

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorik secara *in vitro* yakni menguji potensi dari ekstrak perikarp manggis dalam menghambat sekresi protein CFP-10 pada *M. tuberculosis* H37Rv. Desain penelitian yang digunakan adalah *post-test only*. Pengujian potensi ekstrak perikarp manggis dilakukan dengan metode SDS PAGE dan Dot Blot.

4.2 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan sampel berupa isolat *M. tuberculosis* H37Rv yang diperoleh dari BBLK Surabaya.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak perikarp manggis dengan variasi konsentrasi 522,25 µg/ml (mengandung α-mangostin 3,215 µg/ml); 1044,5 µg/ml (mengandung α-mangostin 6,25µg/ml); dan 2089 µg/ml (mengandung α-mangostin 12,5 µg/ml). Suatu penelitian mengatakan bahwa efek penghambatan yang kuat

melawan *M. tuberculosis* dengan MIC=6,25 µg/ml ditunjukkan oleh α-mangostin (Ragasa *et al.*, 2010). Kadar α-mangostin dalam ekstrak perikarp manggis diperoleh dari hasil penetapan kadar menggunakan HPLC MS/MS. HPLC MS/MS dipilih karena selektif, sensitif, dan cepat.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah sekresi protein CFP-10 *M. tuberculosis* H37Rv pada media cair BD BACTEC MGIT 960 SIRE.

4.4 Lokasi dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2014 hingga Maret 2015.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Maserasi

Alat : Cawan porselen, sendok tanduk, gelas ukur, corong, pipet tetes, maserator, beaker glass, pipet ukur, kain flannel, aluminium foil, pembungkus plastik, pot/vial, stirrer, neraca analitik, spatel, rotary evaporator

Bahan : Sebuk perikarp manggis, etanol 96%

4.5.2 Alat dan Bahan Pembuatan Larutan Ekstrak Perikarp Pemanding

Alat : cawan porselen, sendok tanduk, labu ukur 100ml, labu ukur 10ml, corong, pipet tetes, mortar dan stamper

Bahan : Serbuk ekstrak perikarp manggis pemanding, aquades

4.5.3 Alat dan Bahan Uji Fitokimia

Alat : Cawan porselen, spatel, gelas ukur, beaker glass, pipet tetes, pipet ukur, bola hisap, tabung reaksi, penjepit kayu, Bunsen pembakar, alumunium foil, pembungkus plastik, labu ukur

Bahan : Ekstrak perikarp manggis, etanol 96%, HCl 2N, pereaksi dragendoff, pereaksi meyer, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, FeCl_3 , HCl pekat, serbuk Mg

4.5.4 Alat dan Bahan Uji Kuantitatif HPLC MS/MSEkstrak Perikarp Manggis

Alat : HPLC MS/MS

Bahan : Ekstrak perikarp manggis, methanol, standar α -mangostin

4.5.5 Kultur *M. tuberculosis* dengan Media Lowenstein Jensen

Alat : Neraca analitik, Gelas ukur 10 ml dan 100 ml, gelas beaker 1 L, autoklaf, tabung *screw-cap test* steril, oven, wadah berukuran besar, inkubator, pipet tetes, pipet volum 10 ml

Bahan : Medium Lowenstein Jensen, aquadest, gliserol, suspensi telur bebek segar dimana kuning telurnya tidak boleh berwarna orange, dan bakteri *M. tuberculosis*

4.5.6 Pembuatan Media BD BACTEC MGIT 960 SIRE dan Perlakuan Ekstrak Manggis, Larutan Ekstrak Perikarp Manggis Pemanding, dan Larutan Rifampicin dengan Bakteri *M. tuberculosis*

Alat : Tabung steril, votex, mikropipet, tabung steril, filter 0,2 mm

Bahan : Bovine albumin, Catalase, Dextrose, Oleic acid, ekstrak perikarp manggis, MGIT RIF, ekstrak perikarp manggis pemanding, kertas perkamen, hasil biakan *M. tuberculosis* dari media Lowenstein Jensen

4.5.7 Penentuan Kadar Total Protein Sampel dengan Metode Nanodrop

Alat : Nanodrop Spechtrophotometer ND-100 (Thermo), tissue

Bahan : Smapel semua perlakuan, aquades

4.5.8 Analisa Profil Protein dengan Metode SDS-PAGE Metode Pewarnaan Coomassie Blue

Alat : Cetakan (casting frames), beaker glass, plat kaca, sumuran sel buffer, seperangkat alat elektroforesis

Bahan : ddH₂O, Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0,8% W/V), 1,5 M Tris pH 8,8 , 0,5 M Tris-HCl, PH 6,8 , 10% (W/V) SDS, 10% (W/V) ammonium persulfate (AP), TEMED, low range protein marker, coomassie blue, Lysol

4.5.9 Analisa Profil Protein dengan Metode SDS-PAGE Metode Pewarnaan Silver Stain

Alat : Cetakan (casting frames), beaker glass, plat kaca, sumuran sel buffer, seperangkat alat elektroforesis

Bahan : ddH₂O, Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0,8% W/V), 1,5 M Tris (PH=8,8), 0,5 M Tris-HCl, PH 6,8 , 10% (W/V) SDS, 10% (W/V) ammonium persulfate (AP), TEMED, low range protein marker (Thermo Scientific), etanol, asam asetat glacial, aquades, natrium tiosulfat 5% (W/V), natrium asetat, glutaraldehyd 25% (W/V), silver nitrat 25% (W/V), formaldehyd 37% (W/V), natrium karbonat, EDTA

4.5.9 Alat dan Bahan Uji Spesifitas Protein CFP-10 dengan Dot Blot dan Visualisasi Membran *Nitrocellulose* dengan ImageQuant LAS 500

Alat : Alat *blotting* (Bio Dot Apparatus BioRad), alat pengukur pH, magnetic stirrer, freezer 4°C, vortex, ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare), tabung falcon

Bahan : Tris Base, NaCl, Aquades steril, larutan pH adjuster, membran *nitrocellulose*, *skim milk*, antibody primer CFP-10 (Abcam), antibody sekunder *anti rabbit* label biotin (KPL), TBS-Tween 0,05%, Streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP), substrat peroksidase-luminal 1:1

4.6 Definisi Operasional

- a) Bakteri *M. tuberculosis* H37Rv diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya Jl. Karangmenjangan no 18 Surabaya. Koloni *M. tuberculosis* H37Rv ditumbuhkan pada medium padat *Lowenstein Jensen*.
- b) Media MGIT yang digunakan yakni BD BACTEC MGIT 960 SIRE.

- c) Serbuk perikarp manggis 500 gram (*Garcinia mangostana* L.) dibeli dari UPT Materia Medika, Batu Malang Jl. Lahor no 87 Batu dengan keadaan geografis tanaman tumbuh pada curah hujan 256 mm/bulan, suhu rata-rata 23°C, suhu minimum 5°C, suhu maksimum 30°C, kelembapan 80, dan ketinggian 875 m dpl.
- d) Kontrol positif yakni rifampicin yang digunakan berasal dari MGIT RIF dengan dosis 1 µg/ml.
- e) Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi selama 7 hari dengan remaserasi sebanyak satu kali dengan tujuan agar hasil ekstrak yang didapatkan mengandung senyawa fitokimia dan α-mangostin yang diinginkan dapat tersari seefektif mungkin.
- f) Ekstrak perikarp manggis merupakan hasil ekstraksi dengan pelarut etanol 95% menggunakan perikarp manggis yang telah dikeringkan dan dihaluskan.
- g) Metode pengukuran kadar α-mangostin menggunakan HPLC MS/MS. Spektrometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa. Sistem HPLC MS/MS merupakan penggabungan kemampuan pemisahan dari HPLC dan deteksi dari spektrofotometri massa. Dipisahkanlah beberapa senyawa atau campuran senyawa berdasarkan kepolarannya (prinsip kerja kromatografi) selanjutnya setelah campuran senyawa tersebut terpisah maka senyawa yang murni akan diidentifikasi berat molekulnya.
- h) Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 digunakan untuk kuantifikasi protein pada filtrat hasil kultur. Pembacaan dilakukan pada λ 280 nm. Kalibrasi dilakukan sebelum melakukan pengukuran dengan mengukur

balnko yang berisi media kultur. Sampel ditetaskan di atas *lower measurement pedestal* kemudian ditutup dan ditunggu kurang lebih 5 detik. Hasil kuantifikasi dapat dilihat pada layar komputer.

- i) SDS PAGE elektroforesis (BioRad) digunakan untuk analisa profil protein. Pemisahan berdasarkan ukuran/berat molekul protein. Protein dengan berat molekul kecil akan bermigrasi lebih cepat. Protein dapat terpisah dengan cara memberi gaya pada protein tersebut untuk melewati medium berisi gel (poliakrilamid) yang dibantu dengan adanya listrik. Protein yang bermuatan listrik ditempatkan pada medium berisi tenaga listrik. Pemisahan protein berdasarkan pada tingkat migrasi dan berat molekulnya dalam sebuah medan listrik.
- j) Metode dot blot digunakan untuk mengidentifikasi protein CFP-10 dalam filtrat hasil kultur. Sampel ditetaskan pada membran *nitrocellulose* yang telah ada dalam alat dot blot. Kandungan protein CFP-10 dapat diketahui dari hasil ikatan antara antigen (protein dalam sampel) dengan antibodi primer CFP-10. Selanjutnya ditambahkan antibodi sekunder label biotin yang dikonjugasikan dengan SA-HRP.
- k) Visualisasi hasil dot blot dilakukan dengan ImageQuant LAS 500. Membran *nitrocellulose* direaksikan dengan substrat peroksidase-luminal 1:1 kemudian diletakkan di atas *tray* untuk selanjutnya dipapar dengan sinar. Hasil visualisasi diperoleh dari sinyal yang merupakan hasil reaksi antibodi sekunder label SA-HRP dengan substrat peroksida-luminol (1:1). Metode pembacaan yang digunakan adalah *chemiluminescence*.

4.7 Prosedur penelitian

4.7.1 Pengumpulan dan Persiapan Bahan

Serbuk perikarp manggis diperoleh dari Balai Materia Medika, Batu, Jawa timur. Kulit manggis dipisahkan dari daging buah dan kulit luarnya, bagian perikarp manggis diiris tipis-tipis kemudian dikeringkan pada suhu 50°C dengan oven vaccum dan diserbukkan untuk memaksimalkan ekstraksi.

4.7.2 Maserasi Perikarp Manggis

Adapun prosedur maserasi perikarp manggis adalah (Dewi *et al.*, 2013) :

1. Sebanyak 100 gram serbuk perikarp manggis ditimbang.
2. Dimaserasi dengan 750 mL ethanol 95% pada suhu kamar selama 5 hari, lalu disaring.
3. Ampas diremaserasi dengan menggunakan 150 mL ethanol 95% pada suhu kamar selama 2 hari, lalu disaring.
4. Ekstrak yang didapat selanjutnya digabungkan dan disaring menggunakan kain flanel, kemudian pelarut dihilangkan menggunakan rotary vacuum evaporator pada suhu 50°C.
5. Ekstrak yang diperoleh diuapkan kembali dengan oven pada suhu 40°C untuk memperoleh ekstrak kental.

4.7.3 Uji Fitokimia Ekstrak

4.7.3.1 Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji untuk uji fitokimia dilakukan dengan cara melarutkan sebanyak 500 mg ekstrak etanol 95% perikarp manggis dalam 50 ml etanol 95% (Dewi *et al.*, 2013).

4.7.3.2 Pemeriksaan Alkaloid

Larutan ekstrak uji sebanyak 2 ml diuapkan di atas cawan porselin hingga didapat residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5 ml HCl 2 N. Larutan yang didapat kemudian dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan HCl 2N yang berfungsi sebagai blanko. Tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendoff sebanyak 3 tetes dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Dewi *et al.*, 2013).

4.7.3.3 Pemeriksaan Triterpenoid

Larutan uji sebanyak 2 ml diuapkan. Residu yang diperoleh dilarutkan dalam 0,5 ml kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 ml asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran ini ditetesi dengan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Bila terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut, menunjukkan adanya triterpenoid (Dewi *et al.*, 2013).

4.7.3.4 Pemeriksaan Saponin

Ekstrak uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, dinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. pada penambahan HCl 2N, buih tidak hilang (Dewi *et al.*, 2013).

4.7.3.5 Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara mengambil larutan uji sebanyak 1 ml kemudian, ditambahkan dengan beberapa tetes HCl pekat dan beberapa butir serbuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna orange sampai merah (Wahyuni, 2013).

4.7.3.6 Pemeriksaan Tannin dan Polifenol

Larutan ekstrak uji sebanyak 1 ml direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%, jika terjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tannin (Dewi *et al.*, 2013).

4.7.4 Identifikasi α -mangostin dengan HPLC MS/MS

Adapun prosedur identifikasi α -mangostin dengan HPLC MS/MS adalah:

1. Ditimbang sampel yakni ekstrak perikarp manggis sebanyak 0,1124 gram.
2. Ditambahkan methanol 5 mL.
3. Disonifikasi selama 30 menit.
4. Disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit.
5. Difiltrasi menggunakan membran filter 0,2 μ m.

6. Diinjeksikan ke dalam HPLC MS/MS untuk dianalisa.
7. Diperoleh kadar α -mangostin pada ekstrak perikarp manggis.

4.7.5. Kultur *M. tuberculosis* dengan Media Padat Lowenstein Jensen

Adapun prosedur kultur bakteri *M. tuberculosis* pada media Lowenstein Jensen adalah:

1. Disiapkan medium padat Lowenstein Jensen yang telah dibuat di BBLK Surabaya.
2. Biakan *M. tuberculosis* H37Rv digoreskan pada media Lowenstein Jensen.
3. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 minggu.

4.7.6 Inokulasi *M. tuberculosis* pada Media Cair BD BACTEC MGIT 960 SIRE

Medium BACTEC MGIT memiliki volume tiap tube sebesar 7 ml, untuk jumlah perlakuan sebanyak 7 perlakuan maka, komposisi bahan untuk pembuatan medium MGIT terdiri dari Bovine albumin 2,45 gram; Catalase 1,47 mg; Dextrose 0,98 gram; Oleic acid 29,4 mg.

1. Tambahkan 4 ml medium cair BBL MGIT kedalam 16,5 x 128 mm tube steril.
2. Ambil biakan koloni bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dan disuspensikan koloni ke medium cair Middlebrook 7H9.
3. Vortex suspensi tersebut selama 2-3 menit (suspensi harus mencapai standart 1.0 McFarland).
4. Biarkan suspensi selama 20 menit.

5. Transfer cairan supernatant ke tube steril 16,5 x 128 mm dengan penutup dan biarkan selama 15 menit.
6. Transfer cairan supernatant ke tube steril lain (suspensi harus memiliki konsentrasi lebih besar dari 0,5 McFarland).
7. Adjust suspensi hingga 0,5 McFarland dengan membandingkan pada standart turbidity 0,5 McFarland.
8. Larutkan 1 ml suspensi dalam 4 ml saline steril.
9. Sebanyak 7 ml tube MGIT yang telah berisi BACTEC MGIT *Growth Supplement* di monitoring pertumbuhan bakterinya menggunakan BACTEC MGIT *Instrument* hingga menunjukkan hasil positif.

4.7.7 Pembuatan Larutan Ekstrak Perikarp Manggis, Rifampicin, dan Ekstrak Perikarp Manggis Pembanding

4.7.7.1 Pembuatan Larutan Ekstrak Perikarp Manggis

Adapun prosedur pembuatan larutan ekstrak perikarp manggis adalah:

1. Ditimbang 0,1044 gram ekstrak perikarp manggis di atas cawan persolen menggunakan neraca analitik.
2. Dilarutkan ekstrak perikarp manggis yang telah ditimbang dengan sedikit aquades.
3. Dituangkan ke dalam labu ukur 100 ml.
4. Dilarutkan dengan aquades hingga mencapai batas pada labu ukur 100 ml.
5. Dikocok hingga homogen sehingga diperoleh ekstrak perikarp Manggis dengan konsentrasi 1044,5 µg/ml yang mengandung α-mangostin 6,25 µg/ml. Selanjutnya dibuat ekstrak perikarp Manggis dengan konsentrasi

2089 $\mu\text{g/ml}$ yang mengandung α -mangostin 12,5 $\mu\text{g/ml}$ dan ekstrak perikarp Manggis dengan konsentrasi 522,25 $\mu\text{g/ml}$ yang mengandung α -mangostin 3,125 $\mu\text{g/ml}$.

4.7.7.2 Pembuatan Larutan Rifampicin pada Media BD BACTEC MGIT 960

SIRE

1. Secara aseptis tambahkan 0,8 ml suplemen BACTEC MGIT pada *tube* kontrol positif.
2. Pipet menggunakan mikropipet 100 μl dari 83 $\mu\text{g/ml}$ larutan MGIT RIF (Rifampicin) hingga konsentrasi akhir dalam medium MGIT sebesar 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

4.7.7.3 Pembuatan Larutan Ekstrak Perikarp Manggis Pemanding

Adapun prosedur pembuatan larutan ekstrak perikarp Manggis pemanding adalah:

1. Dikeluarkan serbuk ekstrak perikarp manggis pemanding dari dalam cangkang kapsul dan dituang ke atas kertas perkamen bersih.
2. Ditimbang 0,1044 gram ekstrak perikarp manggis pemanding dengan neraca analitik.
3. Dituangkan ke dalam cawan porselin kemudian dilarutkan dengan sedikit aquades.
4. Dituangkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan aquades hingga tanda batas.
5. Dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan ekstrak perikarp Manggis pemanding dengan konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$.

4.7.7.4 Perlakuan Ekstrak Perikarp Manggis, Larutan Rifampicin, dan Larutan Ekstrak Manggis Pembanding dalam Media BD BACTEC MGIT 960 SIRE

1. Perlakuan ekstrak perikarp manggis dilakukan dalam 7 variabel, yakni:

Tabel 0.1 Perlakuan Variabel pada Media BD BACTEC MGIT 960 SIRE

Variabel		Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Tiap tabung (Berisi media MGIT + ekstrak)
A	Ekstrak 1	522,25 (mengandung α - mangostin 3,125)	7 ml
B	Ekstrak 2	1044,5 (mengandung α - mangostin 6,25)	7 ml
C	Ekstrak 3	2089 (mengandung α - mangostin 12,5)	7 ml
D	kontrol (+) Rifampicin	1,0	7 ml
E	Kontrol (-)	-	7 ml
F	Pembanding	1044,5	7 ml
G	Media BD BACTEC MGIT 960 SIRE	-	7 ml

2. Larutan ekstrak perikarp manggis ditambahkan pada media MGIT yang telah ditambahkan BACTEC MGIT SIRE *Supplement* sesuai dengan dosis yang ditentukan (pada tabung A, B, dan C).

3. Tabung E tidak perlu ditambahkan apapun (kontrol pertumbuhan), pembuatan *Growth Control tube* yaitu pipet 0,1 ml dari suspensi organisme dan masukan ke dalam 10 ml saline untuk membuat larutan

suspensi dengan perbandingan 1 : 100. Kemudian, inokulasi 0,5 ml dari larutan suspensi ke dalam tube MGIT.

4. Ditambahkan larutan ekstrak perikarp manggis pembanding sebesar 6,25 µg/ml dalam tabung F yang telah ditambahkan BACTEC MGIT SIRE *Supplement*.

4.7.8 Identifikasi Pertumbuhan Bakteri *M.tuberculosis* H37Rv dalam Media BD BACTEC MGIT 960 SIRE

1. Tube steril disimpan dalam tempat penyimpanan selama beberapa hari.
2. Senyawa fluorescent yang terdapat dalam medium sensitif terhadap adanya oksigen yang terlarut dalam *broth* sehingga ketika terjadi pertumbuhan bakteri maka fluoresensi akan terdeteksi.

4.7.9 Penentuan Kadar Total Protein Sampel dengan Metode Nanodrop ND-1000 Thermo Scientific

1. Dibuka pedestal atas alat dengan mengangkatnya ke arah atas.
2. Dibersihkan pedestal atas dan bawah alat menggunakan tisu bersih yang telah dibasahi dengan aquades steril.
3. Diletakkan 1,5 µl aquades steril di pedestal bawah.
4. Ditutup pedestal atas.
5. Dibuka software "ND 1000".
6. Muncul menu utama "ND 1000".
7. Dipilih jenis program pengukuran (*application module*) yakni protein A280 untuk sampel protein.

8. Muncul window protein A280 dan muncul peringatan, cek ulang bahwa pedestal sudah ditetesi aquades steril, klik ok.
9. Setelah alat terinisialisasi pilih tipe sampel klik tombol blanko biarkan alat bekerja mengukur blanko, setelah blanko terukur yakinkan bahwa tombol *record* telah aktif.
10. Dibuka pedestal atas, kemudian usap/keringkan aquades pada pedestal atas dan bawah menggunakan tissue kering.
11. Diulangi tahap sebelumnya untuk sampel yang akan diukur.

4.7.10 Analisa Profil Protein dengan SDS-PAGE Metode Pewarnaan Coomassie Blue

1. Pembuatan *separating gel*

Langkah pertama yaitu mengatur cetakan atau tempat penuangan (*Casting frames*) pada cetakan. Kemudian siapkan larutan gel dalam beaker yang terpisah. Untuk 10 ml *Separating gel* dengan komposisi Acrylamide 15% maka komposisi bahan yang diperlukan yakni:

Tabel 0.2 Komposisi bahan pembuatan *separating gel*

Bahan	Jumlah
ddH ₂ O	2,4 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0,8% W/V)	5 ml
Gel Buffer (1,5 M Tris pH=8,8)	2,5 ml
10% (W/V) SDS	0,1 ml
10% (W/V) ammonium persulfate (AP)	75 µl
TEMED	10 µl

Kemudian, bahan-bahan yang telah tercampur diaduk pelan-pelan hingga homogen. Pipet jumlah *separating gel* yang dibutuhkan kedalam

celah antara plat kaca. Kemudian tunggu selama 20-30 min hingga menjadi bentuk gel.

2. Pembuatan *Stacking gel*

Stacking gel dituangkan diatas *separating gel* yang telah menjadi bentuk gel. *Stacking gel* yang digunakan yaitu sebesar 4 %. Bahan-bahan yang perlu disiapkan untuk pembuatan 10 ml *stacking gel* yakni:

Tabel 0.3 Komposisi bahan pembuatan *stacking gel*

Bahan	Jumlah
ddH ₂ O	6,1 ml
Gel Buffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	2,5 ml
10% (W/V) SDS	0,1 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0,8% W/V)	1,3 ml
10% (W/V) ammonium persulfate (AP)	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

Pipet *stacking gel* hingga penuh, kemudian masukan cetakan pembentuk sumuran dan tunggu selama 20-30 menit hingga terbentuk gel.

- Setelah itu ambil cetakan sumuran setelah gel terbentuk dan ambil plat kaca dari bingkai cetakan (*casting frames*) dan atur kedalam sumuran sel buffer. Tuang electrophoresis buffer kedalam sumuran dan tuang hingga menyentuh permukaan atas.

4. Persiapan Sampel

Sampel yang disiapkan yaitu hasil filtrat kultur dengan penambahan ekstrak perikarp manggis dengan berbagai konsentrasi, filtrat kultur tanpa penambahan ekstrak (kontrol negatif), filtrat dengan penambahan rifampicin dan filtrat dengan penambahan ekstrak perikarp Manggis pembanding didenaturasi dengan penambahan RSB dan dipanaskan selama 5-10 menit.

Tabel 0.4 Komposisi sampel yang diinjeksikan ke dalam sumuran

Sampel	10 μ l
Aquades	-
RSB	10 μ l

5. Tambahkan sampel kedalam masing-masing sumuran yang telah terbentuk dan jaga supaya tidak melebihi batas sumuran. Tambahkan protein marker kedalam sumuran pertama. Kemudian tutup pada bagian atas dan hubungkan elektroda dengan power.
6. Atur power elektroforesis yaitu pada kondisi 120 V, 400 mA, selama 90 menit.
7. Hentikan proses elektroforesis ketika dye mencapai batas bawah gel.
8. Gel di staining dengan coomassie blue dan destaining dengan metanol-asetat (selama 10 menit), sensitifitas 0,2 – 0,5 μ g/pita dengan proses celupkan gel pada larutan destaining dan letakkan pada shaker yang sama selama 20-30 menit. Ganti larutan destaining selama 3-5 kali hingga dapat terlihat pita yang bening.
9. Pita protein diamati dan dibandingkan. Berat molekul protein CFP-10 diketahui dengan menarik garis lurus secara horizontal dari protein marker 10 kDa. Masing-masing pita yang terbentuk dihitung intensitas cahaya atau tingkat gelap terangnya dengan menggunakan Adobe Photoshop Cs 6. *Software* Adobe Photoshop Cs 6 dibuka dan dipilih menu *Window* kemudian dipilih Histogram. Besarnya intensitas cahaya diketahui dari nilai *mean* dengan menandai pita protein menggunakan *Marque tool*.

4.7.11 Analisa Profil Protein dengan SDS-PAGE Metode Pewarnaan Silver

Stain

1. Pembuatan *separating gel*

Langkah pertama yaitu mengatur cetakan atau tempat penuangan (*Casting frames*) pada cetakan. Kemudian siapkan larutan gel dalam beaker yang terpisah. Untuk 10 ml *separating gel* dengan komposisi Acrylamide 15% maka komposisi bahan yang diperlukan yakni:

Tabel 0.5 Komposisi bahan pembuatan *separating gel*

Bahan	Jumlah
H ₂ O	2,4 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0,8% W/V)	5 ml
Gel Buffer (1,5 M Tris pH=8,8)	2,5 ml
10% (W/V) SDS	0,1 ml
10% (W/V) ammonium persulfate (AP)	75 µl
TEMED	10 µl

Kemudian, bahan-bahan yang telah tercampur diaduk pelan-pelan hingga homogen. Pipet jumlah *separating gel* yang dibutuhkan kedalam celah antara plat kaca. Kemudian tunggu selama 20-30 min hingga menjadi bentuk gel.

2. Pembuatan *Stacking gel*

Stacking gel dituangkan diatas *separating gel* yang telah menjadi bentuk gel. *Stacking gel* yang digunakan yaitu sebesar 4,5 %. Bahan-bahan yang perlu disiapkan untuk pembuatan 5 ml *stacking gel* yakni:

Tabel 0.6 Komposisi bahan pembuatan *stacking gel*

Bahan	Jumlah
H ₂ O	6,1 ml
Gel Buffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	2,5 ml
10% (W/V) SDS	0,1 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0,8% W/V)	1,3 ml
10% (W/V) ammonium persulfate (AP)	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

Pipet *stacking gel* hingga penuh, kemudian masukan cetakan pembentuk sumuran dan tunggu selama 20-30 menit hingga terbentuk gel.

- Setelah itu ambil cetakan sumuran setelah gel terbentuk dan ambil plat kaca dari bingkai cetakan (*casting frame*) dan atur kedalam sumuran sel buffer. Tuang electrophoresis buffer kedalam sumuran dan tuang hingga menyentuh permukaan atas.

6. Persiapan Sampel

Sampel yang disiapkan yaitu hasil filtrat kultur dengan penambahan ekstrak perikarp manggis dengan berbagai konsentrasi, filtrat kultur tanpa penambahan ekstrak (kontrol negatif), filtrat dengan penambahan Rifampicin dan filtrat dengan penambahan ekstrak perikarp Manggis pembeding didenaturasi dengan penambahan RSB dan dipanaskan selama 5-10 menit.

Tabel 0.7 Komposisi sampel yang diinjeksikan ke dalam sumuran

Sampel	5 µl
Aquades	5 µl
RSB	10 µl

- Tambahkan sampel kedalam masing-masing sumuran yang telah terbentuk dan jaga supaya tidak melebihi batas sumuran. Tambahkan

protein marker kedalam sumuran pertama. Kemudian tutup pada bagian atas dan hubungkan elektroda dengan power.

10. Atur power elektroforesis yaitu pada kondisi 120 V, 400 mA, selama 90 menit.

11. Hentikan proses elektroforesis ketika dye mencapai batas bawah gel.

12. Dilakukan prosedur pewarnaan dengan silver stain sebagai berikut:

(1). Fiksasi 30 menit dengan menggunakan shaker

Bahan : Etanol 12 ml

Asam asetat glacial 3 ml

Aquades add 30 ml

(2). Sensitizing 30 menit dengan menggunakan shaker

Bahan : Etanol 9 ml

Natrium tiosulfat 5% (W/V)* 1,2 ml

Natrium asetat 2,04 gram

Aquades add 30 ml

Glutaraldehid 25% (W/V)* 150 μ l

*ditambahkan paling akhir kira-kira 5-10 menit tahap sebelumnya akan berakhir

(3). Washing 3 kali masing-masing 5 menit, dengan menggunakan shaker

Bahan : Aquades

(4). Silver reaction selama 20 menit dengan menggunakan shaker

Bahan : Silver nitrat 25% (W/V) 3 ml

Aquades add 30 ml

Formaldehid 37% (W/V) 12 μ l

(5). Washing 2 kali masing-masing 1 menit dengan menggunakan shaker

Bahan : Aquades

(6).Developing selama 2-5 menit, digoyang-goyang hingga berwarna coklat

Bahan : Na_2CO_3 0,75 gram

Aquades add 30 ml

Formaldehid 37% (W/V)* 6 ml

*Formaldehid ditambahkan terakhir

(7). Stopping selama 10 menit dengan digoyang-goyang

Bahan : EDTA 0,438 gram

ddH₂O add 30 ml

(8). Washing selama 5 menit

Bahan : Aquades

(9). Disimpan dalam H₂O 4°C

10. Pita protein diamati dan dibandingkan. Berat molekul protein CFP-10 diketahui dengan menarik garis lurus secara horizontal dari protein marker 10 kDa. Masing-masing pita yang terbentuk dihitung atau dikuantifikasi dengan menggunakan Adobe Photoshop Cs 6. *Software* Adobe Photoshop Cs 6 dibuka dan dipilih menu *Window* kemudian dipilih *Histogram*. Besarnya intensitas cahaya diketahui dari nilai *mean* dengan menandai pita protein menggunakan *Marque tool*.

4.7.11 Uji Spesifitas CFP-10 dengan Metode Dot Blot dan Visualisasi dengan Menggunakan ImageQuant LAS 500

1. Mempersiapkan larutan Tris Base Solution (TBS) yang dibuat dari Tris Base Solution 1,212 gram, NaCl 2,336 gram dan Aquades steril 200 ml. Sebelum larutan dijadikan hingga 200 ml di adjust pH nya terlebih dahulu yakni pH 7,4 selanjutnya ditambahkan aquades hingga 200 ml dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*.
2. Dilakukan pengenceran sampel dan *mapping* dot blot sesuai dengan gambar berikut :

		CFP-10											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P E R L A K U A N	A							1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$			
	B							1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$			
	C							1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$			
	D							1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$			
	E							1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$			
	F							1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$			
	G							1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$			
	H							1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$			

Gambar 0.1 Mapping sampel pada Membran Nitrocellulose

Perhitungan kebutuhan pengenceran untuk protein CFP-10

- Pengenceran 1x

1 sumuran = 50 μ l

- Pengenceran $\frac{1}{2}x$

$$\frac{1}{2} = \frac{y}{50} // \text{sampel } (y) = 25\mu\text{l} \text{ sehingga TBS yang ditambahkan } 25\mu\text{l}$$

- Pengenceran $\frac{1}{4} \times$

$$\frac{1}{4} = \frac{y}{50} // \text{sampel } (y) = 12,5\mu\text{l} \text{ sehingga TBS yang ditambahkan } 37,5 \mu\text{l}$$

3. Menyiapkan membran *nitrocellulose* dan pemasangan alat dot blot, membran *nitrocellulose* dicuci dengan *tris base solution* (membran dipasang pada bagian bawah alat dot blot selanjutnya ditutup dengan alat dot blot bagian atas dan dirapatkan).
4. Memasukkan masing-masing sampel ke dalam alat dot blot sesuai *mapping* dan dilakukan *blocking* dengan menambahkan larutan *skim milk*:TBS ke dalam alat dot blot sejumlah 50 μl . Lalu alat dot blot ditutup dengan aluminium foil
5. Didiamkan selama 18 jam pada suhu 4°C. Setelah didiamkan selama 18 jam dimasukkan masing-masing antibodi primer ke dalam tiap-tiap well pada alat dot blot. Kemudian, dihitung volume antibodi sekunder antirabbit label biotin dan TBS yang diambil.

Perhitungan sebagai berikut :

$$\begin{aligned} 24 \text{ well} \times 50 \mu\text{L TBS-antibodi sekunder} \\ = 1200 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Keterangan :

Berdasarkan *datasheet* yang ada, perbandingan antibodi sekunder dengan larutan TBS adalah 1:1000 sehingga volume larutan TBS yang diambil = 1200 μL volume antibodi sekunder antirabbit berlabel biotin = 1200 μl .

6. Dibuat larutan TBS-antibodi sekunder *antirabbit* label biotin.

7. Dimasukkan TBS-Tween 0,05% ke dalam masing-masing well pada alat dot blot dan digoyang selama 3 menit dengan alat *shaker* lalu dikeluarkan larutan dengan membalik di atas tisu (diulangi sebanyak 2 kali).
8. Dimasukkan antibodi sekunder *antirabbit* CFP-10 sebanyak 50 μ L sesuai dengan *mapping* blotting.
9. Diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dan alat dot blot ditutup dengan aluminium foil. Kemudian, dicuci dengan larutan TBS-Tween 0,05% sebanyak 3 x 3 menit dan dimasukkan SA-HRP sebanyak 50 μ L ke dalam masing-masing well dan diinkubasi selama 45 menit di suhu ruang.
10. Dikeluarkan larutan dengan membalik diatas tisu. Kemudian, dicuci dengan TBS-Tween 0,05% selama 3 x 3 menit.
11. Diambil membran *nitrocellulose* dari alat dot blot dan membran *nitrocellulose* diletakkan diatas baki.
12. Ditambahkan substrat HRP ke atas permukaan membran *nitrocellulose* hingga merata lalu ditempelkan dengan substrat HRP yang telah disemprotkan secara merata diatas baki dan ditunggu selama \pm 5 menit.
13. Membran *nitrocellulose* dipindahkan ke atas *tray* pembaca LAS ImageQuant 500 dan diperoleh hasil berupa pembacaan *chemiluminescence*.
14. Hasil pembacaan dengan LAS ImageQuant 500 dianalisis secara kuantitatif melalui software ImageQuant TL.

4.8 Analisis Data

Data yang diambil berupa kadar protein yang disekresikan. Data tersebut diambil setelah dilakukan metode SDS PAGE dan Dot Blot dengan visualisasi membran *nitrocellulose* dengan ImageQuant LAS 500. Analisis data dilakukan dengan membandingkan ketebalan pita protein yang dianalisis statistik menggunakan SPSS 20. *One Way Anova* digunakan untuk menguji apakah terdapat perbedaan yang signifikan pada sekresi protein dari masing-masing perlakuan dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dimana apabila diperoleh $p>0,05$ artinya tidak ada perbedaan yang bermakna, sebaliknya bila $p>0,05$ terdapat perbedaan yang bermakna. Kemudian juga dilakukan uji korelasi Pearson untuk mengetahui apakah ada hubungan dari masing-masing perlakuan terhadap sekresi protein yang dihasilkan. Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95% ($\alpha=0,05$) dimana apabila diperoleh $p>0,05$ artinya tidak ada hubungan antar perlakuan, sebaliknya bila $p<0,05$ artinya terdapat hubungan antar perlakuan.

4.9 Diagram Alur Penelitian

