

PRAKTIKUM TEKNIK ELISA-PEMERIKSAAN KUANTITATIF MANNAN-BINDING LECTIN (MBL) PADA PLASMA DARAH

**Kegiatan praktikum ini diadaptasi dari :*

- Manual book human MBL Immunoassay. For the quantitative determination of Mannan-Binding lectin (MBL) concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma.

Tujuan : i) Praktikan dapat mengerti dan memahami teknik elisa
ii) Praktikan dapat melakukan pemeriksaan kuantitatif Mannan-Binding Lectin (MBL) dengan teknik elisa

Alat dan Bahan

Darah	Pipet Otomatic + Tips
MBL Elisa Test Kit	Alat-alat glass
Aquaidest	Elisa reader
Tabung Vacum Heparin/EDTA	Sentrifus
Spuid 3 cc	Microplate 96 well

Preparasi Sampel : *(dikerjakan oleh setiap praktikan)*

- Plasma dengan EDTA atau heparin di sentrifuge pada 3400 rpm selama 15 menit. Simpan pada -20°C.
- Sampel di dilusi 400 X agar nilai yang dihasilkan masih dalam batas kurva standard.
10 µl plasma + 190 µl Calibrator Diluent RD5-26 (1X) → 200 X(1)
10 µl plasma (1) + 190 µl Calibrator Diluent RD5-26 (1X) → 400 X(2)

Reagensia : Kit Human MBL (Mannan Binding Lectin) yang terdiri dari :

- **MBL Microplate 96 well** (12 strip dengan 8 well) yang telah dicoated dengan antigen mouse monoclonal antibody MBL.
- **MBL Conjugate**-12,5 ml mouse monoclonal antibody MBL yang telah diconjugate dengan horseradish peroxidase.
- **MBL Standard**- 100 ng recombinant human MBL dalam larutan buffer protein.
- **Assay Diluent RD1-21**- 12,5 ml larutan buffer protein.

- **Calibrator Diluent RD5-26 Concentrate**-21 ml larutan buffer protein.
- **Wash Buffer Concentrate 25 X**- 21 ml
- **Color Reagent A**- 12,5 ml Hydrogen Peroxide
- **Color Reagent B** – 12,5 ml chromogen (tetramethylbenzidine)
- **Stop Solution** – 23 ml larutan HCl.

Preparasi Reagensia :

- **Wash Buffer Concentrate 25 X** (*dikerjakan oleh kelompok I*)

Encerkan 20 ml wash buffer 25 X dengan aquabidest untuk membuat 500 ml wash buffer 1X.

- **Substrate Solution** (*dikerjakan oleh kelompok II*)

Color reagent A dan B dicampur dengan perbandingan volume yang sama dan dapat digunakan selama 15 menit. Hindarkan dari cahaya.

- **Calibrator Diluent RD5-26 Concentrate** (*dikerjakan oleh kelompok III*)

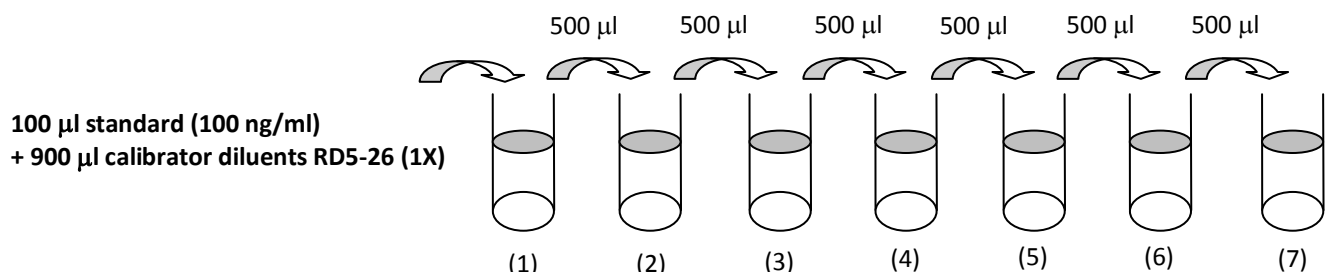
Encerkan 20 ml Calibrator Diluent RD5-26 Concentrate dalam 60 ml aquabidest untuk membuat 80 ml Calibrator Diluent RD5-26 dengan konsentrasi 1X.

- **MBL Standard** (*dikerjakan oleh kelompok IV*)

Encerkan MBL standard dengan 1 ml Calibrator Diluent RD5-26 (1X) sehingga didapatkan stock MBL Standard konsentrasi 100 ng/ml. Mix standard dan biarkan selama 5 menit.

Buatlah serial standard sesuai dengan bagan dibawah ini:(*dikerjakan oleh kelompok V-VII*)

- Pada tabung (1) diisi dengan 900 μ l calibrator diluents RD5-26 (1X) dan 100 μ l standard (100 ng/ml).
- Pada tabung (2) s/d (7) diisi dengan 500 μ l calibrator diluents RD5-26 (1X) dan 500 μ l standart dari tabung (1) ke tabung (2), dari tabung (2) ke tabung (3), demikian seterusnya.
- Untuk standart zero (0 ng/ml) digunakan calibrator diluents RD5-26 (1X).



Hitung konsentrasi (ng/ml) serial standard tersebut

Tabung	[ng/ml]
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	

Prosedur Kerja :

1. Ambil Microplate sesuai dengan kebutuhan.
2. Isi dengan 50 μ l **Assay Diluent RD1-21** ke masing-masing well
3. Tambahkan 50 μ l standart dan sampel ke masing-masing well. Tutup dengan strip yang tersedia, inkubasi 2 jam pada temperatur ruang sambil digoyang dengan shaker pada 500 $\pm$ 50 rpm.
4. Aspirasikan dan cuci 4 X dengan **Wash Buffer**. Cuci dengan mengisi tiap-tiap well dengan wash buffer (400 μ l) menggunakan multi-channel pipet atau autowasher. Setelah pencucian terakhir, buang semua sisa wash buffer dengan mengaspirasikannya. Balikkan plate dan bersihkan dengan kertas tissue.
5. Tambahkan 100 μ l **MBL Conjugate** ke masing-masing well. Tutup dengan strip yang baru. Inkubasi 2 jam pada temperatur ruang dengan menggunakan shaker.
6. Ulangi Aspirasi/cuci pada langkah 4.
7. Tambahkan 100 μ l **Substrate Solution** ke masing-masing well. Inkubasi 30 menit pada temperatur ruang dalam ruang gelap (hindari dari cahaya).

8. Tambahkan 100 μ l **Stop Solution** ke masing-masing well. Goyang plate agar cairan tercampur seluruhnya.
9. Baca dengan menggunakan microplate reader pada λ 450 nm dalam jangka waktu 30 menit. Jika tersedia λ koreksi maka atur pada λ 540 nm atau 570 nm.

Analisa Data

- Buat kurva standard dari data yang diperoleh dari pengukuran serial standard menggunakan Microsoft office excel. Hitung konsentrasi sampel
- Bandingkan hasil pemeriksaan antara hasil dari alat dengan yang di hitung.