

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Eksperimen dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan September-Desember 2013.

4.2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional
Urea	Suatu senyawa organik dengan rumus kimia $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. Molekulnya memiliki dua kelompok $-(\text{NH}_2)$ yang berikatan dengan kelompok fungsional karbonil ($\text{C}=\text{O}$).
Denaturasi protein	Perubahan pada suatu bentuk protein melalui berbagai bentuk tekanan (<i>stress</i>) eksternal. Proses ini meliputi desrupsi atau bahkan destruksi, baik struktur sekunder maupun tersier. Namun, ikatan peptida struktur primer asam amino tetap intak.
Kemurnian protein	Suatu penentuan yang selalu melibatkan pengukuran kuantitas tipe-tipe tertentu dari ketidakmurnian, atau menunjukkan ketiadaannya (Rhodes dan Laue, 2009).

4.3. Bahan dan Alat Penelitian

4.3.1. Alat Penelitian

Alat sentrifugasi, alat sonikasi, eppendorf, kolom spin yang berisi Ni-NTA, kuvet, tabung sentrifugasi, tabung sentrifugasi, *shaking incubator*, piringan kaca, tisu, pengapit, *teflon sample application comb*, *micro pipet*, *White*, *blue*, dan *yellow tip*, kertas filter.

4.3.2. Bahan Penelitian

- **LEW (Lysis Equilibration Wash) Buffer (1x LEW Buffer, 1 liter)**
 - i. 50 mM NaH_2PO_4 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (BM = 156,01 g/mol)
 - ii. 300 mM NaCl 17,5 g NaCl (BM = 58,44 g/mol)
 - iii. pH diatur hingga mencapai 8.0 menggunakan NaOH
- **Denaturing Solubilization Buffer (1x Buffer, 1 liter) :**
 - i. 50 mM NaH_2PO_4 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (BM = 156,01 g/mol)
 - ii. 50 mM NaCl 7,5 g NaCl (BM = 58,44 g/mol)
 - iii. 8 M urea 480,5 g (BM = 60,06 g/mol)
 - iv. pH diatur hingga 7,4 menggunakan NaOH
- **Wash Buffer :**
 - i. 20 mM Tris-HCl
 - ii. 0,5 M NaCl
 - iii. 20 mM imidazol
 - iv. 8 M urea
 - v. 1 mM 2-mercaptoethanol
 - vi. pH 8.0
- **Denaturing Elution Buffer (1x Buffer, 1 liter) :**
 - i. 50 mM NaH_2PO_4 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (BM = 156,01 g/mol)
 - ii. 300 mM NaCl 17,5 g NaCl (BM = 58,44 g/mol)

- iii. 8 M urea 480,5 g (BM = 60,06 g/mol)
- iv. 250 mM imidazol 17,0 g imidazol (BM = 68,08 g/mol)

○ **SDS-PAGE**

- *Cleaning solution* PCC-54 2%
- H₂O yang didistilasi
- Metanol
- *Resolving gel*
- TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine).
- Solusi isopropanol
- *Running buffer*
- *Bromophenol blue*

4.4. Metode

Penelitian ini digunakan untuk meningkatkan kemurnian protein Ag 38 dari *M. tuber-culosis* yang optimum sehingga dapat dikembangkan sebagai agen serodiagnostik.

Berikut adalah prosedur-prosedur purifikasi protein :

1. Isolasi *Inclusion bodies* :
 - i. Resuspensi 1 gram pellet, *wet cells* dalam 5 ml LEW *Buffer* (tanpa denaturan) pada es, diaduk dengan pipet.
 - ii. Menambahkan lisozim pada konsentrasi akhir 1 mg/ml, aduk solusi pada es selama 30 menit.
 - iii. Mensonikasi suspensi pada es (10 x 15 detik dengan jeda 15 detik antarsonikasi)
 - iv. Mensentrifugasi lisis mentah 10.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C untuk mengumpulkan *inclusion bodies*. Simpan pellet dalam es.

2. Solubilisasi *inclusion bodies*

- i. Meresuspensi per gram pellet dengan 10 ml LEW *buffer* untuk mencuci *inclusion bodies*.
- ii. Mensentrifugasi suspensi 10.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C
- iii. Resuspensi pellet dalam 2 ml *Denaturing Solubilization Buffer* per gram *wet cells* untuk mensolubilisasi *inclusion bodies*. Homogenisasi atau sonikasi mungkin diperlukan untuk resuspensi pellet. Melarutkan *inclusion bodies* dengan diaduk pada es selama 60 menit.
- iv. Sentrifugasi 10.000 g selama 30 menit pada suhu 20°C untuk menghilangkan material yang tidak larut.
- v. Menyaring supernatan dengan filter 0.45 µm

3. Renaturasi *inclusion bodies*

- i. Dimulai dengan meneteskan *wash buffer* ke pellet sebanyak 2 ml, kemudian diaduk dengan mikropipet selama 2 menit. Lalu didiamkan selama 30 menit.
- ii. Mengulangi langkah yang sama untuk konsentrasi urea yang lebih rendah hingga mencapai konsentrasi urea akhir (0 M).

Analisis

Aggregation state dan kemurnian protein rekombinan (histidin)₆-*tagged refolded* yang dielusikan dengan HiTrap *Chelating* HP dicek menggunakan filtrasi gel pada Superdex 75 HR 10/30 dan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Elektroforesis memisahkan biomolekul yang telah di-charge berdasarkan tingkat migrasi pada bidang elektrik teraplikasi. Berikut adalah protokol SDS-PAGE (Simpson, 2008) :

- Peletakkan papan gel
 - (a) Membersihkan piringan kaca
 - (i) Merendam piringan kaca dalam *cleaning solution* PCC-54 2% selama 3-24 jam
 - (ii) Membasuh piringan tersebut dengan air mengalir dan sekali menggunakan H₂O yang dididilasi
 - (iii) Mengeringkan piringan kaca dengan tisu bersih lalu menggunakan *Kimwipe* yang telah dibasahi dengan metanol. Selanjutnya, piringan kaca tersebut diangin-anginkan.
 - (b) Pemasangan unit *gel-casting*
 - (i) Membentuk lapisan-lapisan gel dengan memasang penyekat dan dua piringan kaca pada pengapit (*clamp*).
 - (ii) Meluruskan bagian dasar penyekat dan dua piringan kaca pada posisi yang sama, dan kemudian dirapatkan (*clamp*).
 - (iii) Meletakkan lapisan-lapisan gel pada *casting stand*.
 - (iv) Memasukkan *Teflon sample application comb*, dan menandainya pi-aringan kaca pada level ~ 1.0-1.5 cm di bawah dasar *comb teeth*.
 - (c) Menuangkan *resolving gel*
 - (i) Menyiapkan campuran *resolving gel* yang tepat kemudian memasti-kan bahwa solusi telah tercampur dengan baik sebelum menambah-kan TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine).
 - (ii) Memindahkan campuran ke lapisan-lapisan piringan kaca pada permukaan yang telah ditandai dengan menggunakan pipet 10 ml.

- (iii) Melapisi piringan kaca tersebut secara cermat dengan gel menggunakan *~2-mm-deep layer* H₂O atau *n*-butanol H₂O-tersaturasi atau solusi isopropanol.
- (iv) Setelah polimerasi selesai (kira-kira 30 menit), menuangkan H₂O, dan membuang cairan yang tersisa dengan kertas filter tanpa merusak gel tersebut. Jika gel terlapisi oleh *n*-butanol (atau isopropanol), maka diperlukan pengeringan cairan yang melapisinya, dan membilas permukaan gel dengan H₂O.
- (d) Menuangkan *stacking gel*
- (i) Memilih konsentrasi *acrylamide* untuk *stacking gel*, lalu membuat campuran yang tepat.
 - (ii) Menuangkan *resolving gel* dengan solusi *stacking gel* secara hati-hati hingga ketebalan *stacking gel* mencapai 2.0-3.0 cm.
 - (iii) Memasukkan *Teflon comb* ke dalam solusi hingga mencapai jarak 1.0-1.5 cm antara ujung atas *resolving gel* dan pangkal dari *comb*. Kemudian, memastikan bahwa tidak ada gelembung udara di sela-sela *comb*.
 - (iv) Campuran *stacking gel* akan berpolimerisasi sekitar 2 jam. Indeks refraktif akan berubah pada sekeliling *comb* yang mengindikasikan bahwa gel telah terset.
- (e) *Sample comb* dipisahkan dari *stacking gel* secara hati-hati, dan memasangkannya pada kaset di *electrophoresis apparatus*, tergantung pada instruksi manufaktur.
- (f) Reservoar permukaan dituangi hingga penuh oleh *running buffer*.

- Preparasi sampel
 - (g) Mempersiapkan solusi protein:
 - (i) Mencampurkan solusi protein dengan cairan penyangga (*buffer*) sampel 2X SDS-PAGE dengan rasio 1:1 untuk hasil *binding*, *washing*, dan elusi. Sedangkan supernatan dilakukan pengenceran terlebih dahulu dengan perbandingan 1:10 (2 μ l supernatan + 20 μ l PBS), lalu ditambahkan RBS dengan perbandingan 1:1.
 - (ii) Memanaskan sampel pada blok pemanas (*heat block*) selama 4 menit dengan temperatur 95°C untuk mendenaturasi protein dan memastikan bahwa jumlah maksimum SDS berikatan dengan protein. Mendinginkan sampel pada temperatur ruangan, kemudian diaduk dengan menggunakan vortex.
 - *Running* papan gel diskontinyu
 - (h) Mengisikan sampel ke dalam *sample well* dengan menggunakan pipet dan *gel loading-pipette tips*.
 - (i) Menghubungkan sumber energi listrik pada *electrophoresis apparatus* dengan anoda (+) yang dihubungkan dengan reservoir dasar dan katoda (-) pada reservoir bagian atas.
 - (j) Mengalirkan voltase konstan 200 V pada temperatur ruangan, melewati gel hingga permukaan depan pengecatan Bromophenol Blue mencapai dasar gel. Ini akan memakan waktu 30 menit.
 - (k) Mematikan sumber listrik dan melepas elektroda-elektroda. Membuang *gel plates* dari *apparatus*, dan dengan hati-hati

melepas penyekat. Untuk membongkar *gel plates* diperlukan penyekat, membiarkan gel melekat pada satu *plate*.

- (1) Memvisualisasi protein-protein menggunakan pengecatan yang sesuai.

