MODUL PRAKTIKUM

Analisis Nuclear Factor Erythroid Related Factor-2 (Nrf-2) dengan Metode Elisa

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA

2019

I. LUARAN PRAKTIKUM

Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan analisis Nrf-2 dengan menggunakan metode Elisa

II. TUJUAN PRAKTIKUM

a. Untuk Mengetahui alat dan bahan praktikum analisis Nrf-2
b. Mengetahui proses tahapan analisis Nrf-2 langkah demi langkah

III. LANDASAN TEORI

Nuclear factor erythroid related factor-2 (Nrf-2) merupakan faktor transkripsi dalam DNA yang memainkan peran utama dalam regulasi redoks. Nrf-2 pada manusia mengandung 605 asam amino dengan berat molekul *67,*7 KDa. Nrf-2 adalah kelompok protein *Cap-n-Collar* dari *Leucine Zipper Protein*, yang berfungsi sebagai aktivator ekspresi gen β-globin, dan kemudian digambarkan sebagai sensor utama stres oksidatif, dan akan aktif dengan adanya oksidan, elektrofil, ataupun stress retikulum endoplasma (Layal, 2016). Nrf-2 memiliki tujuh fungsi utama yang terlibat dalam pengaturan stabilitas atau aktivitas transkripsional yang juga disebut juga sebagai Nrf2-ECH *Homology domain* (Neh) (Namani *et al*., 2014; Canning *et al*., 2015).

IV. ALAT DAN BAHAN

- Alat yang digunakan adalah:
- Tabung eppendorf
- Mikropipet
- Centrifuge
- Vacutainer EDTA/Heparin

- Bahan yang digunakan:
- PBS 1X steril
- Sampel jaringan

- Elisa Kitt
- Elisa Reader

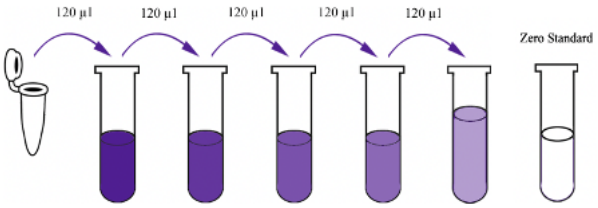
V. PROSEDUR

Kadar Nrf-2 jaringan diukur dengan menggunakan Nrf-2 *Assay Kit* yang digunakan pada penelitian ini berasal dari *Bioassay Technology Laboratory*.

1. Sebanyak 1 gram organ hati di cuci dengan menggunakan PBS untuk menghilangkan seluruh sel darah merah.
2. Jaringan hati kemudian dihancurkan secara mekanik menggunakan mortar dan di homogenasi menggunakan *homogenizer* dengan larutan PBS pH 7.4 pada *icebox*. Cairan jaringan ini kemudian di sentrifugasi pada suhu 2- 4°C, kecepatan 2000-3000 RPM selama 20 menit.
3. Supernatan mengandung Nrf-2 kemudian digunakan untuk analisis menggunakan
4. ELISA dengan tahapan :
    1. Siapkan semua reagen, larutan standar, dan sampel. Semua reagen dipersiapkan ke suhu kamar sebelum digunakan. Pengujian dilakukan pada suhu kamar.
    2. Disiapkan standard dengan seri konsentrasi 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8 ng/ml, 4 ng/ml, dan 2 ng/ml.
    3. Tambahkan 50µl standar ke *well* standar.
    4. Tambahkan 40µl sampel ke sampel *well* dan kemudian tambahkan 10µl anti-NRF2 antibodi ke sampel *wel*, kemudian tambahkan 50µl streptavidin-HRP untuk sampel *well* dan *well* standar. Campur dengan baik. Tutupi piring dengan *sealer* dan Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37 ° C.

5. Lepaskan sealer dan cuci *well* 5 kali dengan buffer cuci. Rendam sumur dengan kira-kira 0,35 ml buffer cuci selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap kali pencucian. Untuk pencucian otomatis, aspirasi semua sumur dan cuci 5 kali dengan buffer pencuci, kemudian keringkan *well* ke tisu kertas atau bahan penyerap lainnya.
6. Tambahkan larutan substrat 50µl A ke setiap lubang lalu tambahkan larutan substrat 50µl B ke masing-masing *well*. Plat inkubasi ditutup dengan sealer baru selama 10 menit pada suhu 37 ° C dalam gelap.
7. Tambahkan 50µl *Stop Solution* ke masing-masing sumur, warna biru akan segera berubah menjadi kuning.
8. Tentukan kerapatan optik (nilai OD) masing-masing *well* segera menggunakan pembaca lempeng mikro pada 450 nm selama 10 menit setelah penambahan *stop solution*

32ng/ml	Standard No.5	120µl Original Standard + 120µl Standard Diluent
16ng/ml	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
8ng/ml	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
4ng/ml	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
2ng/ml	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent



Standard Concentration	Standard No.5	Standard No.4	Standard No.3	Standard No.2	Standard No.1
64ng/ml	32ng/ml	16ng/ml	8ng/ml	4ng/ml	2ng/ml

DAFTAR PUSTAKA

Canning, P., Sorrell, F. J., and Bullock, A. N. (2015). Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Rad. Biol. Med*. 88(Pt B), 101–107. doi: 10.1016/ j.freeradbiomed.2015.05.034

Layal, K. (2016). Peran Nrf2 Dalam Patogenesis Stres Oksidatif dan Inflamasi pada Penyakit Ginjal Kronik Pendahuluan. *Syifa' Medika*, *7*(1).

Namani, A., Li, Y., Wang, X. J., and Tang, X. (2014). Modulation of Nrf2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer. *Biochimica et Biophysica Acta Mol. Cell Res. 1843, 1875–1885.* Doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.003