

LAPORAN PRAKTIKUM
ELISA (Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay)

NAMA: **1. KARIN TIKA FITRIA (NIM: 157008003)**
 2. TM. REZA SYAHPUTRA (NIM: 157008007)
 3. SISKA MULYANI (NIM: 157008009)

HARI/TANGGAL PRAKTIKUM : **KAMIS / 23 JUNI 2016**

TEMPAT : **LABORATORIUM TERPADU LANTAI 2**
UNIVERSITAS SUMATERA UTARA

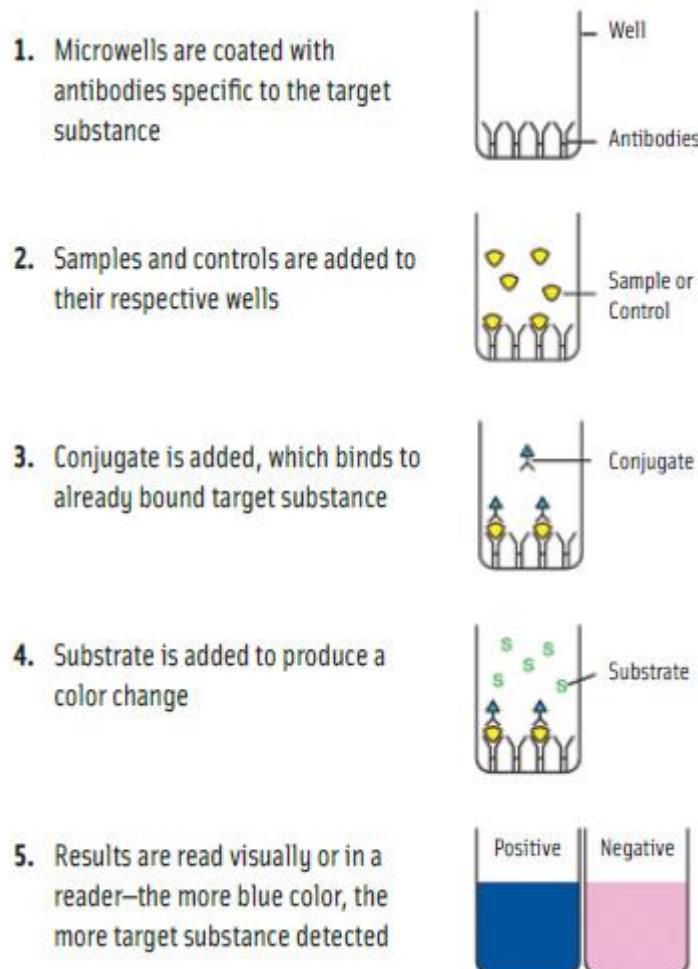
I. Tujuan Praktikum

1. Mampu memahami dan menjelaskan mengenai teknik ELISA.
2. Memahami prinsip kerja teknik ELISA.
3. Mampu melakukan metode pemeriksaan kuantitatif plasma dan serum darah dengan teknik Elisa.
4. Mampu melakukan pemeriksaan kuantitatif human preAlbumin terhadap plasma darah dengan teknik ELISA
5. Mampu membuat grafik dari pengenceran standar dan memperoleh rumus persamaan perhitungan konsentrasi sampel dengan regresi linier.

II. Teori

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) atau nama lainnya *enzyme immunoassay (EIA)* merupakan teknik biokimia yang banyak digunakan di bidang imunologi untuk mendeteksi adanya antibody atau antigen pada suatu sampel. 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 *reporter label*. Terdapat beberapa jenis teknik ELISA, yaitu (1) Indirect ELISA; (2) Direct ELISA; (3) ELISA Sandwich; (4) ELISA Multiplex dan (5)

ELISA Biotin Streptavidin. Dalam penggunaan sehari-hari ELISA bisa digunakan untuk melabel suatu antigen atau mengetahui antibody yang ada dalam tubuh. Apabila kita ingin mengetahui antigen apa yang ada di dalam tubuh, maka yang diendapkan adalah antibody-nya, begitu pula sebaliknya. Untuk mendeteksi kadar suatu protein, maka dapat digunakan teknik ELISA *sandwich assay* dengan dengen mengedapkan antibody pada well plate.



Gambar 1. Prinsip metode ELISA sandwich untuk memeriksa kadar protein sampel

Fungsi dari test ELISA yaitu bukan hanya untuk mengetahui keberadaan suatu antigen dengan antibodi tetapi juga untuk mengukur kadar antigen atau antibodi tersebut dengan menggunakan alat spektrofotometer. Spektrofotometer adalah sebuah alat yang dapat mengukur jumlah dari cahaya yang menembus sumuran dari microplate. Kompleks antigen-antibodi

yang terjadi pada well microplate dan setelah pemberian substrat, enzim yang terikat pada antibody ke dua pada kompleks antigen-antibodi yang terbentuk akan memberikan perubahan warna pada cairan tersebut, sehingga akan memberikan *optical density* yang berbeda. *Optical density* dapat dinyatakan meningkat atau menurun berdasarkan pengenceran material standart, sehingga akan menghasilkan kurva dose-response yang nantinya akan digunakan untuk mengestimasi kadar protein tersebut.

Di dalam plasma darah ada 3 fraksi protein yaitu: - Albumin; Globulin dan Fibrinogen. Serum darah adalah plasma tanpa fibrinogen, sel dan faktor koagulasi lainnya. Konsentrasi serum protein dapat digunakan untuk mengukur status protein. Penggunaan pengukuran status protein ini didasarkan pada asumsi bahwa penurunan serum protein disebabkan oleh penurunan produksi dalam hati. Penentuan serum protein dalam tubuh meliputi: albumin, transferrin, prealbumin (yang dikenal juga dengan transthyretin dan thyroxine-binding prealbumin-TBPA), retinol binding protein (RBP), insulin-Like growth factor-1 dan fibronectin.

Prealbumin merupakan protein tetramerik yang terdiri dari 4 rantai polipeptida identik yang dapat dijadikan sebagai penanda evaluasi nutrisi pada pasien dengan berbagai penyakit(Petunjuk kit). Prealbumin (transthyretin/TTR) adalah termasuk dalam fraksi globulin yang mentransport hormon tiroksin dan metabolitnya(Shenkin, 2006). Kontrol sintesa prealbumin di hati terjadi ketika dihasikannya sitokin fase akut seperti IL-6 yang kemudia menstimulasi protein fase akut seperti C Reactive Protein (CRP), serum amyloid-A, α_1 -antitrypsin dan mengakibatkan tejadinya *downregulation* sintesis protein prealbumin (Johnson *et al*, 2007). Pemeriksaan ini dapat dilakukan untuk mendagnosis pasien dengan malnutrisi dan pemantauan pasien dengan resiko kurang nutrisi atau pasien dengan risiko defisiensi protein(m.prodia.co.id). Penurunan konsentrasi prealbumin dapat timbul akibat respon fase akut yang terjadi pada kondisi penyakit kronis contohnya kanker, hipertiroid, penyakit hati, infeksi, inflamasi dan gangguan pencernaan, atau pemberian IL-6, estrogen, atau pada keadaan kelaparan serta adanya penyakit pada hati. Peningkatan konsentrasi prealbumin dapat terjadi pada saat penggunaan terapi kortikosteroid dan NSAID dosis tinggi, kondisi kelenjar adrenal yang hiperaktif, penyakit Hodgkin serta penurunan katabolisme seperti pada gagal ginjal kronis dan erusakan tubulus ginjal (Johnson *et al*, 2007).

III. Alat dan Bahan

Alat	Bahan
Mesin Sentrifuge dan Microsentrifuge	Darah Sampel
Tabung sampel darah (BD Vacutainer® Blood Collection Tubes dengan K2 EDTA 3,6 mg)	ELISA KIT MyBioSource untuk Pemeriksaan Human PREALBUMIN yang terdiri dari: a. <i>Diluent Concentrate 5x</i> b. <i>Wash Solution 20x</i> c. <i>Enzyme Antibody Conjugate 100x</i> d. <i>Chromogen-Substrate Solution</i> e. <i>Stop Solution</i> f. <i>Anti-Human Prealbumin ELISA Microplate</i> g. <i>Human Prealbumin Standard (Human Prealbumin Calibrator)</i>
ELISA Washer	Mikropipet single channel ukuran 100-1000 µl dan 20-200 µl serta mikropipette multichannel
ELISA Reader Multiskan GO	Tip mikropipette
Perlengkapan untuk Pengambilan sampel darah (Tourniquet, Swab Alkohol, Sput 3cc)	Vortex
Tabung Microsentrifuge	Gelas Ukur
Aquades	Aluminium Foil

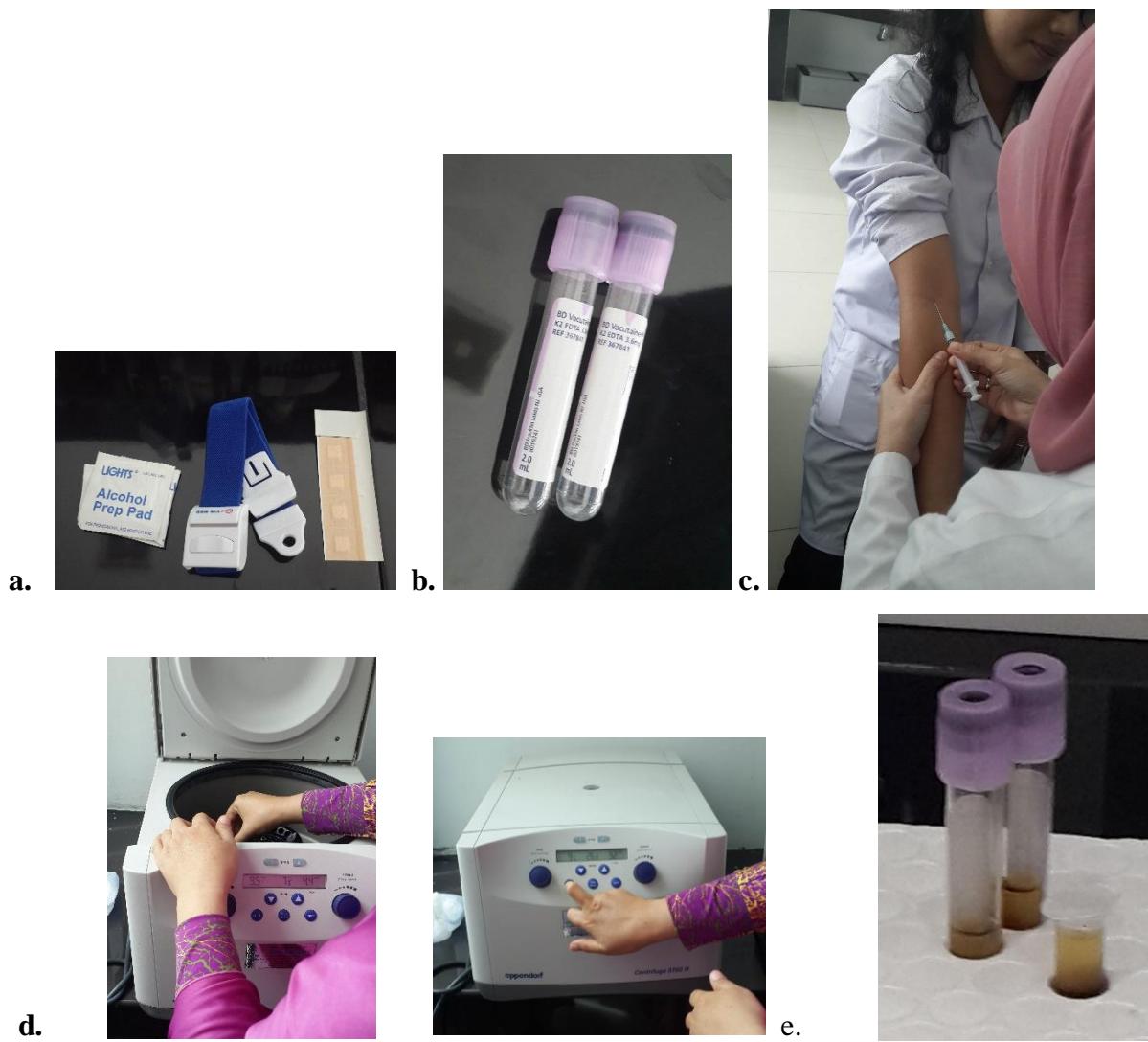
IV. Cara Kerja

a. Sampel

1. Pengambilan sampel darah masing-masing tabung 1,5 cc sampel 1 dan 2 dimasukkan ke dalam tabung yang berisi EDTA untuk diambil plasma darahnya, sementara sampel ke 3 dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge tanpa EDTA untuk diambil serumnya. Selanjutkan dilakukan sentrifugasi ketiga sampel darah tersebut untuk memisahkan plasma darah dan serum darah dengan sel darah.

Tabung sampel+EDTA 1 dan 2 → sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.

Tabung mikrosentrifuge 3 → dengan mikrosentrifuge kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.



Gambar 2. a. Perlengkapan untuk pengambilan sampel darah, (Alkohol Swab, Torniquet dan Plester)

b. Tabung sampel darah (BD Vacutainer® Blood Collection Tubes dengan K2 EDTA

c. Pengambilan sampel darah.; **d.** Sentrifugasi tabung *microsentrifuge* dengan mesin

Sentrifuge *Eppendorf* **e** Hasil Sampel yang telah disentrifugasi

2. Pengenceran *Diluent Solution 5X* → *1X*

Untuk mendapatkan 10 ml *diluent sol 1x*= 2 ml *Diluent sol.* + 8 ml Aquades.

3. Pengenceran sampel.

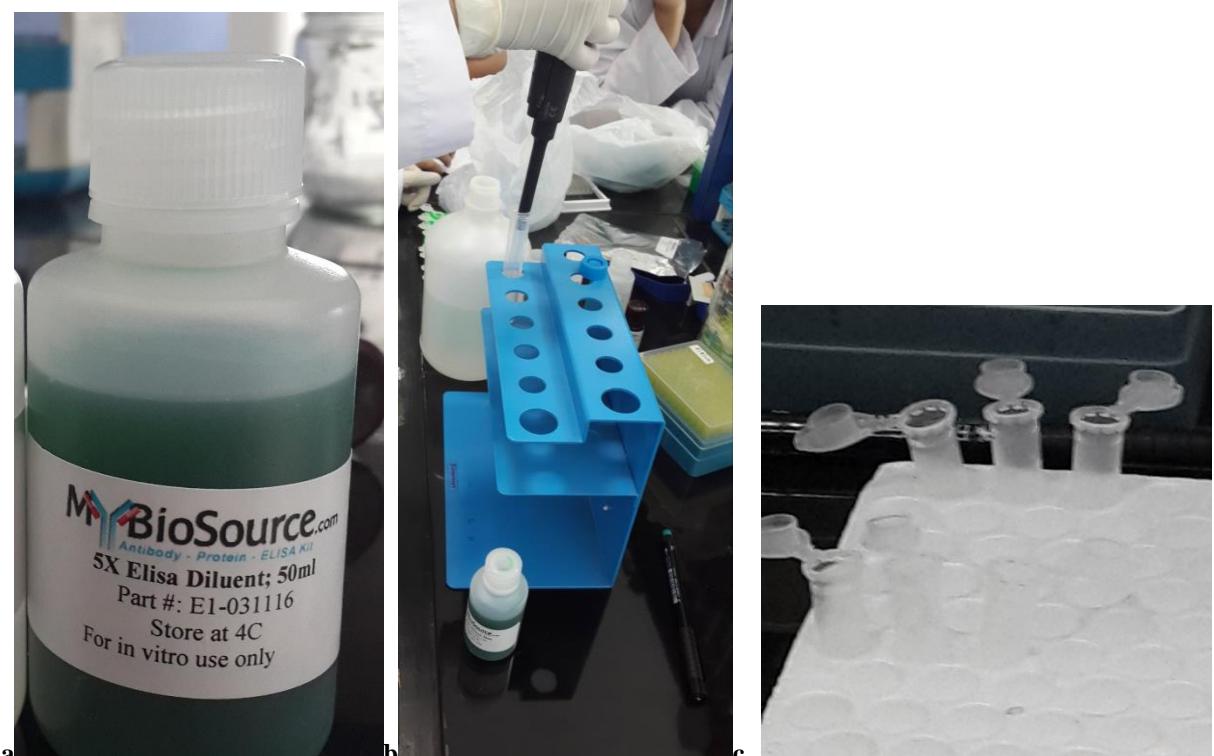
Siapkan @ 2 tabung eppendorf untuk tiap sampel,

Tabung I = 5 µl Sampel + 495 µl *Diluent 1X*

= 1/100 *dilution* → sentrifugasi.

Tabung II = 5µl Tabung I + 495 µl *Diluent 1X*

= 1/10000 *dilution* → sentrifugasi.



Gambar 3. a. Stok 5x ELISA Diluent b. Pengenceran 5x *Diluent* menjadi 10 ml *1X diluent* (dengan menambahkan 2 ml *5I diluent* dengan aquadest sebanyak 8 ml) c. Pengenceran sampel plasma dan serum

b. Standard

Siapkan 8 tabung eppendorf

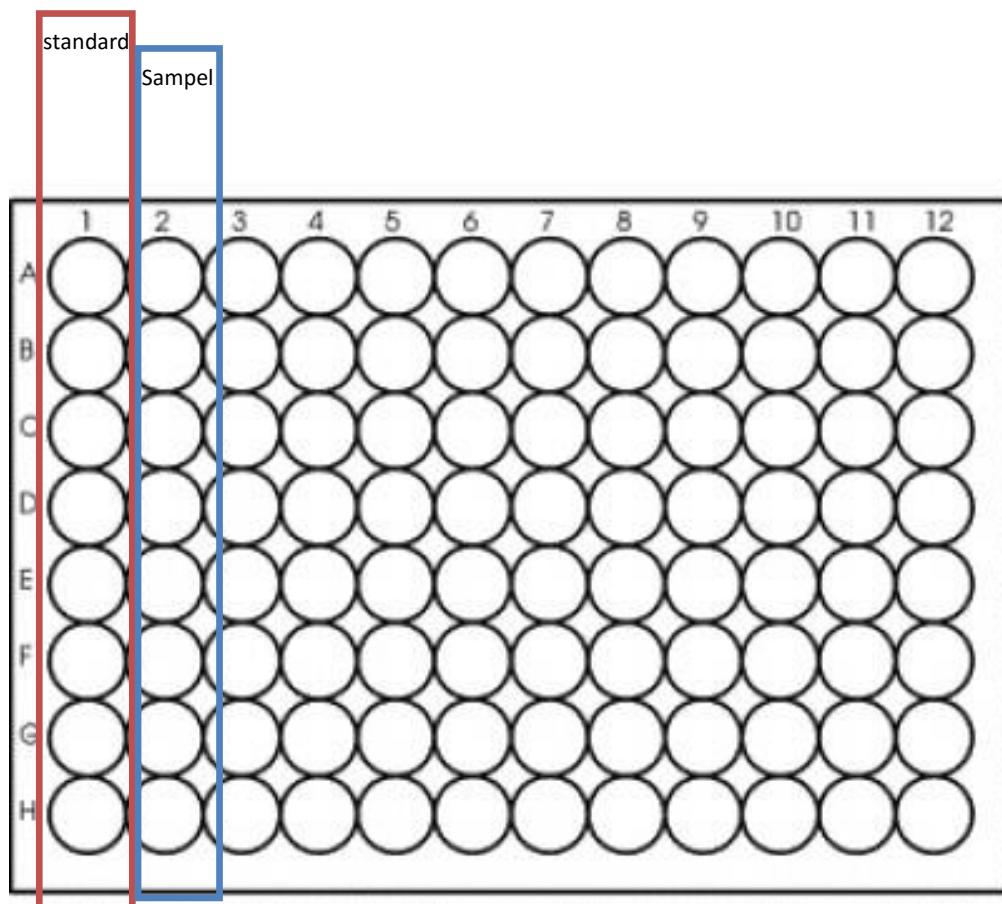
- Standard 7 = 8 μ L Human Pre-Calibrator + 677 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 6 = 300 μ L standard 7 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 5 = 300 μ L standard 6 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 4 = 300 μ L standard 5 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 3 = 300 μ L standard 6 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 2 = 300 μ L standard 3 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 1 = 300 μ L standard 2 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 0 = 600 μ L Diluent 1X.



Gambar 4. a. Stok Human Pre-Albumin Calibrator b. 1X Elisa Diluent c. Pembuatan Standard 0-7

c. **Well ELISA (Anti-Human Prealbumin ELISA Microplate)**

1. Dengan menggunakan micropipet, masukkan Standard 7-0 ke dalam well kolom 1 (A-H) sebanyak 100 μ L.
2. Dengan menggunakan micropipet, masukkan Sampel 1-3 ke dalam well kolom 2 (A-H) sebanyak 100 μ L.
3. Diinkubasikan pada suhu ruangan selama 60 ± 2 menit. Tutup *well plate* dengan plastik transparan dan dalam posisi sejajar.



Gambar 5. Elisa Well Plate yang telah dicoating dengan antibody anti-prealbumin dari pabrik. Standard 0-7 dimasukkan masing ke dalam well A01-H01, sementara sampel 1 pada well A02, D02 dan G02; sampel 2 pada well B02, E02 dan H02; sampel 3 pada well C02 dan F02

4. Siapkan **Wash Solution** 20X → 1X sebanyak 100 ml.
= 5 ml **Wash Solution** + 95 ml **Aquades**.
5. Setelah selesai diinkubasi, *well plate* dicuci dengan larutan **Wash Solution** sebanyak 4 kali dengan menggunakan alat **Elisa Washer(Thermo Scientific™ Wellwash™ Microplate Washer)**.



Gambar 6 a.Stok 20x Wash Solution; **b.** Elisa Washer (*Thermo Scientific™ Wellwash™ Microplate Washer*)

6. Siapkan 100x **enzyme-antibody conjugate** yang diencerkan menjadi 1x (dalam keadaan gelap).
= 20 µl **enzim** + 1980 µl **1X diluent**.
7. Masukkan ke masing-masing well 100 µl enzim yang telah diencerkan. Kemudian tutup dengan aluminium foil (dalam keadaan gelap) dan inkubasi selama 30±2 menit.
8. Lakukan pencucian kembali seperti langkah 5.



Gambar 7. a. Stok 100x *enzyme-antibody conjugate- 1x diluent solution* - Pengenceran *enzyme-antibody conjugate* dengan *diluent solution* pada tabung yang dilapisi alumunium foil.
b. multichannel pipette reservoir digunakan sebagai tempat mengambil bahan menggunakan multichannel mikropipette. **c.** berbagai micropipette baik single channel maupun multichannel

9. Masukkan 100 μL **TMB Substrate Solution (Chromogen-Substrate Solution)** pada masing-masing well dan inkubasi dengan suhu ruangan dan keadaan gelap selama 10 menit.
10. Kemudian masukkan 100 μL **Stop Solution** pada masing-masing well.
11. Masukkan seluruh well ke **Elisa Reader Multiskan GO** dan lakukan pembacaan hasil dengan gelombang absorbansi 450 nm.



Gambar 8. a. Stok *TMB Substrate Solution* b. *Stop Solution* c. Standard dan smpel berwarna biru sebelum diberikan substrat d. setelah pemberian substrat dan stop solution menjadi berwarna kekuningan dan diperiksa menggunakan ELISA Reader Multiskan GO

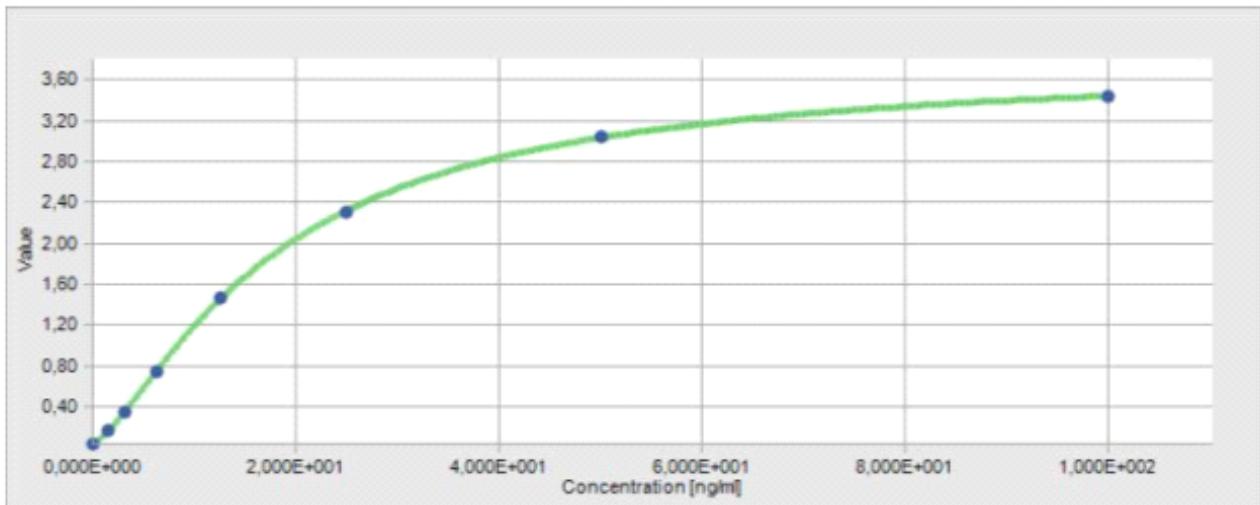
V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Prinsip metode ELISA untuk pemeriksaan prealbumin ini adalah Protein prealbumin pada sampel akan berikatan dengan anti-prealbumin yang telah dicoating pada permukaan polystyrene microtitre wells. Setelah dicuci dengan cairan washing solution, protein yang tidak berikatan dengan antibody pada dinding well akan tercuci dan dibuang. Kemudian diberikan antibody ke dua yang telah dikonjugasi dengan enzim horseradish peroxidase(HRP) yang akan berikatan dengan prealbumin yang sebelumnya berikatan dengan anti prealbumin pada dinding well dan membentuk kompleks antbodi-antigen-antibodi. Setelah pencucian yang kedua untuk membuang antibody yang tidak berikatan, diberikan chromogenic substrate, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB). Banyaknya enzim yang terikat akan bergantung pada jumlah prealbumin pada sampel, sehingga ketika diberikan substrat, enzim akan mengolah substrat sehingga terjadi perubahan warna pada cariran di dalam well dengan gradasi warna berbeda beda sesuai dengan konsentrasi prealbumin yang dikandungnya(Petunjuk kit).

Dari hasil pembacaan Elisa Reader pada well yang berisi standard 0-7, dengan panjang gelombang 450nm maka diperoleh hasil seperti tampak pada tabel 1. Kemudian hasil absorbansi yang diperoleh dibuat kurva standard menggunakan jenis kurva *four-parameter logistic curve* sesuai petunjuk di dalam kit dan diperoleh kurva seperti pada gambar 9.

Tabel 1. Hasil Absorbansi pada pengenceran standard

WELL	Sampel	Konsentrasi (ng/ml)	Absorbansi
A01	Standard 7	100	3,4389
B01	Standard 6	50	3,0440
C01	Standard 5	25	2,3114
D01	Standard 4	12,5000	1,4675
E01	Standard 3	6,2500	0,7437
F01	Standard 2	3,125	0,3539
G01	Standard 1	1,5600	0,1668
H01	Standard 0	0	0,0486



Gambar 9. Kurva logistic 4 parameter untuk menggambarkan hubungan Antara konsentrasi dan absorbansi pada pengenceran standard

Dari grafik kurva Kuantitatif terhadap hasil absorbansi Standard maka diperoleh persamaan sebagai berikut:

$$y = d + (a - d) / (1 + (x / c)^b)$$

Parameter a	0,0460
Parameter b	1,3820
Parameter c	17,8380
Parameter d	3,7549

$$y = 3,7549 + \frac{3,7549 - 0,0460}{1 + \left(\frac{x}{17,8380}\right)^{1,3820}}$$

$$x = 17,8380 \cdot \sqrt{\frac{3,7549 - 0,0460}{y - 3,7549} - 1}$$

y= Absorbansi

x= Konsentrasi

Coefficient of determination $R^2 = 0,6493$ (Low R^2)

Oleh karena itu bila dimasukkan ke dalam rumus, hasil absorbansi dari sampel, maka diperoleh konsentrasi seperti pada table 2.

Tabel 2. Hasil Interpolasi untuk menentukan nilai konsentrasi dari sampel menggunakan persamaan yang diperoleh dari nilai absorbansi standard teradap konsentrasi

WELL	Sampel	Absorbansi	Konsentrasi (ng/ml)	Rata Konsentrasi (ng/ml)	rata Standard (ng/ml)
A02	Sampel 1	1,8547	17,2126		
D02	Sampel 1	1,6411	14,5504	15,7180	1,3609
G02	Sampel 1	1,712	15,3909		
E02	Sampel 2	1,8979	17,8029		
H02	Sampel 2	2,0240	19,6468	18,4818	1,0135
B02	Sampel 2	1,9117	17,9956		
C02	Sampel 3	1,6214	14,3237		
F02	Sampel 3	1,5226	13,2274	13,7756	0,7752

Untuk sampel 1 yaitu atas nama Bina, pemeriksaan prealbumin diambil dari plasma darah diperoleh hasil rata rata konsentrasi yang diperoleh adalah $15,7180 \pm 1,3609$ ng/ml. sementara sampel 2 atas nama Henny sampel juga diambil dari plasma darah diperoleh hasil rata rata konsentrasi dari 3 kali pemeriksaan adalah $18,4818 \pm 1,0135$. Sementara hasil pemeriksaan kadar albumin pada sampel ke 3 atas nama Karin yang diambil dari serum darah yang dilakukan 2 kali adalah $13,7756 \pm 0,7752$ ng/ml. kadar normal prealbumin dewasa adalah 18 - 45 mg/dL atau 180000 ng/ml (http://www.globalrph.com/labs_p.htm)

Adanya perbedaan konsentrasi pada beberapa kali pengukuran tiap sampel dapat dipengaruhi oleh akurasi dan presisi dari pipet yang digunakan. Beberapa faktor dapat mempengaruhi akurasi dan presisi pipet. Yang pertama adalah suhu. Semua pipetor sangat sensitive terhadap perbedaan suhu antara sampel dan lingkungan, semakin kecil perbedaan suhu antara pipetor, tip dan sampel yang akan dipipet maka semakin akurat hasilnya. Pada percobaan ini sampel, pipet dan tip berada di ruang yang sama sehingga kemungkinan suhunya juga tidak berbeda. Faktor yang ke dua adalah viskositas cairan yang dipipet. Bila

menggunakan aquadest tidak begitu menimbulkan masalah namun pada cairan dengan viskositas tinggi seperti serum viskositas dapat mempengaruhi akurasi dan presisi. Faktor yang ketiga adalah pengalaman dari pengguna pipet. Semakin berpengalaman pengguna pipet maka semakin akurat dan presisi hasil yang diperoleh. Teknik pipetting juga sangat mempengaruhi akurasi dan presisi dari mikropipet. Penggunaan mikropipet ini membutuhkan keterampilan dan pengalaman untuk dapat melakukannya dengan benar. Performansi pipet otomatis juga dipengaruhi oleh pemilihan tip pipet yang digunakan. Untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat dan presisi, sebaiknya menggunakan tip yang diproduksi oleh pabrik yang sama dengan pembuat pipet. Bila tidak memungkinkan, maka perlu diuji performansi dari tip tersebut sebelum digunakan untuk prosedur penelitian atau laboratorium lainnya. Selain perbedaan suhu antara pipet, tip dan sampel yang telah dibahas sebelumnya, perbedaan tekanan udara dan kelembaban udara di lingkungan juga mempengaruhi(Ylatupa, 1997).

VI. KESIMPULAN

1. ELISA adalah teknik biokimia yang dilakukan untuk mendeteksi adanya antibody atau antigen pada suatu sampel. Dengan metode spektrofotometri, selain mendeteksi dapat pula menghitung secara kuantitatif kadar antigen atau antibody pada suatu sampel yang diperiksa
2. Prealbumin adalah (transthyretin/TTR) adalah faksi protein dalam plasma darah yang berfungsi mentransport hormon tiroksin. Pemeriksaan terhadap prealbumin dilakukan untuk mendiagnosis pasien dengan malnutrisi dan pemantauan pasien dengan resiko kurang nutrisi atau pasien dengan risiko defisiensi protein yang dapat terjadi pada penyakit kronis contohnya kanker, hipertiroid, penyakit hati, infeksi, inflamasi dan gangguan pencernaan dan lainnya.
3. Percobaan menggunakan ELISA kit untuk mengukur kadar prealbumin sampel darah dilakukan dengan menentukan nilai absorbansi standard yang diencerkan bertingkat dan kemudian dibuat kurva 4 parameter logistic untuk menentukan persamaan hubungan

Antara konsentrasi dan absorbansinya. Setelah itu dapat ditentukan kadar prealbumin sampel dari persamaan yang diperoleh.

4. Koefisien determinasi yang diperoleh dari persamaan tersebut adalah 0,6493, artinya cukup rendah(yang paling tinggi $R^2=1$). Hal ini dapat terjadi karena prosedur yang dilakukan masih belum sempurna. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi diantaranya dari segi akurasi dan presisi mikropipet yang digunakan, pengalaman dan keterampilan praktikan dalam menggunakan pipet maupun dalam melaksanaan seluruh prosedur, kestabilan bahan yang digunakan(mengingat bahan yang digunakan adalah bahan yang tersisa dari pemakaian sebelumnya) kebersihan dari perangkat seperti gelas ukur, tabung plastik, reservoir multichannel pipet dll, kualitas dari air destilasi serta akurasi dan presisi waktu inkubasi maupun temperature dan pencahayaan ruangan.
5. Hasil pemeriksaan kadar prealbumin sampel 1 adalah $15,7180 \pm 1,3609$ ng/ml, sampel 2 adalah $18,4818 \pm 1,0135$. Dan sampel 3 adalah $13,7756 \pm 0,7752$ ng/ml. sementara kadar normal prealbumin dewasa adalah 18 - 45 mg/dL

Referensi

1. <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction> (diakses 30 Juni 2016)
2. <http://m.prodia.co.id/ProdukLayanan/PemeriksaanLaboratoriumDetails/Pre-Albumin-Transthyretin> (diakses 30 Juni 2016)
3. Shenkin, Alan. 2006. Serum Prealbumin: Is It a Marker of Nutritional Status or of Risk of Malnutrition?. *Clinical Chemistry*. v. 52, p.2177-2179
4. Johnson AM, Merlini G, Sheldon J & Ichihara K. 2007. Clinical indications for plasma protein assays: transthyretin (prealbumin) in inflammation and malnutrition1) International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) IFCC Scientific Division Committee on Plasma Proteins (C-PP). *Clin Chem Lab Med* 2007;45(3):419–426. by Walter de Gruyter • Berlin • New York. DOI 10.1515/CCLM.2007.051
5. Ylatupa, Sari, 1997. Liquid Handling Application Note. www.biohit.com (diakses 21 Maret 2016)
6. http://www.globalrph.com/labs_p.htm (diakses 30 juni 2016)