

Peningkatan Kualitas Kit Elisa Rabies Pusvetma

Elisa Rabies Pusvetma Kit Quality Improvement

Ekky Valinia Devia Mashelli*¹, Nur Sjolichah², Febri Hartanti³

^{1,2,3}Pusat Veteriner Farma; Ahmad yani 68 -70 Surabaya, (031) 8291124

e-mail: *ekkyvaliniadm@gmail.com

ABSTRAK

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan salah satu alat uji untuk mendeteksi antibody. Teknik pengujian atau pemeriksaan berdasarkan atas ikatan antigen antibody yang mana salah satu antigen atau antibody dilabel dengan Enzym tertentu dan reaktan lainnya berikatan. Metode yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu persiapan mikroplate (*coating, blocking, washing*) dan pengujian kit ELISA. Hasil uji serum kontrol positif, serum kontrol negatif, serum standart dan serum sampel yang menggunakan substrat label TMB dan Konjugat Protein A-HRP menunjukkan nilai OD yang lebih stabil dibanding dengan yang menggunakan substrat PNPP dan Konjugat Protein A-AP (*Alkaline Phosphatase*) dengan panjang gelombang 405 nm.

Kata kunci— *ELISA, substrat, konjugat*

ABSTRACT

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is a test tool for detecting antibodies. The technique of testing or examination is based on the binding of the antigen to the antibody in which one of the antigens or antibodies is labeled with certain enzymes and other reactants are bound. The methods used in this research are microplate preparation (*coating, blocking, washing*) and ELISA kit testing. The test results of positive control serum, negative control serum, standard serum and sample serum using TMB labeled substrate and Protein A-HRP Conjugate showed more stable OD values than those using PNPP substrate and Protein A-AP (*Alkaline Phosphatase*) conjugate with a length of the 405 nm wave.

Keywords— *ELISA, substrate, konjugat*

PENDAHULUAN

Rabies disebabkan oleh virus neurotropic genus Lyssavirus family Rhabdoviridae dan penyakit anjing gila adalah infeksi susunan syaraf pusat pada hewan yang dapat menular ke manusia. Rabies ditularkan melalui gigitan, cakaran, bahkan air liur yang mengenai luka pada kulit (Kang et al., 2007). Karena bersifat zoonosis, maka

semua material yang dicurigai terinfeksi harus ditangani dengan memperhatikan aspek keamanan sesuai spesifikasi WHO (WHO, 1996).

penyakit anjing gila adalah infeksi susunan syaraf pusat pada hewan yang dapat menular ke manusia. Rabies ditularkan melalui gigitan, cakaran, bahkan air liur yang mengenai luka pada kulit (Kang et al., 2007). Vaksinasi merupakan tindakan

pencegahan yang efektif dalam mengurangi kejadian rabies. Hail vaksinasi rabies harus memenuhi standart kebutuhan minimal sesuai dengan acuan OIE, yaitu sama atau lebih besar dari 0,5 *Equivalent Unit* (EU) (Hooper et al, 1998, WHO Expert Committee in Biological standart, 1985). Antibody netralisasi diyakini merupakan komponen utama dari respon imun melawan virus rabies. *Gold standart* uji adalah virus netralisasi. Pemeriksaan zat kebal (antibodi) pada serum dapat dilakukan dengan cara *Mouse Netralization* (MN), *Rapid Fluorecent Focus Inhibition Test* (RFFIT) dan *Enzym Linked Immunosorbent Assays* (ELISA).

ELISA – *Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan alat pertama kali diperkenalkan pada awal tahun 1970 (D.Catty,1989) dan salah satu uji untuk mendeteksi antibodi yang sangat berguna terkait dengan survey epidemiologi dalam populasi besar (Xu et al, 2007) dengan teknik pengujian atau pemeriksaan berdasarkan atas ikatan antigen – antibody yang mana salah satu antigen atau antibody dilabel dengan enzim tertentu dan reaktan lainnya berikatan bersifat resisten yang tidak berikatan akan lepas dengan pencucian. Lalu ditambahkan substrat yang apabila bereaksi dengan enzim dapat menimbulkan warna. Perubahan warna yang terjadisesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan sesuai pula dengan kadar antibodi yang dicari (Johnson et al, 2011). Intensitas warna yang mencerminkan intensitas antigen – antibody yang diperiksa dan dapat diukur absorbsinya secara kuantitatif dengan *optical density*. Makin banyak antigen yang berinteraksi dengan antibodi makin tinggi intensitas warnanya (Sumartini et al., 2002). Nilai *Equivalen Unit* (EU) sebagai hasil akhir pengujian ELISA dianalisis secara

deskriptif dengan mengacu pada data yang sudah disediakan dalam KIT yaitu titer dinyatakan protektif jika nilainya $\geq 0,5$ EU dan titer dinyatakan tidak protektif jika $\leq 0,5$ EU (Saputra dkk, 2013).

Kit ELISA Rabies Pusvetma telah mendapat perhatian secara nasional dan internasional dalam perjalanan produksinya. Dalam rangka meningkatkan mutu dan kualitas kit ini dilakukan penelitian uji stabilitas dengan membandingkan penggunaan substrat label PNPP dan konjugat Protein A - AP (*Alkaline Phosphatase*) dengan substrat label TMB dan Konjugat Protein A - HRP. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengkaji larutan substrat yang dipakai Kit Elisa Pusvetma sehingga dapat mempengaruhi stabilitas dan kualitas Kit Elisa Rabies Pusvetma.

METODE PENELITIAN

Bahan – bahan yang digunakan meliputi antigen rabies, *carbonat bicarbonat buffer*, *bovine serum albumin*, *sucrose*, *phosphat buffer saline*, *tween 20*, *thiomersal*, sampel serum lapangan, serum kontrol positif, serum kontrol negatif, serum standart, *phospat buffer saline tween*, substrat label PNPP, substrat label TMB, konjugat Protein A - AP, konjugat Protein A - HRP, dan stopper. Peralatan yang digunakan meliputi mikroplate urai, multichannel pipet, single channel pipet, finntipe, baker glass, tabung reaksi, petri disk, elisa reader dan elisa washer. Metode yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu persiapan mikroplate (*coating*, *blocking*, *washing*) dan pengujian kit ELISA

Persiapan mikroplate

Coating antigen rabies dilakukan pada mikroplate urai dengan

menggunakan buffer bicarbonate buffer pH 9,6 seratus mikroliter setiap *well* dan ditutup dengan plastik absorbent lalu simpan semalam pada suhu 4°C. *Blocking* mikroplate dengan membuka plastik absorbent dan membuang larutan coating lalu diisi dengan larutan blocking buffer bicarbonat buffer pH 9,6 bovine serum albumin, dan succrose, di isi seratus mikroliter setiap *well* dan di tutup dengan plastik absorbent lalu di simpan pada inkubator pada suhu 37 °C selama 1 jam. *Washing* mikroplate dengan cara membuka plastik absorbent yang sudah di simpan pada inkubator lalu di buang cairan blocking dan di cuci dengan phospat buffer saline selama 4 kali, diisi 250 mikroliter setiap *well*.

Pengujian ELISA

Uji Elisa dilakukan dengan pengenceran serum sampel, serum kontrol negatif, serum kontrol positif,

serum standart dengan PBS *tween*, masukkan ke dalam setiap *well* masing – masing seratus mikroliter dan tutup plastik absorbent dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam setelah itu buka plastik absorbent dan cuci dengan PBS *tween* pengenceran 1 kali, masukan pengenceran konjugat dengan PBS *tween* sebanyak 100 µl setiap *well* lalu tutup kembali dengan plastik absorbent dan inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 1 jam, lalu cuci kembali dengan PBS *tween*, tambahkan subtrat label PNPP dan Konjugat Protein A - AP dengan Substrat label TMB dan Konjugat Protein A - HRP sebanyak 100 µl tempatkan pada ruang gelap selama 10 menit dan mikroplate selanjutnya diisi dengan 100 µl stop solution pada semua sumur. Tiga puluh menit kemudian dilakukan pembacaan *optical density* pada panjang gelombang 450 nm dan 405 nm (Biorad 2009).

Tabel 1. Reader dengan panjang gelombang 405 nm dan 450 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K4EU	K4EU	K4EU	K4EU	S68	S68	K4EU	K4EU	K4EU	K4EU	S68	S68
B	K2EU	K2EU	K2EU	K2EU	S68	S68	K2EU	K2EU	K2EU	K2EU	S68	S68
C	K1EU	K1EU	K1EU	K1EU	S88	S88	K1EU	K1EU	K1EU	K1EU	S88	S88
D	K0,5EU	K0,5EU	K0,5EU	K0,5EU	S88	S88	K0,5EU	K0,5EU	K0,5EU	K0,5EU	S88	S88
E	K0,25E U	K0,25E U	K0,25E U	K0,25E U	S102	S102	K0,25E U	K0,25E U	K0,25E U	K0,25E U	S102	S102
F	K0,125E U	K0,125E U	K0,125E U	K0,125E U	S102	S102	K0,125E U	K0,125E U	K0,125E U	K0,125E U	S102	S102
G	ST	ST	ST	ST	blank	blank	ST	ST	ST	ST	blank	blank
H	K-	K-	K-	K-	blank	blank	K-	K-	K-	K-	blank	blank

Keterangan:

- 1. Substrat label TMB dan Konjugat Protein A - HRP
- 2. Subsrat label PNPP dan Konjugat Protein A - AP (Alkaline Phosphatase)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dengan membandingkan penggunaan subtrat label PNPP dan Konjugat Protein A - AP dengan Substrat label TMB dan

Konjugat Protein A - HRP. Pembacaan hasil Elisa dilakukan dengan panjang gelombang 450 nm dan 405 nm. Hasil pengujian Kit Elisa Rabies dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Optical density (OD) dengan panjang gelombang 450 nm

Measurement count: 1 Filter: 450												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,018	3,156	3,13	3,081	0,884	0,807	0,278	0,279	0,286	0,307	0,055	0,061
B	3,129	3,062	3,083	3,042	0,638	0,634	0,162	0,169	0,171	0,163	0,057	0,046
C	2,678	2,765	2,678	2,597	1,117	1,262	0,104	0,117	0,113	0,117	0,069	0,077
D	2,052	1,903	1,855	1,873	1,014	1,008	0,076	0,085	0,079	0,082	0,069	0,049
E	1,355	1,206	1,184	1,189	1,32	1,214	0,062	0,075	0,062	0,071	0,087	0,094
F	0,781	0,853	0,784	0,756	1,379	1,350	0,053	0,056	0,08	0,07	0,085	0,05
G	2,737	2,924	2,716	2,771	0,249	0,213	0,117	0,132	0,12	0,117	0,051	0,055
H	0,372	0,292	0,339	0,299	0,232	0,23	0,052	0,046	0,063	0,05	0,052	0,048

Tabel 3. Hasil Optical density (OD) dengan panjang gelombang 405 nm

Measurement count: 1 Filter: 405												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,725	1,736	1,661	1,706	0,375	0,347	1,272	1,274	1,292	1,393	0,128	0,153
B	1,42	1,362	1,352	1,371	0,286	0,242	0,649	0,7	0,707	0,676	0,126	0,065
C	1,059	1,084	1,078	1,019	0,453	0,508	0,376	0,383	0,403	0,4	0,188	0,2
D	0,778	0,734	0,709	0,71	0,412	0,342	0,226	0,226	0,23	0,232	0,18	0,069
E	0,541	0,473	0,481	0,473	0,523	0,48	0,145	0,162	0,153	0,16	0,24	0,259
F	0,336	0,371	0,34	0,326	0,539	0,441	0,107	0,112	0,14	0,128	0,244	0,174
G	1,162	1,158	1,135	1,122	0,157	0,141	0,418	0,442	0,432	0,405	0,074	0,073
H	0,198	0,164	0,18	0,164	0,144	0,141	0,086	0,078	0,094	0,086	0,074	0,071

Pengujian Kit Elisa ini dilakukan dengan penggunaan 1 mikroplate dengan coating yang sama. Perbedaan pengujian pada penggunaan substrat dan konjugat. Penggunaan substrat label TMB dan Konjugat Protein A - HRP dimasukkan pada sumuran mikroplate nomor 1 sampai 6 sedangkan penggunaan substrat PNPP dan Konjugat Protein A-AP dimasukkan pada sumuran mikroplate nomor 7 sampai 12. Pengenceran konjugat protein A-HRP dan Konjugat Protein A-AP sama yaitu pengenceran 16.000x.

Berdasarkan hasil uji Kit Elisa Rabies tersebut diatas tampak bahwa nilai OD kontrol dan sampel pengujian yang dibaca pada Elisa reader dengan panjang gelombang 450 nm (tabel 2) lebih baik dibandingkan dengan nilai OD kontrol dan sampel pengujian yang dibaca pada Elisa reader dengan panjang gelombang 405 nm (tabel 3).

Hasil uji serum kontrol positif, serum kontrol negatif, serum standart dan serum sampel yang menggunakan substrat label TMB dan Konjugat Protein A - HRP menunjukkan nilai OD yang lebih stabil dibanding dengan yang menggunakan substrat PNPP dan Konjugat Protein A - AP (Alkaline Phosphatase) seperti tampak pada tabel 2 dan 3. Pengkajian kit elisa rabies dengan menggunakan substrat label TMB dan Konjugat Protein A - HRP menunjukkan stabilitas dan kualitas yang lebih baik.

KESIMPULAN

1. Penggunaan substrat label TMB dan Konjugat Protein A - HRP memberikan hasil yang lebih stabil.
2. Pembacaan hasil OD pada elisa reader dengan panjang gelombang

405 nm memberikan hasil yang lebih stabil.

Rabies Pusvetma. Pusat Veteriner Farma. Surabaya.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang Uji Stabilitas Kit Elisa Rabies.

Sumartini, S., Zuas, O., Juliasmardiany, R., dan Sulilawati, E. 2002. *Aplikasi Elisa Kit Untuk Mendeteksi Adanya Daging Babi Dalam Makanan*. Pusat Penelitian Kimia; Tangerang

DAFTAR PUSTAKA

Biorad. 2009. *User's manual Platelia Rabies II Kit*. Tersedia pada: [http://web.oie.int/VCDA/eng/Registre/User's %20 manual_Platelia Rabies II. pdf](http://web.oie.int/VCDA/eng/Registre/User's%20manual_Platelia%20Rabies%20II.pdf).

D. Catty. 1989. *A Practical Approach*. Vol II

Hooper, D.C., Morimoto, K., Bette, M., Weihe, E., Koprowski, H. dan Dietzschold, B. 1998. Collaboration of Antibody and Inflammation in Clearance of Rabies Virus from The Central Nervous System. *J.Virol.* 72. 3711-3719.

Johnson, G.A, Zielger, R.J, Hawley, L. 2011. *Essential Mikrobiologi dan imunologi*. Tangerang selatan: Binarupa Aksara Publisher.

Kang, B., J.S. Oh, C.S. Lee, B.K. Park, Y.N. Park, K.S. Hong, K.G. Lee, B.K. Cho, D.S. Song. 2007. Evaluation of Rapid Immunodiagnostic Test kit for Rabies Virus. *Journal of Virology Methods*. 145: 30 – 36

OIE. 2011. *Terrestrial Manual, Rabies*. Chapter 2.1.13.

Saputra, P.N., D. Estikoma., dan saN. Shohchah. 2013. *Kit ELISA*

World Health Organization. 1996. *Laboratory Techniques in Rabies Fourth Edition*, Meslin F-X.Kaplan M.M dan Koprowski H.,Eds. WHO. Geneva. Switzerland.

World Health Organization Expert Commitee on Biological Standards. Thirty-Fifth Report. 1985. *World Health Organisation Technical Report Series No. 725*. WHO. Geneva. Switzerland.

Xu G., Weber P., Hu Q.,Xue H., Audry L.,Li C., Wu J dan Bourhy H. 2007. *A Simple Sanwich Elisa (WELYSSA) For The Detection of Luysavirus Nucleocapsid in Rabies Suspected Specimens Using Mouse Monoclonal Antibodies Biologicals*. 35. 297-302