

## STANDARISASI PENGUJIAN BRUCELLOSIS DENGAN UJI ELISA

Muflihanah<sup>(1)</sup>, Isep Sulaiman<sup>(2)</sup>, Nawaty<sup>(1)</sup>, Rosmiaty<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> BPPV Regional VII Maros

<sup>(2)</sup> BPPV Regional IV Yogyakarta

### ABSTRAK

Telah dilakukan standarisasi pengujian Brucellosis dengan uji ELISA. Analisis hasil dilakukan dengan membandingkan dengan OD target pada pemberian substrat ABTS dengan TMB, EIA (Enzym Immunoassay) Unit, dan membandingkan rata-rata negatif pada pengenceran serum 1 : 200 dan 1 : 500 dengan ABTS substrat.

Hasil yang diperoleh bahwa substrat ABTS pada pengenceran serum sampel, kontrol positif dan kontrol negatif 1 : 500 dan dibaca pada ELISA Reader dengan filter 414 nm didapatkan hasil sesuai dengan OD target.

### I. PENDAHULUAN

Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan salah satu uji serologis yang saat ini banyak dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Dalam diagnosis penyakit infeksi, ELISA dapat diarahkan untuk mendeteksi adanya antigen (virus, bakteri, parasit atau jamur) atau terhadap antibodinya. Demikian pula pada penyakit non infeksi, ELISA dapat digunakan untuk evaluasi program vaksinasi, memonitor hormon, obat-obatan, antibiotika, toksin, pestisida, komponen serum, protein onkofetal, sitokin ataupun penyakit-penyakit autoimun (Suwarno, dkk, 2003). Salah satu tujuan ELISA adalah sebagai uji konfirmasi untuk Brucellosis.

Sejak diperkenalkan pada tahun 1971, ELISA telah mengalami banyak perkembangan sesuai dengan tujuan asalnya. Pada dasarnya ELISA dapat dibagi menjadi 3 (tiga) jenis menurut komponen yang dilabel enzim, yakni pelabelan pada antibodi (Ab), antigen (Ag) atau anti-immunoglobulin (Anti-Ig).

Pada ELISA Brucellosis digunakan *Indirect ELISA* yang mana antigen Brucella ditempelkan pada dinding lubang plate, kemudian diikuti penambahan serum. Setiap antibodi yang spesifik akan bereaksi dengan antigen, dan *rabbit anti-bovine conjugated to horseradish peroxidase* sewaktu ditambahkan akan bereaksi dengan antibodi. Sebagai indikator warna, ditambahkan substrat dan setelah bereaksi akan timbul warna dalam waktu tertentu. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan Elisa Reader.

## II. MATERI DAN METODA

Sampel serum untuk pengujian diencerkan 1:200 dan 1:500 dengan PBST, juga kontrol serum positif dan kontrol serum negatif. Kontrol positif diencerkan mulai 1: 2000 sebagai kontrol *strong positive* (positif kuat), 1: 4000, 1: 8000, 1: 16.000 sebagai kontrol *weak positive* (positif lemah), 1: 32.000, 1: 64.000 sebagai *Cut of Value* (rata-rata kontrol negatif) dan 1: 128.000.

Antigen yang digunakan dengan pengenceran 1: 3000 dengan coating 1 (satu) jam, conjugate dengan pengenceran 1: 1000, sedangkan substrat yang digunakan adalah ABTS untuk serum dengan pengenceran 1: 500 kemudian dibaca pada filter 414 nm dan TMB untuk serum pengenceran 1: 200 dengan pembacaan pada filter 450 nm. Hasil diperoleh dengan menghitung :

EIA (Enzyme Immunoassay) Unit =

$$\frac{\text{OD Sampel yang terbaca} - \text{Rata-Rata OD Negatif}}{\text{OD Rata-Rata OD Strong Positif} - \text{Rata-Rata OD Negatif}} \times 100/1$$

Sampel dikatakan positif jika diperoleh hasil lebih atau sama dengan 20 EIA Unit, dengan target OD *strong positive*  $\pm 1,20$  dan *weak positive*  $\pm 0,40$  dan OD negatif  $\pm 0,2$ .

Analisis hasil dengan membandingkan OD target pada pemberian substrat ABTS dan TMB, EIA Unit dan membandingkan rata-rata OD negatif pada pengenceran serum 1: 200 dan 1: 500 dengan pemberian ABTS substrat.

Tabel 1. Keterangan sampel pada plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2000	2000	Neg	Tdkong2	7	9	10	11	12	19	20	21
B	4000	4000	Neg									
C	8000	8000	Neg	48	49	50	54	60	66	86	101	102
D	16000	16000	Neg									
E	32000	32000	DB	43	113	Sbpru176	167	168	171	Plcm164	190	191
F	64000	64000	DB									
G	128000	128000	DB	Btg47 BI	68BI	23BI	46BI	67BI	41BI	26BI	33BI	126BI
H	Neg	Neg	DB									

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil uji ELISA diperoleh OD sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif seperti pada tabel berikut :

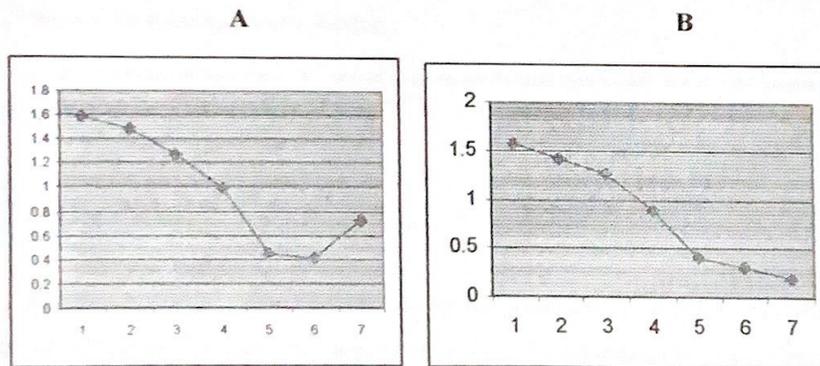


Dari hasil pembacaan pada filter 414 nm dengan pemberian substrat ABTS diperoleh OD *strong positive* (positif kuat) dengan rata-rata 1,515, OD *weak positive* (positif lemah) pada pengenceran 1 : 8000 0,556 dengan EIA Unit 25, rata-rata OD negatif 0,223, sedangkan larutan blanko didapatkan rata-rata 0,117.

Tabel 5. Hasil Pembacaan pada filter 450 dengan TMB Subtrat

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.59	1.565	0.586	1.574	1.744	1.703	1.698	1.638	1.681	1.724	1.686	1.641
B	1.491	1.427	0.679	1.558	1.717	1.654	1.645	1.687	1.662	1.715	1.699	1.627
C	1.265	1.259	0.712	1.713	0.99	1.635	1.768	1.538	1.554	1.659	1.582	1.722
D	0.989	0.887	0.723	1.729	1.007	1.584	1.725	1.546	1.571	1.682	1.66	1.769
E	0.448	0.412	0.222	1.795	1.716	1.561	1.572	1.824	1.828	1.744	1.86	1.838
F	0.412	0.305	0.21	1.815	1.705	1.579	1.605	1.806	1.862	1.82	1.862	1.828
G	0.72	0.203	0.261	1.033	1.032	0.821	1.277	1.41	1.469	1.207	0.975	1.308
H	1.382	0.665	0.306	1.101	1.077	0.747	1.445	1.398	1.461	1.218	0.976	1.353

Grafik 2. Pengenceran Kontrol Positif (A) pada kolom 1 dan (B) pada kolom 2



Tabel 6. Hasil EIA Unit pada filter 450 nm dengan TMB substrat

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	101	98	-26	99	121	116	115	107	113	118	113	108
B	89	80	-14	97	117	109	108	113	110	117	115	106
C	60	59	-10	117	25	107	124	95	97	110	100	118
D	25	12	-8	119	27	100	118	96	99	113	110	124
E	-43	-48	-72	127	117	97	99	131	131	121	136	133
F	-48	-61	-73	130	116	100	103	129	136	130	136	131
G	-9	-74	-67	30	30	3	61	78	86	52	23	65
H	75	-16	-61	39	36	-5	83	77	85	54	23	71

Tabel 7. Interpretasi Hasil (Positif jika EIA Unit  $\geq 20$ )

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pos	Pos	Neg	Pos								
B	Pos	Pos	Neg	Pos								
C	Pos	Pos	Neg	Pos								
D	Pos	Neg	Neg	Pos								
E	Neg	Neg	Neg	Pos								
F	Neg	Neg	Neg	Pos								
G	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
H	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

Dari hasil pembacaan pada filter 450 nm dengan pemberian substrat TMB diperoleh OD *strong positive* (positif kuat) dengan rata-rata 1,577, OD *weak positive* (positif lemah) 1,260 pada pengenceran 1 : 8000 dengan EIA Unit rata-rata 59, rata-rata OD negatif 0,791, sedangkan larutan blanko didapatkan OD rata-rata 0,249. Pemberian substrat ABTS hasilnya lebih baik dari pemberian TMB. Hal ini terlihat dari OD target yang diperoleh, baik dari kontrol positif, kontrol negatif maupun sampel. Standarisasi dengan menggunakan ABTS substrat dapat juga dibandingkan antara pengenceran 1 : 200 dan 1 : 500 pada serum negatif RBT dan CFT yang diuji ELISA. Dari hasil uji ELISA didapatkan rata-rata OD negative pada pengenceran 1 : 200 dan 1 : 500 masing-masing sebagai berikut :

Tabel 8. Perbandingan Rata-Rata OD Negatif pada Serum Pengenceran 1 : 200 dan 1 : 500 dengan ABTS Substrat pada Pembacaan filter 414 nm

Pengenceran	Rata-Rata OD Negatif
1 : 200	0,571
1 : 500	0,249

Dalam Alton *et al*, 1988, disebutkan bahwa pada pemberian ABTS substrat target OD kontrol negatif adalah 0,2, jadi pengenceran serum 1 : 500 digunakan ABTS substrat dan dibaca pada filter 414 nm.

#### IV. KESIMPULAN

Dari hasil pengujian ELISA didapatkan bahwa penggunaan substrat ABTS pada pengenceran serum sampel, kontrol positif dan kontrol negatif 1 : 500 dan dibaca pada ELISA Reader dengan filter 414 nm, diperoleh hasil sesuai dengan target OD.

## V. DAFTAR PUSTAKA

- Alton et al. 1988. *Techniques for The Brucellosis Laboratory*. INRA. Paris
- Nielson, Klaus & J. Robert Duncan. 1990. *Animal Brucellosis*. CRC Press. Boston.
- Tizard, Ian. 1988. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Suwarno, dkk. 2003. *Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil uji ELISA*. Laboratorium Virologi dan Immunologi FKH. Unair. Surabaya.