



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

ELISA

(enzyme-linked immunosorbent assay): Prinsip Dasar

Hevi Wihadmadyatami

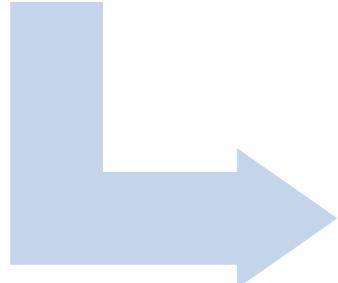
Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gadjah Mada

heviwihadmadyatami@ugm.ac.id



DNA



RNA

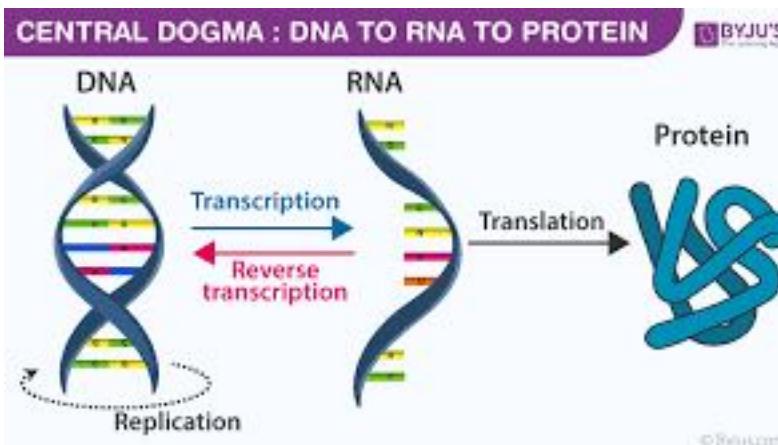
- Genome

PCR/ qPCR, Southern Blot, Sequencing

- Transkriptomik

Northern Blot, Sequencing, Exon Seq, RT-PCR

Protein



- Proteomik
FACS, ELISA, WB, IHC, Luminex

ELISA

- Diawali dengan penemuan Radio Immuno Assay (RIA) oleh Rosalyn Sussman Yalow dan Solomon Berson pada tahun 1960
- Kemudian pada tahun 1971, Eva Engvall dari Stockholm University, Swedia: IgG dalam serum kelinci menggunakan alkaline fosfatase (enzim) sebagai label reporter- **ELISA**
- 1971 Anton Schuurs serta Bauke van Weemen di Belanda: human chorionic gonadotropin dalam urin dengan horseradish peroxidase (enzim) ditambah dengan glutaraldehyde sebagai label reporter



UNIVERSITAS GADJAH MADA



Rosalyn Sussman Yalow



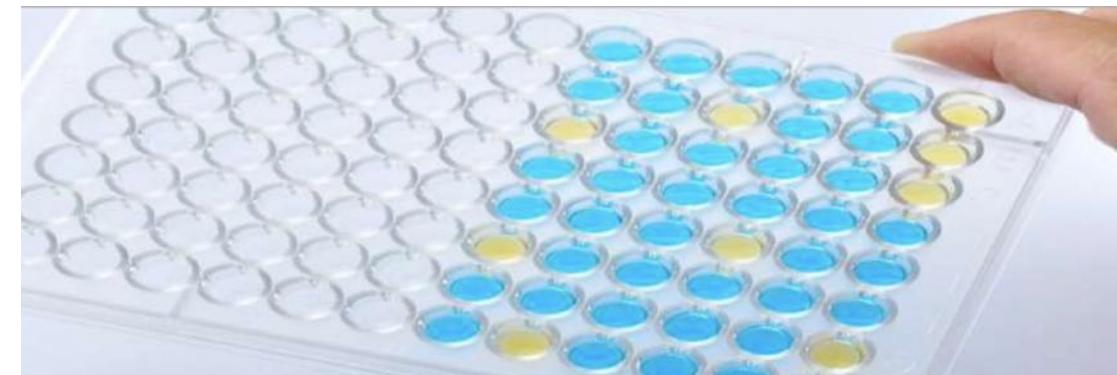
Eva Engvall



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Definisi

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) adalah teknik laboratorium yang umum digunakan untuk mengukur konsentrasi atau kadar sebuah **substansi (analyte)** umumnya berupa **antibodi atau antigen** pada **solid phase (ELISA Plate)** dengan hasil akhir adalah **OD** dari kalorimetrik substrat



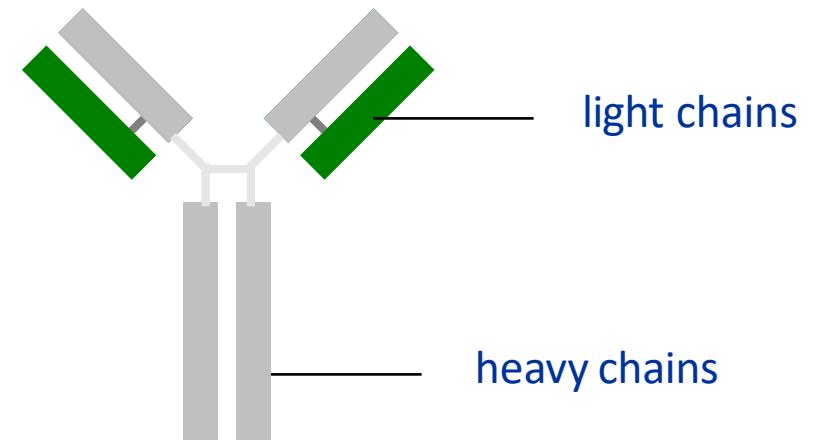
LOCALLY ROOTED, GLOBALLY RESPECTED

Antibodi



UNIVERSITAS GADJAH MADA

- Antibodi adalah **immunoglobulin** yang mampu membentuk kombinasi spesifik dengan antigen yg menimbulkannya
- Diproduksi oleh **B-cells (B-lymphocytes)** sebagai pelindung dr invasi agen asing spt bakteri, virus, dll.
- Setiap B-cell menghasilkan antibody dengan spesifitas tunggal.
- Masing-masing antibody terdiri dr 4 polipeptida – 2 **heavy chains** dan 2 **light chains** bergabung membentuk molekul spt "Y".





- Bentuk klasik “Y” antibodi terdiri dr 2 variabel antigen spesifik **Fab** dan konstan **Fc**.
- Sequence asam amino pd ujung Fab bervariasi antar antibodi. Daerah “**variable region**” tsb memberikan spesifisitas ikatan terhadap antigen tertentu





Pembuatan Antibodi

- Antibodi diproduksi dengan menyuntikkan antigen yg telah dimurnikan pada hewan. Hewan merespon dengan memproduksi antibodi yg spesifik mengenali dan mengikat antigen.
- Antibodi mungkin **poliklonal** atau **monoklonal**.



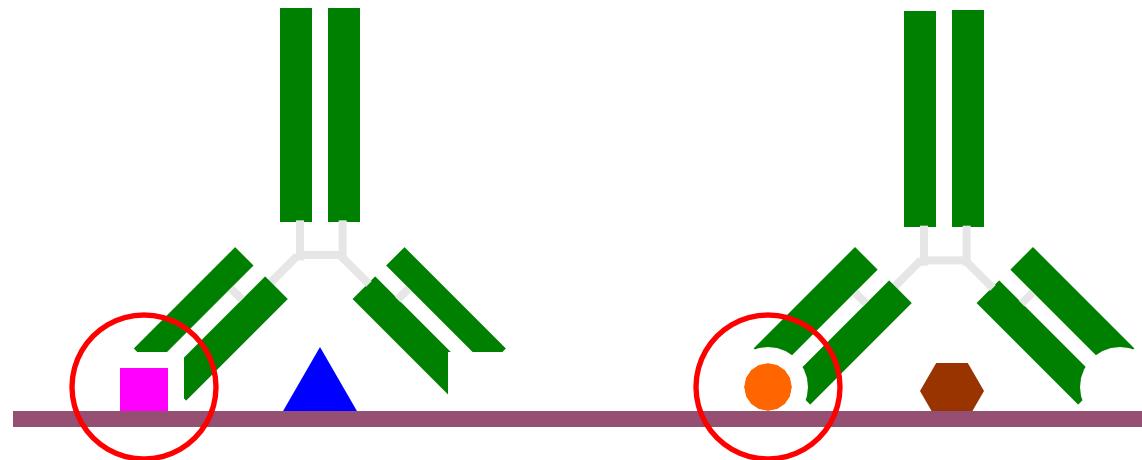
Poliklonal Antibodi

- Reagen Poliklonal antibody diperoleh dari berbagai sel B dan merupakan kombinasi dari beberapa imunoglobulin yang dapat bereaksi pada berbagai epitop antigen.
- Poliklonal antibody lebih toleran pada perubahan kecil pd antigen karena mereka mengenali berbagai epitope.
- Poliklonal antibody dapat diproduksi pada berbagai hewan seperti kelinci, kambing, domba, kuda, dll. Kelinci paling umum digunakan utk memproduksi antibody poliklonal.



Poliklonal Antibodi

Poliklonal antibody

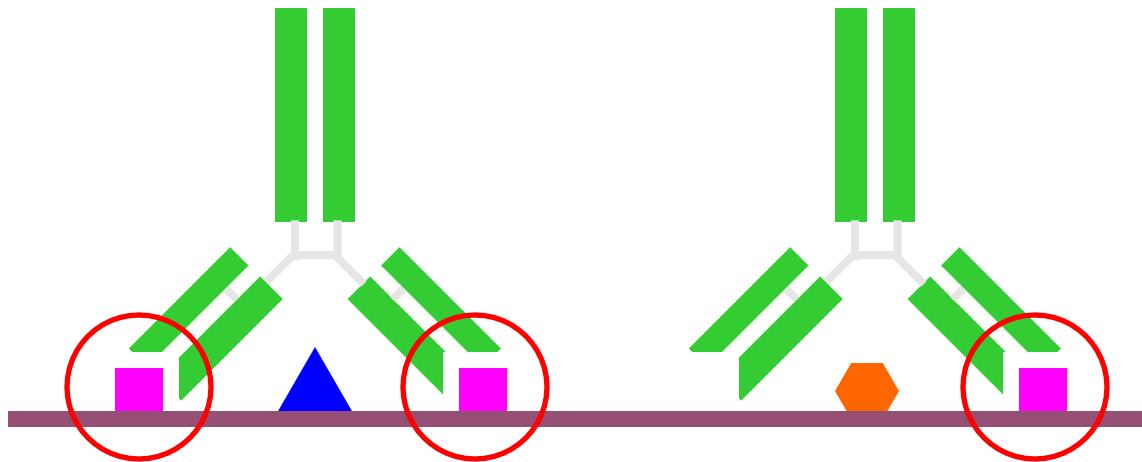


Reaksi antibodi poliklonal dengan berbagai epitop



Antibodi Monoklonal

- Antibodi Monoklonal merupakan antibodi yg spesifik (spesifitas tunggal) karena didapat dr sel imun yg identik (clone).
- Monoklonal antibody bereaksi speisfik pada satu epitope antigen, shg memberikan background yang minimal
- Monoklonal antibody bereaksi hanya pada satu epitop,



Antibodi monoklonal beraksi pada epitop yg sama



Mengapa disebut ELISA?

enzyme-linked immunosorbent assay

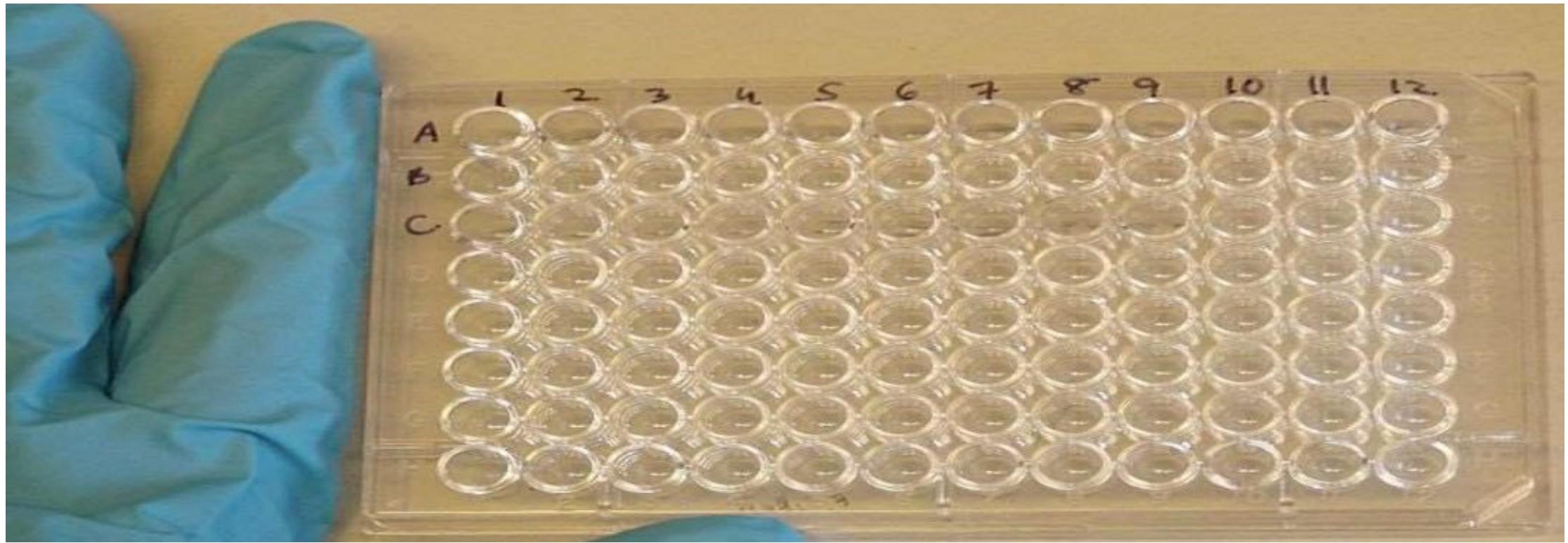
1. Antigen atau antibodi yang dicari menempel pada permukaan dari plastik plate = "solid phase = sorbent"
2. Antigen dikenali oleh **spesifik antibodi** = immuno
3. **Antibodi** ini (nomer 2) dikenali oleh **antibodi kedua** yang telah berlabel enzim = enzyme-linked
4. Substrat akan bereaksi dengan enzim pada antibodi kedua dan membentuk warna



Terminologi

Solid Phase:

Berupa microtiter plate well, dengan 8 x 12 well format (96 well)





Terminologi

- Adsorption:

Proses penambahan (adding) antigen/antibody, dengan dilusi menggunakan buffer, sehingga akan melekat pada solid phase selama inkubasi.

- Washing:

Metode pencucian dengan mengisi dan mengosongkan well dengan buffered solution untuk memisahkan materi yang terikat dan tidak berikatan pada proses ELISA.



Terminologi

- Antigen:
Sebuah molekul yang memungkinkan timbulnya antibodi ketika berada di dalam tubuh
- Antibodies:
Protein yang diproduksi sebagai salah satu bentuk dari stimuli antigen
- Enzyme conjugate:
Enzyme yang menempel irreversible pada antibodi, cnth: Horse-redish peroxidase (HRP).



Terminologi

- Chromogen:
Bahan kimia yang bereaksi dengan enzim dan menghasilkan warna, warna ini digunakan sebagai signal ketika pembacaan dengan menggunakan ELISA reader cnth. Trimethyl benzidine (TMB).
- Stopping:
Proses yang menghentikan reaksi antara enzim dan substrat
- Reading:
Pengukuran Spectrophotometric dari warna yang dihasilkan pada proses ELISA.



Prinsip dari ELISA

- Berdasarkan pada Basic Immunology Response
 - Lock and Key Concept
 - 1) Antigen (key)
 - 2) Antibody (lock)
 - 3) Enzyme conjugate substrates melekat pada secondary antibody yang membentuk antibody-antigen complex.
- Key fits into the lock



Peralatan yang dibutuhkan untuk ELISA

- Microwell Plate: Flat bottom polystyrene plate, 8 x 12 wells (96 wells)
- Maksimal volume tiap well 200 - 250 µL.





Peralatan yang dibutuhkan untuk ELISA

- Multipippete atau Multichannel Pipet

Terdiri dari 8 channel dengan volume 100- 200 ul akan sangat membantu terutama dalam proses pencucian





Peralatan yang dibutuhkan untuk ELISA

Washing Device





Peralatan yang dibutuhkan untuk ELISA

- Microplate washer (automatis) :sangat efisien dengan kemungkinan kontaminasi yang sangat kecil





Peralatan yang dibutuhkan untuk ELISA

- ELISA Reader



TECAN SPARK 20M



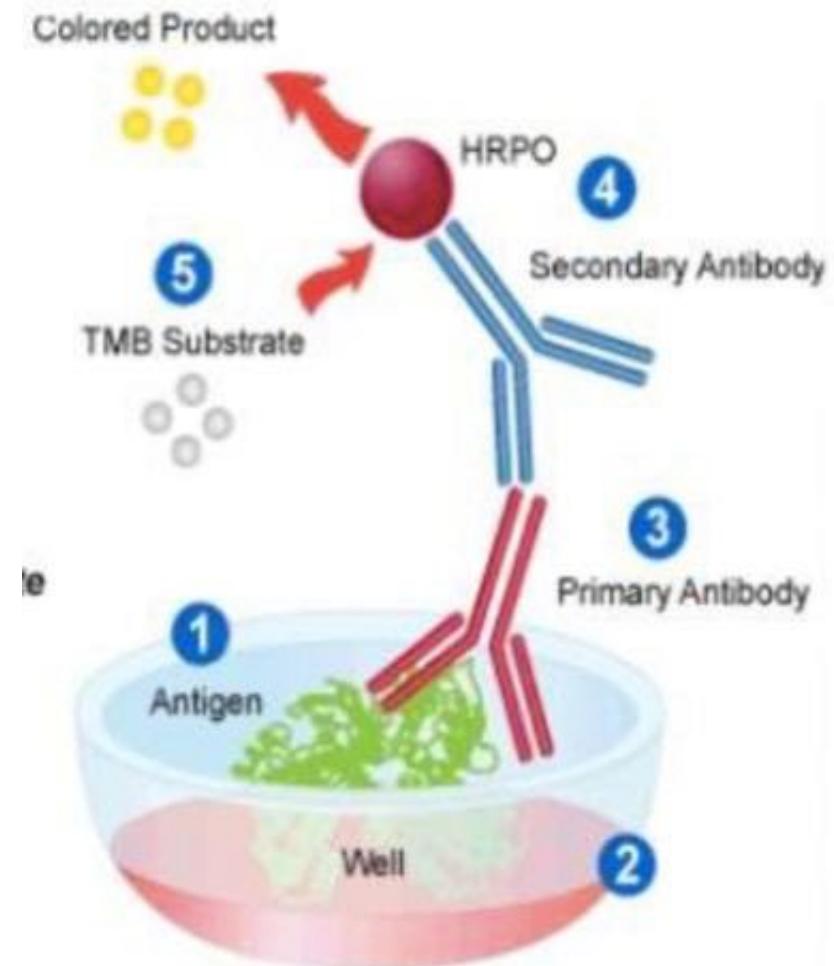
Reagent pada Proses ELISA

Reagent	Composition
Coating Buffer	0.01 M Phosphate Buffer + 0.15 M NaCl (PBS)
Diluting/Washing Buffer	0.01 M Phosphate Buffer + 0.50 M NaCl + 0.1% Tween 20
Blocking Buffer	Bovine Serum Albumin (BSA)
Enzyme	Horse-redish peroxidase (HRPO)
Chromogenic Substrate	Trimethyl benzidine (TMB)
Stop Solution	0.5 M H ₂ SO ₄



Prosedur ELISA (secara umum)

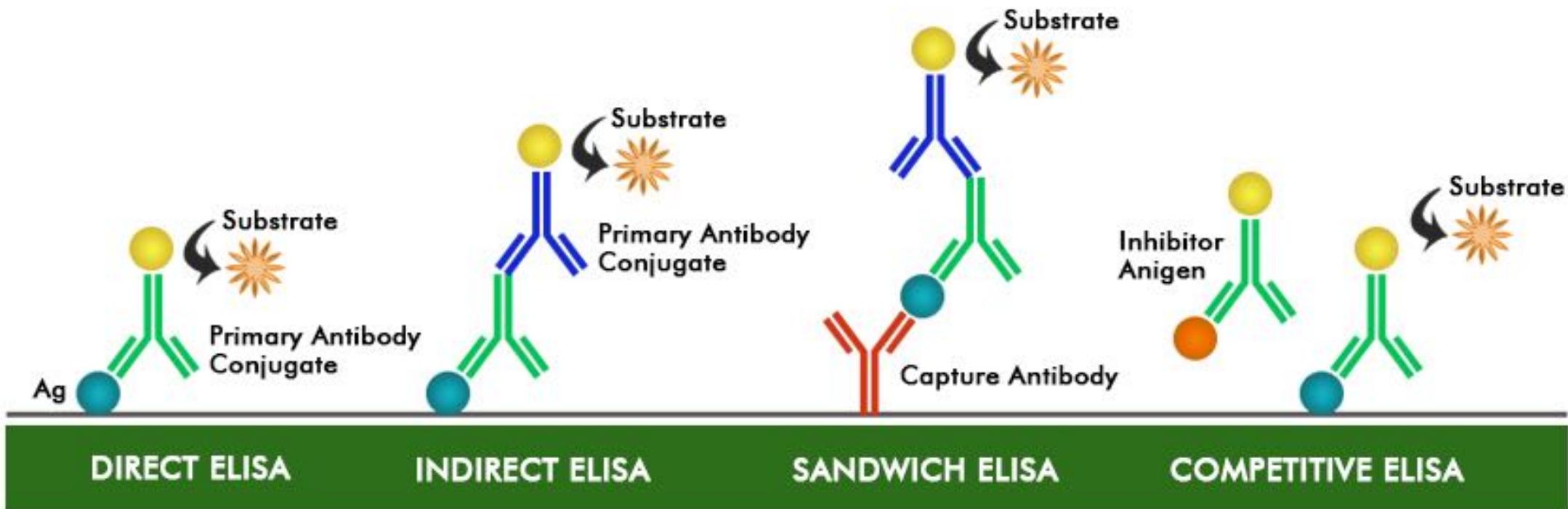
1. Antigen diletakkan pada substrat
2. Tambahkan bloking buffer untuk menutup protein binding site yang masih terbuka
3. Penambahan Antibodi Primer
4. Penambahan Antibodi Sekunder yang telah berlabel enzim (HRP)
5. Penambahan substrat (TMB)
6. Terbentuk warna





UNIVERSITAS GADJAH MADA

JENIS ELISA



DIRECT ELISA

INDIRECT ELISA

SANDWICH ELISA

COMPETITIVE ELISA

LOCALLY ROOTED, GLOBALLY RESPECTED



Non-Competitive:

Direct ELISA:

- Menggunakan **Antibodi primer berlabel yang langsung** bereaksi dengan antigen
- Saat ini proses automatisasi memungkinkan penggunaan direct label antibody ini pada antigen yang terlebih dahulu telah diimmobilisasi pada plate
- Pada mulanya tidak umum digunakan pada ELISA tetapi prinsip dari metode ini digunakan secara luas pada Pewarnaan Imunohistokimia pada organ dan jaringan

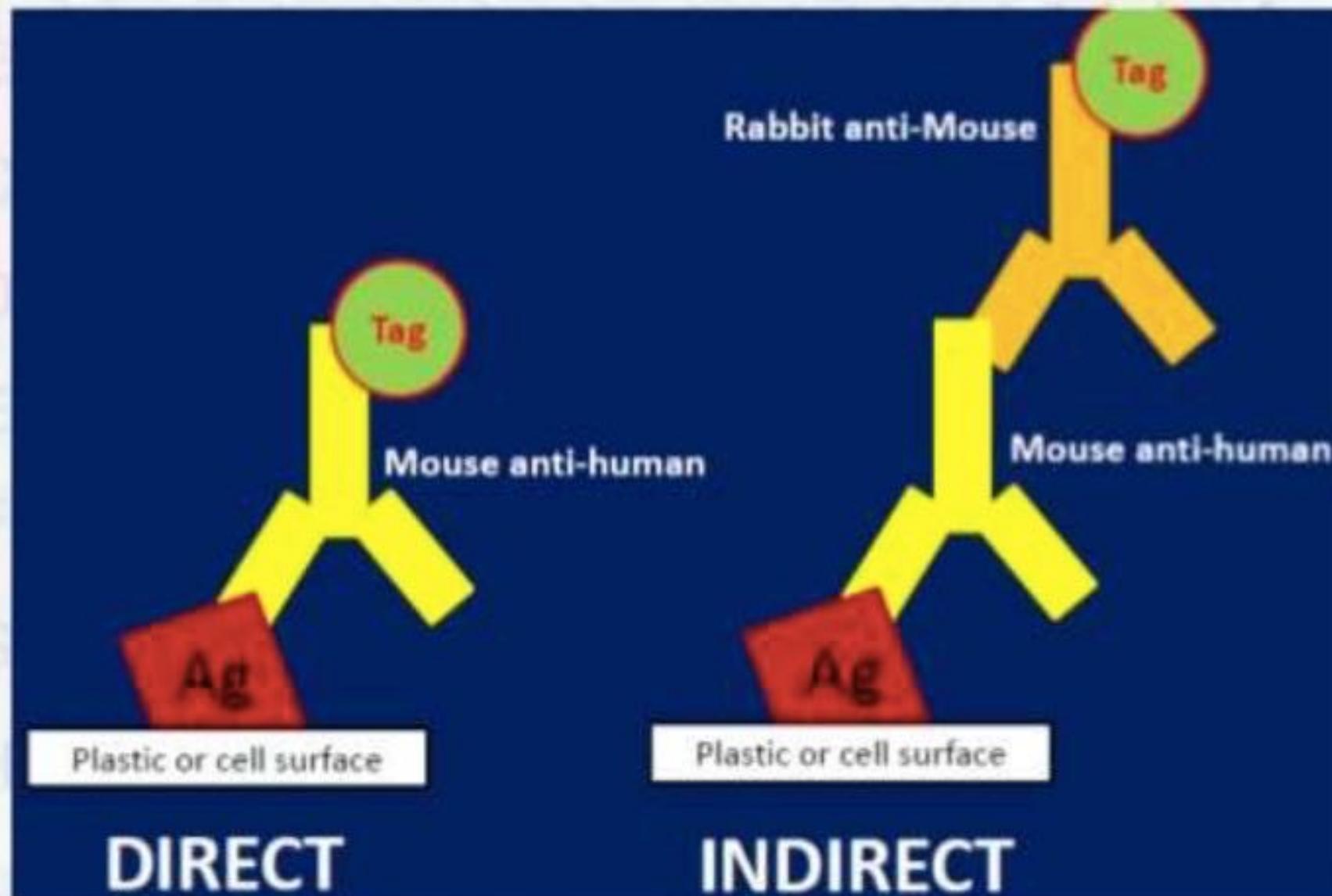


Non-Competitive:

Indirect ELISA:

- Antibodi pertama tidak berlabel tetapi antibodi kedua berlabel enzim
- Secondary antibody spesifik digunakan terhadap primary antibody.

Direct and Indirect ELISA

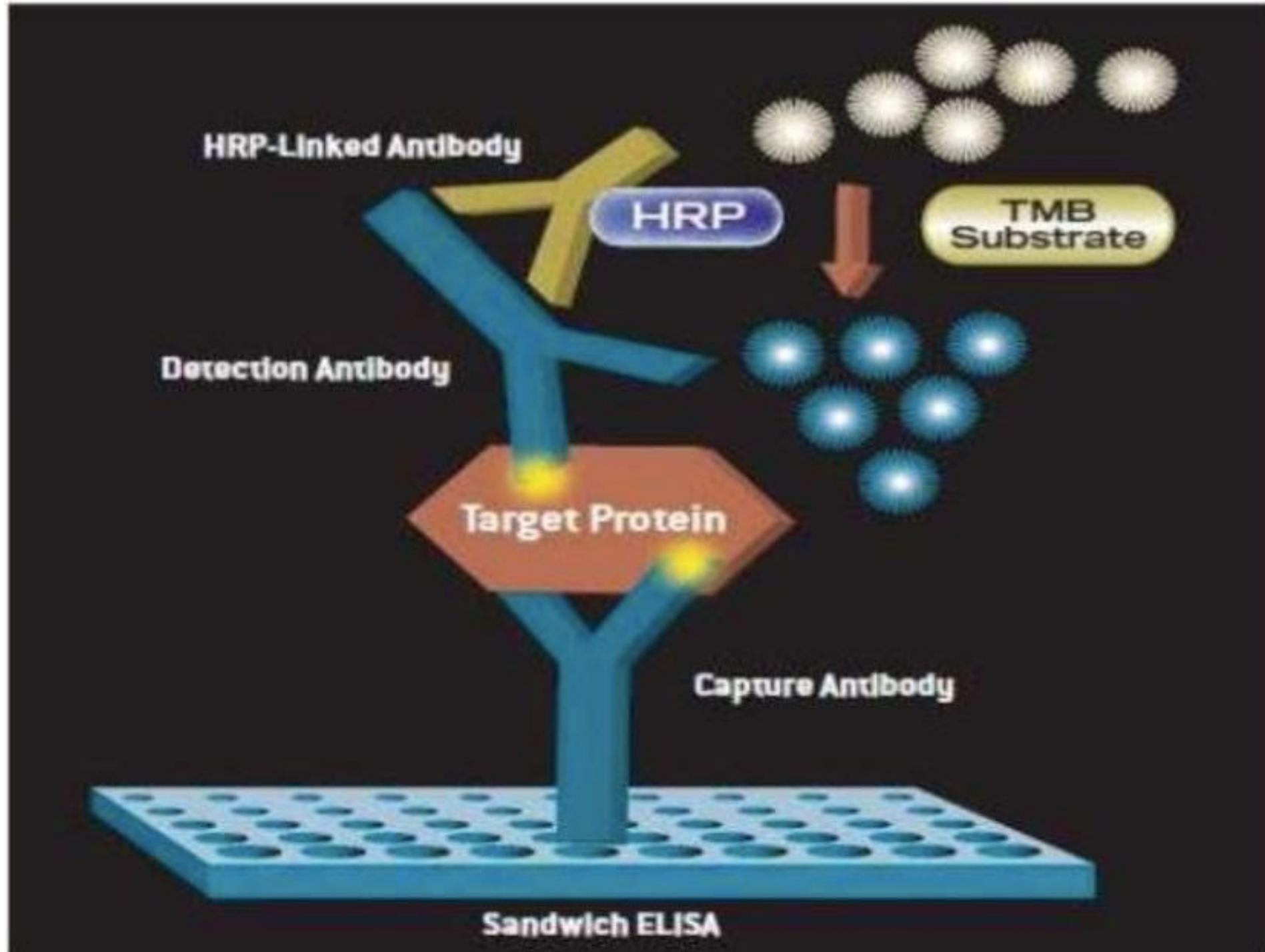




Non-Competitive:

Sandwich ELISA:

- Antibodi penangkap terlebih dahulu diimobilisasi pada substrat
- Antigens akan berikatan dengan antibodi penangkap (capture antibody) dan menjadi terimobilisasi
- Antibodi kedua berlabel enzim akan berikatan dengan antigen yang telah terimobilisasi dan membentuk sandwich Ab-Ag-Ab.

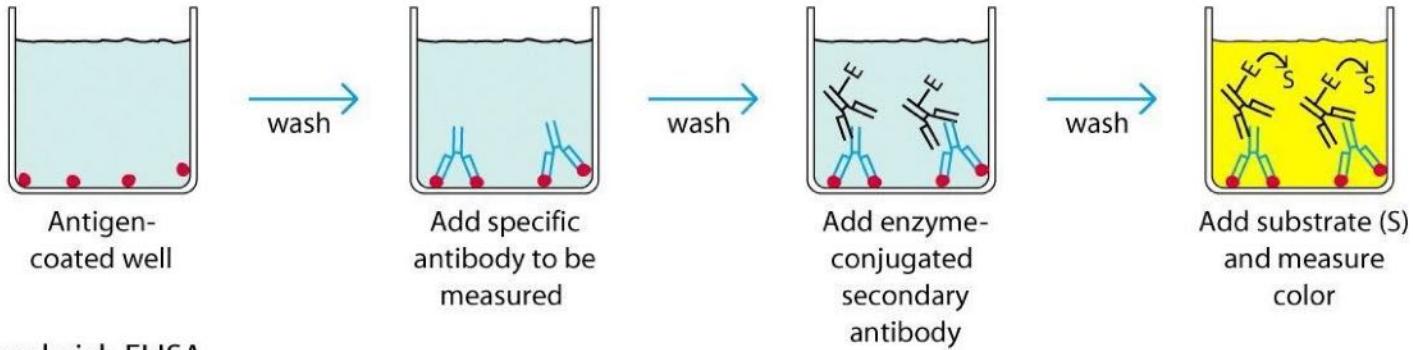




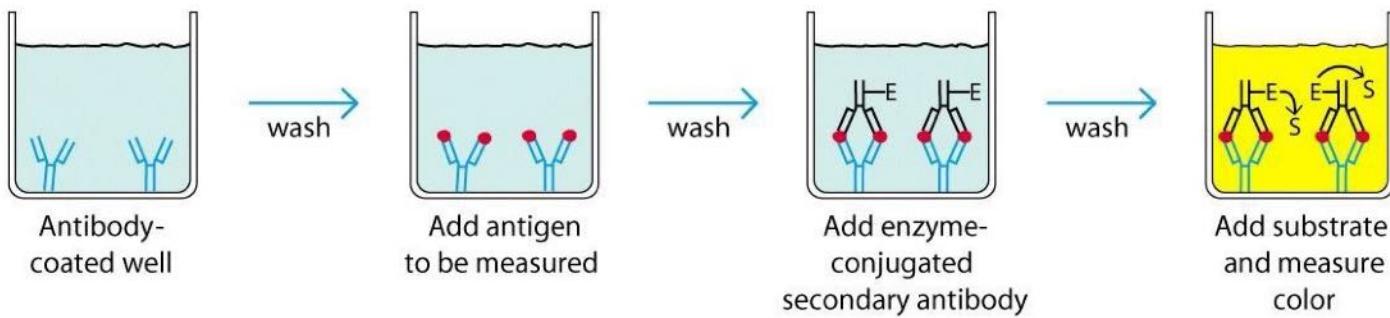
Competitive ELISA

- Antibodi dicoatingkan pada microplate
- Serum (antigen) & labeled antigen ditambahkan bersama Competition
- Ab-Ag enzyme complex berbanding terbalik dengan konsentrasi antigen yang ditemukan pada sample
- Peningkatan ikatan serum antigen dalam mengurangi pengikatan antara Ag- enzyme conjugate dengan antibody menghasilkan aktivitas enzim yang lebih sedikit sehingga terbentuk formasi warna (yellow).
- Digunakan untuk: molekul kecil seperti T3 , T4 dan Progesterone.

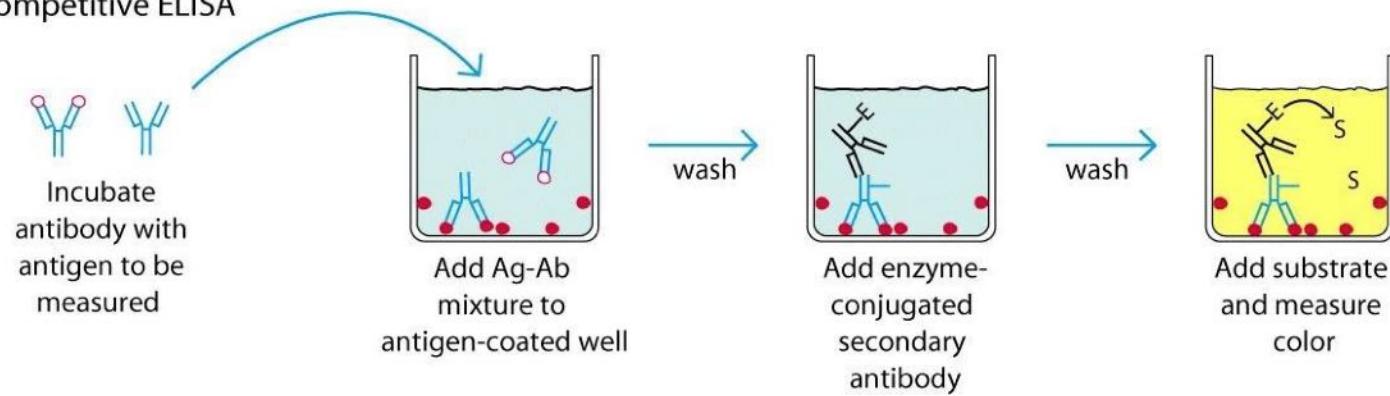
(a) Indirect ELISA



(b) Sandwich ELISA



(c) Competitive ELISA





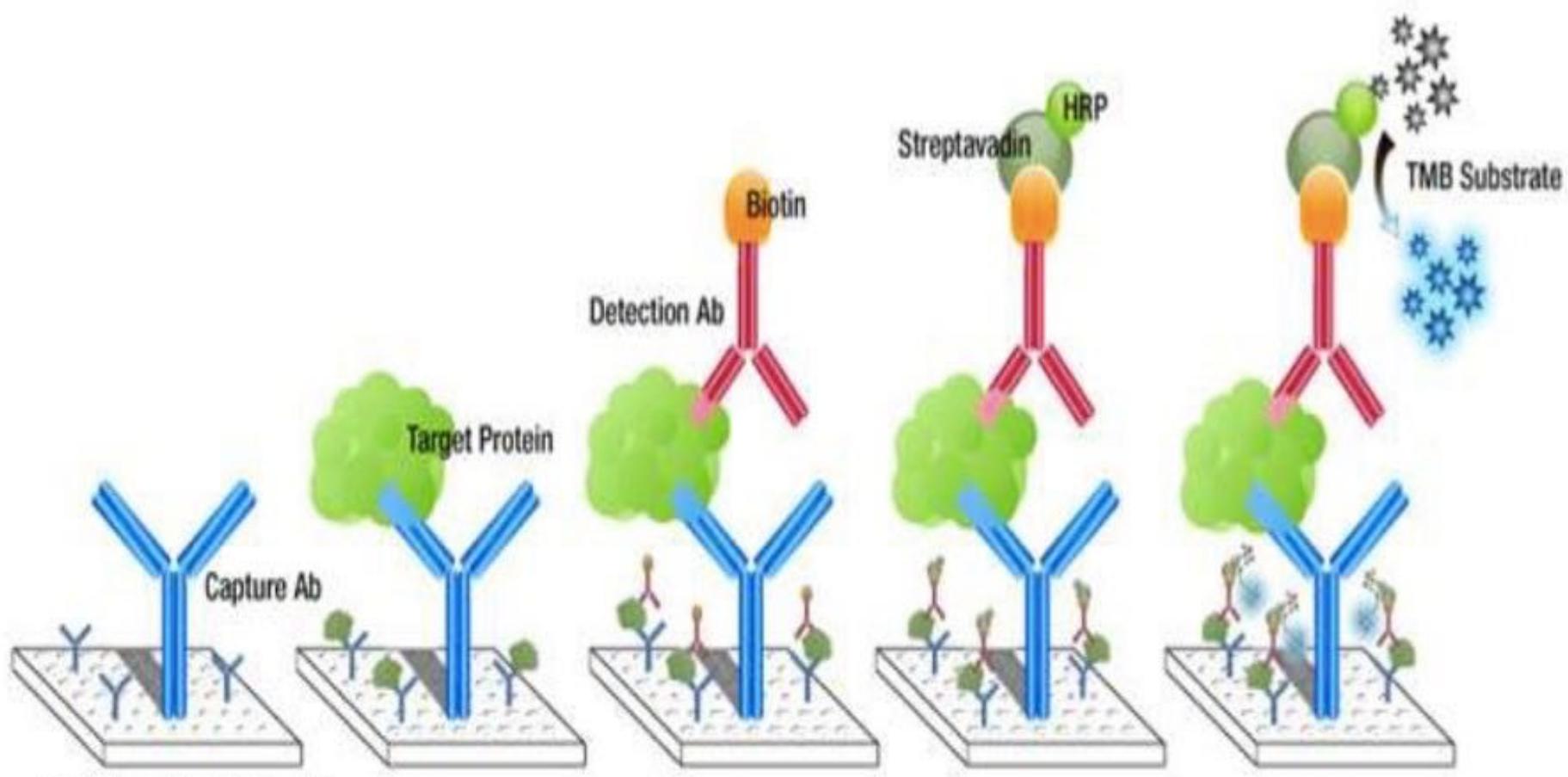
Modified ELISA

Antibodi kedua dilabel oleh zat molekuler yang sangat kecil, contoh biotin (MW=244.31), dan protein pengikat spesifik untuk biotin, avidin terkonjugasi dengan enzim seperti HRP.

atau

Menggunakan lebih dari dua tipe antibodi

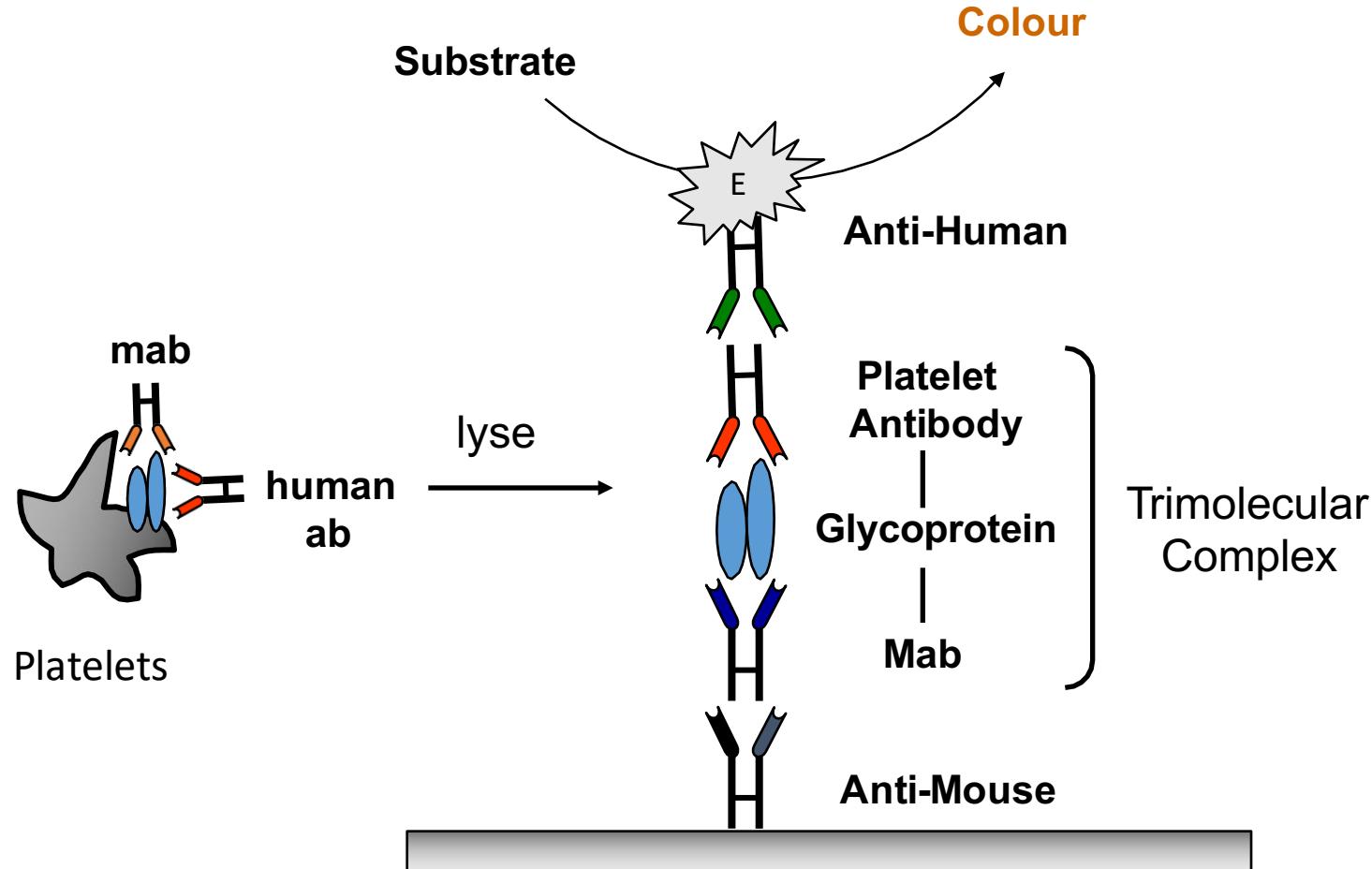
Modified ELISA:





Platelet Antibody Test (III. Generation)

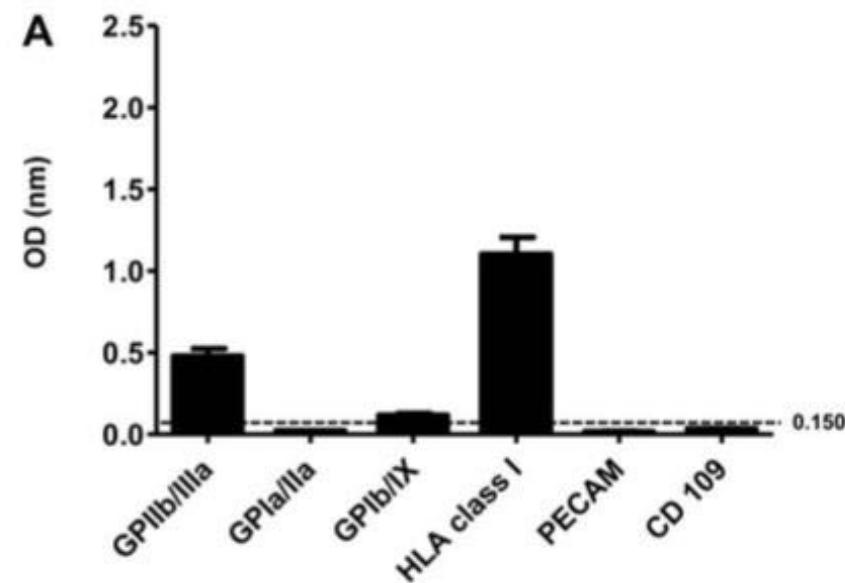
- Antigen Capture Assay - MAIPA



MAIPA: Monoclonal Antibody Immobilized Platelet Antigens

Alloantibody against new platelet alloantigen (Lap^a) on glycoprotein IIb is responsible for a case of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia

Fig. 1. (A) Serologic analysis of Lap^a antibody by MAIPA. Paternal PLTs were incubated with maternal serum together with MoAbs against PLT GPs (anti-GPIIb/IIIa, -GPIa/IIa, -GPIb/IX, -PECAM, -CD109, and -HLA Class I). Bound human antibodies were then detected by the use of enzyme-labeled secondary antibody and substrate system. Reaction was measured at OD490/620 using ELISA microtiter reader. (B)





Pembacaan

- Dengan panjang gelombang tertentu menyesuaikan substrat yang digunakan
- Penghitungan nilai positif dengan memperhatikan kontrol negatif dan nilai simpangan deviasi (SD)
- Nilai yang muncul berupa OD = Optical Density



Enzim dan Substrat

Enzyme	Substrat	Warna	Panjang Gelombang
Alkaline Phosphatase (AP)	PNPP (<i>p</i> -Nitrophenyl Phosphate, Disodium Salt)	yellow	405 nm
Horse Radish Peroxidase (HRP)	ABTS Substrate (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazolin e-6-sulfonic acid]-diammonium salt)	Green	410 nm
HRP	OPD <i>o</i> -phenylenediamine dihydrochloride	Green (orange)	492 (450) nm



Enzim dan Substrat

Enzyme	Substrat	Warna	Panjang Gelombang
HRP	TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)	Yellow (Blue)	450 (650) nm
GAL (beta galactosidase)	ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)	Yellow	410 nm

Plate No. _____

Date ____ / ____ / ____

Expt. No. _____

Plate No. _____ Conc. _____ Time _____ Temp. _____

Coating Ab _____ Conc. _____ Time _____ Temp. _____

Antigen _____ Conc. _____ Time _____ Temp. _____

Second Ab _____ Conc. _____ Time _____ Temp. _____

Conj. _____ Conc. _____ Time _____ Temp. _____

Subst _____ Conc. _____ Time _____ Temp. _____

NOTES. _____

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												





Kelebihan metode ELISA

- Harga reagent murah dan dapat digunakan dalam waktu yang cukup lama
- Spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi (<1pg/ml).
- Tidak ada efek radiasi pada setiap langkah dari proses penggerjaan
- Mudah digunakan dan prosedurnya cepat dilakukan
- Peralatan penggerjaan mudah ditemukan
- Dapat digunakan untuk berbagai tujuan analisis
- Dapat digunakan untuk berbagai macam sample: serum, plasma, lisat dari jaringan atau sel kultur, urin, dll



Kekurangan ELISA

- Pengukuran aktivitas enzim pada sebuah sampel sangat dipengaruhi oleh preparasi, level plasma dan serum yang digunakan
- Dalam bentuk kit yang sekarang banyak dijual harga tidak murah
- Spesifik hanya untuk satu tipe antigen atau antibodi
- Kemungkinan terjadinya Negatif dan Positif Palsu



Terimakasih

LOCALLY ROOTED, GLOBALLY RESPECTED