

Perbandingan Homogenisasi Hati Mencit dengan Metode Penggerusan, *Freeze Thawing*, dan Sonikasi dengan Menggunakan Human Foxp3 Elisa Kit

Hafizah Fadhilah ¹⁾, Afifatul Achyar ¹⁾, Ira Wahyuni ²⁾

¹⁾Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang

²⁾Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas

Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Barat, Kecamatan Padang Utara, Kota Padang

Email: hafizahfadhilah746@gmail.com

ABSTRAK

Homogenisasi adalah proses penyeragaman ukuran partikel dalam upaya mempertahankan kestabilan dari sebuah campuran yang terbentuk dari 2 fase yang tidak dapat menyatu atau biasa disebut emulsi. Ada tiga jenis homogenisasi penggerusan, sonikasi dan *Freeze Thawing*. Kemajuan bioteknologi menghadirkan salah satu teknik baru dalam bidang molekuler. Salah satunya adalah *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Alat dan bahan yang digunakan adalah sonikator, heater, mikropastel, sedangkan bahan adalah hati mencit dan Human FOXP3 (Forkhead Box Protein P3) ELISA Kit. Berdasarkan hasil yang didapatkan metode penggerusan merupakan metode paling sesuai untuk sampel hati karena dapat menghasilkan homogenate yang baik. Jika menggunakan metode *Freeze Thawing* molekul atau struktur dapat rusak selama proses pembekuan dan pencairan berulang. Begitu juga dengan metode sonikasi diperlukan peralatan sonikasi yang sesuai. Terlalu intens dapat menyebabkan pemanasan sampel sehingga sampel mengalami kerusakan.

Kata kunci : ELISA, Penggerusan, *Freeze Thawing*, Sonikasi

PENDAHULUAN

Kemajuan yang dicapai dalam bioteknologi telah membantu mempercepat meningkatkan berbagai penelitian menuju arah pemahaman mengenai teknik-teknik yang dapat dimanfaatkan dalam bidang biologi molekuler. Salah satunya adalah *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) adalah salah satu metoda dalam bidang laboratorium terutama imunologi untuk mengetahui ekspresi protein, reaksi imunitas, respon imun. Tentunya sebelum melakukan teknik ELISA perlu memastikan sampel yang akan digunakan telah melalui tahap homogenisasi.

Proses ekstraksi DNA terdiri dari beberapa metode diantaranya menggunakan metode fisik/ mekanik dengan cara penggilangan atau mendidih, serta menggunakan metode kimia dengan penambahan reagen (Mardhotillah *et al.*, 2023). Homogenisasi adalah proses penyeragaman ukuran partikel dalam upaya mempertahankan kestabilan dari sebuah campuran yang terbentuk dari 2 fase yang tidak dapat menyatu atau biasa disebut emulsi. Penyeragaman ukuran dilakukan dengan proses pengecilan ukuran partikel pada

fase terdispersi (Markus, 2014). Proses pengecilan ukuran terjadi karena gaya yang timbul akibat perlakuan mekanik yang diberikan sehingga menyebabkan pemecahan pada partikel terdispersi. Menurut Bylund (1995), pada homogenisasi menggunakan kecepatan putaran tinggi, pemecahan partikel disebabkan oleh aliran turbulensi yang ditimbulkan.

Homogenisasi yang digunakan menggunakan beberapa metode diantaranya penggerusan. Untuk menghancurkan sel atau jaringan biologis (Li & Schluesener, 2013). Metode penggerusan melibatkan penggunaan alat penggiling, seperti mortar, penggiling bola, atau homogenizer, untuk menghancurkan sel atau jaringan. Proses ini memecahkan struktur sel melalui gaya fisik, seperti gesekan dan tekanan, sehingga membebaskan komponen seluler.

Berikutnya adalah prinsip proses *freeze-thawing*, *freezing* dan *thawing* bergantian dapat menyebabkan pembekuan dan pelelehan air dalam sel, yang dapat merusak struktur sel dan memfasilitasi pelepasan komponen seluler (Allen & Tresini, 2000). Lisis freeze thaw terjadi karena adanya kerusakan dinding sel sebagai akibat dari pembekuan dan pencairan yang dilakukan berkali-kali. Metode terakhir adalah sonikasi. Sonikasi adalah suatu metode modifikasi material dengan memanfaatkan gelombang ultrasonik. Penggunaan sonikasi dapat menyebabkan perubahan massa molekul rata-rata viskositas (Mv) dengan adanya degradasi viskositas akibat pemberian gelombang ultrasonik (Jin Li et al., 2008). Pengaruh sonikasi menyebabkan penurunan berat molekul dengan semakin lamanya pemberian gelombang ultrasonik (Kencana, 2009). Senyawa polimer yang memiliki berat molekul yang berbeda akan memiliki perbedaan kelarutan dalam suatu pelarut. Suatu polimer dengan berat molekul yang tinggi akan sulit dalam proses kelarutannya dan sebaliknya (Wibowo, 2010).

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit jantan karena kondisi fisiologisnya mirip dengan manusia, mudah dalam pemeliharaan dan penanganan serta hemat biaya. Mencit jantan digunakan karena tidak mengalami siklus estrus, sehingga hormonnya cenderung stabil dan mudah dikontrol (Fitri et al., 2017).

Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan ketiga metode penggerusan, sonikasi, dan *Freeze Thawing* menggunakan hati mencit sebagai sampel dan dibantu oleh teknik ELISA .

METODE PENELITIAN

Kegiatan Kerja Praktek dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Sumatra Barat. Kegiatan Kerja Praktek dilaksanakan pada tanggal 22 Juni- 22 Juli 2022.

Alat yang digunakan untuk lisis sel adalah neraca analitik, *hand homogenizer*, *micropestle*, gunting, timer, *sonikator*, *micropipet*, *heater*, rak

microtube, *vortex*, *microtube* 1,5 ml, tips, dan *centrifuge*. Alat yang digunakan untuk ELISA adalah polysteren 96 *well microtiter plate (Microplate)*, mikropipet, mikropipet *multi channel* dan tips (kuning & biru), *microplate shaker*, mikrotube (1-1,5 mL), *microplate washer*, *baker glass*, *ELISA reader*, dan kertas whatman no.4.

Bahan yang dibutuhkan untuk keperluan sterilisasi yaitu: aquades dan alkohol 70%. Bahan yang digunakan untuk lisis sel adalah 3 organ hati mencit, PBS (*Phosphate Buffered Saline*), dan *dry ice*. Bahan untuk ELISA adalah sampel dari hati mencit yang sudah dilisiskan dengan tiga metode, Human FOXP3 (Forkhead Box Protein P3) ELISA Kit (yang terdiri dari *wash buffer*, larutan pengenceran standar, *biotinylated detection*, dan *concentrated HRP*) *micro assay plate*, dan *tissue*.

Prosedur kerja

a. Homogenisasi

Sampel hati mencit dari organ yang sama diambil sekitar 90 mg dengan cara dipotong dengan gunting lalu dimasukkan menggunakan pinset untuk masing-masing tiga *microtube* dan beri kode di atasnya untuk sampel hati pertama (H1 (01,02,03), perlakuan hati kedua H2 (01,02, 03), sampel hati ketiga H3 (01,02,03)). Kemudian larutan PBS ditambahkan kedalam masing-masing tube. Sampel hati lalu dihancurkan menggunakan gunting dan *hand homogenizer* lalu *vortex*. Sampel dengan kode 01 diberikan perlakuan homogenisasi dengan cara di mikropastel dan digunting, sampel dengan kode 02 diberi perlakuan sonikasi dengan cara sampel di dimasukan kedalam mesin sonikator selama 5 detik kemudian diangkat selama 30 detik lalu dimasukan lagi kedalam mesin sonikator selama 5 detik dengan 5 kali pengulangan. Untuk sampel dengan kode 03 diberikan perlakuan *Freeze Thawing* dengan cara mendinginkan sampel dengan *dry ice* lalu dipanaskan kembali dengan heater dan dilakukan selama 5 kali pengulangan. Setelah itu semua sampel disentrifuge dengan kecepatan 17000 XG selama 5 menit. Lalu supernatan dipindahkan ke tube baru yang diberi kode masing-masing sampel.

b. ELISA menggunakan Human FOXP3

- 1) Mensentrifuge semua sampel yang akan digunakan.
- 2) Menyiapkan larutan standar sebanyak 8 buah larutan standar
- 3) Tambahkan larutan kerja standar dengan konsentrasi berbeda ke dua kolom pertama, setiap konsentrasi larutan ditambahkan kedalam dua sumur secara berdampingan sebanyak 50 μ l untuk setiap *well*.
- 4) Masukkan sampel sebanyak 100 μ l untuk setiap sumur, inkubasi 90 menit pada suhu 37°C.
- 5) Setelah selesai inkubasi keluarkan cairan dari wel dengan di pukul-pukul ke tisu. Tambahkan 100 μ l biotin kedalam setiap *well* kecuali ke dalam larutan

standar. Lalu tutup *well* dengan *sealer* dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. kemudian cuci *well* sebanyak 3 kali.

- 6) Tambahkan 100 µl HRP conjugate ke masing-masing *well*, lalu tutup dengan *sealer* dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
- 7) Buang larutan pada tiap *well*, lalu melakukan proses pencucian pada no 6 ulangi proses pencucian sebanyak 5 kali pengulangan.
- 8) Tambahkan 90 µl substrat reagent ke setiap *well* kemudian ditutup dengan *sealer* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C lindungi dari cahaya.
- 9) Tambahkan stop solution sebanyak 50 µl untuk masing-masing *well*
- 10) Tentukan nilai *Optical density* (OD) masing-masing *well* menggunakan *micro plate reader* yang diatur ke 450 nm.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil perbandingan metode homogenisasi dapat dilihat pada tabel 1.1

Tabel 1.1 Data Analysis Report ELISA

| Sample ID | Well | Replicates | Mean | Conc (ng/ml) | SD (Conc) |
|-----------|------|------------|-------|--------------|-----------|
| H1.01 | A2 | 0.239 | 0.239 | 2.601 | (*) |
| H1.02 | B2 | 0.234 | 0.234 | 2.518 | (*) |
| H1.03 | C2 | 0.172 | 0.172 | 1.384 | (*) |
| H2.01 | D2 | 0.251 | 0.251 | 2.797 | (*) |
| H2.02 | E2 | 0.278 | 0.278 | 3.228 | (*) |
| H2.03 | F2 | 0.179 | 0.179 | 1.527 | (*) |
| H3.01 | G2 | 0.344 | 0.344 | 4.248 | (*) |
| H3.02 | H2 | 0.275 | 0.275 | 3.181 | (*) |
| H3.03 | A3 | 0.239 | 0.239 | 2.601 | 0.000 |
| | A4 | 0.239 | | | |

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) atau penetapan kadar imunosorben dengan menggunakan antibodi sekunder berlabel enzim merupakan uji serologis yang umum digunakan di berbagai laboratorium imunologi. Keunggulan uji ini antara lain adalah memiliki teknik pengerjaan yang relatif sederhana, ekonomis, dan memiliki sensitivitas yang cukup tinggi. Pada tahun 1971, Peter Perlmann dan Eva Engvall memperkenalkan teknik ELISA dalam bidang imunologi (ELISA konvensional) yang pada waktu itu bertujuan untuk menganalisis interaksi antigen dengan antibodi di dalam suatu sampel yang ditandai dengan menggunakan indikator enzim sebagai pelapor/reporter label/signal (Santosa, 2021).

ELISA merupakan metode immunoassay yang menggunakan enzim sebagai label. Prinsip dasar dari sandwich assay adalah sampel yang mengandung antigen direaksikan

dengan antibody spesifik pertama yang terikat dengan fase padat. Selanjutnya ditambahkan antibody spesifik kedua yang berlabel enzim dan ditambahkan substrat dari enzim tersebut (Asihara & Kasahara, 2001). ELISA mampu menganalisis adanya interaksi antigen dengan antibody di dalam suatu sampel dengan menggunakan enzim sebagai reporter label. Kompleks antigen antibody akan terikat pada well plate. Enzim yang terikat pada antibody kedua pada kompleks antigen-antibodi yang terbentuk akan memberikan perubahan warna pada cairan tersebut, sehingga akan memberikan optical density yang berbeda. Optical density dapat dinyatakan meningkat atau menurun berdasarkan pengenceran material standart, sehingga akan menghasilkan kurva dose-response yang nantinya akan digunakan untuk mengestimasi kadar protein tersebut. Setelah penambahan substrate solution, akan terjadi perubahan warna lagi karena adanya ikatan antara enzim dan substrat (Yuniarti *et al.*, 2018).

Hati merupakan organ yang berperan penting dalam mempertahankan fungsi hidup (Tellingen, 2003), karena hati adalah pusat dari metabolisme hewan (Sari *et al.*, 2021) Hati juga berperan sebagai pendetoksifikasi senyawa toksik, hematologik, sistem imun tubuh, berperan dalam proses metabolisme biomolekul, dan sekresi produk akhir metabolisme seperti bilirubin, ammonia dan urea (Kaplan, 1989). Hati merupakan organ yang paling banyak mengandung GSH (Ahda *et al.*, 2023).

Berdasarkan tabel 1.1 di dapatkan bahwa hasil pada perlakuan pertama yaitu penggerusan dengan kode H3 01 yaitu sebanyak 4.248 ng/ml lebih tinggi dibandingkan H1 01 dan H2 01. Pada perlakuan kedua yaitu sonikasi sampel dengan kode H2 02 dengan nilai 3.228 ng/ml lebih tinggi dibandingkan H1 02 dan H3 02. Pada perlakuan ketiga yaitu freeze-thawing sampel dilakukan duplo untuk mengecek hasil pemipetan akurat atau tidaknya, hasilnya menunjukkan bahwa sampel dengan kode H3 03 dengan nilai 2.601ng/ml lebih tinggi dibandingkan H1 03 dan H2 03. Namun dari ketiga teknik ini rata-rata nilai tertinggi adalah metode homogenisasi dengan cara penggerusan, kemudian metode sonikasi, dan terakhir metode *Freeze Thawing*.

Metode penggerusan cocok untuk sampel padat atau keras seperti jaringan hati. Dapat menghasilkan homogenat yang baik oleh karena itulah metode ini yang paling cocok untuk sampel hati. Jika menggunakan metode *Freeze Thawing* molekul atau struktur dapat rusak selama proses pembekuan dan pencairan berulang. Begitu juga dengan metode sonikasi diperlukan peralatan sonikasi yang sesuai. Terlalu intens dapat menyebabkan pemanasan sampel sehingga sampel mengalami kerusakan.

PENUTUP

Hasil ELISA menunjukkan dengan jelas bahwa metode penggerusan merupakan metode paling sesuai untuk sampel hati karena dapat menghasilkan homogenate yang baik. Jika menggunakan metode *Freeze Thawing* molekul atau struktur dapat rusak selama proses pembekuan dan pencairan berulang. Begitu juga dengan metode sonikasi

diperlukan peralatan sonikasi yang sesuai. Terlalu intens dapat menyebabkan pemanasan sampel sehingga sampel mengalami kerusakan.

REFERENSI

- Ahda, Y., Farma, SA, Atifah, Y., & Efendi, J. (2023, Mei). Efektivitas Ekstrak Kasar *Cinnamomum Zeylanicum* terhadap Kadar GSH Hati Mencit. Dalam *Konferensi Internasional ke-3 tentang Biologi, Sains dan Pendidikan (IcoBioSE 2021)* (hlm. 98-104). Pers Atlantis.
- Allen, R. G., & Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(3), 463-499.
- Ashihara, Y., Kasahara, Y., & Nakamura, R. M. (2001). Immunoassay and immunochemistry. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 20th. Philadelphia: Saunders*, 821-49.
- Bylund, G. 1995. *Dairy Processing Handbook*. Tetra Pak. Lund, Sweden.
- Fitri, R. A., Sumarmin, R., & Yuniarti, E. (2017). Effect of mangosteen skin extract (*Garcinia mangostana* L.) on males mice (*Mus musculus* L. Swiss Webster) uric acid level. *BioScience*, 1(2), 53-61.
- Jin Li, Jun Cai, Lihong Fan, 2008, Effect of Sonolysis on Kinetics and Physicochemical Properties of Treated Chitosan, *journal of Applied Polymer Science*, 109:2417-2425
- Kaplan, L.A. and A.J. Pesce. 1989. *Clinical Chemistry*. Ed-3. New York. Mosby Tear Book
- Kencana, A., L., 2009, Perlakuan Sonikasi Terhadap Kitosan : Viskositas dan Bobot Molekul Kitosan, Institut Pertanian Bogor, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Bogor, (*Skripsi*).
- Li, Y., & Schluesener, H. (2013). Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(6), 626-634.
- Mardhotillah, I., Achyar, A., Chatri, M., Putri, DH, & Ahda, Y. (2023, Mei). Optimalisasi Isolasi DNA pada Sampel Pangan Berbasis Daging Menggunakan Metode Fenol-Kloroform untuk Pengembangan Deteksi Halal Menggunakan Analisis Metode In-House. Dalam *Konferensi Internasional ke-3 tentang Biologi, Sains dan Pendidikan (IcoBioSE 2021)* (hlm. 51-58). Pers Atlantis.
- Markus, Y. W. (2014). Perancangan homogenizer untuk skala industri rumah tangga.

- Santosa, B. (2021). Teknik Elisa: Metode Elisa Untuk Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit.
- Sari, R. N., Ahda, Y., & Farma, S. A. (2021). Kadar MDA Hati Mencit (*Mus musculus* L.) Setelah Diinduksi Ekstrak Kulit Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii*). *Jurnal Serambi Biologi*, 6(2), 32-36.
- Tellingen, C.V. 2003. *Organ Physiology From a Phenomenological Point of View*. Driebergen: Louis Bolk Institut. Driebergen.
- Wibowo, H. B., 2010, Pengaruh Berat Molekul Terhadap Reaksi Pembentukan Poliuretan, Prosiding Siptekgan, 15.
- Yuniarti, E., Syamsurizal, S., Ahda, Y., & Sonata, P. D. (2018). Correlation of Fasting Blood Glucose With IL-6 Levels in Type-2 Diabetes Mellitus Ethnic Minangkabau. *Bioscience*, 2(1), 11-21.