukan oleh Diah Artati dan Dini Sahfitri Lubis (2017), yang berjudul “Optimasi Performa DNA Marker pada Elektroforesis Gel” bertujuan untuk menentukan komposisi komponen elektroforesis yang tepat untuk mendapatkan performa fragmen DNA marker yang optimum. Pada penelitian ini, DNA marker yang digunakan adalah VC 100 bp DNA ladder plus, RTU 50 µg (Vivantis), sedangkan sebagai pewarnanya digunakan *peqGREEN* (peqlab). Proses elektroforesis dilakukan menggunakan alat elektroforesis horizontal mini (Mini-Sub Cell GT Systems, Bio Rad), dengan media berupa gel agarosa 2% (Vivantis).

Perlakuan yang diberikan dalam uji performa DNA marker pada elektroforesis gel agarosa 2% ini berupa perbedaan volume DNA marker, konsentrasi pewarna *peqGREEN*, tegangan listrik, dan lama waktu proses

elektroforesis. Uji performa DNA marker dilakukan dengan cara memasukkan sampel DNA marker dengan volume bervariasi, yaitu 0,50 μL ; 0,75 μL ; 1,00 μL ; 1,25 μL ; dan 1,50 μL ke dalam sumur-sumur gel agarosa 2% yang telah diwarnai peqGREEN dengan konsentrasi bervariasi, yaitu 60.000x dalam aquades (0,5 $\mu\text{L}/30$ mL), 40.000x dalam aquades (0,75 $\mu\text{L}/30$ mL), 30.000x dalam aquades (1 $\mu\text{L}/30$ mL), dan 24.000x dalam aquades (1,25 $\mu\text{L}/30$ mL), kemudian dilakukan elektroforesis dengan tegangan listrik bervariasi, yaitu 80 volt selama 30 menit, 70 volt selama 45 menit, dan 60 volt selama 60 menit, dengan arus listrik sebesar 400 mA. Hasil-hasil elektroforesis divisualisasikan dengan alat dokumentasi gel UV transilluminator(UVB).





Gambar 4. 1 Hasil visualisasi elektroforesis dari 0,50 μL ; 0,75 μL ; 1,00 μL ; 1,25 μL ; dan 1,50 μL DNA marker dalam gel agarosa 2% dengan pewarna *peqGREEN* 60.000x in water pada 80 volt selama 30 menit (A), pewarna *peqGREEN* 40.000x in water pada 80 volt selama 30 (B), pewarna *peqGREEN* 30.000x in water pada 80 volt selama 30 menit (C), pewarna *peqGREEN* 24.000x in water pada 80 volt selama 30 menit (D), pewarna *peqGREEN* 60.000x in water pada 70 volt selama 45 menit (E), pewarna *peqGREEN* 40.000x in water pada 70 volt selama 45 menit (F), pewarna *peqGREEN* 30.000x in water pada 70 volt selama 45 menit (G), pewarna *peqGREEN* 24.000x in water pada 70 volt selama 45 menit (H), pewarna *peqGREEN* 60.000x in water pada 60 volt selama 60 menit (I), pewarna *peqGREEN* 40.000x in water pada 60 volt selama 60 menit (J), pewarna *peqGREEN* 30.000x in water pada 60 volt selama 60 menit (K), pewarna *peqGREEN* 24.000x in water pada 60 volt selama 60 menit (L)

Hasil visualisasi proses elektroforesis pada Gambar 4.1 menunjukkan bahwa volume DNA marker sebanyak 0,5 μL sudah dapat divisualisasikan, namun fragmen DNA yang muncul masih tampak tipis. Volume optimum DNA marker yang dapat menghasilkan visualisasi fragmen-fragmen DNA secara relatif jelas adalah 0,75-1,25 μL . Pewarna *peqGREEN* dengan konsentrasi dalam larutan sebesar 60.000x, sudah cukup untuk mewarnai fragmen DNA dengan jelas.

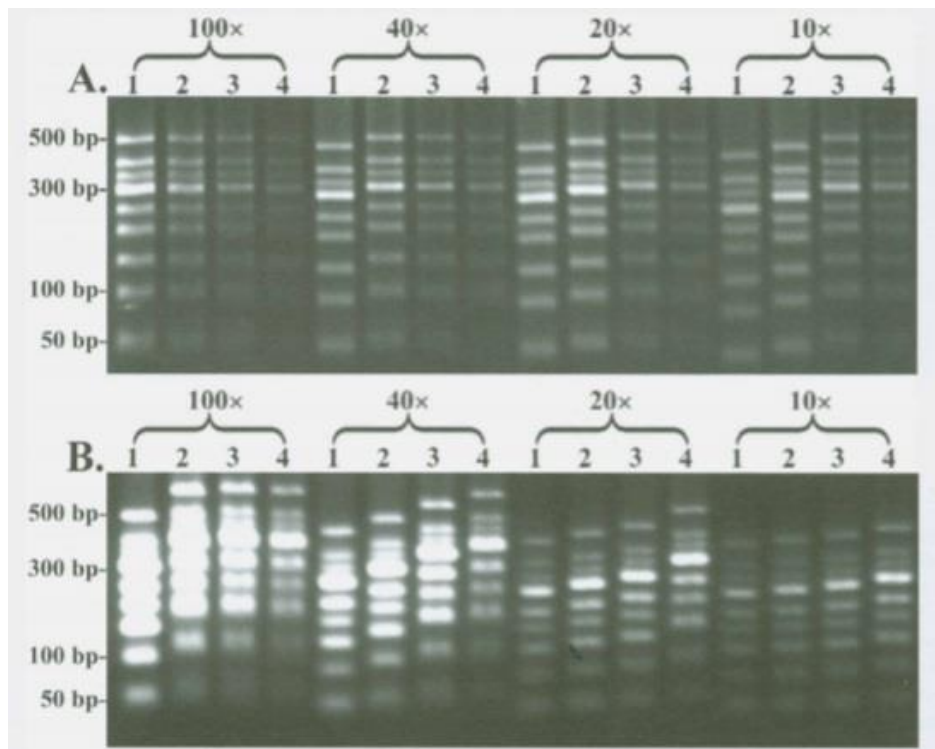
Menurut spesifikasi produknya, penggunaan pewarna *peqGREEN* dalam elektroforesis gel direkomendasikan pada larutan dengan konsentrasi sebesar 20.000x. Namun demikian, hasil kegiatan ini menunjukkan bahwa konsentrasi dalam larutan sebesar 60.000x, dapat menghasilkan visualisasi fragmen DNA dengan baik tanpa mengurangi kualitas hasil pengujian.

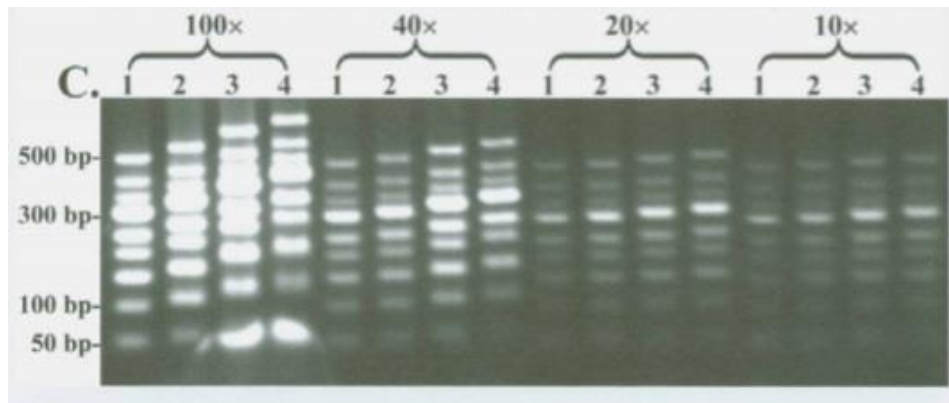
Separasi antar-fragmen DNA terlihat jelas dan tegas pada saat elektroforesis dilakukan menggunakan tegangan listrik sebesar 70 volt selama 45 menit (Gambar E, F, G, dan H) dan tegangan listrik sebesar 60 volt selama 60 menit (Gambar I, J, K, dan L). Tegangan listrik yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terjadinya *smile effect*, seperti pada Gambar C dan D. Elektroforesis dengan perlakuan tegangan listrik pada 70 volt selama 45 menit dan volume DNA marker 1,00 μ L juga terdapat *smile effect*, sedangkan pada volume DNA marker yang lain tidak terjadi (Gambar E). Hasil pemisahan fragmen-fragmen DNA marker pada elektroforesis dengan menggunakan tegangan listrik 80 volt selama 30 menit (Gambar 1A, 1B, 1C, dan 1D) terlihat belum sempurna, yakni fragmen-fragmen DNA berukuran 600 bp, 700 bp, 800 bp, dan 900 bp yang masih relatif menempel satu sama lain.

Dari hasil penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa Performa DNA marker yang digunakan pada elektroforesis gel agarosa 2% menunjukkan performa yang baik dan efektif pada volume 0,75 μ L dan konsentrasi pewarna *peqGREEN* dalam larutan sebesar 60.000x, dengan tegangan listrik 70 volt selama 45 menit.

4.1.2 Hasil Jurnal Peneliti Kedua

Hasil penelitian Qing Huang, Larry Baum, Wei-Ling Fu pada tahun 2010 yang berjudul “*Simple and Practical Staining of DNA with GelRed in Agarose Gel Electrophoresis*” bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi *GelRed* yang dapat menentukan ukuran fragmen DNA secara akurat dan tidak mengubah mobilitas dari pita DNA. Pada penelitian ini, pewarna DNA yang digunakan adalah *GelRed* dan dibandingkan dengan *SYBR gold* dan *SYBR green*.





Gambar 4.2 Konsentrasi *GelRed* (A), konsentrasi *SYBR Gold* (B), konsentrasi *SYBR Green* (C). Konsentrasi DNA pada baris 1-4 adalah 50, 25, 12,5 dan 6,25 ng/band. Kecuali pada fragmen DNA 300 bp, konsentrasi DNA nya adalah 100, 50, 25 dan 12,5 ng/band. Konsentrasi gel agarose adalah 2,5%

Berdasarkan Gambar 4.2, didapatkan hasil pewarnaan DNA dengan menggunakan *SYBR Gold* dan *SYBR Green*, terjadi penurunan intensitas fluoresen seiring dengan menurunnya konsentrasi *SYBR Gold* dan *SYBR Green*. Pada semua konsentrasi *GelRed* dan pada konsentrasi *SYBR Gold* yang tinggi, intensitas fluoresens menghilang seiring dengan penurunan konsentrasi DNA. Semua band DNA dapat terlihat pada semua konsentrasi *GelRed*, *SYBR Gold*, dan *SYBR Green*. Mobilitas band DNA berubah seiring dengan perubahan konsentrasi dari *SYBR Gold* dan *SYBR Green*, namun pada *GelRed* 100x tidak ditemukan adanya perubahan mobilitas band DNA baik pada konsentrasi DNA yang tinggi maupun rendah.

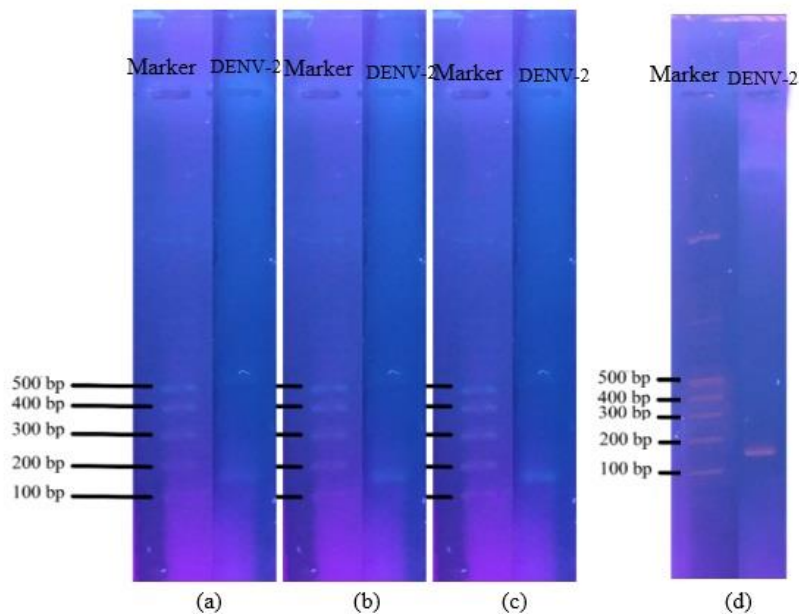
Dari hasil penelitian tersebut, didapatkan bahwa konsentrasi *GelRed* yang paling optimal untuk elektroforesis gel agarose yaitu *GelRed* 100x,

hal ini dikarenakan *GelRed* 100x tidak mengubah mobilitas band DNA pada semua konsentrasi produk PCR.

4.1.3 Hasil Jurnal Peneliti Ketiga

Hasil penelitian Krisna Abdullah pada tahun 2019 yang berjudul “Pengaruh Lama Waktu pada Pewarnaan *Hematoxylin* sebagai Pengganti *Ethidium Bromide* untuk Visualisasi DNA Hasil Elektrforesis Gel *Agarose*” bertujuan untuk menentukan lama waktu paparan *Hematoxylin* pada DNA hasil elektroforesis *gel agarose* yang paling berpengaruh. Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah RNA virus dengue yang telah dilakukan proses *Reverse Transcriptase – PCR* menjadi cDNA Virus Dengue dengan empat *serotype* (DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4).

Sebagai pewarna DNA digunakan *Hematoxylin* 0.01 % dengan variasi paparan lamanya waktu untuk pewarnaan DNA hasil elektroforesis yaitu selama 10 menit, 20 menit, dan 40 menit yang dilakukan sebanyak empat kali pengulangan. Hasilnya dibandingkan secara langsung dengan hasil pewarnaan DNA menggunakan *Ethidium Bromide* sebagai standar, hasil pewarnaan DNA dianalisa melalui *software Image J*.



Gambar 4. 3 Hasil pewarnaan *Hematoxylin* dengan lama waktu 10 menit (a), 20 menit (b), 40 menit (c), dan pewarnaan Ethidium Bromide (d) pada DNA marker dan cDNA Virus Dengue

Tabel 4. 2 Hasil Uji Deskriptif Pewarnaan DNA Hematoxylin

Descriptive Statistics								
	N	Range	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Statistic
10 Menit	6	3,00	1,00	4,00	2,3333	,42164	1,03280	1,067
20 Menit	6	3,00	1,00	4,00	2,5000	,42817	1,04881	1,100
40 Menit	6	3,00	1,00	4,00	3,0000	,51640	1,26491	1,600
Valid N (listwise)	6							

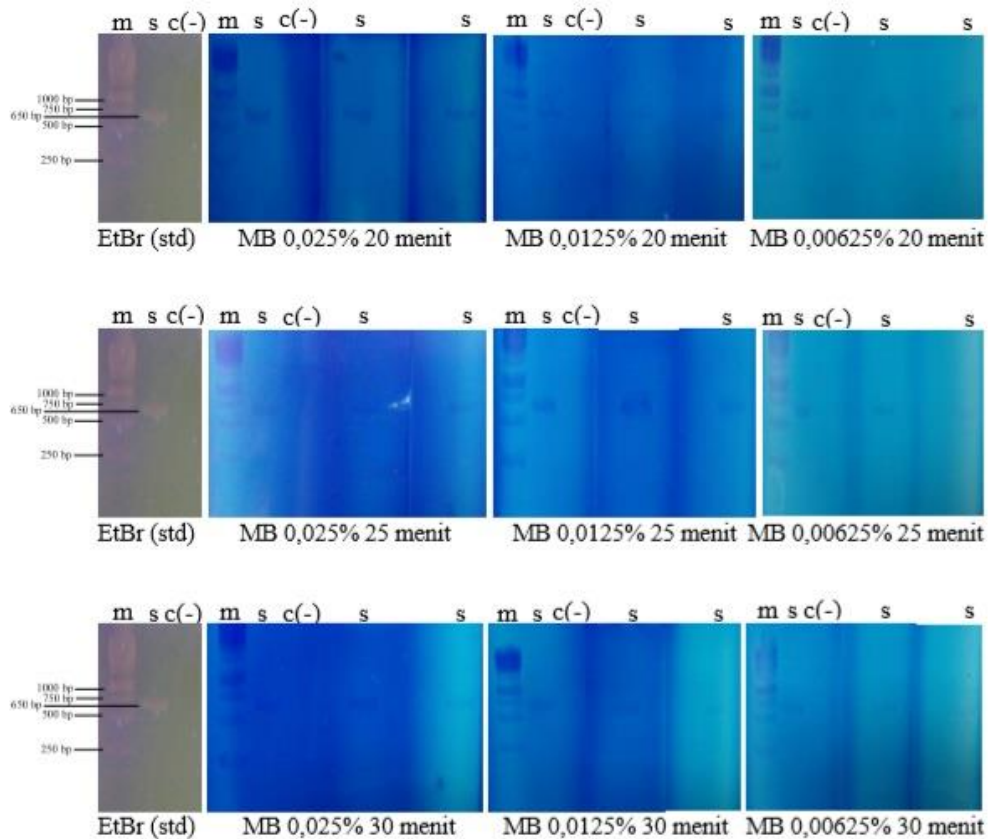
Berdasarkan hasil uji deskriptif pada Tabel 4.2, pewarnaan *Hematoxylin* dengan variasi lama waktu 10 menit, 20 menit, dan 40 menit pada cDNA Virus Dengue hasil elektroforesis pada gel *agarose* menunjukkan adanya pengaruh pada *band* yang dihasilkan. Nilai rata-rata meningkat sesuai dengan variasi lama waktu. Namun hasil uji deskriptif ini masih kurang optimal, dapat dilihat dari hasil yang masih jauh dari pengelompokan kelas 4.0 atau sangat jelas (penilaian paling optimal dari *Ethidium Bromide*). Hasil yang didapat yaitu 3.0, masih termasuk kedalam kategori jelas, dapat dinyatakan perubahan variasi konsentrasi pada *Hematoxylin* belum optimal, perlu dilakukan pengujian variasi konsentrasi dan waktu lebih lama untuk menghasilkan nilai yang mendekati 4.0.

Hasil pewarnaan *Hematoxylin* dengan variasi lama waktu 10 menit, 20 menit, dan 40 menit terjadi peningkatan ketebalan *band* DNA. Hal ini merupakan faktor dari laju reaksi yaitu lama waktu, semakin lama waktu perendaman DNA pada pewarna *Hematoxylin* akan mempengaruhi tebal *band* DNA yang dihasilkan. Karena kontak DNA dengan zat pewarna dilakukan lebih lama, maka interkalasi zat warna kedalam DNA semakin banyak sehingga warna yang ditimbulkan menjadi lebih tebal (Purnami, et al., 2015). Dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa lama kontak yang paling berpengaruh terhadap pewarnaan *Hematoxylin* ini, yaitu 40 menit dengan nilai rata-rata 3.0.

4.1.4 Hasil Jurnal Penelitian Keempat

Hasil penelitian Yayah Winarti pada tahun 2017 yang berjudul "Optimasi Penggunaan *Methylene Blue* sebagai Pengganti *Ethidium Bromida* pada DNA Hasil

Elektroforesis *Gel Agarose*” bertujuan untuk menentukan konsentrasi dan lama waktu *Methylene Blue* yang paling optimal untuk pewarnaan DNA hasil elektroforesis *gel agarose*. Penelitian ini dilakukan dengan melakukan variasi konsentrasi dan lama kontak gel agarose hasil elektroforesis dengan *Methylene Blue*. Pengujian dilakukan dengan perendaman gel agarose pada larutan *Methylene Blue* konsentrasi 0,00625%, 0,0125%, dan 0,025% dengan lama kontak 20 menit, 25 menit, dan 30 menit. Hasil pewarnaan DNA menggunakan *Methylene Blue*, dibandingkan dengan hasil pewarnaan DNA menggunakan *Ethidium Bromide* sebagai *gold standar*. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.



Gambar 4. 4 Perbandingan hasil pewarnaan DNA menggunakan Methylene Blue pada berbagai variasi konsentrasi dan lama kontak

Berdasarkan Gambar 4.4, maka dapat diketahui bahwa hasil pewarnaan DNA menggunakan Methylene Blue sama dengan hasil pewarnaan menggunakan Etidium Bromida. Gambar 4.4 menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi dan lama kontak gel agarose di dalam Methylene Blue berpengaruh terhadap resolusi band DNA yang dihasilkan.

Hasil uji normalitas untuk mengetahui apakah warna band DNA pada setiap lama kontak gel agarose dalam *Methylene Blue* dengan berbagai variasi konsentrasi tidak terdistribusi normal. Hasil uji nonparametrik Kruskal-Wallis, diperoleh hasil adanya perbedaan warna band DNA baik pada lama kontak 20 menit, 25 menit, dan

30 menit, terhadap variasi konsentrasi *Methylene Blue* 0,00625%, 0,0125% dan 0,025%.

Tabel 4. 3 Hasil Uji Deskriptif Pewarna DNA Methylene Blue

Lama Kontak	Konsentrasi	Mean warna band DNA
20 menit	0,0125%	2,75
	0,025%	3,92
25 menit	0,00625%	3,00
	0,0125%	3,92
30 menit	0,00625%	3,08
	0,0125%	3,33
	0,025%	3.83

Hasil pengamatan warna band DNA pada lama kontak 20 menit pada konsentrasi *Methylene Blue* 0,00625% dan lama kontak 25 menit pada konsentrasi *Methylene Blue* 0,025% ialah konstan, maka *mean* pada kedua perlakuan tersebut tidak muncul saat di uji deskriptif. *Mean* kedua perlakuan tersebut dapat diperoleh dengan perhitungan sederhana secara manual dan disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Mean Warna Band DNA terhadap konsentrasi Hematoxylin 0,00625% Dengan Lama Kontak 20 Menit dan Konsentrasi 0,025% Dengan Lama Kontak 25 Menit

Lama Kontak	Konsentrasi	Mean warna band DNA
20 menit	0,00625%	2,00
25 menit	0,025%	4,00

Hasil penelitian diperoleh nilai optimasi *Methylene Blue* untuk pewarnaan DNA yaitu perendaman gel agarose hasil elektroforesis dalam larutan *Methylene Blue* 0,0125% selama 25 menit. *Methylene Blue* merupakan pewarna thiazine kationik, berwarna biru tua pada saat teroksidasi dan tidak berwarna dalam bentuk tereduksi. *Methylene Blue* dimanfaatkan untuk pewarnaan histokimia, dan berikatan dengan DNA melalui mode semi-interkalasi dan elektrostatis, meskipun ligan yang dimiliki merupakan interkalator (Vardevanyan, et al., 2013)

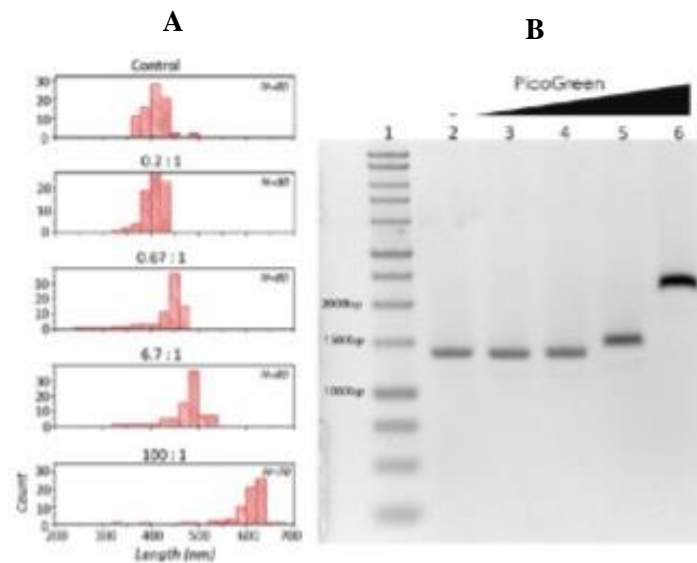
Beberapa kesamaan antara *Hematoxylin* dengan *Methylene Blue*, diantaranya yaitu merupakan pewarna histokimia, sebagai pewarna kationik, pewarna basa (Avwioro, 2011), akan berikatan dengan DNA melalui model ikatan elektrostatis (Kiss, et al., 1996). Karena adanya beberapa kesamaan antara *Hematoxylin* dan *Methylene Blue*, maka penelitian yang dilakukan oleh Yayah Winarti dapat digunakan sebagai salah satu acuan untuk menentukan adanya pengaruh konsentrasi *Hematoxylin* dalam pewarnaan DNA hasil elektroforesis gel agarose.

4.1.5 Hasil Jurnal Penelitian Kelima

Hasil penelitian Aleksandre Japaridze, Alexander Benke, Sylvain Renevey, Carine Benadiba, Giovanni Dietler (2015) yang berjudul “*Influence of DNA Binding Dyes on Bare DNA Structure Studied with Atomic Force Microscopy*”. Peneliti mengamati pengaruh pewarna terhadap panjang persistensi, panjang kontur DNA, dan bentuk morfologi molekul DNA. Peneliti menggunakan tiga pewarna yang banyak digunakan dan mengikat molekul DNA dengan cara yang berbeda, yaitu *PicoGreen*, DAPI, dan DRAQ5. Hasil pengamatan secara mikroskopis dilanjutkan dengan uji kuantifikasi dan pengukuran sifat struktural DNA menggunakan ukuran nanometer seperti tercantum pada Tabel 4.5.

Tabel 4. 5 Parameter bentuk dari DNA yang berikatan dengan *PicoGreen*

PicoGreen:bp	no. of molecules	av length L [nm]	elongation [%]	L_p [nm]
control	80	410 ± 25		61 ± 3
0.2:1	80	410 ± 20		63 ± 3
0.67:1	80	430 ± 45	5	59 ± 3
6.7:1	80	480 ± 40	16	64 ± 3
100:1	70	600 ± 55	46	61 ± 3

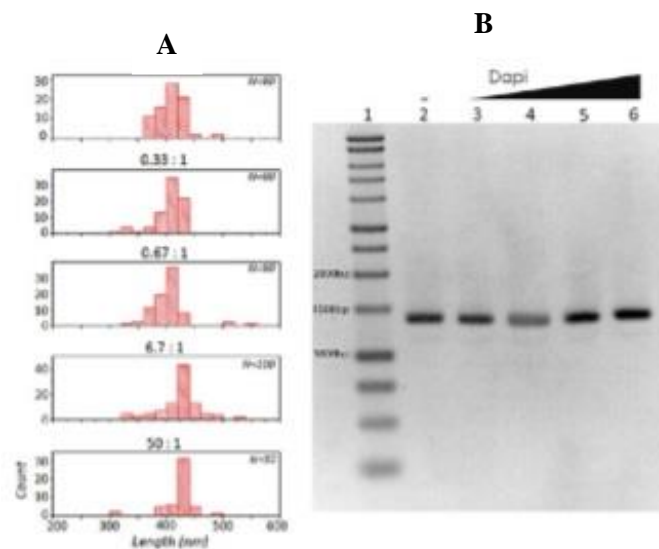


Gambar 4. 5 A. Distribusi Panjang kontur untuk kompleks DNA-*PicoGreen*
 B. Gel elektroforesis DNA yang sesuai. Konsentrasi *PicoGreen*
 (*PicoGreen*:bp = 0.2:1; 0.67:1; 6.7:1; and 100:1)

Dari Gambar 4.5, terlihat adanya hubungan antara panjang kontur DNA terhadap konsentrasi *PicoGreen*. Dengan peningkatan konsentrasi *PicoGreen* sebagai pewarna DNA, terjadi distribusi peningkatan terhadap panjang DNA secara progresif sampai 45%. Namun, setelah dilakukan perhitungan panjang persistensi, tidak mengungkapkan adanya ketergantungan antara panjang persistensi dengan konsentrasi *PicoGreen*. Dari hasil pengukuran tersebut, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi *PicoGreen* yang tinggi dapat meningkatkan panjang kontur DNA dan mengubah bentuk keseluruhan DNA tanpa mempengaruhi panjang persistensi.

Tabel 4. 6 Parameter bentuk dari DNA yang berikatan dengan DAPI

Dapi:bp	no. of molecules	av length L [nm]	L_p [nm]	ΔL_p [%]
control	80	410 ± 25	61 ± 3	
0.33:1	80	405 ± 25	52 ± 3	-15
0.67:1	80	400 ± 30	47 ± 3	-23
6.7:1	100	425 ± 40	42 ± 3	-31
50:1	50	420 ± 30	35 ± 3	-42



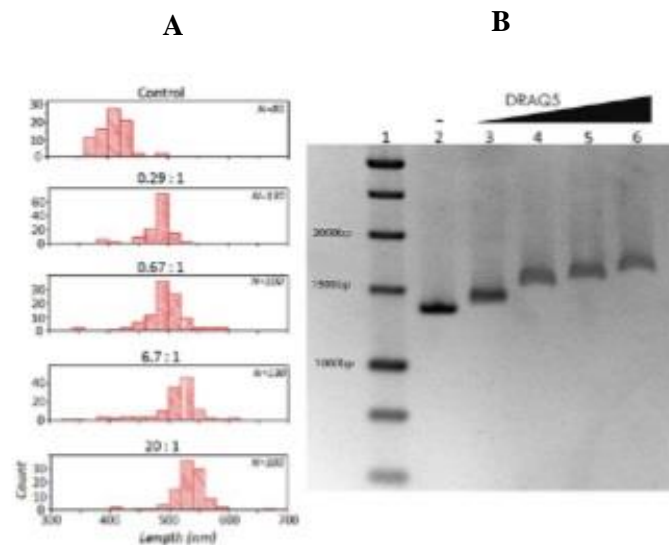
Gambar 4. 6 (A). Distribusi Panjang kontur untuk kompleks DNA-DAPI ; (B). Gel elektroforesis DNA yang sesuai. Konsentrasi DAPI (Dapi:bp = 0.33:1; 0.67:1; 6.7:1; dan 50:1).

Berdasarkan Tabel 4.6, DAPI digunakan sebagai pewarna selanjutnya dalam penelitian ini dan dibandingkan terhadap pewarna *PicoGreen*, DAPI tidak mengubah panjang rata-rata fragmen DNA seperti yang terlihat dari distribusi panjang kontur dan hasil elektroforesis gel pada Gambar 4.6. Panjang kontur DNA tidak berubah, tetapi panjang persistensi mengalami perubahan secara signifikan,

dimana terjadi penurunan secara proporsional seiring dengan peningkatan konsentrasi pewarna.

Tabel 4. 7 Parameter bentuk dari DNA yang berikatan dengan DRAQ5

DRAQ5:bp	no. of molecules	av length	elongation [%]	L_p [nm]	ΔL_p [%]
control	80	410 ± 25		61 ± 3	
0.29:1	130	480 ± 30	16	53 ± 3	-13
0.67:1	100	495 ± 35	20	55 ± 3	-10
6.7:1	130	510 ± 45	24	44 ± 3	-28
20:1	100	535 ± 30	30	33 ± 3	-46



Gambar 4. 7 (A). Distribusi Panjang kontur untuk kompleks DNA-DRAQ5 (B). Gel elektroforesis DNA yang sesuai. Konsentrasi DRAQ5 (DRAQ5:bp = 0.29:1; 0.67:1; 6.7:1; dan 20:1).

Pewarna terakhir yang digunakan dalam penelitian ini adalah DRAQ5. Sampel yang diwarnai dengan DRAQ5 menunjukkan perubahan yang lebih kuat terhadap DNA dibandingkan dengan *PicoGreen* dan DAPI. Morfologi DNA serta

panjang total dipengaruhi secara drastis oleh pewarna DRAQ5. Hasil elektroforesis gel, diperoleh fragmen DNA menjadi lebih panjang seiring peningkatan konsentrasi pewarna dan bermigrasi lebih lambat. Panjang persistensi DNA juga mengalami perubahan yang besar, terjadi penurunan nilai sebesar ~45%. Hasil penelitian menyatakan bahwa pewarna DRAQ5 berinteraksi sangat kuat dengan DNA dan mengubah sifat fisik DNA, sehingga dapat meningkatkan panjang total fragmen DNA sebesar ~30% dan secara bersamaan terjadi penurunan panjang persistensi sebesar ~45%.

4.2 Analisis dan Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini melakukan studi literatur mengenai gambaran berbagai pewarna DNA dalam mewarnai DNA hasil elektroforesis *gel agarose*. Berdasarkan hasil studi literatur yang telah didapat, diketahui bahwa pada pewarnaan DNA hasil elektroforesis *gel agarose* menggunakan *peqGREEN*, konsentrasi *peqGREEN* yang paling baik digunakan adalah 60.000x dalam aquades, meskipun penggunaan *peqGREEN* yang direkomendasikan untuk pewarnaan DNA hasil elektroforeis gel agarose adalah 20.000x dalam aquades, namun pada penelitian yang dilakukan oleh Artati & Dini, (2017), menunjukkan bahwa konsentrasi 60.000x dalam aquades masih dapat menghasilkan visualisasi fragmen DNA dengan baik tanpa mengurangi kualitas hasil pengujian. *peqGREEN* sendiri diketahui memiliki sensitivitas yang tinggi sebagai pengganti *Ethidium Bromide* (GeneOn, n.d.).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Huang, et al., (2010), diketahui bahwa meskipun SYBR *Gold* dan SYBR *Green* banyak digunakan sebagai pewarna DNA

yang lebih aman dibandingkan dengan *Ethidium Bromide*, namun kedua pewarna ini menyebabkan adanya perubahan mobilitas DNA sehingga tidak dapat menentukan fragmen DNA secara akurat, maka pada penelitian Huang, et al., (2010) digunakan *GelRed* pada konsentrasi 10x, 20x, 40x, dan 100x. *GelRed* sendiri diketahui memiliki sensitivitas dua kali lebih besar dari *Ethidium Bromide* (Crisafuli, et al., 2015). Hasil yang didapatkan yaitu pada konsentrasi 10x, 20x, dan 40x, intensitas fluoresens menghilang seiring dengan penurunan konsentrasi DNA dan terdapat perubahan mobilitas band DNA. Hal tersebut tidak terjadi pada *GelRed* pada konsentrasi 100x, sehingga didapatkan konsentrasi *GelRed* 100x merupakan yang paling optimal sebagai pewarna DNA hasil elektroforesis *gel agarose*, dikarenakan *GelRed* pada konsentrasi 100x tidak menyebabkan perubahan mobilitas band DNA dan dapat menentukan fragmen DNA secara akurat.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Abdullah, (2019), digunakan *Hematoxylin* sebagai pewarna DNA hasil elektroforesis *gel agarose*. Hasil dari penelitian ini didapatkan lama waktu yang paling optimal dalam pewarnaan DNA hasil elektroforesis *gel agarose* menggunakan *Hematoxylin* adalah 40 menit. Pada penelitian tersebut, konsentrasi *Hematoxylin* yang digunakan adalah 0,01%. Namun hasil yang didapat masih dikatakan kurang optimal, dimana kejelasan band DNA masih termasuk kedalam kategori jelas saja dengan rata-rata 3.0, sehingga perlu dilakukan perubahan variasi konsentrasi untuk mendapatkan hasil yang lebih optimal.

Penelitian yang dilakukan oleh Winarti, (2017), menggunakan konsentrasi *Methylene Blue* 0,00625%, 0,0125%, dan 0,025% dengan lama kontak 20 menit,

25 menit, dan 30 menit. Sensitivitas dari Methylene Blue sendiri relatif rendah dan memiliki pengikatan reversible yang membuatnya menjadi noda sementara dan berdifusi relatif cepat dari gel (Soto & Draper, 2011). Dari penelitian tersebut, didapatkan hasil *Methylene Blue* yang optimal pada pewarnaan DNA hasil elektroforesis gel agarose adalah pada konsentrasi 0,0125% dengan lama waktu 25 menit, dimana pada konsentrasi dan lama waktu tersebut, didapatkan rata-rata 3,92 yang termasuk ke dalam kategori sangat jelas.

Pada penelitian yang dilakukan Japaridze, et al., (2015), digunakan tiga pewarna yang banyak digunakan dan mengikat molekul DNA dengan cara yang berbeda untuk mengamati pengaruh pewarna terhadap panjang persistensi, panjang kontur DNA, dan bentuk morfologi molekul DNA. Ketiga pewarna itu adalah *PicoGreen*, DAPI, dan DRAQ5. Dari penelitian tersebut, didapatkan hasil bahwa pada konsentrasi yang rendah sekalipun, DAPI dan DRAQ5 sangat mempengaruhi morfologi DNA (pewarna:bp = 0.2:1–0.67:1). DRAQ5 merubah panjang kontur dan panjang persistensi DNA, sedangkan DAPI hanya mempengaruhi panjang persistensi DNA. *PicoGreen* tidak menunjukkan adanya perubahan apapun pada konsentrasi rendah, namun pada konsentrasi yang tinggi (pewarna:bp > 6.7:1), terjadi perubahan pada struktur DNA.

Dari penelitian Japaridze, et al., (2015) tersebut, diketahui bahwa *PicoGreen* meningkatkan panjang kontur DNA hingga lebih dari 45% tanpa mempengaruhi panjang persistensi. DAPI menurunkan panjang persistensi sebanyak 40% tanpa merubah panjang total dari fragmen DNA. Sedangkan DRAQ5 mempengaruhi keduanya, yaitu meningkatkan panjang kontur DNA dan pada waktu yang

bersamaan menurunkan panjang persistensi DNA. Namun DRAQ5 diketahui bersifat toksik sehingga tidak direkomendasikan untuk digunakan (Lukinavičius, et al., 2015).