

ELEKTROFORESIS

Definisi

Tehnik pemisahan komponen-komponen dengan pengaruh arus listrik sehingga terjadi laju perpindahan disebut sebagai suatu elektroforesis atau elektrokromatografi.

ATAU

Elektroforesis:

adalah Teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik.

Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan , bentuk dan ukuran.

Secara luas teknik ini diklasifikasikan dalam tiga kelompok yaitu :

1. elektroforesis free boundary
2. elektroforesis wilayah dan
3. elektroforesis kontinyu.

Prinsip Elektroforesis

Jika suatu fase zat bermuatan, diberi beda potensial, fase tersebut akan berpindah sepanjang medium yang kontinyu kearah katoda atau anoda sesuai dengan muatan partikel.

Fenomena ini disebut : **elektroforesis.**

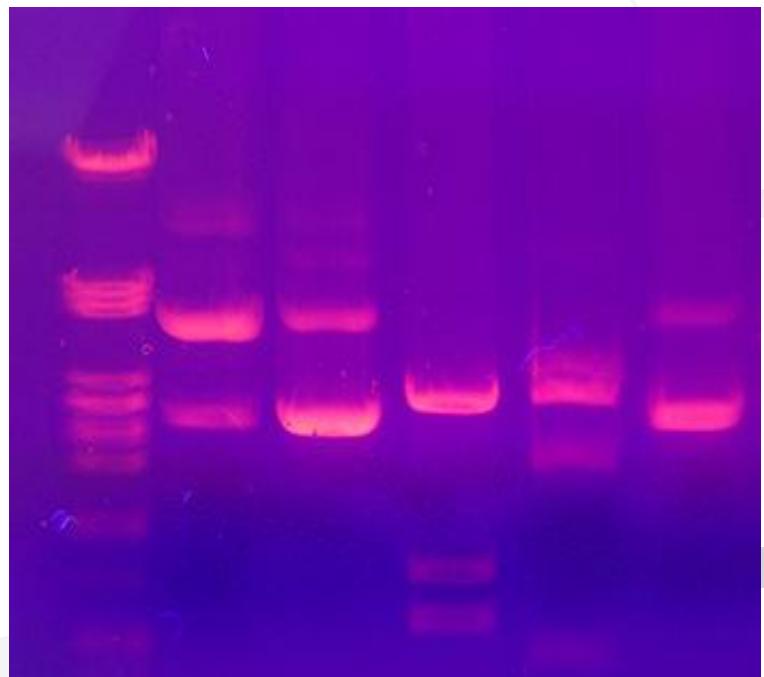
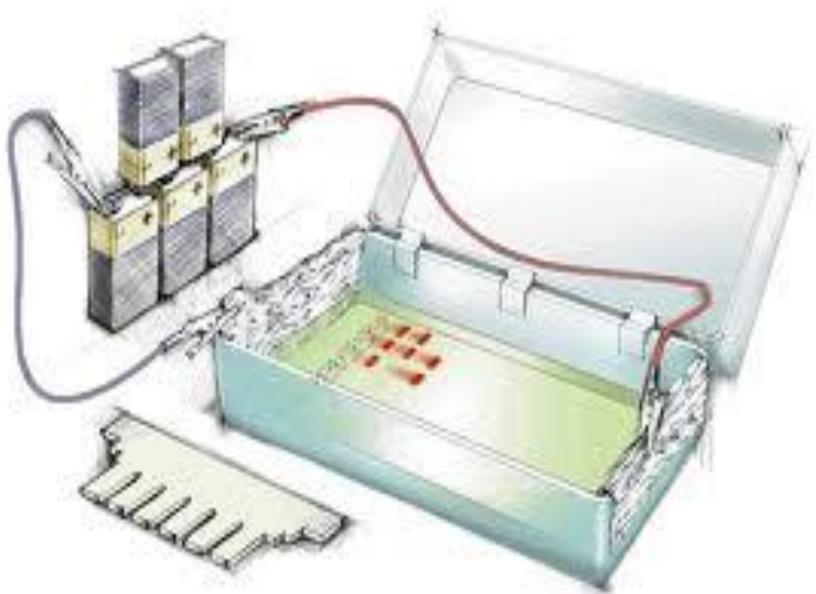
Dasar elektroforesis

adalah pembentukan suatu ketidak homogenan atau gradasi konsentrasi sepanjang sistem.

- Koloid, protein enzim menunjukkan mobilitas elektroforesis spesifik dan titik isoelektrik yang dapat digunakan untuk identifikasi zat-zat spesifik.
- Pemisahan dapat dilakukan bila senyawa-senyawa yang telah terpisah tidak secara spontan bercampur kembali akibat sirkulasi konvektif.

Sehingga Elektroforesis dapat digunakan untuk separasi makromolekul seperti protein, asam nukleat.

Posisi molekul yang terpisah pada gel dapat dideteksi dengan pewarnaan atau autoradiograf atau densitometer



Aliran muatan (ion-ion) pada proses elektroforesis

Aliran elektroforetik

adalah ion-ion selalu bergerak menuju kutub listrik

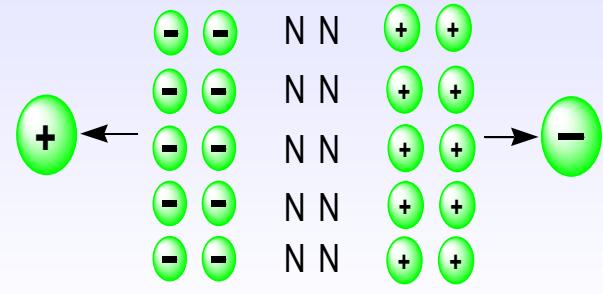
yang berlawanan,

kation akan bergerak menuju katoda

(kutub listrik negatif)

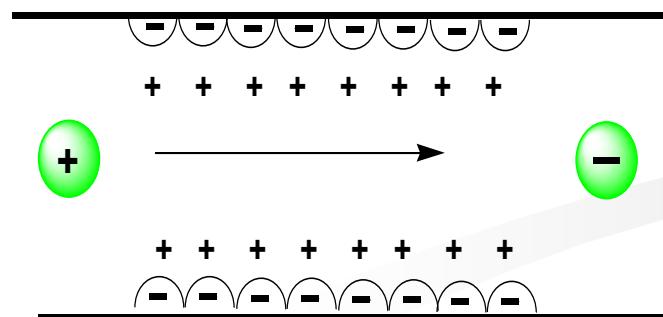
anion akan bergerak menuju anoda (kutub listrik positif),

akan tetapi molekul netral tidak akan bergerak



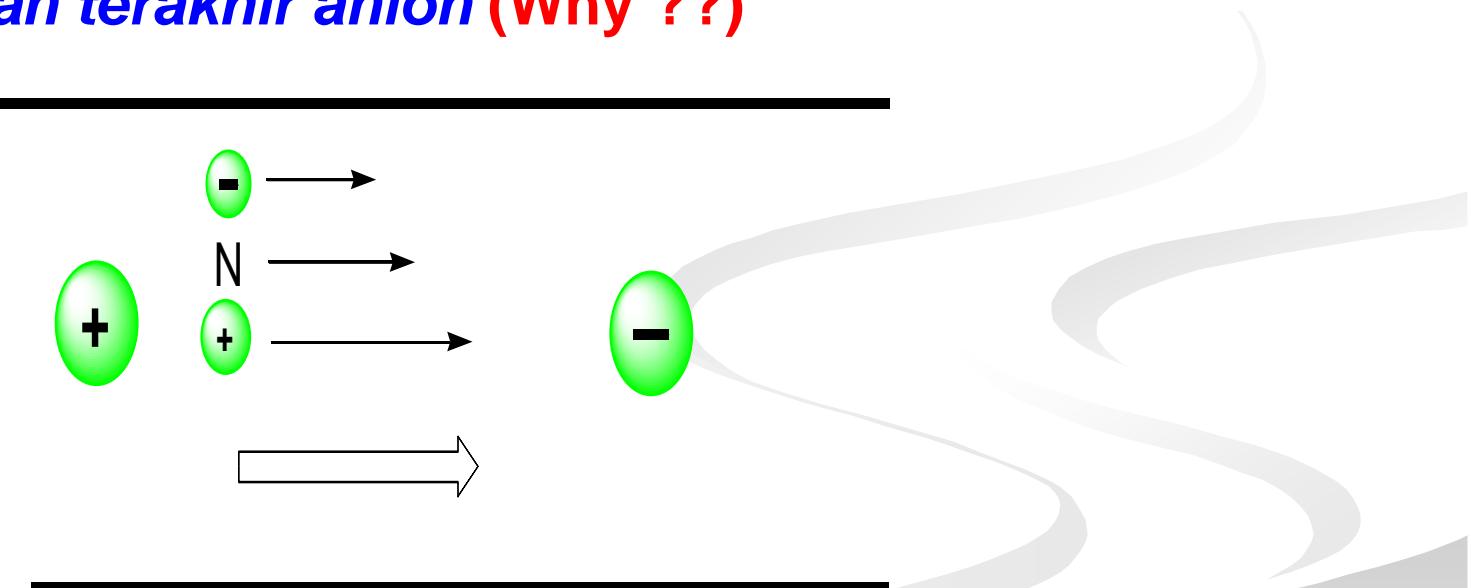
Aliran elektroosmotik

adalah kation yang bergerak menuju katoda
(kutub negatif) yang sangat cepat, diakibatkan
pemberian arus listrik searah tegangan tinggi.



Aliran elektroforesis kapiler

adalah penggunaan kedua aliran elektroosmotik dan elektroforetik. Karena aliran elektroosmotik lebih dominan dibandingkan dengan yg elektroforetik. Maka, semua molekul baik yang bermuatan atau netral akan terbawa ke katoda. **Sehingga, kation akan bergerak paling cepat, diikuti dengan molekul netral dan terakhir anion (Why ??)**



Kecepatan ion atau molekul bermuatan (solut) menuju katoda dipengaruhi oleh medan listrik yang didapat formulasi sbr. :

$$v = \mu_{ef} E + \mu_{eo} E$$

v = kecepatan solut menuju katoda

μ_{ef} = mobilitas elektroforetik

μ_{eo} = mobilitas elektroosmotik

E = tegangan listrik

Efisiensi elektroforesis

Sama seperti pada kromatografi modern, Efisiensi (N) merupakan faktor penentu keberhasilan pemisahan.

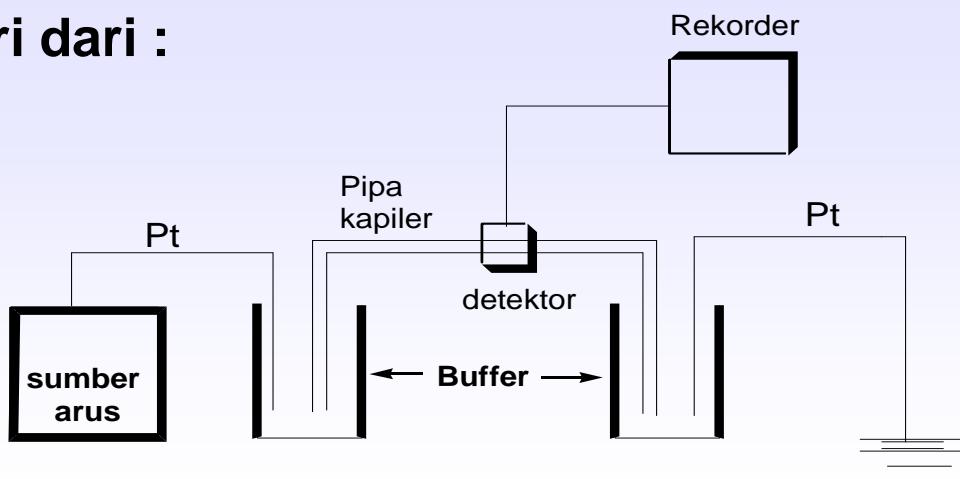
Semakin tajam suatu peak semakin efisiensi pemisahan

$$N = \frac{(\mu_{ef} + \mu_{eo}) E}{2 D}$$

D adalah koefisien difusi solut

Komponen elektroforesis terdiri dari :

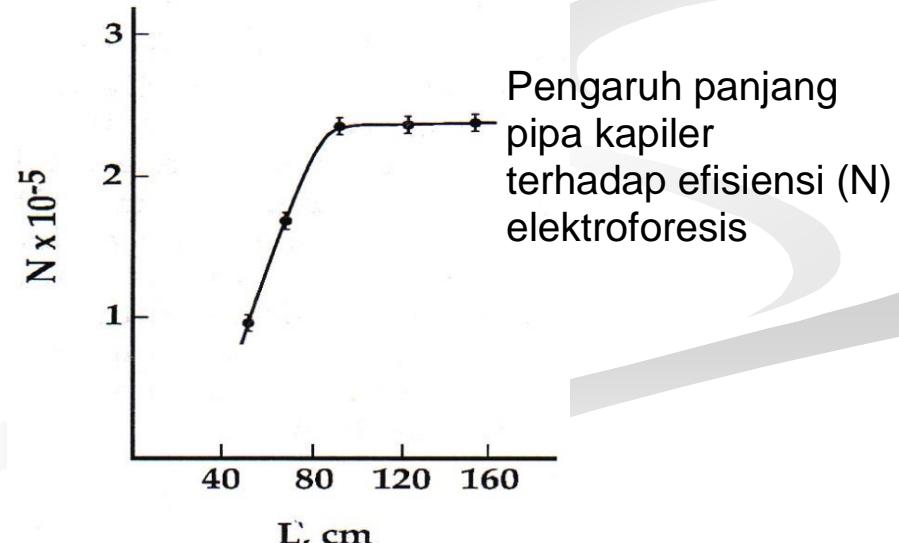
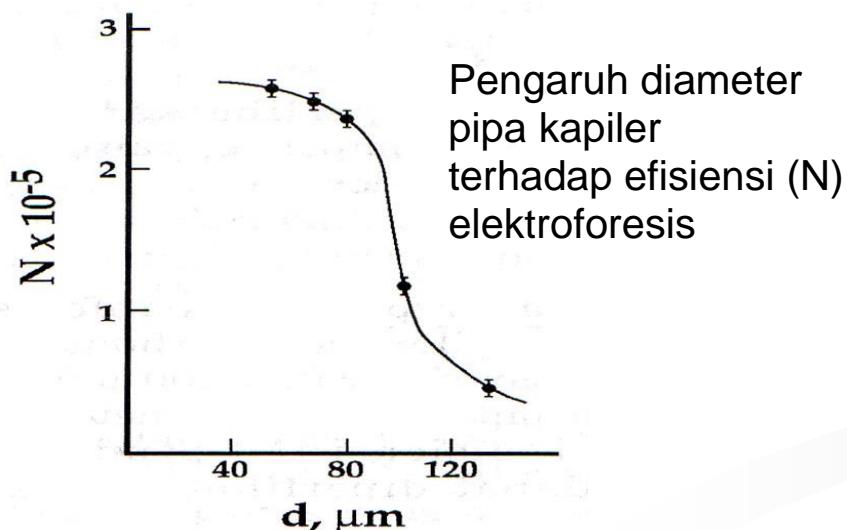
1. Pipa kapiler
2. Larutan buffer
3. Sumber arus
4. Detektor
5. Rekorder



Pipa Kapiler

Pipa kapiler terbuat dari gelas dengan diameter 25 - mm dan panjang 50 - 100 cm. Dimensi pipa kapiler, diameter dan panjang mempengaruhi efisiensi (N) pemisahan elektroforesis.

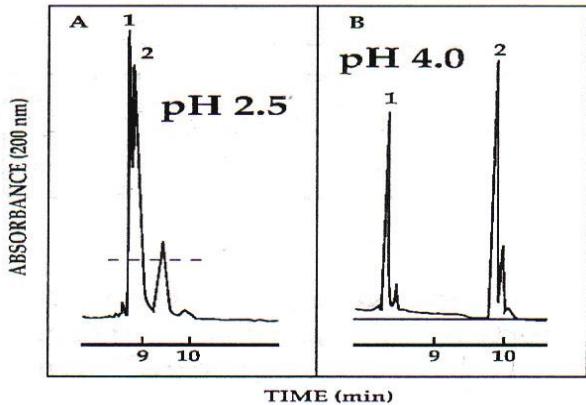
Semakin kecil ukuran diameter pipa kapiler, maka semakin besar harga N .



Buffer

Pipa kapiler diisi dengan larutan buffer yang berfungsi sebagai

1. Larutan elektrolit untuk menghantar arus listrik
2. Pengontrol muatan molekul (Karena suatu molekul dapat bermuatan positif, negatif, atau netral bergantung pada pH larutan).
pH buffer dapat mengontrol selektivitas pemisahan elektroforesis



Pengaruh pH buffer terhadap selektivitas pemisahan peptida dengan elektroforesis kapiler

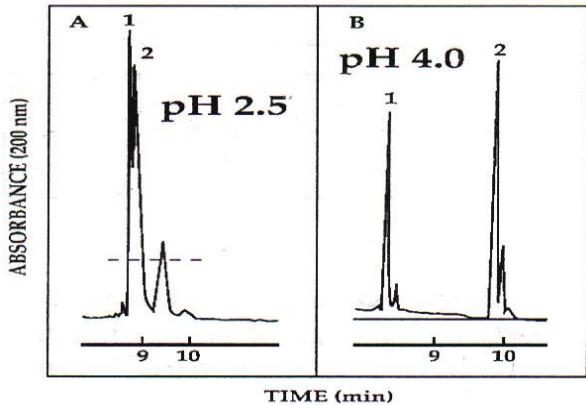
Sumber arus

Untuk elektroforesis konvensional dialirkan arus searah sekitar 100 volt, tetapi dalam elektroforesis kapiler dialirkan arus bertegangan sangat tinggi 10.000 - 30.000 volt.

Buffer

Pipa kapiler diisi dengan larutan buffer yang berfungsi sebagai

1. Larutan elektrolit untuk menghantar arus listrik
2. Pengontrol muatan molekul (Karena suatu molekul dapat bermuatan positif, negatif, atau netral bergantung pada pH larutan).
pH buffer dapat mengontrol selektivitas pemisahan elektroforesis



Pengaruh pH buffer terhadap selektivitas pemisahan peptida dengan elektroforesis kapiler

Sumber arus

Untuk elektroforesis konvensional dialirkan arus searah sekitar 100 volt, tetapi dalam elektroforesis kapiler dialirkan arus bertegangan sangat tinggi 10.000 - 30.000 volt.

Detektor

Beberapa jenis detektor yang digunakan untuk mendeteksi komponen hasil pemisahan a.l.

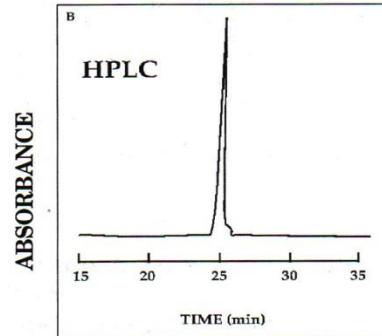
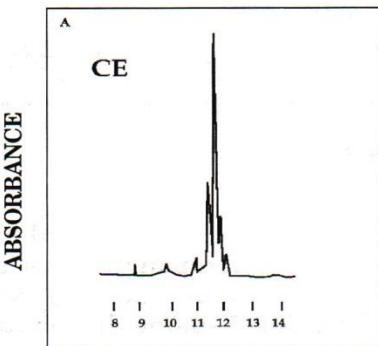
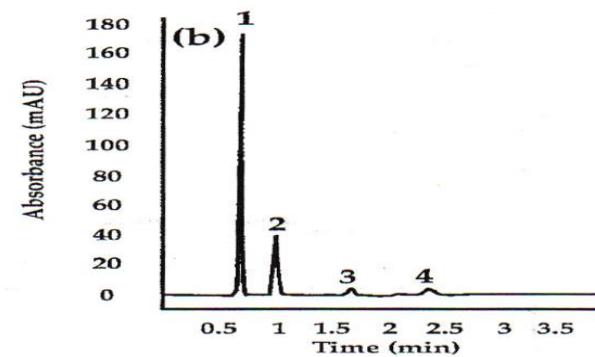
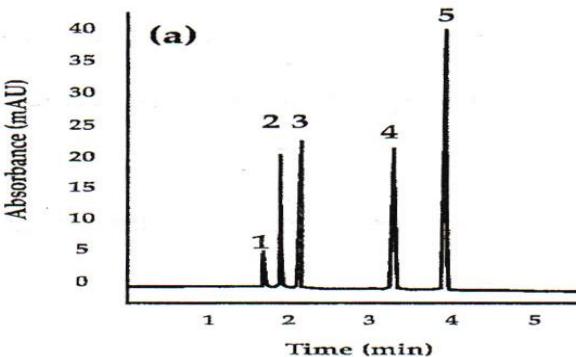
Detektor spektrometri (UV, fluoresensi)

Detektor elektrokimia (konduktometri, amperometri)

Perbandingan hasil analisis obat analgesik

(a) elektroforesis 1. norpheredin 2. caffeine 3. acetominophen
4. acetylsalycic acid 5. salicylic acid

(b). HPLC 1. salicylic acid 2. caffeine 3. acetominophen
4. acetylsalycic acid



Perbandingan hasil pemisahan peptida dengan metode
(a) elektroforesis (b). HPLC

Alat elektroforeses

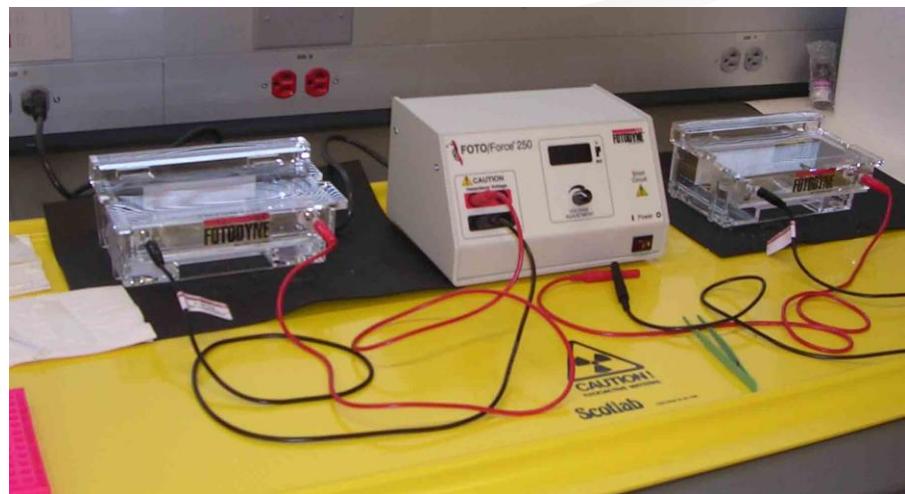
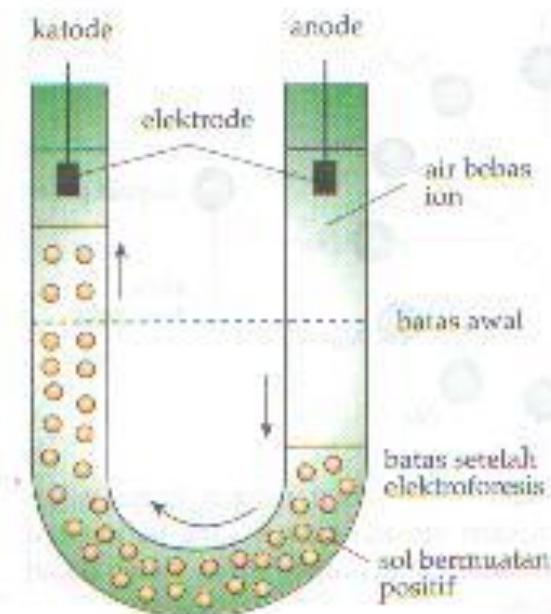
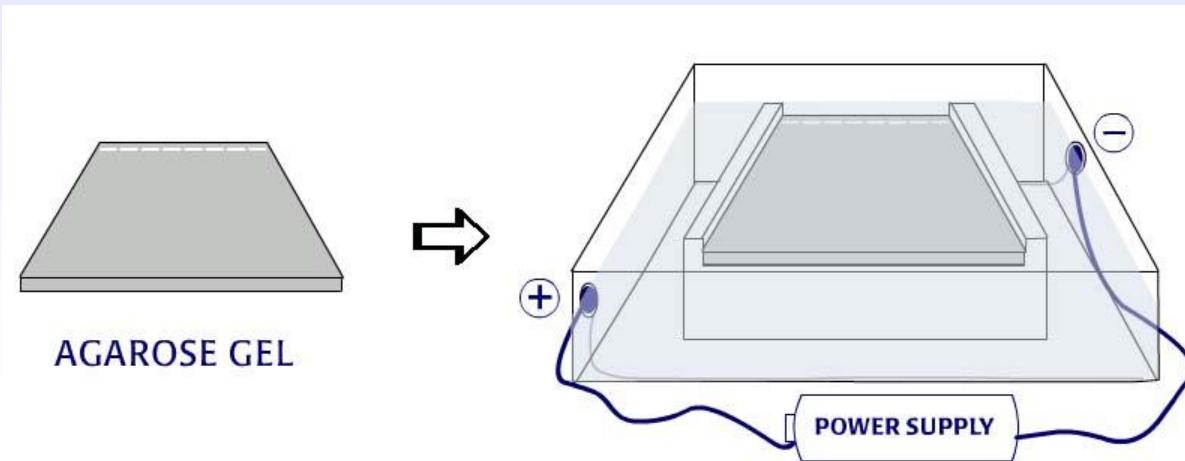
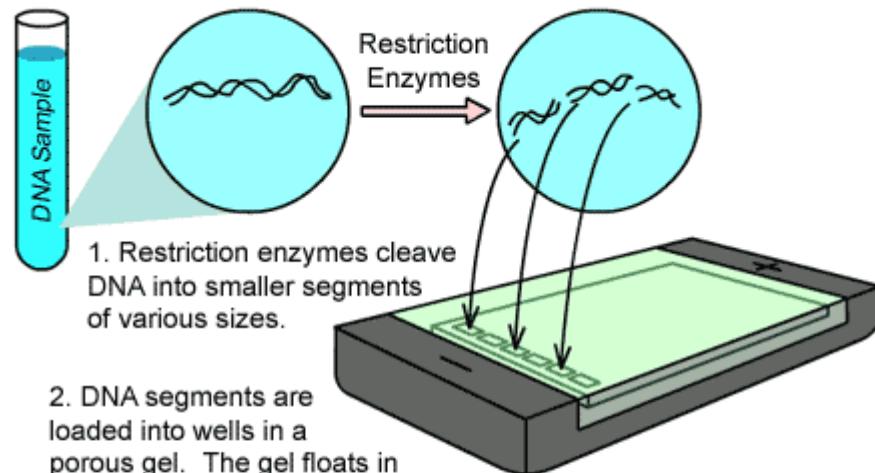
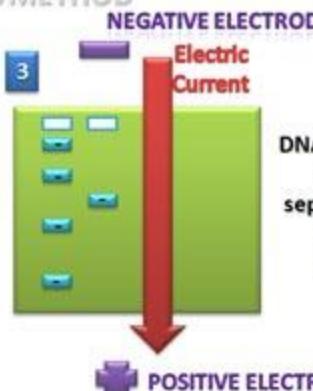
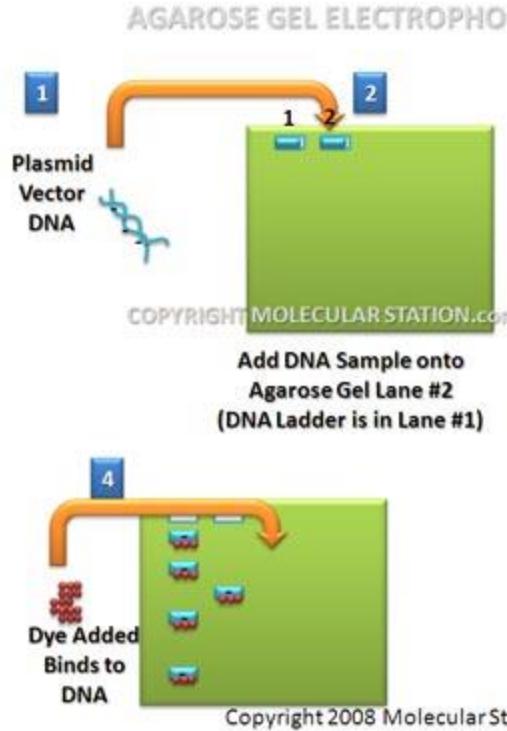
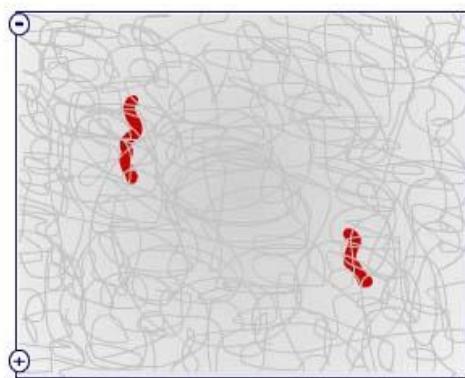
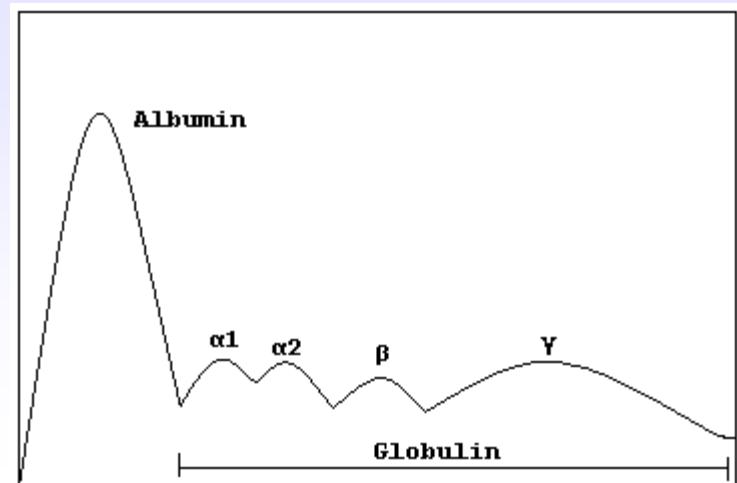
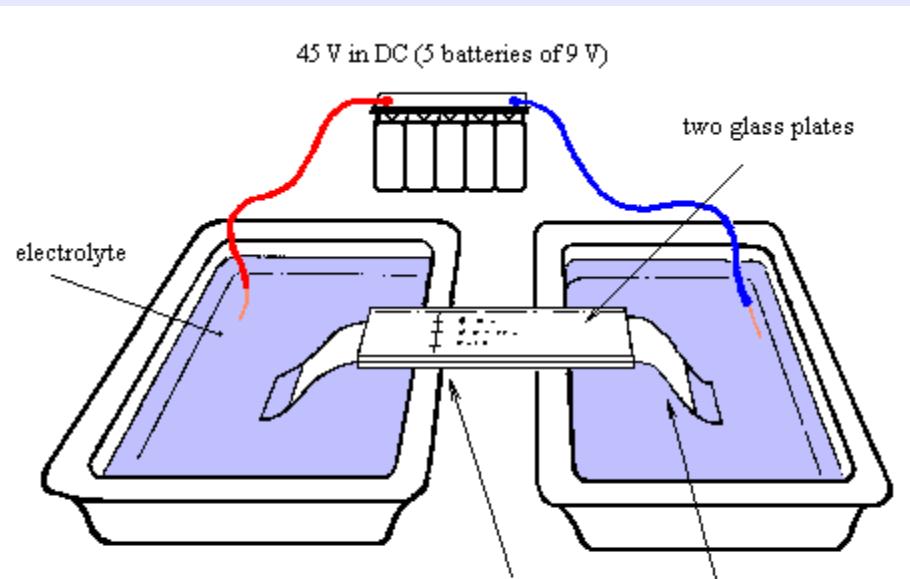


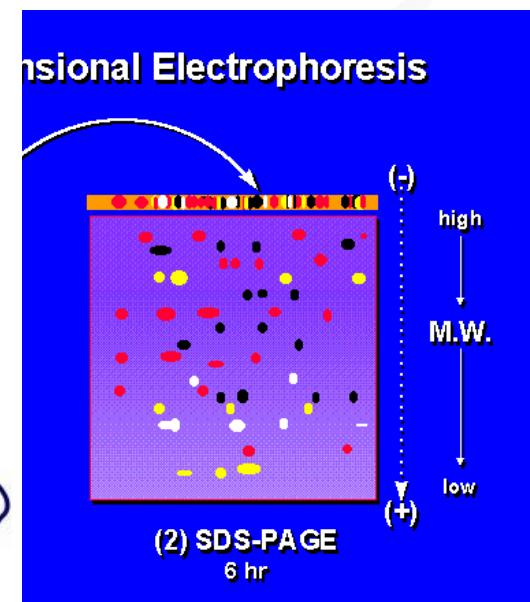
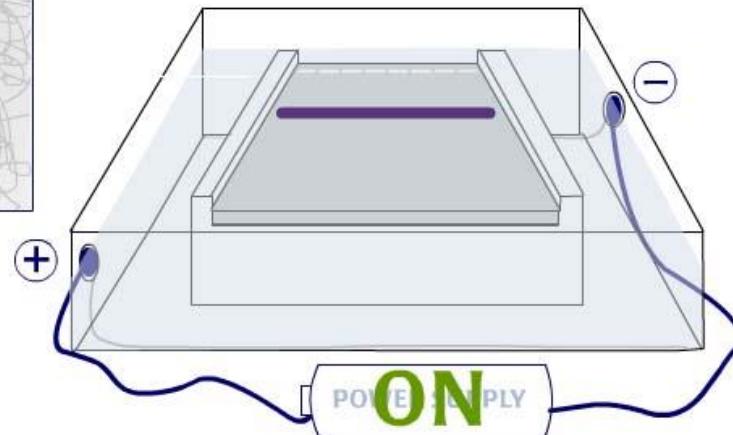
Figure S-2: Gel Electrophoresis



3. When an electric current is passed through the chamber, DNA fragments move toward the positively-charged cathode.
4. Smaller DNA segments move faster and farther than larger DNA segments.



NEGATIVELY
CHARGED DNA
MOVING THROUGH
MATRIX



1. Elektroforesis *free boundary*

- Keterbatasan elektroforesis *free boundary* dapat diatasi secara parsial dengan melakukan kromatografi pendahuluan sebelum proses elektroforesisnya sendiri. Ini dilakukan dengan mencampurkan larutan buffer dan memvariasikan konsentrasi nonelektrolit yang larut, kemudian biarkan merayap vertikal pada tabung elektroforesis yang akan digunakan, sehingga terbentuk gradien perbedaan kerapatan akibat gravitasi.

- Bila perpindahan elektroforesis dilakukan pada suatu medium berpori, wilayah perpindahannya tidak dipengaruhi oleh gradien kerapatan dan suhu. Pada medium tersebut aliran cairan dalam tabung berbanding terbalik terhadap kuadrat dari jari-jari penampang melintang tabung.
- Kertas saring, agar, kanji, gelatin, butiran-butiran kaca umumnya digunakan karena memiliki rongga kapiler. Kertas penyaringlah yang paling sering digunakan karena pemisahan yang sempurna dapat dilakukan dan mudah dikelola.
- Pemisahan dapat dilakukan baik horizontal ataupun vertikal dan interferensi anomali paling kecil pada *boundary*.

- Pada umumnya istilah **elektrokromatografi** digunakan untuk pemisahan perbedaan transport fisik zat terlarut yang bermuatan di dalam medium kertas akibat pengaruh gradien potensial.
- Perpindahan partikel bermuatan dalam kertas tergantung pada tanda dan besarnya muatan pada zat terlarut, permukaan, muatan, tegangan yang digunakan, konsentrasi elektrolit, kuat ion, pH, suhu, viskositas, adsorptivitas zat terlarut dan sifat-sifat fisika kimia lainnya medium migrasi. Ion yang berpindah pada suatu arah juga mempengaruhi mobilitas ion-ion lain yang bergerak pada arah yang berlawanan.

■ **Peralatan dan Metodologi**

- Secarik kertas saring dibasahi dengan suatu elektrolit dan direntangkan secara horizontal diantara dua ruang elektrode yang berbeda potensial.
- Sampel diletakkan ditengah-tengah lembaran kertas.
- Lembaran kertas diletakkan diantara dua lempeng kaca untuk mencegah penguapan elektrolit.

Arus searah digunakan pada beda tegangan sekitar 100-300 volt, elektroda yang digunakan karbon dari platina. Kombinasi elektromatografi dengan aliran pelarut yang simultan untuk memisahkan zat-zat ini juga telah dikembangkan

2. Elektroforesis Wilayah

Ada berbagai faktor yang mempengaruhi laju perpindahan elektroforesis wilayah. Faktor-faktor yang mempengaruhi pergerakan ion adalah mobilitas ion, tipe resolusinya, macam larutan buffernya, pH yang digunakan, kuat ion zat terlarut, suhu, ada atau tidaknya fenomena elektrolisis atau elektroosmosis.

Medium yang umum digunakan adalah kertas saring, selulosa, asetat, gel seperti kanji, poliakrilamida dan bubuk gel.

3. Elektroforesis Tirai (Elektroforesis Kontinyu)

Elektroforesis kontinyu yaitu suatu elektroforesis yang dilakukan secara kontinyu.

- Suatu tirai dari kertas saring digunakan yang mana terendam dalam larutan buffer.
- Suatu aplikator digunakan untuk meneteskan sampel. Sampel masuk dalam aplikator dari suatu reservoir sampel.
- Kedua ujung kertas saring dalam bentuk alur tercelup dalam dua ruang elektroda.
- Dengan pemberian tegangan, partikel zat terlarut mulai bergerak dan komponen terpisahkan dalam berbagai permukaan.

- Setelah kertas, medium lain yang tepat untuk percobaan elektromigrasi adalah kanji. Pemisahan pada umumnya dilaksanakan dalam kolom, dan kadangkala untuk sejumlah komponen mempunyai beberapa kelebihan dibanding dengan kertas.
- Teknik elektrokromatografi banyak digunakan pada pemisahan ion-ion anorganik dan diagnosis klinik.