



REPUBLIK INDONESIA  
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

## SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan : EC00201941420, 28 Mei 2019

**Pencipta**

Nama : **Dina Fatmawati, suparmi, , dkk**

Alamat : **Raya Kaligawe KM.4, Semarang, Jawa Tengah, 50112**

Kewarganegaraan : **Indonesia**

**Pemegang Hak Cipta**

Nama : **Dina Fatmawati, suparmi, , dkk**

Alamat : **Raya Kaligawe KM.4, Semarang, 9, 50112**

Kewarganegaraan : **Indonesia**

Jenis Ciptaan : **Buku Panduan/Petunjuk**

Judul Ciptaan : **Buku Petunjuk Praktikum Biologi: Untuk Modul Mikrobiologi, Virologi, Dan Imunologi**

Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia : **28 Mei 2019, di Semarang**

Jangka waktu perlindungan : **Berlaku selama hidup Pencipta dan terus berlangsung selama 70 (tujuh puluh) tahun setelah Pencipta meninggal dunia, terhitung mulai tanggal 1 Januari tahun berikutnya.**

Nomor pencatatan : **000143570**

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.  
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA  
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.  
NIP. 196611181994031001

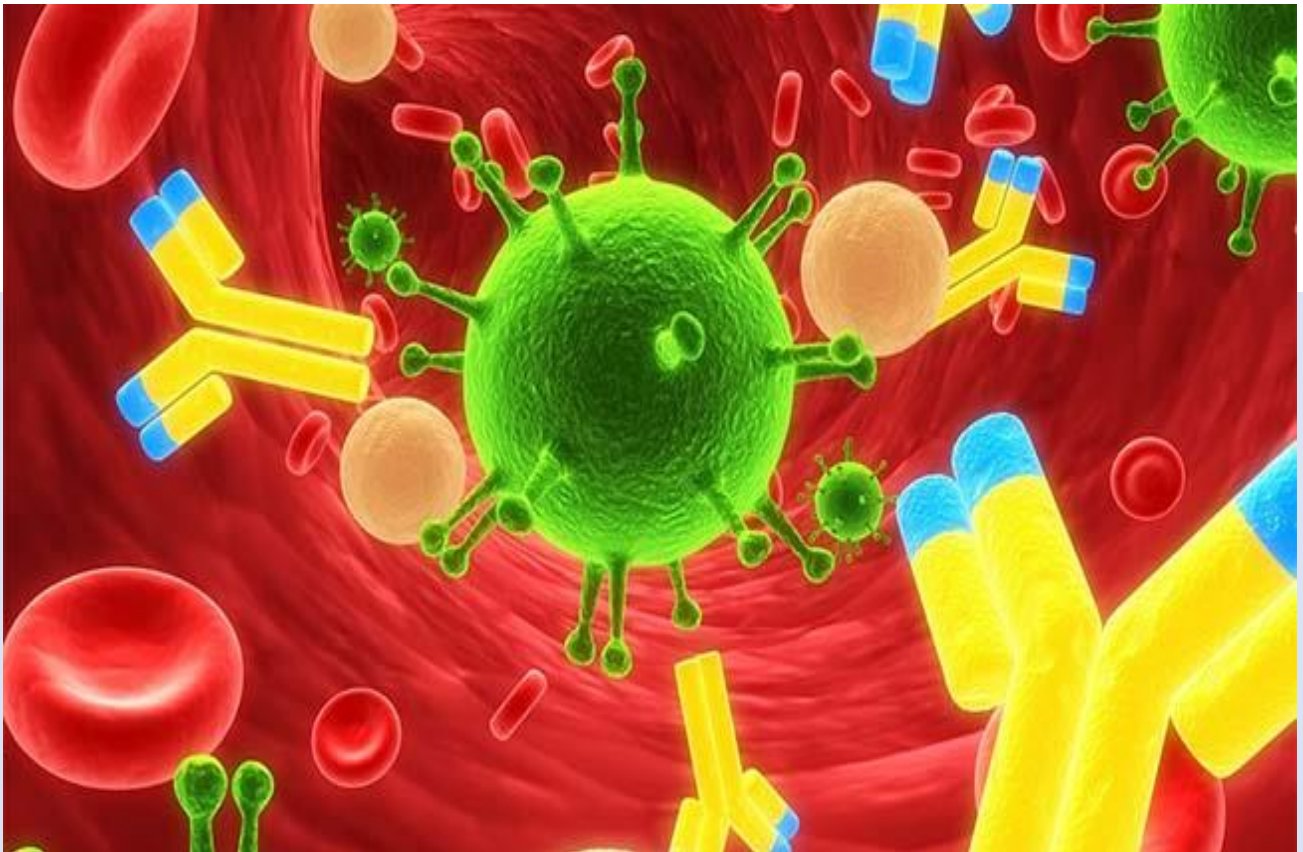
**LAMPIRAN PENCIPTA**

No	Nama	Alamat
1	Dina Fatmawati	Raya Kaligawe KM.4
2	suparmi	Perumahan Sembungharjo Permai E-29, Sembungharjo, Genuk
3	Iwang yusuf	Wonorejo Rt. 01/RW. 3, Wonorejo, Karanganyar
4	Israhnanto	Beruang Dalam VII No. 17

**LAMPIRAN PEMEGANG**

No	Nama	Alamat
1	Dina Fatmawati	Raya Kaligawe KM.4
2	suparmi	Perumahan Sembungharjo Permai E-29, Sembungharjo, Genuk
3	iwang yusuf	Wonorejo Rt. 01/RW. 3, Wonorejo, Karanganyar
4	israhnanto	Beruang Dalam VII No. 17





# **BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM BIOLOGI**

**Laboratorium Biologi  
Fakultas Kedokteran  
Universitas Islam Sultan Agung  
2018**

**BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM  
BIOLOGI**  
*Untuk modul Mikrobiologi, Virologi, dan Imunologi*

**Penulis:**

Dina Fatmawati, S.Si., M.Sc.

Suparmi, S.Si., M.Si

dr. Iwang Yusuf, M.Si

Dr. Drs. Israhnanto, M.Si

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang

**Hak Cipta dilindungi undang-undang © 2018, pada Penulis**

Hak publikasi pada Penerbit Fakultas Kedokteran UNISSULA

Dilarang memperbanyak, memperbanyak sebagian atau seluruh isi dari buku ini dalam bentuk apapun, tanpa izin tertulis dari penulis.

**Tahun 2018**

**Penerbit FAKULTAS KEDOKTERAN UNISSULA**

Jl. Raya Kaligawe km. 4 Semarang 50112

PO BOX 1054/SM,

Telp. (024) 6583584, Fax. (024) 6594366

**ISBN: xxxxxxxxxxxxxx**

## KATA PENGANTAR

Buku petunjuk ini digunakan untuk menunjang kegiatan pembelajaran Modul Imun dan kulit dan diperuntukkan bagi mahasiswa kedokteran. Isi buku petunjuk ini disusun oleh sebagian dosen bagian biologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung dengan menyitasi berbagai sumber referensi. Buku petunjuk ini dilengkapi dengan format laporan sementara yang dapat digunakan oleh praktikan sebagai tuntunan dalam membuat laporan resmi praktikum isolasi dan daya fagosit makrofag. Diagram alir kerja pada petunjuk praktikum ini diharapkan dapat mempermudah mahasiswa dalam mengaplikasi cara kerja yang tertulis.

Sel makrofag sebagai komponen *innate immunity* memiliki peran penting dalam memfagosit patogen, dimana pengenalan tersebut terjadi melalui mekanisme interaksi antara *pattern-Recognition Receptor* (PRR) dan *patogen-associated molecular pattern* (PAMPs/DAMPs). Pada praktikum kali ini, makrofag yang diisolasi merupakan makrofag yang berasal dari peritoneum, sedangkan bahan pada uji daya fagosit makrofag digunakan latex bead. Melalui buku petunjuk ini diharapkan mahasiswa dapat lebih memahami peran penting makrofag sebagai *professional phagocytic cell* dan limfosit dalam sistem imun serta teknik ELISA. Akhir kata, buku petunjuk ini masih sangat sederhana sehingga kritikan dan masukan untuk pengembangan buku ini kami akan terima dengan senang hati.

Mei 2018

Tim Penulis

**DAFTAR ISI**

KATA PENGANTAR.....	4
DAFTAR ISI .....	5
TATA TERTIB PRAKTIKUM .....	6
BIOHAZARD.....	7
RENCANA PEMBELAJARAN.....	8
ISOLASI DAN UJI DAYA FAGOSIT MAKROFAG .....	9
Tujuan praktikum .....	9
Dasar teori.....	9
Cara kerja.....	11
Instruksi kerja mahasiswa.....	13
LEMBAR KERJA PRAKTIKAN (LAPORAN SEMENTARA).....	15
ISOLASI DAN PROLIFERASI LIMFOSIT .....	18
Tujuan Praktikum .....	18
Dasar teori.....	18
Cara kerja.....	18
Instruksi kerja mahasiswa.....	20
LEMBAR KERJA PRAKTIKAN (LAPORAN SEMENTARA).....	21
ELISA.....	23
Tujuan Praktikum :.....	23
Dasar Teori.....	23
Alat dan bahan.....	24
Cara kerja.....	24
Instruksi kerja mahasiswa.....	26
LEMBAR KERJA PRAKTIKAN (LAPORAN SEMENTARA).....	28

### **TATA TERTIB PRAKTIKUM**

1. Saat praktikum berlangsung praktikan diwajibkan mengenakan jas praktikum dan membawa pensil warna.
2. Praktikan diwajibkan datang 10 menit sebelum praktikum dimulai untuk mengikuti pretest
3. Praktikan diwajibkan menguasai cara kerja dari materi yang akan dipraktikumkan
4. Praktikan berhak bertanya tentang hasil pengamatan kepada asisten mahasiswa
5. Praktikan tidak diperkenankan meninggalkan ruang praktikum saat praktikum berlangsung tanpa seijin asisten atau dosen yang berwenang.
6. Praktikan tidak diperkenankan membuat keonaran saat praktikum berlangsung
7. Setelah praktikum selesai, praktikan diwajibkan mengembalikan alat yang telah dipinjamkan oleh pihak laboratorium sesuai dengan keadaan awalnya.
8. Setelah selesai praktikum tiap kelompok diwajibkan membuat laporan sementara sesuai dengan format yang ada dan mendapatkan tanda asistensi oleh asisten atau dosen, dan dilampirkan pada laporan resmi.
9. Pembuatan laporan resmi dilakukan pada buku laporan yang telah disediakan oleh pihak laboratorium dan paling lambat dikumpulkan satu minggu setelah praktikum berlangsung.

## BIOHAZARD

Pada praktikum isolasi dan uji daya fagosit makrofag digunakan hewan uji berupa mencit. Bangkai mencit harus dikumpulkan menjadi satu wadah untuk kemudian dimusnahkan oleh teknisi laboratorium, sedangkan cairan yang berasal dari hewan coba wajib dikumpulkan menjadi satu dalam wadah kaca, sehingga mudah untuk disterilkan terlebih dahulu sebelum dibuang ke saluran pembuangan.

Limbah cairan berupa urin maupun feses tikus yang secara tidak sengaja keluar dan terjatuh pada meja praktikum wajib dibersihkan dengan menggunakan desinfektan.

Bahan yang digunakan pada praktikum isolasi makrofag terdapat bahan yang bersifat karsinogen seperti metanol, sehingga praktikan maupun pelaksana praktikum lainnya wajib mengenakan alat pelindung diri berupa jas praktikum yang terkancing dengan rapi, masker dan handscoon.

**Seluruh pelaksana praktikum wajib mengenali menaati peraturan didalam laboratorium biologi untuk menghindari resiko kecelakaan kerja dan menjaga keselamatan lingkungan.**



## RENCANA PEMBELAJARAN

**Jadwal pelaksanaan :**

Senin, 21 Mei 2018 jam 13.00 – 16.40 : Isolasi dan daya fagosit makrofag

Rabu, 23 Mei 2018 jam 13.00 – 16.40 : Isolasi dan proliferasi limfosit

Rabu, 30 Mei 2018 jam 13.00 – 16.40 : ELISA

**Penanggung jawab kegiatan praktikum :**

Kepala Laboratorium Biologi (Dina Fatmawati, M.Sc)

**Tim Pelaksana kegiatan :**

1. Teknisi (Sumardi)
2. Asisten Praktikum
3. Praktikan mahasiswa Prodi Farmasi Angkatan 2017

**Time table pelaksanaan praktikum**

Waktu pelaksanaan	Materi	Duras	Sarana penunjang	Pelaksana kegiatan
12.50 – 13.00	Pre test	10 menit	Komputer dan LCD	Asisten Lab.Biologi
13.00 – 13.15	Pengarahan teknis praktikum	15 menit	Komputer dan LCD	Dosen bagian biologi
13.15 – 13.30	Preparasi	15 menit	Alat dan bahan	Teknisi, asisten lab. Biologi, dan praktikan
13.30 – 15.00	Pelaksanaan praktikum	90 menit	Alat dan bahan praktikum	Teknisi, asisten lab. Biologi, dan praktikan
15.00 – 15.15	Sholat ashar	15 menit	Alat dan bahan praktikum	Teknisi, asisten lab. Biologi, dan praktikan
15.15 – 16.30	Pelaksanaan praktikum	75 menit	Alat dan bahan praktikum	Teknisi, asisten lab. Biologi, dan praktikan
16.30 – 16.40	Post test	10 menit	Komputer dan LCD	Asisten Lab.Biologi

## ISOLASI DAN UJI DAYA FAGOSIT MAKROFAG

### Tujuan praktikum

1. Mahasiswa mampu menjelaskan tentang prinsip isolasi makrofag dengan benar
2. Mahasiswa mampu menjelaskan cara kerja isolasi makrofag dengan benar
3. Mahasiswa mampu mengidentifikasi bentuk sel makrofag dan sel limfosit dengan menggunakan mikroskop sesuai dengan karakteristik yang dimiliki oleh sel tersebut
4. Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip pengujian daya fagositosis makrofag dengan benar
5. Mahasiswa mampu menghitung indeks fagositosis sesuai dengan rumus yang telah ditetapkan

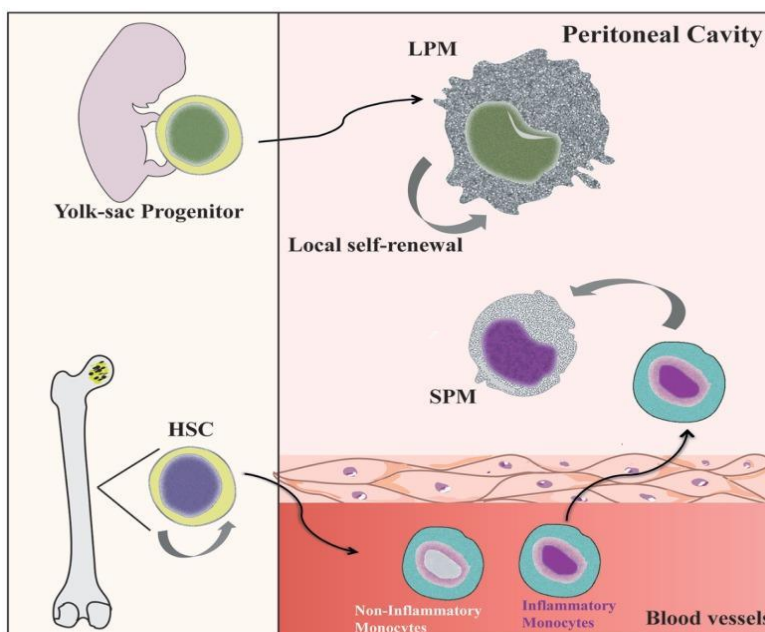
### Dasar teori

Sel makrofag merupakan sel mononuklear yang terdistribusi luas di tubuh dan berfungsi sebagai profesional *phagocytic cell*. Sel tersebut berperan dalam perkembangan, homeostasis, dan berpartisipasi dalam respon imun *innate* maupun adaptif salah satunya dalam penyembuhan luka (respon inflamasi). Sel makrofag pada jaringan berasal dari monosit atau berasal dari proliferasi lokal dari *embryonically-derived tissue-resident macrophage colony forming cells*. Monosit berasal dari *hematopoietic pluripotent stem cells* di sumsum tulang yang membelah dan berdiferensiasi menjadi monoblast, promonosit dan monosit. Monosit berdiferensiasi menjadi makrofag sesaat setelah memasuki jaringan. Selama terjadi inflamasi, sebagian besar makrofag berasal dari sel monosit di darah sebaliknya, pada keadaan homeostasis, sebagian besar makrofag berasal dari progenitor lokal.

Sel makrofag peritoneal memiliki ciri berbentuk spindle (gelendong) yang agak memanjang dengan lisosom yang terkonsentrasi dibagian bawah. Sel-sel makrofag terdapat pada : Jaringan ikat longgar berupa makrofag atau histiosit; Didalam darah berupa monosit; Didalam hati melapisi sinusoid dikenal dengan sel Kupffer; Makrofag perivascular sinusoid limpa, limfonodus, dan sumsum tulang; Pada susunan saraf pusat berupa mikroglia yang berasal dari mesoderm. Makrofag sangat sensitif terhadap endotoksin, sehingga reagen yang digunakan harus berkualitas tinggi dan bebas dari endotoksin, apabila hasil pemanenan diperoleh jumlah sel yang melebihi rentang

normal sel maka, dimungkinkan terjadi infeksi dalam koloni. Waktu pemanenan sel makrofag dari peritoneum seekor mencit tidak boleh lebih dari 6 menit.

Pemanenan sel makrofag pada rongga peritoneum lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan isolasi makrofag pada organ lain. Perlu diketahui bahwa sel peritoneum tidak hanya terdiri dari makrofag melainkan terdapat sel limfosit dan sel imun lainnya. Persentase perolehan sel makrofag 40% dari total sel peritoneal ( $\sim 0,5-1 \times 10^6$  sel) makrofag/mencit tanpa adanya stimulasi, 40% sel limfosit B, dan 20% lainnya adalah sel NK, NKT (NK cell T Cell), eosinofil, sel mast, neutrofil, dan sel dendritik. Pada umumnya isolat makrofag dari mencit normal (tanpa induksi) tidak dapat digunakan untuk pengujian biokimia. Sel makrofag peritoneal memiliki 2 subset sel yaitu *large peritoneal macrophage* (LPM) dan *small peritoneal macrophage* (SPM). Sel LPM mengekspresikan  $F4/80^{\text{high}}$  and  $CD11b^{\text{high}}$  sedangkan sel SPM mengekspresikan  $F4/80^{\text{low}}$  and  $CD11b^{\text{low}}$ . Sel LPM berasal dari jalur *hematopoiesis independent* dan *selfrenewal* berperan mengatur homeostasis dalam kondisi normal. Sel SPM berasal dari monosit yang bersirkulasi di darah dan akan mengalami peningkatan dalam kondisi inflamasi.



(sumber: Cassado et al., 2015)

Pada petunjuk praktikum kali ini, dijabarkan bagaimana langkah-langkah isolasi dan uji daya fagosit makrofag peritoneum mencit. Daya fagosit makrofag penting untuk menentukan fungsi makrofag sebagai sel fagositik. Makrofag dengan kemampuan tinggi. Untuk memfagosit memiliki indeks fagositosis antara 500 – 1500 cell/bakteri dengan

rasio 1:10. Hal tersebut berarti bahwa ~80% sel merupakan sel fagositik dan tiap sel fagositik menelan 10-20 bakteri.

### Hewan coba

Berupa mencit Balb/C yang sehat dengan bobot badan berkisar antara 20-30 gram.

### Alat dan Bahan

Alat praktikum :

Mikroskop binokuler, Pinset, Spuit 10 cc, needle 26 G, papan fiksasi dari sterofom, jarum pentul untuk fiksasi, gunting, bilik hitung, deck glass 20x20, pipet tetes, tabung conical 14 mL, sentrifuge, plate 24 well, round coverslip, micropipet 200  $\mu$ L, mikropipet 10, 20  $\mu$ L, yellow/blue tip, White tip, shaver, object glass.

Bahan praktikum

Preparat awetan makrofag, Medium RPMI, Medium kultur (mengandung Penstrep 2%, fungizone 0,5%, FBS 10%, dan medium RPMI), PBS, Alkohol 70%, larutan giemsa 30%, metanol PA.

### Cara kerja

#### Langkah A. Penanganan hewan uji

1. Mencit dikorbankan dengan cara pemberian kloroform inhalasi.  
*Cara lain yang dapat ditempuh dengan menggunakan CO<sub>2</sub>, sedangkan metode dislokasi cervical tidak disarankan karena dikhawatirkan darah akibat pecahnya pembuluh darah akan mencemari rongga peritoneum.*
2. Mencit yang telah mati diletakkan pada papan fiksasi difiksasi dalam keadaan terlentang, selanjutnya dilakukan fiksasi menggunakan jarum pentul. Bulu mencit didaerah ventral dicukur.  
*Pencukuran dapat dilakukan sebelum mencit dikorbankan.*
3. Area ventral yang telah bersih dioles alkohol 70% untuk mengurangi resiko kontaminasi pada saat isolasi dan pengkulturan sel makrofag
4. Kulit luar pembungkus abdomen dibuka, sehingga selubung peritoneum terlihat.  
*Harus dipastikan bahwa selubung peritoneum tidak sobek karena akan mengurangi jumlah sel peritoneal yang diperoleh.*

#### Langkah B. Isolasi makrofag

5. Medium RPMI dingin sebanyak 10 cc dimasukkan ke dalam rongga peritoneum mencit dengan menggunakan bantuan spuit 10 cc needle 26 G. Arahkan needle di sisi kiri mencit (daerah spleen)

*Sebelum memasukkan medium RPMI pastikan ukuran needle telah sesuai. Saat memasukkan perhatikan arah spluit supaya tidak menusuk organ. Penusukan tidak boleh dilakukan berulang-ulang. Hal tersebut bertujuan untuk mencegah kebocoran medium RPMI.*

6. Lakukan penekanan pada rongga peritoneum selama 3 menit  
*Penekanan dilakukan secara perlahan supaya sel peritoneum dapat terlepas. Perhatikan waktu minimal pada langkah ini.*
7. Cairan peritoneal di aspirasi dengan menggunakan spluit 10cc dan tampung aspirat pada conical 14 cc  
*Ukuran needle dapat diganti dengan ukuran yang lebih besar. Pastikan tidak tertusuk organ atau pembuluh darah. Volume optimal aspirat yang dapat terambil  $\pm$  7-8 cc.*
8. Aspirat disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm, 4<sup>o</sup>C selama 10 menit
9. Pellet aspirat yang diperoleh ditambahkan medium kultur sebanyak 4 cc dan dihomogenkan kemudian dihitung konsentrasinya.  
*Perhitungan konsentrasi sel peritoneal: Resuspen yang diperoleh diambil 10-20  $\mu$ L dan diletakkan pada bilik hitung yang telah ditutup deckglass. Perhitungan dilakukan pada 64 kotak sedang bilik leukosit.*
10. Resuspen yang diperoleh diambil 20  $\mu$ L dan diletakkan pada object glass, kemudian dispread dengan bantuan object glass lain dan dikering anginkan.
11. Metanol sebagai larutan fiksatif ditambahkan dan diamkan selama 10 menit.  
*Metanol bersifat karsinogen*
12. Preparat digenangi dengan larutan pewarna giemsa selama 15 menit, kemudian di bilas air yang mengalir.  
*Setelah dibilas pastikan preparat benar-benar kering sebelum diamati*
13. Preparat yang telah kering diamati dibawah mikroskop perbesaran 400x
14. Hasil pengamatan digambar dan diberi keterangan sesuai dengan format laporan sementara.
15. Pellet aspirat ditempatkan pada plate 24 well yang telah diberi coverslip, kemudian diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37<sup>o</sup>C selama 2 jam untuk kepentingan uji daya fagosit makrofag  
*Volume aspirat pada masing-masing sumuran sebanyak 200  $\mu$ L*

Urutan langkah ke 16-21 tidak dilakukan oleh mahasiswa karena keterbatasan waktu praktikum

16. Setelah 2 jam, medium kultur ditambahkan sampai 1000  $\mu\text{L}$  dan diinkubasi kembali selama 24 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C
17. Setelah 24 jam, medium kultur diaspirasi dan sel pada dasar coverslip dicuci dengan PBS sebanyak 2 x.
18. Suspensi latex sebanyak 200  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam sumuran dan diinkubasi kembali selama 4 jam.
19. Suspensi dibuang dan dicuci PBS 3x, selanjutnya coverslip diambil dan difiksasi dengan metanol selama 10-15 menit.
20. Setelah difiksasi, coverslip digenangi larutan giemsa dan didiamkan selama 15-20 menit, kemudian dibilas air mengalir.
21. Preparat dikering anginkan, kemudian diamati dibawah mikroskop.

Langkah C. Indeks Daya Fagosit makrofag.

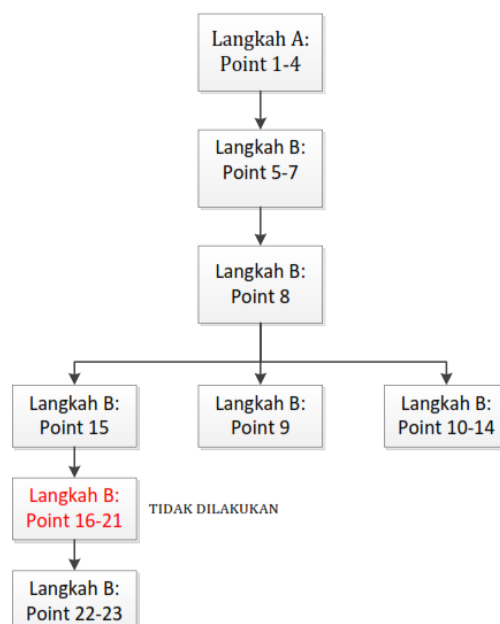
22. Preparat awetan makrofag yang telah disediakan diamati dibawah mikroskop binokuler.
23. Indeks daya fagosit dihitung berdasarkan rumus :

*Jumlah makrofag yang memfagosit latex x jumlah latex yang difagosit makrofag*

### Instruksi kerja mahasiswa

1. Lakukan isolasi makrofag dan perhitungan daya fagosit sesuai dengan cara kerja yang tertulis.
2. Buatlah laporan sementara praktikum sesuai dengan format yang telah disediakan

### Diagram alir kerja



### Daftar Pustaka

1. Wang C, Yu X, Cao Q, *et al.* Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunol.* 2013; 14:6
2. Wijayanti Mahardika Agus, 2009. *Isolation & Functional Activity Test of Mouse peritoneal-Macrophages.* Pusat Kedokteran Tropis Universitas Gadjah Mada. Jogjakarta.
3. Kenneth M. 2016. *Janeway Immunobiology.* Garland Science. New York
4. Cassado ADA, Lima MRD, Bortoluci KR. Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. *Front immunol.* 2015; 6:225
5. Goncalves R, Mosser DM. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr protoc immunol.* 2015. John Wilet & Sons. New York.
6. Drevets DA, Canono BP, Campbell PA, , Measurement of Bacterial Ingestion and Killing by Macrophages. *Curr protoc immunol.* 2015. John Wilet & Sons. New York.

---

## **LEMBAR KERJA PRAKTIKAN (LAPORAN SEMENTARA)**

Tujuan Praktikum

Cara kerja



Konsentrasi sel peritoneal yang berhasil diisolasi (sel/mL) =

n =

p =

v =

Konsentrasi sel peritoneal =

Estimasi perolehan konsentrasi sel makrofag yang diperoleh (sel/mL) =

Hasil pengamatan sel makrofag pada mikroskop seperti dibawah ini:

Lapang pandang ke-



Preparat diamati dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran .....x.....

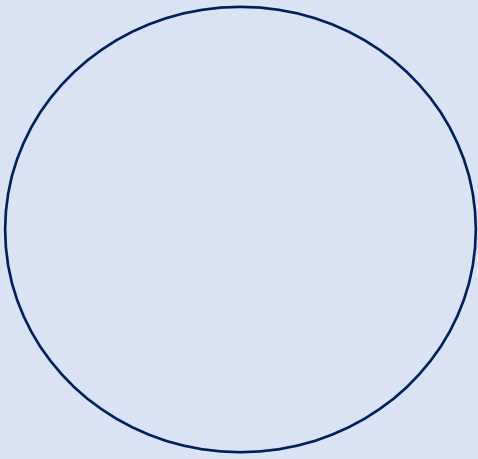
Keterangan gambar:

Karakteristik/ciri sel makrofag yang teramati pada pengamatan di mikroskop :

<u>Karakteristik</u>	<u>Secara teori</u>	<u>Hasil pengamatan</u>
<u>Bentuk sel</u>	<u>Bulat irreguler</u>	
<u>Letak Inti sel</u>	<u>Eksentrik</u>	
<u>Hasil pengecatan giemsa pada sitoplasma sel</u>	<u>Biru kemerahan</u>	
<u>Hasil pengecatan giemsa pada inti sel</u>	<u>Biru gelap</u>	
<u>Jumlah sel makrofag yang teramati di preparat</u>		

Hasil pengamatan sel makrofag pada mikroskop seperti dibawah ini:

Lapang pandang ke-



Preparat diamati dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran .....x.....

Keterangan gambar:

Jumlah makrofag yang dijumpai pada lapang pandang (LP) ke-    sebanyak (sel) =

Jumlah sel makrofag yang memfagosit lateks pada LP ke-    sebanyak (sel) =

Jumlah lateks yang difagosit oleh sel makrofag pada LP ke-    sebanyak (buah) =

Indek fagosit makrofag pada LP ke-    adalah =

**Catatan perbaikan =**

Semarang, Mei 2018  
Mengetahui,  
Asisten Bagian Biologi

Nama:

NIM:

## ISOLASI DAN PROLIFERASI LIMFOSIT

### Tujuan Praktikum

1. Mampu melakukan isolasi limfosit dari limpha (lien) mencit
2. Mampu mengidentifikasi limfosit
3. Memahami peran limfosit dalam sistem imun
4. Mampu melakukan uji daya proliferasi limfosit

### Dasar teori

Limfosit merupakan komponen sistem imun spesifik yang terspesialisasi menjadi dua kelas yaitu limfosit T dan limfosit B. Sel limfosit dapat ditemukan pada jaringan limfoid primer (sumsum tulang dan thymus) dan jaringan limfoid sekunder (limfonodus, limpa, Gut-Associated lymphoid Tissue (GALT), thoracic duct, Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT), Skin-Associated Lymphoid Tissue, *peyer patches intestine*, dan darah. Peningkatan aktivitas proliferasi limfosit sangat terkait erat dengan status imunitas.

**Tabel 1. Persentase populasi limfosit T dan B pada organ limfosit primer dan sekunder**

Organ limfoid manusia	Limfosit T (%)	Limfosit B (%)
Thymus	100	0
Darah	80	20
Limfonodus	60	40
Limpa	45	55
Sumsum tulang	10	90

### Cara kerja

**Hewan coba** : Dua ekor Mencit (*Mus musculus*), dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kontrol, dan perlakuan

**Bahan** : Medium Kultur, bahan uji, alkohol 75%, kloroform, kapas, NH<sub>4</sub>Cl

**Alat****a. Isolasi limfosit**

Gunting steril, Pinset steril, *Petridisk* (cawan petri), Spluit 1 cc, papan bedah, Jarum pentul, *Beaker glass*, Conical steril 15 mL.

**b. Proliferasi limfosit**

Inkubator CO<sub>2</sub>, Mikroskop inverted, Mikropipet, Plate 24 well, hemositometer

**Langkah kerja :****Isolasi limfosit**

1. Mencit *dinarkose* dengan menggunakan kloroform secara inhalasi
2. Mencit yang telah *dinarkose* diletakkan pada papan bedah dengan keadaan terlentang dan difiksasi dengan jarum pentul
3. Sebelum dilakukan pembedahan mencit diberi alkohol 75% dengan cara mengoleskan kapas alkohol ke permukaan tubuh terutama daerah abdomen sampai basah
4. Buat sayatan pada daerah abdomen mencit dengan menggunakan gunting sampai bagian peritoneal terbuka.
5. Usus disisihan dari sisi kanan hewan, sehingga limpa yang terletak dikiri atas perut tampak. Limpa diambil dengan menggunakan pinset secara hati-hati dan diletakkan pada petridisk berisi 10 mL Medium kultur.
6. Pada cawan petri, limpa ditusuk dengan jarum pada spluit 1 cc disalah satu ujung limpa. Medium dipompakan ke dalam dengan spluit sehingga suspensi sel mengalir keluar dari tempat tusukan tadi sehingga menghasilkan suspensi sel.
7. Suspensi sel diambil dengan spluit dan ditampung pada tabung conical steril kemudian disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 1200 rpm (prinsip: mengendap)
8. Setelah sentrifugasi, akan terbentuk 2 lapisan yaitu : lapisan cair (supernatan), lapisan padat (pelet). Pisahkan antara supernatan dengan pelet dengan cara membuang supernatan pada buangan berklorin yang telah disediakan
9. Pelet yang terbentuk diresuspensi dengan 2 cc NH<sub>4</sub>Cl lalu sentrifuge kembali selama 3 menit kecepatan 1200 rpm.
10. Langkah (9) dapat diulang kembali sampai dihasilkan pelet warna putih (limfosit).

### **Uji proliferasi limfosit**

1. Supernatan dibuang dan pelet (limfosit) diresuspensi dengan 4 mL medium kultur (resuspen) dan kemudian dihitung pada bilik hitung.
2. pada umumnya limpa 1 ekor mencit mengandung  $5 \times 10^7$  sampai  $2 \times 10^8$  sel bernukelus.
3. Setelah dihitung, masukkan resuspen ke dalam sumuran mikroplate 24 well masing-masing sumuran sebanyak 1 mL.
4. Inkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 72 jam (*langkah ini disimulasikan*).
5. Setelah 72 jam, konsentrasi sel limfosit yang hidup pada masing-masing sumuran dihitung pada hemositometer dengan menggunakan pewarnaan tripan blue
6. Aktivitas proliferasi makrofag ditentukan dengan membandingkan aktivitas proliferasi limfosit pada kontrol dengan perlakuan dalam bentuk grafik.

### **Instruksi kerja mahasiswa**

1. Lakukan tiap langkah kerja secara sistematis
2. Hitung jumlah sel dengan menggunakan bilik hitung dan buatlah grafik proliferasi limfosit pada kertas milimeter block.

## LEMBAR KERJA PRAKTIKAN (LAPORAN SEMENTARA)

Tujuan Praktikum

Cara kerja

Hasil Pengamatan

Catatan perbaikan

Semarang, Mei 2018  
Mengetahui Asisten Lab. Biologi

Nama:

## ELISA

### Tujuan Praktikum :

1. Mahasiswa memahami prinsip dasar ELISA
2. Mahasiswa dapat mendemostrasikan teknik pengujian dengan metode ELISA dengan benar
3. Mahasiswa mampu menghitung kadar immonoglobulin gamma (IgG) dari saliva dengan menggunakan metode ELISA

### Dasar Teori

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) merupakan uji serologis yang umum digunakan di berbagai laboratorium imunologi. 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). Keuntungan metode ELISA yaitu: Cukup sensitive, Reagen relatif murah dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama, Dapat memeriksa beberapa parameter sekaligus, Peralatan mudah didapat, Tidak menggunakan zat radiasi. Kerugian metode ELISA adalah pemeriksaan menggunakan enzim sebagai label cukup kompleks karena akvitas enzim dipengaruhi oleh berbagai faktor

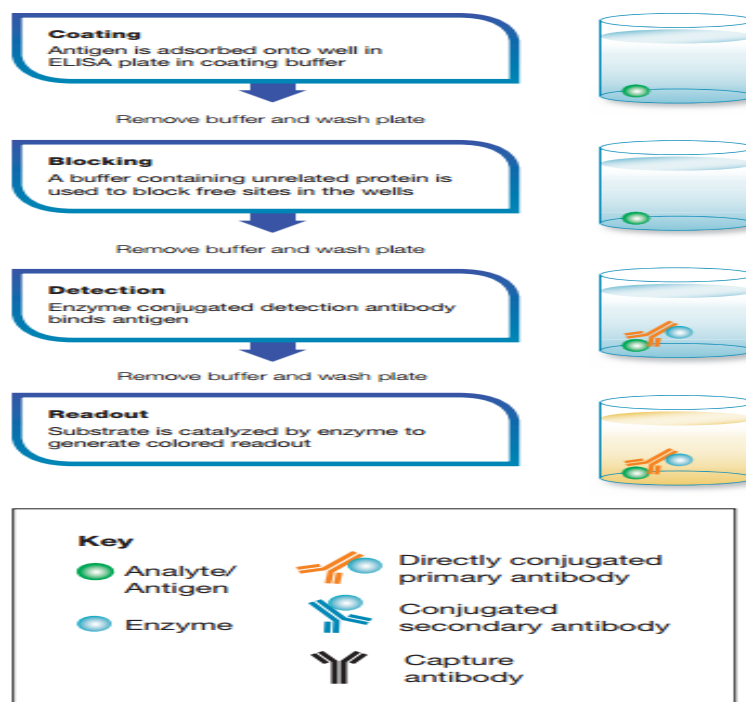
Umumnya ELISA dibedakan menjadi dua jenis, yaitu *competitive assay* yang menggunakan konjugat antigen–enzim atau konjugat antibodi–enzim, dan *non-competitive assay* yang menggunakan dua antibodi. Metode kompetitif mempunyai prinsip sampel ditambahkan antigen yang berlabel dan tidak berlabel dan terjadi kompetisi membentuk kompleks yang terbatas dengan antibodi spesifik pada fase padat. Teknik non kompetitif ini dibagi menjadi dua yaitu sandwich dan indirek. Pada ELISA non-competitive assay, antibodi kedua akan dikonjugasikan dengan enzim sebagai indikator. Teknik kedua ini seringkali disebut sebagai "Sandwich" ELISA. Prinsip dasar dari *sandwich assay* adalah sampel yang mengandung antigen direaksikan dengan antibodi spesifik pertama yang terikat dengan fase padat. Selanjutnya ditambahkan antibodi spesifik kedua yang berlabel enzim dan ditambahkan substrat dari enzim



tersebut. 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.

Pada elisa ada beberapa metoda antara lain :

1. Direct elisa
2. Indirect elisa
3. Sandwich elisa
4. Competitive elisa



Gambar 1. Prosedur umum ELISA (<https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-procedure.html>)

### Alat dan bahan

Dengan menggunakan well ELISA yang jumlahnya 96 lubang. Kit E

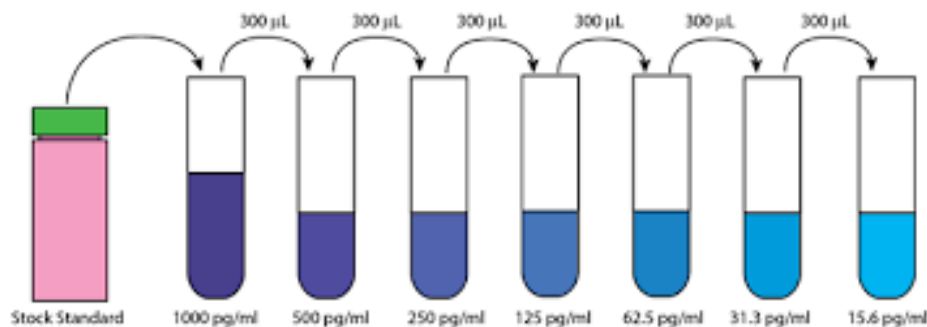
### Cara kerja

1. Preparasi sampel

- **Plasma dengan EDTA di sentrifuge pada 3400 rpm selama 15 menit (tidak dilakukan)**
- **Simpan pada suhu -20 °C (tidak dilakukan)**
- Diambil 10 µL plasma + 190 µL sample diluent (1x) (didapatkan pengenceran 200x)
- Diambil kembali 10 µL plasma yang telah diencerkan 200x + 190 µL sample diluent (1x) (didapatkan pengenceran 400x)
- Sampel plasma yang telah diencerkan 400x ini yang nantinya akan dihitung konsentrasi IgGnya menggunakan teknik ELISA Sandwich.

## 2. Preparasi IgG Standar

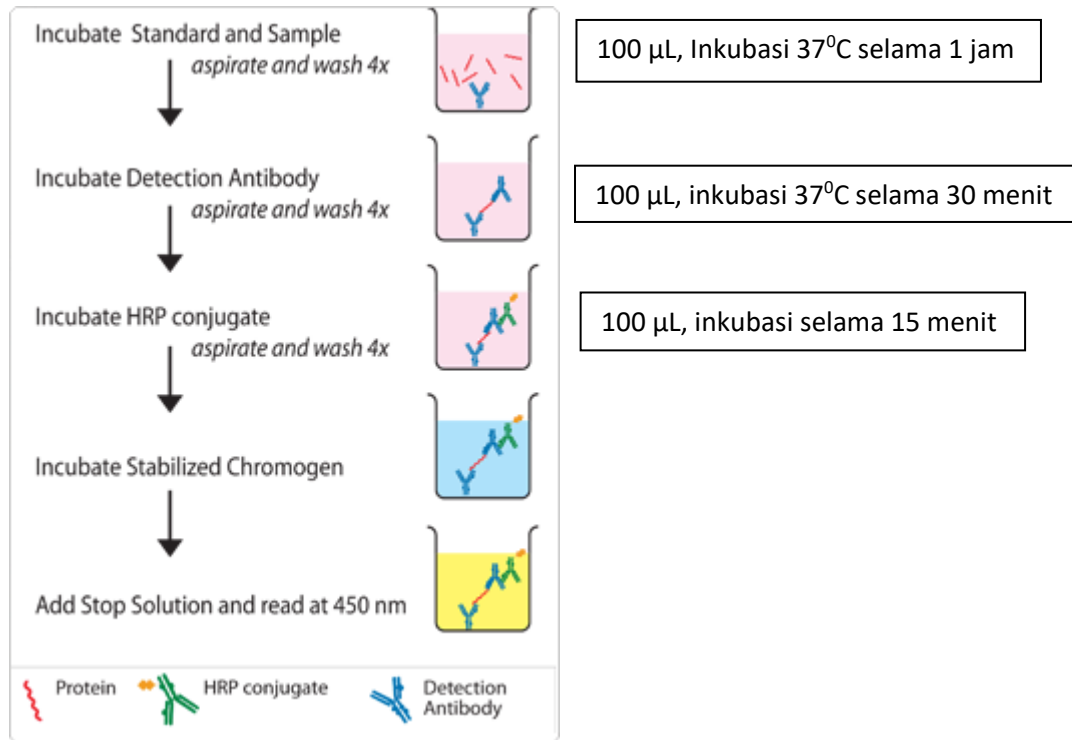
- Pada tabung pertama diisi standar konsentrasi 1000 ng/mL
- Pada tabung kedua diisi dengan 500 µL sample diluent (1x) dan 500 µL larutan IgG standar (konsentrasi 1000 ng/mL) sehingga didapatkan konsentrasi pada tabung pertama sebesar 500 ng/mL.
- Pada tabung kedua sampai tujuh dilakukan doubling dilution berturut-turut mulai dari tabung pertama dengan pelarut menggunakan 500 µL sampel Diluent (1x) sehingga didapatkan konsentrasi pada tabung kedua sampai tujuh.



Gambar 2. Teknik pengenceran

(<http://nptel.ac.in/courses/102103047/module5/lec30/5.html>).

## 3. Pelabelan dengan antibodi pada ELISA SANDWICH



**Gambar 2. Tahapan kerja ELISA Sandwich** (<https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/elisa-protocol/general-elisa-protocol.html>)

4. Ukur absorbansi dengan ELISA reader.
  - Buatlah kurva dan regresi linear dimana x adalah nilai konsentrasi (yang didapat) dan y adalah nilai absorbansi .
  - Persamaan regresi linier yang didapat ini akan digunakan untuk menghitung konsentrasi IgG masing-masing mahasiswa yang telah dipersiapkan sebelumnya (Tabel 2)

#### Instruksi kerja mahasiswa

1. Lakukan tiap langkah dari cara kerja secara urut
2. Buatlah kurva dan regresi linear (dimana x adalah nilai konsentrasi (yang didapat) dan y adalah nilai absorbansi) pada kertas milimeter.

#### Daftar Pustaka:

1. <http://www.ebioscience.com/media/pdf/best-protocols/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa.pdf>
2. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/elisa-protocol/general-elisa-protocol.html>
3. <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-procedure.html>
4. <http://nptel.ac.in/courses/102103047/module5/lec30/5.html>

## **LEMBAR KERJA PRAKTIKAN (LAPORAN SEMENTARA)**

Tujuan Praktikum

Cara kerja

Hasil Pengamatan

Tabel 1

Sumuran	Konsentrasi yang dihitung (ng/mL)	Konsentrasi yang didapat (ng/mL)	Nilai Absorbansi
1000			
500			
250			
125			
62,5			
31,25			
15,6			
7,5			

Kurva Standart 1

Tabel 2.

Sampel Plasma	Nilai Absorbansi Sampel Plasma	Konsentrasi IgG Sampel Plasma (Pengenceran 400x) (ngmL)	Konsentrasi IgG Sampel Plasma (ngmL)
I			
II			
III			
IV			
V			
VI			
VII			
VIII			
IX			
X			

Catatan perbaikan

Semarang, Mei 2018

Mengetahui Asisten lab. Biologi

Nama: