

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik secara *in vitro* yaitu, menguji efek anti TB dari ekstrak perikarp manggis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Desain penelitian yang digunakan adalah *quasi experimental in vitro, post-test design*, dan *control group design*. Pengujian efek anti TB dari ekstrak perikarp manggis dalam menghambat sekresi protein Ag85 pada bakteri *M. tuberculosis* dilakukan dengan uji spesifisitas Ag85 yang menggunakan *Dot Blotting* dan hasil pengujian spesifisitas Ag85 dibaca dengan menggunakan ImageQuant LAS 500.

4.2 Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan sampel kultur bakteri *M. tuberculosis* yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK), Surabaya.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini, variabel bebas yang digunakan adalah dosis α -*mangostin* dalam ekstrak perikarp manggis 3,125 $\mu\text{g/ml}$; 6,25 $\mu\text{g/ml}$; dan 12,5

µg/ml berdasarkan nilai MIC (*Minimum Infected Concentration*) *α*-mangostin yang diperoleh melalui hasil HPLC-MS/MS.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar protein Ag85 *M. tuberculosis* H37Rv dalam media BACTEC-MGIT yang disekresikan.

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis rifampin 1,0 µg/ml. Sedangkan, variabel kontrol negatif yang dipakai dalam penelitian ini ialah hasil kultur bakteri tidak diberikan perlakuan apapun. Lalu terdapat variabel kontrol media yang hanya menggunakan medium BACTEC-MGIT tanpa kultur bakteri *M. tuberculosis*. Kemudian variabel kontrol pembanding yang digunakan adalah produk ekstrak perikarp manggis yang beredar di pasaran dan memiliki efek antituberkulosis (Garcia®).

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Farmasi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Ilmu Faal, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini juga dilakukan di Laboratorium Analisa Instrumen, Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK), Surabaya. Kemudian penelitian ini pula dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2014 hingga Maret 2015.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Pengumpulan dan Persiapan Bahan

- Bahan : serbuk ekstrak perikarp manggis

4.5.2 Ekstraksi Perikarp Manggis

- Bahan : serbuk ekstrak perikarp manggis, etanol 96%, kain flanel, kertas saring, aluminium foil, *plastic wrap*, dan tisu.
- Alat : toples besar 2 buah, *rotary vacuum evaporator*, batang pengaduk, gelas ukur, corong pemisah, *magnetic stirrer*, neraca analitik, cawan porselen, batang pengaduk, sendok tanduk, *ice box*, wadah untuk menampung ekstrak kental, dan gel pendingin.

4.5.3 Uji Fitokimia Ekstrak Perikarp Manggis

- Bahan : ekstrak kental perikarp manggis, etanol 96%, serbuk Mg, HCl pekat, reagen *Dragendoff*, reagen *Mayer*, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, air panas, larutan besi (III) klorida (FeCl_3) 10%, aluminium foil, tisu.
- Alat : gelas beker 200 ml, neraca analitik, cawan porselen, tabung reaksi dan raknya, pipet tetes, pipet volum, mikropipet, batang pengaduk, labu ukur 50 ml, gelas ukur 10 ml dan 100 ml, lemari asam, penangas air, pembakar spiritus.

4.5.4 Identifikasi α -mangostin dengan HPLC-MS/MS

- Bahan : ekstrak kental perikarp manggis, methanol, standar α -*mangostin*, standar *xanthone*, dan tisu
- Alat : sonikator, neraca analitik, sentrifugator, HPLC-MS/MS, *membrane filter 0,2 μm* , cawan porselen, gelas ukur 10 ml, gelas beker, dan batang pengaduk.

4.5.5 Kultur Bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dengan Media *Lowenstein Jensen*

- Bahan : Medium *Lowenstein Jensen* dan biakan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv.
- Alat : Inkubator

4.5.6 Pembuatan Larutan Ekstrak Perikarp Manggis dan Garcia®

- Bahan : ekstrak perikarp manggis kental, Garcia®, aquadest, dan kertas perkamen.
- Alat : neraca analitik, cawan porselen, batang pengaduk, labu ukur 100 ml, botol aquadest, corong pemisah.

4.5.7 Filtrasi Larutan Ekstrak Perikarp Manggis dan Garcia®

- Bahan : larutan ekstrak perikarp manggis, tisu, dan larutan Garcia®.
- Alat : membran filter 0,2 μm , magnetic stirrer, gelas beker, spuit, dan tabung falcon 15 ml.

4.5.8 Inokulasi *M. tuberculosis* H37Rv pada medium BACTEC-MGIT

- Bahan : BACTEC-MGIT 960 SIRE Supplement, BBL Middlebrook 7H9, saline steril, dan biakan koloni bakteri *M. tuberculosis* H37Rv yang telah ditumbuhkan di medium *Lowenstein Jensen*.
- Alat : mikropipet, blue tip, loop sterile, glass beads, tube steril berukuran 16,5 x 128 mm, vortex, stopwatch, gelas beker, dan pipet tetes.

4.5.9 Perlakuan Ekstrak Perikarp Manggis dalam Medium BACTEC-MGIT

- Bahan : larutan ekstrak perikarp manggis dan larutan Garcia® yang telah difiltrasi, larutan MGIT RIF (Rifampin) yang memiliki

konsentrasi 83 µg/ml, suspensi organisme *M. tuberculosis* H37Rv, saline steril, dan tisu.

- Alat : tabung steril bertutup ulir yang mengandung medium BACTEC-MGIT + bakteri *M. tuberculosis* H37Rv, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, *stopwatch*, BACTEC-MGIT *Instrument*, pipet volum 0,5 ml, dan pipet volum 1 ml.

4.5.10 Pemanenan Hasil Kultur Bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dalam Medium BACTEC-MGIT

- Bahan : medium BACTEC-MGIT yang telah mengandung masing-masing variabel dan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv yang telah menunjukkan hasil positif dan pita plastik khusus.
- Alat : tabung steril bertutup ulir, pipet transfer steril, BACTEC-MGIT *Instrument*, tabung *falcon*, sentrifugator, dan *biological safety cabinet* (area yang memiliki *BSL (Bio-safety level) III practices and containment facilities*).

4.5.11 Penentuan Kadar Protein Filtrat Kultur *M. tuberculosis* H37Rv dengan *Nanodrop Spectrophotometer*

- Bahan : sampel filtrat kultur bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dan tisu.
- Alat : *nanodrop spectrophotometer ND-1000*, tabung *falcon*, *yellow tip*, komputer yang telah terpasang software *Nanodrop spectrophotometer ND-1000*.

4.5.12 Pemekatan Filtrat Kultur Bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dengan Ammonium Sulfat

- Bahan : membran selofan, PBS (*Phosphat Bovine Saline*) steril, ammonium sulfat, aquadest steril, sampel filtrat kultur bakteri *M. tuberculosis* H37Rv, ethanol, aluminium foil.

- Alat : *blue tip*, *yellow tip*, LAF (*Laminar Air Flow*), *ependorf*, tabung steril, tabung *falcon* 15 ml, neraca analitik, sendok tanduk, *magnetic stirrer*, mikropipet, labu erlenmeyer, kulkas, sentrifugator, lemari es kaca, dan penjepit membran selofan.

4.5.13 Analisis Profil Protein Ag85 dengan Metode SDS-PAGE Pewarnaan *Coomassie Blue* dan *Silver Staining*

- Bahan : filtrat hasil kultur bakteri *M. tuberculosis*, ddH₂O, Acrylamide/Bis-acrylamide, 1,5 M Tris (pH=8,8), *gel buffer*, SDS 10%, *ammonium persulfate* (APS), TEMED, RSB, *Coomassie Blue*, aquadest, air panas, *destaining buffer*, *marker protein broad range*, alkohol, ethanol, asam asetat glasial, natrium tiosulfat 5% (w/v), natrium asetat, glutaraldehid 25% (w/v), silver nitrat 25% (w/v), formaldehid 37% (w/v), Na₂CO₃, EDTA, H₂O, alkohol, tisu, *running buffer* (tris base, glisine, SDS, dan aquadest), plastik, dan *marker protein low range*.
- Alat : gelas beker 100 ml, *Casting frames*, plat kaca, sumuran sel buffer (sisir), power elektroforesis, *ependorf*, mikropipet, LAF (*laminar air flow*), *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, kompor listrik, *vortex*, neraca analitik, lemari asam, *stopwatch*, panci untuk denaturasi sampel, labu erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur 10 ml, semprotan, spidol marker, *magnetic stirrer*, wadah tertutup untuk menampung gel elektroforesis, gabus, komputer yang terdapat software *Microsoft Excel*, dan *waterbath shaker*.

4.5.14 Uji Spesifisitas Ag85 dengan Metode Dot Blot

- Bahan : *membrane nitroselulosa*, serbuk tris base solution (TBS), NaCl, aquadest steril, larutan skim milk, aluminium foil, HCl, antibodi primer Ag85, antibodi sekunder antirabbit berlabel biotin, TBS-Tween

0,05%, tisu, SA-HRP, Substrat peroksida-luminol (1:1), dan sampel filtrat kultur bakteri *M. tuberculosis* H37Rv.

- Alat : neraca analitik, gelas beker, pH meter, *magnetic stirrer*, mikropipet, LAF, alat *dot blotting*, gabus, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, tabung *falcon* 15 ml, cawan petri, wadah untuk pencucian membran nitroselulosa, baki, *ependorf*, multimikropipet, *vortex*, *stopwatch*, dan *waterbath shaker*.

4.5.15 Pembacaan Hasil Dot Blot dengan *ImageQuant LAS 500*

- Bahan : membran nitroselulosa hasil dot blot dan tisu
- Alat : *ImageQuant LAS 500* dan Komputer yang terdapat *software ImageQuant TL* dan *microsoft excel*.

4.6 Definisi Operasional

- 1) Koloni bakteri *M. tuberculosis* H37Rv diperoleh dari BBLK, Surabaya di Jalan Karangmenjangan No. 18, Surabaya, Jawa Timur.
- 2) Serbuk Perikarp Manggis (*G. mangostana* L.) didapatkan dari UPT Materia Medika di Jalan Lahor No 87, Batu, Jawa Timur dengan keadaan geografis tanaman tumbuh pada curah hujan 256 mm/bulan, suhu rata-rata 23°C, suhu minimum 5°C, suhu maksimum 30°C, kelembaban 80, dan ketinggian 875 m dpl (di atas permukaan laut). Serbuk perikarp manggis dibeli sebanyak 100 gram pada tanggal 9 September 2014.
- 3) Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan etanol 96% dan remaserasi sebanyak satu kali selama 7 hari dengan tujuan supaya hasil ekstrak perikarp manggis yang didapatkan mengandung senyawa

fitokimia (meliputi tanin, polifenol, flavonoid, terpenoid, saponin, dan alkaloid) dan derivat *xanthone*, yakni *α -mangostin*.

- 4) Identifikasi *α -mangostin* dilakukan dengan menggunakan HPLC-MS/MS yang diukur berdasarkan berat molekul *α -mangostin* (410,46 g/mol) dan dilaksanakan di Laboratorium Analisa Instrumen, Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang.
- 5) Anti Ag85 yang digunakan adalah anti Ag85B berlabel biotin sesuai yang tertera pada protokol antibodi yang diperoleh.
- 6) Berdasarkan protokol anti Ag85 yang digunakan merupakan antibodi primer dengan tipe antibodi poliklonal yang berasal dari kelinci dimana dapat disimpan dalam -20°C selama 12 bulan. Anti Ag85 ini juga diperoleh dari *Bioss* dengan konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$.
- 7) Kadar protein filtrat kultur bakteri *M. tuberculosis* H37Rv ditentukan dengan menggunakan alat *Nanodrop spectrophotometer ND-1000* yang tersedia di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, Malang.
- 8) Analisis profil protein kultur filtrat bakteri *M. tuberculosis* H37Rv menggunakan metode SDS-PAGE dengan pewarnaan *Coomassie Blue* dan *Silver staining*. *Separating gel* yang digunakan adalah 12% untuk *Coomassie Blue* dan 15% untuk *silver staining*, sedangkan *stacking gel* menggunakan gel 4%. Analisis profil protein dilakukan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.
- 9) Uji spesifisitas Ag85 dilakukan dengan menggunakan metode *Dot Blotting* yang dilaksanakan di laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang dan pembacaan hasil dari uji spesifisitas

Ag85 akan dibaca dengan *ImageQuant LAS 500* yang ada di laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

- 10) Pengukuran intensitas pita protein Ag85 secara kuantitatif baik itu terhadap hasil SDS-PAGE pewarnaan *Coomassie Blue* maupun *Silver staining* dilakukan berdasarkan dari nilai *mean* pada *histogram* dengan menggunakan *Software Adobe Photoshop CS5*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengumpulan dan Persiapan Bahan

Serbuk perikarp manggis diperoleh dari Balai Materia Medika, Batu, Jawa Timur.

4.7.2 Ekstraksi Perikarp Manggis

- 1) Sebanyak 100 gram serbuk perikarp manggis ditimbang.
- 2) Dimaserasi dengan 750 mL etanol 96% pada suhu kamar selama 5 hari (setiap hari diaduk selama 30 menit dengan digunakan *overhead stirrer*), lalu disaring dengan kain flanel kemudian ditampung ke dalam toples kaca 1 L dan filtrat hasil maserasi diberi label "Maserasi 1".
- 3) Ampas dari hasil maserasi tadi diremaserasi (ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 200 ml kemudian diaduk selama 30 menit dengan *overhead stirrer*) pada suhu kamar selama 2 hari kemudian disaring dengan kain flanel, ditampung ke dalam toples kaca 1 L, dan filtrat hasil remaserasi 1 diberi label "Remaserasi 1".

- 4) Filtrat hasil maserasi 1 dan remaserasi 1 digabungkan menjadi satu kemudian pelarut dihilangkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C.
- 5) Ekstrak yang diperoleh diuapkan kembali dengan oven pada suhu 40°C untuk memperoleh ekstrak kental.

4.7.3 Uji Fitokimia Ekstrak Perikarp Manggis

4.7.3.1 Pembuatan Larutan Uji

- 1) Ditimbang 500 mg ekstrak kental perikarp manggis dengan neraca analitik.
- 2) Diukur 50 ml etanol 96% dengan gelas ukur 50 ml.
- 3) Dilarutkan ekstrak kental perikarp manggis tadi dengan etanol 96% dalam cawan porselen.
- 4) Cawan ditutup dengan aluminium foil untuk mencegah penguapan larutan ekstrak uji.

4.7.3.2 Pemeriksaan Alkaloid

- 1) Larutan ekstrak uji sebanyak 2 ml diuapkan di atas pembakar spiritus hingga didapat residu.
- 2) Residu kemudian dilarutkan dengan 5 ml HCl 2 N dimana HCl 2 N diperoleh dari hasil pengenceran HCl pekat (12 N).
- 3) Larutan yang didapat kemudian dibagi ke dalam 3 tabung reaksi.
 - 3.1) Tabung pertama ditambahkan dengan HCl 2 N yang berfungsi sebagai blanko.
 - 3.2) Tabung kedua ditambahkan pereaksi *Dragendoff* sebanyak 3 tetes. Kemudian akan terbentuk endapan berwarna jingga yang menunjukkan positif alkaloid dalam ekstrak perikarp manggis.

- 3.3) Tabung ketiga ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid.

4.7.3.3 Pemeriksaan Triterpenoid

- 1) Larutan uji sebanyak 2 ml diuapkan hingga menjadi residu diatas pembakar spiritus.
- 2) Residu yang diperoleh dilarutkan dalam 0,5 ml kloroform.
- 3) Ditambah dengan 0,5 ml asam asetat anhidrat.
- 4) Campuran ini ditetesi dengan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Bila terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut, maka menunjukkan adanya triterpenoid.

4.7.3.4 Pemeriksaan Saponin

- 1) Ekstrak uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- 2) Ditambahkan 10 mL air panas.
- 3) Didinginkan.
- 4) Dikocok kuat-kuat selama 10 detik sehingga terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm.

4.7.3.5 Pemeriksaan Flavonoid

- 1) Diambil larutan uji sebanyak 1 ml.
- 2) Ditambahkan dengan beberapa tetes HCl pekat dan beberapa butir serbuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna jingga sampai merah.

4.7.3.6 Pemeriksaan Tannin dan Polifenol

- 1) Diambil larutan ekstrak uji sebanyak 1 ml.

- 2) Direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%. Jika terjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tannin.

4.7.4 Identifikasi α -mangostin dengan HPLC MS/MS

- 1) Ditimbang sampel 0,1124 gram ekstrak perikarp manggis.
- 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 Bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dengan Media *Lowenstein Jensen*

- 1) Biakan *M. tuberculosis* H37Rv disemprotkan atau diinokulasikan pada media *Lowenstein Jensen*.
- 2) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 minggu.

4.7.6 Pembuatan Larutan Ekstrak Perikarp Manggis dan Garcia®

4.7.6.1 Pembuatan Larutan Ekstrak Perikarp Manggis

- 1) Dikalibrasi cawan porselen kosong.
- 2) Ditimbang 104,45 mg ekstrak perikarp manggis dengan neraca analitik.
- 3) Dilarutkan dengan sedikit aquadest hingga larut dalam cawan porselen.
- 4) Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
- 5) Ditambahkan aquadest hingga tanda batas (100 ml).
- 6) Dikocok hingga homogen.

4.7.6.2 Pembuatan Larutan Garcia® sebagai Pembanding

- 1) Dikalibrasi cawan porselen kosong.

- 2) Dikeluarkan serbuk Garcia® dari dalam cangkang kapsul dan dituang ke atas kertas perkamen bersih.
- 3) Ditimbang 104,45 mg serbuk pembanding (Garcia®) dalam cawan kosong dengan neraca analitik.
- 4) Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
- 5) Ditambahkan aquadest hingga tanda batas (100 ml).
- 6) Dikocok hingga homogen.

4.7.7 Filtrasi Larutan Ekstrak Perikarp Manggis dan Garcia®

4.7.7.1 Filtrasi Larutan Ekstrak Perikarp Manggis

- 1) Dimasukkan larutan ekstrak perikarp manggis ke dalam gelas beker.
- 2) Dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* untuk melarutkan sisa endapan larutan ekstrak perikarp manggis.
- 3) Difiltrasi dengan *membran filter 0,2 µm* yang telah dipasang dengan *spuit*.
- 4) Dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 ml sehingga diperoleh filtrat larutan ekstrak perikarp manggis.

4.7.7.2 Filtrasi Larutan Garcia® sebagai Pembanding

- 1) Dimasukkan larutan Garcia® ke dalam gelas beker.
- 2) Dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* untuk melarutkan sisa endapan larutan Garcia®.
- 3) Difiltrasi dengan *membran filter 0,2 µm* yang telah dipasang dengan *spuit*.
- 4) Hasil filtrasi dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 ml sehingga diperoleh filtrat larutan Garcia®.

4.7.8 Inokulasi *M. tuberculosis* H37Rv pada medium BACTEC-MGIT

4.7.8.1 Inokulasi *M. tuberculosis* H37Rv dari Media Lowenstein Jensen

- 1) Dimasukkan 4 ml *BBL Middlebrook 7H9* ke dalam *tube* steril berukuran 16,5 x 128 mm yang mengandung 8-10 *glass beads*.
- 2) Diambil biakan koloni bakteri *M. tuberculosis* H37Rv yang telah ditumbuhkan di medium *Lowenstein Jensen* dengan *loop* steril lalu disuspensikan koloni ke dalam media *Middlebrook 7H9*.
- 3) Dicampurkan suspensi dengan *vortex* selama 2-3 menit untuk memecah gumpalan besar. Sebaiknya suspensi harus mencapai 1,0 standar *McFarland*.
- 4) Didiamkan suspensi selama 20 menit.
- 5) Ditransfer cairan supernatan ke *tube* steril kedua lalu dibiarkan selama 15 menit.
- 6) Ditransfer cairan supernatan ke *tube* steril ketiga (sebaiknya cairan supernatan dalam keadaan halus dan bebas dari gumpalan lalu suspensi organisme > 0,5 standard *McFarland*).
- 7) Diatur suspensi hingga mencapai 0,5 standard *McFarland* secara visual dengan dibandingkan pada 0,5 standard turbiditas *McFarland*.
- 8) Dilarutkan 1 ml suspensi dalam 4 ml saline steril.
- 9) Dilakukan langkah yang sama (nomor 1-8) pada *tube* lainnya.

4.7.8.2 Pembuatan Medium BACTEC-MGIT dari Inokulum *M. tuberculosis* H37Rv

- 1) Secara aseptis, dimasukkan 0,8 ml *BACTEC-MGIT 960 SIRE Supplement* ke dalam masing-masing *tube* yang mengandung inokulum (suspensi organisme).
- 2) Dihomogenkan dengan *vortex*.

4.7.9 Perlakuan Ekstrak Perikarp Manggis dalam Medium BACTEC-MGIT

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

Tabel 4.1 Perlakuan Ekstrak Perikarp Manggis

Tabung	Variabel	Dosis (µg/ml)	Tiap tabung (berisi media MGIT + variabel)
A	Ekstrak Perikarp Manggis 1	3,125	7 ml
B	Ekstrak Perikarp Manggis 2	6,25	7 ml
C	Ekstrak Perikarp Manggis 3	12,5	7 ml
D	Kontrol - (tanpa perlakuan apapun)	-	7 ml
E	Kontrol + (Rifampin)	-	7 ml
F	Pembanding (Garcia®)	-	7 ml
G	Medium BACTEC-MGIT	-	7 ml

2) Tabung A, B, C (Larutan ekstrak perikarp manggis)

Tabung A : ditambahkan 3 µl larutan ekstrak perikarp manggis ke dalam *tube* yang mengandung medium BACTEC-MGIT + bakteri *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabung B : ditambahkan 6 µl larutan ekstrak perikarp manggis ke dalam *tube* yang mengandung medium BACTEC-MGIT + bakteri *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabung C : ditambahkan 12 µl larutan ekstrak perikarp manggis ke dalam *tube* yang mengandung medium BACTEC-MGIT + bakteri *M. tuberculosis* H37Rv.

3) Tabung D (kontrol negatif atau kontrol pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv).

Prosedur Pembuatan *Growth Control tube*:

- Secara aseptis, diambil suspensi organisme sebanyak 10^{-1} ml (100 µl) dengan mikropipet ke dalam 10 ml saline steril untuk menyiapkan larutan suspensi dengan perbandingan 1:100.
- Diinokulasi larutan suspensi kontrol pertumbuhan 1:100 sebanyak 0,5 ml ke dalam *tube* yang mengandung medium BACTEC-MGIT.

- Dicampurkan hingga homogen.
- 4) Tabung E (kontrol positif (Rifampin))

Prosedur:

- Secara aseptis, diambil larutan MGIT RIF yang memiliki konsentrasi 83 µg/ml sebanyak 100 µl.
 - Dimasukkan ke dalam *tube* yang mengandung medium BACTEC-MGIT.
 - Dicampurkan hingga homogen.
 - Ditunggu selama 48 hari.
- 5) Tabung F (Pembanding (Garcia®))
- Ditambahkan 6 µl larutan Garcia® dalam tabung F yang mengandung media BACTEC-MGIT + bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dan dihomogenkan.
- 6) Tabung G merupakan tabung yang berisi medium BACTEC-MGIT (tanpa penambahan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv).
- 7) Ketujuh tabung tersebut dikocok secara vertikal pada masing-masing *tube* sebanyak 3-4 kali.
- 8) Dimasukkan ketujuh tabung tersebut ke dalam BACTEC-MGIT *Instrument* dan diinkubasi pada suhu 37°C.
- 9) Dimonitoring tiap 60 menit untuk melihat adanya peningkatan *fluorescent*.
- 10) Ditunggu hingga menunjukkan hasil positif (10^5 - 10^6 CFU (*Colony Forming Unit*)/ml).

4.7.10 Pemanenan Hasil Kultur Bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dalam medium BACTEC-MGIT

- 1) Setelah menunjukkan hasil positif, dikeluarkan *tube* MGIT dari BACTEC-MGIT *Instrument*.

- 2) Dibawa ke *biological safety cabinet* (area yang memiliki *BSL (Bio-safety level) III practices and containment facilities*) dan disentrifugasi.
- 3) Diambil filtrat kultur bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dengan pipet transfer steril.
- 4) Dimasukkan ke dalam tabung *falcon*.
- 5) Ditutup dengan pita plastik khusus hingga rapat.

4.7.11 Penentuan Kadar Protein Filtrat Kultur *M. tuberculosis* H37Rv dengan *Nanodrop Spectrophotometer*

- 1) Disiapkan alat *Nanodrop spectrophotometer ND-1000* dan sampel filtrat kultur *M. tuberculosis* H37Rv.
- 2) Diambil 0,5-2 μ l sampel lalu diteteskan secukupnya pada *lower measurement pedestal*.
- 3) Ditutup *lower measurement pedestal*.
- 4) Ditunggu selama \pm 5 detik.
- 5) Dibuka software alat "ND-1000" lalu terlihat menu utama "ND-1000".
- 6) Dipilih jenis program pengukuran (*application module*) Protein A280.
- 7) Hasil kadar protein dapat terlihat dimonitor dalam bentuk kurva. Pengukuran protein dilakukan pada panjang gelombang 280 nm.
- 8) Lakukan hal yang sama untuk sampel berikutnya setelah terlebih dahulu dilakukan pembersihan dengan tisu (kering, lembut, dan bersih) pada *lower measurement pedestal*.

4.7.12 Pemekatan Filtrat Kultur Bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dengan Ammonium Sulfat

- 1) Disiapkan alat dan bahan untuk presipitasi sampel dengan ammonium sulfat yang terdiri dari *magnetic stirrer*, tabung *falcon*, tabung steril,

ammonium sulfat, labu erlenmeyer 100 ml, dan sampel filtrat kultur *M. tuberculosis* H37Rv.

- 2) Ditimbang ammonium sulfat sebanyak 27,089 gram untuk membuat larutan ammonium sulfat 45% dan dilarutkan dalam 50 ml aquadest. Sebaiknya ammonium sulfat dituang sedikit demi sedikit ke dalam aquadest steril selama dilarutkan dengan *magnetic stirrer* karena ammonium sulfat sulit larut dalam aquadest.
- 3) Dicampurkan 3 ml sampel filtrat kultur *M. tuberculosis* H37Rv dengan larutan ammonium sulfat sebanyak 2,45 ml untuk masing-masing perlakuan dalam tabung *falcon*.
- 4) Dikocok tabung *falcon* secara vertikal.
- 5) Dibiarkan semalaman dalam lemari es.
- 6) Diambil sampel filtrat kultur *M. tuberculosis* H37Rv yang telah disimpan dalam kulkas selama semalaman.
- 7) Disiapkan tabung steril yang telah diberi label A, B, C, D, E, F, dan G.
- 8) Dimasukkan sampel filtrat kultur *M. tuberculosis* H37Rv ke dalam masing-masing tabung steril (pengerjaan dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF)).
- 9) Jika didalam tabung *falcon* masih ada sedikit sampel filtrat kultur *M. tuberculosis* H37Rv, maka diambil dengan bantuan mikropipet.
- 10) Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C.
- 11) Diambil pellet dan ditambahkan PBS steril sebanyak volume awal (5 ml).
- 12) Dilakukan dialisa dengan membran selofan untuk memisahkan pengotor dengan ammonium sulfat.

- 13) Disimpan di dalam lemari es semalaman dalam larutan PBS dan distirrer pada suhu dingin.
- 14) Dialisat disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.
- 15) Supernatan diambil dan diresuspensi dengan buffer PBS sejumlah volume akhir yang diinginkan, yaitu 200 µl.
- 16) Hasil resuspensi dimasukkan ke dalam vial yang telah diberi label.

4.7.13 Analisis Profil Protein Ag85 dengan Metode SDS-PAGE Pewarnaan *Coomassie Blue* dan *Silver Staining*

4.7.13.1 Pembuatan Gel Elektroforesis 12% (untuk Pewarnaan *Coomassie Blue*)

- 1) Dibersihkan alat elektroforesis (*Casting frames* dan plat kaca) dengan alkohol yang disemprotkan.
- 2) Disusun alat elektroforesis secara rapi.
- 3) Disiapkan sampel dan *ependorf* yang diberi marker dengan label A, B, C, D, E, F, dan G.
- 4) Diambil sampel yang telah dipresipitaskan dengan ammonium sulfat sebanyak 10 µl dan dimasukkan ke dalam *ependorf* yang telah dilabeli tadi.
- 5) Ditambahkan 10 µl RSB ke dalam masing-masing *ependorf* yang telah mengandung sampel (perbandingan sampel:RSB = 1:1).
- 6) Dibuat *separating gel* 12% dan *stacking gel* 4% dalam gelas beker yang terpisah.

Komposisi *separating gel* 12%:

Tabel 4.2 Komposisi Bahan untuk Pembuatan *Separating Gel* 12%

Bahan	Volume Bahan
ddH ₂ O	6,8 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide	8 ml
1,5 M Tris (pH=8,8)	5 ml
10% (W/V) SDS	200 µl
ammonium persulfate (APS)	100 µl
TEMED	20 µl

Komposisi *stacking gel* 4%:

Tabel 4.3 Komposisi Bahan untuk Pembuatan *Stacking Gel* 4%

Bahan	Volume Bahan
ddH ₂ O	6,1 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide	1,3 ml
0,5 M Tris (pH=6,8)	2,5 ml
10% (W/V) SDS	100 µl
ammonium persulfate (APS)	75 µl
TEMED	10 µl

- 7) Setelah sampel ditambahkan RSB, selanjutnya dihomogenkan dengan *vortex* dan dipanaskan selama 15 menit dalam air panas (100°C).
- 8) Dimasukkan *separating gel* ke dalam celah antara plat kaca dengan *casting frames* lalu ditambahkan aquadest hingga penuh dan ditunggu hingga menjadi gel.
- 9) Setelah *separating gel* membeku, larutan aquadest yang tersisa dibuang lalu ditambahkan *stacking gel* hingga penuh dan ditunggu sampai menjadi gel.
- 10) Setelah *stacking gel* membeku, sampel dimasukkan ke dalam *well* atau sumuran gel.

Susunan sampel dalam gel:

G	F	E	D	C	B	A	Marker
---	---	---	---	---	---	---	--------

Marker yang digunakan adalah *marker protein broad range* (10 kDa-260 kDa).

- 11) Dimasukkan *running buffer*.
- 12) Dinyalakan *power elektroforesis* dengan arus 400 mA 200 V selama 45 menit.
- 13) Setelah sampel dan *marker* telah mencapai dasar elektroforesis, maka selanjutnya *power elektroforesis* dimatikan dan dilakukan prosedur pewarnaan gel elektroforesis dengan *Coomassie Blue*.

4.7.13.2 Pewarnaan Gel Elektroforesis dengan *Coomassie Blue*

- 1) Setelah *power elektroforesis* dimatikan, gel dipindahkan dari tank.
- 2) Dipindahkan *glass plate* dari gel kedua sisi.
- 3) Dituangkan larutan pewarna *Coomassie Blue* pada gel ke dalam wadah.
- 4) Ditunggu wadahnya dan diletakkan diatas *waterbath shaker* selama 15-30 menit.
- 5) Dipindahkan larutan pewarna dari gel dan disimpan dalam wadah lain untuk digunakan kembali.
- 6) Gel *didestaining* dengan *destaining buffer*.
- 7) Ditunggu hingga gel terlihat bersih selama semalam di dalam *waterbath shaker*.
- 8) Gel digambar pada plastik lalu diukur berat molekul pita protein pada pita antara 25 kDa-35 kDa.
- 9) Dihitung rumus interpolasi melalui *software microsoft Excel* sehingga diperoleh pita protein Ag85 dengan berat molekul 30 kDa.

Rumus interpolasi:

$$\text{Log BM sampel} = \frac{(\text{Rf}_{\text{kecil}} - \text{Rf}_{\text{sampel}})}{(\text{Rf}_{\text{kecil}} - \text{Rf}_{\text{besar}})} \times (\log \text{BM besar} - \log \text{BM kecil}) + \log \text{BM kecil}$$

4.7.13.3 Pembuatan Gel Elektroforesis 15% (untuk Pewarnaan *Silver Staining*)

- 1) Dibersihkan alat elektroforesis (*Casting frames* dan plat kaca) dengan alkohol yang disemprotkan.
- 2) Disusun alat elektroforesis secara rapi.
- 3) Dimasukkan aquadest ke dalam plat kaca untuk mengecek apakah ada kebocoran.
- 4) Dibuat *separating gel* 15% dan *stacking gel* 4% dalam gelas beker yang terpisah.

Komposisi *separating gel* 15%:

Tabel 4.4 Komposisi Bahan untuk Pembuatan *Separating Gel* 15%

Bahan	Volume Bahan
ddH ₂ O	2,4 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide	5 ml
1,5 M Tris (pH=8,8)	2,5 ml
10% (W/V) SDS	100 µl
ammonium persulfate (APS)	75 µl
TEMED	10 µl

Komposisi *stacking gel* 4% sama dengan yang tercantum pada tabel 4.3.

- 5) Dimasukkan *separating gel* ke dalam celah antara plat kaca dengan *Casting frames* lalu ditambahkan aquadest hingga penuh dan ditunggu hingga menjadi gel.
- 6) Disiapkan sampel filtrat kultur bakteri *M. tuberculosis* H37Rv (yang tidak dipresipitasi dengan ammonium sulfat) dengan dimasukkan ke dalam eppendorf yang telah diberi label A', B', C', D', F', dan G'.

Sampel = 5 µl

Aquadest = 5 µl

RSB = 10 µl

- 7) Ketiga komponen tersebut dihomogenkan dengan *vortex*.
- 8) Dipanaskan dalam panci yang berisi air panas (100°C) selama 10 menit.
- 9) Sampel yang telah dipanaskan didiamkan beberapa saat hingga dingin.
- 10) Setelah *separating gel* membeku, larutan aquadest yang tersisa dibuang lalu ditambahkan *stacking gel* hingga penuh dan ditunggu sampai menjadi gel.
- 11) Setelah *stacking gel* membeku, sampel dimasukkan ke dalam *well* atau sumuran gel.

Susunan sampel dalam gel:

Marker	A'	B'	C'	D'	F'	G'
--------	----	----	----	----	----	----

Marker yang digunakan adalah *marker protein low range* (1,7 kDa–40 kDa).

- 12) Dimasukkan *running buffer*.
- 13) Dinyalakan *power elektroforesis* dengan arus 400 mA/200 V selama 90 menit.
- 14) Setelah sampel dan *marker* telah mencapai dasar elektroforesis, maka selanjutnya *power elektroforesis* dimatikan dan dilakukan prosedur pewarnaan gel elektroforesis dengan *silver staining*.

4.7.13.4 Pewarnaan Gel Elektroforesis dengan Metode *Silver Staining*

- 1) Disiapkan alat dan bahan (seperti yang tercantum pada subbab 4.5.13.).
- 2) Dilakukan fiksasi selama 30 menit dengan menggunakan *waterbath shaker*.

Bahan:

- Etanol 12 ml
- Asam asetat glasial 3 ml

- Aquadest hingga 30 ml

Dihomogenkan dalam *magnetic stirrer* lalu dimasukkan ke dalam wadah yang berisi gel elektroforesis.

- 3) Dilakukan *sensitizing* selama 30 menit dengan menggunakan *waterbath shaker*.

Bahan:

- Etanol 9 ml
- Natrium tiosulfat 5% (w/v)* 1,2 ml

Cara pembuatan:

- Dimasukkan natrium tiosulfat sebanyak 0,5 gram ke dalam labu ukur 10 ml.
- Ditambahkan aquadest hingga 10 ml (mencapai tanda batas).
- Dikocok hingga homogen.
- Natrium asetat 2,04 gram
- Aquadest hingga 30 ml
- Glutaraldehid 25% (w/v)* 150 μ l

Keterangan:

* ditambahkan ke dalam larutan *sensitizing* yang sedang dihomogenkan paling akhir kira-kira 10 menit sebelum tahap fiksasi akan berakhir.

Selanjutnya, dicampurkan hingga homogen dengan *magnetic stirrer* lalu dimasukkan ke dalam wadah yang berisi gel.

- 4) Dilakukan *washing* 3 kali masing-masing selama 5 menit dengan menggunakan *waterbath shaker*.

Bahan: aquadest

- 5) Dilakukan *silver reaction* selama 20 menit dengan menggunakan *waterbath shaker*.

Bahan:

- Silver nitrat 25% (w/v) 3 ml
- Aquadest hingga 30 ml
- Formaldehid 37% (w/v) * 12 μ l

Keterangan: * Ditambahkan terakhir

Selanjutnya, bahan-bahan tersebut dicampurkan hingga homogen dengan *magnetic stirrer* lalu dimasukkan ke dalam wadah yang berisi gel.

- 6) Dilakukan *washing* 2 kali masing-masing 1 menit dengan menggunakan *waterbath shaker*.

Bahan : aquadest

- 7) Dilakukan *developing* selama 2-5 menit dengan cara digoyang-goyangkan wadah yang berisi gel.

Bahan:

- Na₂CO₃ 0,75 gram
- Aquadest hingga 30 ml
- Formaldehid 37% (w/v)* 6 μ l

Keterangan: * ditambahkan terakhir

Selanjutnya, dicampurkan dengan *magnetic stirrer* hingga homogen lalu dimasukkan ke dalam wadah yang berisi gel.

- 8) Dilakukan *stopping* selama 10 menit dengan cara digoyang-goyangkan wadah yang berisi gel.

Bahan:

- EDTA 0,438 gram

- ddH₂O hingga 30 ml

Kedua bahan tersebut dilarutkan dengan *magnetic stirrer* hingga homogen lalu ditambahkan ke dalam wadah yang berisi gel.

- 9) Dilakukan *washing* selama 5 menit dengan digoyang-goyangkan wadah yang berisi gel.

Bahan: aquadest

- 10) Disimpan dalam H₂O 4°C.
- 11) Digambar gel pada plastik lalu diukur berat molekul pita protein Ag85 (30 kDa) pada pita *marker* antara 25 kDa-40 kDa dengan penggaris.
- 12) Dihitung rumus interpolasi melalui *software microsoft Excel* sehingga diperoleh pita protein Ag85 dengan berat molekul 30 kDa.

Rumus interpolasi:

$$\text{Log BM sampel} = \frac{(\text{Rfkecil} - \text{Rfsampel})}{(\text{Rfkecil} - \text{Rfbesar})} \times (\log \text{BM besar} - \log \text{BM kecil}) + \log \text{BM kecil}$$

4.7.14 Uji Spesifisitas Ag85 dengan Metode Dot Blot

4.7.14.1 Pembuatan Larutan *Tris Base Solution* (TBS)

- 1) Ditimbang *tris base solution* sebanyak 1,212 gram dan dimasukkan ke dalam gelas beker.
- 2) Ditambahkan NaCl sebanyak 2,336 gram.
- 3) Ditambahkan aquadest steril kurang dari 200 ml (karena pH larutan akan disesuaikan terlebih dahulu).
- 4) dilarutkan dengan *magnetic stirrer* hingga terlarut sempurna dan homogen.
- 5) pH larutan disesuaikan hingga mencapai pH 7,4 (karena pada awalnya larutan memiliki pH diatas 7,4, maka ditambahkan HCl hingga mencapai pH 7,4).

- 6) Ditambahkan aquadest steril hingga 200 ml dan dicampurkan dengan magnetic stirrer hingga homogen.
- 7) Diperoleh larutan TBS dengan pH 7,4.

4.7.14.2 Pengujian Spesifisitas Protein Ag85 *M. tuberculosis* H37Rv dengan Metode Dot Blot

- 1) Dibuat larutan TBS.
- 2) Dilakukan pengenceran sampel dan mapping dot blot (lampiran 5)

Untuk protein Ag85:

- Pengenceran 1x

3 sumuran $\rightarrow 3 \times 50 \mu\text{l} = 150 \mu\text{l}$

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

$$\frac{1}{2} = \frac{y}{150}$$

Sampel (y) = 75 μl

Larutan TBS yang ditambahkan = 150 $\mu\text{l} - 75 \mu\text{l} = 75 \mu\text{l}$

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

$$\frac{1}{4} = \frac{y}{150}$$

Sampel (y) = 37,5 μl

Larutan TBS yang ditambahkan = 150 $\mu\text{l} - 37,5 \mu\text{l} = 112,5 \mu\text{l}$

- 3) Penyiapan membran nitroselulosa dan penyusunan alat dot blot.

Prosedur:

- Dipotong membran nitroselulosa dengan ukuran 12 x 8 cm.
- Dicuci membran nitroselulosa dengan larutan TBS.
- Disusun alat dot blot dan membran nitroselulosa diletakkan diantara bagian atas dan bawah alat dot blot.
- Bagian atas alat dot blot ditutup dan dirapatkan.

- Dipasang pompa udara pada bagian samping alat dot blot.
- 4) Dimasukkan masing-masing sampel ke dalam alat dot blot sesuai dengan mapping yang ditentukan.
- 5) Ditambahkan larutan *skim milk* yang telah dicampurkan dengan TBS ke dalam alat dot blot sebanyak 50 μ l.
- 6) Alat dot blot ditutup dengan aluminium foil.
- 7) Didiamkan selama 18 jam (semalam) pada suhu 4°C.
- 8) Dimasukkan masing-masing antibodi primer ke dalam tiap-tiap well pada alat dot blot.
- 9) Dihitung volume antibodi sekunder *antirabbit* label biotin dan TBS yang diambil.

Untuk 3 antibodi primer (Ag85, CFP-10, dan ESAT-6):

24 well x 3 antibodi = 72 x 50 μ l TBS-antibodi sekunder

= 3600 μ l (dibulatkan menjadi 4000 μ l (4 ml))

Berdasarkan datasheet yang ada, perbandingan antibodi sekunder dengan larutan TBS adalah 1:1000 sehingga

volume larutan TBS yang diambil = 4000 μ l (4 ml)

volume antibodi sekunder *antirabbit* label biotin = 4 μ l

- 10) Dibuat larutan TBS-antibodi sekunder *antirabbit* label biotin.

Cara pembuatan:

- Diambil antibodi sekunder *antirabbit* label biotin sebanyak 4 μ l.
- Dimasukkan ke dalam tabung *falcon* yang mengandung larutan TBS.
- Dicampurkan dengan *vortex* hingga homogen.

- 11) Setelah dimasukkan antibodi primer, diinkubasi sampel yang telah dicampur dengan antibodi primer selama 1 jam dan ditutup dengan aluminium foil pada suhu ruang.
- 12) Dimasukkan TBS-Tween 0,05% ke dalam masing-masing *well* pada alat dot blot.
- 13) Digoyang selama 3 menit dengan *waterbath shaker*.
- 14) Dikeluarkan larutan dengan membalik diatas tisu.
- 15) Langkah nomor 12-14 diulangi lagi sebanyak 2 kali.
- 16) Dimasukkan antibodi sekunder *antirabbit* label biotin di *well* 1-3 (untuk Ag85) masing-masing sebanyak 50 μ l.
- 17) Diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dan alat dot blot ditutup dengan aluminium foil.
- 18) Dicuci dengan larutan TBS-Tween 0,05% sebanyak 3 x 3 menit (dilakukan langkah nomor 12-14 sebanyak 3 kali).
- 19) Dimasukkan SA-HRP sebanyak 50 μ l ke dalam masing-masing *well*.
- 20) Diinkubasi selama 45 menit di suhu ruang.
- 21) Dilakukan langkah nomor 12-14 sebanyak 3 x 3 menit.
- 22) Diambil membran nitroselulosa dari alat dot blot.
- 23) Membran nitroselulosa diletakkan diatas baki.
- 24) Ditambahkan substrat peroksida-luminol (1:1) ke atas permukaan membran nitroselulosa hingga merata lalu ditempelkan dengan substrat peroksida-luminol yang telah disemprotkan secara merata di atas baki (pada sisi membran lainnya).
- 25) Ditunggu selama \pm 5 menit.

Keterangan: langkah nomor 22-25 dilakukan dalam keadaan gelap.

4.7.15 Pembacaan Hasil Dot Blot dengan *ImageQuant LAS 500*

- 1) Setelah didiamkan selama ± 5 menit, membran nitroselulosa dipindahkan ke atas *tray* pembaca *ImageQuant LAS 500*.
- 2) Pada alat *ImageQuant LAS 500*, dipilih *chemiluminescence* lalu ditunggu sebentar (± 1 menit) hingga muncul hasil pembacanya.
- 3) Dicoba lagi pembacaan hasil dot blot dengan dipilih *chemiluminescence* lalu diklik marker *colorimetric* hingga muncul tanda centang “√” kemudian dibaca hasilnya.
- 4) Hasil pembacaan (visualisasi) dengan *ImageQuant LAS 500* dianalisis secara kuantitatif berdasarkan intensitas dot melalui *software alat ImageQuant TL*.
- 5) Hasil analisa dengan *software ImageQuant TL* disalin ke *Microsoft excel* sehingga diperoleh hasilnya dalam bentuk tabel.

4.8 Analisis Data

Data yang diambil berupa kadar protein Ag85 yang disekresikan. Data tersebut diambil setelah dilakukan metode SDS-PAGE yang disajikan dalam bentuk tabel sesudah dihitung intensitas pita protein Ag85 dengan menggunakan *Adobe Photoshop CS5*. Analisis data dilakukan pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Hal ini dilakukan dengan cara membandingkan intensitas pita protein antara kelompok perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan kelompok kontrol (negatif, positif, pembanding, dan medium BACTEC-MGIT) untuk mengetahui dosis *α -mangostin* dalam ekstrak perikarp manggis yang paling efektif menghambat sekresi protein Ag85 *M. tuberculosis* H37Rv pada berat molekul 30 kDa. Bila sebaran data normal dan varian data sama atau homogen ($p > 0,05$)

maka digunakan uji hipotesis *One Way ANOVA*. Sebaliknya, jika tidak sama ($p < 0,05$) maka digunakan uji *Kruskal Wallis*.

Kemudian dilakukan juga uji korelasi Pearson untuk mengetahui adanya hubungan pada sekresi protein Ag85 dari masing-masing perlakuan dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p=0,05$). Jika diperoleh $p>0,05$, maka tidak ada hubungan antar perlakuan. Namun, bila didapatkan $p<0,05$, maka ada hubungan antar perlakuan. Selain dianalisis dengan statistika, data-data yang dihasilkan juga akan dianalisis dengan menggunakan rumus interpolasi. Hal ini dilakukan untuk memastikan berat molekul protein Ag85 yang dapat dihambat oleh ekstrak perikarp manggis terletak pada 30 kDa atau mendekati berat molekul protein Ag85 yang sebenarnya.



4.9 Alur Penelitian



