

Perbandingan Metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Dengan Metode Penggerusan, *Freeze Thawing*, dan Sonikasi

Dara Suci Amini ¹⁾, Dwi Hilda Putri ¹⁾, Ira Wahyuni ²⁾

¹⁾*Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang*

²⁾*Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas*

Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Barat, Kecamatan Padang Utara, Kota Padang

Email: darasuci.aminii@gmail.com

ABSTRAK

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah salah satu metoda dalam bidang laboratorium terutama imunologi untuk mengetahui ekspresi protein, reaksi imunitas, respon imun. Salah satu yang mempengaruhi keberhasilan metode ELISA yaitu proses homogenisasi sampel. Ada beberapa metode homogenisasi sel yang umum digunakan yaitu sonikasi, penggilingan (penggerusan), dan *freeze-thawing*. Pemilihan metode homogenisasi yang tepat dapat memastikan ekstraksi yang efisien dan konsisten dari substansi target. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 4 sampel ginjal mencit dengan yang diberikan 3 perlakuan homogenasi yang berbeda-beda. Berdasarkan hasil yang didapat diketahui bahwa metode homogenasi yang bagus untuk digunakan yaitu sampel P03 yang menggunakan metode homogenasi *freeze thawing* karena memiliki konsentrasi yang tinggi dibandingkan dengan P02 (sonikasi) dan P01 (penggerusan). Hal ini dikarenakan proses *freeze-thawing* melibatkan pembekuan cepat dan pembebasan kembali sampel pada suhu yang lebih tinggi. Pembebasan kembali ini dapat menyebabkan pembentukan kristal es dalam sel dan struktur biologis lainnya, yang dapat menyebabkan kerusakan fisik pada dinding sel atau membran, membantu pemecahan struktur seluler.

Kata kunci: ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), Metode Penggerusan, Sonikasi, *freeze Thawing*

PENDAHULUAN

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. 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 (Santosa, 2020).

Teknik ELISA pertama kali diperkenalkan pada tahun 1971 oleh Peter Perlmann dan Eva Engvall. Mereka menggunakan teknik ini dalam bidang imunologi (ELISA konvensional) untuk menganalisis interaksi antara antigen dan antibodi di dalam suatu sampel, dimana interaksi tersebut menggunakan suatu enzim yang berfungsi sebagai pemberi signal. Pada dasarnya, ELISA memiliki empat langkah prinsip, terdiri dari pelapisan, pemblokiran, pengaktifan antigen dan antibodi, dan pengembangan warna (Rudolf, 2005).

Langkah prinsip 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 solutions (Santosa, 2020). Analisis interaksi antara antigen dan antibodi yang teradsorpsi secara pasif pada permukaan fase padat dengan menggunakan konjugat antibodi atau antigen yang dilabel enzim. Enzim ini akan bereaksi dengan substrat dan menghasilkan warna. Warna yang timbul dapat ditentukan secara kualitatif dengan pandangan mata atau kuantitatif dengan pembacaan nilai absorbansi pada ELISA *plate reader* (Crowther, 2001).

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 (Santosa, 2020). Dalam keberhasilan metode ELISA ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya yaitu pada tahap homogenisasi sampel.

Homogenisasi sampel adalah proses yang melibatkan pemecahan sel atau jaringan biologis sehingga komponen-komponennya dapat diakses atau dianalisis lebih lanjut. Ada beberapa metode homogenisasi sel yang umum digunakan yaitu sonikasi, penggilingan (penggerusan), dan *freeze-thawing*. Proses homogenisasi sampel harus sesuai dengan jenis sampel yang digunakan. Pemilihan metode homogenisasi yang tepat dapat memastikan ekstraksi yang efisien dan konsisten dari substansi target. Dengan memperhatikan dan mengoptimalkan faktor homogenisasi ini, penelitian atau pengujian dengan metode ELISA memiliki peluang lebih besar untuk sukses dan memberikan hasil yang dapat diandalkan.

METODE PENELITIAN

Kegiatan kerja praktek dilaksanakan pada tanggal 22 juni- 22 juli 2023 dan dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat. Penelitian ini dilakukan dengan ELISA dengan tiga perlakuan

berbeda-beda pada tahap homogenasi empat sampel ginjal mencit. Perlakuan yang diberikan yaitu homogenasi secara mekanik, sonikasi, dan *freeze thawing*.

Alat yang digunakan untuk lisis sel adalah neraca analitik, *hand homogenizer*, *micropestle*, gunting, timer, *sonikator*, *micropipet*, *heater*, rak *microtube*, *vortex*, *microtube* 1,5 ml, tips, dan *centrifuge*. Alat yang digunakan untuk ELISA adalah polysteren 96 *well microtiter plate (Microplate)*, mikropipet, mikropipet *multi channel* dan tips (kuning & biru), *microplate shaker*, mikrotube (1-1,5 mL), *microplate washer*, *baker glass*, *ELISA reader*, dan kertas whatman no.4.

Bahan yang dibutuhkan untuk keperluan sterilisasi yaitu: aquades dan alkohol 70%. Bahan yang digunakan untuk lisis sel adalah 4 ginjal mencit yang berbeda, PBS (*Phosphate Buffered Saline*), dan *dry ice*. Bahan untuk ELISA adalah sampel dari ginjal mencit yang sudah dilisiskan dengan tiga metode, ADMA (*Asymmetrical Dimethylarginine*) ELISA Kit (yang terdiri dari *wash buffer*, larutan pengenceran standar, *biotinylated detection*, dan *concentrated HRP*) *micro assay plate*, dan *tissue*.

Prosedur kerja

a. Homogenasi Sel

Sampel ginjal mencit dari organ yang sama diambil sekitar 25 mg dengan cara dipotong dengan gunting lalu dimasukkan menggunakan pinset untuk masing-masing empat *microtube* dan beri kode di atasnya (H1 (P1,P2,P3, P4), H2 (P1,P2, P3, P4), H3 (P1,P2,P3, P4), H4 (P1,P2,P3, P4)). Kemudian larutan PBS ditambahkan kedalam masing-masing tube. Sampel hati lalu dihancurkan menggunakan gunting dan *hand homogenizer* lalu *vortex*. Sampel dengan kode P2 diberikan perlakuan sonikasi dengan cara sampel di dimasukan kedalam mesin sonikator selama 5 detik kemudian diangkat selama 30 detik lalu dimasukan lagi kedalam mesin sonikator selama 5 detik dengan 5 kali pengulangan. Untuk sampel dengan kode P3 diberikan perlakuan *freeze thawing* dengan cara mendinginkan sampel dengan *dry ice* lalu dipanaskan kembali dengan *heater* dan dilakukan selama 5 kali pengulangan. Setelah itu semua sampel disentrifuge dengan kecepatan 17000 XG selama 5 menit. Lalu supernatan dipindahkan ke tube baru yang diberi kode masing-masing sampel.

b. ELISA menggunakan Kit ADMA

- 1) Mensentrifuge semua sampel yang akan digunakan.
- 2) Menyiapkan larutan standar (larutan standar ada 8)
- 3) Tambahkan larutan kerja standar dengan konsentrasi berbeda ke dua kolom pertama, setiap konsentrasi larutan ditambahkan kedalam dua sumur secara berdampingan sebanyak 50 μ l untuk setiap *well*.
- 4) Masukkan sampel sebanyak 50 μ l untuk setiap sumur
- 5) Tambahkan 50 μ l biotin kedalam setiap *well* kecuali ke dalam larutan standar. Lalu tutup *well* dengan *sealer* dan inkubasi selama 45 menit pada suhu 37°C.

- 6) Buang larutan pada setiap *well* kemudian tambahkan 350 μ l *wash buffer* kedalam *well*. Rendam selama 1-2 menit lalu buang larutan dari *well* dan tepuk-tepuk ke *tissue* hingga kering, ulangi langkah pencucian ini sebanyak 3 kali.
- 7) Tambahkan 100 μ l HRP conjugate ke masing-masing *well*, lalu tutup dengan *sealer* dan inkubasi selama 30 detik pada suhu 37°C.
- 8) Buang larutan pada tiap *well*, lalu melakukan proses pencucian pada no 6 ulangi proses pencucian sebanyak 5 kali pengulangan.
- 9) Tambahkan 90 μ l substrat reagent ke setiap *well* kemudian ditutup dengan *sealer* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C lindungi dari cahaya.
- 10) Tambahkan stop solution sebanyak 50 μ l untuk masing-masing *well*
- 11) Tentukan nilai *Optical density* (OD) masing-masing *well* menggunakan *micro plate reader* yang diatur ke 450 nm.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Standar report

| Std # | Conc (ng/ml) | Well | Replicates | Mean | SD | %CV |
|-------|--------------|------|------------|-------|-------|-------|
| 1 | 0 | H1 | 0.812 | 0.812 | (*) | (*) |
| 2 | 15.63 | G1 | 0.660 | 0.660 | (*) | (*) |
| 3 | 31.25 | F1 | 0.678 | 0.678 | (*) | (*) |
| 4 | 62.5 | E1 | 0.635 | 0.635 | (*) | (*) |
| 5 | 125 | D1 | 0.508 | 0.508 | (*) | (*) |
| 6 | 250 | C1 | 0.424 | 0.424 | (*) | (*) |
| 7 | 500 | B1 | 0.288 | 0.288 | (*) | (*) |
| 8 | 1000 | A1 | 0.221 | 0.221 | (*) | (*) |

Data Analysis Report

| Sample ID | Well | Replicates | Mean | Conc (ng/ml) | SD (Conc) |
|-----------|------|------------|-------|--------------|-----------|
| G1P01 | A2 | 0.645 | 0.645 | 38.273 | (*) |
| G1P02 | B2 | 0.615 | 0.615 | 53.070 | (*) |

| | | | | | |
|-------|----|-------|-------|---------|--------|
| G1P03 | C2 | 0.483 | 0.483 | 160.724 | (*) |
| G2P01 | D2 | 0.830 | 0.830 | (+) | (*) |
| G2P02 | E2 | 0.782 | 0.782 | 1.229 | (*) |
| G2P03 | F2 | 0.436 | 0.436 | 223.298 | (*) |
| G3P01 | G2 | 0.748 | 0.748 | 6.149 | (*) |
| G3P02 | H2 | 0.728 | 0.728 | 10.352 | (*) |
| G3P03 | D3 | 0.389 | 0.389 | 305.494 | (*) |
| G4P01 | E3 | 0.862 | 0.862 | (+) | (*) |
| G4P02 | F3 | 0.774 | 0.774 | 2.117 | (*) |
| G4P03 | G3 | 0.533 | 0.522 | 120.106 | 14.487 |
| | H3 | 0.511 | | | |

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dapat diartikan sebagai penentuan kadar imunisorben taut-enzim. ELISA merupakan teknik pengujian serologi yang didasarkan pada prinsip interaksi antara antibodi dan antigen. Pada awalnya, Teknik ELISA hanya digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi keberadaan antigen maupun antibodi dalam suatu sampel. Namun, seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan. Teknik ELISA juga diaplikasikan dalam bidang patologi tumbuhan dan kedokteran (Fernanda *et al.*, 2019).

Metode ELISA didasarkan pada kerja imunologi yang dikombinasi dengan reaksi enzimatik, reaksi imunologi dalam sistem ELISA adalah adanya ikatan antigen-antibodi atau sebaliknya. Reaksi enzimatik antara enzim dan reaktan digunakan untuk menandakan adanya reaksi yang kemudian dapat diukur secara kualitatif berdasarkan pada perubahan warna dalam sistem. Keunggulan metode ini adalah reaksinya yang cepat dan relatif murah jika dibandingkan dengan metode molekuler lainnya. (Rohima, 2019). Pada penelitian ini dilakukan pengujian metode ELISA dengan metode mekanik (pengerusan), sonikasi, dan *freez thawing*. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan metode ekstraksi sampel dalam konteks ELISA. Metode mekanik, sonikasi, dan *freez-thawing* dapat diuji untuk melihat mana yang memberikan hasil ekstraksi yang lebih baik dan lebih konsisten.

Sampel yang digunakan berupa empat ginjal mencit yang berbeda, dimana masing-masing diberikan tiga perlakuan dimana P01 dihomogenasi secara mekanik (pengerusan), P02 dihomogenasi secara mekanik dan sonikasi, dan P03 dihomogenasi

secara mekanik dan *freeze thawing*. Berdasarkan hasil pembacaan ELISA menggunakan *micro plate reader* dapat diketahui bahwa pada sampel P01 yang menggunakan metode penggerusan, untuk G1P01 dan G3P01 memiliki konsentrasi berurutan yaitu 38.273 dan 6.149 sedangkan untuk G2P01 dan G4P01 memiliki tanda " (+) " di kolom "Conc (ng/ml)", menunjukkan bahwa konsentrasi dalam sampel ini tidak dapat ditentukan atau berada di luar batas deteksi yang ditetapkan oleh metode ELISA yang digunakan.

Untuk sampel P02 yang dihomogenasi secara mekanik dan sonikasi diketahui G1P02, G2P02, G3P02, G4P02 memiliki konsentrasi berurutan yaitu 53.070, 1.229, 10.352, 2.117 dan semua sampel terdeteksi. Untuk sampel P03 yang dihomogenasi secara mekanik dan *freez thawng* diketahui G1P03, G2P03, G3P03, G4P03 memiliki konsentrasi berurutan yaitu 160.724, 223.298, 305.494, 120.106. Pada sampel P03 memiliki lonjakan konsentrasi yang tinggi daripada pada sampel lain dan semua sampel terdeteksi.

Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa untuk metode ELISA yang dihomogenasi dengan *freeze thawing* memiliki hasil yang lebih bagus dibandingkan dengan metode sonikasi dan mekanik (penggerusan) saja. Hal ini dikarenakan proses *freeze-thawing* melibatkan pembekuan cepat dan pembebasan kembali sampel pada suhu yang lebih tinggi. Pembebasan kembali ini dapat menyebabkan pembentukan kristal es dalam sel dan struktur biologis lainnya, yang dapat menyebabkan kerusakan fisik pada dinding sel atau membran, membantu pemecahan struktur seluler. Sedangkan penggunaan metode sonikasi lebih daripada penggerusan.

PENUTUP

Berdasarkan hasil dan pembahasan diatas diketahui urutan metode yang baik digunakan untuk homogenasi metode ELISA yaitu berurutan metode *freeze thawing*, sonikasi, dan penggerusan. Hal ini dapat diketahui dengan meliat perbedaan konsentrasi yang dimiliki setiap sampel, dimana sampel dengan metode P03 rata-rata memiliki konsentrasi yang lebih tinggi daripada konsentrasi P02 dan P01.

REFERENSI

- Allen, R. G., & Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(3), 463-499.
- Crowther, J. R. 2001. *The Elisa Guidebook*. New Jersey: Humana Press.
- Johnson, B.H. and Hecht, M.H. 1994. Recombinant Proteins Can Be Isolated From E. Coli Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing. *Biotechnology* 12(13): 1357-60.
- Li, Y., & Schluesener, H. (2013). Health-promoting effects of the citrus flavanone

hesperidin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(6), 626-634.

Ferry Fernanda, Sa'adi Ashon, & Sudjarwo. (2019). Verifikasi Linieritas Kurva Baku Testosteron Menggunakan Metode Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). *Journal of Research and Technology*, 5(1), 51–53.

Rau, G. A. (2001). Ultrasonication as a method to extract proteins from bacteria. *Analytical Biochemistry*, 299(2), 189-195

Rudolf M. L. 2005. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* Vol. 51 No. 12 pp. 2415–2418

Rohima, I. E. (2019). Identifikasi Protein Hewani Pada Produk Bumbu Instan Impor dengan Metode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). *Pasundan Food Technology Journal*, 5(3), 167. <https://doi.org/10.23969/pftj.v5i3.1265>

Santosa, B. (2020). Teknik Elisa: Metode Elisa Untuk Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit. In *Unimus Press, Semarang*. (Issue 18).