



**BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM**

# **IMUNOLOGI**

DISUSUN OLEH :

**Dr. Rike Oktarianti, M.Si.  
Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.**

Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Jember

## KATA PENGANTAR

Buku pedoman praktikum Imunologi ini digunakan sebagai pedoman dalam bekerja di laboratorium untuk praktikum mahasiswa yang menempuh MK Imunologi. Kegiatan praktikum Imunologi mendukung capaian pembelajaran mahasiswa melalui praktek langsung pada teknik-teknik dasar penelitian imunologi yang meliputi uji interaksi antigen-antibodi, perhitungan jumlah sel leukosit, teknik koleksi sampel darah dan preparasi serum, preparasi metode ELISA, uji dan identifikasi protein imunogenik hingga pada kuantifikasi kadar sitokin (IgG).

Penyusunan buku petunjuk praktikum ini dilakukan dengan tetap mempertimbangkan adanya “*update*” informasi dan pengetahuan sesuai dengan perkembangan imunologi saat ini. Namun demikian sangat disadari bahwa penyusunannya tidak lepas dari kekurangan, oleh karena itu kami terbuka terhadap masukan yang konstruktif dari berbagai pihak untuk peningkatan kualitas praktikum MK Imunologi.

Pada kesempatan ini kami juga mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan materi maupun petunjuk teknis sehingga terwujud buku pedoman praktikum ini.

Jember, 15 Februari 2024  
Penyusun

## TATA TERTIB PRAKTIKUM IMUNOLOGI

Tata tertib dalam menjalankan praktikum:

1. Mempelajari acara-acara praktikum dengan membuat pendahuluan, metode dalam bentuk bagan kerja sebelum melakukan praktikum
2. Masuk ke dalam laboratorium 5 menit sebelum praktikum dimulai
3. Hanya buku kerja yang dibawa ke ruang praktikum
4. Memperhatikan petunjuk-petunjuk yang diberikan oleh dosen atau asisten
5. Alat-alat yang dipakai harus dalam keadaan bersih dan utuh. Kalau ada kerusakan supaya segera melapor pada asisten
6. Bertanggung jawab terhadap alat-alat yang dirusakkan
7. Tidak boleh makan, minum, merokok di ruang praktikum selama bekerja
8. Kalau berhalangan hadir, harus memberi tahu secara tertulis
9. Selama praktikum diharuskan selalu menggunakan jas lab.

# ACARA 1

## UJI INTERAKSI ANTIGEN ANTIBODI (PENGUJIAN RHESUS)

### A. PENDAHULUAN

Sistem penggolongan darah besar yang dikenal adalah sistem ABO (golongan darah A, B, AB, dan O) serta sistem penggolongan darah Rhesus (Rh+ dan Rh-). Rhesus adalah sistem penggolongan darah berdasarkan ada atau tidaknya antigen D di permukaan sel darah merah, nama lainnya adalah *faktor Rhesus atau faktor Rh*. Nama ini diperoleh dari monyet jenis Rhesus yang diketahui memiliki faktor ini pada tahun 1940 oleh Karl Landsteiner. Seseorang yang tidak memiliki faktor Rh di permukaan sel darah merahnya memiliki golongan darah Rh- (Rhesus Negatif). Mereka yang memiliki faktor Rh pada permukaan sel darah merahnya disebut memiliki golongan darah Rh+ (Rhesus Positif).

Jenis penggolongan ini seringkali digabungkan dengan penggolongan ABO dengan menambahkan "+" bagi pemilik faktor rhesus atau "-" bagi yang tidak memiliki faktor rhesus dalam darahnya, sehingga kita mengenal golongan darah A<sup>+</sup> atau A<sup>-</sup>, B<sup>+</sup> atau B<sup>-</sup>, AB<sup>+</sup> atau AB<sup>-</sup>, dan O<sup>+</sup> atau O<sup>-</sup>. Delapan puluh lima persen penduduk dunia memiliki faktor rhesus (Rh+) dalam darahnya, sementara 15% nya tidak memiliki faktor rhesus (Rh-) dalam darahnya. Pada sistem Rhesus pembentukan antibodi hampir selalu oleh suatu exposure apakah yaitu dengan melalui transfusi atau kehamilan. Sistem golongan darah Rhesus merupakan antigen yang terkuat bila dibandingkan dengan sistem golongan darah lainnya. Dengan pemberian darah Rhesus positif (D+) satu kali saja sebanyak ± 0,1 ml secara parenteral pada individu yang

mempunyai golongan darah Rhesus negatif (D-), sudah dapat menstimulasi pembentukan anti Rhesus pada orang tersebut.

## B. TUJUAN

Untuk mengetahui proses interaksi antigen-antibodi, dan mampu mengetahui reaksi positif maupun negatif dari model tes aglutinasi.

## C. ALAT DAN BAHAN

- 1) Kertas putih polos
- 2) Alkohol 70%
- 3) *Blood Lancet* steril
- 4) Tusuk gigi
- 5) Kapas
- 6) Serum Anti D
- 7) Larutan garam fisiologis
- 8) Gelas benda

## D. PROSEDUR KERJA

- Pengambilan sampel darah
  - 1) Bersihkan jari tangan yang akan diambil darahnya menggunakan alkohol 70%
  - 2) Siapkan *blood lancet* yang steril yang disobek hanya bagian ujung tajamnya saja.
  - 3) Usahakan tidak menusuk ujung jari sendiri, tetapi mintalah bantuan rekan anda untuk melakukannya.
  - 4) Tusuklah secara hati-hati ujung jari dengan *blood lancet* sampai terlihat adanya tetesan darah
  - 5) Letakkan darah yang menetes ke atas gelas benda (dua tetes)
  - 6) Tetesi masing-masing tetesan darah dengan serum Anti D
  - 7) Apabila darah kurang encer dapat ditambahkan larutan garam fisiologis

- 8) Perhatikan ada atau tidak adanya penggumpalan yang terjadi.
- 9) Tetesan yang menggumpal akan mengindikasikan golongan darah dari pemiliknya.



## ACARA 2

### PERHITUNGAN SEL LEUKOSIT

#### **A. TUJUAN :**

Tujuan kegiatan ini adalah mengetahui teknik perhitungan jumlah sel leukosit.

#### **B. DASAR TEORI :**

Darah terdiri dari komponen cair yang disebut plasma dan berbagai unsur yang dibawa dalam plasma yaitu sel-sel darah. Sel-sel darah terdiri dari eritrosit atau sel darah merah, yaitu sel yang mengangkut oksigen, leukosit atau sel darah putih yaitu sel yang berperan dalam kekebalan dan pertahanan tubuh dan trombosit yaitu sel yang berperan dalam homeostasis. Sel darah putih memiliki ciri tidak berwarna, memiliki inti, dapat bergerak secara amoeboid, dan dapat menembus dinding kapiler atau diapedesis. Leukosit dibedakan menjadi granuler dan agranuler. Granuler meliputi Basofil, Eosinofil, dan Neutrofil sedangkan agranuler meliputi Limfosit dan Monosit. Leukosit memiliki fungsi yang umum yaitu sebagai defensif dan reparatif. Fungsi defensif yaitu mempertahankan tubuh dari benda-benda asing yang dilakukan oleh neutrofil dan monosit. Fungsi reparatif yaitu memperbaiki atau mencegah kerusakan terutama kerusakan vaskuler. Peningkatan jumlah leukosit disebut Leukositosis yang menunjukkan adanya proses infeksi atau radang akut, misalnya pneumonia atau radang paru-paru, meningitis atau radang selaput otak. Sedangkan penurunan jumlah Leukosit disebut Leukopeni yang dapat terjadi pada infeksi tertentu terutama virus, malaria, alkoholik, dan lain-lain.

#### **C. ALAT DAN BAHAN :**

Mikroskop, gelas benda, gelas penutup, pipet tetes, papan dan alat seksi, hemasitometer, lar. Hayem, lar. Turk dan EDTA (heparin).

Hewan coba : Hewan poikilothermik, misalnya kadal, katak dan lain-lain.

## D. Penjelasan Haemocytometer dan pipet darah :

### 1. Haemocytometer

Terbuat dari sepotong gelas berukuran 3,5 x 7,5. Pada salah satu permukaannya terdapat petak perhitungan, bewarna bening dengan banyak garis. Di sisi kanan kiri petak ini terdapat bagian yang agak menonjol setinggi 1/10 mm, sehingga jika petak hitung ini ditutup dengan gelas penutup akan terdapat jarak antara petak hitung dengan gelas penutup setinggi 1/10 mm (lihat gambar 1).

Petak hitung mempunyai luas 3 x 3 mm<sup>2</sup>. Luas tersebut dibagi menjadi 9 petak kecil masing-masing seluas 1 x 1 mm<sup>2</sup>.

Untuk perhitungan sel darah merah dipakai petak hitung yang berada di tengah (petak yang dibatasi garis rangkap), sedang untuk perhitungan sel darah putih berada pada keempat sudut petak (lihat gambar 2). Petak perhitungan sel darah merah terbagi menjadi 25 petak besar (lihat gambar 3). Petak hitung untuk darah putih terbagi menjadi 16 petak kecil seluas ¼ x ¼ mm<sup>2</sup>.

### 2. Pipet darah

Berupa mikropipet yang pada bagian tengahnya terdapat penggelembungan dengan volume 100 x volume pipet di bawahnya (untuk pipet darah merah) dan 100 x (untuk pipet darah putih). Pada bagian yang menggelembung ini terdapat butir kecil warna merah (untuk pipet darah merah) dan butir darah putih (untuk pipet darah putih). Pada batang pipet bagian bawah bagian yang menggelembung tertera angka 0,5 dan 1 (pada pipet darah merah maupun pipet darah putih). Sedangkan sedikit di atas bagian yang menggelembung tertera angka 101 untuk pipet darah merah dan 11 untuk pipet darah putih (lihat gambar 5 dan 6). Jika darah dihisap sampai angka 0,5 dan cairan pengencer dihisap sampai angka 11, maka pengencerannya adalah  $10/0,5 = 20x$ . Jika darah dihisap sampai angka 0,5 dan cairan pengencer dihitung sampai angka 101, maka pengencerannya adalah  $100/0,5 = 200x$ .

## E. Cara membersihkan pipet darah merah

Apabila saudara gagal pada saat pengambilan darah (misalnya terdapat gelembung udara), maka pipet harus dibersihkan dengan cara :

1. Keluarkan darah dari pipet dengan cepat, dengan jalan meniup melalui karet.
2. Isi pipet darah dengan aquadest dengan jalan menghisapnya, kemudian keluarkan.

Ulangi beberapa kali sampai pipet bersih. Bila dengan cara ini belum bersih (masih ada noda darah), isi pipet dengan HCl 1%, kocok, kemudian HCl dikeluarkan. Cuci kembali dengan aquadest.

3. Bila pipet sudah bersih, isi dengan alkohol 95%, kemudian keluarkan alkoholnya.
4. Keringkan dengan *air blower*.

## F. Cara menghitung sel darah

### 1. Menghitung sel darah putih

Luas 4 petak yang masing- masing terdiri atas 16 petak kecil  
 $=4 \times 1 \times 1 \text{ mm}^2 = 4 \text{ mm}^2$  (Gambar 1 petak no 1,2,3, dan 4)

Volume darah yang ada dalam 4 petak tersebut =  $4 \times \frac{1}{10} \text{ mm}^3$ .

Misalkan dalam 4 petak tersebut terdapat sel darah putih sejumlah N butir, maka dituliskan sebagai berikut :

1. Dalam  $\frac{4}{10} \text{ mm}^3$  darah terdapat N butir sel darah putih
2. Jadi dalam  $1 \text{ mm}^3$  darah terdapat  $\frac{10}{4}$  butir sel darah putih.
3. Karena darah tersebut diencerkan 200 x, berarti dalam  $1 \text{ mm}^3$  darah tanpa pengenceran terdapat  $200 \times \frac{10}{4} \times N$  butir = 50 N butir sel darah putih.

### 2. Perhitungan Sel Darah Putih

1. Darah dihisap dengan pipet darah putih sampai tanda 0,5. Setelah itu masukkan pipet ke dalam larutan Turk, dan dihisap sampai larutan dalam pipet mencapai angka 11.

2. Kocoklah pipet selama kira-kira 3 menit, kemudian buang beberapa tetes larutan dari pipet dengan menempelkan ujungnya pada kertas hisap.
3. Sentuhkan ujung pipet pada ruangan antara hemositometer dengan gelas penutupnya (hemisotemer sudah disiapkan di bawah mikroskop)
4. Hitung jumlah sel darah putih dalam petak perhitungan sel darah putih.



## **ACARA 3**

### **KOLEKSI DAN PREPARASI SERUM DARAH**

#### **A. DASAR TEORI**

Darah terdiri dari sel darah (eritrosit, leukosit, trombosit) dan plasma darah (fibrinogen, serum darah yang terdiri dari albumin dan globulin). Plasma darah adalah darah minus sel-sel darah dan masih mengandung fibrinogen. Serum adalah cairan darah/plasma yang tidak mengandung fibrinogen (komponen pembeku darah). Baik plasma maupun serum memiliki karakteristik berupa cairan bening berwarna kuning muda, warna serum mungkin berubah menjadi merah muda atau merah karena hemolisis, yaitu pecahnya sel darah merah, hal ini dimungkinkan karena penanganan yang tidak tepat dari sampel darah. Dalam pemanfaatannya plasma darah digunakan untuk transfusi darah, sedangkan yang digunakan dalam berbagai macam uji imunologis adalah serum karena tidak adanya zat antikoagulan, adanya zat antikoagulan dalam sampel akan dapat menyebabkan reaksi kimia yang dapat mempengaruhi hasil uji.

#### **B. TUJUAN**

Untuk mengetahui teknik koleksi darah dan preparasi darah menjadi sediaan serum.

#### **C. ALAT DAN BAHAN**

- 1) Vakultainer darah (tanpa koagulan)
- 2) Setrifus berpendingin
- 3) *Sput disposable* 5 mL
- 4) *Microtube* 1,5 mL
- 5) *Eppendorf stander*
- 6) Mikropipet
- 7) Mikrotip

#### D. PROSEDUR KERJA

- Pengambilan sampel darah manusia penderita DBD, neonatus, dan manusia sehat dari daerah endemik DBD serta preparasi serum.
  - 1) Bersihkan bagian lengan manusia (pada daerah *vena brachial*) menggunakan alkohol 70%
  - 2) Siapkan *sput disposable* yang steril.
  - 3) Ambil secara hati-hati darah  $\pm 3$  mL dari bagian lengan (pada point no.1) dengan *sput disposable* sampai terlihat adanya darah di dalam penampung *sput*.
  - 4) Letakkan darah segar ke dalam vakultainer (tanpa koagulan).
  
- Preparasi serum darah manusia penderita DBD, neonatus, dan manusia sehat dari daerah endemik DBD serta preparasi serum.
  - 1) Inkubasi darah di dalam vakultainer selama  $\pm 10 - 15$  mL.
  - 2) Ambil cairan bening pada darah yang diendapkan di dalam vakultainer
  - 3) Pindahkan cairan bening ke dalam *eppendorf* 1,5 mL.
  - 4) Kemudian cairan bening di dalam *eppendorf* tersebut disentrifus dengan kecepatan 3200 rpm selama 15 menit pada suhu 27°C.
  - 5) Pindahkan supernatan (serum) ke dalam *eppendorf* 1,5 mL (baru).
  - 6) Tuliskan label pada *eppendorf* tersebut dan simpan sediaan serum pada suhu -20°C.

## ACARA 4

### PERSIAPAN REAGEN UNTUK ANALISIS ELISA

- **Coating Antigen**  
1 x 1 x 50  $\mu$ l x jumlah well yang digunakan
- **Antigen (10  $\mu$ g/mL)**  
1 x 1 x 50  $\mu$ l x jumlah well yang digunakan
- **Washing Buffer**  
4 x 3 x 250  $\mu$ l x jumlah well yang digunakan
- **Blocking Buffer**  
1 x 1 x 200  $\mu$ l x jumlah well yang digunakan
- **Antibodi Diluen**  
Antibodi Primer 1:100  
1/100 x (50  $\mu$ l x jumlah well yang digunakan)  
  
Antibodi Sekunder 1:1000  
1/1000 x (50  $\mu$ l x jumlah well yang digunakan)
- **Substrat TMB**  
1 x 1 x 50  $\mu$ l x jumlah well yang digunakan
- **Pembuatan Reagen 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**  
1 x 1 x 50  $\mu$ l x jumlah well yang digunakan  
Total volume yang dibutuhkan untuk PBS adalah total kebutuhan penggunaan *washing buffer*, *blocking buffer* dan antibodi diluen

- **Cara membuat PBS-T (Tween 0,05%)**  
0,05/100 x total PBS yang digunakan
  
- **Cara membuat blocking buffer (BSA 1%)**  
1/100 x total blocking buffer yang digunakan



## ACARA 5

### ISOLASI KELENJAR SALIVA DAN EKSTRAKSI PROTEIN KELENJAR SALIVA NYAMUK

#### A. DASAR TEORI

*Aedes aegypti* merupakan vektor yang memiliki peranan paling besar dalam penyebaran virus *dengue*. Virus dengue ditransmisikan oleh nyamuk betina dewasa saat melakukan *blood feeding*. Untuk dapat menghambat proses transmisi tersebut diperlukan vaksin yang mampu melawan ataupun memblokir molekul yang berperan dalam proses transmisi patogen di dalam tubuh vektor. Vaksin tipe ini disebut TBV (*Transmission Blocking Vaccine*). Upaya pengembangan TBV salah satunya dengan memanfaatkan komponen saliva vektor. Saliva menjadi kunci penting dalam siklus transmisi virus dengue ke dalam tubuh inang karena memiliki komponen anti hemostasis, anti inflamasi dan imunomodulator yang dapat memudahkan transmisi patogen ke dalam tubuh inang. Selain itu, kelenjar saliva nyamuk *Aedes aegypti* juga mengandung protein imunogenik 31 kD dan 56 kD, yang diduga mampu memodulasi respon imun pada inang di daerah endemik DBD (Oktarianti *et al.*, 2014). Secara struktural kelenjar saliva nyamuk *Aedes aegypti* terdiri dari satu pasang dengan jumlah total enam lobus, kedua bagian tersebut dihubungkan oleh saluran saliva (*Salivary Duct*). Masing-masing bagian terdiri dari tiga lobus, satu bagian terletak di tengah (*single medial*) dan dua bagian yang terletak di pinggir (*Lateral Lobes*). Pada lobus bagian pinggir (*Lateral Lobes*) dibedakan menjadi dua bagian yaitu *Proximal Lateral* (PL) dan *Distal Lateral* (DL).

#### B. TUJUAN

Untuk mengetahui cara isolasi kelenjar saliva nyamuk dengan teknik *microdissection* dan untuk mengetahui teknik ekstraksi protein kelenjar saliva nyamuk.

### C. ALAT DAN BAHAN

- 1) Cup wadah nyamuk betina dewasa
- 2) Mikroskop stereo
- 3) Jarum diseksi serangga
- 4) Gelas obyek
- 5) Petridish
- 6) *Microtube* 1,5 mL (steril)
- 7) Mikrotip
- 8) 0,5 % NaCl
- 9) 1 mM PMSF dalam PBS

### D. PROSEDUR KERJA

#### ➤ Isolasi Kelenjar Saliva Nyamuk

- 1) Nyamuk *Ae. aegypti* betina dimasukkan ke dalam gelas plastik dan diletakkan di dalam lemari pendingin 4°C selama  $\pm$  20 detik.
- 2) Identifikasi spesies dilakukan dengan cara melihat garis pada bagian dorsal torak nyamuk, nyamuk *Ae. aegypti* memiliki 2 garis sejajar yang diapit dengan garis melengkung pada kedua sisinya.
- 3) Identifikasi jenis kelamin nyamuk dilakukan dengan mengamati struktur antena. Nyamuk *Ae. aegypti* betina memiliki antena dengan rambut yang jarang, sedangkan *Ae. aegypti* jantan memiliki antena dengan rambut yang banyak.
- 4) Larutan 0,5% NaCl diteteskan pada gelas benda
- 5) Nyamuk betina dewasa diambil dengan cara menusuk bagian toraknya menggunakan jarum diseksi, kemudian dibuang bagian kaki nyamuk dengan cara ditarik perlahan menggunakan tangan
- 6) Tubuh nyamuk diletakkan di atas gelas benda dengan larutan 0,5% NaCl.
- 7) Gelas benda tersebut kemudian diletakkan dibawah mikroskop stereo.

- 8) Jarum diseksi digunakan untuk melakukan teknik mikrodiseksi dengan cara tangan kiri menekan dengan lembut bagian toraks dan tangan kanan menarik bagian kepala perlahan-lahan, apabila tarikan benar maka akan tampak *salivary gland* yang berwarna bening dan memiliki jumlah total 6 lobus
- 9) *Salivary gland* yang telah didapat kemudian diletakkan di dalam microtube yang berisi larutan 1 mM PMSF dalam PBS dengan perbandingan 1:1 (10 pasang SG dalam 10  $\mu$ L 1 mM PMSF dalam PBS)
- 10) *Salivary gland* kemudian disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  hingga digunakan

➤ **Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva Nyamuk**

- 1) Kelenjar saliva yang telah dibekukan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  kemudian di *thawing*
- 2) Kemudian kelenjar saliva ditambahkan dengan buffer lisis dengan perbandingan 1:1 (10 pasang SG dalam 10  $\mu$ L 1 mM PMSF dalam PBS dan ditambahkan 10  $\mu$ L buffer lisis)
- 3) Larutan kemudian dihomogenisasi dengan vortex.
- 4) Larutan diletakkan pada *water sonicator* selama 45 menit.
- 5) Sampel protein disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  hingga digunakan.

## **ACARA 6**

### **KUANTIFIKASI KADAR IgG MANUSIA DENGAN METODE ELISA**

#### **A. DASAR TEORI**

ELISA merupakan salah satu metode yang digunakan untuk deteksi antibodi pada serum hewan dan serum manusia. Kelebihan dari uji ELISA adalah dapat dilakukan dalam empat jam, tidak menggunakan virus hidup, tidak memerlukan laboratorium dengan fasilitas biosekuriti yang tinggi. ELISA merupakan reaksi pengikatan antara antigen dengan antibodi dengan bantuan enzyme sebagai penanda. ELISA merupakan teknik laboratorium yang digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi atau antigen dalam sampel. Secara umum teknik ELISA yang digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi adalah Indirect ELISA, sedangkan sandwich ELISA untuk deteksi antigen. Dalam indirect ELISA untuk deteksi antibodi, microplate 96-wells yang berbahan polystyrene dilapisi dengan antigen dan diinkubasikan sebelum dicuci. Serum yang diuji ditambahkan ke microplate sehingga antibodi dalam serum dapat berikatan dengan antigen. Setelah inkubasi dan pencucian untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat, kehadiran dari setiap antibodi terikat terdeteksi dengan penambahan antiglobulin kimia terkait dengan enzim (konjugat). Komplek ini mengikat antibodi, setelah inkubasi dan pencucian, dapat dideteksi dan diukur dengan penambahan substrat. Intensitas warna yang berkembang sebanding dengan jumlah antibodi yang hadir dalam serum yang diuji.

#### **B. Tujuan :**

Untuk mengukur kadar IgG pada sampel serum manusia serta mengetahui respon imun manusia yang hidup di wilayah endemik DBD terhadap paparan saliva nyamuk *Ae. aegypti*.

### C. Alat dan Bahan :

#### ➤ Alat

- Elisa Plate
- Elisa reader
- Mikropipet
- Vortex
- Stirer
- pH meter

#### ➤ Bahan

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- DI Water
- NaN<sub>3</sub>
- NaCl
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- KCl
- Tween 0.5 %
- BSA
- H<sub>2</sub>O
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- TMB
- Metanol
- Antibodi Sekunder

### D. PROSEDUR KERJA

#### ➤ Coating Antigen

- 1) SGE *Ae.aegypti* dalam bicarbonate buffer @ 50 µl
- 2) Ditungkup plate sealed, Bungkus Aluminium foil
- 3) Shaker 5 menit, inkubasi overnight 4°C
- 4) Buang dan cuci dengan PBST @ 250 µl 3X

➤ **Coating Blocking Buffer**

- 1) @ 200  $\mu$ l
- 2) Ditutup plate sealed, Bungkus Alumunium foil
- 3) Shaker 5 menit, inkubasi 2 jam 37°C
- 4) Buang dan cuci dengan PBST @ 250  $\mu$ l 3X

➤ **Coating Antibodi Primer (Serum)**

- 1) @ 50  $\mu$ l
- 2) Ditutup plate sealed, Bungkus Alumunium foil
- 3) Shaker 5 menit, inkubasi 1 jam 37°C
- 4) Buang dan cuci dengan PBST @ 250  $\mu$ l 3X

➤ **Coating Antibodi Sekunder (Anti-Human IgG)**

- 1) @ 50  $\mu$ l
- 2) Ditutup plate sealed, Bungkus Alumunium foil
- 3) Shaker 5 menit, inkubasi 1 jam 37°C
- 4) Buang dan cuci dengan PBST @ 250  $\mu$ l 3X

➤ **Substrat TMB**

- 1) Masukkan substrat TMB @ 50  $\mu$ l di dalam ruang gelap
- 2) Inkubasi 30 menit dalam ruang gelap

➤ **Stop Solution**

- 1) Masukkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> @ 50  $\mu$ l
- 2) Inkubasi 10 menit di suhu ruang

➤ **Reader 450 nm**

## ACARA 7

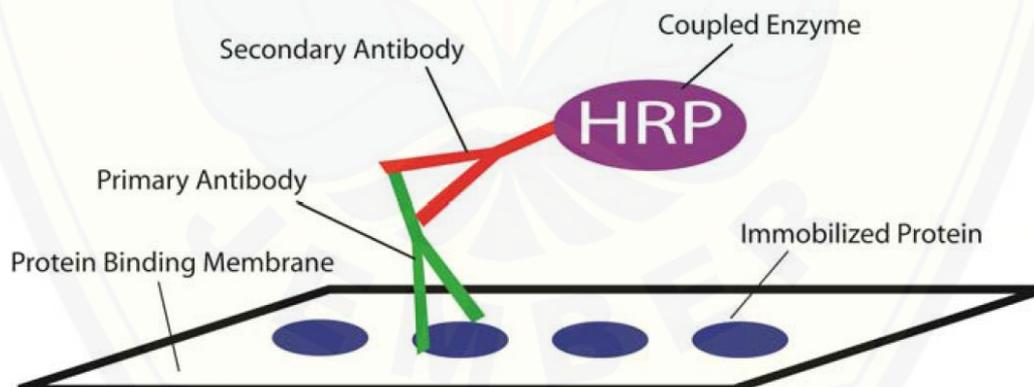
### UJI PROTEIN IMUNOGENIK DENGAN METODE DOT BLOT

#### A. DASAR TEORI

Kelenjar saliva nyamuk dan arthropoda lain mengandung bahan yang bersifat imunogenik yaitu dapat memunculkan respon imun adaptif yang dapat merangsang respon antibodi pada penduduk yang hidup di daerah endemik atau pada wisatawan yang terpapar oleh vektor di daerah tropis. Beberapa penelitian membuktikan bahwa gigitan vektor memberikan pengaruh positif terhadap reaksi imun inang. Komponen dalam kelenjar saliva mengandung protein aktif yang dapat memodifikasi respon haemostasis inang vertebrata melalui proses anti koagulasi untuk menghambat vasokonstriksi (vasodilator). Selain itu juga mengandung molekul spesifik (imunomodulator) yang berfungsi sebagai faktor anti inflamasi dan dapat menginduksi respon imun inang yang dapat berupa respon alergi yang diwujudkan oleh rasa gatal di kulit dan kemerahan di lokasi gigitan. Komponen vasodilator dan imunomodulator pada kelenjar saliva ini membantu vector dalam melakukan blood feeding pada inang. Untuk membuktikan bahwa kelenjar saliva nyamuk *Aedes aegypti* mengandung komponen protein imunogenik maka dilakukan uji analisis Dot Blot.

Analisis Dot Blot adalah teknik sederhana untuk menganalisis, mengidentifikasi protein dalam sampel biologis. Kemudahan dan kesederhanaan teknik membuat dot blotting alat diagnostik yang ideal. Teknik ini menyerupai Western Blot namun perbedaannya adalah protein sampel tidak dipisahkan melalui elektroforesis akan tetapi ditandai dengan template sirkuler secara langsung pada substrat membrane. Penggunaan dot blot dalam Imunodeteksi untuk mengidentifikasi protein spesifik, misalnya penanda protein untuk penyakit. Protein yang telah terikat pada membran (PVDF) akan bisa dideteksi dengan antibodi primer, antibodi

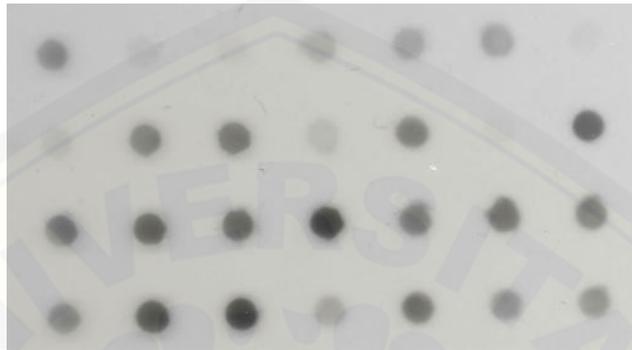
spesifik untuk protein target. Ikatan tersebut dapat divisualisasikan, baik dengan penanda tertentu yang berikatan dengan antibodi primer atau dengan penggunaan antibodi sekunder. Antibodi sekunder yang digunakan dapat yang terkonjugasi dengan enzim Horse Radish Peroksidase (HRP) atau Alkalin Posfatase (AP). Antibodi sekunder adalah antibodi umum yang mempunyai domain konstan imunoglobulin G dari spesies tertentu. Pada praktikum ini digunakan anti human IgG yang terkonjugasi dengan enzim AP karena antibodi primer yang digunakan adalah serum manusia. Reaksi antigen antibodi pada metode dot blot dapat divisualisasikan dengan enzim-enzim yang dapat mengkatalisis substrat untuk menghasilkan warna yang divisualisasikan pada membran PVDF, substrat yang digunakan adalah NBT/BCIP solution. Tahapan yang tidak kalah penting dalam Dot blot adalah tahapan blocking yaitu langkah pemblokiran (blocking), yang bertujuan untuk meningkatkan spesifisitas dengan mencegah interaksi non-spesifik yaitu dengan penggunaan skim milk atau Bovine Serum Albumin (BSA).



Hasil positif Dot Blot ditunjukkan dengan timbulnya warna dot biru keunguan yang mengindikasikan semakin banyak ikatan spesifik antara antigen antibodi. Jika tidak ada warna yang timbul menunjukkan tidak ada ikatan.. Untuk mengkuantifikasi hasil analisis Dot Blot berdasarkan densitas warna yang muncul dapat dilakukan dengan bantuan software *Corel*

*Photopaint 11*, dari program tsb akan diperoleh data berupa nilai densitas yang dinyatakan dengan pixel mean. Semakin rendah nilai pixel mean menunjukkan warna yang muncul semakin pekat.

Contoh Hasil Analisis Dot Blot :



### B. Tujuan :

Untuk mengetahui teknik deteksi protein imunogenik dengan metode dot blot.

### C. Alat dan Bahan :

#### Alat

- Micropipet
- Cawan Petri
- Shaker
- Ependorf

#### Bahan

- Membran PVDF
- Antibodi Primer (serum manusia pasien DBD, orang sehat, infant)
- Antibodi Sekunder (anti human IgG)
- Ekstrak Protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*
- Skim Milk 5 %
- Methanol
- TBS
- PBS

#### D. PROSEDUR KERJA

- 1) Potong membran PVDF 1 x 1 cm
- 2) Rendam dalam metanol 1 menit
- 3) Membran direndam dalam TBS 3 menit
- 4) Teteskan 5  $\mu$ l sampel protein SG dan kontrol negatif ditetesi dengan PBS
- 5) Dikering anginkan
- 6) Inkubasi dalam 5% skim milk dalam TBS, 1 jam (Blocking 1)
- 7) Cuci dengan TBS 3x @ 3 menit
- 8) Inkubasi selama 2 jam on shaker dengan antibodi primer + Skim milk 5% dalam TBS (1:500) @10 mL.
- 9) Cuci dengan TBS 3x @ 5 menit
- 10) Inkubasi selama 2 jam on shaker dengan skim milk 5% dalam TBS + Antibodi Sekunder (1:2500)
- 11) Cuci dengan TBS 3x @ 5 menit
- 12) Dikering anginkan
- 13) Inkubasi membran dalam 250  $\mu$ l NBT/BCIP 5-15 menit pada suhu ruang. Reaksi dihentikan dengan menambah H<sub>2</sub>O.
- 14) Pengamatan hasil dot blot.