

LAPORAN PRAKTIKUM TEKNIK ELISA PEMERIKSAAN KUANTITATIF MANNAN BINDING LECTIN PADA PLASMA DARAH

NAMA PRAKTIKAN : Amirul Hadi
KELOMPOK : I
HARI/TGL. PRAKTIKUM : Kamis, 9 Januari 2014

I. TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mahasiswa mampu memahami teknik ELISA
2. Mahasiswa mampu melakukan serta menjelaskan cara kerja teknik ELISA
3. Mahasiswa mampu menjelaskan dan melakukan metode pemeriksaan kuantitatif Mannan Binding Lectin (MBL) dari plasma darah menggunakan teknik ELISA

II. TEORI

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah suatu teknik biokimia yang terutama digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Dalam pengertian sederhana, sejumlah antigen yang tidak dikenal ditempelkan pada suatu permukaan, kemudian antibodi spesifik dicucikan pada permukaan tersebut, sehingga akan berikatan dengan antigennya. Antibodi ini terikat dengan suatu enzim, dan pada tahap terakhir, ditambahkan substansi yang dapat diubah oleh enzim menjadi sinyal yang dapat dideteksi. Dalam ELISA fluoresensi, saat cahaya dengan panjang gelombang tertentu disinarkan pada suatu sampel, kompleks antigen/antibodi akan berfluoresensi sehingga jumlah antigen pada sampel dapat disimpulkan berdasarkan besarnya fluoresensi dengan menggunakan spektrofotometer.

Spektrofotometer adalah sebuah alat yang dapat mengukur jumlah dari cahaya yang menembus sumuran dari microplate. Kompleks antigen-antibodi yang kita buat pada well microplate akan memberikan perubahan warna pada cairan tersebut, sehingga akan memberikan optical density yang berbeda. Optical density dapat dinyatakan meningkat atau menurun berdasarkan pengenceran material standart, sehingga akan menghasilkan kurva dose-response yang nantinya akan digunakan untuk mengestimasi kadar protein tersebut.

Dalam penggunaan sehari-hari ELISA bisa digunakan untuk melabel suatu antigen atau mengetahui antibody yang ada dalam tubuh. Apabila kita ingin mengetahui antigen apa yang ada di dalam tubuh, maka yang diendapkan adalah antibody-nya, begitu pula sebaliknya.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Persiapan sampel

- a. Pisahkan plasma darah dengan cara sentifuge selama 15 menit dengan kecepatan 3400 Rpm, pada suhu ruangan.
- b. Diambil 10 μ L plasma + 190 μ L Calibrator Diluent RD5-26 (1x) (didapatkan pengenceran 200x)

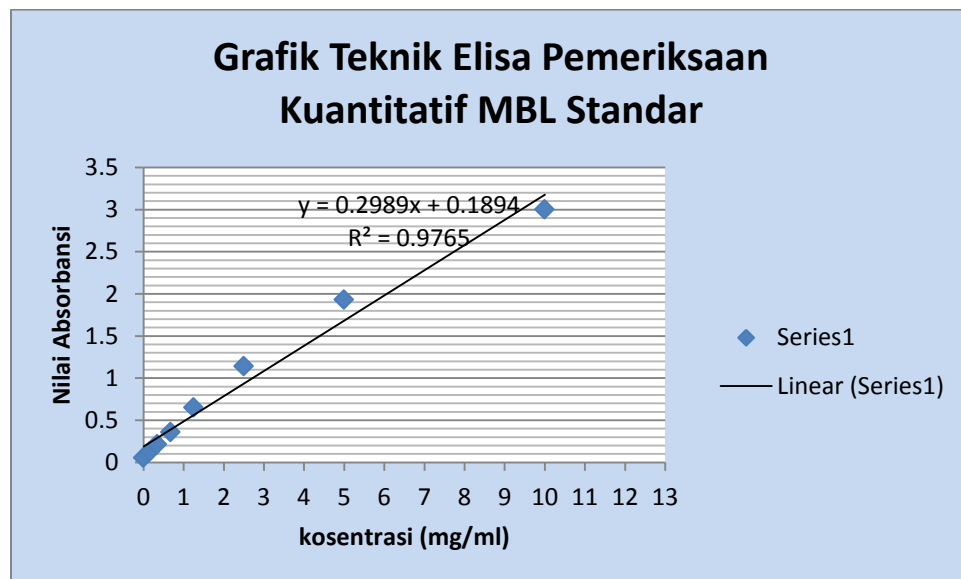
- c. Diambil kembali 10 µL plasma yang telah diencerkan 200x + 190 µL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) (didapatkan pengenceran 400x)
- d. Hanya sampel yang telah diencerkan Sampel 400x ini yang nantinya akan dihitung konsentrasi Mannan Binding Lectin-nya menggunakan teknik ELISA.

2. Persiapan MBL Standar

- a. Tabung (1) diisi dengan 900 µL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) dan 100 µL larutan MBL standar (konsentrasi 100 ng/mL) sehingga didapatkan konsentrasi pada tabung (1) sebesar 10 ng/mL.
- b. Tabung (2) sampai (7) dilakukan doubling dilution berturut-turut mulai dari tabung (1) dengan pelarut menggunakan 500 µL Calibrator Diluent RD5-26 (1x) sehingga didapatkan konsentrasi pada tabung (2) sampai (7) seperti di bawah ini :

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	0.15625	0.16875	0.128
8	0	0	0

Dari table di atas dapat dibuat grafik regresi liniernya seperti di bawah ini :



Dari grafik di atas didapatkan :

- persamaan regresi liniernya yaitu $y = 0.298x + 0.189$
- Y adalah nilai absorbansi
- X adalah nilai konsentrasi

- Persamaan regresi linier yang didapat digunakan untuk menghitung konsentrasi MBL pada tiap-tiap sampel plasma darah (pengenceran 400x) yang telah dipersiapkan sebelumnya.

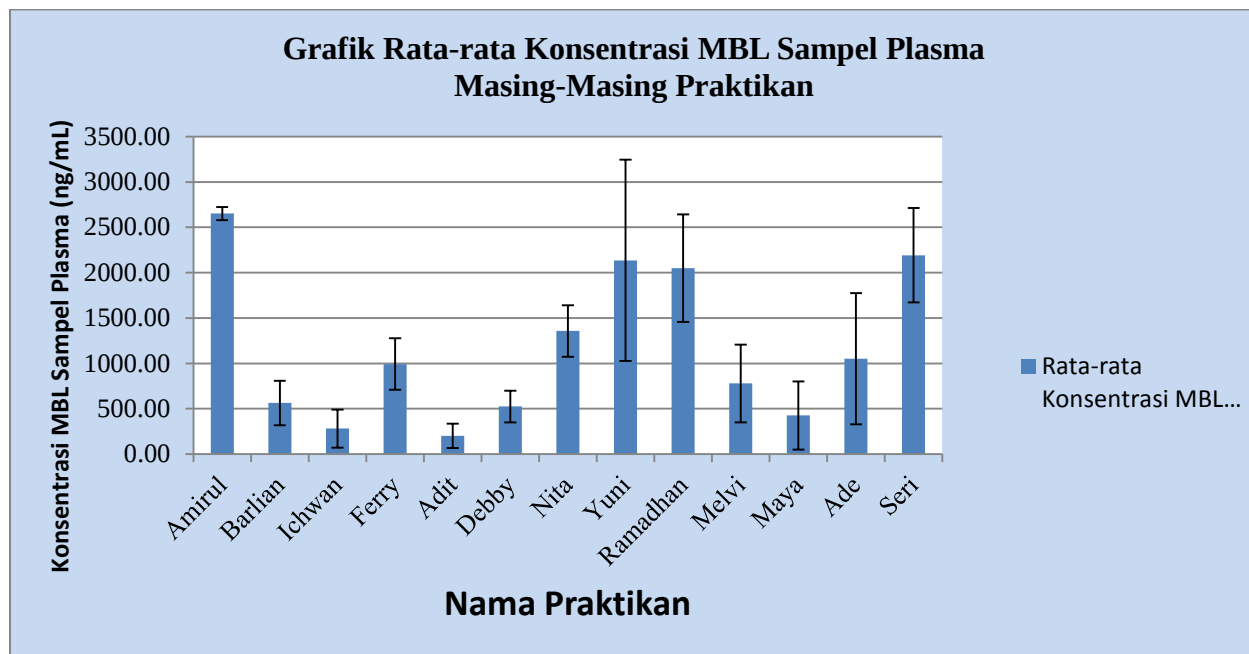
Tabel (2) Sampel Plasma	Nilai Absorbansi Sampel Plasma	Konsentrasi MBL Sampel Plasma (Pengenceran 400x) (ng/mL)	Konsentrasi MBL Sampel Plasma (ng/mL)
Amirul 1	2.164	6.63	2651.01
Amirul 2	2.130	6.51	2605.37
Amirul 3	2.138	6.54	2616.11
Amirul 4	2.228	6.84	2736.91
Barlian 1	0.447	0.87	346.31
Barlian 2	0.658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

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 :



Dari grafik di atas didapatkan bahwa :

- konsentrasi MBL sampel plasma yang paling tinggi adalah praktikan Amirul.
- konsentrasi MBL sampel plasma yang terendah adalah praktikan Adit.
- Hasil pemeriksaan kuantitatif MBL sampel plasma praktikan Amirul paling stabil di mana nilai standar deviasinya paling kecil
- Hasil pemeriksaan kuantitatif MBL sampel plasma praktikan Yuni paling tidak stabil di mana nilai standar deviasinya paling besar .

IV. KESIMPULAN

1. Kadar MBL plasma pada tiap-tiap orang dapat berbeda, hal ini dapat terlihat pada tabel (3) di mana terdapat variasi pengukuran rata-rata MBL plasma masing-masing praktikan.
2. 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 μ L sehingga saat dilakukan pemipetan untuk well yang keempat.
3. 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.
4. Nilai R^2 pada grafik di atas hanya mencapai 0.976 disebabkan karena adanya kesalahan pada saat melakukan doubling dillution larutan standar di antaranya volume pemipetan yang kurang tepat, pencampuran larutan yang kurang homogen, adanya kontaminasi dari tips, dan lain sebagainya.
5. Lintasan MBL (Mannan Binding Lectin) adalah lintasan pada sistem komplemen yang menggunakan protein serupa dengan C1q seperti pada lintasan komplemen klasik, yang

mengikat senyawa mannos yang nampak pada karbohidrat pada permukaan bakteri maupun virus. Ikatan yang terjadi adalah ikatan antara lektin, protein dari golongan kolektin yang diproduksi oleh hati, dengan mannos merupakan kompleks protein, yang kemudian akan mengaktivasi sistem komplemen.

V. SARAN

1. Karena ini praktikum pertama untuk Teknik ELISA, banyak terdapat kekurangan pada praktikan, khusus nya pembekalan materi
2. praktikum teknik ELISA di tahun berikutnya sebaiknya setiap praktikan dibagi ke dalam grup-grup yang jumlah peserta lebih banyak agar pengerjaan nya bisa lebih mudah kerna dikerjakan bersama.
3. Semua sarana dan prasarana yang akan menunjang kegiatan praktikum agar dipersiapkan dengan baik agar tidak mengganggu kelancaran kegiatan praktikum Berikutnya.