

PENGUNAAN POLYMERASE CHAIN REACTION ENZYME LINKED OLIGONUCLEOTIDE SORBENT ASSAY (PCR-ELOSA) UNTUK DETEKSI AGEN PENYAKIT

SIMSON TARIGAN

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Makalah diterima 30 Desember 2010 – 14 Maret 2011)

ABSTRAK

Alat diagnostik merupakan salah satu komponen vital dalam usaha pengendalian penyakit menular. Salah satu teknik yang paling banyak dipakai dalam diagnosis penyakit menular saat ini adalah PCR (*Polymerase chain reaction*) karena teknik ini sangat sensitif, spesifik dan cepat. Teknik ini membutuhkan teknik lain untuk mengkonfirmasi terbentuknya reaksi amplifikasi yang tepat. Elektroforesis agarose adalah teknik yang paling umum digunakan untuk memvisualisasi hasil PCR atau amplicon. *Enzyme linked oligonucleotide sorbent assay* (ELOSAs) adalah teknik alternatif yang lebih sensitif dan memberikan identitas amplicon lebih penting. Teknik ini lebih sensitif sampai kira-kira seratus kali dan lebih spesifik karena konfirmasi amplicon dilakukan dengan cara hibridisasi DNA. Kemampuan deteksi ELOSAs bahkan dapat dikembangkan sampai tingkat subtype dari suatu agen penyakit atau mendeteksi terjadinya mutasi pada suatu lokasi dalam suatu gen. Disamping itu, karena peralatan untuk pelaksanaan ELOSAs sama dengan ELISAs, sampel dalam jumlah yang banyak dapat dikerjakan dalam waktu yang singkat. Sama seperti ELISAs, ELOSAs juga sangat fleksibel sehingga dapat dilakukan berbagai variasi atau format. Imobilisasi nukleotida pada permukaan *microwell* dapat dilakukan secara adsorpsi pasif, nukleotida terlebih dahulu dikonjugasikan dengan biotin lalu diimobilisasi pada *streptavidin-coated microwell plate*, atau diimobilisasi dengan ikatan kovalen. Pelaksanaan PCR dan ELOSAs dapat dilakukan pada wadah yang terpisah tetapi dapat juga pada wadah yang sama dengan cara mengimobilisasi primer PCR terlebih dahulu pada permukaan cawan.

Kata kunci: Amplicon PCR, elektroforesis agarose, imobilisasi oligonukleotida, hibridisasi DNA

ABSTRACT

USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION ENZYME LINKED OLIGONUCLEOTIDE SORBENT ASSAY (PCR-ELOSA) FOR DETECTION OF DISEASE AGENTS

Diagnostic tool comprises one of the vital components in the control of infectious diseases. One of the most common techniques in the diagnosis of infectious disease currently available is the polymerase chain reaction (PCR) because this technique is very sensitive, specific, and rapid. This technique requires an adjunct technique to indicate the formation of the right reaction product. Agarose gel electrophoresis has been the most common technique to visualise the PCR product or amplicon. Enzyme linked oligonucleotide sorbent assay (ELOSAs) is an alternative technique which is more sensitive and gives more important identity of the amplicon. This technique can be more than 100 times as sensitive as a gel agarose electrophoresis, and very specific since confirmation of the amplicon is carried out by DNA hybridisation. The capacity of the ELOSAs can also be extended to the detection of disease-causal agent at subtype level, or detection of mutation at particular location in a gene. Since the equipment used for ELOSAs is similar to that for ELISAs (*enzyme linked immunosorbent assay*), a large number of samples can be accomplished rapidly. As in ELISAs, a number of variation can be made in ELOSAs depend on the requirement. Nucleotide can be immobilised on the microwell plate either by passive adsorption, by first conjugation of nucleotide with biotin then immobilisation on streptavidin-coated microwell plate, or immobilisation by covalent bonding. The PCR and ELOSAs can be performed at separate or in a single tube by first immobilising the PCR primers on the surface of microwell plates.

Key words: PCR amplicon, agarose electrophoresis, oligonucleotide immobilisation, DNA hybridisation

PENDAHULUAN

Salah satu komponen terpenting dalam usaha pemberantasan atau pengendalian penyakit menular adalah tersedianya alat diagnostik yang dapat diandalkan untuk menunjukkan secara tepat, cepat dan dengan biaya yang dapat dijangkau guna menetapkan

suatu hewan terserang suatu penyakit atau tidak. Tindakan yang tepat dan pada waktu yang tepat hanya dapat dibuat berdasarkan diagnosis yang tepat. Diagnosis yang salah akan diikuti oleh tindakan yang salah pula. Disamping tepat, penetapan diagnosis juga harus dibuat dengan cepat karena keterlambatan akan berakibat penambahan jumlah hewan dan perluasan

wilayah yang terserang penyakit yang akhirnya menambah kerugian ekonomi dan kesulitan pengendalian penyakit. Disamping itu, biaya untuk peneguhan diagnosis juga harus ekonomis. Metode yang terlalu sulit atau alat dan bahan yang terlampau mahal atau sulit diperoleh akan berakibat terlampau jarangnyanya peneguhan diagnosis dilakukan.

Sejak ditemukannya mikroorganisme patogen sebagai penyebab penyakit, standar diagnosis kausalis penyakit menular adalah isolasi kuman penyebab penyakit. Walaupun ini adalah cara yang paling akurat, waktu yang dibutuhkan untuk pengerjaannya sering terlampau lama dan mahal. Untuk itu berbagai cara alternatif telah diusahakan. Secara garis besar cara alternatif untuk mendeteksi agen penyakit dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yakni cara imunologis dan molekuler. *Polymerase chain reaction enzyme link oligonucleotide sorbent assay* (PCR-ELOSA) adalah gabungan dari PCR dan ELISA (*enzyme link immunosorbent assay*) dan merupakan salah satu cara yang sangat sensitif, spesifik dan cepat namun belum banyak digunakan. Tulisan ini bertujuan mengulas prinsip kerja, pemakaian dan modifikasi dari metode tersebut. Hal ini dianggap perlu karena kelihatannya belum ada tinjauan yang berusaha mengupas teknik tersebut.

Sejak PCR ditemukan pada akhir tahun 1980an, teknik ini dipakai secara cepat, intensif dan meluas pada hampir semua cabang ilmu hayati, termasuk mikrobiologi medis dan veteriner (VILJOEN *et al.*, 2005). Sebagai alat diagnosis penyakit menular, PCR secara langsung menempati posisi yang sangat dominan karena kemampuannya mendeteksi secara cepat dan akurat keberadaan agen penyakit walaupun keberadaannya dalam spesimen sangat sedikit. Segmen spesifik nukleotida agen penyakit digandakan jutaan kali oleh PCR sehingga hasil gandaan yang disebut amplicon dapat divisualisasi. Elektroforesis agarose dengan pewarnaan ethidium bromida merupakan cara yang paling banyak dipakai untuk memvisualisasi amplicon tersebut. Limit deteksi cara ini untuk fragmen DNA sepanjang 600 bp adalah $7,72 \times 10^9$ buah atau setara dengan 5 ng. Fragmen sebanyak itu mengisyaratkan bahwa reaksi PCR harus efisien mengamplifikasi *template* dalam sampel (OROSKAR *et al.*, 1996). Kenyataannya, PCR sering tidak efisien disebabkan banyak faktor seperti adanya *inhibitor* pada sampel, primer, enzim polimerase atau reagen yang lain yang kurang optimum.

Disamping itu, deteksi atau identifikasi amplicon dengan elektroforesis gel dirasakan kurang efisien karena lama pengerjaannya dan terbatasnya jumlah sampel yang dapat diperiksa. Disamping itu, kadang kadang hasil PCR dalam gel muncul pita yang tidak berbentuk (*ghost* atau *smear bands*) atau pita yang terlampau banyak sehingga hasilnya sulit

diinterpretasikan (RASMUSSEN *et al.*, 1994). Untuk mengatasi persoalan tersebut berbagai cara alternatif untuk mengidentifikasi amplicon telah diperkenalkan, antara lain teknik *dot blot*, *Southern blot*, *sandwich hybridization*, dan *biotin-streptavidin magnetic bead* (RASMUSSEN, *et al.*, 1994). Diantara teknik deteksi yang paling banyak mendapat perhatian, yang menjadi pokok bahasan tulisan ini, adalah PCR-ELOSA.

Teknik PCR-ELOSA adalah suatu metode untuk mendeteksi suatu segmen nukleotida menggunakan PCR dan ELISA. Amplicon PCR didenaturasi, diimobilisasi pada *microwell plate* lalu diidentifikasi secara hibridisasi DNA dan imunologis (ELISA). Sejumlah istilah telah digunakan untuk teknik tersebut diantaranya PCR and DIG-ELISA detection (CALLENS dan DE CLERCQ, 1999), *ELISA-based oligonucleotide ligation assay* (NICKERSON *et al.*, 1990), *PCR-oligonucleotide ligation assay* (STONE *et al.*, 1995), *DIAPOPS (Detection of immobilised amplified products in one phase system)* (RASMUSSEN *et al.*, 1994).

FORMAT-FORMAT ELOSA

ELOSA dengan T4-DNA ligase

Format ini merupakan format ELOSA yang pertama diperkenalkan, dikembangkan untuk mengidentifikasi individu dengan kelainan genetik pada *sickle cell anemia* dan *cystic fibrosis* (NICKERSON *et al.*, 1990). Pertama, gen atau bagian dari gen yang ingin dianalisis (*gene* TCR β) diamplifikasi dengan PCR (Gambar 1A). Dua buah oligonuklotide (masing masing sepanjang kurang lebih 20 *base pair*) dengan sekuen yang sama dengan lokasi yang ingin dianalisis pada amplicon, dan yang memiliki *melting temperature* yang sama disintesis secara buatan. Ujung 5' pada oligonukleotida pertama (*capture probe*) dilabel dengan biotin lalu diimobilisasi pada *streptavidin-coated microwell* (Gambar 1B). Oligonukleotida kedua (yang disebut *reporter probe*) dilabel pada ujung 3' dengan digoxigenin (DIG). *Reporter Oligonucleotida*, amplicon PCR (amplicon yang telah didenaturasi) dan T4-DNA ligase ditambahkan (Gambar 1C).

Hibridisasi antara amplicon dengan kedua oligonukleotida (*capture* dan *reporter*) akan terjadi hanya bila sekuen kedua oligonukleotida dan amplicon sama. Perbedaan satu basa saja akan menyebabkan *reporter probe* tidak bisa bersambung atau berhibridisasi dengan *capture probe*. Penyambungan kedua *probe* dan hibridisasi dideteksi dengan antibodi terhadap DIG yang dilabel dengan enzyme peroxidase (HRP) (Gambar 1D).

Keunggulan format ini terletak pada sensitivitasnya untuk mendeteksi perbedaan sekuen nukleotida, oleh karena itu sangat cocok digunakan

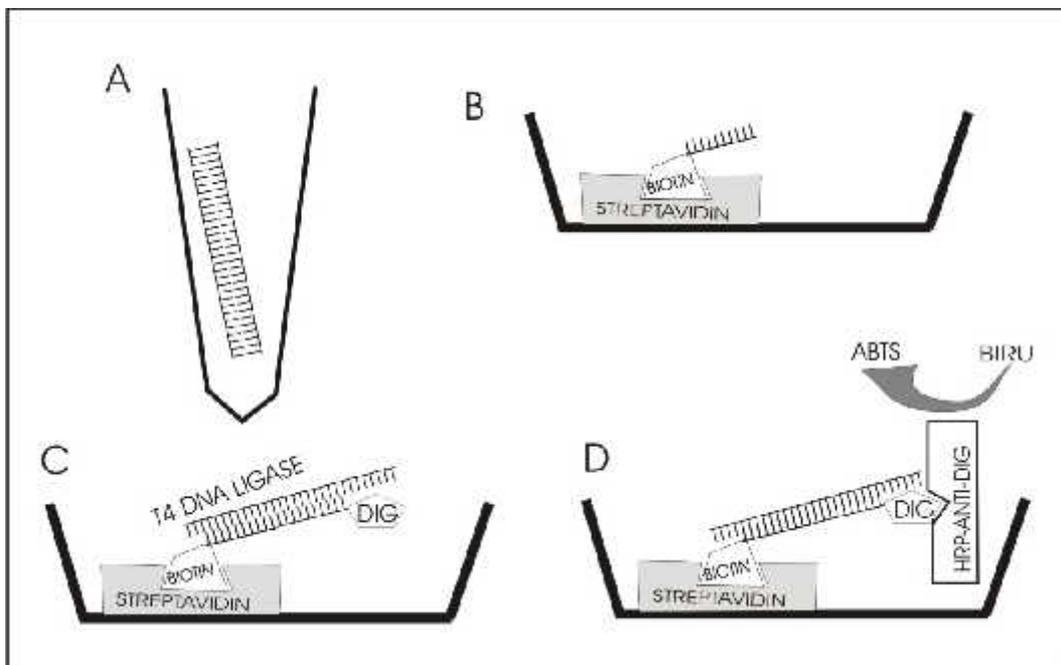
untuk mendeteksi terjadinya mutasi. Terjadinya mutasi yang berakibat resistensi terhadap obat antiviral pada infeksi HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) merupakan masalah yang penting. Format ini telah dibuktikan sangat praktis untuk digunakan untuk mendeteksi mutasi terhadap obat virus kelompok inhibitor protease (amprenavir, nelvinavir, indinavir, saquinavir dan lopinavir) (BECK *et al.*, 2008; BECK *et al.*, 2002). Bahkan sensitivitas ELOSA dengan format ini dilaporkan lebih tinggi (96,7%) jika dibandingkan dengan *consensus sequencing* (92,2%).

Format ini juga telah diaplikasikan untuk mendeteksi secara cepat bakteri *Salmonella* sampai level serovar (STONE *et al.*, 1995) dan *Cyclospora sp* (protozoa zoonosis) (XIAO *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil pengujian terhadap sejumlah sampel yang terdiri dari 28 serovar *Salmonella*, 25 spesies bakteri lain yang bukan *Salmonella*, dan 102 sampel klinik yang dicurigai bakteri *Salmonella* disimpulkan bahwa tes ini memiliki sensitivitas 100% dan spesivitas 96,6%. Sedangkan limit deteksinya (untuk *S. typhimurium*) adalah 20 CFU (*colony forming unit*), atau setara dengan 80 fg kromosom DNA. Untuk diagnosis *Cyclospora sp.*, limit deteksinya sekitar 0,5 ng amplicon dan terbukti lebih sensitif dibandingkan dengan PCR-elektroforesis gel agarose (XIAO *et al.*, 2007).

ELOSA dengan amplicon diadsorbsi secara pasif

Format ini jauh lebih sederhana jika dibandingkan dengan format ELOSA dengan DNA ligase, diperkenalkan pada waktu yang hampir bersamaan (INOUE dan HONDO, 1990). Pelaksanaan uji secara ringkas adalah sebagai berikut: amplicon PCR dari sampel (misalnya virus Varicella Zoster) didenaturasi dengan panas kemudian diimmobilisasi ke dalam *microwell plate* dengan cara adsorbsi secara pasif menggunakan pelarut yang mengandung 1,5 M NaCl atau 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Pemakaian pelarut tersebut sangat penting untuk menginduksi adsorbsi atau perlekatan amplicon pada salah satu ujung amplicon saja sehingga memudahkan hibridisasi dengan *probe*. *Probe* yang digunakan adalah sama dengan amplicon yang tetapi telah dikonjugasikan dengan biotin (proses konjugasi dilakukan dengan PCR) lalu didenaturasi dengan panas (biasanya antara $55^\circ - 70^\circ\text{C}$). Terbentuknya hibridisasi dideteksi dengan penambahan konjugat streptavidin-HRP atau streptavidin β -galaktisidase. Sekalipun sederhana, format ini dilaporkan memiliki sensitivitas yang tinggi (INOUE dan HONDO, 1990).

Amplicon dari PCR terhadap sampel klinik Varicella Zoster dilaporkan dapat dideteksi bahkan



Gambar 1. ELOSA dengan T4 DNA ligase. (A) Gen atau fragmen DNA yang ingin dianalisis diamplifikasi dengan PCR (B). *Capture oligonukleotida* yang dikonjugasikan dengan biotin pada ujung 5' diimmobilisasi pada *streptavidin-coated microwell* (C). Amplicon (yang sebelumnya telah didenaturasi), *reporter oligonukleotida* dikonjugasikan dengan DIG pada ujung 3' nya, dan T4 DNA ligase ditambahkan (D). Menyambungkannya kedua oligonukleotida dan hibridisasi keduanya dengan amplicon (terjadi kalau sekuen oligonukleotida persis cocok dengan amplicon) dideteksi dengan konjugat HRP-anti-DIG.

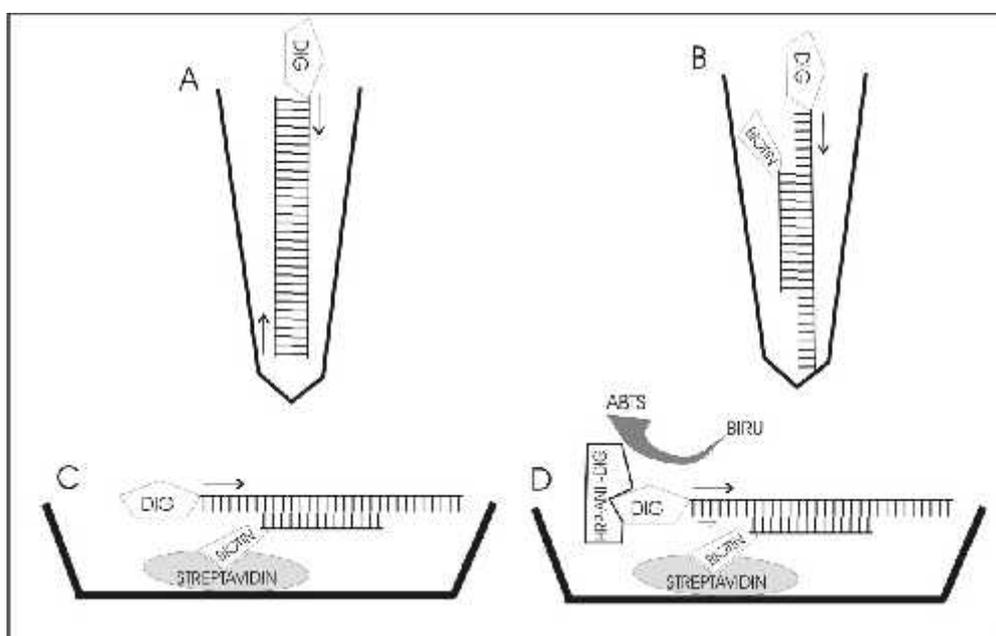
setelah diencerkan 1 : 100 000. Disamping sensitif, spesifitasnya juga tinggi, karena uji ini mampu membedakan virus Herpes Simplex dengan virus lain yang memiliki kekerabatan genetik dekat dengan virus Herpes Simplex. Format ini juga telah dilaporkan dapat dipakai untuk mendeteksi virus Polio sampai tingkat *strain*, seperti membedakan virus Polio *strain* lapang (*wild strain*) dengan *strain* vaksin (Sabin) (TAKEDA, *et al.*, 1994). Untuk pelaksanaannya, primer PCR yang dipakai didisain sedemikian rupa sehingga mampu mengamplifikasi semua virus Polio. Perbedaan virus lapang dengan virus Sabin terletak pada perbedaan tingkat 'stringensi hibridisasi' (*hybridisation stringency*). Pada kondisi hibridisasi stringensi tinggi hanya virus vaksin Sabin yang memberikan hasil positif. Walaupun format ini adalah format yang paling sederhana dan dilaporkan sensitif dan spesifik namun pemakaiannya kelihatannya tidak meluas. Kemungkinan untuk penyakit yang lain format ini tidak memberikan hasil yang konsisten. Ketidak konsistenan hasil kemungkinan akibat imobilisasi amplicon dengan cara adsorpsi yang dipakai dalam format ini kurang stabil.

ELOSA dengan hibridisasi SNAP

Untuk mempercepat proses hibridisasi pada ELOSA diperkenalkan hibridisasi SNAP (*simple and aqueous phase*) (ALEXANDERSEN *et al.*, 2000). Format ini mula-mula dikembangkan untuk diagnosis penyakit

mulut dan kuku (PMK). Secara ringkas pelaksanaan uji adalah sebagai berikut: pertama, nuklotida pada posisi 790 – 1044 (*conserved* untuk spesies virus PMK) dan posisi spesifik untuk masing masing serotipe diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer *upstream* PCR yang dilabel dengan DIG (Gambar 2A). Kedua, *probe internal oligonukleotida* untuk amplicon spesies dan serotipe disintesa secara kimiawi dan dilabel dengan biotin. Ketiga, *probe* dan amplicon dihibridisasikan dengan SNAP hibridisasi, yakni dipanaskan pada suhu 95°C selama 5 menit lalu didinginkan pada suhu *annealing* (Gambar 2B). Hibridisasi ini dilakukan pada mesin PCR. Keempat, produk hibridisasi SNAP diadsorbsikan kedalam *streptavidin-coated microwell plate* diikuti dengan penambahan konjugat HRP anti DIG dan substrat (Gambar 2C, D).

Hibridisasi dengan sistem SNAP membutuhkan waktu yang sangat singkat (beberapa menit), dibandingkan dengan hibridisasi pada ELOSA format lain yang membutuhkan waktu sekitar 3 jam. Format ini juga dilaporkan sangat spesifik dan sensitif untuk virus penyakit PMK. Sensitivitasnya sekitar 0,2 TCID₅₀, seratus kali lipat lebih sensitif dibandingkan dengan RT-PCR elektroforesis agarose (ALEXANDERSEN *et al.*, 2000). Disamping sensitif, kemampuan format ini sampai pada penentuan serotipe virus PMK sehingga menjadikannya uji ini sangat bermanfaat.



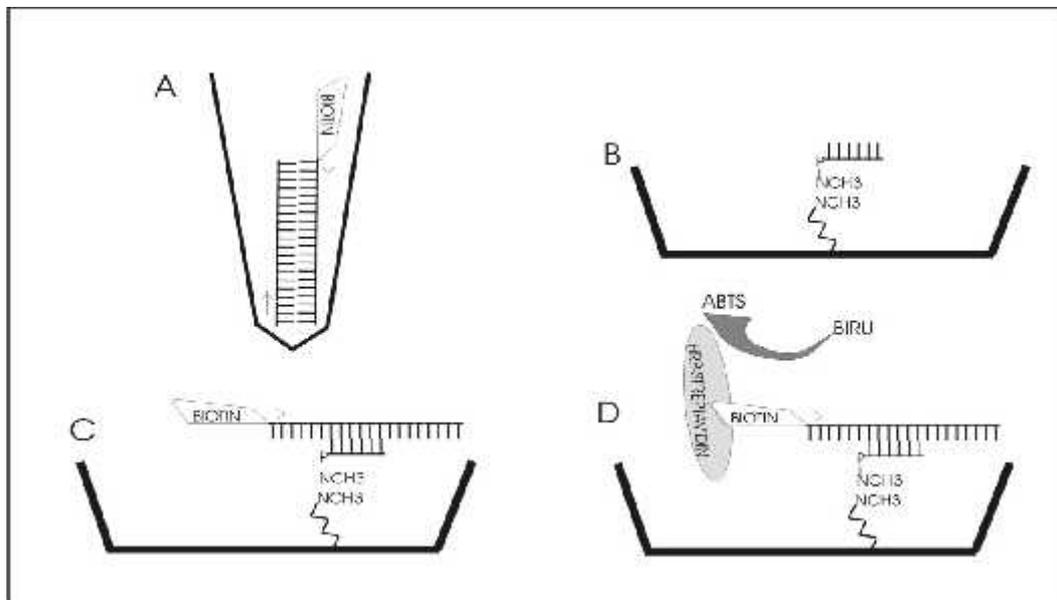
Gambar 2. ELOSA dengan hibridisasi SNAP. (A) Amplifikasi fragmen DNA dengan PCR menggunakan primer yang dikonjugasikan dengan DIG; (B) Hibridisasi SNAP antara amplicon dengan *probe* oligonukleotida yang dikonjugasikan dengan biotin; (C) Imobilisasi hibrid amplicon dengan *probe* oligonukleotida pada *streptavidin-coated microwell*; (D) Deteksi DIG dengan konjugat HRP-anti-DIG

ELOSA dengan *Probe* Berikatan Kovalen

Ikatan nukleotide dengan permukaan cawan ELISA pada semua format ELOSA di atas adalah ikatan non kovalen. Ikatan non kovalen kekuatannya beragam dan sering tidak cukup kuat untuk bertahan saat hibridisasi pada kondisi yang keras seperti temperatur atau konsentrasi NaOH yang tinggi. Imobilisasi DNA pada permukaan polystyrene cawan ELISA dengan ikatan kovalen telah diuraikan dengan cukup mendalam (LUND *et al.*, 1988, RASMUSSEN *et al.*, 1991). Gugus amino beserta lengan atau *spacer arm* dicangkokkan di atas permukaan polystyrene. Nukleotida (DNA) yang sebelumnya telah difosforilisasi akan membentuk ikatan kovalen (*phosphoramidate bond*) antara atom P (pada ujung 5' molekul DNA) dengan gugus amino tersebut melalui proses kondensasi dengan *carbodiimide* (RASMUSSEN *et al.*, 1991). Bentuk imobilisasi seperti ini selain imobilisasinya stabil karena ikatan kovalen, adanya *spacer arm* dan ikatan kovalen yang terbentuk hanya pada ujung 5' menyebabkan proses hibridisasi menjadi sangat efisien. Cawan mikro ELISA yang mengandung gugus amino plus *spacer arm* telah tersedia secara komersial seperti CovaLink™NH (Nunc, Denmark). Jumlah DNA yang dapat diikat oleh *plate* ini dilaporkan cukup banyak, yakni 25 – 30 ng/well (RASMUSSEN *et al.*, 1991). Sekitar 95% dari DNA tersebut diimobilisasi dengan ikatan kovalen, dan 85%

dari ikatan kovalen tersebut terjadi antara P (pada ujung 5' molekul DNA) dengan gugus amino (RASMUSSEN *et al.*, 1991).

Penggunaan ELOSA format ini telah dilaporkan memiliki sensitivitas yang tinggi untuk virus Avian Influenza, yakni sekitar 100 kali lebih sensitif dibandingkan dengan PCR-elektroforesis agarose atau setara dengan virus inokulasi pada telur berembrio (MUNCH *et al.*, 2001). Nukleotida yang menjadi target deteksi adalah gen nukleoprotein. Posisi 288 – 506 pada gen tersebut diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer yang dilabel dengan biotin (Gambar 3A). *Probe* oligonukleotida yang sekuennya sama dengan posisi 403 – 428 (amplikon internal) difosforilisasi lalu diimobilisasi pada cawan dengan kondensasi *carbodiimide* untuk membentuk ikatan kovalen (Gambar 3B). Amplikon PCR didenaturasi lalu dihibridisasikan dengan *probe* (Gambar 3C). Terbentuknya hibridisasi lalu dideteksi dengan konjugat HRP-streptavidin (Gambar 3D). Penelitian ini diperkuat oleh penelitian berikutnya yang mengembangkan ELOSA dengan format dan target gen yang sama tetapi dengan posisi amplifikasi yang berbeda (DYBKAER *et al.*, 2004). Berdasarkan pemeriksaan sampel dalam jumlah yang cukup besar (1040 spesimen dari ayam) diperoleh sensitivitas 91% dan spesifitas 98% terhadap *golden standard*, inokulasi pada telur berembrio.



Gambar 3. ELOSA dengan *probe* dengan oligonukleotida berikatan kovalen dengan *microwell*. (A) Amplifikasi fragmen DNA dengan PCR menggunakan primer yang dikonjugasikan dengan biotin; (B) Fosforilisasi *probe* oligonukleotida lalu dikondensasikan menggunakan carbodiimide pada CovaLink™ *microwell*; (C) Hibridisasi amplikon PCR dengan *probe* oligonukleotida di dalam CovaLink™ *microwell*; (D) Deteksi dengan HRP-Streptavidin

DIAPOPS

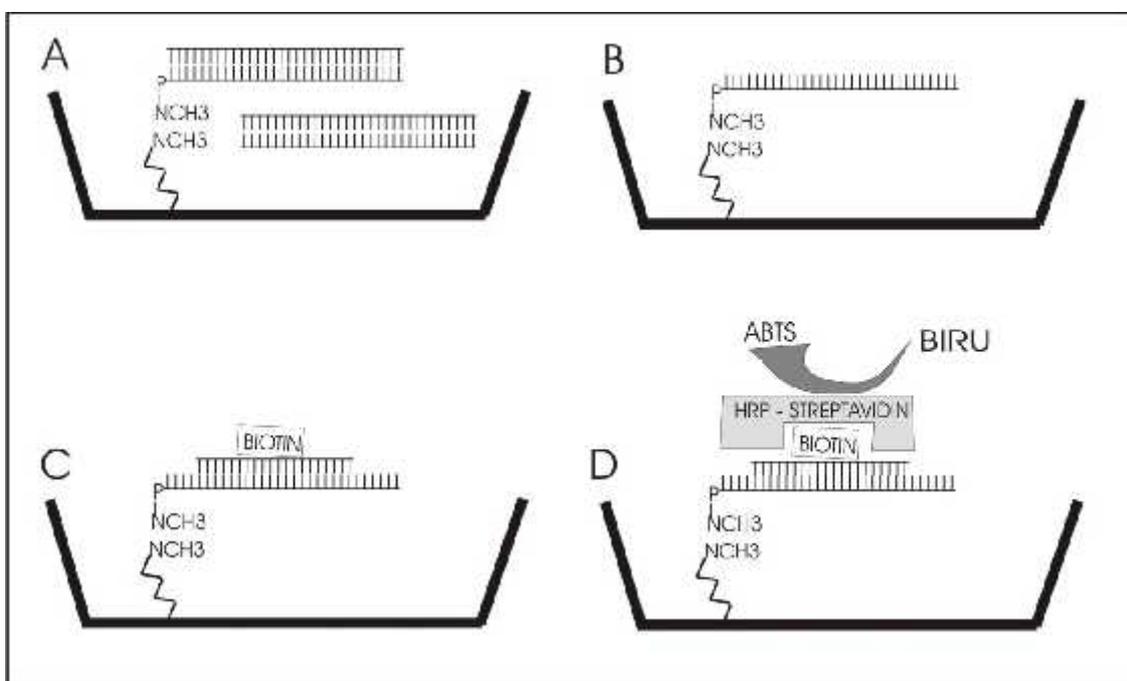
Teknik DIAPOPS (*Detection of immobilised amplified products in one phase system*) merupakan format PCR ELOSA yang paling praktis karena pelaksanaan amplifikasi PCR, hibridisasi dan deteksi amplikon dilakukan pada tabung atau cawan yang sama. Disamping praktis, pelaksanaan semua proses dalam satu tabung (satu fase) juga mengurangi kemungkinan kontaminasi yang sering menjadi masalah besar dalam PCR (RASMUSSEN *et al.*, 1994). Hal yang membuat dimungkinkannya pelaksanaannya menjadi satu fase adalah karena primer PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA sebelumnya sudah diimmobilisasi dalam *microwell plate* dengan ikatan kovalen. Oleh karena itu amplikon yang terbentuk tertahan dalam cawan.

Secara ringkas pelaksanaan DIAPOPS, seperti yang dijelaskan oleh RASMUSSEN *et al.* (1994), adalah sebagai berikut: mula-mula, salah satu primer (*forward* atau *reverse*) diimmobilisasi kovalen dengan kondensasi *carbodiimide* pada *microwell plate*. Penentuan primer mana yang diimmobilisasi (apakah yang *forward* atau *reverse*) tergantung pada *probe* oligonukleotida yang dipakai. Amplifikasi DNA dengan PCR pada DIAPOPS dilakukan secara asimetri, yakni PCR dengan primer *forward* dan *reverse* yang tidak *equimolar*. Artinya, bila primer yang diimmobilisasi

adalah yang *forward*, primer *forward* yang ditambahkan kedalam reaksi PCR jumlahnya hanya 1/8 dari primer *reverse*.

Tujuan dari penambahan primer *forward* jauh lebih sedikit yaitu supaya reaksi amplifikasi condong menggunakan primer *forward* fase solid sehingga sebagian besar amplikon juga menjadi fase solid atau terikat secara kovalen pada cawan (Gambar 4A). Setelah amplifikasi PCR selesai, amplikon didenaturasi lalu dicuci sehingga yang tertinggal hanya amplikon fase solid dalam kondisi *single stranded* (Gambar 4B). Setelah itu, amplikon *single stranded* tersebut dihibridisasikan dengan *probe* oligonukleotida yang berlabel biotin, lalu dideteksi dengan HRP-streptavidin (Gambar 4C dan 4D).

Teknik tersebut pertama diuji cobakan terhadap virus *Bovine Leukemia* dan bakteri *Salmonella* (RASMUSSEN *et al.*, 1994). Primer yang diimmobilisasi untuk virus *Bovine Leukemia* adalah primer *forward* sedangkan untuk bakteri *Salmonella* adalah yang *reverse*. Spesifitas uji untuk kedua penyakit dilaporkan sangat tinggi namun sensitivitasnya dilaporkan relatif rendah dibandingkan dengan PCR-elektroforesis gel agarose, limit deteksinya hanya sekitar 1000 molekul *template*. Walaupun demikian, spesifitasnya sangat tinggi dan waktu yang dibutuhkan untuk pelaksanaan test sangat cepat yakni kurang dari 3 jam (RASMUSSEN *et al.*, 1994).



Gambar 4. Gambar skematik tahapan DIAPOPS. (A) PCR amplifikasi asimetri; (B) Denaturasi amplikon fase solid; (C) Hibridisasi amplikon dengan oligonukleotida biotinisasi; (D) Deteksi dengan HRP-streptavidin

KESIMPULAN

Pemakaian ELOSA sebagai alat deteksi dan identifikasi hasil amplifikasi fragmen DNA oleh PCR memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan elektroforesis gel agarose. Identifikasi ampikon dengan elektroforesis agarose mengisyaratkan reaksi amplifikasi yang optimum sehingga jumlah ampikon cukup banyak untuk dilihat pada gel agarose setelah diwarnai dengan ethidium bromida, dan tidak terlampau banyak kontaminan hasil ikutan yang dapat mengaburkan ampikon spesifik. Peralatan yang dipakai untuk ELISA seperti alat pencuci cawan mikro, pipet dan sebagainya juga dapat dipakai untuk ELOSA sehingga lebih efisien jika dibandingkan dengan elektroforesis agarose. Identitas ampikon yang diperoleh dari elektroforesis agarose hanya berupa berat molekul ampikon, sedangkan ELOSA dapat memberikan data data sekuen sebagian dari ampikon tersebut. Teknik ELOSA dapat dikembangkan untuk mendeteksi suatu agen penyakit sampai pada level sub spesies atau subtype, dan dapat dipakai untuk mendeteksi terjadinya mutasi pada lokasi tertentu pada suatu gen. Oleh karena itu, PCR-ELOSA mempunyai potensi yang sangat besar dalam penetapan diagnosis penyakit.

DAFTAR PUSTAKA

- ALEXANDERSEN, S., M.A. FORSYTH, S.M. REID and G.J. BELSHAM. 2000. Development of reverse transcription-PCR (oligonucleotide probing) enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis and preliminary typing of foot-and-mouth disease: a new system using simple and aqueous-phase hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4604 – 4613.
- BECK, I.A., C. CREWELL, R. KITTOE, H. BREDELL, M. MACHABA, C. WILLIAMSON, W. JANSSENS, S. JALLOW, G. VAN BER GROEN and E. AL. 2008. Optimization of the oligonucleotide ligation assay, a rapid and inexpensive test for detection of HIV-1 drug resistance mutations, for non-North American variants. *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.* 48: 418 – 427.
- BECK, I.A., M. MAHALANABIS, G. PEPPER, A. WRIGHT, S. HAMILTON, E. LANGSTONE and L.M. FRENKEL. 2002. An oligonucleotide ligation assay proved highly sensitive for the detection of mutations in HIV-1 associated with high-level resistance to protease inhibitors. <http://retroconference.org/2002/Posters/13163.pdf> (4 Januari 2011).
- CALLENS, M. and K. DE CLERCQ. 1999. Highly sensitive detection of swine vesicular disease virus based on a single tube RT-PCR system and DIG-ELISA detection. *J. Virol. Methods* 77: 87 – 99.
- DYBKAER, K., M. MUNCH, K.J. HANDBERG and P.H. JORGENSEN. 2004. Application and evaluation of RT-PCR-ELISA for the nucleoprotein and RT-PCR for detection of low-pathogenic H5 and H7 subtypes of Avian Influenza virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 51 – 56.
- INOUE, S. and R. HONDO. 1990. Microplate hybridization of amplified viral DNA segment. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1469 – 1472.
- LUND, V., R. SCHMID, D. RICKWOOD and E. HORNES. 1988. Assessment of methods for covalent binding of nucleic acids to magnetic beads, dynabeads, and the characteristics of the bound nucleic acids in hybridization reactions. *Nucleic. Acids Res.* 16: 10861 – 10880.
- MUNCH, M., L.P. NIELSEN, K.J. HANDBERG and P.H. JORGENSEN. 2001. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch. Virol.* 146: 87 – 97.
- NICKERSON, D.A., R. KAISER, S. LAPPIN, J. STEWART, L. HOOD and U. LANDEGREN. 1990. Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 8923 – 8927.
- OROSKAR, A.A., S.E. RASMUSSEN, H.N. RASMUSSEN, S.R. RASMUSSEN, B.M. SULLIVAN and A. JOHANSSON. 1996. Detection of immobilized amplicons by ELISA-like techniques. *Clin. Chem.* 42: 1547 – 1555.
- RASMUSSEN, S.R., M.R. LARSEN and S.E. RASMUSSEN. 1991. Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: The molecules are only bound at the 5' end. *Anal. Biochem.* 198: 138 – 142.
- RASMUSSEN, S.R., H.B. RASMUSSEN, M.R. LARSEN, R. HOFF-JORGENSEN and R.J. CANO. 1994. Combined polymerase chain reaction-hybridization microplate assay used to detect bovine leukemia virus and Salmonella. *Clin. Chem.* 40: 200 – 205.
- STONE, G.G., R.D. OBERST, M.P. HAYS, S. MCVEY and M.M. CHENGAPPA. 1995. Combined PCR-oligonucleotide ligation assay for rapid detection of Salmonella serovars. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2888 – 2893.
- TAKEDA, N., K. SAKAE, M. AGBOATWALLA, S. ISOMURA, R. HONDO and S. INOUE. 1994. Differentiation between wild and vaccine-derived strains of poliovirus by stringent microplate hybridization of PCR products. *J. Clin. Microbiol.* 32: 202 – 204.
- VILJOEN, G.J., L.H. NEL and J.R. CROWTHER. 2005. Molecular diagnostic PCR handbook. IAEA-Springer.
- XIAO, S.M., G.Q. LI, R.Q. ZHOU, W.H. LI and J.W. YANG. 2007. Combined PCR-oligonucleotide ligation assay for detection of dairy cattle-derived *Cyclospora* sp. *Vet. Parasitol.* 149: 185 – 190.