

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorik secara *in vitro* yakni, menguji potensi ekstrak perikarp manggis dalam menghambat ekspresi protein 38 kDa pada *M. tuberculosis* H37Rv. Desain penelitian yang digunakan adalah *post-test only*. Pengujian potensi perikarp manggis terhadap sekresi protein 38 kDa dilakukan dengan metode SDS-PAGE dan *Dot Blot*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

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

4.3 Sampel penelitian

Pada penelitian ini menggunakan sampel isolate *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv yang diperoleh dari Laboratorium BBLK Surabaya. Isolate ditumbuhkan dalam medium Lowenstein Jensen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 minggu kemudian dibiakan dalam medium cair BACTEC MGIT selama 7 hari.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak perikarp manggis dengan variasi konsentrasi 3,215 µg/ml; 6,25 µg/ml; dan 12,5 µg/ml berdasarkan kadar *α-mangostin* yang didapatkan melalui HPLC-MS/MS.

4.4.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi protein 38 kDa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat dan Bahan Maserasi

Alat :Cawan porselen, sendok tanduk, gelas ukur, corong, pipet tetes, maserator, beaker glass, pipet ukur, alumunium foil, pastik wrap, pot/vial, stirrer, neraca analitik dan *rotary evaporator*

Bahan : Serbuk perikarp manggis 500 mg dan etanol 96%

4.5.2 Alat dan Bahan Uji Fitokimia Ekstrak Perikarp Manggis

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

Bahan :ekstrak perikarp manggis, etanol 96%, HCl 2N, pereaksi dragendoff, pereaksi meyer, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, FeCl₃, HCl pekat, serbuk Mg

4.5.3 Alat dan Bahan Uji Kuantitatif HPLC-MSMS Ekstrak Perikarp Manggis

Alat : HPLC MS/MS

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

4.5.4 Alat dan Bahan Kultur *M. tuberculosis* dengan Media Lowenstein Jensen

Alat : Neraca analitik, Gelas ukur 10 ml dan 100 ml, gelas beker 1 L, autoklaf, tabung *screw-cap test* steril atau tabung steril bertutup ulir, oven, *inspisator*, pipet tetes, pipet volum 10 ml dan *refrigerator*..

Bahan : Medium Lowenstein Jensen, aquabidestilata, gliserol, suspensi telur bebek segar dan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv.

4.5.5 Alat dan Bahan inokulasi *M. tuberculosis* H37Rv dalam medium MGIT dan Perlakuan Ekstrak serta kontrol.

Alat : BACTEC MGIT *instrument monitors tubes*. Neraca analitik, gelas ukur 50 ml dan 100 ml, mikropipet, gelas beker 200 ml, autoklaf, batang pengaduk, oven, tabung kaca, *incubator*, vortex, cawan porselen, pipet volum 1 ml, labu ukur 100 ml.

Bahan : *Bovine albumin*, Dextrose, Catalase, *Oleic Acid*, ekstrak perikarp manggis, Garcia dalam sediaan kapsul, kertas perkamen, hasil biakan *M. tuberculosis* H37Rv dari media Lowenstein Jensen.

4.5.6 Alat dan Bahan Pemekatan Protein Metode Ammonium Sulfat (AMS)

Alat : Neraca analitik, tabung falcon, sentrifugasi, mikropipet, lemari es, bakker glass, stirrer dan tabung Erlenmeyer.

Bahan : Serbuk ammonium sulfat, aquadest, PBS dan membrane dialisa/selofan.

4.5.7 Alat dan Bahan Analisis SDS-PAGE

Alat : cetakan (*casting frames*), *beaker glass*, plat kaca, sumuran sel buffer, pipet tetes, perangkat *elektroforesis* (elektroda dengan *power*).

Bahan : H₂O, Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0,8% W/V), 1,5 M Tris (PH=8,8), 10% (W/V) SDS, 10% (W/V) ammonium persulfate (AP), TEMED, Acrylamide 6%, protein marker, beta mercaptoetanol, *coomassie blue* dan metanol-asetat.

4.5.8 Alat dan Bahan pewarnaan *Silver staining*

Alat : labu Erlenmeyer, labu ukur 100 ml dan 50 ml, mikropipet, shaker.

Bahan : Etanol, asam asetat glacial, aquadest, Na tiosulfat 5%, Na asetat, glutaraldehid 25%, silver nitrat 25%, Formaldehid 37%, Na₂CO₃, EDTA, ddH₂O.

4.5.9 Alat dan Bahan Dot Blot

Alat : Membran nitroselulosa, alat Dot Blot, Erlenmeyer, mikropipet, magnetic stirrer, aluminium foil, alat shaker, tissue, vortex.

Bahan : Tris base solution, NaCl, aquadest, antibodi primer antigen 38 kDa (merk Abcam), antibodi sekunder antimouse label biotin, SA-HRP, TBS tween 0,05%, skim milk TBS.

4.6 Definisi Operasional

- a) Koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya. Jl. Karangmenjangan no 18 Kota Surabaya. Koloni *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ditumbuhkan pada medium padat *Lowenstein Jensen*.
- b) Serbuk perikarp manggis (*Garcinia mangostana* L.) diperoleh dari UPT Materia Medika, Batu Malang Serbuk perikarp manggis berupa serbuk kering sebanyak 500 gram.
- c) Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan remaserasi sebanyak satu kali dengan tujuan agar hasil ekstrak yang didapatkan mengandung senyawa fitokimia dan α -mangostin yang diinginkan dapat tersari seefektif mungkin.
- d) Ekstrak perikarp manggis merupakan hasil ekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan perikarp manggis yang telah dikeringkan dan dihaluskan.
- e) Metode HPLC-MS/MS dilakukan untuk mengukur kadar senyawa α -mangostin pada ekstrak perikarp manggis secara kuantitatif dengan menggunakan standar α -mangostin. Prinsip kerja HPLC-MS/MS yaitu

memisahkan beberapa senyawa berdasarkan kepolaran, berat molekul dan muatan ion.

- f) Medium pertumbuhan *M. tuberculosis* H37Rv menggunakan media cair Middlebrook 7H9 yang dimodifikasi yaitu *Mycobacterial Growth Index* (MGIT). Pada media ini terdapat indikator yang akan berfluorosensi jika kadar oksigen menurun sebagai akibat pertumbuhan Mtb dan tingkat fluorosensi diukur secara otomatis.
- g) Metode *Nano Drop Spectrophotometer* dilakukan untuk mengetahui kadar protein yang terkandung dalam filtrate kultur *M. tuberculosis* sebelum dilakukan metode elektroforesis SDS-PAGE.
- h) Pemekatan Ammonium sulfat (AMS) bertujuan untuk mengendapkan protein dan memisahkan protein dari media pelarut MGIT.
- i) Metode elektroforesis SDS-PAGE dilakukan untuk mengetahui profil protein dalam filtrate kultur. Metode ini menggunakan *separating gel* 15% dan 12% serta *stacking gel* 4% dengan pewarnaan *coomassie blue* dan *silver staining*.
- j) Metode Dot blot dilakukan dengan merangkai membrane nitroselulosa pada alat *Bio Dot Apparatus Bio Rad*. Pembacaan metode Dot blot menggunakan alat LAS ImageQuant 500 dan dianalisa secara *chemiluminescence* berdasarkan reaksi antara antibodi sekunder konjugasi HRP dengan substrat peroksida : luminol (1:1) sehingga terjadi reaksi yang menghasilkan pendaran cahaya dan terdeteksi sebagai sinyal oleh alat LAS ImageQuant 500. Semakin besar sinyal menunjukkan bahwa kadar antigen atau protein semakin tinggi.

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 Estraksi Perikarp Manggis

1. Sebanyak 100 gram serbuk perikarp manggis ditimbang
2. Dimaserasi dengan 750 mL ethanol 96% pada suhu kamar selama 5 hari, lalu disaring.
3. Ampas diremaserasi dengan menggunakan 150 mL ethanol 96% pada suhu kamar selama 2 hari, lalu disaring.
4. Ekstrak yang didapat selanjutnya digabungkan dan disaring menggunakan kertas saring, 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

(Dewi *dkk.*, 2013).

4.7.3 Uji Fitokimia Ekstrak

1 Pembuatan larutan Uji

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

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 *dkk.*, 2013).

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 *dkk.*, 2013).

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 *dkk.*, 2013).

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 (Sitorus, 2010).

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 *dkk.*, 2013).

4.7.4 Identifikasi α -mangostin dengan HPLC- MS/MS

1. Ditimbang sampel 0,1124 gram ekstrak etanol 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

4.7.5. Kultur *M. tuberculosis* H37Rv dengan Media Lowenstein Jensen

- 1) Disiapkan media 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 4 minggu.

4.7.6. Inokulasi *M. tuberculosis* H37Rv pada medium MGIT

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 lain dengan penutup dan biarkan selama 15 menit.
 - 6) Transfer cairan supernatant ke tube sterile 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 sterile .
- 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 Perlakuan Ekstrak Perikarp Manggis, Rifampin dan Garcia

4.7.7.1 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 sehingga diperoleh larutan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 6,25 µg/ml.

4.7.7.2 Pembuatan Larutan Rifampin pada Medium MGIT

1. Secara aseptis tambahkan 0,8 ml suplemen **BACTEC MGIT SIRE** pada tube berisi kontrol positif.
2. Pipet menggunakan mikropipet 100 µl dari 83 µg/ml larutan MGIT RIF (Rifampin) hingga konsentrasi akhir dalam medium MGIT sebesar 1,0 µg/ml.

4.7.7.3 Pembuatan Larutan Garcia

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 sehingga diperoleh larutan Garcia dengan kadar 6,25 µg/ml.

4.7.8 Perlakuan Ekstrak Perikarp Manggis, Rifampin, Garcia dan Kontrol dalam Media MGIT

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

Variabel		Dosis (µg/ml)	Tiap tabung (Berisi media MGIT + ekstrak)
A	Ekstrak 1	3,125	7 ml
B	Ekstrak 2	6,25	7 ml
C	Ekstrak 3	12,5	7 ml
D	kontrol (+) Rifampin	1,0	7 ml
E	Kontrol (-)	-	7 ml
F	Pembanding (Garcia)	6,25	7 ml
G	Medium MGIT	-	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 Garcia sebesar 6,25 µg/ml dalam tabung F yang telah ditambahkan **BACTEC MGIT SIRE Supplement**.

4.7.9 Pengukuran Kadar Protein pada filtrat kultur menggunakan **Nano**

Drop Spectrophotometer

1. Persiapan sampel yang akan diukur kadar proteinnya
2. Ambil 0,5-2 µL sampel
3. Teteskan sampel secukupnya pada *lower measurement pedestal* pada alat *Nano Drop Spectrophotometer*.
4. Tutup *lower measurement pedestal* dan tunggu selama kurang lebih 5 detik.
5. Hasil kadar protein dapat terlihat di monitor dalam bentuk kurva dan pengukuran dipilih jenis protein A-280 dengan panjang gelombang 280 nm.
6. Lakukan hal yang sama untuk sampel berikutnya setelah terlebih dahulu dilakukan pembersihan pada *lower measurement pedestal*.

4.7.10 Pemekatan Protein Metode Ammonium Sulfat (AMS)

1. Ditimbang ammonium sulfat 27,089 gram untuk membuat larutan ammonium sulfat 45% dan dilarutkan dalam 50 ml aquadest
2. Dibuat setengah formula dari perhitungan, sehingga ditimbang 27,089 gram dalam 50 ml aquadest

3. Dicampurkan volume sampel protein 3 ml dan larutan AMS sebanyak 2,45 ml untuk masing –masing perlakuan dalam falcon
4. Dikocok manual tabung falcon dan dibiarkan semalaman dalam lemari es
5. Sentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 15 menit dan suhu 4 °C
6. diambil pellet dan ditambahkan PBS steril sebanyak volume awal (5 ml)
7. dilakukan dialisa dengan membrane selofan (untuk memisahkan pengotor dengan AMS) dan disimpan di lemari es semalaman
8. dialisat disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C
9. supernatan diambil dan diresuspensi dgn buffer PBS sebesar 200 µl
10. Jika akan dilakukan prosedur SDS-PAGE maka, diambil 10 µl sampel (diambil dari 200 µl) dan ditambahkan RSB 10 µl (perbandingan 1:1).

4.7.11 Analisa Profil Protein dengan Metode SDS-PAGE

1. Pembuatan *separating gel*

- Mengatur cetakan atau tempat penuangan (*Casting frames*)
- Siapkan larutan gel dalam beaker yang terpisah. *Separating gel* yang digunakan adalah 15% dan 12%. *Beikut komposisi separating gel :*

Tabel 4.1 Komposisi Bahan untuk Pembuatan *Separating Gel* 12% dan 15%

Bahan	Komposisi Gel 15%	Komposisi Gel 12%
ddH ₂ O	2,4 ml	6,8 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide	5 ml	8 ml
Gel Buffer	2,5 ml	5 ml
10% (W/V) SDS	0,1 ml	200 µl
10% (W/V) ammonium persulfate (AP)	75 µl	100 µl
TEMED	10 µl	20 µl

- bahan-bahan yang telah tercampur diaduk pelan-pelan hingga homogen.

- Pipet jumlah *separating gel* yang dibutuhkan kedalam celah antara plat kaca.
- 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 *stacking gel* sebagai berikut :

Tabel 4.2 Komposisi Volume Pembuatan *Stacking Gel* 4%

Bahan	Komposisi
ddH ₂ O	6,1 ml
Gel Buffer	2,5 ml
10% (W/V) SDS	0,1 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0,8% W/V)	1,3 ml
APS	75 μ l
TEMED	10 μ l

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

3. Setelah itu ambil cetakan sumuran setelah gel terbentuk dan ambil plat kaca dari bingkai cetakan (*casting frame*) dan atur kedalam sumuran sel buffer.

Tuang elektroforesis buffer kedalam sumuran dan tuang hingga menyentuh permukaan atas.

4 . Persiapan Sampel

Sampel yang disiapkan yaitu hasil filtrat kultur media yang ditambah ekstrak perikarp manggis dengan berbagai konsentrasi dan sebagai kontrol

adalah filtrat kultur tanpa ekstrak manggis, filtrat hasil penambahan rifampin dan filtrat hasil penambahan produk manggostin (Garcia). Sampel dan protein marker didenaturasi dengan penambahan beta mercaptoetanol dan dipanaskan selama 5-10 menit.

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*. Protein marker *low range* untuk gel 15% dan *broad range* untuk gel 12%.
6. Atur *power elektroforesis* yaitu pada kondisi 120V, 400mA, selama 1 jam.
7. Hentikan proses elektroforesis ketika dye mencapai batas bawah gel.
8. Gel *distaining* dengan *coomassie blue* dan destaining dengan metanol-asetat (selama 10 menit). Prosesnya yaitu :
 - a. Rendam gel dengan larutan staining dan kocok secara perlahan dengan rotasi horizontal selama 20-30 menit
 - b. Rendam gel pada larutan destaining dan letakkan pada shaker yang sama selama 20-30 menit. Ganti larutan destaining selama 3-5 kali hingga dapat terlihat gel yang jernih.
9. Pita protein diamati dan dibandingkan. Berat molekul protein filtrat dihitung dengan kurva regresi log berat molekul vs jarak migrasi.

4.7.12 Pewarnaan gel hasil SDS-PAGE dengan *Silver Staining*

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 µl

*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 µl

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 ₂ CO 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

Disimpan dalam H₂O 4°C

4.7.13 Uji Spesifisitas protein 38 kDa dengan metode Dot Blot

1. Membuat larutan Tris Base Solution (TBS)

Bahan : Tris Base Solution 1,212 gram

NaCl 2,336 gram

Aquades steril 200 ml

Sebelum larutan dijadikan 200 ml di adjust pH nya terlebih dahulu yakni pH 7,4 selanjutnya ditambahkan aquades hingga 200 ml dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer

2. Melakukan pengenceran sampel dan Mapping Dot Blot

		Ag85			Ag38			CFP-10			ESAT-6		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P E R L A K U A N	A	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$
	B	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$
	C	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$
	D	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$
	E	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$
	F	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$
	G	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$
	H	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$	1x	$\frac{1}{2}x$	$\frac{1}{4}x$

Keterangan :

Sumuran 1-3 untuk protein Ag85 (sampel hasil presipitasi AMS)

Sumuran 4-6 untuk protein Ag38 (sampel hasil presipitasi AMS)

Sumuran 7-9 untuk protein CFP-10 (sampel filtrat kultur bakteri)

Sumuran 10-12 untuk protein ESAT-6 (sampel filtrat kultur bakteri)

*untuk sampel F1-F6, digunakan sampel filtrat kultur bakteri

Kebutuhan pengenceran

- Protein Ag38 kDa

Pengenceran 1x

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

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

$\frac{1}{2} = \frac{y}{150}$ // sampel (y) = $75\mu\text{l}$ sehingga TBS yang ditambahkan $75\mu\text{l}$

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

$\frac{1}{4} = \frac{y}{150}$ // sampel (y) = $37,5\mu\text{l}$ sehingga TBS yang ditambahkan $112,5\mu\text{l}$

3. Menyiapkan membran nitroselulose dan pemasangan alat dot blot

Membrane nitroselulose dicuci dengan *Tris base solution* (TBS) dan 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
5. Menambahkan larutan skim milk:TBS ke dalam alat dot blot sejumlah $50\mu\text{l}$
6. Alat dot blot ditutup dengan aluminium foil

7. Didiamkan selama 18 jam pada suhu 4°C
8. Dimasukkan masing-masing antibodi primer ke dalam tiap-tiap well pada alat dot blot dengan perbandingan 1:500.
9. Dihitung volume antibodi sekunder antimouse label biotin dan TBS yang diambil. Berdasarkan datasheet untuk metode Dot Blot, perbandingan antibodi sekunder antimouse dengan larutan TBS adalah 1:1000
10. Dibuat larutan TBS-antibodi sekunder antimouse label biotin
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 alat shaker
14. Dikeluarkan larutan dengan membalik di atas tisu.
15. Diulangi langkah ke 5-7 sebanyak 2 kali.
16. Dimasukkan antibodi sekunder antimouse label biotin ke dalam larutan TBS lalu divortex hingga homogen.
17. Dimasukkan antibodi sekunder antimouse di well 4-6 (Ag38) masing-masing 50 µL.
18. Diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dan alat dot blot ditutup dengan aluminium foil.
19. Dicuci dengan larutan TBS-Tween 0,05% sebanyak 3 x 3 menit (lakukan langkah 5-7 sebanyak 3 kali).
20. Dimasukkan SA-HRP sebanyak 50 µL ke dalam masing-masing well.
21. Diinkubasi selama 45 menit di suhu ruang.

22. Dikeluarkan larutan dengan membalik diatas tisu.

23. Dicuci dengan TBS-Tween 0,05% selama 3 x 3 menit

4.7.14 Pengukuran dengan alat LAS ImageQuant 500.

- 1) Diambil membran nitroselulosa dari alat dot blot.
- 2) Membran nitroselulosa diletakkan diatas baki.
- 3) Ditambahkan substrat peroksida-luminol (1:1). ke atas permukaan membran nitroselulosa hingga merata lalu ditempelkan dengan substrat yang telah disemprotkan secara merata diatas baki.
- 4) Ditunggu selama ± 5 menit.
- 5) Membran nitroselulosa dipindahkan ke atas tray pembaca LAS ImageQuant 500.
- 6) Pada alat LAS ImageQuant 500, dipilih *chemiluminescence* lalu ditunggu sebentar hingga muncul hasil pembacaannya.
- 7) Hasil pembacaan dengan LAS ImageQuant 500 dianalisa

4.8 Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar, kemudian dianalisa secara deskriptif. Dicari dosis efektif dari ekstrak perikarp manggis (*Garcinia manggosana* L.) yang dapat menghambat sekresi protein antigen 38 kDa *M. tuberculosis* H37Rv dengan cara membandingkan tebal tipisnya pita protein pada kelompok perlakuan menggunakan metode SDS-PAGE, kemudian dilakukan metode *immunoblotting* menggunakan Dot-Blot dan dianalisa secara *chemiluminescence* menggunakan LAS ImageQuant 500.

4.9 Diagram Alur Penelitian

