

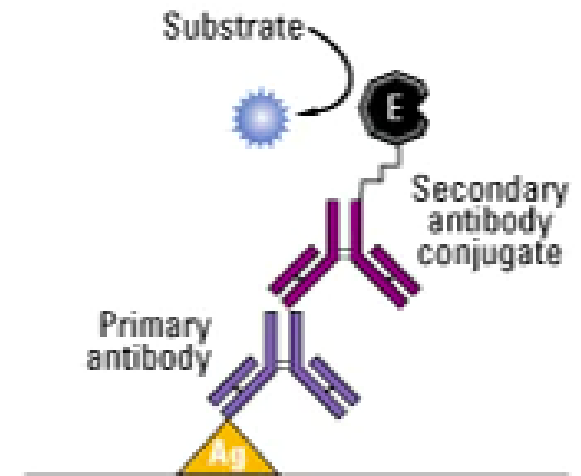


# **Teknik Dasar ELISA dan Aplikasinya untuk Deteksi Pathogen Penyebab Penyakit**

**Kurdianto, M.Si**

# Prinsip Dasar ELISA

- ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) adalah suatu teknik biokimia berbasis plate yang terutama digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi **antigen (peptida, hormon, protein) dan antibodi** dalam suatu sampel.
- Dalam ELISA, antigen diimobilisasi di atas plate, lalu dikonjugasikan dengan antibody spesifik yang berikatan dengan enzim. Proses deteksi dilakukan dengan melihat perubahan **warna** akibat aktivitas enzim terhadap substrat
- ELISA dikembangkan untuk menggantikan metode **RIA (radio immuno assay)** yang menggunakan radioaktif untuk deteksinya.



# Sejarah ELISA

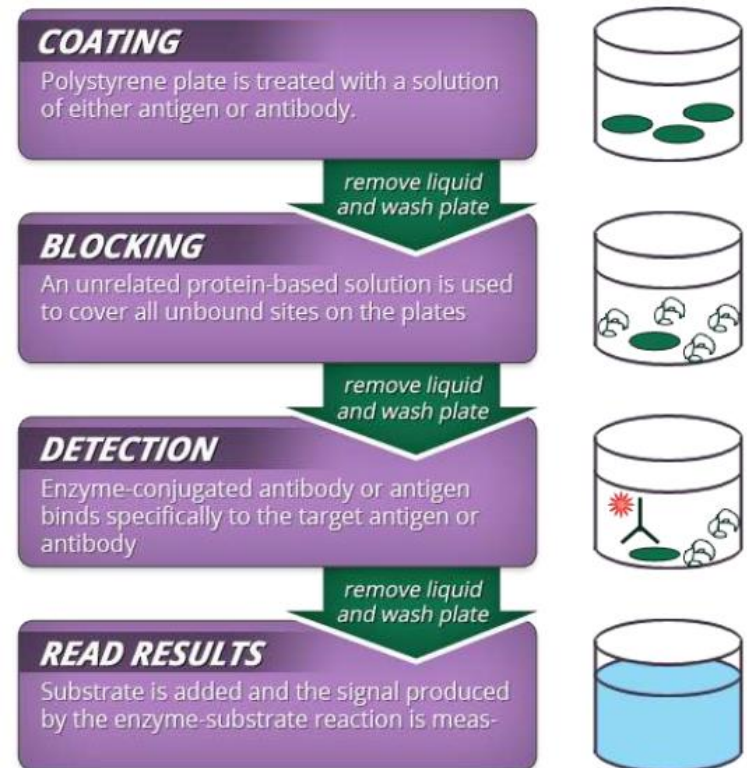
Tahun 1971, **Peter Permann** dan **Eva Engvall** dari Stockholm pertama kali mempublikasikan paper tentang *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)*, yang menunjukkan dapat mengukur konsentrasi IgG dalam serum kelinci menggunakan ***alkaline phosphatase*** (AP) sebagai enzimnya.

Pada tahun yang sama, **Anton Schuurs** dan **Bauke Van Weemen** dari Netherlands mempublikasikan paper tentang *Enzyme ImmunoAssay (EIA)*, mereka dapat mengukur konsentrasi *human chorionic gonadotropin* dalam urin dengan menggunakan ***horseradish peroxidase*** (HRP) sebagai enzimnya

ELISA/EIA memiliki sensitifitas yang jauh lebih tinggi dan lebih aman dibanding metode sebelumnya yaitu **RadioimmunoAssays**

# Prosedur ELISA

- ELISA dimulai dengan proses **coating**, antigen atau antibody diimobilisasi dalam 96-well polystyrene plate. Lalu dilanjutkan dengan proses **blocking**, dimana bagian yang tidak ada antibody/antigen ditutupi dengan reagent blocking.
- Plate diinkubasi dengan antibody yang terkonjugasi dengan enzim. Lalu, plate dicuci untuk menghilangkan antibody yang tidak berikatan.
- Substrat ditambahkan ke dalam plate yang akan menghasilkan perubahan warna, lalu dibaca menggunakan **microplate reader**.



# Prosedur ELISA

- Label enzim yang paling banyak digunakan dalam ELISA adalah **horseradish peroxidase (HRP)** and **alkaline phosphatase (AP)**. Enzim lain yang digunakan juga diantaranya :  $\beta$ -galactosidase, acetylcholinesterase, and catalase
- Substrat kolorimetrik yang dipakai untuk horseradish peroxidase adalah TMB, OPD dan ABTS, sedangkan untuk alkaline phosphatase adalah PNPP
- Pemilihan substrat tergantung pada sensitivitas pengujian yang diperlukan dan instrument yang tersedia untuk deteksi sinyal (spectrophotometer, fluorometer atau luminometer)



# Prosedur ELISA

## Alat dan Bahan Pengujian ELISA



Microplate Washer



ELISA Plate & Reservoir



Microplate Reader



Incubator



ELISA Kit

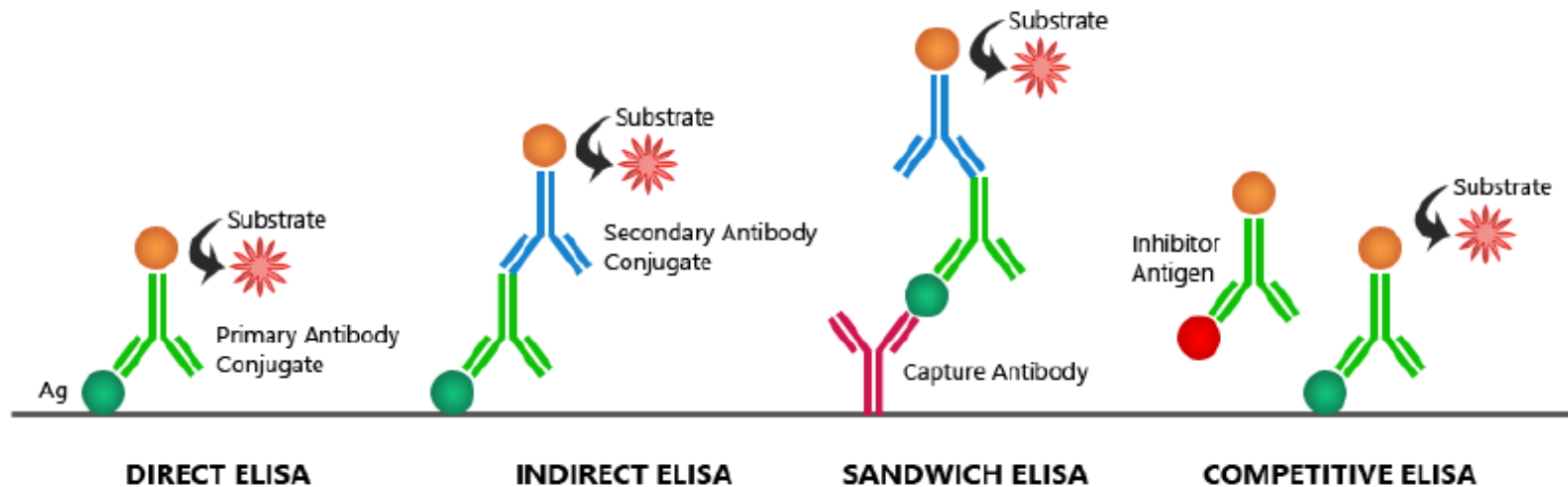


Micropipette

# Jenis-jenis ELISA

Berdasarkan konfigurasi antibodi-antigennya, ELISA dapat dibagi menjadi beberapa jenis, yaitu :

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



# Direct ELISA

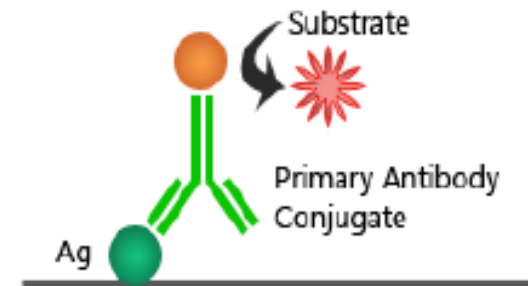
Antigen diimobilisasi pada well plate, lalu antigen tersebut langsung dideteksi menggunakan antibodi yang terkonjugasi dengan enzim yang sudah memiliki substrat, seperti HRP

## Kelebihan :

- Cepat, karena hanya menggunakan 1 antibody dan tidak banyak proses pencucian
- Cross-reactivity dengan secondary antibodi tidak terjadi

## Kekurangan :

- Reaktifitas antibodi mungkin terpengaruh oleh adanya enzim
- Dibutuhkan pewarnaan setiap jenis antibodi
- Sinyal kurang kuat dan kemungkinan ada background



**Applikasi :** untuk menganalisis respon imun terhadap suatu antigen tertentu



# Indirect ELISA

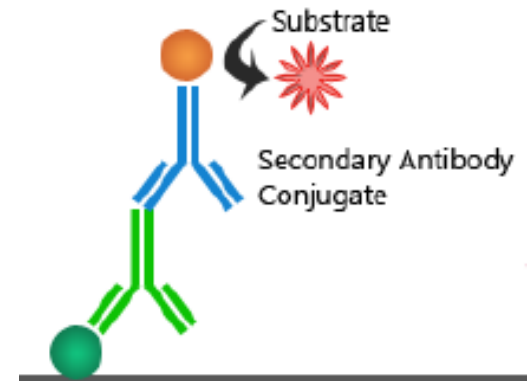
Antigen diimobilisasi pada well plate, lalu antinbodi utama yang tidak berlabel menempel pada antigen spesifik, kemudian antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim menempel pada antibodi utama

## Kelebihan :

- Sensitifitas tinggi, karena ada 2 jenis antibody yang digunakan
- Fleksibel, karena karena satu antibody sekunder berlabel dapat digunakan untuk beberapa jenis antibodi primer.
- Immunoreaktifitas antibodi primer lebih tinggi, karena tidak berlabel enzim

## Kekurangan :

- Ada kemungkinan cross-reactivity dengan antibodi sekunder, sehingga bisa muncul sinyal non spesifik
- Waktunya lebih lama, karena ada tambahan proses pencucian dan inkubasi



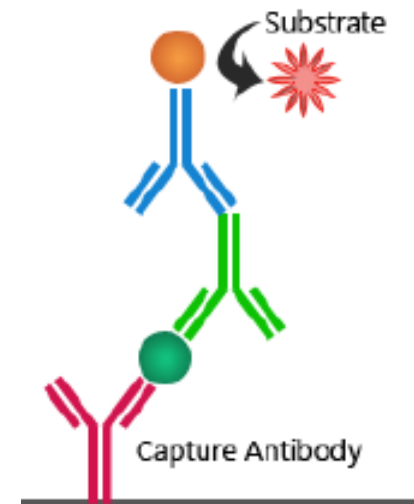
**Applikasi :** untuk menentukan konsentrasi total antibodi pada suatu sampel

# Sandwich ELISA

Pada sandwich ELISA, dibutuhkan pasangan antibodi yang cocok (*capture and detection antibody*), setiap antibodi harus memiliki lokasi atau *epitope* yang spesifik dan tidak overlapping pada antigen

## Kelebihan :

- Spesifisitas tinggi, antigen/analyte dapat di tangkap secara spesifik oleh capture antibody
- Cocok untuk sample kompleks dan tidak murni, antigen tidak harus dimurnikan dahulu sebelum analisis
- Sensitifitas tinggi
- Fleksibel, bisa menggunakan metode deteksi direct atau indirect



**Applikasi :** untuk mengukur konsentrasi antigen/analyte dari sampel yang kompleks ( hormon, sitokin, protein bakteri/virus/parasit )

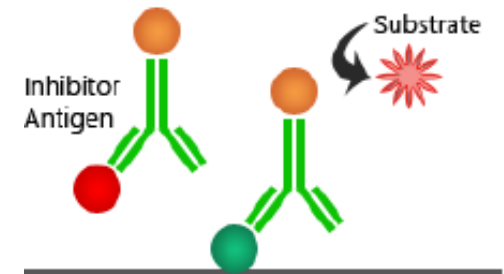
# Competitive ELISA

Antigen diimobilisasi pada well plate, lalu ditambahkan antibodi anti-A yang sudah terkonjugasi dengan enzim (sebagai inhibitor antigen). Sampel yang berisi antibodi anti-A dimasukkan ke dalam well. Kedua antibodi tersebut akan berkompetisi untuk berikatan dengan antigen.

Semakin tinggi konsentrasi protein target, semakin kecil sinyal yang terbaca oleh alat

## Kelebihan :

- Sensitifitas tinggi
- Dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi antigen/antibodi dengan konsentrasi yang rendah dalam sampel

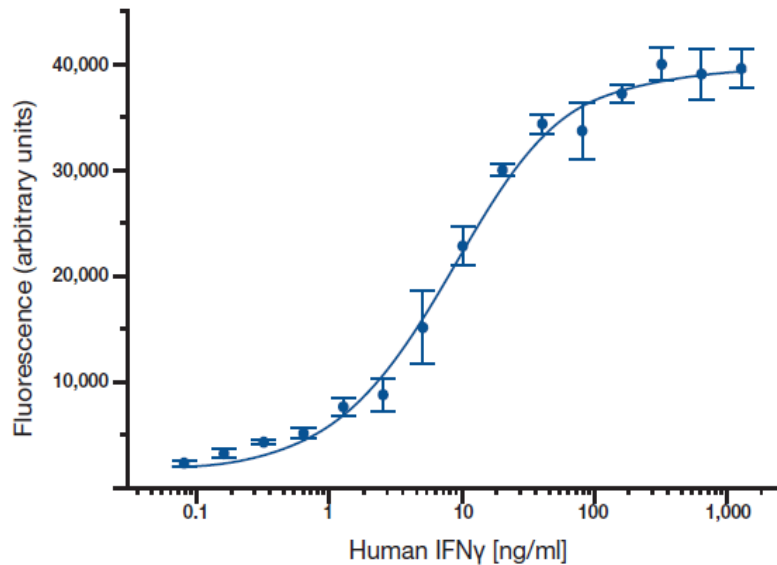


**Applikasi :** untuk mengukur konsentrasi antigen atau antibodi dalam suatu sampel yang konsentrasinya kecil

# Analisis Data ELISA

- **Kuantitatif**

Analisis data untuk menghitung konsentrasi antigen/antibodi dalam sampel yang dikalkulasi dengan cara membandingkan dengan **kurva standar** (pengenceran serial antigen/antibodi target)



# Analisis Data ELISA

- **Kuantitatif**

Analisis data untuk menghitung **konsentrasi** antigen/antibodi dalam sampel yang dikalkulasi dengan cara membandingkan dengan kurva standar (pengenceran serial antigen/antibodi target)

- **Kualitatif**

Analisis data yang menghasilkan jawaban **ada** atau **tidak** nya antigen/antibodi dalam suatu sampel dengan cara membandingkan absorbansi blanko (well yang tidak berisi antigen/antibodi target)

- **Semi-kuantitatif**

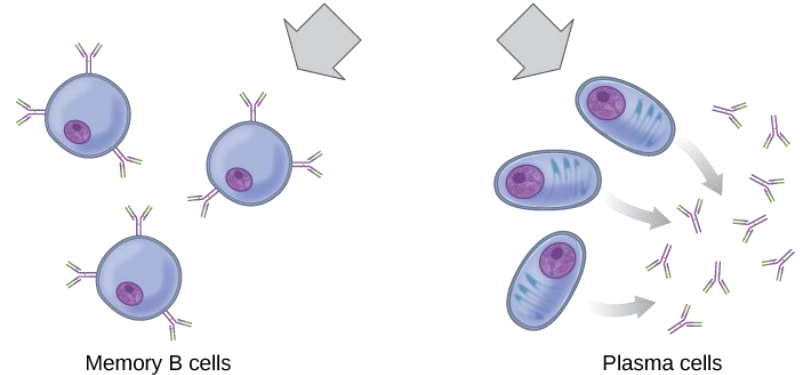
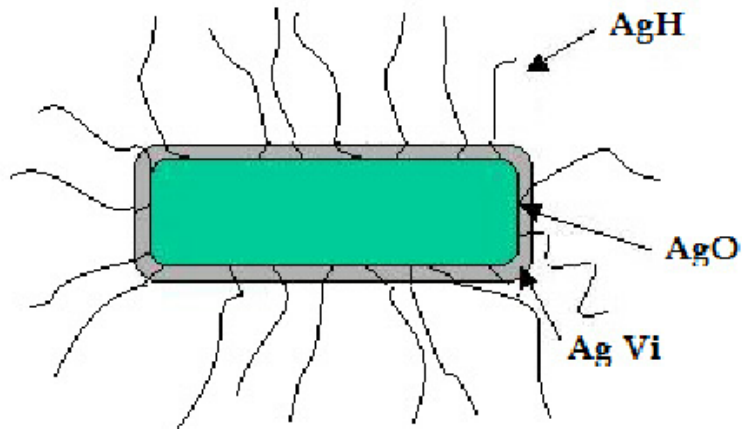
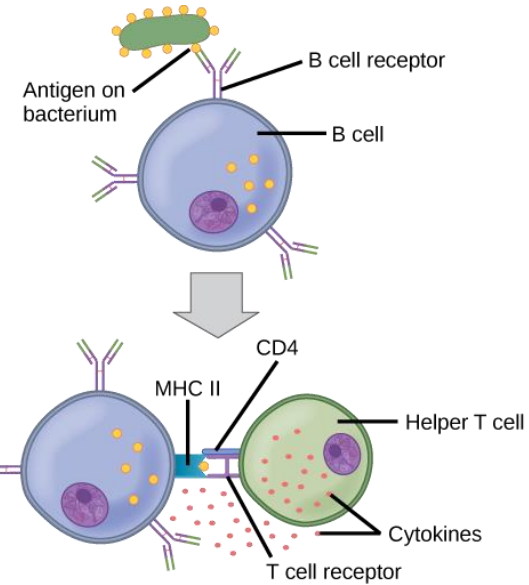
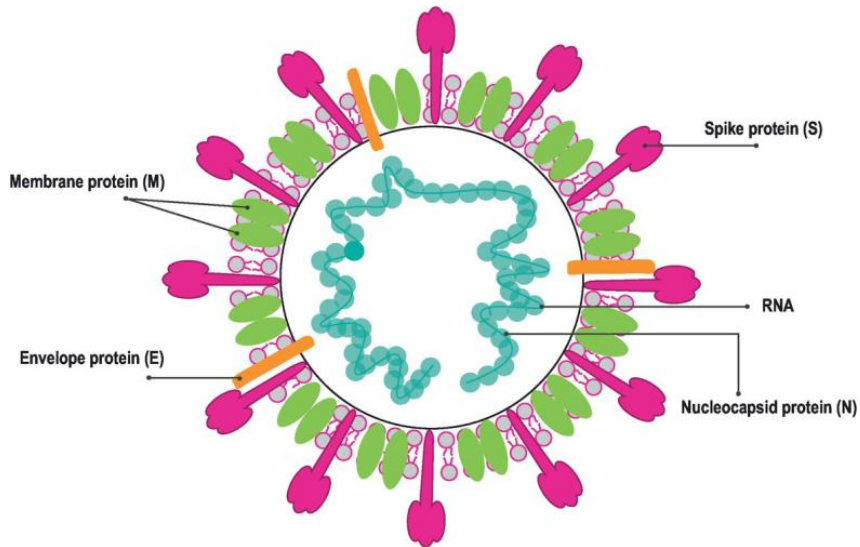
Analisis data yang menghasilkan nilai **level relatif** dari suatu antibodi/antigen dalam suatu sampel dengan cara membandingkan dengan kontrol atau sampel lain.

# Aplikasi ELISA

1. Deteksi keberadaan patogen penyebab penyakit (virus, bakteri, parasit, and fungi)
2. Pengujian titer antibodi
3. Deteksi alergen dalam makanan
4. Pegujian hormon
5. Deteksi penanda tumor (CA-9, CA19, CA242, Ferritin)
6. Pengujian obat-obatan dan bahan kimia



# ELISA untuk Deteksi Pathogen Penyebab Penyakit



# ELISA untuk Deteksi Pathogen Penyebab Penyakit

Bulletin of the World Health Organization, 61 (1): 135-142 (1983)

Experimental condition enzyme-linked immuno detection of hepatitis B

HOWARD A. FIELDS,<sup>1</sup> CANDACE L. DA

*The sensitivity of an hepatitis B surface antigen various solid-phase suppo different conditions for ad made by checkerboard titr strated essentially equivale by spectroph*

## Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Rapid Detection of Dengue Virus (DENV) NS1 and Differentiation of DENV Serotypes during Early Infection

Authors: [Szu-Chia Lai](#), [Yu-Yine Huang](#), [Pei-Yun Shu](#), [Shu-Fen Chang](#), [Po-Shiuan Hsieh](#), [Jiunn-Jye Wey](#), [Meng-Hung Tsai](#), [Ren-Jy Ben](#), [Yi-Ming Hsu](#), [Yi-Chien Fang](#), [Mei-Ling Hsiao](#), and [Chang-Chi Lin](#) | [AUTHORS INFO &](#)

[AFFILIATIONS](#)

[Pan Afr Med J](#). 2015;  
Published online 2015

### Evaluation of diagnosis of

[Loveness John Urio](#),<sup>1</sup>

► [Author information](#)

### Evaluation of New ELISA based on rLsa63 – rLipL32 antigens for serodiagnosis of Human Leptospirosis

[Safar Ali Alizadeh](#),<sup>1</sup> [Gholamreza Abdolahpour](#),<sup>2</sup> [Mohammad Reza Pourmand](#),<sup>1</sup> [Taghi Naserpour](#),<sup>3,4</sup> [Reza Najafipour](#),<sup>4,5</sup> and [Seyyed Saeed Eshraghi](#)<sup>1,\*</sup>

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ► [Disclaimer](#)

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.



# Terima Kasih

[kurdianto@sciencewerke.com](mailto:kurdianto@sciencewerke.com)