

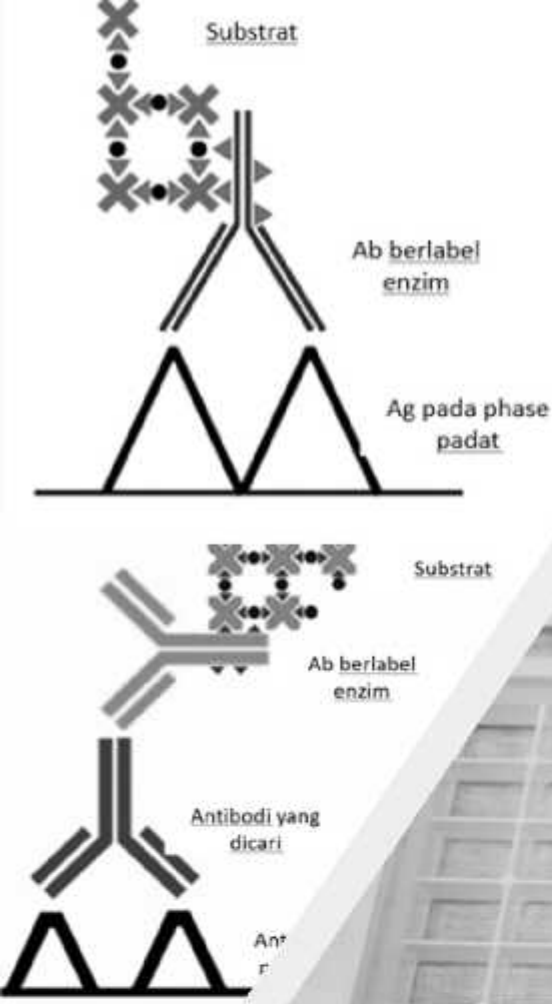
TEKNIK ELISA

Metode Elisa Untuk Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit

Penyusun :

Dr. Budi Santosa, S.KM., M.Si.Med





TEKNIK ELISA

Metode Elisa Untuk Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit

Penyusun :

Dr. Budi Santosa, S.KM., M.Si.Med



TEKNIK ELISA

Metode Elisa Untuk Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit

Penulis :

Dr. Budi Santosa, S.KM., M.Si.Med

Editor :

Dr. Budi Santosa, S.KM., M.Si.Med

Desain Cover :

Gansar Timur Pamungkas, M.Kom

Ditebitkan oleh Penerbit Unimus Press

© 2020 Unimus Press

Jl. Kedungmundu Raya No. 18 Semarang, 50273

Telp. (024) 76740296

iv, 35 halaman, 21.5 x 29.7

ISBN : 978-602-5614-93-4

Hak cipta dilindungi Undang-Undang.

Dilarang mengutip, memperbanyak dan menterjemahkan sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari Penerbit.

Cetakan I : 2020

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
DAFTAR ISI.....	ii
DAFTAR TABEL.....	iii
DAFTAR GAMBAR.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
BAB I PROTEIN METALLOTHIONEIN	1
1. Gambaran Umum Protein <i>Metallothionein</i>	1
2. Regulasi gen <i>Metallothionein</i>	2
3. Regulasi pada Ekspresi Gen <i>Metallothioneins</i>	4
4. <i>Metallothioneins</i> dan Detoksikasi Logam	5
BAB II TEKNIK ELISA	6
1. Gambaran Umum Teknik Elisa	6
2. Dasar Teori	8
2.1 Antigen dan Antibodi	8
2.1.1 Determinan antigen.....	9
2.1.2 Mitogen.....	9
2.1.3 Macam-macam antigen.....	9
2.2 Antibodi.....	9
3.1.1 Immunoglobulin G (IgG).....	11
3.1.2 Immunoglobulin A (IgA).....	11
3.1.3 Immunoglobulin M.....	11
3.1.4 Immunoglobulin D (IgD).....	11
3.1.5 Immunoglobulin E (IgE).....	12
3. Teknik Elisa.....	12
3.1 Jenis-Jenis Metode Elisa (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	12
3.1.1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) DIRECT	12
3.1.2 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) INDIRECT	13
3.1.3 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) SANDWICH	15
3.1.4 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Biotin Sterptavidin (Jenis ELISA Modern)	17

3.1.5 Multiplex immunoassay.....	17
3.1.6 Teknik ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) COMPETITIVE.....	18
BAB III APLIKASI ELISA PADA DAUN PADI IR Bagendit.....	22
1. Prosedur Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit Menggunakan Teknik Elisa Indirect.....	22
2. Metoda.....	22
2.1 Bahan dan alat	22
2.2 Preparasi Ekstrak bahan metoda Infundasi (infusa)	22
2.3 Prosedur Pemeriksaan <i>metallothionein</i> /MT (kit ELISA)	23
3. Ringkasan	27
SUMBER PUSTAKA.....	28

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Karakteristik Gen MT pada <i>Oxya chinensis</i>	4
--	---

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Daun padi IR Bagendit.....	1
Gambar 2. Gen MT, NCBI	3
Gambar 3. Model struktur pengikatan logam oleh PsMTA ((Hamer ; cherian et al. 1994)	5
Gambar 4. Respon sel B terhadap hapten	8
Gambar 5. Struktur antibodi	10
Gambar 6. Mekanisme ELISA direct)	13
Gambar 7. Mekanisme Indirect ELISA	14
Gambar 8. Prinsip kerja Elisa Sandwich.....	16
Gambar 9. Multiplex assay design.....	17
Gambar 10. Competitive Elisa.....	19
Gambar 11. Foto pembuatan infusa	22
Gambar 12. Skema pembuatan infusa	23
Gambar 13. Tahapan pemeriksaan MT.....	24
Gambar 14. Tahapan pengukuran kadar MT pada kurva ekspert.....	25

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan petunjukNya, sehingga penulisan buku teknik Elisa untuk pengukuran kadar protein metallothionein dapat terselesaikan. Buku ini sebagai panduan untuk dosen dan mahasiswa dalam penggunaan teknik Elisa terutama untuk pengukuran protein yang ada dalam tanaman khususnya daun padi. Dalam penyusunan buku ini, penulis sangat menyadari akan kekurangan dan ketidaksempurnaan, semua itu karena keterbatasan yang ada pada penulis. Untuk itulah penulis sangat mengharapkan masukan dan saran yang membangun dari berbagai pihak terutama dari Senior dan sejawat dibidang teknik laboratorium Elisa. Penulis merasa bangga dan bahagia terhadap segala sumbang saran untuk perbaikan. Akhirnya, sebagai penulis ijinlah saya menghaturkan terima kasih sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu, baik secara fisik, psikologis, materi dan spiritual. Semoga Allah SWT memberikan balasan atas segala jasa baik, bimbingan dan dukungan yang telah diberikan. Amiin.

Semarang Oktober 2020

Penulis

BAB 1

PROTEIN METALLOTHIONEIN

1. Gambaran Umum Protein *Metallothionein*

Metallothioneins (MTs) merupakan superfamily dari ubikuitos protein sitosolik yang berukuran kecil (25-82 aa, 2,5-8,0 KDa) yang mampu untuk mengikat kation logam berat melalui jumlah residu sistein (Cys) (18-23 Cys yang terdapat dalam wilayah gen yang *conserve*). (Isani G, 2014). *Metallothioneins* memiliki kemampuan mengikat logam berat dan ditemukan pada tanaman maupun hewan. Berbagai tanaman telah diteliti dan yang paling banyak terdapat pada daun padi IR bagendit. Infusa air daun padi telah terbukti dapat memprevensi kerusakan ginjal akibat pajanan Pb. Kandungan protein *metallothioneins* yang terdapat dalam daun padi IR bagendit dapat diperiksa melalui teknik imunologi misalnya metoda *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Santosa B (2016), MT nabati yang terdapat pada akar, daun, bunga, buah/biji padi, jagung, buncis, dan kedelai, kandungan *MTs* tertinggi terdapat pada daun padi, tetapi belum diketahui berasal dari varietas padi apa. Pada tahun 2017 Santosa B telah meneliti berbagai varietas daun padi yaitu ketan hitam, ketan merah, ketan putih, padi merah, padi chiherang, padi serang, padi umbuk, padi ciliwung, padi IR Bagendit, padi IR 64, padi umbul. Berbagai varietas daun padi tersebut yang paling tinggi kandungan *methallothioneinsnya* adalah padi IR Bagendit.



Gambar 1. Daun padi IR Bagendit

Pada penelitian Wong *et al.*, 2004 telah dilaporkan bahwa ekspresi *metallothioneins* ditemukan disemua jaringan tanaman padi (biji yang belum matang, daun kecambah, dan daun,

hasil penelitian menunjukkan ekspresi *metallothioneins* paling banyak ditemukan pada kultur sel, akar.

Dasar molekuler dan fisiologi tanaman, terdapat interaksi antara tanaman dengan logam berat. Salah satu logam berat yaitu tembaga (Cu). Tembaga dibutuhkan oleh tanaman dalam jumlah sedikit (mikronutrien), jika kadarnya berlebihan akan berdampak racun bagi tanaman. Sehingga pada tanaman ada upaya untuk mengontrol jumlah kandungan logam berat agar seimbang. *Metallothioneins* merupakan salah satu gen yang dapat diinduksi oleh logam berat.

2. Regulasi gen *Metallothionein*

MT pada tanaman pertama kali diidentifikasi pada tahun 1987, yaitu EcMT (*Early cysteine* MT) pada embrio gandum. Saat ini, lebih dari 140 sekuens MT telah dicatat dari berbagai spesies tanaman, termasuk dari beberapa tanaman seperti kedelai, buncis, jagung, *Arabidopsis* padi (Zhou et al. 2006, Steven R, 2000),

Gen *Mt* telah diisolasi dari banyak jenis tanaman dan diekspresikan didalam berbagai jaringan maupun organ seperti pada akar, batang, daun, bunga, buah dan biji dari berbagai spesies tanaman yang berbeda. Analisis pola ekspresi dapat membantu untuk mengungkapkan kemungkinan fungsi biologi dari gen *Mt* (Ornella, 2000).

Regulasi ion logam pada gen *Metallothioneins* di mediasi oleh sekuens *metal-responsive element* (MRE) yang mengandung promoter. MRE-binding transcription faktor (MTF) yang mengikat secara spesifik MRE dikarakteristik pada manusia, *Drosophila* dan *yeast*, dan menunjukkan kemampuan untuk merespon logam berat dan terlibat dalam beberapa perkembangan jaringan dan reaksi fisiologis. Jalur signaling untuk mengaktivasi transkripsi sudah ditemukan. Wilayah 5' upstream pada gen MTs telah diisolasi dari beberapa spesies tanaman, tetapi sekuens inti MRE belum diidentifikasi dalam promoter gen MT pada tanaman.

Kelompok gen MT pada padi diklasifikasikan menjadi dua kelas, kelas 1 dibagi menjadi 4 tipe berdasarkan sekuens kemiripan dan hubungan filogenetik. Gen yang disebut OsMT-1-1a , OsMT-1-4c dan OsMT-II-1a (tabel 1), genus dan spesies untuk MT (gen MT pada kelas 1 tipe 1 pada padi, *Oryza sativa*, disebut OsMT-1-1a). Sebagian besar family gen OsMT masuk ke kelas 1 dikelompokkandalam 2 cysteine-rich domains. Berikut merupakan gen metalothionein yang diperoleh dari NCBI.


```

1 gaattcctttt aaaaccattt gtactgaatt taagagaaaa atgtatcacg agggaatata
61 ctggagggat tataattcat ctcccttatta ttttagcactt ttttttatct acagagttga
121 aaggacatgg catcacaatt actttcatct ttcatgctca gcctcagacg tctaatggc
181 tagtatacta gcttggttagg tgcaaaqtca agcaagagaa tttcaactgt ggcggtgtt
241 aattctcttt aaacttctaa aaattccgtc acatcaaatg tttaaatgtg gacaaaaaaa
301 aaataattgc acagtttqta tgtaaatgc gaaacgaaac ttgtgagctc aattacgcca
361 tgatttgaca atgttgtgct acagttaaca tgtgctaata atgtattaat tagatttaat
421 agattcatct cgcagtttat atgtggaac tatatatatt gttattaatc tatatttaat
481 acttaatact tttgtccgtg tatgtaaaaa aattttgacc aaacaactga acacggcctg
541 tatatgtaac caaagaaaga tcaaaggaga ggaggtagct actcctacaa agaaagaaga
601 aacgatgaga tttgattgcc tactactcca gctagctagt atacagtaact catabctgtc
661 tatccatatt cctgctcca atgcaaaaat gcaatggcga gattgcaagg ttgtgtgggt
721 ggtggacctt ggatcgatcg cctccattct ttctccgcat ctgccacag tacgcttgc
781 tgctctcccg cctatatata ccacctctc ctcgatcacc agttcatcag caaccaaagc
841 aagaagcaat tcttgagctc aatcagcaac aacatctatc tccttcttgc ttgattaaat
901 ccttcgacct cccaagaaga agaagatgtc ttgctgcccg gccaactgag gctcggcag
961 cggctggccg tgccggcggg gctgcccggg gtaattaaat aactaactaa ccaactgcca
1021 attaattcac tcaagaaacc attgtgacac gcacagatcg ataactgac aatattaaca
1081 ttaatatgca tggatgcaga tgcaaatgtt tccctgtagt ggagggcaca gccaccacca
1141 agaccttctt cctcgtctct ccatccaaca aggcgtaagt ttcatatta atgcttaata
1201 attgatctgt cattcctgtg tgtgttcacc attagtgata attaattgat tgatctgcca
1261 ttccgaaaca aaattgtgct ggattacagg agctctggag gaatggagat ggcggtggag
1321 agcggcgaga acggcggctg cggctgcaac acctgcaagt gtggcaccag ctgcagcggc
1381 tgctcctgct gctcctgcaa ctgaatctat cgtcgtcgtc gcccgctgc atgaggattt
1441 atcgtatgga tgctgctact gtcgatcaga gctttgatcg aggccttaat ttgcttgcct
1501 tagtaccacg ctatataata gccaggcctt gccttttgcct ctgacgccta aataaaaccg
1561 tgctcgtcgt tgtcagtgat tgccgtgtgtc gatcaatggt ggatggatcc ctgcttagct
1621 tggatggatc atctatcacc atggtgatct catcatgac tcctgctcca tctcctcaag
1681 cgtgccagac ttcttaatat aatctaccct tgctttcacc ccatttctct tactgcttac
1741 tgcccttgtt taatttcctt ttggttctaa ttaccacgag gaaattgttg ttttttcaat
1801 aatgaaaaact ctgcaaaagt aaactgacca caaactagtt aacacagaga ctgcatcagc
1861 tg

```

(Gambar 2. Gen MT, NCBI)

MTs terbagi menjadi super family pada evolusi yang conserved, masa molekulerya rendah (4-10 KDa), *cysteine-rich* protein yang berperan dalam meng-*chelate* logam berat dengan afinitas yang tinggi pada gugus thiol pada sistein. Berdasarkan turunan pada residues Cys dengan polipeptida, MTs diklasifikasikan menjadi 3 kategori yang berbeda. MTs ditemukan tinggi pada tanaman masuk dalam tipe protein kelas 2, yang mengandung 2 Cys-rich yang di cluster terpisah dengan wilayah spacer, dan selanjutnya dapat dikategorikan menjadi 4 subkategori berdasarkan pola distribusi residues pola Cys pada amino (N)-terminal dan Carboxyl ©-terminal pada protein. Tipe 1 MT gene OsMT-1-1a (Os12g38270) telah dikarakterisasi untuk memainkan peran penting dalam homeostasis Zn dan toleransi kekeringan (Yang *et al.*, 2009). Tipe lainnya 1MT isoform OsMT-1-1b daripadi telah dikarakteristik kemampuannya dalam mengikat nikel, cadmium, Zn.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh de Francisco *et al.*, (2016) menyatakan bahwa family MTs dari *Tetrahymena* merepresentasikan kelompok struktur protein yang conserved dengan ciri-ciri yang unik. Antara subfamily Cd dan CuMT memperlihatkan perbedaan karakteristik dari berbagai tingkatan : pola sistein, struktur mobular, penggunaan kodon untuk glutamine, dan ekspresi gen dibawah tekanan logam. Pengandaan gen melalui evolusi sama dengan mekanisme genetik secara umum untuk membuat gen MT baru yang memiliki isoform dan meningkatkan fungsi yang beragam.

Penelitian Liu *et al.*, 2014 yang telah mengkarakteristik gen pada *metallothioneins* pada jenis *Oxya chinensis* melihat pola ekspresi dan perannya pada tekanan logam berat menggunakan primer yang spesifik sebagai berikut:

Tabel 1. Karakteristik Gen MT pada *Oxya chinensis*

Application of primers	Gene name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
cDNA cloning	<i>OcMT1</i>	F: GTTGCTGAAGCCGCTACT	172
		R: CATCTTGGGTGGCTGGTG	
	<i>OcMT2</i>	F: CCGCTCTGACAAGCAGGAAC	259
		R: CTGCCTGGTGATCTATGGGT	
RT-qPCR analysis	<i>OcMT1</i>	F: GTTGCTGAAGCCGCTACT	172
		R: CATCTTGGGTGGCTGGTG	
	<i>OcMT2</i>	F: ATGTCGTCTCCGTGCTGT	123
		R: GCCCTTTGTTCTCCTT	
	<i>β-actin</i>	F: CGAAGCACAGTCAAGAGAGGTA	156
		R: GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG	
dsRNA synthesis	<i>OcMT1</i>	F: TAATACGACTCACTATAGGG GCTGAAGCCGCTACTTCTA	169
		R: TAATACGACTCACTATAGGG CATCTTGGGTGGCTGGTG	
	<i>OcMT2</i>	F: TAATACGACTCACTATAGGG CGCTCTGACAAGCAGGAAC	193
		R: TAATACGACTCACTATAGGG ATCCTCCTCGTTTGCAC	
	<i>GFP</i>	F: TAATACGACTCACTATAGGG GTGGAGAGGGTGAAGG	712
		R: TAATACGACTCACTATAGGG GGGCAGATTGTGGGAC	
Heterologous gene expression	<i>OcMT1</i>	F: GTGGGATCCATGCCTGACCCGTG	141
		R: ACGAAGCTTTCACCTAGAGGTGGT	
	<i>OcMT2</i>	F: GTGGGATCCATGCTCCTCCGTGC	213
		R: ATTAAGCTTTCATTACATTTGCAGC	

3. Regulasi pada Ekspresi Gen *Metallothioneins*

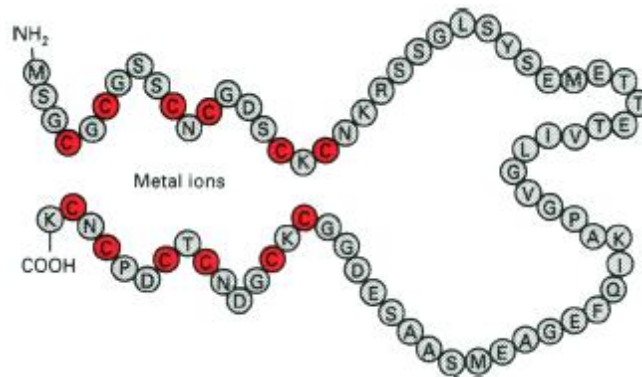
Struktur gen MTs dan regulasinya dapat dipelajari di tikus maupun manusia. Walaupun pada tikus, MTs multigen family yang terdiri dari 4 kelompok (MT-1 hingga MT-4) yang berlokasi di kromosom nomor 8, dan MTs pada manusia dicode oleh family multigen pada 15 kelompok berlokasi pada kromosom 16. 15 kelompok gen tersebut merupakan MTs pada manusia termasuk dalam MT-II, MT-III, MT-IV pada tiap gen dan 13 gen MT-1. Walaupun pada tikus MT-I dan MT-II diatur secara bersama, MT-III di ekspresikan di otak dewasa, dan MT-IV memiliki tingkatan yang berbeda pada epithelium skuamosa. Ada 4 isoform yang di ekspresikan di plasenta. Pada manusia, MT-II gen isoform (MT-IIA) merupakan gen MT yang sering diekspresikan.

Gen MT diekspresikan sebagai pengontrol utama level transkripsi. Sel yang telah resisten dengan Cd, ekspresinya diperkuat dengan protein MT dapat diterima melalui hen amplifikasi MT. 5' end pada MT-1 dan gen MT-II mengandung TATA box (elemen promoter utama) dan beberapa cis-berperan dalam merespon elemen. (promoter proximal elements). Cis- berperan untuk merespon elemen termasuk elemen yang responsive terhadap logam berat (MRE).

4. *Metallothioneins* dan Detoksikasi Logam

Dalam proses biologi yang kompleks, ion logam berperan sebagai kofaktor dan modulator di dalam reaksi biokimia oksidasi dan reduksi. Sel perlu menyimpan cadangan logam tetapi tidak berlebihan atau pada konsentrasi toksik. Cadangan ion logam tersebut dibebaskan secara perlahan sebagai fungsi keperluan sel (Swaran J.S, *et al*,2010). Peranan *metallothioneins* dalam mekanisme detoksikasi logam berkaitan dengan kemampuan *metallothioneins* dalam mengikat logam-logam yang bersifat toksik. *Metallothioneins* berfungsi dalam proses pengikatan ataupun penyekapan logam di dalam jaringan setiap makhluk hidup sehingga dipakai sebagai indikator pencemaran terhadap logam. *Metallothioneins* dapat mengikat logam dengan sangat kuat karena mengandung kelompok “thiol” (sulfidril, SH) dalam jumlah besar. Residu sulfidril dari Cys mampu mengikat 1 ion logam untuk 2 atau 3 residu SH membentuk struktur tetrahedral tetrathiolate. Residu Cys dibutuhkan untuk mendetoksikasi logam-logam berat dengan mengikat kation dari logam transisi.

Metallothionein memiliki dua domain yaitu domain β (N-terminal) yang berperan dalam homeostasis ion logam esensial, dan domain α (C-terminal) yang mengikat kuat logam-logam toksik Kedua domain ini diilustrasikan seperti gambar 1 berikut:



Gambar 3. Model struktur pengikatan logam oleh PsMTA ((Hamer ; cherian *et al*. 1994).

BAB II

TEKNIK ELISA

1. Gambaran Umum Teknik Elisa

Teknik Elisa merupakan salah satu dari Teknik imunologi yang bertujuan untuk mengetahui atau mengukur kadar dari aktivitas/respon ekspresi protein dan status reaksi imun dari reaksi individu/ respon imun. Dalam perkembangannya teknik imunologi tidak hanya bisa dilakukan dengan metoda ELISA tetapi juga imunohistokimia (IHC), Western blot, Amino Acid seq, FACS analysis. Pada metoda ELISA spesimen yang biasa dipakai berupa cairan misalnya serum atau hasil ekstraksi dalam bentuk infusa berbagai bahan. Apabila spesimen berupa serum maka masuk dalam ranah pemeriksaan serologik yang mempelajari reaksi antigen dan antibodi secara invitro. Pemeriksaan serologik sering dilakukan sebagai upaya menegakkan diagnosis, walaupun saat ini pemeriksaan serologik tidak terbatas pada penyakit infeksi, namun untuk menunjang diagnosis penyakit infeksi memang hal yang sering dilakukan. Pengamatan secara invitro terhadap perubahan kompleks antigen-antibodi (Ag-Ab) sangat mungkin dapat dilakukan dengan berbagai metode termasuk Elisa dan sangat membantu dalam menegakkan diagnosis dan pengembangan penelitian.

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) atau 'penetapan kadar imunosorben dengan menggunakan antibodi sekunder berlabel enzim merupakan uji serologis yang umum digunakan di berbagai laboratorium imunologi. Keunggulan uji ini antara lain adalah memiliki teknik pengerjaan yang relatif sederhana, ekonomis, dan memiliki sensitivitas yang cukup tinggi. Pada tahun 1971, Peter Perlmann dan Eva Engvall memperkenalkan teknik ELISA dalam bidang imunologi (ELISA konvensional) yang pada waktu itu bertujuan untuk menganalisis interaksi antigen dengan antibodi di dalam suatu sampel yang ditandai dengan menggunakan indikator enzim sebagai pelapor/*reporter label*/signal.

ELISA adalah suatu teknik biokimia yang terutama digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Jika sedang mencari antibodi maka plate ELISA di coated dengan antigen yang sesuai demikian pula sebaliknya jika sedang mencari antigen maka plate yang disediakan di coated dengan antibodi yang sesuai. Dalam perkembangan kemajuan teknologi, teknik ELISA telah banyak digunakan untuk berbagai bidang

baik diagnostik dalam bidang medis, patologi tumbuhan, dan juga berbagai bidang industri. Kelebihan metoda ELISA dibandingkan dengan metoda imun lainnya adalah penggunaan antibodi dengan spesifitas yang tinggi sehingga akurasi bahan atau analit yang ditemukan sangat dapat diandalkan. Berdasarkan uraian diatas maka penulis akan membahas tentang ELISA dan aplikasinya pada infusa daun padi IR bagendit.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah salah satu metoda dalam bidang laboratorium terutama imunologi untuk mengetahui ekspresi protein, reaksi imunitas, respon imun. Dalam bidang imunologi teknik ini digunakan untuk menentukan adanya antigen atau antibodi dalam sampel/serum. ELISA merupakan suatu teknik biokimia yang dalam perkembangannya banyak diaplikasikan dalam berbagai bahan baik human, rat, tumbuhan dan lain lain yang juga berfungsi sebagai alat diagnostik dalam bidang medis maupun non medis misalnya industri. Prinsip dasar reaksi ELISA adalah mereaksikan antigen dengan antibodi yang berlabel enzim yang kemudian ditambah dengan substrat sehingga akan dihidrolisis menjadi presipitat warna yang dapat dideteksi menggunakan Elisa reader. Pada tahapan akhir Teknik Elisa selalu ditambah dengan stop solution yang berfungsi untuk menghentikan reaksi. Bahan asam kuat biasanya digunakan sebagai larutan stop solution.

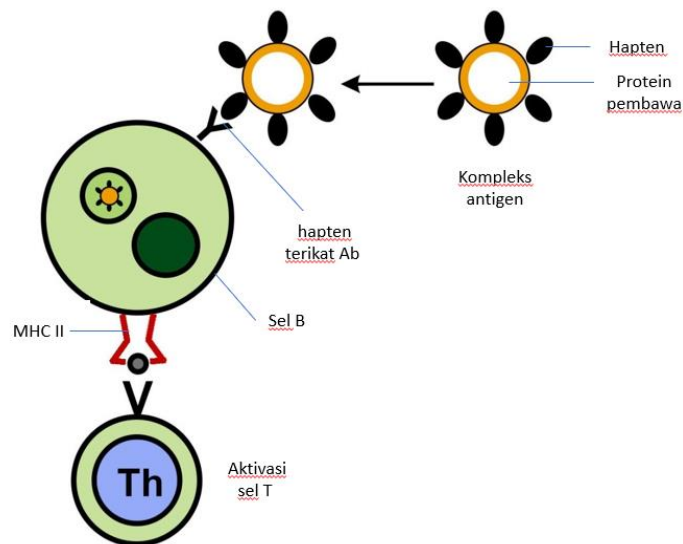
Pada Teknik ELISA, kita harus menetapkan dulu apa yang dicari, jika antigen yang dicari maka reagen yang disiapkan adalah antibodi demikian sebaliknya jika mencari antibodi maka reagen yang disiapkan adalah antigennya. Pada deteksi antigen, maka antibodi yang memiliki spesifisitas tinggi untuk antigen tersebut harus disiapkan. Selanjutnya antigen yang dari sampel dimasukkan dalam lempeng mikrotiter polisterene yang sudah dikoated dengan antibodi spesifik. Kemudian ditambah dengan antibodi pendeteksi sehingga terdapat kompleks antigen antibodi. Antibodi pendeteksi dapat berikatan dengan antibodi sekunder yang berlabel enzim melalui proses biokonjugasi. Setiap akhir tahapan proses ini harus dilakukan pencucian plate dengan deterjen yang sudah ada dalam kit. Tahapan berikutnya pemberian substrat enszimatik untuk memproduksi presipitat warna yang menunjukkan kadar dari sampel. Substrat yang digunakan bisa dari kromogen atau fluorogenik. Tahapan yang diuraikan ini adalah metode ELISA Sandwich, secara rinci akan dibahas dalam sub bab buku ini.

2. Dasar Teori

Sebelum mempelajari Teknik Elisa, kita perlu mengingat kembali pengertian antigen dan antibodi serta reaksi antigen dan antibodi. Pada Teknik Elisa selalu menggunakan prinsip pertemuan antara antigen dan antibodi. Di bawah ini pengertian antigen dan antibodi serta prinsip reaksi antigen dan antibody

2.1 Antigen dan Antibodi

Antigen atau sering disebut imunogen terdapat pada berbagai patogen seperti bakteri, virus, jamur, parasit. Imunogen spesifik dapat merangsang sel limfosit B atau T dan menghasilkan produk respon imun yang disebut antibody dan atau *T-Cell Receptor* (TCR). Secara fungsional antigen terdiri dari immunogen dan hapten misalnya dimitrofenol, antibiotik dan berbagai obat yang memiliki berat molekul kecil. Hapten merupakan antigen inkomplit yang tidak bisa secara langsung/mandiri bereaksi dengan respon imun tetapi harus melalui molekul protein pembawa. Hapten dapat dikenali oleh sel B sedangkan protein pembawa dapat dikenali oleh sel T. Epitop dibentuk oleh Hapten pada protein pembawa yang dapat nerangsang terbentuknya antibody. Molekul pembawa dengan hapten membentuk kompleks antigen. Komplek antigen diproses melalui reseptor Sel B dan melalui peptide dari protein pembawa yang dipresentasikan dalam MHC-II ke sel T helper (Th). Gambar 4 berikt untuk memperjelas mekanisme respons sel B terhadap hapten.



Gambar 4. Respon sel B terhadap hapten

2.1.1 Determinan antigen

Determinan antigen disebut juga epitop adalah bagian yang terdapat pada makromolekul yang dapat dikenali oleh limfosit, bagian ini mampu membuat kontak fisik dengan reseptor antibody. Berbagai epitop yang terdapat pada antigen yang sama dapat dikenali oleh sel B dan T. Antigen yang bebas dalam larutan, epitopnya mudah dikenali sehingga mudah diikat oleh sel B. Berbagai epitop yang terdapat pada makromolekul, masing-masing dapat merangsang terbentuknya respon imun sehingga menghasilkan antibody spesifik yang berbeda-beda. Bagian antigen yang berikatan dengan antibody disebut epitope atau determinan antigen, sedangkan bagian dari antibody yang berikatan dengan epitop antigen atau TCR disebut paratop atau disebut regio variabel pada molekul antibody. Protein dengan berat molekul lebih dari 40.000 Dalton dan kompleks polisakarida adalah merupakan antigen poten alamiah terbanyak. Glikolipid yang tidak dimurnikan, lipoprotein dapat juga bersifat imunogenik termasuk asam nukleat dalam penyakit autoimun.

2.1.2 Mitogen

Dalam respon imun di fase pengenalan, setelah makrofag melalui MHC II memperkenalkan antigen kepada limfosit maka limfosit akan teraktivasi membentuk klon atau memperbanyak diri. Dalam proses proliferasi dan diferensiasi limfoid ini diperlukan suatu bahan alamiah yang berfungsi atau mengikat banyak klon yang disebut mitogen atau lektin.

2.1.3 Macam-macam antigen

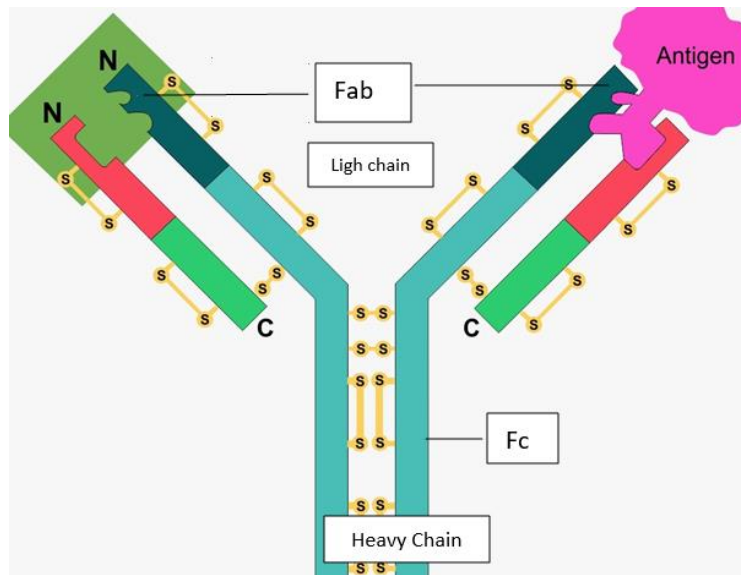
Antigen dapat dibedakan berdasarkan beberapa hal yaitu: epitope yaitu unideterminan univalen, unideterminan multivalen, multideterminan univalen, multideterminan multivalen; menurut spesifitasnya yaitu heteroantigen, xenoantigen, alloantigen, antigen organ spesifik, autoantigen; menurut ketergantungan terhadap sel T yaitu T depeden dan T independen; menurut sifat kimiawi yaitu polisakarida, lipid asam nukleat, protein.

2.2 Antibodi

Komponen darah terdiri dari bagian cair dan padat. Bagian cair disebut serum atau plasma dan bagian padat disebut sel darah. Bagian cair diperoleh melalui pemisahan darah dengan cara

disentrifugasi dapat juga melalui pembekuan sehingga bagian cair terperas. Bagian cair mengandung bahan terlarut tanpa sel diantaranya adalah protein globulin yang dikenal sebagai imunoglobulin. Imunoglobulin ini memiliki tingkat spesifisitas dan aktifitas biologik yang berfungsi untuk mengikat antigen dan menghantarkannya ke sistem efektor pemusnahan. Imunoglobulin ini dikenal dengan nama antibody.

Proses pembentukan imunoglobulin (Ig) diawali dari aktivasi sel limfosit B melalui rangsangan antigen. Sel B yang teraktivasi membentuk klonal yang selanjutnya menjadi sel plasma dan memproduksi antibody. Antibody yang terbentuk akan mengikat antigen spesifik dengan antibody tersebut. Melalui proses pemisahan elektroforesis pada serum akan ditemukan imunoglobulin terbanyak yaitu gama, juga ada fraksi globulin alfa dan beta. Struktur antibody terdiri dari dua fragmen FAB (fragmen antigen binding) yang berikatan dengan determinan antigen dan Fc (fragmen konstan) yang tidak bisa berikatan dengan atigen. Setiap molekul imunoglobulin memiliki 4 rantai polipeptida yang terbagi menjadi 2 rantai berat (heavy chain) dan 2 rantai ringan (light chain). Jenis imunoglobulin terdiri dari IgM, IgG, IgA, IgD, IgE. Imunoglobulin M memiliki struktur pentamer sehingga memiliki berat molekul tertinggi. Imunoglobulin A memiliki struktur dimer sedangkan IgG, IgE, IgD memiliki struktur yang sama yaitu monomer.



Gambar 5. Struktur antibody

3.1.1 Immunoglobulin G (IgG)

Imunoglobulin G memiliki berat molekul 160.000 dalton dan kadarnya dalam darah mencapai kurang lebih 13 mg/ml. Imunoglobulin G terbanyak didalam serum yang merupakan 75% dari semua imunoglobuli. Selain didalam darah IgG dapat ditemukan juga dalam urin dan cairan serebrospinalis (CSS). IgG dapat menembus plasenta sehingga menjadi imunitas bayi hingga berumur 6-9 bulan. IgG dan komplemen dapat menjadi opsonin sehingga memudahkan proses fagositosis antigen.

3.1.2 Immunoglobulin A (IgA)

Imunoglobulin A memiliki berat molekul 165.000 dalton dan hanyasedikit ditemukan dalam serum, terbanyak ditemukan dalam saluran nafas, cerna, kemih, air mata, keringat, ludah, dan air susu ibu. IgA memiliki fungsi melindungi tubuh dari pathogen melalui adhesi dari pathogen, dapat bekerja sebagai opsonin, menetralkan toksin dan virus, mengaglutinasi kuman dengan cara mengganggu motilitasnya sehingga memudahkan proses fagositosis, dan mengaktifkan komplemen melalui jalur alternatif.

3.1.3 Immunoglobulin M

Imunoglobulin M memiliki berat molekul 900.000 dalton dan merupakan makroglobulin (M) atau immunoglobulin terbesar. Dalam aktivasi komplemen pada jalur klasik, IgM merupakan Ig yang paling efisien. Pada respon imun primer, IgM dibentuk paling dahulu dibandingkan dengan IgG, akan tetapi pada respon imun sekunder IgG akan mencapai titer tertinggi. Antibody alamiah seperti isoaglutinin, golongan darah AB, antibody heterofil adalah IgM. Pada proses imunisasi pada anak, produk bakteri seperti toksoid diperlukan beberapa hari sebelum antibody terbentuk dalam darah. Setelah pemberian toksoid kedua maka kadar antibody dalam darah meningkat tajam dan mencapai kadar maksimal dibandingkan pada respon primer. Hal ini karena adanya ekspansi sel memori yang di bentuk oleh respon primer/pertama.

3.1.4 Immunoglobulin D (IgD)

Kadar immunoglobulin D yang berada di dalam serum sangat rendah bila dibandingkan dengan kelas immunoglobulin lainnya, jumlahnya sekitar 1% dari total immunoglobulin. IgD sangat rentan terhadap degradasi proses proteolitik karena tidak dilepas oleh sel plasma. IgD digunakan sebagai marker terhadap sel B karena keberadaan IgD ada di permukaan sel B, bersama

IgM memiliki fungsi sebagai reseptor antigen untuk aktivasi sel B. Namun peran utama hingga sekarang masih belum jelas, diduga mencegah terjadinya toleransi imun.

3.1.5 Immunoglobulin E (IgE)

Sel Plasma memproduksi IgE dalam selaput lender saluran nafas dan cerna. IgE memiliki sifat mudah diikat oleh sel mast, sel basophil, dan sel parasit¹²¹ pada reseptor fraksi Fc dari IgE (Fc-R). Kadar IgE yang tinggi ditemukan pada kasus alergi, infeksi kecacingan, dan hampir imunitas terhadap parasit.

3. Teknik Elisa

3.1 Jenis-Jenis Metode Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Secara garis besar ada dua jenis Teknik ELISA yaitu kompetitif dan non kompetitif. Teknik kompetitif menggunakan konjugat antibodi-enzim atau antigen -enzim. Teknik non kompetitif menggunakan antibodi primer dan sekunder. Antibodi sekunder pada Teknik nonkompetitif dikonjugasikan dengan anzim yang berfungsi sebagai signal.

Seiring dengan kebutuhan deteksi antigen atau antibodi secara secara sensitif dan spesifik, maka Teknik ELISA telah banyak digunakan. Inovasi Teknik ELISA telah berkembang pesat yang tujuannya adalah untuk mendapatkan hasil yang optimal. Penjelasan berikut ini adalah contoh inovasi teknik ELISA yaitu: ELISA Direct, ELISA Indirect, ELISA Sandwich, dll.

3.1.1 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) DIRECT

Teknik ELISA direct adalah yang paling sederhana. Pada Teknik ini biasanya untuk mengukur antige pada sampel dengan menggunakan antibodi monoclonal yang spesifik. Antigen dari sampel yang dicari dimasukkan pada microtiter sehingga antigen tersebut dapat menempel pada dinding microtiter. Pada tahapan ini microtiter dibilas untuk menghilangkan antigen yang tidak menempel pada dinding microtiter tersebut. Antibodi yang berlabel enzim (dicoated dengan enzim misalnya dengan horse rapid peroksidase/HRP) ditambahkan sehingga terjadi ikatan kompleks antigen antibodi yang berlabel enzim dan pencucian dilakukan pada tahapan ini untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat dengan antigen yang diinginkan. Tahapan akhir sebelum pemberian stop solution adalah dengan menambahkan substrat yang bereaksi dengan

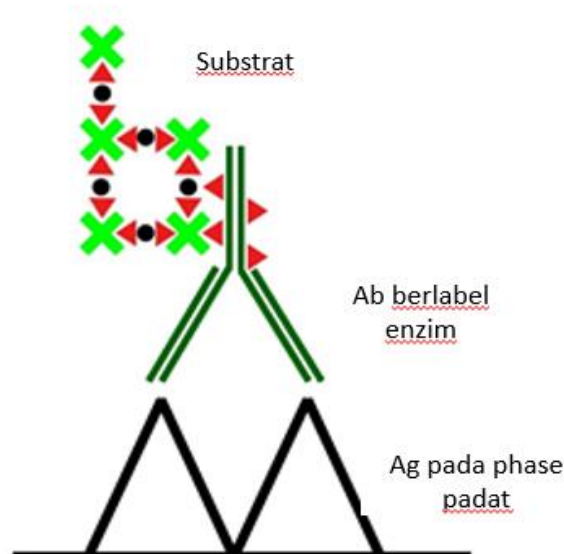
enzim yang terdapat pada antibodi sehingga akan menghasilkan presipitat warna yang dapat diukur kadar atau keberadaan antigen yang dicari baik menggunakan kolorimetri, chemiluminescent, atau fluorescent end-point.

Beberapa kelemahan ELISA direct antara lain:

- a. Cukup mahal
- b. Kurang sensitive (penurunan imunoreaktivitas antibodi)
- c. Tidak memiliki fleksibilitas enzim

Sedangkan kelebihan dari ELISA direct antara lain:

- a. hanya 1 antibodi sehingga cepat
- b. reaksi silang dapat dihindari



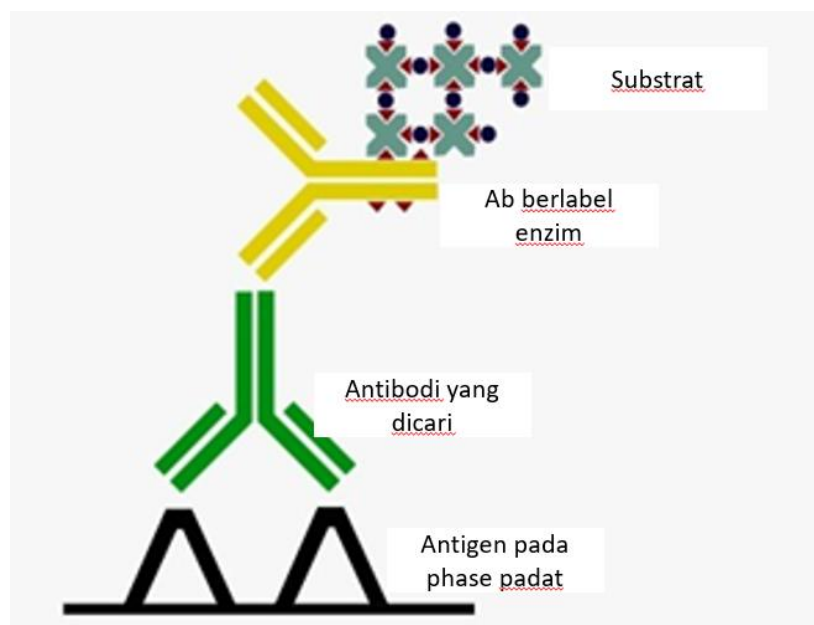
(Gambar 6. Mekanisme ELISA direct)

3.1.2 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) INDIRECT

Pada Teknik ELISA Indirect yang dicari adalah antibodi sehingga diperlukan antigen yang spesifik. Antigen spesifik (monoclonal), antibodi yang dicari pada sampel, antibodi sekunder yang berlabel enzim, substrat, dan stop solution adalah mutlak diperlukan untuk Teknik ELISA indirect ini.

Berikut ini secara ringkas tahapan Teknik ELISA indirect untuk mengukur keberadaan antibodi pada sampel:

1. Pada plate microtiter ditambahkan pengenceran standar yang sudah disiapkan dari reagen dan pada plate berikutnya ditambahkan sampel yang akan dicari konsentrasinya. Enceran standar ini berguna untuk menetapkan kurva sebagai acuan menentukan rumus dalam penentuan kadar sampel.
2. Diinkubasi sesuai prosedur yang berfungsi untuk menghasilkan kompleks antigen antibodi secara optimal.
3. Dilakukan pencucian untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat pada kompleks tersebut.
4. Antibodi pendeteksi yaitu antibodi sekunder yang berlabel enzim ditambahkan sehingga terjadi kompleks ikatan antigen antibodi dengan antibodi yang berlabel enzim.
5. Diinkubasi sesuai prosedur, dan dicuci sesuai prosedur dalam kit.
6. Substrat dimasukkan untuk diubah oleh enzim sehingga dihasilkan presipitat warna
7. Absorben dibaca pada Elisa reader/spektrofotometer, dikuantifikasi menggunakan kurva expert menggunakan absorbansi enceran standar.



(Gambar 7. Mekanisme *Indirect ELISA*)

Kelemahan ELISA indirect antara lain :

- a. metoda imobilisasi antigen nya non spesifik
- b. waktu pengujian relative lama

Kelebihan dari ELISA indirect antara lain :

- a. banyak produk variasi antibodi sekunder.
- b. Lebih sensitive

3.1.3 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) SANDWICH

Teknik Elisa Sandwich mirip dengan Elisa direct yaitu mencari antigen yang diinginkan dan yang membedakan adalah pada Elisa Sandwich, antigen yang dicari tidak perlu dipurifikasikan. Teknik Elisa Sandwich menggunakan antibodi primer untuk bereaksi dengan antigen yang diinginkan pada sampel dan bereaksi dengan antibodi sekunder yang berlabel enzim. Komplek antigen antibodi primer dan antibodi sekunder ini selanjutnya dengan penambahan substrat akan menghasilkan presipitat warna dan intensitas warna ini mencerminkan konsentrasi antibodi yang dicari pada sampel. Pada Teknik Elisa Sandwich. Antigennya bersifat multivalent seperti polisakarida atau protein yang memiliki minimal 2 sisi antigenik agar dapat berinteraksi dengan antibodi primer spesifik dan antibodi sekunder spesifik yang berlabel enzim. Antibodi primer disebut juga antibodi penangkap dan antibodi sekunder disebut juga antibodi deteksi.

Elisa Sandwich memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi sehingga aplikasi Elisa Sandwich kebanyakan untuk mendeteksi keberadaan antigen yang kadarnya rendah dengan tingkat kontaminasi pada sampel yang tinggi.

Secara ringkas berikut ini adalah tahapan Teknik Elisa Sandwich:

1. Plate yang digunakan sudah disiapkan dengan antibodi spesifik (non spesifik binding site diblokir)
2. Sampel yang berisi antigen yang dicari dimasukkan dalam plate
3. Untuk membuang kelebihan antigen yang tidak bereaksi, maka dilakukan pencucian plate.
4. Ditambahkan antibodi primer agar berikatan dengan antigen secara spesifik.
5. Ditambahkan antibodi sekunder yang berlabel enzim agar berikatan dengan antibodi primer.
6. Untuk membuang konjugat antibodi-enzim yang tidak berikatan maka dilakukan pencucian plate.
7. Substrat ditambahkan agar dapat diubah oleh enzim menjadi presipitat warna yang dapat diukur intensitasnya.
8. Ditambahkan stop solution untuk menghentikan reaksi.

9. Intensitas warna diukur menggunakan Panjang gelombang tertentu menggunakan Elisa reader/spektrofotometer.

Tingkat sensitifitas Elisa Sandwich dipengaruhi oleh beberapa factor antara lain:

- a. Molekul antibodi primer banyak yang menempel pada dinding-dinding microtiter.
- b. Tingkat avinitas antibodi primer dan antibodi sekunder dengan antigen yang dicari
- c. Pengembangan dari Elisa direct.

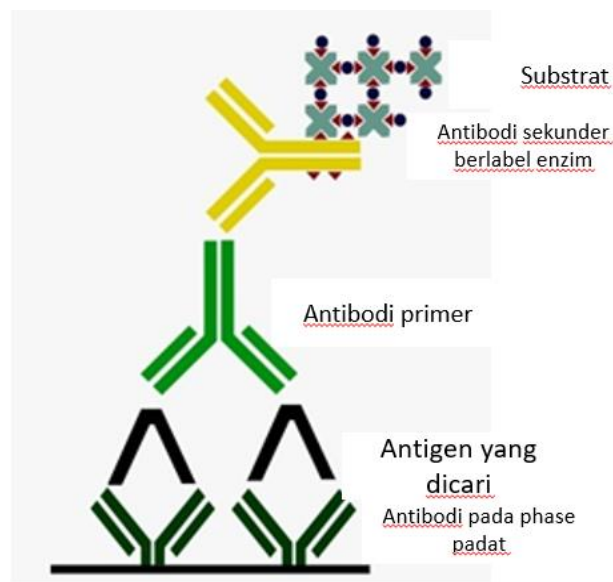
Kelebihan teknik ini adalah:

- a. Kemampuan mendeteksi antigen dengan titer yang sangat rendah karena bisa bereaksi dengan antibodi primer dan antibodi sekunder dengan sangat baik.
- b. Kemampuan mengukur antigen multivalent(yang tidak perlu dipurifikasikan) dan mampu mengikat antigen yang diinginkan secara selektif.

Kelemahan Teknik ini adalah:

- a. Sulit mencari dua sisi antibodi yang dapat bereaksi dengan antigen yang sama pada sisi antigenik yang berbeda (epitope yang berbeda)
- b. Hanya dapat diaplikasikan untuk mendeteksi keberadaan antigen multivalent pada sampel.

Prinsip dasar Elisa Sandwich diilustrasikan pada gambar berikut:



(Gambar 8. Prinsip kerja Elisa Sandwich)

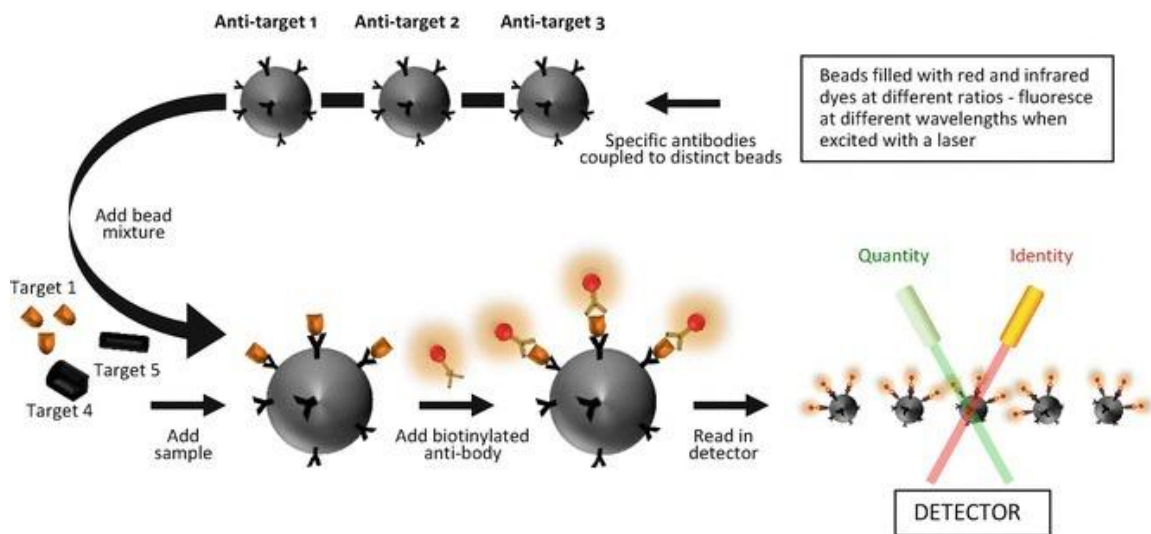
3.1.4 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) Biotin Sterptavidin (Jenis ELISA Modern)

Teknik Elisa Sandwich dikembangkan menjadi Teknik Elisa yang lebih modern yaitu tidak hanya mencari antigen tetapi juga antibodi. Tingkat sensitivitas dari jenis Elisa ini relative tinggi. Prinsip kerja Teknik ini sama dengan Elisa Sandwich, namun menggunakan antigen primer/penangkap dan antigen sekunder/detector yang bersifat opsional apabila antibodi yang dicari pada sampel tidak bereaksi dengan label enzim.

Teknik ini sudah banyak diaplikasikan pada berbagai analit dengan tingkat keberhasilan yang baik misalnya mendeteksi vitamin biotin.

3.1.5 Multiplex immunoassay

Multiplex immunoassay merupakan pengembangan prinsip Teknik Elisa yang bertujuan untuk menguji secara simultan berbagai analit dalam waktu bersamaan dalam satu sampel. Keuntungan dari Teknik ini adalah dapat mengukur marker yang diinginkan dalam waktu yang sama. Kekurangannya memerlukan alat yang lebih canggih dengan biaya yang lebih mahal bila dibandingkan dengan Elisa konvensional. Teknik Multiplex immunoassay diilustrasikan dalam gambar berikut:



(Gambar 9. Multiplex assay design, Stephen L, 2017)

Multiplex immunoassay menjadi metoda yang semakin dikenal karena beberapa keuntungan diantaranya adalah dapat menghemat waktu dan sampel karena menggabungkan deteksi beberapa analit menjadi satu reaksi. Prinsip kerja multiplex immunoassay bisa menggunakan manik-manik yang dicoated dengan antibody yang memungkinkan deteksi simultan hingga 500 analit yang berbeda. Setiap manik-manik di kode dengan warna yang berbeda yang memungkinkan diferensiasi cepat dan mudah dari peristiwa pengikatan individu. Penambahan antibody spesifik berguna untuk menangkap analit yang sesuai, selanjutnya ditambahkan antibody yang berlabel enzim sebelum dilakukan pembacaan pada instrumen.

3.1.6 Teknik ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) COMPETITIVE

Teknik ELISA Competitive merupakan pengembangan Teknik Elisa yang berguna untuk menguji keberadaan antigen atau antibodi. Prinsip kerja Teknik ini adalah dengan menambahkan competitor untuk bereaksi dengan antigen atau antibodi yang terjadi pada microtiter.

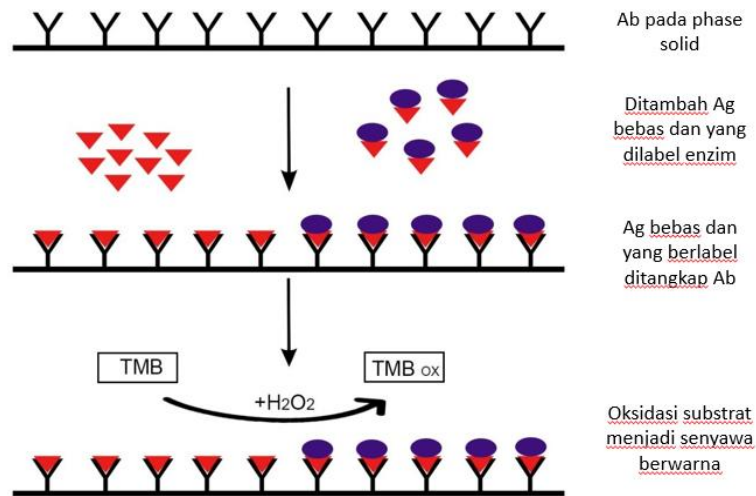
Prosedur singkat untuk pendeteksian antigen pada Elisa competitive adalah sebagai berikut: Pada microtiter diisi dengan antibodi spesifik, larutan yang mengandung antigen spesifik dengan antibodi spesifik yang berlabel enzim serta sampel yang mengandung antigen yang diinginkan ditambahkan dalam microtiter sehingga terjadi kompetisi untuk saling berebut pasangan. Pencucian dilakukan untuk membuang sisa antigen spesifik maupun antibodi yang berlabel enzim yang tidak berikatan dengan antigen pada sampel yang tidak berikatan dengan antibodi spesifik. Langkah selanjutnya adalah dengan menambahkan substrat yang dapat bereaksi dengan antibodi berlabel enzim dan antigen spesifik yang dapat menghasilkan presipitat warna yang intensitasnya merupakan cerminan dari kadar antigen pada sampel. Sebelum pembacaan pada Elisa reader maupun spektrofotometer perlu ditambah asam pekat sebagai stop solution yang berfungsi untuk menghentikan reaksi.

Perlu diperhatikan tanda positif dalam deteksi antigen metoda Elisa competitive adalah apabila kompetisi antigen yang diinginkan menang dengan antigen spesifik yang bereaksi dengan antibodi berlabel enzim dan berinteraksi dengan antibodi spesifik, maka tidak terjadi signal yang ditimbulkan.

Prosedur singkat pendeteksian antibodi spesifik pada metoda Elisa competitive adalah antigen spesifik dilekatkan pada microtiter sehingga menempel pada dinding microtiter. Langkah berikutnya adalah antibodi yang diinginkan pada sampel ditambahkan bersamaan dengan antibodi

yang berlabel enzim sehingga terjadi kompetisi antara antigen spesifik dengan antibodi yang diinginkan pada sampel dan antibodi yang berlabel enzim. Proses pencucian pada setiap akhir dari langkah ini diperlukan untuk menghilangkan sisa antigen spesifik yang tidak bereaksi dengan antibodi yang dicari maupun antibodi yang berlabel enzim.

Besarnya kadar antibodi pada sampel yang dicari bisa diketahui setelah ada penambahan substrat. Substrat yang biasanya berisi kromogen akan dihidrolisis oleh enzim yang terdapat pada antibodi yang bereaksi dengan antigen yang dicari pada sampel dan antigen spesifik menjadi presipitat yang berwarna. Intensitas warna yang terjadi diukur absorbansinya dan dibaca pada kurva ekspert untuk dihitung kadarnya. Deteksi positif ditandai oleh tidak terbentuknya signal yang artinya semua antibodi yang diinginkan pada sampel bereaksi/menang berkompetisi dengan antibodi yang berlabel enzim dan antigen spesifik. Prinsip kerja Elisa Competitive diilustrasikan pada gambar berikut:



(Gambar 10. Competitive Elisa)

Teknik Elisa Competitive memiliki tingkat sensitivitas tinggi akibat spesifisitas dari antibodi dan antigen. Oleh karena itu kelebihan dari teknik ini adalah larutan sampel yang mengandung antibodi atau antigen tidak perlu dipurifikasikan atau dimurnikan.

Berikut ini secara singkat prinsip kerja Teknik Elisa:

Microplate atau microtiter dilekati dengan antibodi atau antigen yang dicari (prinsip ini adalah untuk direct Elisa). Penempelan tersebut dapat dilakukan secara non spesifik maupun spesifik. Jika menggunakan indirect Elisa maka pada dinding microtiter dilekati dengan antibodi spesifik dan jika Sandwich Elisa maka pada dinding microtiter dilekati dengan antibodi spesifik. Langkah selanjutnya adalah mereaksikan dengan antigen atau antibodi yang dicari pada sampel dan antibodi yang berlabel enzim. Penambahan substrat selalu dilakukan setelah penambahan antibodi yang berlabel enzim agar terjadi presipitat warna dan reaksinya dihentikan dengan penambahan stop solution. Kadarnya dibaca pada alat Elisa reader atau spektrofotometer.

Langkah-langkah teknis prosedur kerja Elisa diuraikan sebagai berikut, langkah ini berdasarkan manual prosedur tertentu secara prinsip sama, namun pada saat mengerjakan Teknik Elisa wajib mengikuti manual prosedur yang ada dalam kit reagen. Contoh berikut ini adalah dari beberapa macam teknik Elisa:

ELISA indirect untuk mendeteksi antibodi pada sampel:

- 1) Mikrotiter dilapisi dengan antigen yang sudah dimurnikan dengan membiarkan larutan berisi antigen menempel pada dinding/ permukaan selama 30-60 menit.
- 2) Dilakukan proses pencucian yang berguna untuk membilas antigen yang tidak terikat dengan buffer.
- 3) Sampel serum yang akan dideteksi antibodinya ditambahkan dan dibiarkan antibodi spesifik untuk berikatan dengan antigen.
- 4) Dilakukan pencucian untuk membilas antibodi yang tidak terikat.
- 5) Anti-Ig ditambahkan agar berikatan pada daerah Fc pada antibodi yang spesifik secara kovalen dengan enzim.
- 6) Dilakukan pencucian untuk membilas kompleks antibodi-enzim yang tidak terikat.
- 7) Substrat chromogenic ditambahkan agar dapat dihidrolisis oleh enzim sehingga menghasilkan warna setelah diinkubasi pada waktu tertentu.
- 8) Intensitas warna yang terjadi diukur pada Elisa reader atau spektrofotometer pada Panjang gelombang tertentu. Semakin pekat warna yang terjadi semakin tinggi kadar antibodi yang ada pada sampel.

ELISA sandwich untuk deteksi antigen:

- 1) membiarkan larutan berisi antigen menempel pada dinding/ permukaan selama Mikrotiter dilapisi dengan antibodi yang sudah dimurnikan dimurnikan dengan 30-60 menit.
- 2) Dilakukan pencucian unuk membilas antibodi yang tidak terikat dengan buffer.
- 3) Sampel yang akan dideteksi antigennya ditambahkan dan antibodi dibiarkan untuk berikatan dengan antigen spesifik dari sampel.
- 4) Dilakukan pencucian untuk membilas antigen yang tidak terikat.
- 5) Antibodi yang berlabel enzim ditambahkan dan antibodi ini bersifat spesifik untuk epitp dari antigen yang dicari pada sampel
- 6) Dilakukan pencucian untuk membilas antibodi yang berlabel enzim yang tidak terikat.
- 7) Substrat chromogenic ditambahkan, substrat ini tidak berwarna yang terikat pada enzim pada antibodi sekunder dan dikonversi menjadi produk hingga terbentuk warna setelah melalui waktu inkubasi.
- 8) Larutan asam pekat sebagai stop solution ditambahkan untuk menghentikan reaksi
- 9) Intensitas warna yang terjadi diukur absorbansinya menggunakan Elisa reader atau spektrofotometer. Semakin pekat warna yang terbentuk semakin tinggi kadar antigen yang terdapat padan sampel. Kadar antigen dalam sampel dapat diukur menggunakan kurva ekspert.

BAB III

APLIKASI ELISA PADA DAUN PADI IR Bagendit

1. **Prosedur Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit Menggunakan Teknik Elisa Indirect**

Pengukuran kadar protein daun padi IR Bagendit bertujuan untuk mengetahui kandungan kadar protein metallothionein. Protein ini berfungsi untuk mengikat logam berat misalnya Plumbum (Pb).

2. **Metoda**

2.1 **Bahan dan alat**

Daun padi berbagai varietas, Assay Plate, Standard, Sampel diluent, Assay Diluent A, Assay Diluent B, Wash Buffer (25 x concentrat), Substrat, Stop Solution, Plate sealer for 96 wells

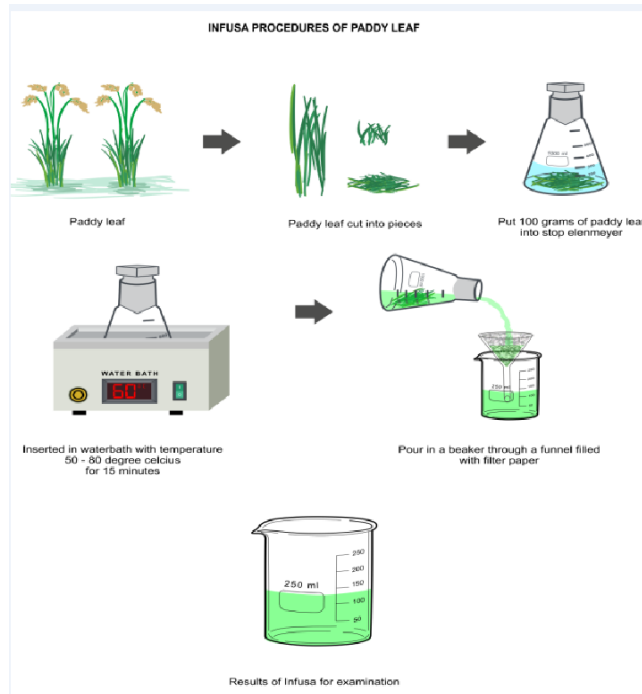
2.2 **Preparasi Ekstrak bahan metoda Infundasi (infusa)**

Daun padi dari berbagai varietas dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir sebelum di cacah menjadi bagian kecil. Ditimbang sebanyak 100 g dimasukkan kedalam panci A dan ditambah aquades sebanyak 1 liter, kemudian ditutup. Panci bagian B (sebagai water bath) ditambah air secukupnya hingga panci atas (A) terendam sebagian. Dipanaskan selama 15 menit dihitung mulai suhu didalam panci A mencapai suhu 90°C sambil sesekali diaduk. Infusa diserakai selagi panas melalui kain panel. Supernatan merupakan Infus.

Persiapan pembuatan infusa



Gambar 11. Foto pembuatan infusa



Gambar 12. skema pembuatan infusa

2.3 Prosedur Pemeriksaan *metallothionein*/MT (kit ELISA)

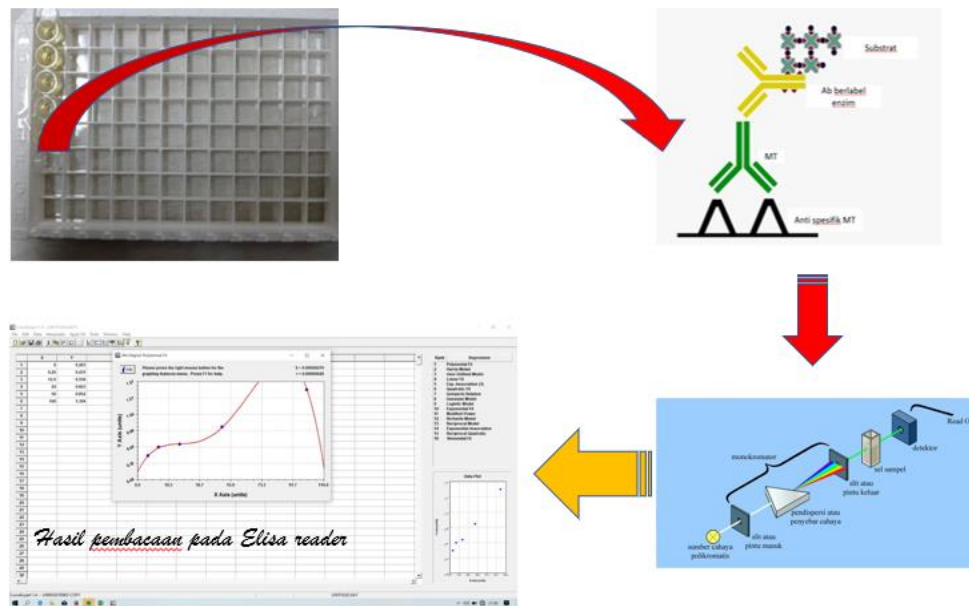
a). Prinsip pemeriksaan:

Mikro plate dilapisi dengan antibodi apesifik MT. Standar dan sampel ditambahkan kedalam mikro well yang sesuai dengan biotin-terkonjugasi pada antibodi poliklonal spesifik untuk MT. Selanjutnya avidin terkonjugasi peroksidase ditambahkan ke dalam setiap sumur dan diinkubasi. Substrat solusi ditambahkan ke setiap sumur. Perubahan warna terjadi pada sumur yang berisi MT, antibodi biotin-terkonjugasi, dan enzim avidin-terkonjugasi. Reaksi enzim-substrat diakhiri dengan penambahan larutan asam sulfat dan perubahan warna diukur secara spektrofotometri dengan panjang gelombang 450 nm 2 nm. Konsentrasi MT dalam sampel ini ditentukan dengan membandingkan OD dari sampel dengan kurva standart.

b). Cara Kerja

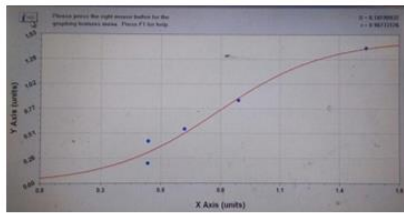
Semua reagen dipersiapkan dalam suhu kamar dan dihomogenkan. Pada setiap sumur ditambahkan 100 standar, blangko, sampel, ditutup dengan sealer, inkubasi selama 2 jam pada suhu 37⁰C. Ditambahkan 100 ml Reagen deteksi solusi pada setiap sumur. Tutup dengan sealer. Inkubasi selama 1 jam 37⁰C. Aspirasi masing-masing dengan baik, cuci dengan buffer pencuci

kira-kira 400 ml dengan cara menyemprotkan botol, multi pipet, dispenser atau autiwasher. Diulangi hingga tiga kali. Ditambahkan 100 ml larutan B Deteksi Reagen setiap sumur, ditutup dengan sealer baru, diinkubasi 1 jam suhu 37⁰C. Langkah pencucian diulangi hingga 5 kali. Ditambahkan 90 ml Substrat Solusi untuk setiap sumur, tutup dengan sealer, inkubasi selama 15 – 30 menit pada suhu 37⁰C. Lindungi dari cahaya. Ditambahkan 50 ml Stop Solution untuk setiap sumur. Jika perubahan warna tidak muncul, tekan sumur untuk memastikan pencampuran menyeluruh. Dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm.

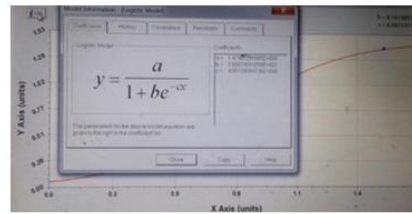


Gambar 13. Tahapan pemeriksaan MT

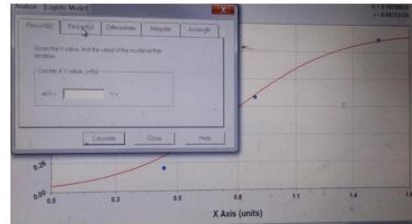
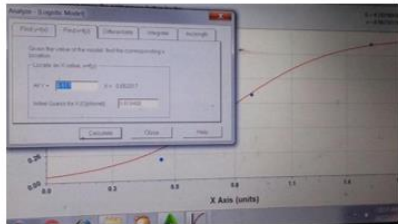
Pada gambar 13, sampel dan standar yang telah dimasukkan pada mikro plate sesuai dengan enceran standar dan nomor sampel akan bereaksi dengan antigen pada phase padat, antibody sekunder, dan substrat. Absorbance sampel dan enceran standar dibaca pada spektrofotometr atau elisa reader.



1



2



Gambar 14. Tahapan pengukuran kadar MT pada kurva expert.(1. Pemilihan kurva yang r nya mendekati 1, 2. Penentuan tumus, 3. Mengkonversi ke rumus digital, 4. Memasukkan absorbance sampel pada rumus)

Pada gambar 14, setelah pembacaan pada spektrofotometer atau Elisa reader, maka hasil absorbance enceran standar dimasukkan pada kurva expert untuk diketahui kurva yang bagus. Kurva yang bagus adalah yang memiliki nilai r mendekati angka 1 dan dipilih untuk menentukan rumus perhitungan kadarnya. Setelah ditetapkan kurvanya dan rumusnya diketemukan, maka langkah selanjutnya adalah menghitung kadar protein metallothionein berdasarkan rumus tersebut.

Daun padi IR Bagendit setelah diperiksa dengan Teknik Elisa ternyata memiliki kadar protein metallothionein tertinggi bila dibandingkan dengan batang, akar dan biji termasuk pada jagung, kedelai, dan buncis. (Santosa,2016) protein metallothionein memiliki sifat mudah mengikat logam berat sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan detoksikasi. Secara molekuler kandungan metallothionein sudah dibuktikan dengan melihat letak gen nya berdasarkan *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Gambar berikut adalah hasil penelitian yang membuktikan Notasi gen metallothionein pada daun padi IR Bagendit. (Santosa B, 2020)

Posisi gen terletak pada kromosom 3 tepatnya pada 130432 bp, /locus_tag="OSJNBa0003G23.9"/note="putative stress-inducible protein".



Notasi gen metallothionein pada padi hasil sekuensing locus_tag="OSJNBa0003G23.9" similar to stress-inducible protein STI GB:CAA56165 GI:872116 [Glycine max]. codon_start=1. Product="putative stress-inducible protein. protein_id="AAK00971.1.translation="MKKCLEVLIPVTFRKELTYHIWNSAIVTYTPVVFT TAIQLDPTD TLHSNRSFCYLKSGEAREALVDAKTCIGLKPDPKGYRKGALMSLKEYKEACDAF MDGVKLDPASGEMHEAFWEAAAALKKKHLAGKTVSSFD"

Gen metallothionein terletak pada kromosom 3 yang memiliki fungsi sebagai protein yang terinduksi dengan adanya tekanan lingkungan seperti adanya cemaran logam. Sesuai penelitian Taleby M, dkk. 2019 ekspresi gen penyandi metallothionein mengalami peningkatan pada induksi logam berat Cu, Zn, Ni, Cd, dan metallothioneins (MTs) adalah ligan pengikat logam berat yang terdefinisi dengan baik pada tanaman. Uji laboratorium menggunakan kerang Scrobicularia plana yang dipajan logam berat Zn, Cd, Pb dan Cu, selama 15 hari menunjukkan peningkatan konsentrasi metallothionein terutama pada pajanan Zn. Sintesis metallothionein adalah hasil dari perubahan secara fisiologis seiring dengan perubahan dalam pajanan logam. (Luque EG, 2004).

3. Ringkasan

Dalam proses respon imun, mengukur keberadaan protein sangat penting untuk diketahui sebagai petunjuk pengembangan ilmu pengetahuan termasuk dalam dunia medis digunakan dalam menegakkan diagnosis. Keberadaan Protein metallothionein merupakan petanda adanya paparan logam berat diantaranya plumbum (Pb). Protein ini memiliki sifat dapat mengikat dengan kuat logam berat misalnya plumbum dan selanjutnya dapat didetoksikasi. Pengembangan melalui penelitian telah dilakukan dengan menemukan keberadaan protein metallothionein pada bahan alam. Tanaman padi, jagung, buncis, kedelai baik pada daun, batang, biji, maupun akarnya telah terbukti mengandung protein metallothionein. Berbagai tanaman yang telah diteliti, daun padi memiliki kandungan protein metallothionein tertinggi. Kandungan protein metallothionein ini dapat diukur kadarnya melalui Teknik Elisa dengan berbagai metoda baik direct, indirect, Sandwich, maupun competitive. Protein metallothionein yang telah diukur kadarnya melalui Teknik Elisa diperkuat hasilnya dengan melalui pemeriksaan molekuler, gen penyandi protein metallothionein ternyata sesuai fungsinya untuk mengikat logam berat.

Semua metoda atau Teknik yang telah dikembangkan tentu memiliki kelebihan dan kekurangan, termasuk Teknik Elisa. Beberapa kelebihan Teknik Elisa adalah pengerjaannya relatif sederhana, relatif ekonomis bila dilihat dari jumlah antibody yang digunakan, memiliki tingkat sensitivitas yang cukup tinggi, sifat interaksi antigen dan antibody sangat spesifik sehingga Teknik Elisa ini dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen walaupun kadar antigen tersebut sangat rendah, dapat digunakan untuk menguji berbagai macam analit. Sedangkan kekurangan dari Teknik Elisa antara lain hanya menggunakan antibody monoklonal yaitu antibody yang hanya mengenal satu antigen yang spesifik, dapat terjadi fals positif karena inefektivitas larutan bloking yang menyebabkan kontrol negatif menunjukkan respon positif sehingga antibody sekunder dapat antigen dapat bereaksi dengan antiven berlabel enzim, biaya relatif mahal karena antibody monoklonal lebih mahal dari antibody poliklonal.

SUMBER PUSTAKA

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2016, *Imunologi Dasar Abbas: Fungsi dan Kelainan Sistem Imun*, Edisi Kelima, ELSEVIER, Halaman 15- 18.
2. Arini Krisna Oktavia. 2012. *TES ELISA* Melalui Haussmann, M. F., C. M. Vleck, and E. S. Farrar. 2007. *A laboratory exercise to illustrate increased salivary cortisol in response to three stressful conditions using competitive ELISA*. *Adv. Physiol. Educ.* 31: 110–115.
3. Cherian MG, Howell SB, Imura N, Klaassen CD, Koropatnick J, Lazo JS, Waalkes MP. 1994 a. Role of metallothionein in carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 126: 1-5.
4. Cherian MG. 1994 b. The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. *Environ Health Perspect* 102(3): 131-135.
5. Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., Palo, E.F.D., 2017, *Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation*, *Clinica Chimica Acta* 383 (2007) 30–40.
6. De Francisco P, Melgar LM, Díaz S et al, 2016. The Tetrahymena metallothionein gene family: twenty-one new cDNAs, molecular characterization, phylogenetic study and comparative analysis of the gene expression under different abiotic stressors. *BMC Genomics* Vol.17:346
7. Isani G, Carpenè E. 2014. Metallothioneins, Unconventional Proteins from Unconventional Animals: A Long Journey from Nematodes to Mammals. *Biomolecules*. vol 4(2): 435–457.
8. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., alih bahasa, Jan Tambayong. ,2007, *Histologi Dasar*, Edisi ke-8, Jakarta. EGC. hlm: 370-387.
9. Baratawidjaja, K.G., Rengganis, I., 2013, *Imunologi Dasar*, Edisi ke-10, FKUI, Jakarta, Halaman 222-233.
10. Leng, S. J. McElhaney, J. Walston, D. Xie, N. Fedarko, G. Kuchel. 2008. *"Elisa and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research"*. *J Gerontol a Biol Sci Med Sci* 63 (8):879–884. [PMC 2562869](#). [PMID 18772478](#).
11. Liu Y, Wu H, Kou L, Liu X, Zhang J, Guo Y. 2014. *Enbo MaTwo Metallothionein Genes in Oxya Chinensis: Molecular Characteristics, Expression Patterns, and Roles in Heavy Metal Stress*. *Plos One*. Vol. 9(11):e112759.
12. Luque EG, DelValls TA, Martínez CC, Forja JM, Parra AG. 2004. *Simulating a heavy metal spill under estuarine conditions: Effects on the clam Scrobicularia plana*. *Marine Environmental Research*. Vol 58(2-5):671-4.
13. Lequin, RM. 2005. *"Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)"* *Clinical Chemistry* 51 (12): 2415–2418.
14. Manahan SE. 2002. *Toxicological chemistry and biochemistry*. 3th ed. ISBN 1-56670-618-1
15. Ornella, M., Cinzia, V., Antonio, C., 2000., *Zinc Transport and Metallothionein Secretion in the Intestinal Human Cell Line Caco-2*. *The Journal of Biological Chemistry*, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc
16. Setiawan, I Made. 2007. *Pemeriksaan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) untuk diagnosis Leptospirosis*. EBERS POPYRUS
17. Steven R, Davis and Cousin J.R. 2000. *Metallothionein Expression in Animal: A Physiological Perspective on Function*. American Society for Nutrition Sciences, Food

Science and Human Nutrition Departement, University of Florida, Gainesville FL 32611-0370.

18. Stephen L. (2017) Multiplex Immunoassay Profiling. In: Guest P. (eds) Multiplex Biomarker Techniques. *Methods in Molecular Biology*, vol 1546. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_13
19. Santosa B, Sunoko H, Sukeksi A. 2016. The Analysis, Identification, And Formulation Of Metallothionein Extract Available In Roots, Stems, Leaves , Flowers , And Grains Of Rice, Corns, Beans And Soybeans. *Internat. J. Sci. Eng.*, Vol. 10(1):17-20
20. Santosa B, Sunoko HR. Analysis, Identification, And Formulation of *Metallothionein* Extracts on Numerous Varieties of Paddy Leaves. *Internat J Sci Eng*. 2017.
21. Santosa B, Darmawati S, Kartika AI, dkk 2020. Isolation, Identification Similarity And Qualitative Expression Of Metallothionein Gene in IR-Bagendit Rice (*Oryza sativa*). *Pharmacognosy Journal*. Vol 12(4):709-715.
22. Talebi M, Ebrahim Sayed Tabatabaei BES, Akbarzadeh H. 2019. Hyperaccumulation of Cu, Zn, Ni, and Cd in *Azolla* species inducing expression of methallothionein and phytochelatin synthase genes. *Chemosphere*. Vol 230:488-97.
23. Wong HL, Tsuyoshi Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K. 2004. DownRegulation of Metallothionein, a Reactive Oxygen Scavenger, by the Small GTPase OsRac1 in Rice. Vol 135:1447-56.
24. Zhou G, Xu Y, Li J, Yang L, Liu JY. Molecular Analyses of the Metallothionein Gene Family in Rice (*L.*). 2009;39(5):595-606.



UNIMUS PRESS
Jl Kedungmundu Raya No 18 Semarang