

PENGEMBANGAN KONJUGAT BIOTIN DAN HORSERADISH PEROXIDASE TERHADAP ANTIBODI MONOKLONAL AMILOID- β_{42} DAN APLIKASI PADA TEKNIK ELISA

NUR RIZKY FIERO



**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Pengembangan Konjugat Biotin dan Horseradish Peroxidase terhadap Antibodi Monoklonal Amiloid- β_{42} dan Aplikasi pada Teknik ELISA” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2025

Nur Rizky Fiero
P0501221006

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RINGKASAN

NUR RIZKY FIERO. Pengembangan Konjugat Biotin dan Horseradish Peroxidase terhadap Antibodi Monoklonal Amiloid- β_{42} dan Aplikasi pada Teknik ELISA. Dibimbing oleh HUDA SALAHUDIN DARUSMAN dan UUS SAEPULOH.

Penyakit alzheimer merupakan salah satu penyebab demensia yang dapat mengakibatkan kehilangan ingatan dan kemunduran kognitif dari seseorang hingga kehilangan kemampuan untuk hidup secara mandiri. Salah satu penyebab dari penyakit ini yaitu penumpukan dari Amyloid- β_{42} ($A\beta_{42}$). Hingga saat ini, belum ada pengobatan yang efektif untuk penyakit alzheimer, tetapi ada beberapa terapi dan pengobatan alternatif yang dapat memperlambat proses dari penyakit Alzheimer, sehingga deteksi secara dini untuk penyakit alzheimer sangat penting untuk mencegah terjadinya penyakit alzheimer. ELISA sering digunakan untuk mendeteksi dari $A\beta_{42}$ dengan menggunakan teknik *Sandwich* ELISA. Teknik ini menggunakan dua antibodi monoklonal yang sama sebagai *Capture Antibody* dan *Detect Antibody* atau *Reporter Antibody*. Horseradish Peroxidase dan Biotin sering digunakan sebagai konjugat untuk Antibodi, kompleks Avidin-HRP akan membantu meningkatkan spesifisitas dari pembacaan ELISA. Penelitian bertujuan mengembangkan pembentukan konjugat antibodi monoklonal terhadap $A\beta_{42}$ menggunakan biotin dan HRP, serta menguji aplikasinya menggunakan Teknik ELISA.

Konjugasi dilakukan dengan menggunakan dua label yaitu HRP secara langsung dan Biotin. Konjugasi dilakukan dengan memanfaatkan reaksi NHS ester dengan amina primer pada antibodi yang membentuk ikatan amida yang stabil dengan antibodi. Hasil dari validasi menggunakan SDS-PAGE menunjukkan pita protein *whole antibody* pada 150 kDa dengan fragmen FaB dan Fc pada 50kDa dan 25 kDa, kedua antibodi yang terkonjugasi menunjukkan bahwa antibodi lebih berat dari kontrol, yang berarti antibodi berhasil terkonjugasikan dengan label HRP dan Biotin. Pita dari label HRP lebih berat dibandingkan dari label Biotin. Hasil kolorimetri menunjukkan adanya perubahan dari warna TMB dari bening menjadi biru, dan berubah menjadi kuning setelah diberi H_2SO_4 , hal ini menunjukkan adanya reaksi enzimatik dari HRP dan TMB, menunjukkan bahwa antibodi berhasil terkonjugasi. Selain itu, %CV juga dihitung dari hasil perhitungan OD. Hasil menunjukkan pada pengenceran 10^{-1} - 10^{-4} dari konjugat HRP dan pengenceran 10^{-1} - 10^{-5} dari konjugat biotin memiliki %CV <5%, yang berarti pembacaan dapat diterima pada konsentrasi tersebut.

Optimasi dilakukan untuk menentukan konsentrasi optimum untuk konjugat yang dipakai. Konsentrasi konjugat divariasikan dengan diencerkan 7 kali. Hasil pembacaan menentukan konsentrasi optimum yang dapat digunakan untuk Biotin yaitu pada pengenceran 10^{-4} sedangkan HRP pada pengenceran 10^{-3} dengan mengikuti %CV yang telah ditentukan. Stabilitas dari konjugat juga ditentukan dengan penyimpanan pada suhu yang sama hingga pembacaan tidak stabil. Hasil menunjukkan bahwa konjugat biotin lebih stabil dibandingkan dengan konjugat HRP.

Penelitian ini menunjukkan bahwa antibodi dapat dan berhasil terkonjugasi dengan label HRP dan Biotin. Perbedaan dari berat molekul dan ukuran dari antibodi pra-konjugasi dengan yang terkonjugasi terlihat dari hasil validasi SDS-PAGE dan kolorimetri. Konsentrasi optimum untuk konjugat HRP dan Biotin



adalah pada pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} . Stabilitas dari konjugat biotin lebih tinggi daripada konjugat HRP pada kondisi penyimpanan 0 °C hingga pembacaan tidak stabil. Penggunaan HRP langsung secara keseluruhan lebih sederhana dibandingkan penggunaan konjugat biotin, akan tetapi biotin memiliki stabilitas ikatan yang sangat kuat serta memiliki sensitivitas yang lebih baik.

Kata kunci: A β_{42} , Antibodi Terkonjugasi, Antibodi, HRP, Biotin, ELISA

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

SUMMARY

NUR RIZKY FIERO Development of Biotin and Horseradish Peroxidase Labelling against Monoclonal Antibody Amyloid- β_{42} and Its Application on ELISA. Supervised by HUDA SALAHUDIN DARUSMAN and UUS SAEPULOH.

Alzheimer's disease is one of the causes of dementia that can lead to memory loss and cognitive decline in a person, to the point of losing the ability to live independently. One of the causes of this disease is the accumulation of Amyloid- β_{42} ($A\beta_{42}$). Currently there is no effective treatment for Alzheimer's disease, but there are several therapies and alternative treatments that can slow down the progression of Alzheimer's disease, so early detection of Alzheimer's disease is very important to prevent its onset. ELISA is often used to detect $A\beta_{42}$ using the Sandwich ELISA technique. This technique uses two identical monoclonal antibodies as the capture antibody and the detect antibody or reporter antibody. Horseradish peroxidase and biotin are often used as conjugates for antibodies, and the avidin-HRP complex helps to increase the specificity of the ELISA reading. The study aims to develop the formation of monoclonal antibody conjugates against $A\beta_{42}$ using biotin and HRP, as well as to test their application using the ELISA.

Conjugation was performed using two labels, namely HRP directly and biotin. Conjugation was performed by utilising the NHS ester reaction with primary amines on the antibody, which formed stable amide bonds with the antibody. The results of validation using SDS-PAGE showed a whole antibody protein band at 150 kDa with Fab and Fc fragments at 50 kDa and 25 kDa. Both conjugated antibodies showed that the antibodies were heavier than the control, which means that the antibodies were successfully conjugated with HRP and Biotin labels. The band from the HRP label was heavier than that from the Biotin label. The colorimetric results showed a change in the colour of TMB from clear to blue, and then to yellow after adding H_2SO_4 , indicating an enzymatic reaction between HRP and TMB, confirming that the antibodies were successfully conjugated. In addition, %CV was also calculated from the OD calculation results. The results showed that at a dilution of 10^{-1} - 10^{-4} of the HRP conjugate and a dilution of 10^{-1} - 10^{-5} of the biotin conjugate, the %CV was <5%, which means that the readings were acceptable at these concentrations.

Optimisation was performed to determine the optimum concentration for the conjugate used. The concentration of the conjugate was varied by diluting it 7 times. The results determined the optimum concentration that could be used for biotin to be at a dilution of 10^{-4} , while for HRP it was at a dilution of 10^{-3} , following the predetermined %CV. The stability of the conjugate was also determined by storing it at the same temperature until the reading became unstable. The results showed that the biotin conjugate was more stable than the HRP conjugate.

This study shows that antibodies can be successfully conjugated with HRP and Biotin labels. The difference in molecular weight and size between pre-conjugated and conjugated antibodies can be seen from the SDS-PAGE and colorimetric validation results. The optimum concentrations for HRP and Biotin conjugates are at dilutions of 10^{-3} and 10^{-4} . The stability of the biotin conjugate is

higher than that of the HRP conjugate under storage conditions of 0°C until the reading becomes unstable. The use of HRP directly is simpler overall than the use of biotin conjugates, but biotin has a very strong bond stability and better sensitivity.

Keywords: $A\beta_{42}$, Conjugated Antibodies, HRP, Biotin, ELISA

Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2025
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

PENGEMBANGAN KONJUGAT BIOTIN DAN HORSERADISH PEROXIDASE TERHADAP ANTIBODI MONOKLONAL AMILOID- β_{42} DAN APLIKASI PADA TEKNIK ELISA

NUR RIZKY FIERO

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk melakukan penelitian
pada Program Magister Bioteknologi
Sekolah Pascasarjana IPB

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Judul Tesis : Pengembangan Konjugat Biotin dan Horseradish Peroxidase terhadap Antibodi Monoklonal Amiloid- β_{42} dan Aplikasi pada Teknik ELISA

Nama : Nur Rizky Fiero

NIM : P0501221006

Disetujui oleh:

Dosen Pembimbing 1:

Prof. Dr. drh. Huda Salahudin Darusman, M.Si



Dosen Pembimbing 2:

Dr. Uus Saepuloh, S.Si, M. Biomed



Diketahui oleh:

Kepala Program Studi Bioteknologi:

Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si

NIP. 1962041919890310



Dekan Sekolah Pascasarjana:

Prof. Dr. Ir. Dodik Ridho Nurrochmat, M.Sc.F.Trop.IPU

NIP. 197003291996081001

Tanggal Ujian: 30 September 2025

Tanggal Lulus: 20 OCT 2025

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala rahmat-Nya sehingga tugas akhir tesis untuk menyelesaikan studi magister Bioteknologi berhasil diselesaikan. Penelitian ini yang dilaksanakan sejak bulan Desember 2023 sampai bulan Desember 2024 ini ialah keteknikan, teknologi, dan perencanaan, dengan judul “Pengembangan Konjugat Biotin dan Horseradish Peroxidase terhadap Antibodi Monoklonal Amiloid- β_{42} dan Aplikasi pada Teknik ELISA” terlaksana dengan baik.

Penulis ucapkan terima kasih kepada para pembimbing, drh. Huda Salahudin Darusman, M.Si, Ph.D dan Dr. Uus Saepuloh, S.Si, M.Biomed yang telah membimbing dalam tugas akhir ini, serta memberikan saran yang banyak. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada moderator kolokium, moderator seminar, moderator ujian tesis, serta penguji luar komisi pembimbing. Penghargaan penulis sampaikan kepada seluruh staf Laboratorium Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) IPB University yang telah mendampingi selama masa penelitian dan pengumpulan data. Disamping itu, apresiasi juga disampaikan kepada Kementerian Keuangan Republik Indonesia yang telah memberikan dukungan berupa pendanaan melalui program Dana Penelitian Kemen-Diktisaintek (Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains, dan Teknologi) (nomor hibah: 06/C3/DT.05.00/PL/2025), karena dukungan tersebut penelitian dapat berjalan dengan baik. Ungkapan rasa terima kasih juga diucapkan untuk keluarga, sahabat, serta rekan-rekan Departemen Bioteknologi IPB Angkatan 59 yang telah memberikan dukungan dalam menyelesaikan tugas akhir ini.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2025

Nur Rizky Fiero

DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR TABEL	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xx
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Proses Amyloid- β Hingga Menjadi Alzheimer	3
2.2 <i>Immunoassay</i> untuk Deteksi Antibodi	3
2.3 Reaksi HRP dengan Substrat	6
2.4 Biotin dan Avidin	7
III METODE PENELITIAN	10
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	10
3.2 Alat dan Bahan	10
3.3 Diagram Alir Penelitian	10
3.4 Prosedur	11
3.4.1 Konjugasi Antibodi	11
3.4.1.1 Konjugasi dengan Label Horseradish Peroxidase	11
3.4.1.2 Konjugasi dengan Label Biotin	11
3.4.2 Karakterisasi dengan SDS-PAGE	11
3.4.3 Karakterisasi Aktivitas Konjugat secara Kolorimetri	12
3.4.4 Optimasi Konsentrasi Konjugat untuk ELISA	12
3.4.5 Stabilitas Konjugat	13
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	14
4.1 Konjugasi dan Karakterisasi Konjugat dengan SDS-PAGE	14
4.2 Aktivitas Konjugat dan Substrat dengan Kolorimetri	15
4.3 Optimasi Konsentrasi Konjugat untuk ELISA	17
4.4 Stabilitas Konjugat	18
V SIMPULAN	20
5.1 Simpulan	20
5.2 Saran	20
DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	26
RIWAYAT HIDUP	29

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR GAMBAR

1	Pembentukan A β dari APP oleh β -secretase dan γ -secretase pada jalur amiloidogenik (Thinakaran dan Koo, 2008).	3
2	Skema ELISA tipe <i>direct</i> (Langsung)	4
3	Skema ELISA tipe <i>indirect</i> (Tidak Langsung)	4
4	Skema ELISA tipe <i>sandwich</i>	5
5	Skema ELISA tipe <i>competitive</i>	5
6	Skema (a) <i>direct</i> dan (b) <i>indirect sandwich</i> ELISA.	6
7	Reaksi TMB dan peroksidase pada ELISA (Mufidah <i>et al.</i> , 2015)	6
8	Struktur kimia dari SureLINK™ <i>Biotin Chromophoric</i> , (1) <i>Biotin Moiety</i> , (2) rantai PEG spacer, (3) <i>Hydrazone Chromophore</i> , (4) <i>Aromatic NHS Ester Leaving Group</i> .	7
9	Struktur kimia dari Dojindo <i>Peroxidase Labelling Kit – NH₂</i> .	8
10	Reaksi dari <i>NHS ester</i> dengan amina primer pada antibodi.	8
11	Biotiniliasi antibodi <i>human-IgG</i> dan <i>goat-IgG</i> melalui amina primer dan <i>sulphydryl groups</i> .	9
12	Diagram alir penelitian pengembangan konjugat biotin dan HRP terhadap antibodi monoklonal amiloid- β_{42} dan aplikasi pada immunoassay.	10
13	Karakterisasi hasil konjugasi menggunakan dengan SDS-PAGE. Pita menunjukkan fragmen dari (A) antibodi pra-konjugasi, (B) antibodi terkonjugasi HRP dan (C) antibodi terkonjugasi Biotin dengan (M) protein ladder.	14
14	Perubahan warna yang terjadi (A) sebelum antibodi yang terkonjugasi direaksikan, (B) setelah bereaksi dengan substrat, dan (C) setelah diberikan H ₂ SO ₄ .	16
15	Kurva konsentrasi konjugat HRP dan Biotin terhadap absorban pembacaan ELISA pada panjang gelombang 450 nm.	18

DAFTAR TABEL

1	Hasil pengukuran OD dari konjugat HRP secara kolorimetri serta perhitungan persentase CV.	16
2	Hasil pengukuran OD dari konjugat Biotin secara kolorimetri serta perhitungan persentase CV.	16
3	Rerata absorban dari pembacaan optimasi konsentrasi konjugat Biotin dan HRP untuk aplikasi ELISA.	17
4	Perhitungan stabilitas konjugat HRP dan Biotin.	19

DAFTAR LAMPIRAN

1	Perhitungan optimasi dari HRP dan Biotin secara duplo.	26
2	Perhitungan stabilitas HRP dan Biotin hingga pembacaan tidak stabil.	27