

LAMPIRAN

Lampiran 1 Penggunaan *transmission electron microscopy* (TEM): Teknik preparasi spesimen biologi (Ita & Siti, 2013) Laboratorium Histologi dan TEM, Lembaga Eijkman-Jakarta

Berbeda dengan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya, pengamatan menggunakan TEM memerlukan persiapan tertentu. Berikut ada langkah kerja standar yang biasa dilakukan:

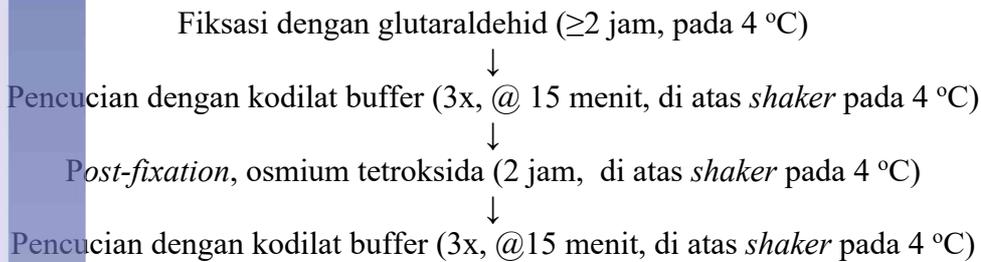
1. Pembuatan Block Resin
2. Pemotongan Block
3. Pewarnaan Spesimen
4. Pengamatan menggunakan mikroskop elektron

1. Preparasi standar pembuatan block plastik (resin)

Untuk proses pembuatan block, diperlukan jaringan ukuran $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ atau 100 μl pellet sel/bakteri.

- Fiksasi. Proses fiksasi berguna untuk mengawetkan struktur dari jaringan/sel hidup, sehingga setelah diproses bentuknya tidak akan berubah dari struktur hidupnya. Fiksasi harus melindungi jaringan ketika proses embedding, pemotongan, dan juga dari *electron beam* selama pengamatan dengan TEM. Proses fiksasi terbagi menjadi dua tahapan, fiksasi menggunakan fiksatif 2,5% glutaraldehid dalam 0,1M kakodilat buffer + 3% sukrosa, dan *post-fixation* menggunakan fiksatif 2% osmium tetroksida dalam 2,5% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 3% sukrosa.

Lebih jelas dapat dilihat pada diagram di bawah ini:



• Dehidrasi

Dehidrasi dilakukan setelah proses fiksasi selesai. Dehidrasi berfungsi untuk menggantikan air yang ada di dalam sel dengan cairan tertentu. Cairan ini harus bisa bertindak sebagai pelarut antara lingkungan *aqueous* sel dengan embedding media yang bersifat hidrofobik. Dehidrasi dilakukan dengan merendam sampel dalam etanol bertingkat, sebagai berikut:

- larutan etanol 10%, 20%, 30% (@ selama 5 menit, di atas *shaker*, 4°C)
- larutan etanol 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 95%, 95% (@ selama 10 menit, di atas *shaker* pada 4 °C)
- etanol absolut (2x, @ 20 menit, di atas *shaker*, 4°C)

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Infiltrasi

Pergantian etanol ke medium embedding sebaiknya dimediasi dengan penggunaan larutan transisi yang memiliki afinitas tinggi terhadap medium embedding. Larutan transisi yang biasa digunakan adalah *propylene oxide*, yang bersifat 'ringan' dan mudah menguap.

Perubahan dari larutan dehidrasi ke larutan transisi tidak sekaligus, tetapi berkala, dimulai dengan etanol absolut: *propylene oxide* 2:1; etanol absolut: *propylene oxide* 1:1; etanol absolut: *propylene oxide* 1:2; dilanjutkan dengan *propylene oxide* murni. Hal ini dilakukan agar infiltrasi dapat berjalan dengan sempurna, tidak ada ruang kosong didalam sel/jaringan.

Embedding dan curing

Embedding dimulai dengan proses pergantian larutan transisi dengan medium embedding (monomer resin) secara bertingkat. Mula-mula digunakan resin yang dicampur dengan *propylene oxide*, hingga diakhiri dengan resin murni. Sama seperti saat infiltrasi dengan *propylene oxide*, hal ini dilakukan semua ruang kosong dalam sel/jaringan terisi medium embedding.

Contoh medium embedding: epoxy resin (epon) 812, araldite, Spurr's resin, LR white.

Setiap medium embedding memiliki waktu polimerisasi yang berbeda.

- Epon 812 memerlukan waktu minimal 48 jam.
- Araldite memerlukan waktu minimal 3 hari (1. *overnight* pada 35 °C; 2. *overnight* pada 45 °C; 3. *overnight* pada 60 °C).
- L.R. White memerlukan waktu minimal 18 jam (biasa untuk proses imunohistokimia dan sitokimia).
- Spurr's resin memerlukan waktu minimal 16 jam. Lab TEM dan Histologi Eijkman biasa menggunakan medium ini.

Pada proses ini, spesimen disimpan dalam oven pada 60 °C selama ± 2 hari. Hal ini dilakukan agar medium mengeras seperti plastik dan spesimen akan terawetkan di dalamnya. Perlu dicatat, bahwa tidak boleh ada gelembung udara yang terperangkap di dalam block. *Bubble* dapat dihilangkan dengan pompa vakum. Proses vakum ini dilakukan selama 2 jam. Selanjutnya spesimen siap dipotong dengan ukuran ultra.

2. Pemotongan Block

Sebelum *block* dipotong dengan ultramikrotom, perlu disiapkan perlengkapan sebagai berikut:

- Grid. Grid adalah piringan logam dengan diameter sekitar 2.3 atau 3 mm dan pola lubang (*mesh*) seperti jala. Grid ini nantinya digunakan sebagai tempat meletakkan irisan spesimen untuk pengamatan dengan TEM, seperti halnya kaca objek yang digunakan pada pengamatan dengan mikroskop cahaya biasa. Material grid bermacam-macam, misalnya nikel, emas, perunggu, dan tembaga, dengan bermacam-macam jumlah lubang (*mesh*). Grid yang biasa digunakan adalah tembaga 200 *mesh*, dan untuk pengamatan virus digunakan grid 400 *mesh*. Ukuran *mesh* menunjukkan banyaknya garis per inci (grid 200 *mesh* berarti 200 x 200 garis per inci persegi). Permukaan grid dibedakan antara permukaan yang kusam (*dull/matt*) dan permukaan mengkilat (*shiny/bright*).



3. Pewarnaan Spesimen

Walaupun fiksatif osmium tetroksida telah memberikan warna gelap terhadap spesimen, seringkali pewarnaan tambahan harus dilakukan pada irisan *ultrathin* dengan tujuan untuk menambah kontras. Pewarna yang harus memiliki bilangan atom yang besar dengan jumlah elektron dan proton yang sangat besar pula, biasanya logam berat.

Jenis pewarnaan terbagi menjadi 2:

- *positive staining*

Pewarna menempel pada berbagai organel atau makromolekul di dalam specimen, sehingga meningkatkan kepadatan dan kontrasnya ketika terpapar *electron beam*. Zat warna yang umum dipakai adalah 1% uranyl asetat dalam 70% etanol dengan *triple lead* (*lead citrate*, *lead acetate*, *lead nitrate*).

- film penyangga (*support film*). Agar spesimen dapat menempel pada grid, maka diperlukan film penyangga untuk menutup lubang-lubang pada grid. Film penyangga ini harus bersifat tipis dan transparan, e. g. film karbon, *nitrocellulose*, plastik yang sangat tipis (*polyvinyl formal/Formvar* dan *collodion/Parlodion*). Film penyangga yang paling banyak digunakan adalah Formvar. Formvar yang digunakan adalah 0.5% Formvar dalam *chloroform*. Formvar ini harus dilekatkan pada permukaan yang kusam (*dull/matt*) dari grid.

- **Trimming block.** Sebelum dilakukan pemotongan, ujung plastik (resin) yang tidak mengandung sampel harus dihilangkan. Kemudian bagian ujung ini dibentuk trapesium. Trimming awal dilakukan dengan silet, dan dilanjutkan dengan kaca (*glass knife*). Karena ukuran grid yang sangat kecil, maka nantinya trapesium harus berukuran luas sekitar 1 mm².

- **Pemotongan block**

Pemotongan awal dilakukan dengan kaca, selanjutnya dilakukan dengan *diamond knife*. Pemotongan awal dengan kaca dilakukan untuk menentukan lokasi yang tepat dari trapesium 1 mm². Setelah pemotongan awal dengan kaca, dilakukan *fast staining* dengan *Toluidine blue* dan diamati dengan mikroskop cahaya. Selanjutnya ditentukan area 1 mm² mana yang akan diambil.

Area 1 mm² dipotong dengan *diamond knife* dan hasil potongannya ditempatkan pada grid. Pemotongan ultrathin dengan *glass knife* maupun *diamond knife* menghasilkan ketebalan yang bervariasi, meskipun ukuran tertentu sudah diset pada ultramikrotom. Acuan dari skala Peachey (berupa gradien warna pelangi) dapat menentukan ketebalan irisan:

- tanpa warna sampai abu-abu : 30-60 nm
- abu-abu keperakan sampai perak : 50-70 nm
- coklat keemasan : 70-100 nm
- ungu : 100-190 nm
- biru : >200 nm

Ketebalan yang ideal untuk pengamatan TEM biasanya skala warna coklat keemasan sampai perak, berkisar antara 50-100 nm. Untuk mendapatkan ketebalan tersebut diperlukan pisau yang benar-benar tajam. Irisan yang terapung di air dalam *boat*, selanjutnya dapat ditempelkan pada grid.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

negative staining

Pada pewarnaan negatif pewarna menempel di area sekitar spesimen, sehingga ketika terpapar *electron beam* spesimen tampak lebih terang, meskipun infrastruktur halus kadang terlihat akibat kemampuan larutan logam berat untuk menembus ke dalam sel. Pewarnaan negatif digunakan untuk keperluan pengamatan partikel subseluler misalnya ribosom, dinding sel, virus, dan makromolekul, misal makromolekul protein.

Larutan sodium atau potassium fosfat mungkin paling banyak digunakan karena mempunyai pH yang sesuai. Garam uranium juga umum digunakan. Pada pH di bawah 4.5 garam uranium dapat terurai menjadi ion uranil (secara praktis digunakan larutan uranil asetat) yang secara langsung dapat menembus ke permukaan material dan dapat mewarnai bagian-bagian yang lebih halus, sehingga meningkatkan detail.

Uranil asetat mudah rusak oleh paparan cahaya, sehingga pengerjaan harus dilakukan dalam keadaan gelap. *Triple lead* mudah mengalami presipitasi akibat pemaparan dengan CO₂. Hal ini menimbulkan kontaminasi pada spesimen. Untuk mengatasi hal ini beberapa kristal NaOH diletakkan di sekitar tetesan zat warna pada saat pewarnaan, serta dilakukan pada wadah tertutup.

4. Pengamatan menggunakan mikroskop elektron

Setelah grid diwarnai, maka spesimen siap diamati. Perbesaran yang diaplikasikan berbeda-beda tergantung jenis sampel, misal untuk mengamati sel bakteri dengan jelas perbesaran yang digunakan minimal 50.000 kali (dengan *high tension*, HT 80 kV), pengamatan mitokondria dengan perbesaran 10.000 kali. Khusus untuk virus, perbesaran yang digunakan minimal 80.000 kali, dengan tegangan 100 kV.

Protokol pewarnaan virus dengan *negative staining*

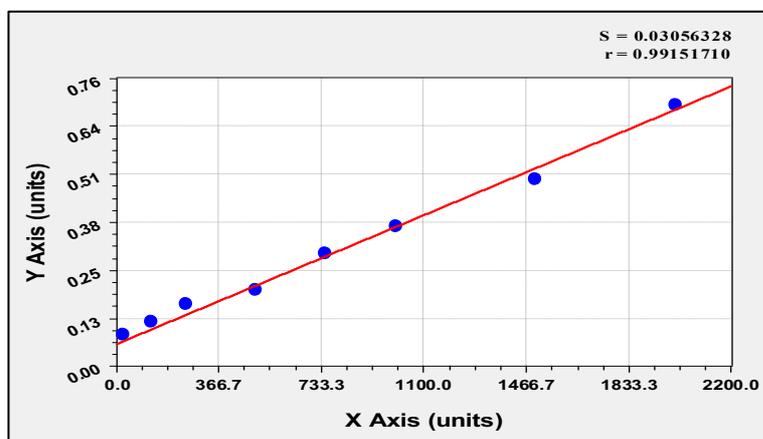
1. Sampel divorteks selama 1 menit
2. *Grid* diambil menggunakan pinset
3. Pinset dikunci dengan klem agar *grid* tidak lepas dan jatuh
4. Sampel dipipet sebanyak 5 µl kemudian ditetaskan pada *grid* yang telah disiapkan. Inkubasi dilakukan selama 30 detik
5. Kelebihan cairan sampel diserap menggunakan kertas penyerap (tissue kimtech)
6. Larutan uranil asetat sebanyak 5 µl dipipet dan ditetaskan pada *grid*. Setelah ditetaskan langsung diserap dengan tissue *kimtech*
7. Grid kemudian dicelupkan dalam larutan NaOH 0.1 M sebanyak 30 kali dan RO sebanyak 30 kali. Setelah itu dikeringkan pada suhu ruang.
8. Sampel diamati menggunakan TEM



Lampiran 2 Hasil pengukuran protein virus dengan metode BCA (kit Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific)

@Hak cipta milik IPB University

Standar	OD rata-rata	Sampel	
2000	0.695±0.00	Kons.awal (µg/ml)	Kons. Akhir (µg/ml)
1500	0.497±0.05	159.68	798.39
1000	0.372±0.02	Linear Fit: $y=a+bx$ Coefficient Data: $a = 5.92 \times 10^{-2}$ $b = 3.11 \times 10^{-4}$	
750	0.301±0.05		
500	0.204±0.03		
250	0.167±0.02		
125	0.121±0.00		
25	0.087±0.01		



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.