

LAPORAN PRAKTIKUM

TEKNIK ELISA : PEMERIKSAAN PREALBUMIN PADA PLASMA DARAH

NAMA PRAKTIKAN : Binayanti Nainggolan (157008008)
Henny Gusvina Batubara (157008011)
Dinno Rilando (157008004)

HARI/TGL. PRAKTIKUM / KLP : Kamis, 23 Juni 2015/III

I. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan mengenai ELISA.
2. Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip kerja teknik ELISA
3. Mahasiswa mampu melakukan langkah-langkah kerja berdasarkan teknik ELISA dengan metode pemeriksaan kuantitatif.
4. Mahasiswa mampu melakukan metode pemeriksaan kuantitatif Prealbumin dari plasma darah menggunakan teknik ELISA.

II. DASAR TEORI

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) merupakan uji serologis yang umum digunakan di berbagai laboratorium imunologi. Uji ini memiliki beberapa keunggulan seperti teknik pengerjaan yang relatif sederhana, ekonomis, dan memiliki sensitivitas yang cukup tinggi. ELISA diperkenalkan pada tahun 1971 oleh Peter Perlmann dan Eva Engvall untuk menganalisis adanya interaksi antigen dengan antibodi di dalam suatu sampel dengan menggunakan enzim sebagai pelapor (*reporter label*).

ELISA merupakan suatu teknik biokimia yang terutama digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibody atau antigen dalam suatu sampel. ELISA juga salah satu metode yang dikerjakan sebagai sarana mengukur kadar antigen atau antibody dalam suatu medium cair seperti serum atau organ yang telah dicairkan/ dilarutkan.

Umumnya ELISA dibedakan menjadi dua jenis, yaitu *competitive assay* yang menggunakan konjugat antigen–enzim atau konjugat antibodi–enzim, dan *non-competitive assay* yang menggunakan dua antibodi. Pada ELISA *non-competitive assay*, antibodi kedua akan dikonjugasikan dengan enzim sebagai indikator. Teknik kedua ini seringkali disebut sebagai "Sandwich" ELISA.

Uji ini memiliki beberapa kerugian, salah satu di antaranya adalah kemungkinan yang besar terjadinya hasil *false positive* karena adanya reaksi silang antara antigen yang satu dengan antigen lain. Hasil berupa *false negative* dapat terjadi apabila uji ini dilakukan pada *window period*, yaitu waktu pembentukan antibodi terhadap suatu virus baru dimulai sehingga jumlah antibodi tersebut masih sedikit dan kemungkinan tidak dapat terdeteksi.

III. LANGKAH MENGERJAKAN

A. Sampel

1. Pengambilan sampel darah masing – masing 1,5 cc sebanyak 3 sampel
2. Sampel 1 dan 2 dibuat pada tabung EDTA lalu disentrifius selama 10 menit (3000 rpm)



3. Sampel 3 dibuat pada tabung sentrifius ependorft, lalu sentrifius selama 10 menit (3000 rpm)
4. Pengenceran diluten konsentrasi 5 x menjadi 1 x (2 ml dilution sol + 8 ml H₂O)



5. Pengenceran sampel
 - a. Siapkan masing – masing 2 tabung ependoft untuk tiap sampel
 - b. Tabung 1 = 5 µl plasma sampel + 495 µl 1x dilution (1/100 dilution) lalu sentrifius
 - c. Tabung 2 = 5 µl bahan dari tabung 1 + 495 µl 1x dilution (1/10000 diluteion) lalu sentrifius short



B. Standard

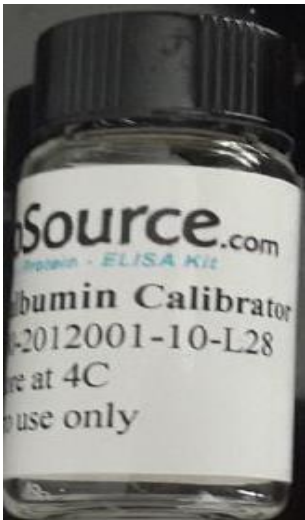
1. Siapkan 8 tabung ependorf

standard	Jumlah diluten	Volume	Keterangan
7	8 ml	677 ml	Sentrifius
6	300 ml standard 7	300 ml	Sentrifius
5	300 ml standard 6	300 ml	Sentrifius
4	300 ml standard 5	300 ml	Sentrifius
3	300 ml standard 4	300 ml	Sentrifius
2	300 ml standard 3	300 ml	Sentrifius
1	300 ml standard 2	300 ml	Sentrifius
0		600 ml	Sentrifius

2. Masukkan 1 x dilution, votex sebentar



3. Masukkan 8 ml calibrator pada standard 7

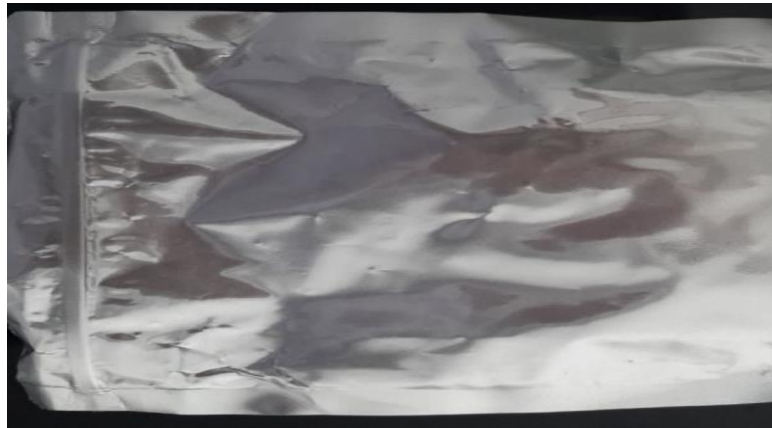


C. Well Elisa (Micro Titer Plate)

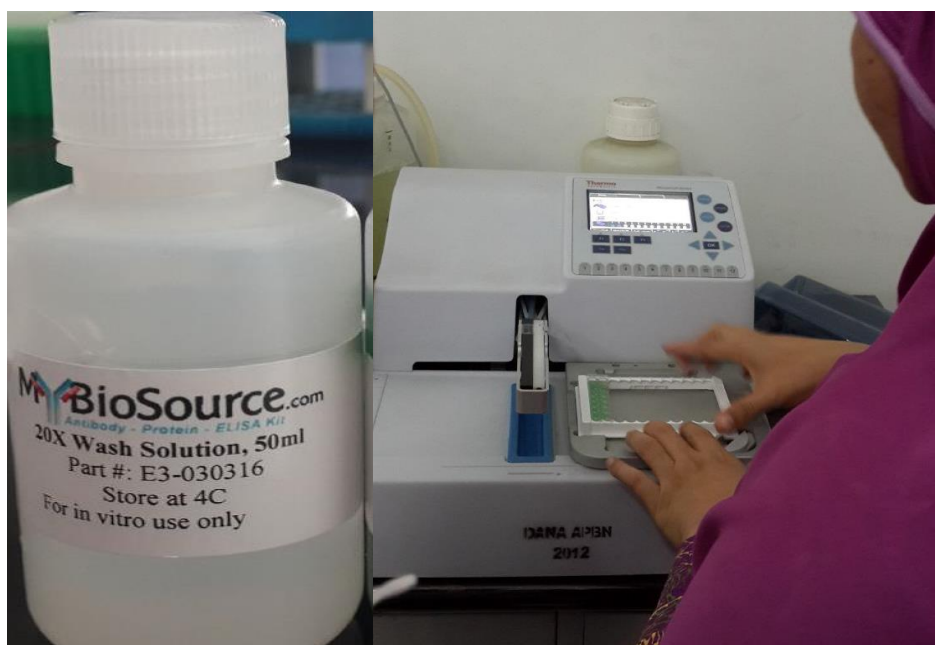
1. Masukkan standard 0 – 7 dengan mikropipet ke dalam well kolom pertama (A-H)



2. Masukkan sampel 1 -3 ke dalam well kolom kedua (ulangi berurutan sampai 8 well terpenuhi)
3. Inkubasi pada suhu ruangan selama 60 + 2 menit (dengan plate ditutup dan posisi sejajar)



4. Siapkan wash solution 20 x $\rightarrow$ 1 x
Bahan yang dibutuhkan 100 ml (1 x wash solution) = 5 ml wash solution + 95 ml H₂O
5. Setelah inkubasi, kemudian lakukan pencucian dengan mesin washer sebanyak 4 x

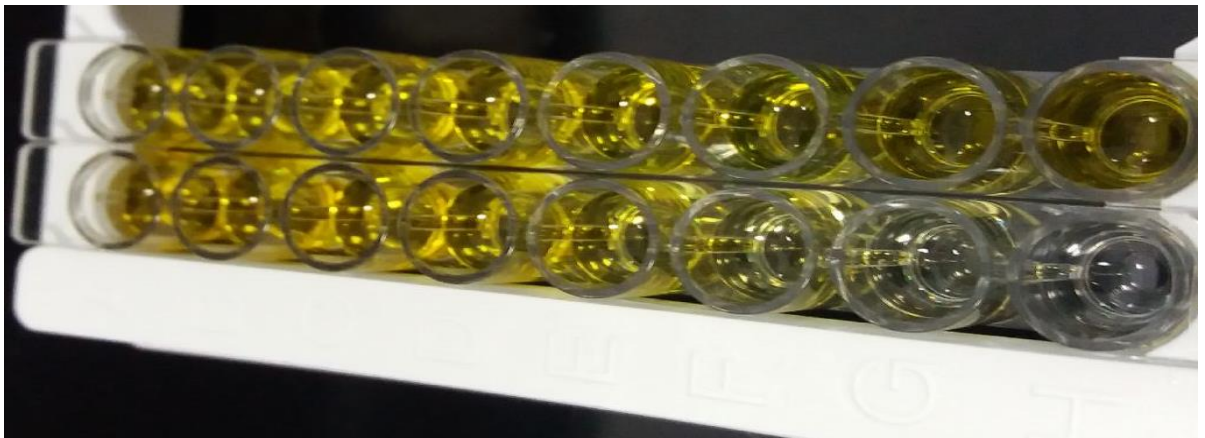


6. Siapkan enzim – antibody conjugasi diencerkan (dalam keadaan ruangan gelap) sebanyak 20 μ l enzim + 1980 μ l 1 x dilution

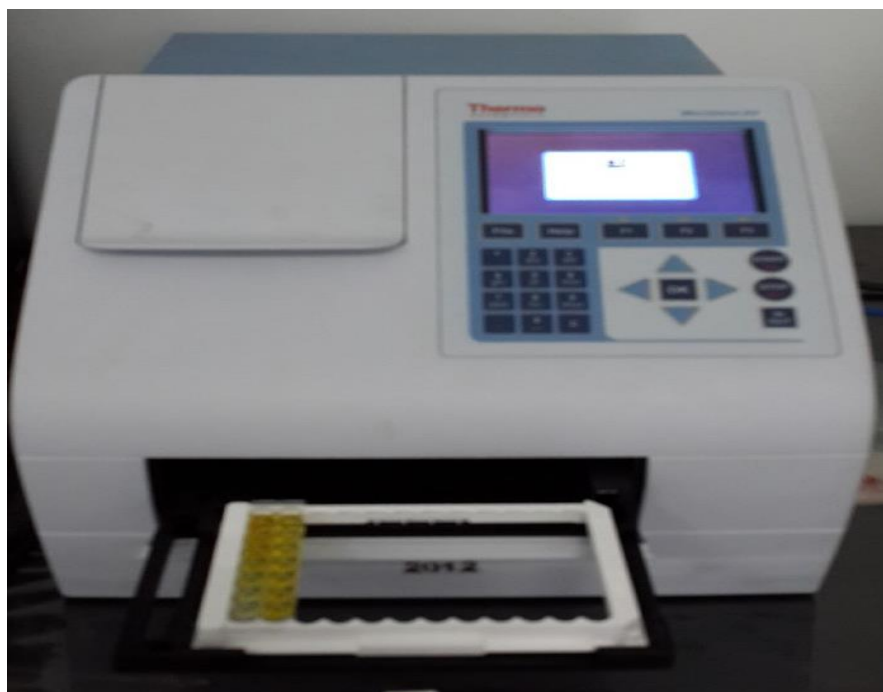
7. Isi ke dalam masing – masing well dengan mikropipet sebanyak 100 μ l enzim yang telah diencerkan, lalu tutup dan inkubasi selama 30 + 2 menit
8. Setelah inkubasi, kemudian cuci well dengan ELISA washer sebanyak 4 x
9. Masukkan dengan mikropipet masing – masing 100 μ l TMB substrat sel
10. Inkubasi di ruang gelap selama 10 menit, maka warna akan berubah menjadi biru



11. Kemudian tambahkan 100 μ l stop solution, maka warna akan berubah menjadi kuning



12. Masukkan ke alat spektrofotometri untuk menghitung nilai absorbansinya (panjang gelombang 450 nm), kalibrasi alat platereader sesuai dengan kit petunjuk pabrik



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

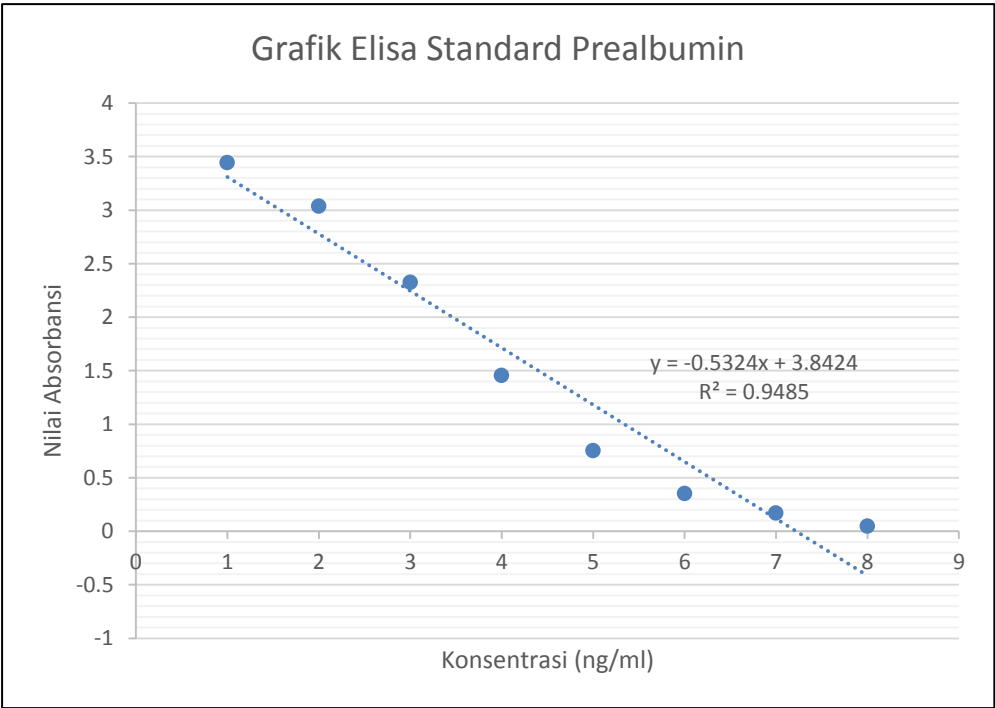
a. Hasil

Pada tabung kedua sampai tujuh dilakukan dilution berturut-turut mulai dari 5

tabung pertama dengan pelarut menggunakan 1000 µL Calibrator Diluent sehingga didapatkan konsentrasi pada tabung kedua sampai tujuh seperti di bawah ini :

Tabel 1: Konsentrasi dan hasil absorbansi standard prealbumin

Tabung	Nilai Konsentrasi yang dihitung	Nilai konsentrasi yang didapat	Nilai absorbansi
1	100	3.4389	3.4413
2	50	3.0440	3.0354
3	25	2.3114	2.3253
4	12,5	1.4675	1.4537
5	6,25	0.7437	0.7511
6	3,125	0.3539	0.3524
7	1,5625	0.1668	0.1696
8	0	0.0486	0.0460

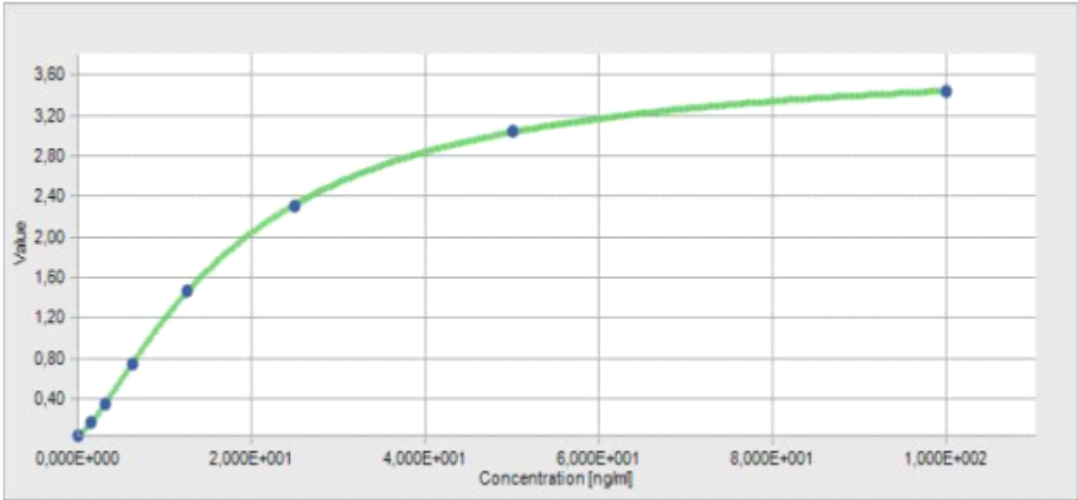


Dari grafik di atas didapatkan persamaan regresi liniernya yaitu $y = -0,5324x + 3,8424$ dan $R^2 = 0,98485$ di mana x adalah nilai konsentrasi dan y adalah nilai absorbansi. Persamaan regresi linier yang didapat ini akan digunakan untuk menghitung konsentrasi prealbumin pada tiap-tiap sampel plasma darah yang telah dipersiapkan sebelumnya.

Pada kolom well kedua dimasukkan sampel sebanyak 8, maka diperoleh hasil sebagai berikut

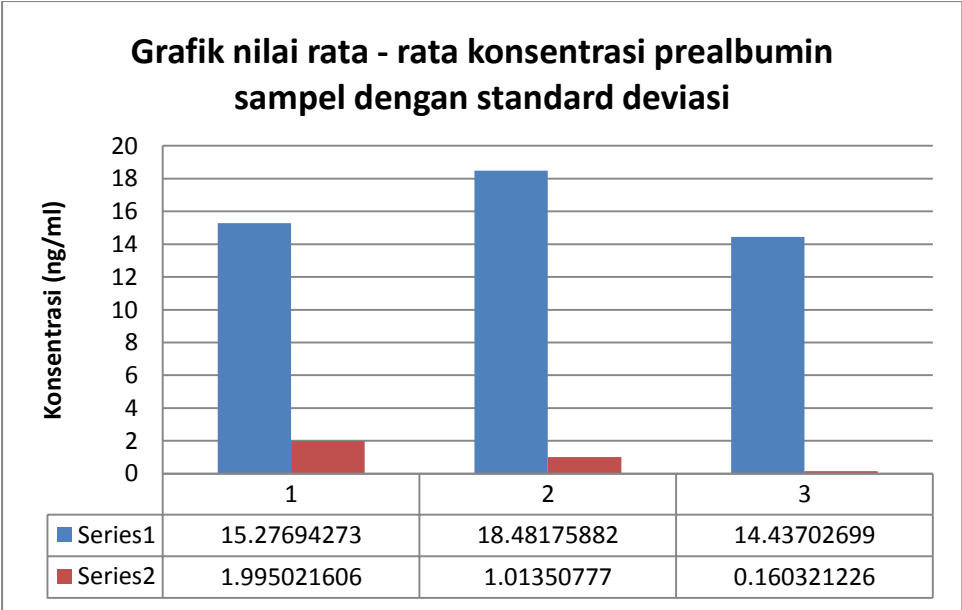
Tabel 2: Hasil absorbansi dan konsentrasi dari setiap sampel

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi yg didapat	Hasil
Henny	1.8547	17.2126	172125.6274
Henny2	1.5226	13.2274	132274.0143
Henny3	1.7120	15.3909	153908.6403
Bina	1.9117	17.9956	179956.4547
Bina2	1.8979	17.8029	178028.7822
Bina3	2.0240	19.6468	196467.5278
Karin	1.6214	14.3237	143236.6277
Karin2	1.6411	14.5504	145503.9122



Tabel 3: nilai rata – rata konsentrasi prealbumin sampel dengan standard deviasi

sampel	rata-rata konsentrasi	standard deviasi
Henny	15.27694273	1.995021606
Bina	18.48175882	1.01350777
Karin	14.43702699	0.160321226



b. Pembahasan

Dari tabel 1 dapat dilihat ada perbedaan konsentrasi antara yang dihitung dengan rumus pengenceran dengan yang didapat dari pembacaan absorbansi dari spektrofotometer. Berdasarkan tabel tersebut dibuat grafik dimana sumbu x adalah konsentrasi (ng/ml) dan y adalah nilai absorbansi (grafik 1).

Dari grafik 1 dapat diketahui persamaan regresi linier dari standar yaitu $y = -0,5342x + 3,8424$ dan $R^2 = 0,948$. Persamaan tersebut akan digunakan untuk menghitung konsentrasi prealbumin plasma dari masing-masing praktikan (sampel) dengan pengenceran yang telah dilakukan sebelumnya

Tabel 2 menunjukkan nilai absorbansi dan konsentrasi dari masing-masing sampel plasma praktikan yang didapat dari spektrofotometer. Dari tabel 2 dapat dilihat nilai absorbansi yang tertinggi adalah Bina3 (2,0240) dan yang terendah adalah Henny2 (1,5226)

Tabel 3 dan grafik 3 menunjukkan nilai rata-rata konsentrasi prealbumin plasma dari masing-masing praktikan dengan standar deviasinya. Nilai Standar deviasi yang paling rendah Karin (0,1603) adalah pada praktikan dan yang tertinggi Henny (1,995) adalah praktikan. Nilai standar deviasi terendah menunjukkan praktikan tersebut melakukan preparasi sampel yang lebih baik dibandingkan dengan praktikan yang lain.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

a. Kesimpulan

Adanya variasi pengukuran prealbumin plasma yang memiliki rentang cukup jauh pada hampir sebagian besar praktikan dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, yang tersering adalah volume sampel plasma yang telah diencerkan kurang dari 200 μ L sehingga saat dilakukan pemipetan untuk semua well volumenya tidak merata, maupun faktor-faktor lain seperti kurang homogennya pencampuran larutan yang akan digunakan, maupun kontaminasi dari tips.

2. Dari grafik prealbumin Standar (Grafik (1)) didapatkan persamaan regresi linier $y = -0,5342x + 3,8424$ dan $R^2 = 0,948$. Hasil ini masih cukup jauh dari persamaan regresi linier yang diharapkan yaitu dengan nilai $R^2 = 1$ dikarenakan akan menyebabkan hasil pengukuran prealbumin sampel plasma menggunakan teknik ELISA menjadi kurang akurat. Nilai R^2 pada grafik di atas hanya mencapai 0.976 disebabkan karena adanya kesalahan pada saat melakukan doubling dilution larutan standar di antaranya volume pemipetan yang kurang tepat, pencampuran larutan yang kurang homogen, adanya kontaminasi dari tips, dan lain sebagainya.

b. Saran

- 1 Berhubung ini praktikum ELISA yang pertama maka untuk selanjutnya sebaiknya harus ada pemahaman tentang teori yang lebih baik untuk mendapatkan garis regresi linear mencapai 1
- 2 Pada saat kegiatan praktikum akan dimulai, sebaiknya semua sarana dan prasarana yang akan

menunjang kegiatan praktikum agar dipersiapkan dengan baik agar tidak mengganggu kelancaran kegiatan praktikum nantinya.

- 3 Untuk melakukan praktikum ELISA sebaiknya dilakukan di tempat yang gelap supaya hasil absorbansi dan warna enzimnya tidak terkontaminasi cahaya