LAPORAN PRAKTIKUM

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

Ade Sinaga Seri Rayani Bangun Kamis 9 Januari 2014, pukul 09.00-16.00

1. TUJUAN PRAKTIKUM

Agar mahasiswa mampu

- 1.1. Mengerti pemeriksaan manan binding lectin pada plasma darah dengan tehnik ELISA
- 1.2. Mempersiapkan larutan wash buffer, larutan callibrator, standar MBL dan larutan pewarna
- 1.3. Melakukan pengenceran serial standard
- 1.4. Mengukur kadar susbtrat pada serialstandard berdasarkan serapan spektrofotometri
- 1.5. Menerapkan pemeriksaan manan binding lectin pada plasma darah tehnik ELISA dengan benar
- 1.6. Mengetahui hasil ikatan antigen-antibodi spesifik
- 1.7. Mengolah data yang diperoleh dari praktikum untuk memperoleh regresi linier
- 1.8. Membuat dan menginterpretasi grafik

2. PENDAHULUAN

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah suatu teknik biokimia digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. ELISA bisa digunakan unruk 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. Dalam pengertian sederhana, sejumlah antigen yang tidak dikenal ditempelkan pada suatu permukaan, kemudian antibodi

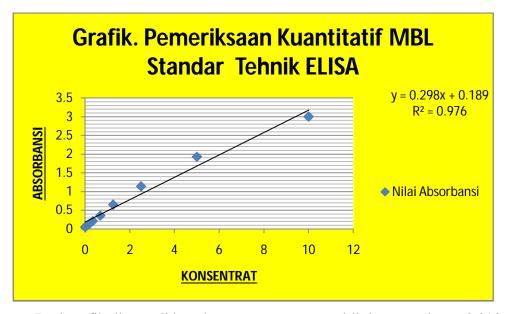
spesifik dicucikan pada permukaan tersebut, sehingga akan berikatan dengan antigennya. Antibodi ini terikat dengan suatu enzim, dan pada tahap terakhir, ditambahkan substansi yang dapat diubah oleh enzim menjadi sinyal yang dapat dideteksi. Dalam ELISA fluoresensi, saat cahaya dengan panjang gelombang tertentu disinarkan pada suatu sampel, kompleks antigen/antibodi akan berfluoresensi sehingga jumlah antigen pada sampel dapat disimpulkan berdasarkan besarnya fluoresensi denan menggunakan spectrofotometer. Spectrofotometer adalah sebuah alat yang dapat mengukur jumlah dari cahaya yang menembus sumuran dari microplate. Kompleks antigen-antibodi yang kita buat pada well mcroplate 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. Mannose-binding lectin (MBL), juga disebut protein mannose-binding protein atau mannanbinding (MBP), merupakan lektin yang berperan dalam kekebalan bawaan. MBL adalah satu-satunya collectin yang mengaktifkan komplemen. MBL menyerupai struktur kuaterner protein komplemen C1q, yang mengakui target melalui cluster biaya. Pengikatan MBL ke permukaan mengaktifkan protease serin MBL -associated (MASPs), MBL mengaktifkan komplemen dengan adanya mekanisme yang sangat mirip dengan C1q, dan melibatkan aktivitas opsonic komplemen mikro - organisme yang jelas. Konsentrasi serum MBL sangat bervariasi pada manusia. Variabilitas ini sebagian besar terkait dengan mutasi yang menyebabkan substitusi asam amino di wilayah kolagen - seperti yang mengurangi MBL perakitan dan stabilitas. Banyak penelitian menunjukkan bahwa kekurangan MBL dikaitkan dengan kerentanan terhadap berbagai penyakit menular dan inflamasi

3. HASIL PRAKTIKUM

Tabel. 1. Hasil Konsentrasi dengan Nilai Absorbansi

Tabung	Konsentrasi Yang	Konsentrasi Yang	Nilai Absorbansi	
	Dihitung (ng/mL)	Didapat (ng/mL)		
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	

Gambar. Grafik1. Hasil Pemeriksaan Kuantitatif MBL standar Tehnik ELISA



Dari grafik di atas didapatkan persamaan regresi liniernya yaitu y=0.298x+0.189 di mana y adalah nilai absorbansi sedangkan x adalah nilai konsentrasi. 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. Hasil rata-rata konsentrasi MBL sampel plasma masing-masing praktikan

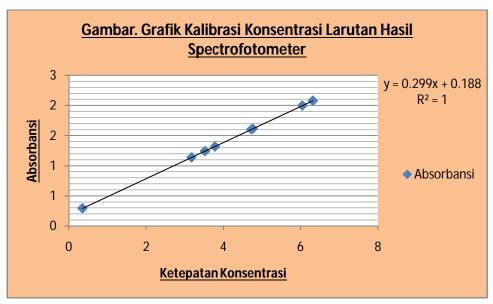
Sampel Plasma	Nilai Absorbansi Sampel Plasma	Konsentrasi MBL Sampel Plasma (Pengenceran 400x) (ng/mL)	Konsentrasi MBL Sampel Plasma (ng/mL)
Amirul 1	2.164	6.63	2651.01
Amirul 2	2.130	6.51	2605.37
Amirul 3	2.138	6.54	2616.11
Amirul 4	2.228	6.84	2736.91
Barlian 1	0.447	0.87	346.31
Barlian 2	0.658	1.57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

Tabel. 3. Hasil Spectrofotometer

No Well/ sampel	Konsentrasi dalam Pengenceran	Ketepatan Konsentrasi	Absorbansi	Log. Absorbansi	Absorbansi Rata-rata
A08/Ade	10	3,17	1,137	0.05576	0.197
B08/Ade	5	3,78	1.319	0.12024	0.379
C08/Ade	2,5	3,52	1.241	0.09377	0.301
D08/Ade	1,25	0,351	0.294	-0.53165	-0.646
E08/Seri	0,675	4,76	1.614	0.20790	0.674
F08/Seri	0,3875	6,04	1.997	0.30037	1.057
G08/Seri	0,16875	6,31	2.077	0.31743	1.137
H08/Seri	0	4,72	1.602	0.20466	0.662

Gamabar 2. Grafik kalibrasi konsentrasi larutan Hasil Spectrofotometer

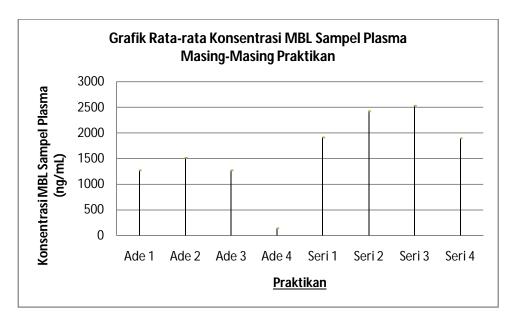


Dari grafik diatas didapatkan hasil regresi liniernya $y= y = 0.299x + 0.188 R^2 = 1$

Tabel. 4. Hasil konsentrasi MBL dengan kesesuain konsentrasi

Sampel Plasma	Nilai Absorbansi Sampel Plasma	Konsentrasi MBL Sampel Plasma (Pengenceran 400x) (ng/mL)	Konsentrasi MBL Sampel Plasma (ng/mL)	Konsentrasi rata-rata	Standar Deviasi
Ade 1	1.137	3.18	1272.48	1050.67	722.88
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	2192.62	521.33
Seri 2	1.997	6.07	2426.85		
Seri 3	2.077	6.34	2534.23		
Seri 4	1.602	4.74	1896.64		

Gambar 3. Hasil konsentrasi MBL dengan kesesuain konsentrasi



4. PEMBAHASAN

ELISA adalah suatu metode yang dikerjakan sebagai sarana mengukur kadar antigen atau antibodi dalam suatu medium cair, seperti serum atau organ yang telahdicairkan /dilarutkan. Metode ELISA yang dilakukan dalam praktikum ini merupakan metode untuk mengukur kadar Konsentrasi MBL Sampel Plasma darahh. adanya ikatan antigen-antibodi yang akan dibaca dengan reaksi enzimatis yang dapat mengakibatkan terjadinya perubahan intensitas warna pada larutan. Intensitas warna ini kemudian akan diukur pada ELISA reader. Penggunaan model ELISA ini bertujuan supaya terjadi amplifikasi reaksi enzimatis yang sehingga intensitas warna yang terjadi akan lebih kuat dan pembacaannya juga lebih mudah. Pada praktikum pemeriksaan plasma darah ini dilakukan oleh seluruh praktikan secara bergantian dari hasil pemeriksaan seluruh praktikan didapatkan dari grafik 1 di atas didapatkan persamaan regresi liniernya yaitu y=0.298x+0.189 di mana y adalah nilai absorbansi sedangkan x adalah nilai konsentrasi. Persamaan regresi linier yang didapat ini akan digunakan untuk menghitung konsentrasi MBL pada tiap-tiap sampel plasma darah (pengenceran 400x) yang telah dipersiapkan sebelumnya ketepatan konsentrasi dengan regresi linier. Pada hasil ELISA ini yang terdapat pada grafik 2 hasil spektofotometer Ade dan Seri didapatkan nilai R² pada kurva 1 yang artinya tingkat akurasinya berada dalam ketepatan konsentrasi yang baik karena akurasi yang baik dibutuhkan nilai R² mendekati 1.

Karena ketepatan jarak pada hasil spektofotometer Ade dan Seri ketepatan konsentrasi dan absorbansinya sehingga dapat diberlakukan hukum lambert. Dari tabel 2 yang tertera di atas, menunjukan 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 stabildibandingkan dengan praktikan lainnya, sedangkan hasil pemeriksaan kuantitatif MBL sampel plasma praktikan Yuni paling tidak stabil dibandingkan dengan praktikan lainnya.

5. KESIMPULAN

- 5.1. Diketahui dari grafik 1 persamaan regresi linier y=0.298x+0.189 dengan R2= 0.976. Hasil ini masih cukup jauh dari persamaan regresi linier yang diharapkan yaitu dengan nilai R²= 1 dikarenakan akan menyebabkan hasil pengukuran MBL sampel plasma menggunakan 0.00
- 5.2. Diketahui dari grafik 2 Dari grafik diatas didapatkan hasil regresi liniernya y = y = 0.299x + 0.188 Hasil ini sama dengan regresi linier sesuai yang diharapkan dengan nilai $R^2 = 1$.
- 5.3. 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

SARAN

1. Sarana dan prasarana kalau bisa dibuat prosedurnya supaya bisa belajar mandiri