

## **Variasi Waktu Pembacaan Setelah *Stop Solution* Terhadap Nilai Absorbansi Anti Hbs Metode Elisa**

**Fithrah Hudaini<sup>1</sup>, Budi Santosa<sup>2</sup>, Aprilia Indra Kartika<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Mahasiswa DIV Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

<sup>2</sup>Dosen Magister Sains Laboratorium Klinik/Medik Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

---

### **Article Info**

#### **Article history:**

Received, Mei 31<sup>th</sup>, 2020

Revised, Sep 15<sup>th</sup>, 2020

Accepted, Sep 17<sup>th</sup>, 2020

---

#### **Keywords:**

Hepatitis B  
Anti HBs  
ELISA  
Stop Soluton

### **ABSTRACT**

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is a biochemical technique used in the field of immunology to presence detection of antibodies or antigens in a sample. After providing a stop solution, it is necessary to know the right time for the absorbance reading. The purpose of this study was to determine the anti HBs titer with absorbance reading time variation (immediate, 30 minutes and 60 minutes). This research is an experimental study. The study population was D4 Health Analyst University Student Muhammadiyah Semarang Class 2018 after hepatitis B vaccination as many as 20. To know the difference in variation during the reading, Kruskal-Wallis test was conducted. The results showed the average absorbance at an immediate reading, 30, and 60 minutes complete in complete 1,931, 1,489, 1,276. Kruskal-Wallis statistical analysis obtained a p value of 0.00. The conclusion is obtained between the variation of absorbance reading time on the ELISA method

*Copyright © Jurnal Analis Medika Biosains (JAMBS)  
All rights reserved*

---

### **ABSTRAK**

*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) adalah suatu teknik biokimia yang digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Setelah pemberian *stop solution*, perlu diketahui waktu yang tepat untuk pembacaan absorbansi. Tujuan penelitian untuk mengetahui titer anti HBs dengan variasi waktu pembacaan absorbansi (segera, 30 menit dan 60 menit). Penelitian ini merupakan studi eksperimental. Populasi penelitian adalah mahasiswa D4 Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang Angkatan 2018 *post* vaksinasi hepatitis B sebanyak 20. Analisa yang dignakan untuk mengetahui perbedaan variasi waktu pembacaan dilakukan uji *Kruskal-Wallis*. Hasil penelitian menunjukkan rerata absorbansi pada pembacaan segera, 30, dan 60 menit secara berturut-turut 1.931, 1.489, 1.276. Analisis statistik *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai p value 0,00. Kesimpulan didapatkan perbedaan bermakna antara variasi waktu pembacaan absorbansi pada metode ELISA

Kata Kunci : Bepatitis B.Anti HBs, ELISA, Stop Solution

### **Pendahuluan**

Hepatitis adalah peradangan atau infeksi pada sel-sel hati. Penyakit Hepatitis B disebabkan oleh virus Hepatitis B yang bersifat akut atau kronik dan termasuk penyakit hati yang paling berbahaya.(Aini & Susiloningsih, 2013) Anti-HBs merupakan antibodi spesifik untuk HBsAg yang timbul setelah terinfeksi oleh virus Hepatitis B atau setelah vaksinasi Hepatitis B yang bersifat protektif.(Kasih & Hapsari, 2017) Keberhasilan suatu vaksinasi dapat diketahui berdasarkan pengukuran titer antibodi yang terbentuk melalui pemeriksaan laboratorium. (Astuti & Kusumawati, 2014)

ELISA digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi dalam suatu sampel. Prinsip dari pemeriksaan ELISA adalah untuk mendeteksi anti-hbs menggunakan metode antigen *sandwich* ELISA, *strip polistiren microwell* yang telah dilapisi dengan HBsAg rekombinan. Sampel serum atau plasma pasien ditambahkan ke dua domain variabel dari antibodi. Selama inkubasi, *immunocomplex* spesifik yang terbentuk ditangkap pada fase padat. Setelah pencucian untuk menghilangkan sampel dan konjugat HRP yang tidak terikat, larutan kromogen yang mengandung *tetramethylbenzidine* (TBM) dan urea peroksida ditambahkan ke dalam sumur. Pada kompleks "*sandwich*" antigen-antibodi-antigen (HRP), reaksi kromogen tidak berwarna dengan asam sulfat. Jumlah intensitas warna dapat diukur dan sebanding dengan jumlah antibodi yang ditangkap di sumur dan masing-masing sampel. (Suou, 2020)

Pembacaan pada ELISA ada beberapa hal yang perlu diperhatikan antara lain panjang gelombang, waktu pembacaan absorbansi dan ketelitian serta ketepatan dalam pemeriksaan itu sendiri. Pembacaan absorbansi harus dilakukan segera setelah penambahan *Stop Solution*. Pada prosedur Kit WANTAI anti-HBs ELISA (*Quantitative*) dijelaskan pembacaan absorbansi dalam pemeriksaan ELISA ini dibaca dalam waktu 10 menit dengan menggunakan panjang gelombang 450 nm. (Acids & Absorption, 2020)

Inkubasi merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi hasil absorbansi pada pemeriksaan sampel menggunakan ELISA. Pembacaan absorbansi harus dilakukan segera setelah penambahan *Stop Solution*. (Idexx, 2012) Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Andini (2016), (Andini, 2016) dapat dilihat hasil penelitiannya secara deskriptif yang memiliki perbedaan variasi waktu pembacaan absorbansi yang dilakukan 1 menit, 15 menit dan 30 menit, tetapi pada uji statistik tidak ada perbedaan yang bermakna. Hal ini mendorong peneliti untuk melakukan uji variasi waktu pembacaan setelah penambahan stop solution (segera, 30 menit dan 60 menit) terhadap nilai absorbansi dengan metode ELISA sehingga dapat mengetahui ke akuratan dari metode tersebut.

### **Metode Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimen berdasarkan intervensi variasi waktu pembacaan setelah penambahan *stop solution*. Populasi diambil dari mahasiswa D4 Analis Kesehatan *pasca* vaksinasi Hepatitis B. Jumlah Sampel sebanyak 20 diambil secara *consecutive sampling*. Pemeriksaan Anti HBs dilakukan pada sampel (serum) dan WANTAI anti-HBs ELISA (*Quantitative*) (Wantai, n.d.) di Laboratorium Imunologi Universitas Muhammadiyah Semarang pada bulan oktober 2019. Pembacaan absorbansi pada alat *Elisa Reader* setelah penambahan *stop solution* pada waktu segera, 30 menit, dan 60 menit. Perbedaan absorbansi berdasarkan variasi suhu dilakukan dengan uji Kruskal Wallis karena data berdistribusi tidak normal menggunakan SPSS versi.. Sampel penelitian ini diambil dari bank sampel sumsum tulang yang dimiliki oleh laboratorium Patologi Klinik Universitas Muhammadiyah Semarang dan telah mendapatkan ijin dengan nomor 012/L.PK/02/19.

## Hasil Penelitian

Telah dilakukan penelitian tentang variasi waktu pembacaan setelah *stop solution* terhadap nilai absorbansi anti hbs metode elisa. Penelitian ini menggunakan desain *cross sectional* atau potong lintang dan dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Muhammadiyah Semarang.

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah sampel darah mahasiswa D4 Jalur Khusus Analis Kesehatan FIKKES Universitas Muhammadiyah Semarang Angkatan 2018 *post* Vaksinasi Hepatitis B sebanyak 20 orang. Sampel yang digunakan adalah sampel darah vena yang telah dilakukan *centrifugasi*, serum yang telah dipisahkan kedalam *cup* sampel disimpan di dalam *Freezer* bersuhu  $-2^{\circ}\text{c}$ , kemudian dilakukan pemeriksaan dengan metode ELISA

### 1. Rerata Nilai Absorbansi

**Tabel 1.** Rerata hasil nilai absorbansi berdasarkan variasi waktu pembacaan setelah penambahan *stop solution* dengan metode ELISA

Waktu Pembacaan Absorbansi	Hasil Absorbansi		
	Rata-rata (mIU/ml)	Tertinggi (mIU/ml)	Terendah (mIU/ml)
Segera	1.931	2.650	0.015
30 Menit	1.489	2.036	0.012
60 Menit	1.276	1.735	0.008

Tabel menunjukkan nilai absorbansi dengan variasi waktu pembacaan absorbansi pada metode ELISA tertinggi yaitu pada pembacaan *stop solution* segera didapatkan hasil konsentrasi anti-HBs sebesar 2.650 mIU/ml dan terendah yaitu pada pembacaan 60 menit didapatkan hasil konsentrasi anti-HBs sebesar 0.008 mIU/ml.

### 2. Uji Normalitas

**Tabel 2.** Hasil Uji Normalitas Shapiro-Wilk

Nilai (Absorbansi)	Waktu pembacaan	Shapiro-Wilk		
		Statistisc	df	Sig
	Segera	.677	20	.000
	30 Menit	.680	20	.000
	60 Menit	.667	20	.000

Tabel hasil uji normalitas pembacaan absorbansi segera, 30 menit dan 60 menit didapatkan hasil (sig <0.00) data terdistribusi tidak normal

### 3. Uji Kruskal-Wallis

**Tabel 3.** Hasil Uji Kruskal-Wallis

	Nilai (Absorbansi)
Chi-Square	20.359
Df	2
Asymp. Sig.	.000

Tabel hasil analisis statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai probabilitas atau signifikansi pada pembacaan absorbansi segera, 30 menit dan 60 menit yaitu (sig 0,00) sehingga diketahui hasil bahwa ada perbedaan antara variasi waktu pembacaan absorbansi pada metode ELISA

Pembacaan pada *ELISA reader* menunjukkan tiap variasi waktu memiliki absorbansi yang berbeda. Kadar absorbansi menunjukkan adanya perbedaan dalam variasi waktu pembacaan. Hasil analisis statistik juga membuktikan bahwa nilai probabilitas atau signifikansi yaitu (sig 0,00:  $p > 0,05$ ) yang membuktikan bahwa ada perbedaan antara variasi waktu pembacaan absorbansi pada metode ELISA. Hasil penelitian yang didapat menunjukkan adanya variasi waktu pembacaan absorbansi memberikan perubahan terhadap hasil antara perbedaan waktu segera, 30 dan 60 menit yang menandakan bahwa waktu pembacaan absorbansi setelah penambahan stop solution dapat mempengaruhi hasil apabila dilakukan penundaan.

Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Andini (2016),(Andini, 2016) dapat dilihat hasil penelitiannya secara deskriptif yang memiliki perbedaan variasi waktu pembacaan absorbansi yang dilakukan 1 menit, 15 menit dan 30 menit, tetapi pada uji statistik tidak ada perbedaan yang bermakna.

Reagen *stop solution* harus memenuhi dua persyaratan utama: 1) untuk menghentikan reaksi dengan secara efektif menghambat aktivitas enzimatis HRP, 2) untuk menstabilkan produk teroksidasi dari substrat kromogenik atau fluorogenik. Asam yang kuat digunakan sebagai stop reagen untuk menghambat aktivitas enzim peroksidase. Hal ini terutama terjadi ketika 3,3'-5,5' *Tetramethylbenzidine* (TMB) berfungsi sebagai substrat warna dan enzim peroksidase dihambat dengan menyesuaikan pH ke nilai pH 2 atau bahkan lebih rendah. Pada kasus TMB, *stop solution*, asam *sulfuric*, tidak hanya menghambat pengembangan warna tetapi juga mengubah produk oksidasi biru TMB menjadi turunan kuning yang memiliki absorptivitas molar yang lebih tinggi secara signifikan yaitu 450nm (Research Gate.2017). (Evers, 2020) Prosedur kit yang tertera setelah penambahan *stop solution* sebaiknya pembacaan hasil absorbansi dilakukan kurang dari 10 menit agar mendapatkan hasil yang baik dan akurat.

### Kesimpulan

Terdapat perbedaan yang signifikan terhadap nilai absorbansi anti-HBs dengan variasi waktu pembacaan segera, 30 menit, dan 60 menit setelah penambahan *stop solution* metode ELISA

**Daftar Pustaka**

- Acids, S., & Absorption, M. (2020). *ELISA stop solution, What concentration of acid?* 1–7.
- Aini, R., & Susiloningsih, J. (2013). Faktor Resiko yang Berhubungan dengan Kejadian Hepatitis B pada Pondok Pesantren Putri Ibnuul Qoyyim Yogyakarta. *Sains Medika*, 5(1), 30–33.
- Andini, S. T. (2016). Titer Anti-HBS Dengan Variasi Waktu Pembacaan Absorbansi pada ELISA Reader. *Universitas Muhammadiyah Semarang*, 1–46.
- Astuti, H. P., & Kusumawati, E. (2014). Kajian Efektifitas Pemberian Vaksinasi Hepatitis B Terhadap Pembentukan Antibodi Anti HBs. *KesMaDaSka*, 29–34.
- Evers, R. (2020). *ELISA Immunoassay Enzyme Immunoassay Bioassays*. 1–5.
- Idexx. (2012). *ELISA Technical Guide*. April, 30.
- Kasih, T., & Hapsari, R. (2017). Profil Anti-Hbs Sebagai Penanda Kekebalan Terhadap Infeksi Virus Hepatitis B Pada Mahasiswa Kedokteran. *Diponegoro Medical Journal (Jurnal Kedokteran Diponegoro)*, 6(2), 1279–1289.
- Suou, I. (2020). *Why sulfuric acid can act as the stop solution in ELISA?* 1–7.
- Wantai. (n.d.). *the Healthanti-HBs Quantitative (WB-2896).Developing Scientifically Focusing on*.