

# PENGERTIAN ELEKTROFORESIS

Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik



berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), dalam hal tersebut DNA, yang bergerak menuju kutub positif (anode), sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (anode).

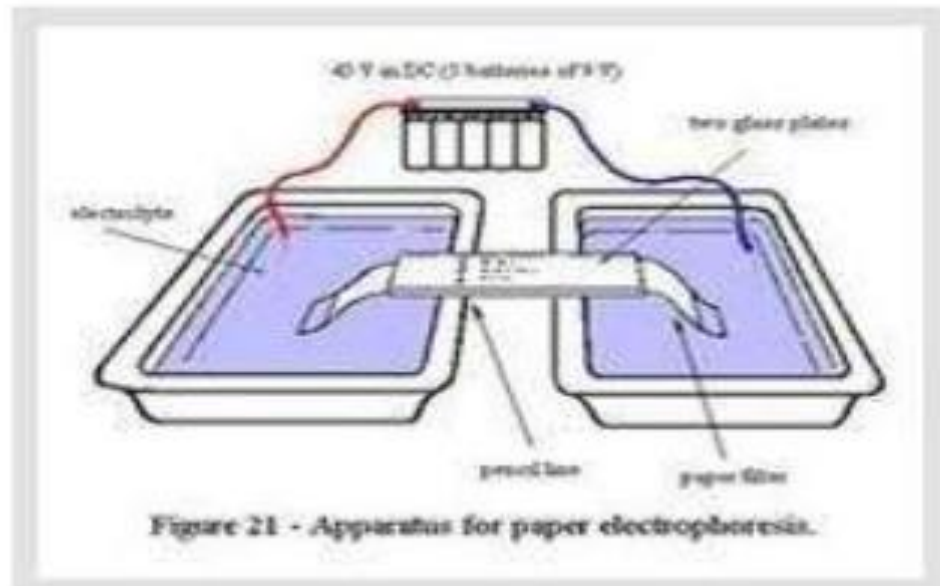


**PRINSIP  
KERJA**

# Fungsi Elektroforesis

- menyediakan informasi mengenai ukuran, konfirmasi dan muatan dari protein dan asam nukleat
- sebagai metode pemisahan yang dapat digunakan untuk menentukan komponen dari protein atau asam nukleat setiap individu
- Pada bidang kepolisian teknik ini digunakan untuk pemeriksaan DNA, karakteristik khusus, misalnya sidik jari. Sehingga membantu polisi dalam mengungkap sebuah kasus.
- Dalam biologi molekuler, elektroforesis merupakan salah satu cara untuk memvisualisasikan keberadaan DNA, plasmid, dan produk PCR.

# ELEKTROFORESIS KERTAS



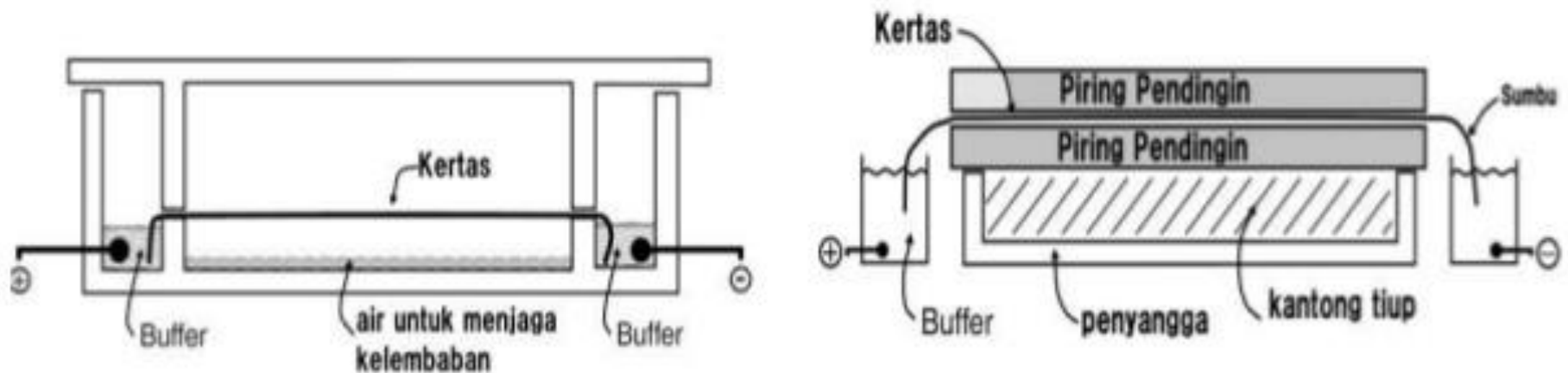
jenis elektroforesis yang terdiri dari kertas sebagai fase diam dan partikel yang terlarut sebagai fase gerak, terutama ion-ion kompleks



Pemisahan ini terjadi akibat adanya gradasi konsentrasi sepanjang sistem pemisahan. Pergerakan partikel dalam kertas tergantung pada muatan atau valensi zat terlarut, luas penampang, tegangan yang digunakan, konsentrasi elektrolit, kekuatan ion, pH, viskositas, dan adsorbsivitas zat terlarut.

# Elektroforesis Kertas

- Diperkenalkan 1950 untuk pemisahan protein (kertas selulosa)
- Berperan pada pemisahan protein atas dasar mobilitasnya pada pH tertentu.
- Menggunakan kertas saring sebagai medium penyangga
- gugus OH pada kertas dapat berinteraksi dengan sampel menyebabkan pita berekor



# Cara kerjanya ???

Kertas saring dibasahi dengan larutan buffer

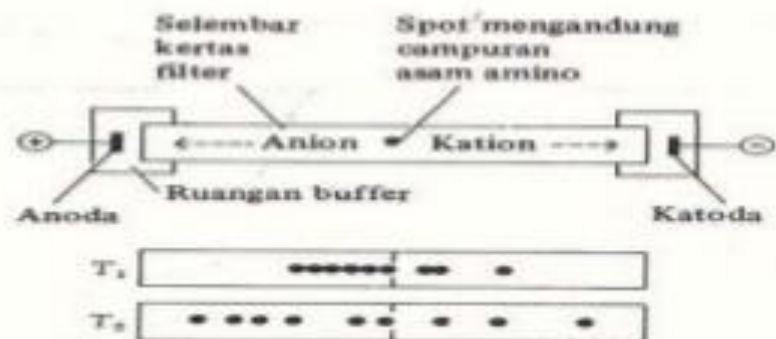
Kertas saring direntangkan diantara dua elektroda

kertas dipindahkan dikeringkan dan diwarnai dengan pewarna yang mewarnai substansinya untuk dianalisa(diperiksa)

Satu tetes campuran yang akan dianalisis ditempatkan pada satu ujung kertas dan listrik dialirkan

Dibandingkan dengan suatu standar

Setiap jenis molekul bermuatan pada campuran (mixtura) akan berpindah pada jarak tertentu baik ke anoda maupun ke katoda tergantung pada muatan dimensi dan akan nampak sebagai titik pada kertas dengan posisi yang baru



## Contoh kasus : pemisahan asam amino

Campuran asam aspartat, histidin dan lisin

setetes larutan dari campuran asam amino, dikeringkan pada kertas dan diberi pewarna

Ujung kertas dicelupkan ke dalam kompartemen elektroda

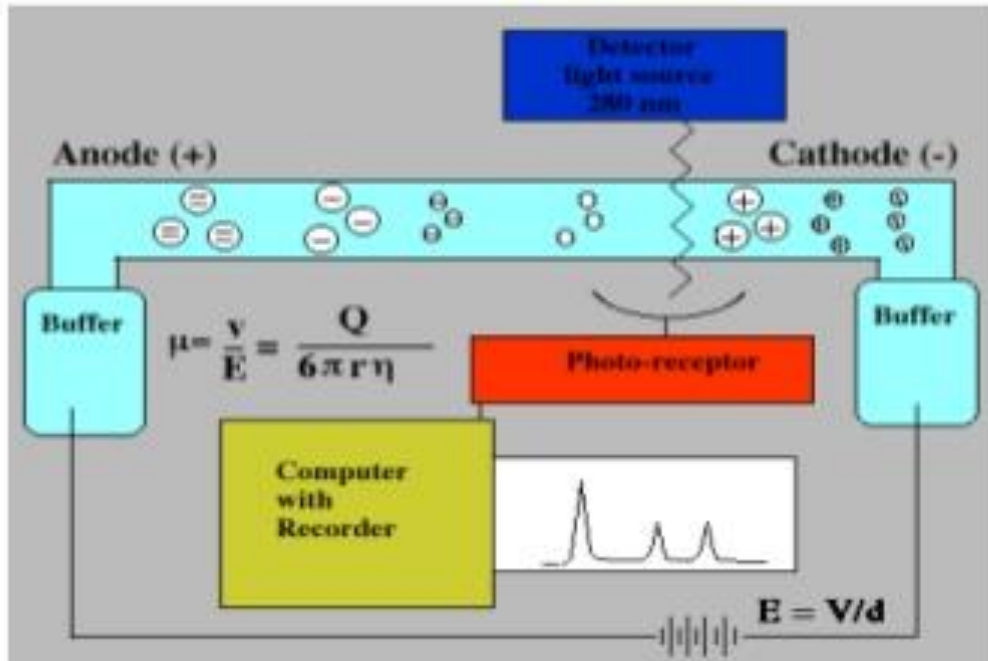
kertas dibasahi dengan buffer pada PH tertentu dan ditempatkan diantara lempengan pendingin

Asam amino yang bersifat sebagai kation pada PH tersebut akan bermigrasi menuju katoda atau kutub negatif. Asam amino yang bersifat anion akan bergerak menuju anoda atau kutub positif

kertas dikeringkan, disemprot dengan ninidrin dan panaskan yang memperlihatkan letak asam amino

diidentifikasi dengan posisi asam amino yang telah diketahui, sebagai marker

# ELEKTROFORESIS KAPILER



Elektroforesis kapiler adalah metode elektroforesis yang digunakan untuk memisahkan asam amino, protein, lipid, karbohidrat dan nukleotida, dengan resolusi tinggi yang dilakukan pada pipa kapiler berisi buffer.

Metode ini mulai digunakan secara luas pada akhir tahun 1940. Elektroforesis kapiler menggunakan listrik bertegangan tinggi yang menyebabkan semua komponen ion atau molekul netral bergerak ke katoda. Deteksi dapat dilakukan dengan teknik pendeteksian spektrometri atau elektrokimia. Teknik pemisahan ini dipengaruhi oleh tegangan listrik, koefisien difusi, panjang, dan diameter pipa kapiler, serta konsentrasi sampel.

# Elektroforesis Kapiler

Elektroforesis yang berlangsung pada tabung kapiler, dikenal sebagai *capillary electrophoresis* (CE)

Gabungan GC dengan elektroforesis

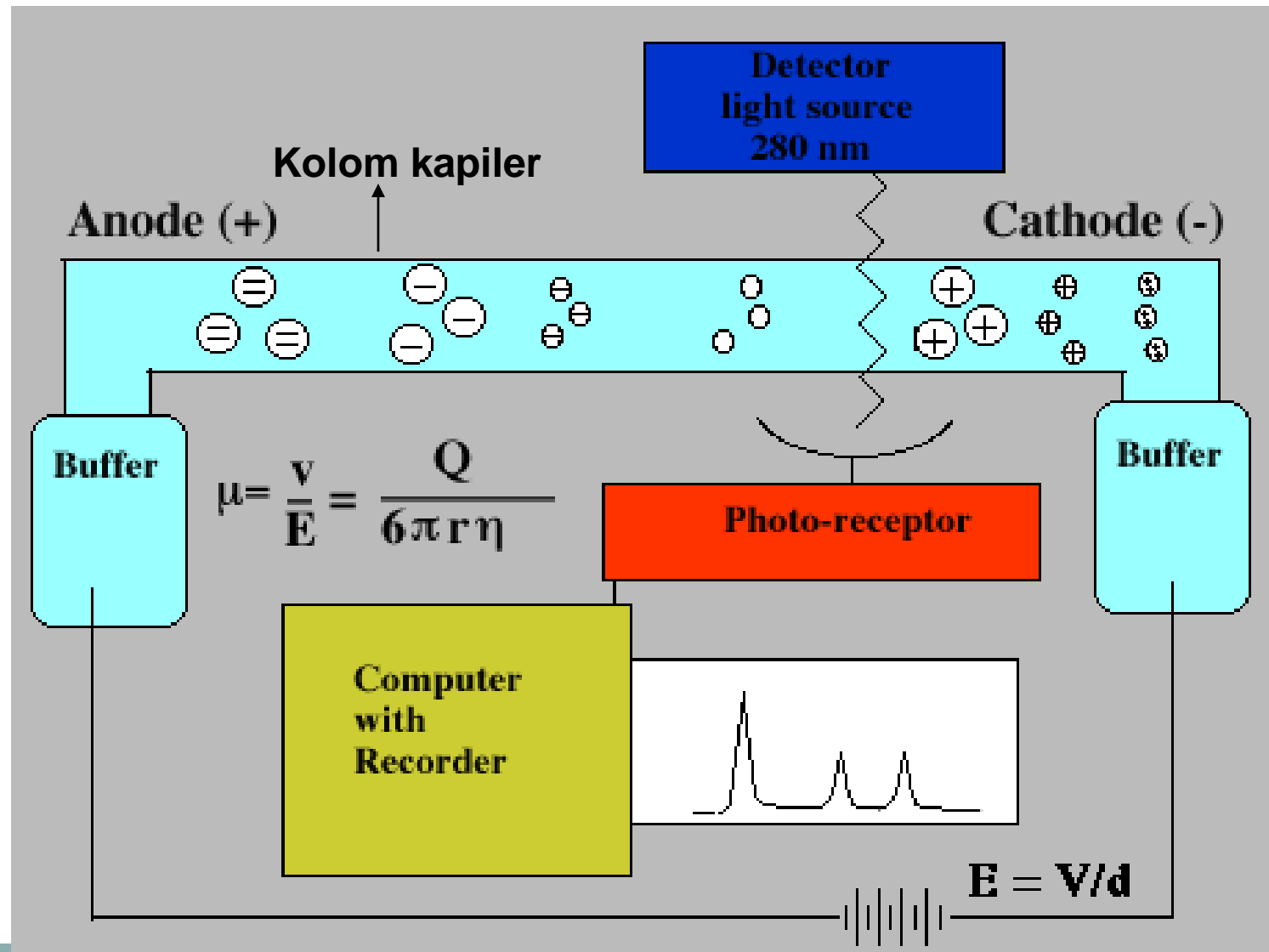
Metode alternatif untuk kromatografi  
→ Elektrokromatografi

Tabung kapiler → Kolom pada kromatografi gas

Ukuran tabung: panjang 10-100 cm; diameter internal 25-100  $\mu\text{m}$



# Instrumentasi



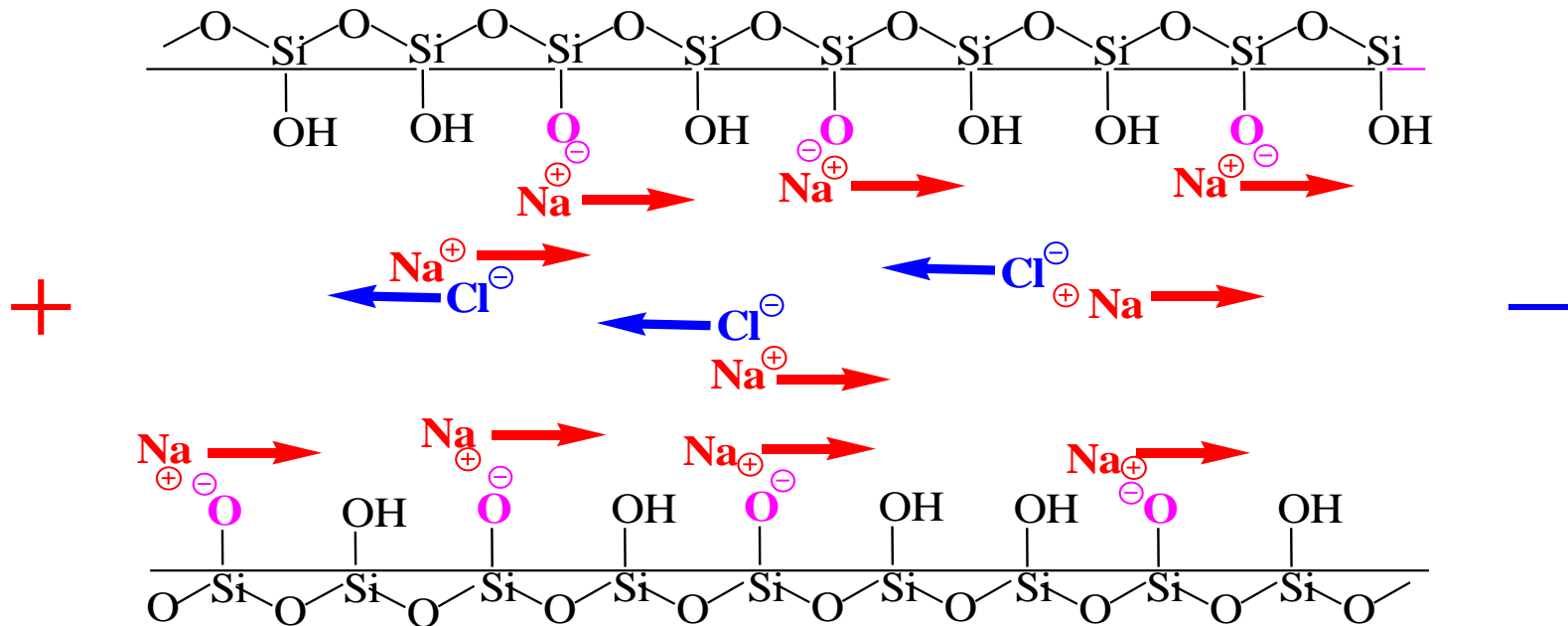
Pada elektroforesis kapiler, komponen dalam campuran ditransport melalui tabung kapiler horizontal oleh potensial dc yang tinggi di sepanjang tabung.

Migrasi ~ mobilitas elektroforesis

Ukuran dan bentuk molekul analat akan berpengaruh terhadap mobilitas elektroforetik

Kolom kapiler  $\longrightarrow$  Biasanya digunakan fused silika baik yang dimodifikasi maupun tidak.

Permukaan bermuatan negatif ( $\text{Si}_2\text{O}^-$  atau silanol)



Pada CE diameter kolom kecil, luas area kecil, sehingga resistensi listrik tinggi. Pada kondisi ini pelebaran kurva karena termal minimum.

- Elektroda → Platinum foil
- Potensial → dc supply 20-30 kV (high voltage)  
Daerah buffer diberi sungkup dari flexiglass ~  $V \gg \gg$
- Detektor: Pada dasarnya detektor yang semua detektor yang digunakan pada HPLC dapat juga diaplikasikan pada CE dan HPCE .Detektor tersebut meliputi: UV, dioda array, fluorescence, refraktif indeks, elektrokimia dan lainnya.

- Injeksi: beberapa  $\mu\text{L}$  (atau  $\text{nL}$  untuk elektrooresis kapiler kinerja tinggi/HPCE) ke bagian ujung kapiler yang bermuatan + (positif) dibantu dengan gravitasi

### Sistem injeksi:

- a. Injeksi hidrodinamik: pada sistem ini digunakan bantuan tekanan saat menginjeksikan sampel pada kolom kapiler.
- b. Injeksi elektrokinetik: digunakan bantuan arus listrik saat sampel diinjeksikan pada kolom kapiler.

volume sampel yang diinjeksikan pada sistem injeksi hidrodinamik dihitung dengan persamaan

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \times 10^3$$

$\Delta P$  adalah perbedaan tekanan (Pa)

$d$  adalah diameter kapiler bagian dalam (m)

$t$  adalah waktu menggunakan (det)

$\eta$  adalah viskositas buffer ( $\text{kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ),

$L$  panjang tabung kapiler. The fact (m)

$10^3$  merupakan faktor konfersi  $\text{m}^3$  ke liter.

**EXAMPLE 12.9**

A hydrodynamic injection is made by applying a pressure difference of  $2.5 \times 10^3$  Pa (approximately 0.02 atm) for 2 s to a 75-cm long capillary tube with an internal diameter of 50  $\mu\text{m}$ . Assuming that the buffer solution's viscosity is  $10^{-3}$  kg  $\text{m}^{-1}$   $\text{s}^{-1}$ , what volume of sample is injected?

**SOLUTION**

Making appropriate substitutions into equation 12.44 gives the volume of injected sample as

$$V_{\text{inj}} = \frac{(2.5 \times 10^3 \text{ Pa})(50 \times 10^{-6} \text{ m})^4(3.14)(2 \text{ s})}{(128)(0.001 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1})(0.75 \text{ m})} \times 10^3 = 1 \times 10^{-9} \text{ L} = 1 \text{ nL}$$

Since the injected sample plug is cylindrical, its length,  $l_{\text{plug}}$ , is easily calculated using the equation for the volume of a cylinder.

$$V = \pi r^2 l_{\text{plug}}$$

Thus,

$$l_{\text{plug}} = \frac{V}{\pi r^2} = \frac{(1 \times 10^{-9} \text{ L})(10^{-3} \text{ m}^3/\text{L})}{(3.14)(25 \times 10^{-6} \text{ m})^2} = 5 \times 10^{-4} \text{ m} = 0.5 \text{ mm}$$

mol solut yang diinjeksikan pada sistem injeksi elektrokinetik dihitung dengan persamaan

$$n_{inj} = \pi C t r^2 (\mu_{ep} + \mu_{eof}) E \frac{\kappa_{buf}}{\kappa_{samp}}$$

C adalah konsentrasi solut

t adalah waktu medan listrik diaplikasikan

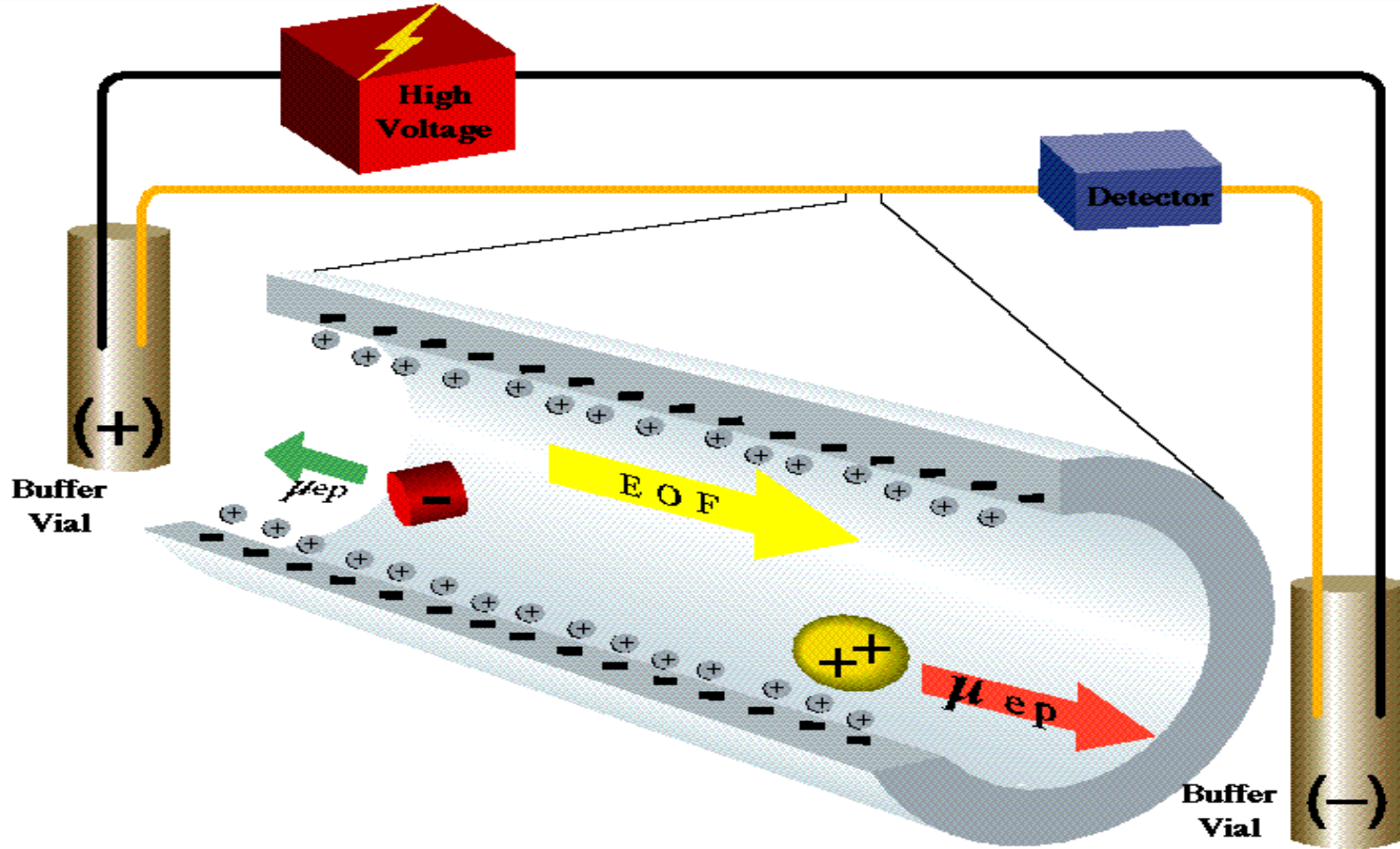
r adalah jari-jari kapiler

$\mu_{ep}$  adalah mobilitas elektroforetik solut  $\mu_{eof}$  adalah mobilitas elektroosmotik

E adalah medan listrik yang digunakan

$\kappa_{buf}$  adalah konduktivitas buffer





Perhatikan:

$\mu_{eof}$ : mobilitas Elektroosmotik (EOF) yang bertambah secara vektorial

$\mu_{ep}$ : mobilitas analat atau mobilitas elektroforetik (EMF)

$\mu_{eap}$ : mobilitas aktual =  $\mu_{ep} + \mu_{eof}$

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon^* \zeta}{4\pi\eta}$$

$\varepsilon^*$  = konstanta dielektrik buffer  $\text{Fm}^{-1} = \text{CV}^{-1}\text{m}^{-1}$

$\zeta$  = potensial zeta (V)

$\eta$  = viskositas larutan ( $\text{dyn S cm}^{-2}$ )

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

$q$  = muatan solut

$\eta$  = viskositas larutan ( $\text{dyn S cm}^{-2}$ )

$$\mu_{eap} = \mu_{ep} + \mu_{eof}$$

$\mu_{tot}$  = mobilitas total

$\mu_{ep}$  = mobilitas analat

$$\mu_{tot} = \mu_{ep} + \mu_{eof}$$

$\mu_{eof}$  = mobilitas elektroforetik

Pada prakteknya:

Spesi bermuatan (+) mencapai katoda paling cepat karena EOF & EMF arahnya sama

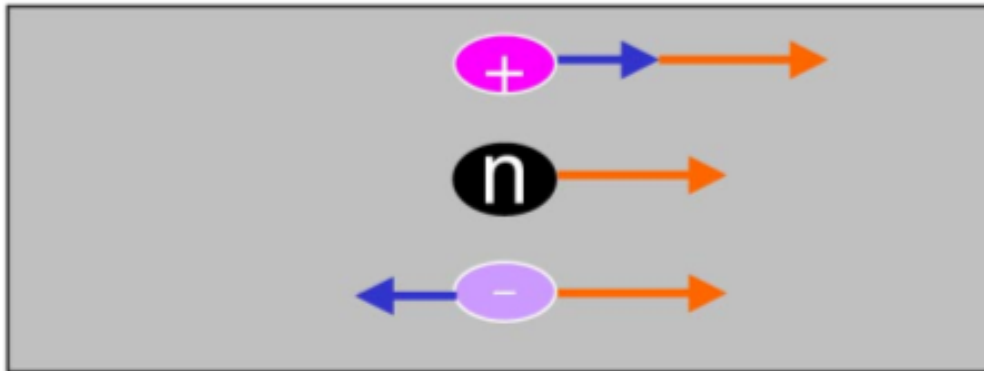
Spesi netral bergerak ke katoda dengan kecepatan ditentukan oleh aliran elektroosmotik

Spesi bermuatan (-) bergerak paling lambat karena EOF & EMF berbeda arah

$\mu_{eo}$  —

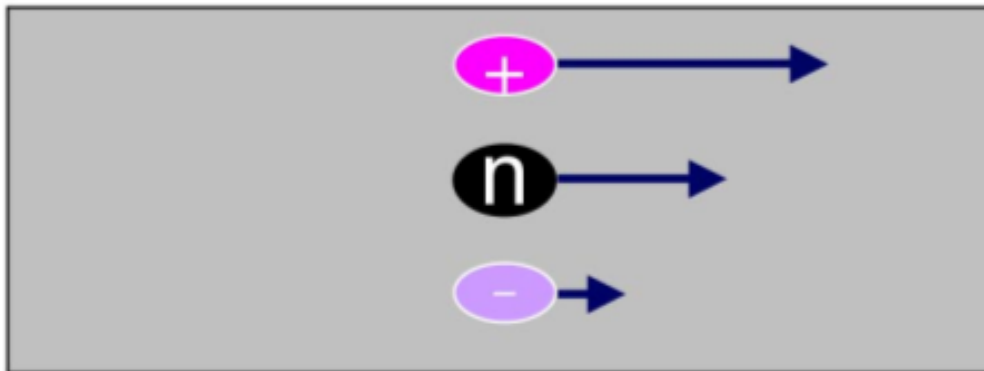
$\mu_{ep}$  —

anode



cathode  
(and detector)

anode



cathode  
(and detector)

Sehingga elektroforesis kapiler dapat memisahkan spesi bermuatan (+), (-), dan netral dalam satu kali injeksi/analisis

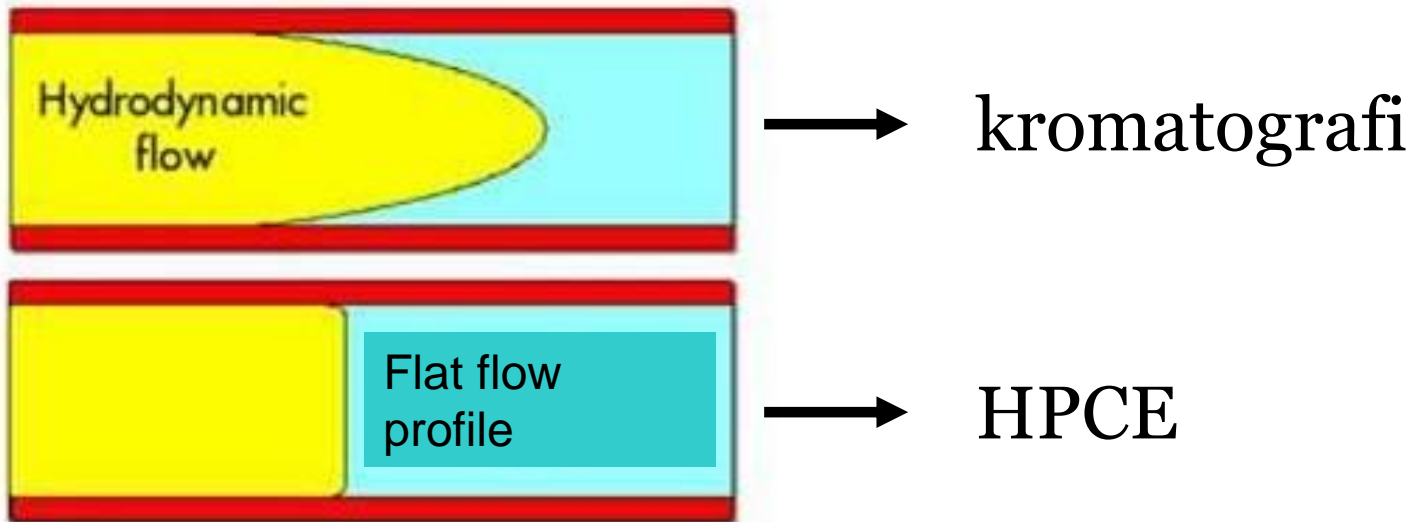
Analisis dapat dibantu dengan menggunakan marker yang netral dan dapat dideteksi.

Syarat marker: inert terhadap dinding dalam kapiler, molekul contoh, dan terhadap komponen buffer.

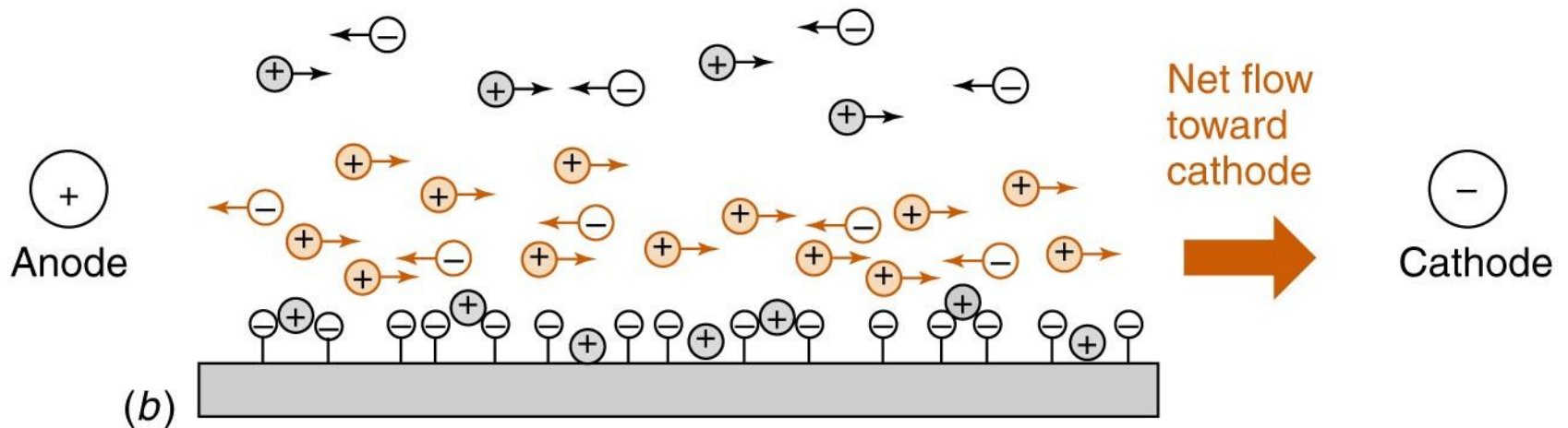
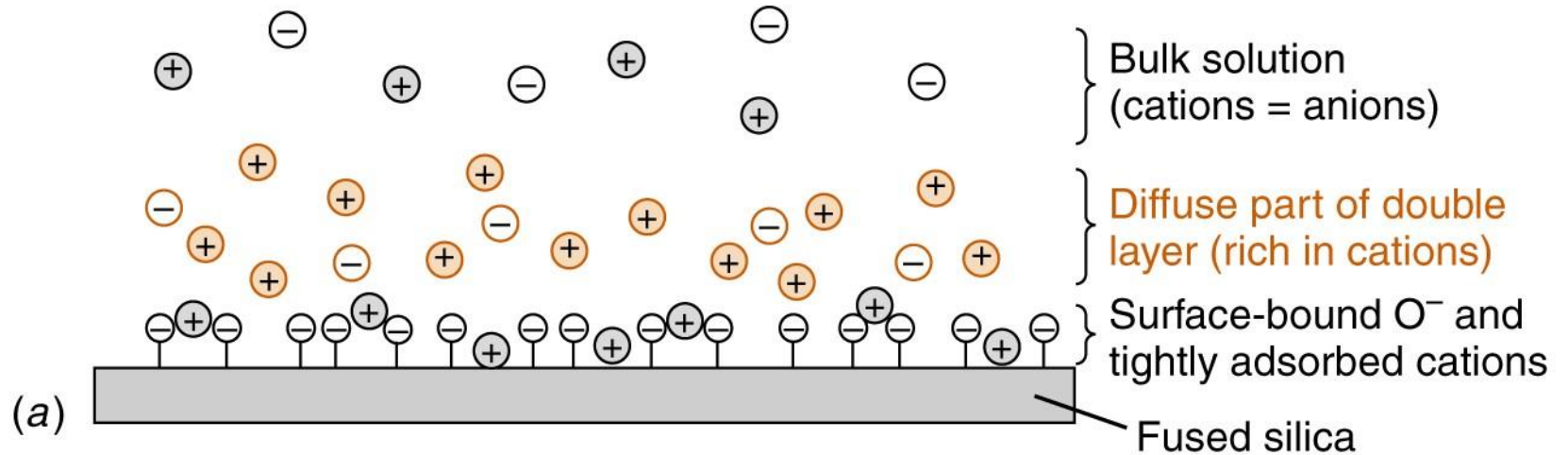
Cntoh markker:metanol, aseton, mesitil oksida.

EOF berpengaruh secara nyata terhadap pelebaran zona ~ Atraksi elektrostatik

~ Elektrik double layer



# Aliran elektroosmosis



## Parameter Identifikasi

- Analisis kualitatif: Waktu migrasi ( $t_M$  atau  $M_t$ )

$$t_M = \frac{L}{v_{\text{tot}}}$$

L = panjang tabung kapiler

$v_{\text{tot}}$  = mobilitas total

$$= (\mu_{ep} + \mu_{eof}) \times E$$

E = medan listrik

$$t_M = \frac{\ell L}{\mu_{ep} V}$$

L = panjang tabung kapiler

$\ell$  = panjang kapiler efektif

V = Tegangan listrik

Catatan: jangan tertukar  $v$  (mobilitas) dengan V (tegangan)

Analisis kuantitatif: Luas area di bawah kurva



# Elektroforesis kapiler kinerja tinggi (HPCE)

- Konsentrasi sampel yang dibutuhkan rendah
- Bentuk kurva berkaitan dengan difusi/dispersi elektromigrasi
- Lebih ditentukan oleh kecepatan gerak dari partikel

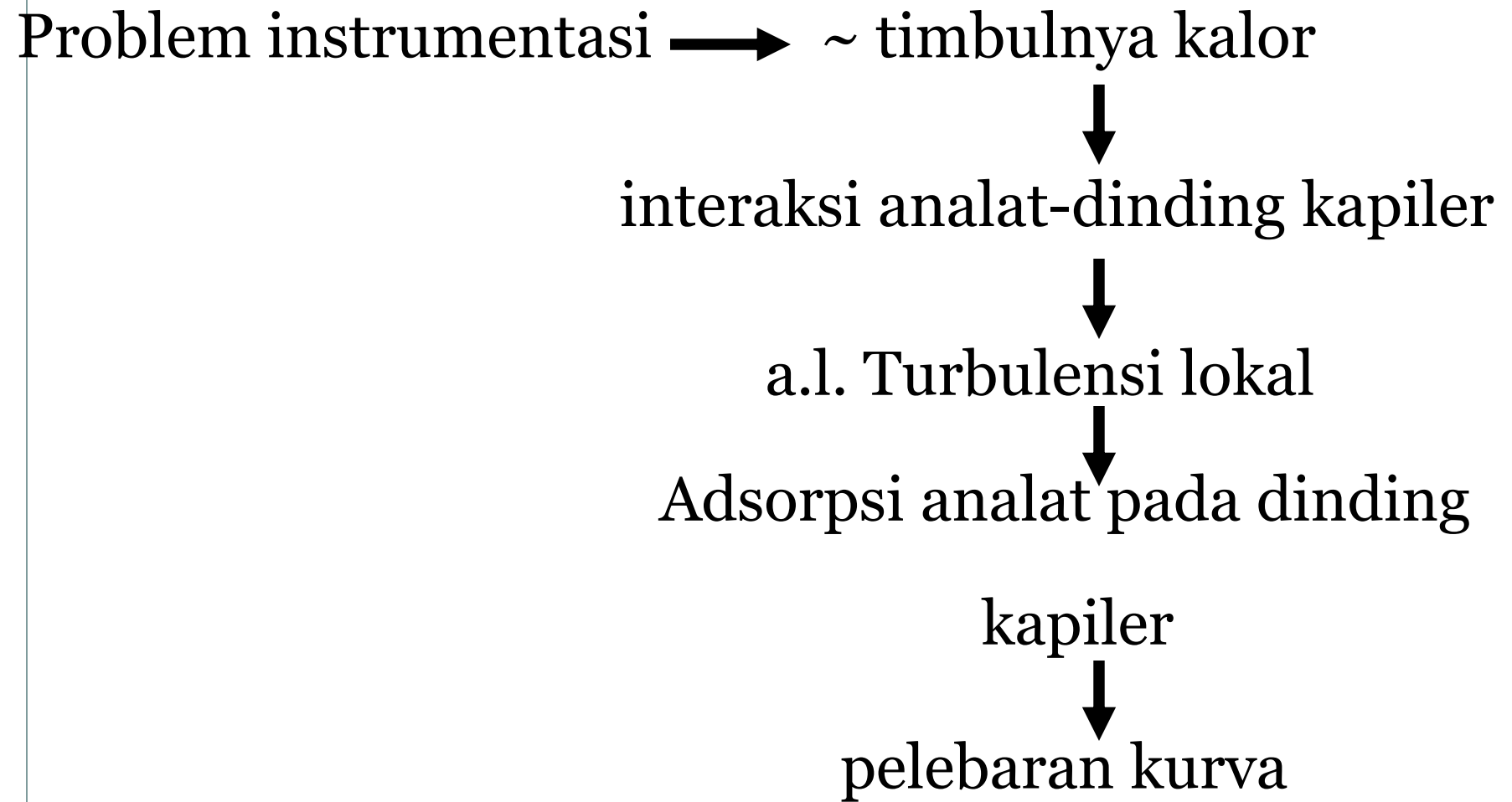
■ Kelebihan HPCE dari CE → terhadap efek termal

HPCE rasio permukaan-volume > CE

■ Temperatur  $\overrightarrow{\text{gradien}}$  pada kolom/kapiler dapat terjadi karena kalor diproduksi di sepanjang kapiler. Tetapi konduksi hanya terjadi pada dinding kapiler

■ Upaya mengurangi efek termal:

- Mengurangi diameter kapiler
- Mengurangi kekuatan medan listrik
- Mengubah komposisi buffer dengan kekuatan ionik yang lebih rendah
- Menggunakan sistem kontrol suhu yang efisien.



Adsorpsi reversibel  $\longrightarrow$  efek  $\lll$

Adsorpsi irreversible  $\longrightarrow$  efek  $\ggg$

## Upaya mengurangi interaksi:

- Penggunaan buffer dengan pH ekstrem
- Penggunaan buffer dengan konsentrasi tinggi
- Penambahan zat aditif pada buffer, seperti: ion zwitter, surfaktan, garam alkali, amina kation divalen, etilena glikol, derivatif selulosa.
- Kapiler yang dilapisi (coated capillary, static coating).

Upaya-upaya tersebut dapat mengurangi EMF

## Panjang plug injeksi dan pengaruh zona detektor

- Injeksi sampel → pelebaran zona



Gunakan volume kecil

Bila plug injeksi lebih panjang dari dispersi yang diakibatkan oleh difusi → pelebaran zona →

mengurangi efisiensi pemisahan

- Panjang zona detektor harus sependek mungkin → adanya pelebaran kurva
- Perlu optimasi antara: efisiensi dan sensitivitas

# Efisiensi

Dicirikan oleh jumlah pelat teoritis  $N$  (analog dengan GC dan HPLC)

Pada CE atau HPCE nilai  $N$  dihitung dengan persamaan

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eof})V}{2D} \quad D = \text{koef. difusi}$$

# Selektivitas

Dihitung berdasarkan rasio dari faktor kapasitas

$$\alpha = \frac{\mu_{ep,1}}{\mu_{ep,2}}$$

# Resolusi

Pemisahan/sepaparsi antara 2 solut

$$R = \frac{0.177(\mu_{ep,2} - \mu_{ep,1})V^{1/2}}{\sqrt{(\mu_{avg} + \mu_{eof})D}}$$

$\mu_{avg}$  adalah mobilitas elektroforetik rata-rata dari 2 buah solut

# Elektroforesis Kapiler Gel **Capillary Gel Electrophoresis (CGE)**

- Tabung kapiler yang digunakan diisi dengan gel polimer
- Karena gel memiliki matriks berpori, maka solut bermigrasi pada sel dengan kecepatan yang ditentukan oleh mobilitas elektroforetik maupun ukurannya
- Pemisahan yang dipengaruhi ukuran ini berguna terutama apabila solut yang berbeda memiliki mobilitas elektroforetik yang sama.



Contoh,

Fragmen DNA dengan panjang yang berbeda-beda memiliki ratio muatan:ukuran yang sama. Pemisahan fragmen DNA tersebut dengan CE cukup sulit, CZE dapat mengatasi hal ini karena memisahkan berdasarkan bobot molekul.

# Keunggulan Elektroforesis Kapiler

- Dapat digunakan untuk memisahkan spesies ion oleh muatan mereka dan gesekan kekuatan dan radius hidrodinamika.
- Memiliki efisiensi dan selektivitas yang baik

## Kekurangan Elektroforesis Kapiler

Boros listrik karena menggunakan tegangan tinggi

Harga alat mahal.

# ELEKTROFORESIS GEL

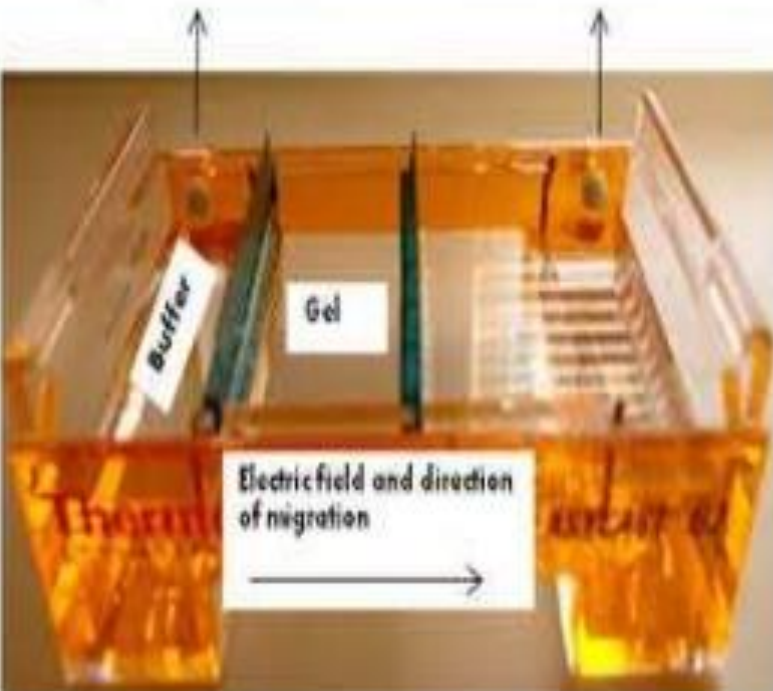
Tahun 1955



Smithies mendemonstrasikan bahwa gel yang terbuat dari larutan kanji dapat digunakan untuk memisahkan protein-protein serum manusia.

Negative (-) Electrode

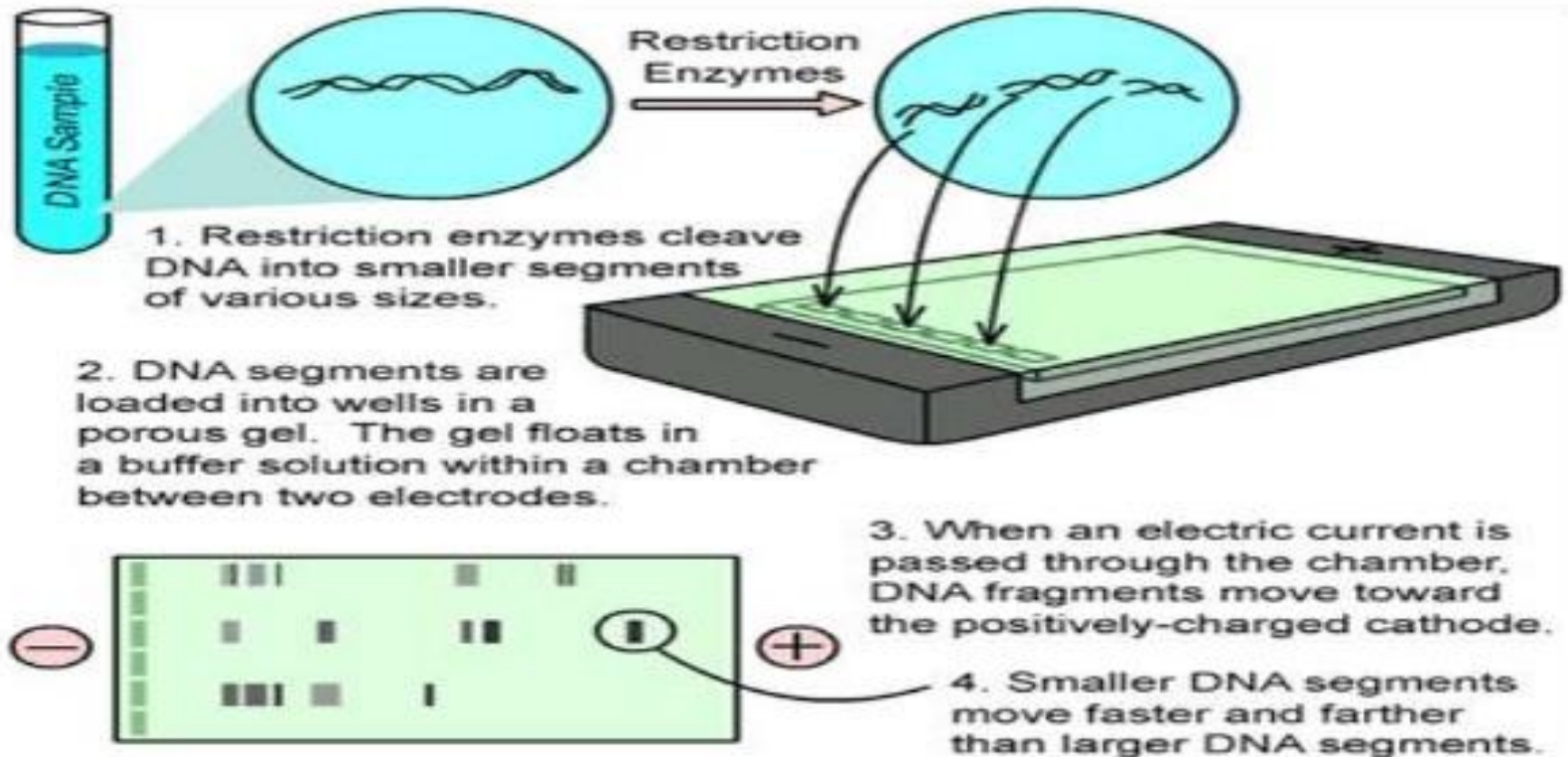
Positive (+) Electrode



Menuangkan larutan kanji panas ke dalam cetakan plastik, setelah dibiarkan mendingin kanji tersebut akan membentuk gel yang padat namun rapuh. Ternyata elektroforesis gel yang Gel kanji berperan sebagai fasa diam (*stationary phase*) menggantikan kertas saring Whatman pada teknik terdahulu diperkenalkan Smithies memicu para ilmuwan untuk menemukan bahan kimia lain yang dapat digunakan sebagai bahan gel yang lebih baik, seperti agarosa dan polimer akrilamida.

# ELEKTROFORESIS GEL

Teknik elektroforesis gel makin berkembang dan disempurnakan, hingga 12 tahun kemudian ditemukan gel poliakrilamida (*PAGE = Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) yang terbentuk melalui proses polimerisasi *akrilamida* dan *bis-akrilamida* yang digunakan untuk DNA



# ELEKTROFORESIS GEL

- Pemisahan DNA, RNA, atau protein dengan menggunakan medan listrik.
- Biasanya digunakan untuk tujuan analisis, namun dapat pula digunakan sebagai teknik preparatif untuk memurnikan molekul sebelum digunakan dalam metode-metode lain seperti spektrofotometri massa, PCR, kloning, sekuensing DNA, atau *immuno-blotting* yang merupakan metode-metode karakterisasi lebih lanjut

# Kelebihan Dan Kekurangan Elektroforesis Gel

## kelebihan

- Proses migrasi lebih cepat
- Pemisahan spot menjadi lebih kecil dengan spektrofotometri
- Mudah dilarutkan dalam jumlah sedikit

## kekurangan

- Adanya gangguan yang disebabkan oleh adanya gugus OH yang terdapat pada selulosa yang dapat berinteraksi dengan molekul polar sehingga daya migrasi molekul tersebut terganggu dan menjadi lebih rendah

# ELEKTROFORESIS DNA

Ada tiga jenis gel yang dapat digunakan dalam elektroforesis DNA, yaitu sebagai berikut :

1. Gel poliakrilamida denaturasi, berfungsi untuk memurnikan penanda oligonukleotida dan menganalisis hasil ekstensi primer.
2. Gel alkalin agarosa, berfungsi untuk memisahkan rantai DNA yang berukuran besar.
3. Gel agarosa formaldehid denaturasi, berfungsi untuk menyediakan sistem elektroforesis yang digunakan untuk fraksi RNA pada ukuran standar.

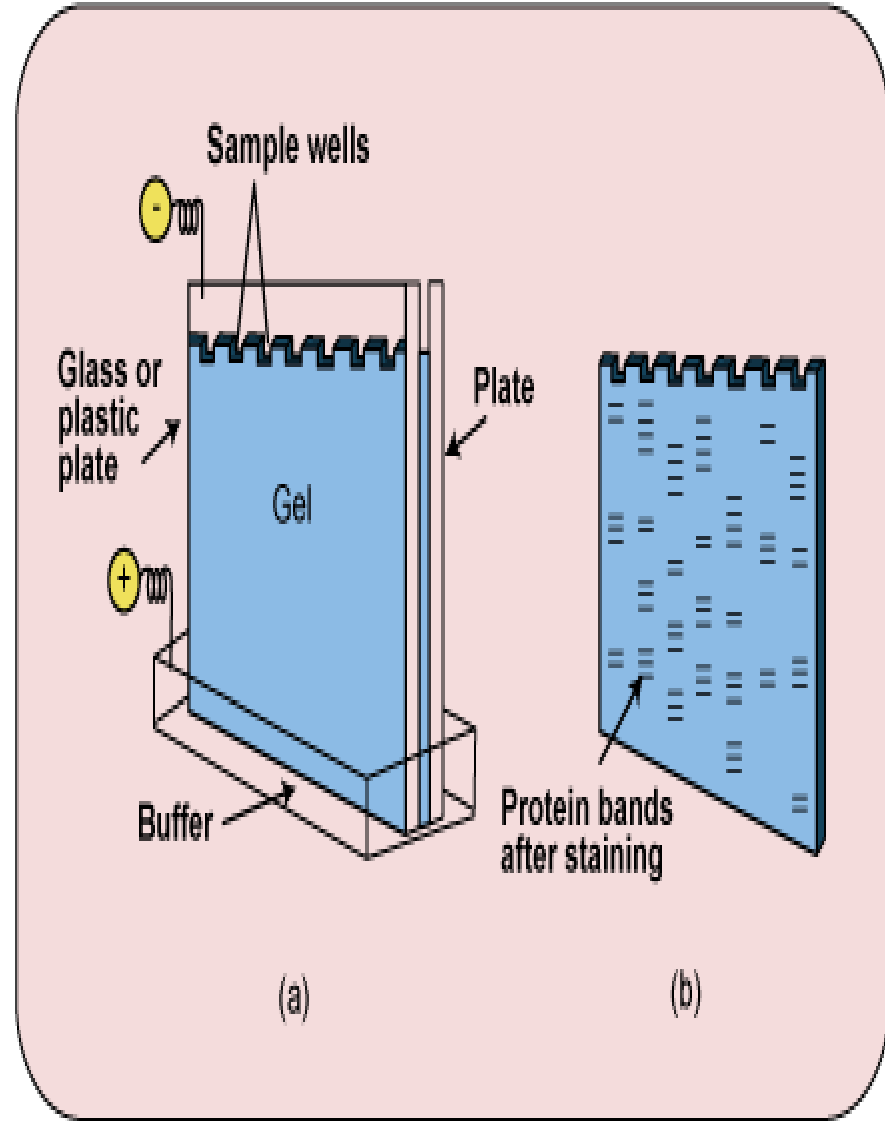
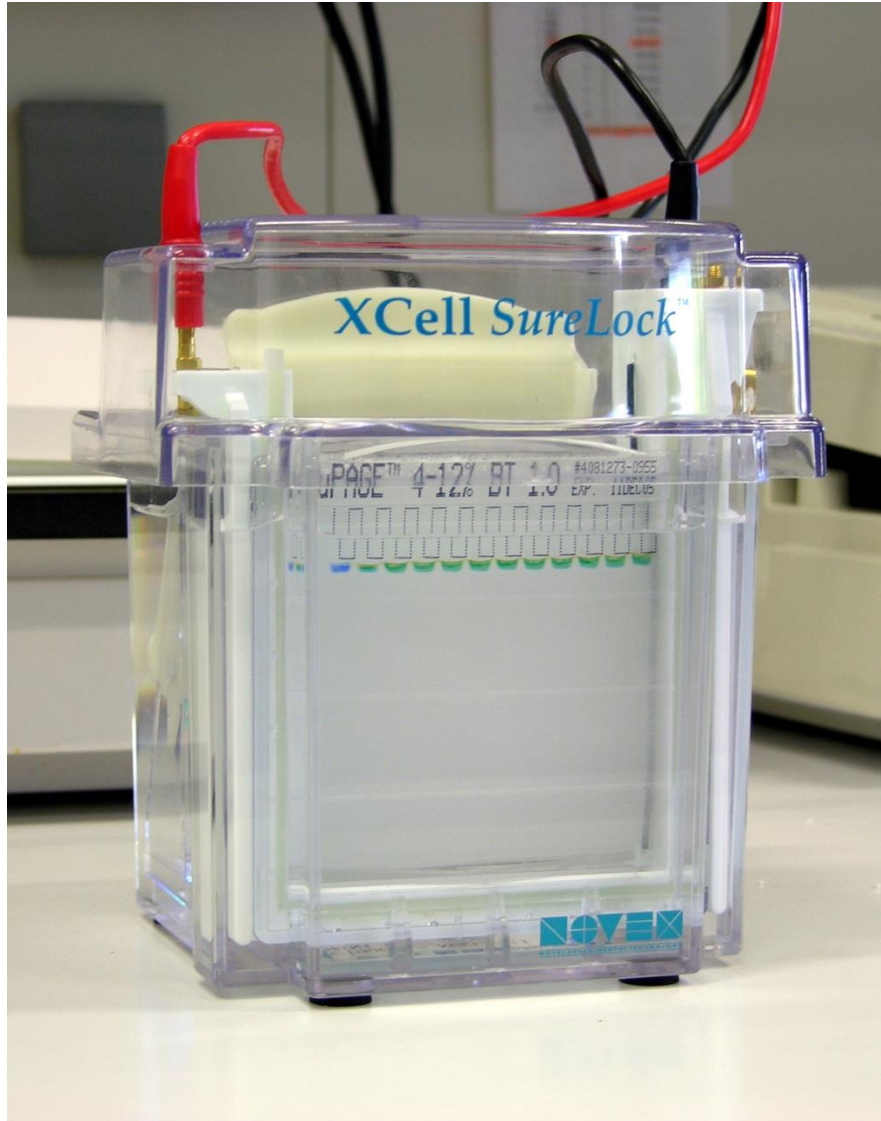
## ELEKTROFORESIS GEL AGAROSA

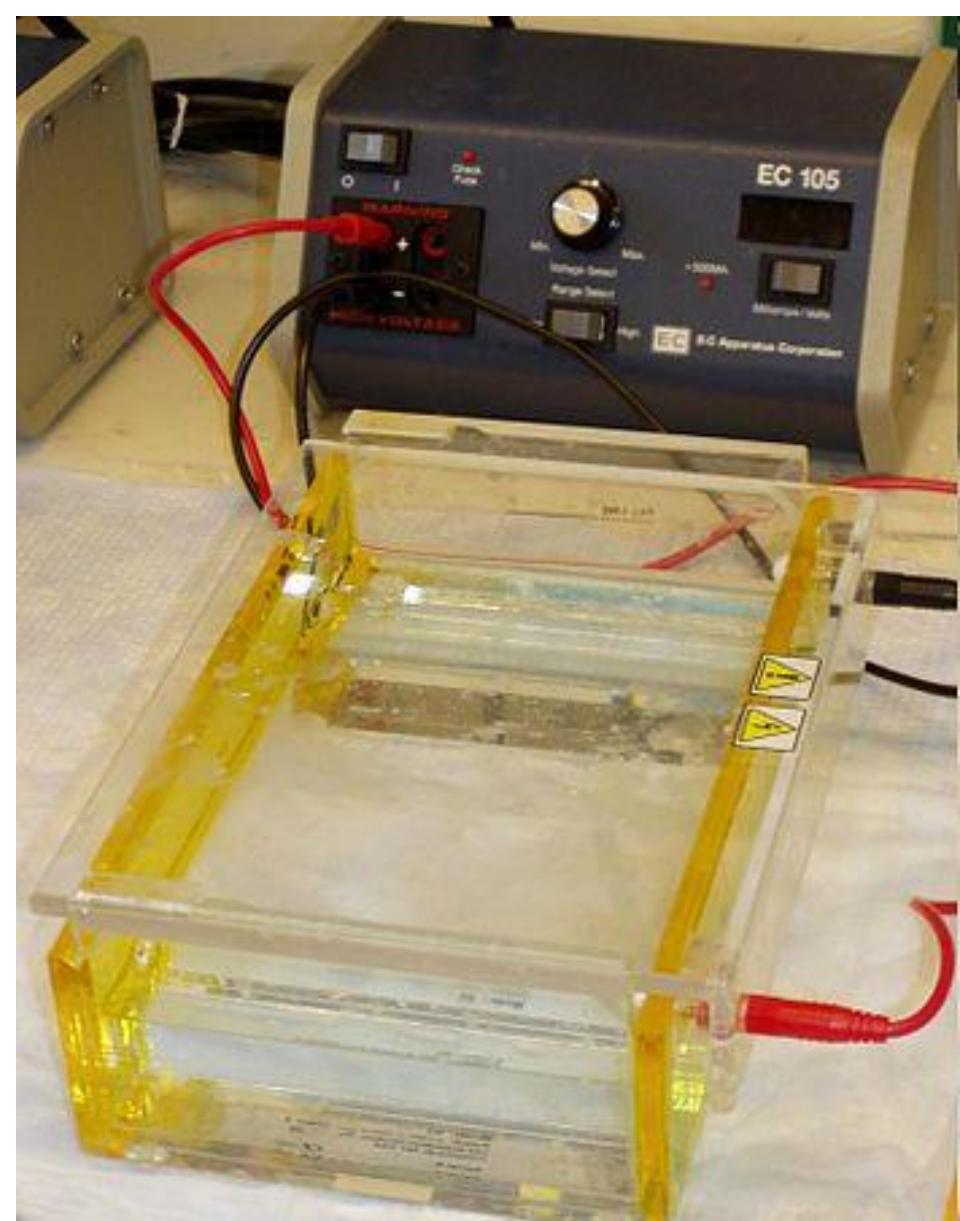
Elektroforesis DNA merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan antara lain agarosa. Elektroforesis gel agarosa dapat dilakukan untuk memisahkan sampel DNA dengan ukuran dari beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa (bp/base pairs).

Teknik ini digunakan untuk analisa :

- DNA
- RNA
- Protein







# KOMPONEN PROSES ELEKTROFORESIS

Alat elektroforesis

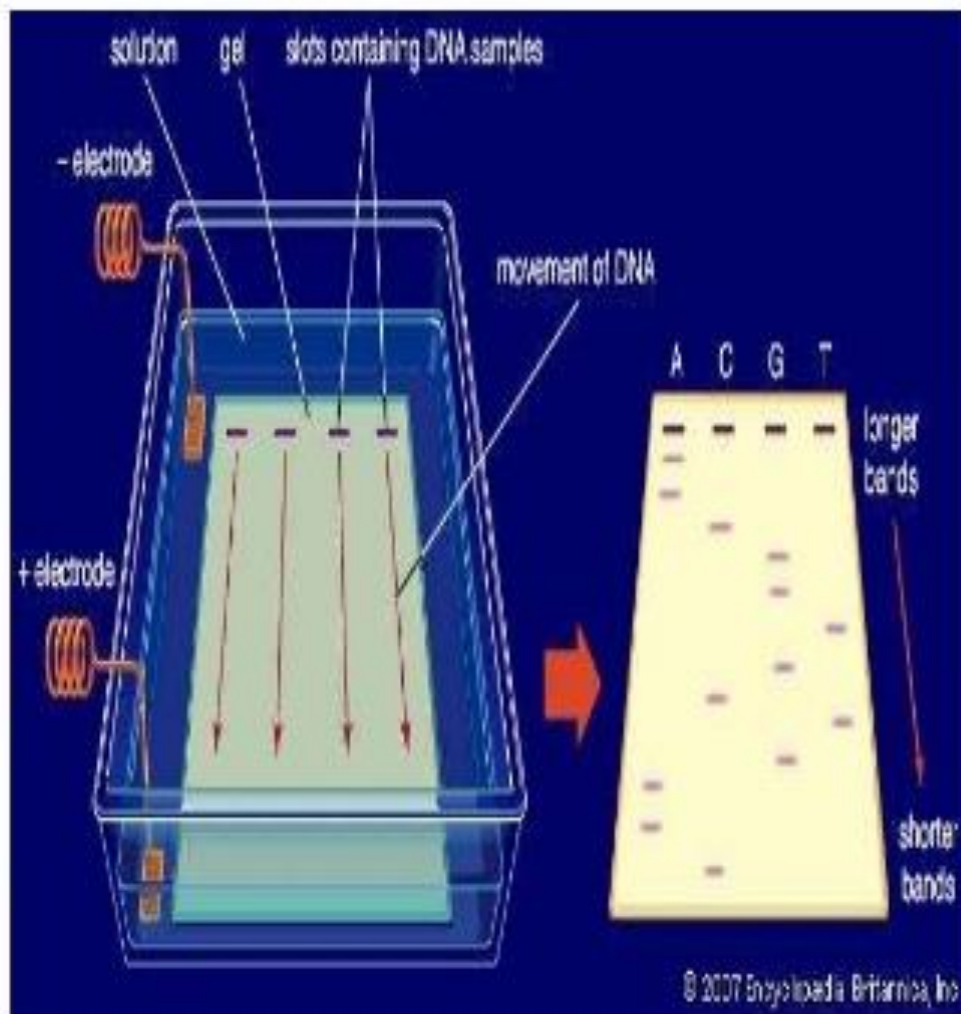
DNA, RNA atau protein

Gel

EtBr

Loading dye

Buffer TAE



# Cara kerja elektroforesis

1. Buat 250 ml larutan buffer TAE 1x dengan cara mencampurkan 5 ml TAE 50x ke dalam 245ml aquades
2. Buat gel agarosa 1% dengan cara menimbang agarosa 0,2 g untuk dilarutkan ke dalam bufer TAE 1x hingga volume 20 ml. Larutan agarosa dididihkan hingga larut sempurna.
3. Siapkan baki gel agarosa, lekatkan selotip di tiap ujung baki gel agarosa (pastikan bahwa selotip melekat kuat dan tidak ada lubang pada masing-masing ujung baki)
4. Pasang sisir elektroforesis di salah satu ujung baki gel agarosa dengan posisi hampir menyentuh dasar baki
5. Periksalah suhu larutan agarosa dengan cara menempelkan erlenmeyer ke tangan, jika suhunya sudah turun hingga sekitar 50-60 °C, tambahkan 1 µl etidium bromid (PERINGATAN KERAS!!, gunakan sarung tangan karena bersifat karsinogenik).

6. Larutan agarosa dihomogenkan sebentar, kemudian tuangkan larutan ke dalam baki gel agarosa, biarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat.

7. ambil sisir dengan hati-hati, lepaskan selotip dari ujung-ujung baki.

8. masukkan baki yang telah berisi gel agarosa ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan larutan bufer TAE 1x (pastikan bahwa gel terendam seluruhnya dalam TAE).

9. siapkan sekitar 5 cm kertas parafilm di dekat tangki elektroforesis.

10. masukkan 10  $\mu$ l sampel DNA dan 2  $\mu$ l loading dye 6x ke dalam sumuran gel agarosa dengan cara mencampurkan kedua bahan tersebut terlebih dahulu secara merata pada kertas parafilm menggunakan mikropipet.

11. buatlah catatan mengenai nomor sumuran dan jenis sampel DNA yang dimasukkan.

12. hubungkan kabel dari sumber arus ke tangki elektroforesis (pastikan bahwa kabel yang tersambung ke kutub negatif berada di dekat sumuran; jika tidak demikian, ubahlah posisi baki/gel ke arah sebaliknya).

13. nyalakan sumber arus, aturlah volatase dan waktu running hingga diperoleh angka 70 V dan 45 menit dengan cara menekan tombol yang sesuai pada sumber arus.

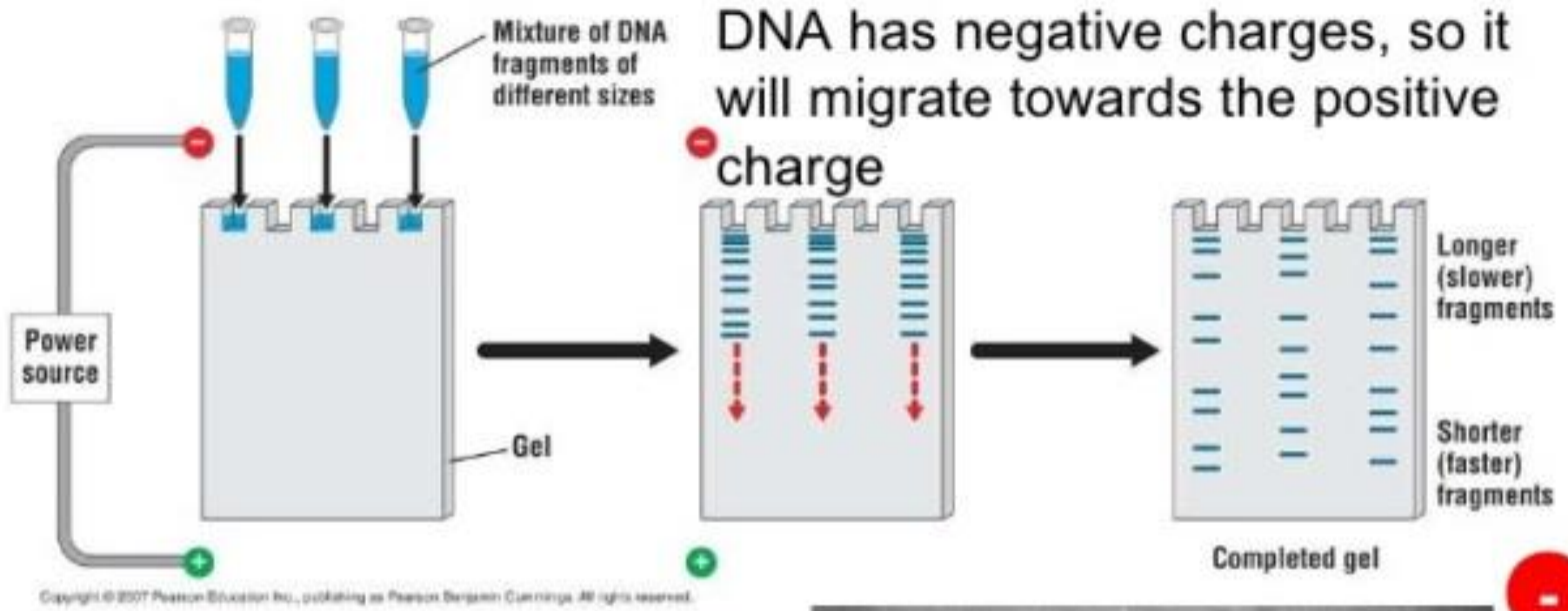
14. jalankan elektroforesis (lakukan running) dengan cara menekan tombol run pada sumber arus.

15. elektroforesis akan berhenti apabila waktu yang ditetapkan sudah habis, yang ditandai oleh adanya bunyi alarm. Matikan sumber arus dan angkatlah baki dari tangki elektroforesis.

16. keluarkan gel dan letakkan di atas UV transluminator (letakkan selubung kaca hitam di atas UV transluminator).

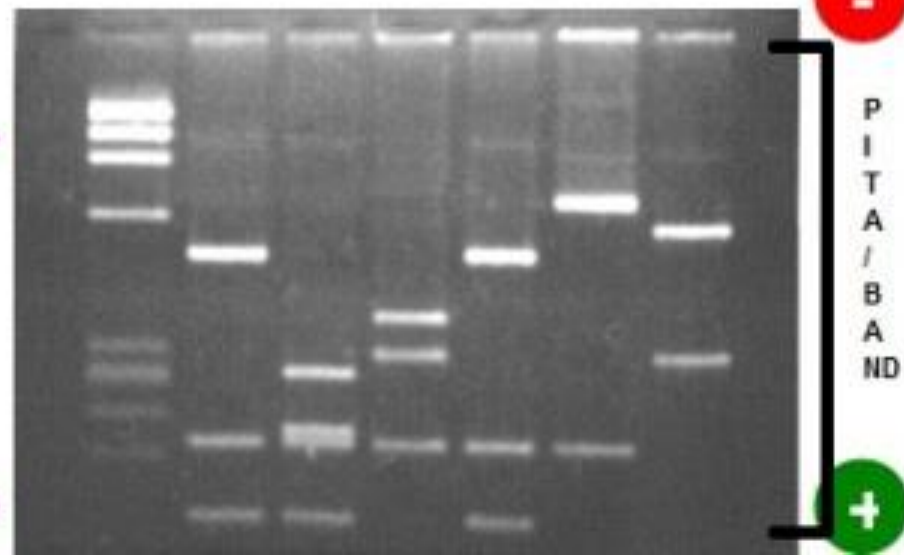
17. nyalakan UV transluminator, amati pita-pita DNA yang tervisualisasi.

# How does gel electrophoresis work?



Long fragments  
(move slower)

Shorter fragments  
(Move Faster)



# Migrasi sampel

Katode

45kD

10kD

25kD

-



high MW



Low MW

+

Anode





(

)

11

12

13

(

)

14

15

16

(

)

17

18

19

(

)

20

21

22

(

)

23

24

25

(

)

26

27

28