

PRAKTIKUM ELISA (Enzyme- linked Immunosorbent Assay)

**Melviana
Maya Anjelir Antika**

Kamis 9 Januari 2014, pukul 09.00-16.00

I. Tujuan Praktikum:

1. Praktikan mampu mengambil dan mempersiapkan sampel plasma darah yang akan diperiksa
2. Praktikan mampu mempersiapkan larutan *wash buffer*, larutan *calibrator*, standar MBL dan larutan pewarna
3. Praktikan mampu melakukan pengenceran serial standard
4. Praktikan mampu mengukur kadar susbtrat pada serial standard berdasarkan serapan spektrofotometri
5. Praktikan mampu membuat dan menginterpretasi grafik hasil pengenceran serial standar-kadar substrat berdasarkan serapan spektrofotometri
6. Praktikan mampu mendapatkan persamaan regresi grafik pengenceran serial standar untuk pengukuran kadar substrat sampel
7. Praktikan mampu mengukur kadar substrat pada masing-masing sampel berdasarkan serapan spektrofotometri

II. Pendahuluan

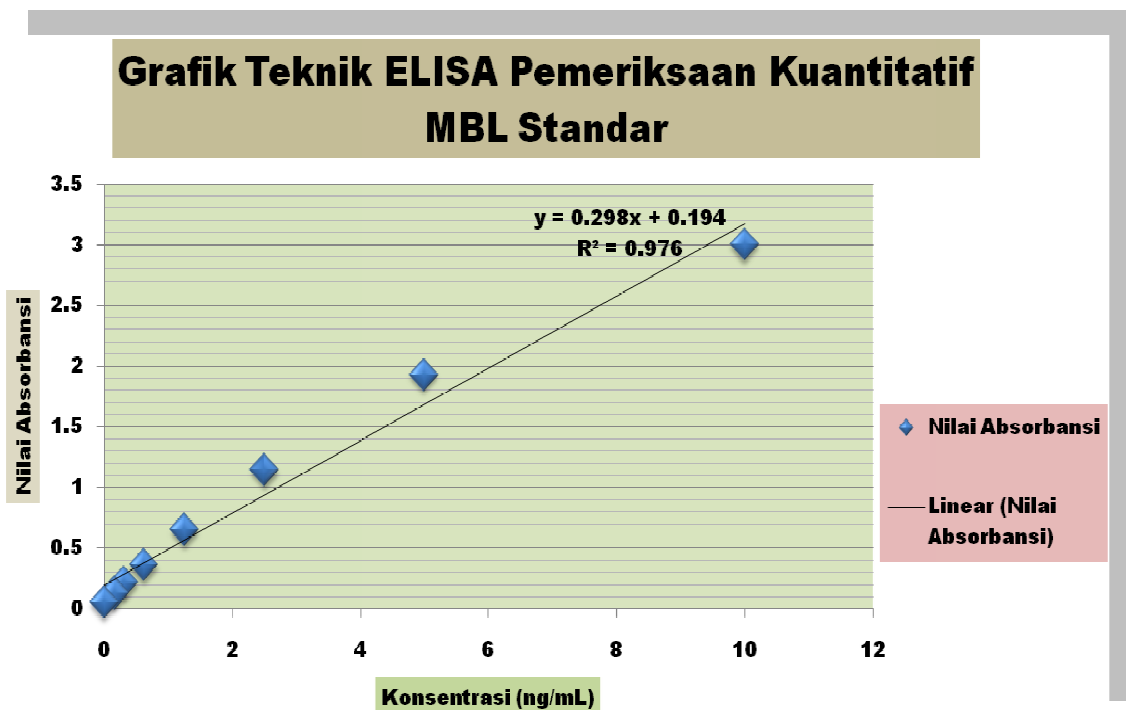
ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) dapat menentukan ada tidaknya suatu protein pada sampel dan jika ada menentukan kadar potein di dalamnya. Ada 2 variasi utama dalam metode ELISA, yang pertama menentukan seberapa banyak suatu antibodi dalam sampel dan yang kedua menentukan seberapa banyak seberapa banyak protein yang diikat antibodi. Pada praktikum ini dilakukan metode yang pertama, yakni dengan menggunakan prinsip ikatan antibodi-antigen untuk mengukur Manan Binding Lectin plasma darah.

Apabila suatu sampel mengandung antibodi MBL, maka akan terjadi pengikatan dengan antigen MBL yang melekat pada dasar sumur assay. Dengan pencucian, antibodi lain yang tidak spesifik akan terlepas. Kemudian dengan adanya enzim yang terikat pada antibodi kedua yang tersedia pada kit dan zat chromogen maka akan terjadi perubahan warna sesuai dengan kadar antibodi yang terdapat di dalamnya. Dengan demikian, kadar antibodi dapat dihitung berdasarkan absorbansi menggunakan spektrofotometer.

III. Hasil dan Grafik

Tabel 1. Hasil Teknik ELISA Pemeriksaan Kuantitatif MBL Standar

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	0.0532



Gambar 1. Grafik Teknik ELISA Pemeriksaan Kuantitatif MBL Standar

Tabel 2. Konsentrasi MBL Pada Tiap-Tiap Sampel Plasma Darah (Pengenceran 400x)

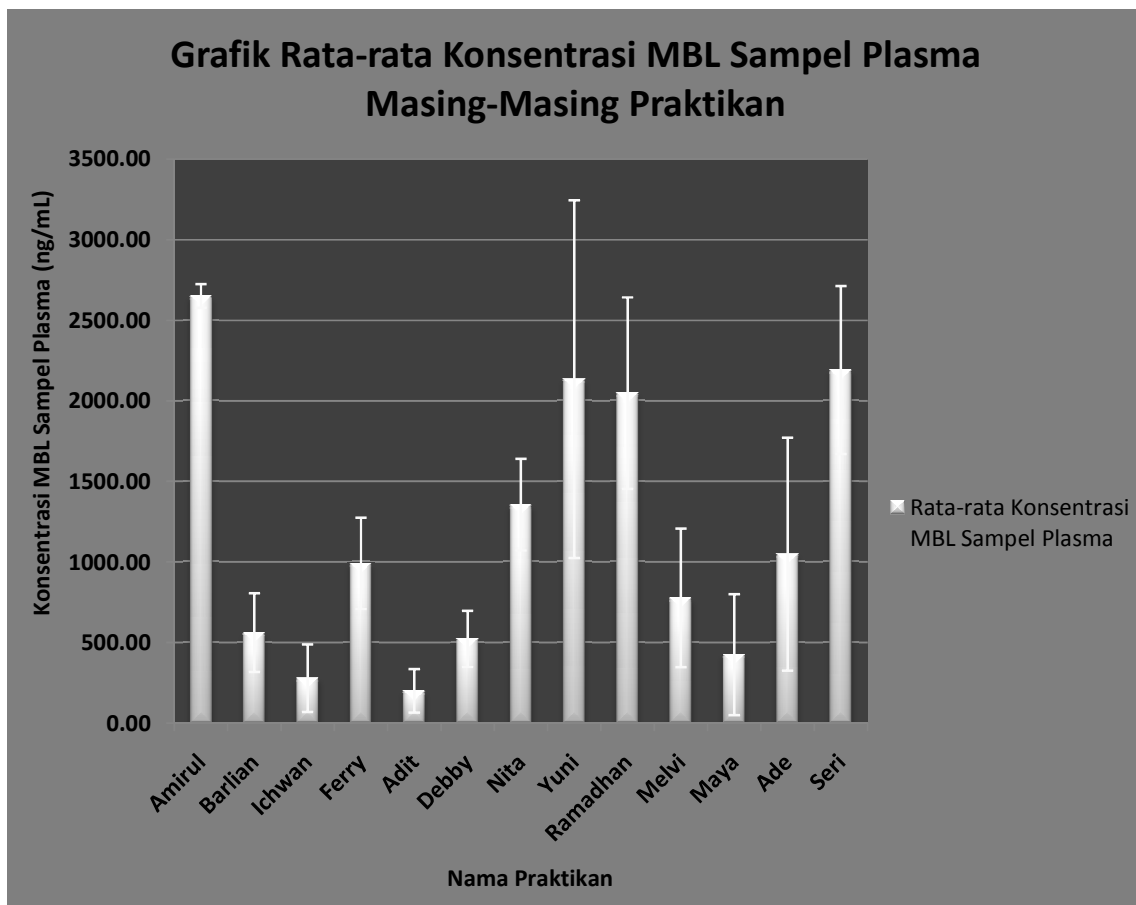
Sampel	Absorbansi	Konsentrasi MBL sampel plasma (pengenceran 400x) (ng/ml)	Konsentrasi MBL sampel (ng/ml)
Amirul 1	2,164	6,63	2651,01
Amirul 2	2,130	6,51	2605,37
Amirul 3	2,138	6,54	2616,11
Amirul 4	2,228	6,84	2736,91
Barlian 1	0,447	0,87	346,31
Barlian 2	0,658	1,57	629,53

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

Tabel 3. Rata-Rata Konsentrasi MBL Sampel (ng/mL)

Sampel	Rata-rata Konsentrasi MBL sampel (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



Gambar 2. Grafik Rata-rata Konsentrasi MBL Sampel Plasma Masing-masing Praktikan

IV. Pembahasan

Dari persamaan regresi didapat nilai $R = 0,97$. Nilai tersebut menunjukkan bahwa akurasi pengenceran tidak mencapai 100%, namun nilai $R > 0,9$ secara statistik dianggap baik. Ketidakakuratan hasil dapat disebabkan praktikan kurang tepat dalam melakukan pemipetan dan pengenceran atau dapat juga disebabkan prosedur homogenisasi larutan masih kurang. Oleh karena persamaan dari grafik regresi digunakan untuk menghitung nilai sampel, maka sebenarnya nilai pembacaan sampel tidak 100% sama dengan nilai kenyataan.

Dari grafik 2 terlihat konsentrasi MBL sampel plasma tertinggi adalah pada sampel dari praktikan Amirul, sedangkan konsentrasi terendah pada sampel dari praktikan Aditya. Pada awal praktikum, belum disepakati bahwa dari 1 praktikan akan dilakukan pengukuran sampel sebanyak 4x. Hal ini baru diinstruksikan, setelah mempertimbangkan jumlah sumur akan banyak yang tidak terisi jika hanya mengukur 1-2x. Oleh karenanya jumlah plasma sampel tidak sama dalam semua sumur. Sehingga pada hasil pembacaan dari tiap-tiap praktikan, pada umumnya didapati standar deviasi yang besar. Standar deviasi terendah nilai pengukuran MBL berasal dari sampel praktikan Amirul, sedangkan standar deviasi tertinggi didapat dari sampel praktikan Yuni. Selain karena perbedaan jumlah sampel dalam tiap-tiap sumur, nilai deviasi yang besar dapat disebabkan karena penambahan *assay diluent*, konjugat, *substrat solution*, zat pewarna, dan *stop solution* yang tidak sama. Namun kemungkinan ini sangat kecil, sebab penambahan komponen diatas dilakukan dengan micropipet otomatis.

V. Simpulan

1. ELISA merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur jumlah suatu protein dalam sampel
2. Nilai $R^2 = 0.976$ menunjukkan pelaksanaan serial standar tidak 100% akurat.
3. Standar deviasi yang besar disebabkan pengukuran dilakukan pada jumlah sampel yang tidak sama besar.

VI. Saran

1. Pada praktikum selanjutnya, apabila akan dilakukan pengukuran 4x maka jumlah darah yang diambil harus lebih banyak, agar mencukupi plasma yang dibutuhkan
2. Pada praktikum selanjutnya dapat disarankan agar proses praktikum dikerjakan masing-masing kelompok (tidak bersama-sama bergantian), agar praktikan dapat lebih terampil dan bertanggungjawab pada pelaksanaan praktikum, namun sebagai konsekuensinya, alat dan bahan juga perlu disesuaikan jumlahnya.
3. Semua alat dan bahan yang akan digunakan sebaiknya dipersiapkan sebelum praktikum akan dimulai sehingga praktikum dapat dilaksanakan dengan efisien.