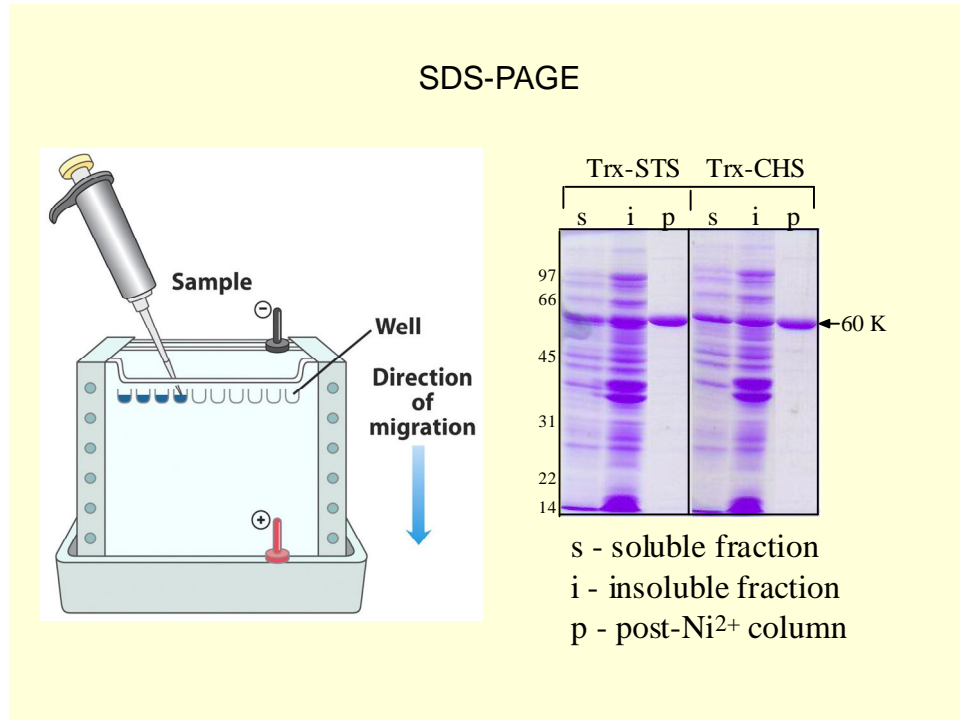


METODE SDS- PAGE

Oleh:
Susila Kristianingrum
susila.k@uny.ac.id



Langkah SDS-PAGE

1. Pembuatan gel pemisah (separating gel)
2. Pembuatan gel pengumpul (stacking gel / upper gel)
3. Pemanasan sampel
4. Dilarutkan. Runing pada plate 1 dengan arus 28A dengan tegangan 110V dan pada plate 2 dengan arus 30A dan tegangan 130 V.
5. Gel direndam dalam larutan staining untuk proses pewarnaan selama 20 menit
6. Gel direndam dalam larutan destaining (Penghilangan warna) untuk proses pencucian 20 menit

Persiapan Gel

- a. Separating gel 12,5% dibuat dengan cara :

Siapkan tabung polipropilen 50 ml

Masukkan 3,125 ml stock akrilamid dalam tabung

Masukkan 2,75 ml 1M tris pH 8,8 tabung ditutup, lalu digoyang dengan shaker secara perlahan-lahan.

Masukkan aquabides 1,505 ml, tabung ditutup, lalu digoyang dengan shaker secara perlahan-lahan

Masukkan 75 μ l SDS (sodium dodesil sulfat) 10%, tabung ditutup, lalu digoyang dengan shaker secara perlahan-lahan

Masukkan 75 ml APS (amonium persulfat) 10%, tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan

Masukkan 6,25 μ l TEMED, tabung ditutup lalu digoyang dengan shaker secara perlahan

Segera tuang larutan ke dalam plate pembentuk gel menggunakan mikro pipet 1 ml (dijaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate.

Perlahan tambahkan aquades/n-BuOH diatas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang.

- b. Biarkan gel memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel yang terbentuk) setelah itu, air/n-BuOH yang menutup separating gel dibuang.
- c. Setelah separating gel memadat, stacking gel 3% disiapkan dengan cara yang sama pada prosedur diatas dengan volume larutan:

30% acrylamide-bis 0,45 m

1M tris pH 6,8 0,38ml

Aquabidest 2,11 ml

10% SDS 30 μ l

TEMED 5 μ l

10% APS 30 μ l

- d. Kemudian tuang stacking gel
- e. Pasang sisir tempat penyuntikan sampel, kemudian biarkan beberapa lama hingga gel memadat
- f. Lepas sisir
- g. Gel dalam plate dipasang pada alat elektroporesis 'set mini protean II Dual Slab Cell Bio-Rad' (Vertical Slab Cells) spesifikasinya sbb:

Inner cooling core	: Molded liquid crystal polymer
Clamp assemblies	: Glass filled liquid crystal polymer Clamps with acrylic pressure plate
Lower buffer chamber, lid, casting stand:	molded polycarbonate
Electrodes	: Platinum wire 0,254mm diameter
Combs	: Teflon
Spacers	: PVC
Shipping weight	: 2,2 kg
Overall size	: 16 cm (L)x 12 cm (W) x 18 cm (H)
Gel size	: 7 cm (L) x 8 cm (W)
Glass plate size	: inner 7,3 cm x 10,2 cm outer 8,3 cm x 10,2 cm

- h. Tuang running buffer

Injeksi Sampel dan Runing

- a. Enzim murni/ ekstrak murni/ isolat dipipet sebanyak 15 µl kemudian dimasukkan kedalam eppendorf
- b. Tambahkan dengan 15µl RSB dan panaskan pada suhu 100⁰C selama 2 menit
- c. Dinginkan pada suhu kamar.
- d. Suntikan sampel sebanyak 10-20 µl kedalam sumur secara hati-hati dengan menggunakan Hamilton syringe.
- e. Syringe dibilas dengan air atau runing buffer sebelum dipakai untuk memasukan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

- f. Untuk memulai running, hubungkan perangkat elektroporesis dengan power supply dengan arus pada plate 1 28 mA tegangan 110 V dan Plate 2 30 mA dengan tegangan 130V

Pewarnaan Gel

- a. Untuk tahap ini diperlukan larutan staining untuk mewarnai protein pada gel dan larutan destaining untuk pencucian atau menghilangkan warna pada gel dan memperjelas band protein yang terbentuk.

- 1) Untuk membuat larutan staining 1 liter diperlukan

Coomassie Blue R-250 1,0 g

Methanol 450 ml

Aquades 450 ml

Asam asetat glasial 100 ml

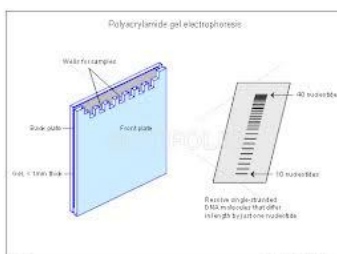
- 2) Untuk membuat larutan destaining 1 liter diperlukan

Methanol 100 ml

Asam asetat glasial 100 ml

Aquades 800 ml

- b. Gel direndam di dalam 20 ml larutan staining solution sambil digoyang dengan shaker selama 20 menit, kemudian larutan staining dituang kembali ke wadahnya.
- c. Kemudian dicuci dalam 150 ml asam asetat / larutan TCA 12,5%
- d. Gel direndam dalam larutan destaining sambil digoyang selama 20 menit
- e. Cuci dengan asam asetat/ larutan TCA 12,5% sampai bening



LATIHAN SOAL

1. a. Jelaskan aplikasi dari metode elektroforesis.
b. Jelaskan kelebihan dan kekurangan metode SDS-PAGE.
2. a. Jelaskan parameter apa yang memberikan hasil pemisahan secara elektroforesis dari 2 protein dapat maksimum?
b. Jelaskan bagaimana cara deteksi komponen sampel yang dipisahkan secara elektroforesis?
3. Perhatikan data hasil pemisahan campuran asam amino berikut ini:

Asam amino	Mr	TIL	Waktu retensi (menit) pada pH bufer	
			4	6
Alanin (ala)	89	6,00	1,2	1,9
Arginin (arg)	174	10,76	3,5	1,3
Asam aspartat (asp)	133	2,77	5,1	3,5
Serin (ser)	105	5,68	1,8	2,8
Tirosin (tyr)	171	5,66	2,9	5,2

Gambarkan kromatogramnya berdasarkan data retensi untuk pemisahan pada pH bufer 4 dan 6, lengkap dengan nama asam aminonya.

“Selamat mengerjakan semoga sukses”