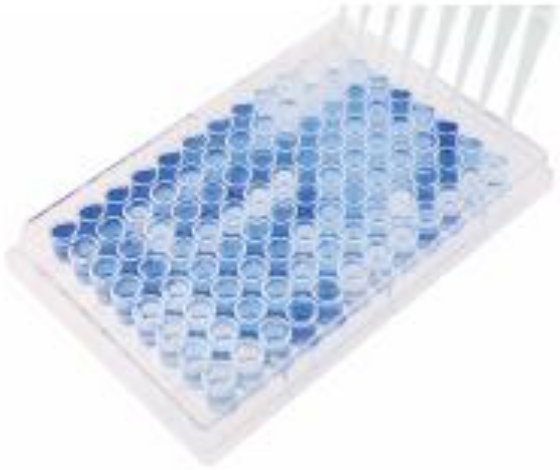
MODUL PRAKTIKUM

PEMERIKSAAN ELISA APOLIPOPROTEIN E



PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA
2020

PETUNJUK UMUM

1. Tujuan Melakukan Praktikum

Melihat sendiri hasil praktikum.

Membandingkan hasil percobaan dengan pendapat-pendapat/teori-teori yang ada dan kemudian mengambil kesimpulan akhir.

Membantu dalam mempelajari efek yang ditimbulkan / diharapkan.

2. Cara Pelaksanaan

Modul Praktikum digunakan sebagai pegangan dalam pelaksaan praktikum secara mandiri.

Pada setiap kegiatan selalu dilakukan pencatatan pada buku catatan harian (log book).

Pada setiap pelaksanaan praktikum, selalu didampingi oleh dosen dan analis laboratorium.

3. Penilaian/Evaluasi

Penilaian dilakukan terhadap proses dan hasil akhir praktikum yang dilakukan.

Pada akhir pelaksanaan praktikum dilakukan pembuatan laporan praktikum.

4. Aturan Pelaksanaan

Lakukan praktikum sebaik-baiknya dan dengan tertib.

Adakan persiapan secukupnya tiap kali akan melakukan praktikum, agar percobaan-percobaan yang dilakukan dapat bermanfaat.

Ambillah pelajaran sebanyak mungkin dari percobaan yang dilakukan.

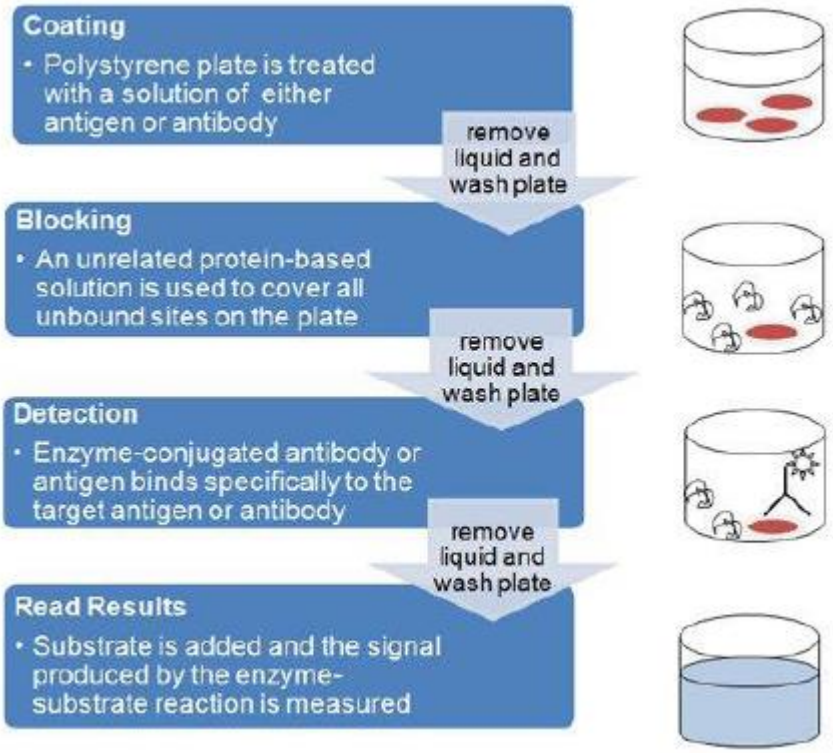
Berhati-hatilah menggunakan alat-alat dan bahan-bahan praktikum.

PRAKTIKUM PEMERIKSAAN ELISA APOLIPOPROTEIN E

PENGANTAR

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) adalah teknik *assay* yang berbasiskan plat/lempengyang dirancang untuk mendeteksi dan kuantifikasi peptida, protein, antibodi dan hormon. Pada ELISA, antigen harus diimobilisasi ke permukaan yang solid dan kemudian ditambahkan antibodi yang berikatan dengan enzim. Deteksi dilakukan dengan menilai aktivitas enzim konjugat melalui inkubasi dengan substrat untuk memproduksi suatu produk yang terukur. Elemen yang penting dalam strategi deteksi pada ELISA adalah interaksi spesifik antigen-antibodi. Pemeriksaan ELISA umumnya dilakukan menggunakan plat/lempeng *polystyrene* 96 (atau (384 sumuran) yang akan secara pasif mengikat antibodi dan protein. Reaktan dari pemeriksaan ELISA yang terimobilisasi ke dalam permukaan mikroplat membuat pemisahan dari material yang tidak berikatan menjadi lebih mudah. Kemampuan untuk mencuci material nonspesifik yang tidak berikatan membuat pemeriksaan ELISA menjadi alat pemeriksaan yang akurat untuk mengukur analit spesifik (Booster, 2020).

Prosedur umum dari pemeriksaan ELISA dimulai dengan tahap pelapisan, di mana lapisan pertama berisikan dengan antigen atau antibodi target yang diabsorbsi ke dalam plat *polystyrene* 96 sumuran. Tahap ini kemudian dilanjutkan dengan tahap *blocking* di mana semua tempat yang permukaan yang tidak berikatan akan terlapisi oleh *blocking agent*. Tahap selanjutnya adalah melakukan beberapa kali pencucican. Plat kemudian akan diinkubasi dengan antibodi yang terkonjugasi dengan enzim. Tahap ini kemudian dilanjutkan dengan beberapa kali proses pencucian untuk menghilangkan antibodi yang tidak berikatan. Substrat kemudian akan ditambahkan untuk memproduksi suatu sinyal kalorimetrik. Tahap akhir adalah pembacaan dari mikroplat. *Assay* ini menggunakan proses seprasi melalui ikatan dengan mikroplat, beberapa kali pencucian akan dilakukan pengulangan pada masing-masing tahap ELISA untuk menghilangkan material yang tidak berikatan. Selama proses ini, hal yang penting diperhatikan adalah untuk membuang cairan sisa untuk mencegah dilusi dari cairan yang ditambahkan pada tahap *assay* selanjutnya. Untuk memastikan keseragaman, alat pencuci plat khusus sering kali digunakan.



Gambar 1. Prosedur Umum Pemeriksaan ELISA

A. JENIS PEMERIKSAAN ELISA

1. ELISA langsung

Pemeriksaan ELISA langsung dilakukan di mana antigen diimobilisasi ke permukaan dari plat dan dideteksi dengan antibodi spesifik terhadap antigen dan secara langsung terkonjugasi dengan HRP atau molekul deteksi lain (ABCAM, 2020). Deteksi ELISA secara langsung lebih cepat dibandingkan dengan teknik pemeriksaan ELISA yang lainnya karena lebih sedikit tahapan yang perlu dilakukan. Pemeriksaan ELISA langsung juga terbukti memiliki lebih sedikit kesalahan karena lebih sedikit reagen dan tahapan yang diperlukan.

Gambar 2. ELISA Langsung

Adapun keuntungan dan kelemahan dari pemeriksaan ELISA langsung ini sebagai berikut (Biorad, 2020):

Keuntungan

- Pemeriksaan ELISA ini lebih cepat dibandingkan tipe ELISA yang lainnya, dengan teknik dengan tahapan yang lebih sedikit
- Memiliki lebih sedikit kesalahan karena menggunakan sedikit reagen dan hanya membutuhkan sedikit tahapan
- Pemeriksaan ELISA yang terbaik ketika menganalisis respon imun terhadap antigen

Kelemahan

- Imobilisasi antigen bersifat kurang spesifik sehingga menyebabkan *background noise* jika dibandingkan dengan ELISA tidak langsung. Sebagian besar dikarenakan semua protein di dalam sampel, termasuk target protein akan berikatan pada plat.
- Kurang fleksibel karena masing-masing target protein memerlukan antibodi primer terkonjugasi spesifik
- Tidak ada amplifikasi sinyal sehingga dapat menurunkan sensitivitas *assay*

2. ELISA tidak langsung

Pemeriksaan ELISA tidak langsung mirip dengan pemeriksaan langsung. Antigen

diimobilisasi ke permukaan dari plat. Proses dua tahap dibutuhkan dalam deteksi di mana antibodi spesifik primer terhadap antigen akan berikatan dengan target dan dilabeli oleh antibodi sekunder terhadap spesies *host* dari antibodi primer. Metode ini juga dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi spesifik dalam sampel serum dengan substitusi serum untuk antibodi primer (ABCAM, 2020).

Gambar 3. ELISA Tidak Langsung

Adapun keuntungan dan kelemahan dari pemeriksaan ELISA tidak langsung ini sebagai berikut (Biorad, 2020):

Keuntungan

- Metode ELISA secara tidak langsung memiliki sensitivitas tinggi karena lebih dari satu antibodi sekunder dapat berikatan dengan antibodi primer.
- ELISA tidak langsung lebih ekonomis dibandingkan ELISA langsung karena dibutuhkan lebih sedikit antibodi yang berlabel.
- Pemeriksaan ELISA tidak langsung lebih fleksibel karena antibodi primer berbeda dapat digunakan dengan hanya satu antibodi sekunder berlabel.
- Pemeriksaan ELISA yang terbaik untuk menentukan konsentrasi antibodi total pada sampel

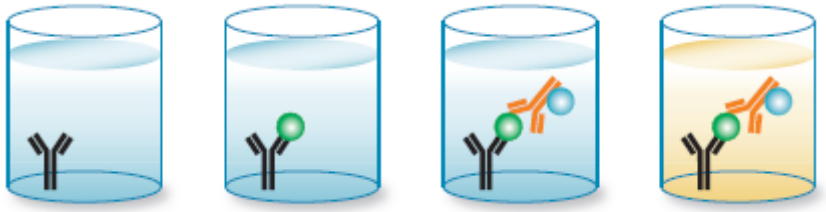
Kelemahan

- Bisa mungkin timbul *background noise* apabila terjadi *cross-reactive* dari antibodi sekunder
- Prosedur yang lebih panjang jika dibandingkan dengan teknik ELISA langsung karen amembutuhkan tambahan tahap inkubasi tambahan untuk antibodi sekunder.

3. ELISA *Sandwich*

ELISA *Sandwich* adalah tipe pemeriksaan ELISA yang paling umum untuk dilakukan. Pemeriksaan ELISA ini membutuhkan dua spesifik antibodi untuk epitop berbeda dari antigen. Kedua antibodi biasanya disebut sebagai pasangan antibodi yang cocok. Salah satu antibodi akan berikatan pada permukaan dari plat dan digunakan sebagai antibodi

penangkap untuk memfasilitasi imobilisasi dari antigen. Antibodi yang lain akan berkonjugasi dan memfasilitasi deteksi dari antigen (ABCAM, 2020).



Gambar 4. ELISA *Sandwich*

Prosedur dari ELISA *sandwich* yaitu pertama-tama adalah sumuran dari plat ELISA harus dilapisi dengan antibodi penangkap. Analit atau sampel kemudian akan ditambahkan, diikuti dengan antibodi pendeteksi. Antibodi pendeteksi bisa berkonjugasi dengan enzim atau disebut sebagai ELISA *sandwich* langsung. Apabila antibodi pendeteksi tidak berlabel, antibodi sekunder pendeteksi yang terkonjugasi dengan enzim akan diperlukan, yang disebut sebagai ELISA *sandwich* tidak langsung.

Adapun keuntungan dan kelemahan dari pemeriksaan ELISA *sandwich* ini sebagai berikut (Biorad, 2020):

Keuntungan

- Metode ELISA ini memiliki sensitivitas tinggi, 2-5 kali lebih sensitive dibandingkan dengan ELISA langsung ataupun tidak langsung
- Metode ELISA ini memiliki spesifisitas tinggi, karena dua antibodi ikut serta sebagai antibodi penangkap dan antibodi pendeteksi
- Pemeriksaan ELISA ini lebih fleksibel karena deteksi secara langsung atau tidak langsung bisa dilakukan
- Pemeriksaan ELISA yang terbaik untuk analisis sampel yang kompleks, oleh karena antigen tidak perlu untuk dipurifikasi sebelum dilakukan pengukuran

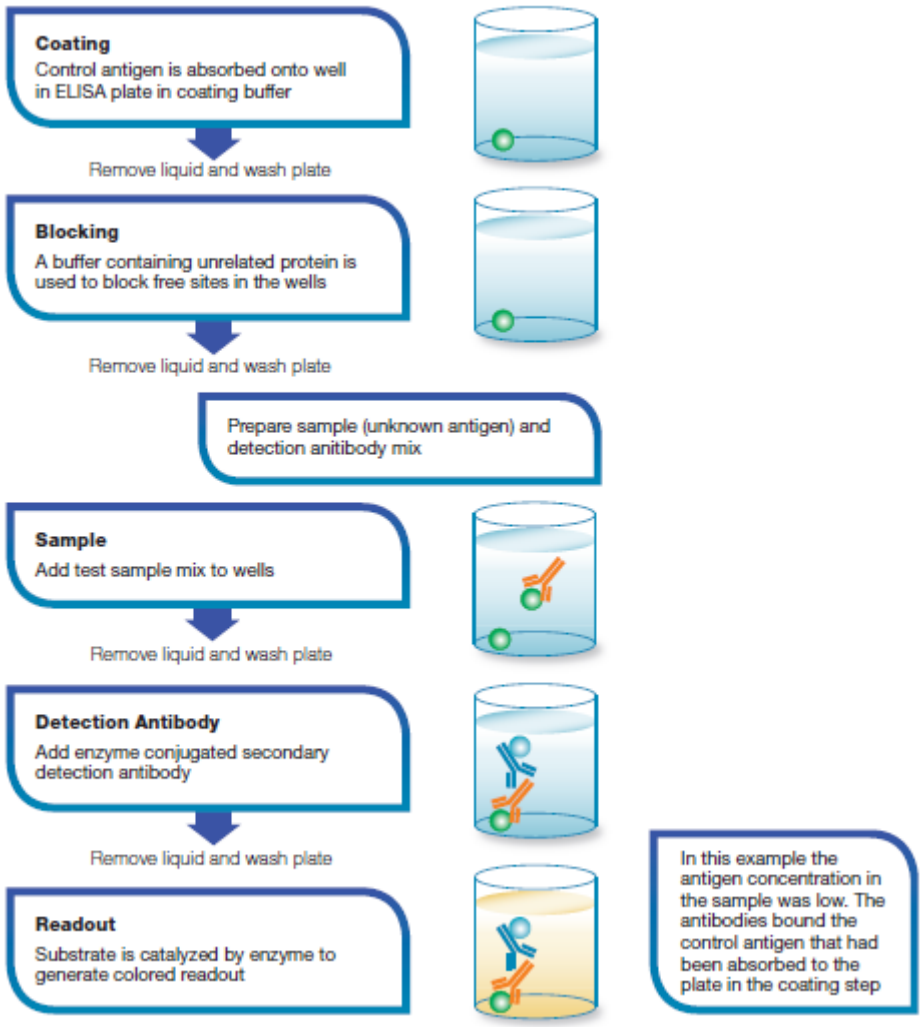
Kelemahan

- Optimasi antibodi dapat sulit dilakukan karena *cross reactivity* dapat terjadi antara antibodi penangkap dan pendeteksi.
- Membutuhkan kit ELISA terstandar atau pasagan antibodi yang telah teruji.

4. ELISA Kompetitif

ELISA kompetitif atau ELISA inhibisi adalah *assay* yang digunakan untuk mengukur konsentrasi dari antigen dengan deteksi dari sinyal interferensi. Antigen sampel akan

berkompetisi dengan antigen referensi untuk berikatan dengan sejumlah spesifik dari antibodi yang berlabel. Antigen referensi ini telah terlapisi sebelumnya pada permukaan plat. Sampel dilakukan pre-inkubasi dengan antibodi berlabel dan kemudian ditambahkan ke dalam sumuran. Tergantung dari jumlah antigen di dalam sampel, lebih banyak atau lebih sedikit antibodi bebas yang akan tersedia untuk berikatan dengan antigen referensi. Beberapa kit ELISA menggunakan antigen yang berlabel dibandingkan dengan antibodi berlabel. Antigen yang berlabel dan antigen sampel (tidak berlabel) berkompetisi dengan berikatan terhadap antibodi primer. Semakin sedikit jumlah antigen di dalam sampel, maka semakin kuat sinyal akibat lebih banyak antigen berlabel di dalam sumuran (ABCAM, 2020).



Gambar 5. ELISA Kompetitif

Pada gambar terlihat bahwa antigen digunakan untuk melapisi plat. Mengikuti prosedur standar *blocking* dan pencucian, sampel berisikan antigen yang tidak diketahui ditambahkan. Antibodi pendeteksi yang berlabel kemudian ditambahkan untuk mendeteksi menggunakan substrat yang relevan (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine atau TMB). Apabila didapatkan konsentrasi yang tinggi dari antigen di dalam sampel, maka sinyal akan melemah, sedangkan apabila hanya ada sangat sedikit antigen di dalam sampel, maka hanya aka nada sedikit saja reduksi dari output sinyal (Biorad, 2020).

Keuntungan

- Tidak ada pemrosesan sampel dan sampel yang kasar atau tidak murni dapat digunakan
- Elisa ini lebih kuat dan kurang sensitif terhadap dilusi sampel dan efek matriks sampel jika dibandingkan dengan ELISA sandwich
- ELISA ini lebih konsisten, lebih sedikit variabilitas antara sampel duplikat dan *assay*
- Memiliki fleksibilitas maksimum, bisa berbasiskan ELISA langsung, tidak langsung, atau sandwich
- Pemeriksaan ELISA yang terbaik untuk analisis ketika hanya satu antibodi yang tersedia untuk antigen yang akan dideteksi. ELISA ini juga cocok digunakan untuk mendeteksi antigen kecil yang tidak bisa berikatan dengan dua antibodi berbeda seperti pada teknik ELISA sandwich.

Kelemahan

- Memiliki beberapa kelemahan, sesuai dengan teknik dasar tipe ELISA mana yang digunakan.

B. PEMERIKSAAN ELISA APOLIPOPROTEIN E

a. Pemeriksaan apolipoprotein E sesuai dengan protokol manufaktur ABCAM® *human* apolipoprotein E ELISA Kit (ABCAM, 2019).

- Persiapan sampel

Kumpulkan plasma menggunakan sepersepuluh volume 0,1 M EDTA sebagai antikoagulan. Sampel disentrifugasi pada 3000 x g selama 10menit. Encerkan sampel 1: 400 menjadi 1X Pengencer N dan *assay*. Sampel yang tidak diencerkan dapat disimpan pada -20°C hingga 3 bulan.

- Prosedur *assay*

1. Siapkan semua reagen, standar kerja, dan sampel. Pengujian dilakukan di suhu kamar (20-25° C).
2. Hapus strip pelat mikro berlebih dari bingkai pelat dan kembalikan langsung ke kantong foil dengan bahan pengering di dalamnya. Tutup kembali kantong dengan aman untuk meminimalkan paparan uap air dan simpan dalam desikator vakum.
3. Tambahkan 50 µL Apolipoprotein E Standard atau sampel per sumur. Tutupi sumur dengan selotip dan inkubasi selama dua jam.
4. Cuci lima kali dengan 200 µL 1X Wash Buffer secara manual. Balikkan pelat setiap kali dan tuangkan isinya; ketuk 4-5 kali kertas penyerap untuk menghilangkan cairan sepenuhnya. Jika menggunakan mesin, maka cuci enam kali dengan 300 µL 1X Wash Buffer dan kemudian balikkan pelat, tuang isinya; ketuk 4-5 kali kertas penyerap untuk menghilangkan cairan sepenuhnya.
5. Tambahkan 50 µL dari 1X Biotinylated Apolipoprotein E Antibody ke masing-masing sumur dan inkubasi selama satu jam.
6. Cuci pelat mikro.

7. Tambahkan 50 µL dari 1X SP Konjugasi ke setiap sumur dan inkubasi 30 menit. Nyalakan pembaca pelat mikro.
8. Cuci pelat mikro.
9. Tambahkan 50 µL Substrat Kromogen per sumur dan inkubasi pada cahaya sekitar selama sekitar 15 menit atau hingga warna biru optimal terbentuk. Ketuk pelat dengan lembut untuk memastikan pencampuran yang menyeluruh dan pecahkan gelembung di dalam sumur dengan ujung pipet.
10. Tambahkan 50 µL *Stop Solution* ke setiap lubang. Warna akan berubah dari biru menjadi kuning.
11. Bacalah absorbansi pada pembaca pelat mikro pada panjang gelombang 450 nm segera. Jika koreksi panjang gelombang tersedia, kurangi pembacaan pada 570 nm dari pada 450 nm untuk mengoreksi ketidaksempurnaan optik. Jika tidak, baca pelat hanya pada 450 nm. Beberapa partikel hitam yang tidak stabil dapat dihasilkan pada titik konsentrasi tinggi setelah menghentikan reaksi selama sekitar 10 menit, yang akan mengurangi pembacaan.

- Analisis dilakukan dengan cara:
  1. Hitung nilai rata-rata dari duplikat atau rangkap tiga bacaan untuk setiap standar dan sampel.
  2. Untuk membuat kurva standar, plot grafik menggunakan konsentrasi standar pada sumbu x dan yang terkait berarti absorbansi 450 nm (OD) pada sumbu y. Garis paling pas dapat ditentukan dengan analisis regresi menggunakan log-log or *four parameter logistic curve-fit*
  3. Tentukan konsentrasi sampel yang tidak diketahui dari Kurva Standar dan kalikan nilainya dengan faktor pengenceran

•

DAFTAR PUSTAKA

ABCAM. 2019. Human Apolipoprotein E ELISA Kit (APOE) (ab108813), diakses 18 Desember 2020 dari: https://www.abcam.com/human-apolipoprotein-e-elisa-kit-apoe-ab108813.html

ABCAM. 2020. ELISA Guide, diakses 18 Desember 2020 dari: https://docs.abcam.com/pdf/kits/elisa-guide.pdf

Bio-Rad. 2020. ELISA Basics Guide, diakses 18 Desember 2020 dari: https://www.bio-rad-antibodies.com/download-request-copy-elisa-guide.html

Boster Biological Technology. 2020. ELISA Handbook: Principle, Troubleshooting, Sample Preparation and Assay Protocols, diakses 18 Desember 2020 dari: https://www.bosterbio.com/ebooks