

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

NAMA PRAKTIKAN : Aditya Candra dan Ferry Prawira Gurusinga

HARI/TGL. PRAKTIKUM / KLP : Kamis, 9 Januari 2014/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 Mannan Binding Lectin (MBL) 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*).

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. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Preparasi sampel

- Plasma dengan EDTA di sentrifuge pada 3400 rpm selama 15 menit. Simpan pada suhu -20°C
- Diambil 10 μL plasma + 190 μL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) (didapatkan pengenceran 200x)
- Diambil kembali 10 μL plasma yang telah diencerkan 200x + 190 μL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) (didapatkan pengenceran 400x)
 - o Sampel plasma yang telah diencerkan 400x ini yang nantinya akan dihitung konsentrasi Mannan Binding Lectin-nya menggunakan teknik ELISA.

2. Preparasi MBL Standar

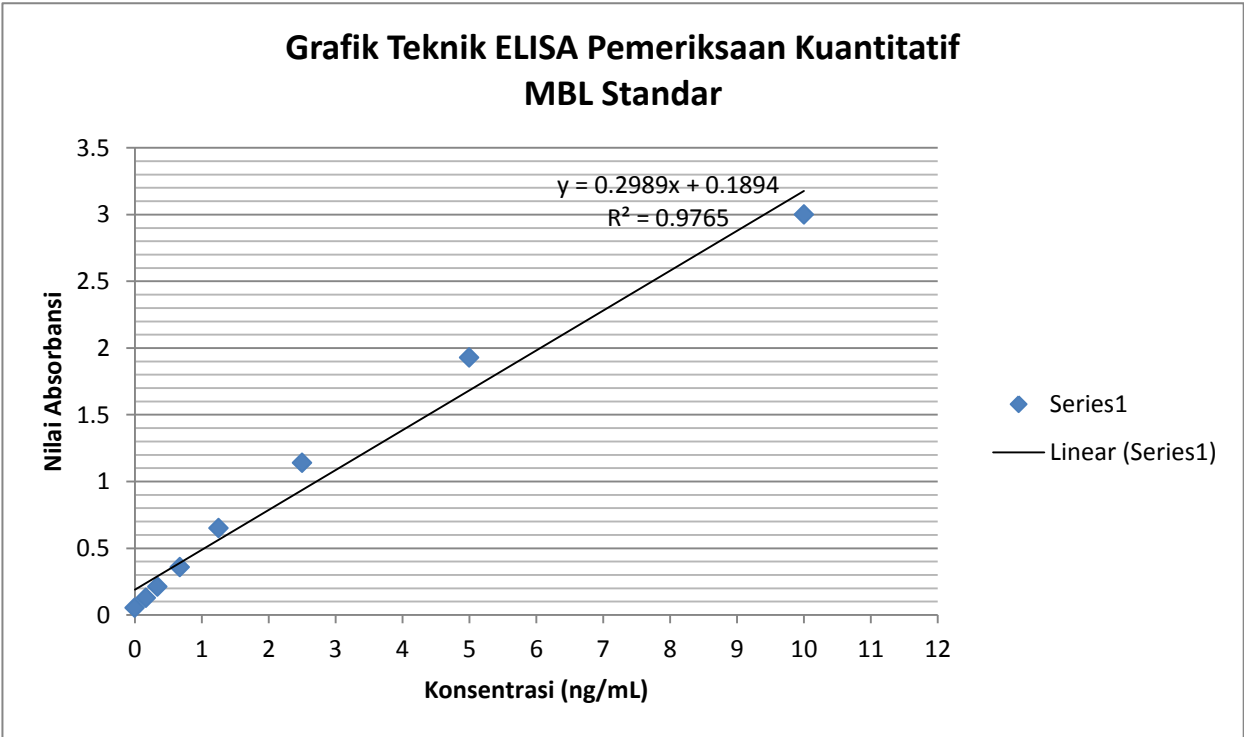
- Pada tabung pertama diisi dengan 900 μL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) dan 100 μL larutan MBL standar (konsentrasi 100 ng/mL) sehingga didapatkan konsentrasi pada tabung pertama sebesar 10 ng/mL.

- Pada tabung kedua sampai tujuh dilakukan doubling dilution berturut-turut mulai dari tabung pertama dengan pelarut menggunakan 500 µL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) sehingga didapatkan konsentrasi pada tabung kedua sampai tujuh seperti di bawah ini :

Tabel (1)

Tabung	Konsentrasi Yang Dihitung (ng/mL)	Konsentrasi Yang Didapat (ng/mL)	Nilai Absorbansi
1	10	10	3
2	5	5	1.93
3	2.5	2.5	1.14
4	1.25	1.25	0.651
5	0.625	0.675	0.358
6	0.3125	0.3375	0.212
7	0.1562	0.16875	0.128
8	0	0	0

Dari tabel (1) di atas dapat dibuat grafik regresi liniernya seperti di bawah ini



Grafik (1)

Dari grafik di atas didapatkan persamaan regresi liniernya yaitu $y=0.298x+0.1894$ di mana x adalah nilai konsentrasi dan y adalah nilai absorbansi .Persamaan regresi linier yang didapat ini akan digunakan untuk menghitung konsentrasi MBL pada tiap-tiap sampel plasma darah (pengenceran 400x) yang telah dipersiapkan sebelumnya.

Tabel (2)

Sampel Plasma	Nilai Absorbansi Sampel Plasma	Konsentrasi MBL Sampel Plasma (Pengenceran 400x) (ng/mL)	Konsentrasi MBL Sampel Plasma (ng/mL)
Amirul 1	2.164	6.63	2651.01
Amirul 2	2.130	6.51	2605.37
Amirul 3	2.138	6.54	2616.11
Amirul 4	2.228	6.84	2736.91
Barlian 1	0.447	0.87	346.31
Barlian 2	0.658	1.57	629.53

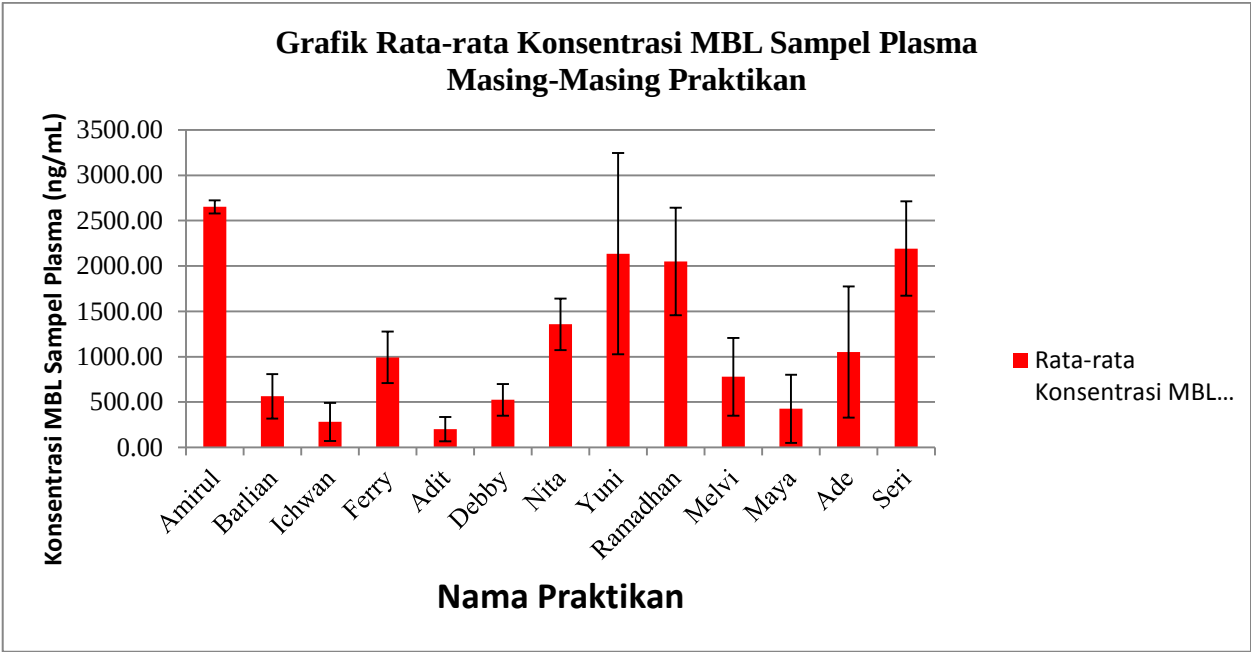
Barlian 3	0.672	1.62	648.32
Barlian 4	0.659	1.58	630.87
Ichwan 1	0.454	0.89	355.70
Ichwan 2	0.439	0.84	335.57
Ichwan 3	0.441	0.85	338.26
Ichwan 4	0.268	0.27	106.04
Ichwan 5	0.373	0.62	246.98
Ichwan 6	0.398	0.70	280.54
Ichwan 7	0.413	0.75	300.67
Ichwan 8	0.402	0.71	285.91
Ferry 1	1.035	2.84	1135.57
Ferry 2	0.976	2.64	1056.38
Ferry 3	1.043	2.87	1146.31
Ferry 4	0.661	1.58	633.56
Adit 1	0.397	0.70	279.19
Adit 2	0.402	0.71	285.91
Adit 3	0.310	0.41	162.42
Adit 4	0.249	0.20	80.54
Debby 1	0.642	1.52	608.05
Debby 2	0.643	1.52	609.40
Debby 3	0.624	1.46	583.89
Debby 4	0.411	0.74	297.99
Nita 1	1.288	3.69	1475.17
Nita 2	1.297	3.72	1487.25
Nita 3	1.294	3.71	1483.22
Nita 4	0.923	2.46	985.23
Yuni 1	2.157	6.60	2641.61
Yuni 2	2.130	6.51	2605.37
Yuni 3	2.137	6.54	2614.77
Yuni 4	0.698	1.71	683.22
Ramadhan 1	1.345	3.88	1551.68
Ramadhan 2	1.863	5.62	2246.98
Ramadhan 3	1.906	5.76	2304.70
Ramadhan 4	1.750	5.24	2095.30
Melvi 1	0.884	2.33	932.89
Melvi 2	0.894	2.37	946.31
Melvi 3	0.945	2.54	1014.77
Melvi 4	0.355	0.56	222.82
Maya 1	0.278	0.30	119.46
Maya 2	0.647	1.54	614.77
Maya 3	0.586	1.33	532.89
Maya 4	0.518	1.10	441.61
Ade 1	1.137	3.18	1272.48
Ade 2	1.319	3.79	1516.78
Ade 3	1.137	3.18	1272.48
Ade 4	0.294	0.35	140.94
Seri 1	1.614	4.78	1912.75
Seri 2	1.997	6.07	2426.85
Seri 3	2.077	6.34	2534.23
Seri 4	1.602	4.74	1896.64

Dari tabel di atas dapat kita cari rata-rata konsentrasi MBL sampel plasma masing-masing praktikan dan standar deviasinya seperti tabel di bawah ini :

Tabel (3)

Sampel Plasma	Rata-rata Konsentrasi MBL Sampel Plasma (ng/mL)	Standar Deviasi
Amirul	2652.35	72.87
Barlian	563.76	244.72
Ichwan	281.21	209.75
Ferry	992.95	283.15
Adit	202.01	135.10
Debby	524.83	174.44
Nita	1357.72	284.62
Yuni	2136.24	1110.08
Ramadhan	2049.66	593.71
Melvi	779.19	429.45
Maya	427.18	375.64
Ade	1050.67	722.88
Seri	2192.62	521.33

Dari tabel di atas dapat dibuat grafiknya seperti di bawah ini :



Grafik yang tertera di atas, menunjukkan bahwa praktikan Amirul memiliki konsentrasi MBL sampel plasma yang paling tinggi, sedangkan konsentrasi MBL sampel plasma yang terendah adalah praktikan Adit. Dari grafik juga terlihat bahwa praktikan Yuni memiliki nilai standar deviasi paling tinggi, sedangkan praktikan Amirul memiliki nilai standar deviasi paling kecil. Dari hasil ini, Praktikan Amirul memiliki hasil pemeriksaan kuantitatif MBL sampel plasma paling stabil dibandingkan dengan praktikan lainnya, sedangkan hasil pemeriksaan kuantitatif MBL sampel plasma praktikan Yuni paling tidak stabil dibandingkan dengan praktikan lainnya..

IV. KESIMPULAN

1. Adanya variasi pengukuran MBL 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 μL sehingga saat dilakukan pemipetan untuk well yang keempat, volumenya kurang dari yang seharusnya (tidak sampai 50 μL), maupun faktor-faktor lain seperti kurang homogennya pencampuran larutan yang akan digunakan, maupun kontaminasi dari tips.
2. Dari grafik MBL Standar (Grafik (1)) didapatkan persamaan regresi linier $y=0.298x+0.189$ dengan $R^2= 0.976$. Hasil ini masih cukup jauh dari persamaan regresi linier yang diharapkan yaitu dengan nilai $R^2= 1$ dikarenakan akan menyebabkan hasil pengukuran MBL 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.

IV. 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.