

Pemanfaatan *Nata de Coco* sebagai Media Gel Elektrofosis Pada Zat Warna Remazol : Pengaruh pH, Waktu dan Aplikasi Pemisahan Gelatin

Lutfi Andre Yahya, Ita Ulfin, Fredy Kurniawan
Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: itau@chem.its.ac.id

Abstrak— *Nata de coco* telah digunakan sebagai pengganti media gel elektrofosis pada sampel pewarna remazol. Pada penelitian ini, diamati pengaruh pH larutan buffer, waktu elektrofosis dan aplikasi pemisahan gelatin menggunakan elektrofosis dengan media *nata de coco*. *Nata de coco* yang berumur 4 hari memiliki ketebalan yang sesuai yaitu 0,454 cm dan waktu inkubasi yang tidak terlalu lama sehingga umur tersebut digunakan dalam penelitian ini. Hasil resolusi elektrofosis terbaik didapatkan pada penggunaan buffer fosfat yang terbuat dari garam-garamnya. Pada pengaruh pH dinyatakan dengan kekuatan ion, dimana semakin besar kekuatan ion larutan, maka semakin jauh jarak migrasi remazol. Lama waktu elektrofosis mempengaruhi jarak migrasi remazol. Kondisi optimum elektrofosis gel menggunakan *nata de coco* yang didapat, digunakan untuk uji pemisahan gelatin menggunakan pewarna remazol turquoise dan didapatkan dua pita pemisahan dengan jarak pita masing-masing 2 cm dan 3,6 cm.

Kata Kunci— *Nata de coco*; Gel Elektrofosis; Remazol; Buffer fosfat; Gelatin.

I. PENDAHULUAN

Elektrofosis merupakan teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam aliran medan listrik yang diberikan [12]. Perbedaan tingkat migrasi disebabkan oleh perbedaan ukuran dan berat molekul serta muatan listrik yang dimiliki oleh molekul yang akan dipisahkan [5].

Metode elektrofosis terbagi atas beberapa jenis berdasarkan media yang digunakan yaitu elektrofosis kertas, gel elektrofosis dan elektrofosis kapiler. Metode elektrofosis yang sering digunakan adalah gel elektrofosis. Gel elektrofosis banyak digunakan untuk penentuan suatu protein maupun asam amino [7]. Gel elektrofosis menggunakan matrik/gel yang berfungsi untuk meminimalisir konveksi, sebagai tempat bergerak molekul dan sebagai penyangga ukuran molekul [5]. Keuntungan dari metode gel elektrofosis adalah harga yang relatif murah dan dalam satu kali analisis bisa digunakan untuk beberapa sampel tergantung dari ukuran lebar gel yang digunakan.

Media gel yang telah digunakan pada penelitian sebelumnya memiliki kelemahan yaitu harga yang relatif mahal, karena diperlukannya sintesis untuk mendapatkannya seperti agarosa yang dibuat dari ekstrak alga [13], dan memiliki sifat beracun seperti akrilamida

[8]. Oleh karena itu perlu dilakukan terobosan baru pembuatan media untuk pengembangan metode gel elektrofosis ini.

Media baru yang diusulkan sebagai gel elektrofosis adalah *nata de coco*. *Nata de coco* merupakan bioselulosa yang mengandung air sekitar 98% dengan tekstur agak kenyal, padat dan kokoh, bewarna putih dan transparan terbentuk dari aktifitas organisme bakteri *Acetobacter xylinum* [10]. *Nata de coco* dibuat dari limbah air kelapa, sehingga penggunaan media ini cukup murah. *Nata de coco* juga tidak berbahaya bagi kesehatan karena *nata de coco* biasanya digunakan sebagai makanan [11].

Gel elektrofosis memerlukan larutan elektrolit yang berfungsi sebagai penghantar arus listrik dalam elektrofosis. Larutan elektrolit yang biasa digunakan adalah buffer/penyangga. Pada penelitian ini digunakan larutan buffer yang digunakan adalah buffer fosfat. Buffer fosfat sudah sering digunakan dan pertama kali digunakan oleh Jorgenson dan Lukacs yang mengawali penggunaan buffer phosphate di tahun 1981[6]. Salah satu keunggulan buffer fosfat adalah area kerja buffer fosfat sangat lebar yaitu dari asam sampai basa. Hal ini dikarenakan asam fosfat adalah trivalen dengan nilai pKa masing-masing 2,12; 7,47; dan 12,36 yang bisa mempertahankan penyanggaan pH [3].

Jenis pewarna yang sudah digunakan bermacam-macam, diantaranya adalah Ethidium bromide[9], Amido Black B, Sudan Black B, Remazol [4], Coomassie Brilliant Blue [1] dan pada penelitian kali ini akan digunakan pewarna remazol karena remazol mudah didapatkan dan harga yang terjangkau. Griffith memperkenalkan penggunaan *reactive dye* anionic pertama kali pada tahun 1972 menggunakan remazol sebagai pewarna dalam pemisahan protein pada Poliakrilamid Gel Elektrofosis (PAGE) [4]. Remazol merupakan pewarna reaktif kelompok ethilsulfonil yang memiliki muatan negatif. Jenis – jenis remazol beragam, dimana setiap jenis memiliki struktur, muatan dan warna yang berbeda-beda.

Lima jenis remazol (Remazol Red RB, Remazol Yellow FG, Remazol Brilliant Blue R, Remazol Turquoise Blue G dan Remazol Violet 5R) yang berbeda digunakan dalam penelitian ini untuk mempelajari penggunaan *nata de coco* sebagai media dalam gel elektrofosis serta untuk mempelajari karakteristik migrasi dari remazol. Remazol sebagai pewarna akan diujikan sebagai pewarnaan diawal (*prestaining*) pada

gelatin yang merupakan protein turunan dari kolagen yang terdiri atas susunan asam amino dalam gel elektroforesis menggunakan media nata de coco.

II. URAIAN PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1) Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi empat bagian yaitu (1) Peralatan pembuatan Nata de Coco, (2) Peralatan Elektroforesis yang terdiri atas: chamber untuk elektroforesis, *power supply*, kabel penghubung, penjepit buaya. (3) Peralatan untuk pembuatan Larutan, (4) Peralatan Pengukuran yang terdiri atas: multimeter, jangka sorong, penggaris dan pH meter.

2) Bahan

Bahan – bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah air kelapa, gula, asam cuka, urea, aquadest, H_3PO_4 (Merck, 99,8%), NaH_2PO_4 (Merck, 99,8%), Na_2HPO_4 (Merck, 99,8%), $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ (Merck, 99,8%), NaOH (Merck, 99,8%), KOH (Merck, 99,8%), HCl (Merck, 99,8%). Remazol Red RB, Remazol Yellow FG, Remazol Brilliant Blue R, Remazol Turquoise Blue G, Remazol Violet 5R, didapat dari rumah batik di Paciran Lamongan, gelatin sapi, gelatin kapsul, gelatin komersial SAP.

B. Prosedur Kerja

1) Pembuatan media elektroforesis dari nata de coco

Pembuatan Nata de coco diawali dengan memanaskan 1L air kelapa hingga mendidih, kemudian 100 gram gula dan 4 gram urea ditambahkan ke dalam air kelapa dan dipanaskan kembali hingga mendidih. Campuran didinginkan hingga suhu kamar ($\pm 30^\circ C$) dan keasamaanya diatur hingga pH 4 dengan menambahkan asam cuka. Starter bakteri *Acebacter Xylinum* ditambahkan sebanyak 10% volume campuran pada suhu ruang ($\pm 30^\circ C$). Campuran dituang ke beberapa cetakan dan didiamkan di ruang isolasi selama 1 – 9 hari. Nata de coco yang sudah dipanen, dibilas dengan air untuk dibersihkan dari sisa campuran air kelapa. Pencucian dilanjutkan menggunakan air panas. Nata de coco kemudian direndam dengan air selama 3 hari. Selanjutnya nata de coco yang sudah dipreparasi diberi lubang sebagai tempat masuknya sampel.

2) Pembuatan sampel pewarna remazol

Pewarna remazol (remazol red RB, remazol yellow FG, remazol brilliant blue R, remazol turquoise blue G, remazol violet 5R) masing-masing dibuat dengan konsentrasi 1%.

3) Pembuatan larutan buffer pH 2-12 dari garam fosfat

Larutan buffer Fosfat pH 2-12 dibuat dari garam-garamnya dengan mencampurkan beberapa gram asam dan beberapa gram basa penyangga yaitu pH 2-4 ($H_3PO_4 + NaH_2PO_4$), pH 5-9 ($NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$) dan pH 10 -12 ($Na_3PO_4 + Na_2HPO_4$)

4) Metode elektroforesis

Nata de coco digunakan sebagai media gel dalam metode elektroforesis. Kemudian dibuat sumuran pada media gel elektroforesis sebagai tempat sampel. Sample dimasukkan ke dalam lubang Nata de coco menggunakan pipet sebanyak 0,1 mL. Nata de coco dimasukkan kedalam chamber elektroforesis dan ditambahkan larutan

buffer dengan ketinggian yang sama dengan tinggi media nata de coco. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 150 V selama 15 menit. Setelah selesai, *power supply* dimatikan dan dilakukan pengambilan data berupa suhu buffer menggunakan termometer, pH buffer menggunakan pH meter dan jarak migrasi menggunakan penggaris.

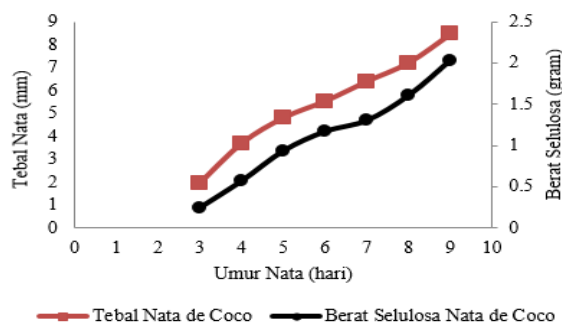
5) Aplikasi penggunaan remazol sebagai pewarnaan dalam pemisahan gelatin menggunakan gel nata de coco dalam proses gel elektroforesis

Gelatin sebanyak 2 mL dicampurkan dengan 1mL Remazol Turquoise Blue G dan dipanaskan selama 1 jam. Campuran didinginkan hingga suhu ruang ($\pm 30^\circ C$). Selanjutnya gelatin digunakan sebagai sampel dalam elektroforesis

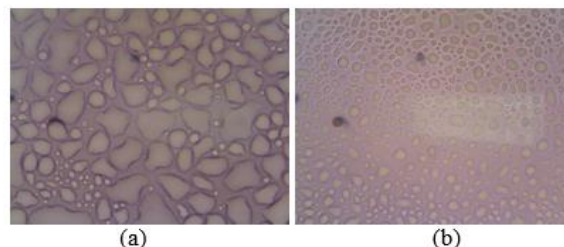
III. HASIL DAN DISKUSI

A. Pembuatan media elektroforesis dari nata de coco

Lapisan nata de coco yang merupakan serat bioselulosa terbentuk setelah waktu inkubasi selama 3 hari. Semakin lama waktu inkubasi, Semakin tebal lapisan serat bioselulosa yang terbentuk. Pengamatan ketebalan nata de coco yang terbentuk dalam variasi hari ditunjukkan pada Gambar 1. Peningkatan bioselulosa diamati dengan menghitung berat padatan nata yang telah dikeringkan. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa kadar air yang terdapat dalam nata de coco sebesar 98-99%, dengan berat selulosa yang terbentuk ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hubungan umur nata de coco terhadap ketebalan nata de coco dan berat selulosa.

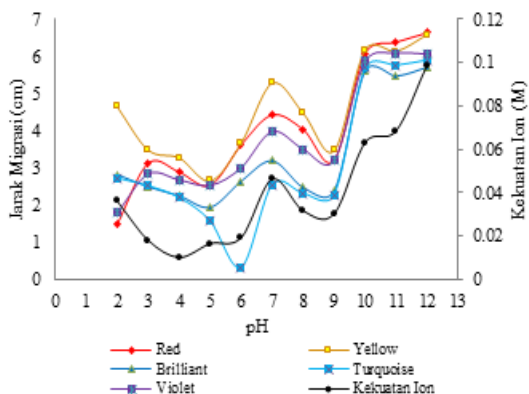


Gambar 2. Penampakan membujur nata de coco umur (a) 4 hari dan (b) 7 hari menggunakan mikroskop perbesaran 1000x

Lapisan tipis nata de coco disayat tipis membujur untuk diamati pori-pori nata yang terbentuk, hasilnya seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Nata de coco yang terbentuk dipreparasi dengan mencuci nata de coco menggunakan air hingga bersih dan di cuci dengan air panas untuk membunuh bakteri. Setelah pencucian, nata de coco direndam dengan air selama 3 hari dengan penggantian air setiap harinya. Hal ini untuk menetralkan pH nata de coco karena nata de coco yang terbentuk memiliki pH asam. Perendaman dengan air bertujuan untuk menghindari adanya ion-ion lain yang akan mempengaruhi proses elektrofore.

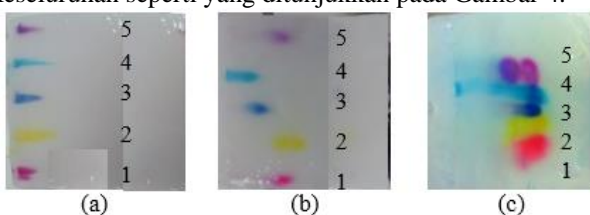
B. Pengaruh pH buffer garam terhadap hasil elektroforesis

Nilai pKa maupun pH tidak konstan untuk semua kondisi terutama dalam sistem elektroforesis, dikarenakan adanya tegangan yang diberikan tetapi bentuk fungsi kekuatan ion bisa mewakili kondisi tersebut. Nilai kekuatan ion didapatkan dari perhitungan konsentrasi jumlah ion yang terdapat dalam buffer tersebut dengan satuan molar (M). Nilai kekuatan ion tertinggi terdapat pada larutan buffer pH 12 dan nilai kekuatan ion terendah terdapat pada larutan buffer pH 4. Hubungan antara nilai kekuatan ion, pH dan jarak migrasi disajikan pada Gambar 3 untuk masing-masing remazol yang digunakan. Davis, 1982 menyatakan bahwa mobilitas molekul tidak hanya dipengaruhi oleh pH dan kekuatan ion tetapi juga dipengaruhi oleh jumlah valensi dan jumlah ion lain yang terdapat didalamnya [2]. Nilai kekuatan ion buffer mempengaruhi migrasi dari remazol dimana, semakin tinggi kekuatan ion larutan buffer maka akan menambah kecepatan migrasi dari molekul remazol.



Gambar 3. Hubungan antara jarak migrasi remazol pada berbagai pH dengan kekuatan ion

Jarak migrasi remazol pada berbagai pH memiliki nilai yang bervariasi sesuai dengan nilai kekuatan ion dari pH larutan buffer yang digunakan. Jarak paling jauh pada komposisi buffer (NaOH+H₃PO₄) adalah pada pH 2, Jarak migrasi terjauh pada komposisi (Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄) adalah pada pH 7 dan jarak migrasi terjauh pada komposisi buffer Na₂HPO₄ + Na₃PO₄ adalah pada pH 12. Hasil migrasi remazol pada kondisi asam pada pH 2 memiliki hasil pita yang meruncing diujung dan remazol tidak bermigrasi secara keseluruhan. Hasil resolusi elektroforesis pada pH 12 menghasilkan pita yang melebar dan remazol bermigrasi secara keseluruhan. Hasil yang paling baik ketika digunakan buffer pada pH 7 dimana, sampel remazol bergerak keseluruhan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.

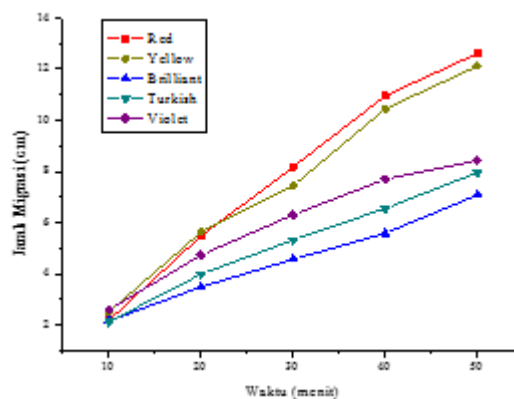


Gambar 4. Hasil resolusi elektroforesis remazol pada (a) pH 2 (b) pH 7 (c) pH 12 menggunakan sampel (1) remazol red (2) remazol yellow (3) remazol brilliant (4) remazol turquoise (5) remazol violet

Jarak migrasi paling jauh diantara berbagai pH yang digunakan adalah pada pH 12, tetapi tidak menghasilkan resolusi yang baik. Dengan demikian, hasil yang paling baik dari penggunaan berbagai buffer adalah ketika digunakan larutan buffer dengan pH 7 yang terbuat dari Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄ dengan nilai kekuatan ion sebesar 0,0461 M.

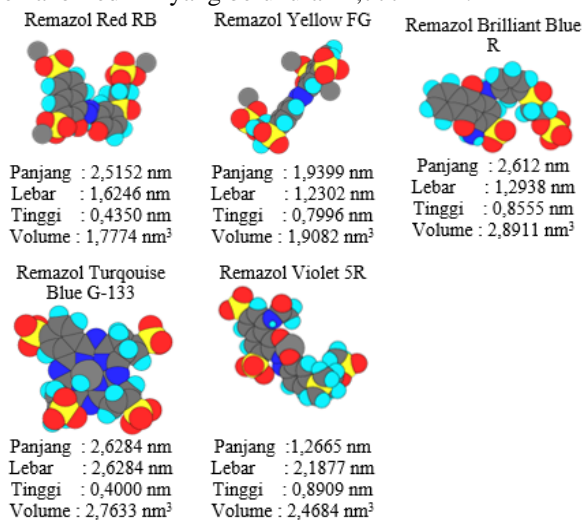
C. Pengaruh waktu elektroforesis terhadap migrasi remazol

Peningkatan jarak migrasi remazol dalam berbagai waktu ditunjukkan pada Gambar 5. Jarak tempuh migrasi remazol semakin lama waktunya akan semakin jauh. Remazol red dan remazol yellow bermigrasi lebih jauh daripada remazol brilliant, violet dan turquoise. Urutan migrasi remazol dari yang paling jauh adalah remazol red, remazol yellow, remazol violet, remazol turkish dan terakhir remazol brilliant.



Gambar 5. Pengaruh waktu elektroforesis terhadap jarak migrasi remazol

Ukuran dan bentuk masing – masing remazol diperkirakan menggunakan software Chemdraw dan disajikan dalam Gambar 6. Ukuran remazol yang paling besar berdasarkan perhitungan panjang ikatan antar atom adalah remazol brilliant blue R yang berukuran 2,8911 nm³, sedangkan yang berukuran paling kecil adalah remazol red RB yang berukuran 1,7774 nm³.



Gambar 6. Ukuran dan bentuk remazol

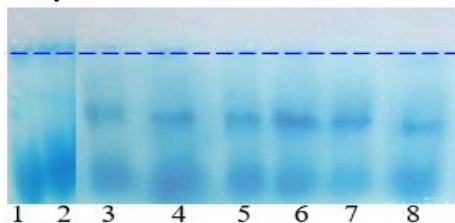
Perbedaan jarak migrasi remazol terhadap waktu elektroforesis ini disebabkan karena beberapa faktor diantaranya adalah ukuran molekul seperti yang telah ditunjukkan pada Gambar 6. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa ukuran molekul remazol red lebih kecil sehingga pergerakan remazol lebih cepat dari remazol yang lain. Remazol turquoise memiliki muatan

total -4 lebih besar daripada yang lain, tetapi karena berat molekul yang besar 990,30 g/mol dan ukuran molekul yang besar migrasi remazol turquoise tidak terlalu jauh. Remazol brilliant blue memiliki jarak migrasi yang paling pendek, hal ini dikarenakan ukuran molekul remazol brilliant blue R yang besar yaitu 2,8911 nm³. Pewarna remazol merupakan pewarna yang memiliki berat molekul relatif (Mr) yang tidak terlalu besar, tetapi pewarna remazol memiliki syarat yang cukup digunakan sebagai pewarna dalam elektroforesis antara lain berwarna, memiliki muatan, dan dapat berikatan dengan senyawa lain.

D. Aplikasi penggunaan remazol sebagai pewarnaan dalam pemisahan gelatin menggunakan gel nata de coco dalam proses gel elektroforesis

Gelatin yang digunakan pada penelitian kali ini adalah gelatin sapi, gelatin kapsul dan gelatin komersial. Gelatin dilarutkan menggunakan air dan dibuat konsentrasi 1200 ppm. Gelatin yang digunakan tidak berwarna dan tidak memendar ketika disinari sinar uv. Oleh karena itu, pewarnaan dilakukan menggunakan remazol turquoise terhadap gelatin yang akan digunakan pada metode gel elektroforesis. Gelatin dan remazol turquoise dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam selanjutnya sampel tersebut dilakukan elektroforesis menggunakan media nata de coco. Hasil pemisahan menggunakan elektroforesis didapatkan hasil seperti pada Gambar 7.

Pewarna remazol menghasilkan pita tunggal seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7 (No. 1 dan 2). Gelatin yang diwarnai dengan remazol turquoise menghasilkan pemisahan fragmentasi 2 pita pemisahan. Jarak migrasi untuk pita paling jauh adalah 3,6 cm dan jarak migrasi untuk pita paling pendek 2 cm. Tidak ada perbedaan pemisahan yang terjadi antara gelatin kapsul, gelatin sapi dan gelatin yang dijual komersial masing – masingnya menghasilkan pemisahan dua pita. Perbedaan pita yang terjadi antara remazol turquoise tunggal dengan gelatin yang diwarnai dengan remazol turquoise menunjukkan bahwa penggunaan remazol sebagai pewarnaan diawal (prestaining) bisa dilakukan. Dua pita pemisahan tidak diidentifikasi lebih lanjut untuk senyawa hasil pemisahannya.



Gambar 7. Pemisahan gelatin dengan prestaining menggunakan remazol dengan media gel nata de coco. Keterangan gambar : 1-2 Remazol Turquoise Blue-G; 3-4 Gelatin Kapsul; 5-6 Gelatin Sapi; 7-8 Gelatin Komersial.

IV. KESIMPULAN

Pemanfaatan gel nata de coco sebagai media dalam proses gel elektroforesis telah dilakukan. Berdasarkan hasil pengamatan dan data yang diperoleh menunjukkan kesimpulan bahwa gel nata de coco dapat digunakan sebagai gel dalam proses gel elektroforesis dengan kondisi sebagai berikut:

1. Umur nata de coco yang dapat digunakan minimal umur 4 hari.

2. Nilai pH larutan buffer fosfat tidak memberikan pengaruh terhadap migrasi remazol, melainkan yang mempengaruhi adalah kekuatan ionnya, dimana semakin besar kuat ion maka semakin jauh jarak migrasi remazol.
3. Semakin lama waktu elektroforesis, semakin jauh jarak migrasi yang ditempuh remazol.
4. Pemisahan gelatin menggunakan pewarnaan remazol turquoise blue menghasilkan 2 pita pemisahan dengan jarak pemisahan 2cm dan 3,6cm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Dra. Ita Ulfin, M.Si selaku dosen pembimbing I, Dr.rer.nat. Fredy Kurniawan, M.Si selaku dosen pembimbing II, Dr. Hendro Juwono, M.Si atas bimbingannya, Kalab Mikrobiologi ITS atas bantuan alat elektroforesis, Kalab Zoologi dan Rekayasa ITS dan semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ausubel, F. M., 1992. *Short Protocols in Molecular Biology "Coomassie Blue Staining"*, New York: Jhon Wiley & Sons, Inc.
- [2] Davis, Bernard D., Edwin J. Cohn., 1983. *The Influence of Ionic Strength and pH on Electrophoretic Mobility*. Boston; Harvard Press.
- [3] Gebauer, P., 2000. *Capillary zone electrophoresis in phosphate buffer – known or unknown?*, Czech Republic: Institute of Analytical Chemistry Academy of Sciences of the Czech Republic.
- [4] Griffith, I., 1972. *Immediate Visualization of Protein in Dedocyl Sulfate-Polyacrylamide Gel by Prestaining with Remazol Dyes*. *Analytical Biochemistry*, Volume 46, pp. 401-412.
- [5] Holde, K. E. v., Johnson, W. C. & Ho, P. S., 2006. *Principles of Physycal Biochemistry*. 2nd penyunt. USA: Pearson Education, Inc.
- [6] Jorgenson, J., 1981. *High Resolution Chromatography*. *Chromatogr*, Volume 4, pp. 230.
- [7] McKee, T. & McKee, J. S., 2012. *Biochemistry : The Molecular Basis of Life*. 5th penyunt. New Yok: Oxford University Press.
- [8] Mickelson, R., Eduardo, C. & `n, 2004. *Bioanalytical Chemistry*. Hoboken-New Jersey: Jhon Wiley & Sons, Inc.
- [9] Sanderson, B. A. et al., 2014. *Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis*. *Analytical Biochemistry*, Volume 454, pp. 44-52.
- [10] Sulistiyana dan Ulfin, I., 2011. *Studi Adsorpsi Kation Ca dan Mg (Penyebab Kسادahan) Menggunakan Selulosa Bakteri Nata de coco dengan Metode Batch*. *Prosiding Seminar Nasional Waste Management I*. ISBN 978-602-95595-4-5, pp. 432-438.
- [11] Ulfin, Ita., Widiastuti, Nurul., Kusumawati, Yuly., Ni'mah, Yatim Lailun., Farahnaz, Rizqa Rif'ati. 2012. *Studi Transport Zat Warna MEtilen Biru, Gentian Violet dan Congo Red Melalui Membran Nata de Coco*. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Unesa 2012*; ISBN: 978-979-028-550-7.
- [12] Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C. W., 2011. *4th Edition Biochemistry*. 4th penyunt. USA: Jhon Wiley & Sons, Inc.
- [13] Westemeier, 2004. *Electrophoresis in Practice: A Guide to theory and Practice*, New Jersey: Jhon Wiley & Sons Inc.