

DAFTAR PUSTAKA

- Ärnlöv, J. 2012. Cathepsin S as A Biomarker : Where Are We Now and What Are The Future Challenges? *Biomarkers Med.* 6 : 9 -11
- Asia Pasific Cohort Study Collaboration. 2006. The Burden of overweight and Obesity in the Asia-Pasific Region, *Obes Rev.* DOI: 10.1111/j.1467-789X.2006.00292.x.
- Baik I et al. 2000. Adiposity and Mortality in Men. *Am J Epidemiol.* 152:264-271
- Barbagallo CM et al. 2001. Prevalence of Overweight and Obesity in a Rural Southern Italy Population and Relationships with Total and Cardiovascular Mortality: The Ventimiglia Di Sicilia Project. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25:185-190
- Bengtsson, E., Håkansson, K., Grubb, A., and Brånén, L. 2005. Lack of The Cysteine Protease Inhibitor Cystatin C Promotes Atherosclerosis in Apolipoprotein E - Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 : 2151 – 6
- Black, S., Kushner, I., and Samols, D. 2004. C-Reactive Protein. *J. Biol. Chem.* 279 : 48487 - 48490
- Brown, T.M. 2009. Biomarkers of Atherosclerosis. *Clinical Applications. Curr. Cardiovasc. Risk Rep.* 3 : 23 – 30
- Capuzzi DM, Freeman JS. 2007. C-Reactive Protein and Cardiovascular Risk in the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes: Controversy and Challenge. *Clinical Diabetes.* 25:16-22
- Carey N, Lumeng, N. C., Saltiel, A. R., 2011, Inflammatory Links Between Obesity and Metabolic Disease. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2111–7
- Castoldi, G., Galimberti, S., Riva, C., Papagna, R. Querci5, M. F., Casati, G. Zerbini, G.L., Caccianiga, C., Ferrarese3, M., Baldoni, M.G., Valsecchi, Stella, A. 2007. Association Between Serum Values of C-Reactive Protein and Cytokine Production in Whole Blood of Type 2 Diabetic Patients. *The Biochemical Society.* 1-18
- Chen Y, Rennie D, Cormier YF, Dosman J. 2007. Waist Circumference is Associated with Pulmonary Function in Normal-Weight, Overweight, and Obese Subjects. *Am J Clin Nutr.* 85:35-39
- Cheng, X.W., Huang, Z., Kuzuya, M., Okumura, K and Toyoaki. 2011. Cysteine Protease Cathepsins in Atherosclerosis-Based Vascular Disease and Its Complications. *Hypertension.* 58 : 978 – 986

- Chiriboga, D.E., Ma, Y., Li, W., Edward, J., Stanek, James, R., Hebert, Philip, A., Merriam, Eric, S., Rawson, and Ira, S. 2009. Seasonal and Sex Variation of High-Sensitivity C-Reactive Protein in Healthy Adults: A Longitudinal Study. *Clin. Chem.* 55 : 313 – 321
- Clement, K., Langin, 2007. D. Regulation of Inflammation-Related Genes in Human Adipose Tissue. *J Intern Med* .262: 422–430
- Dandona P., Ajada A. Chaudhari A., Mohanty, P., Garg, R., 2005. Metabolic Syndrome A Comprehensive Perspective Based on Interactions Between Obesity, Diabetes and Inflammation, *Circulation.* 111: 1448-54
- Dijk, V.J.S., Feskens, M.J.E., Bos, B.M., Hoelen, W.M.D., Heijligenberg, R., Bromhaar, G.M., Groot, L., Vries, J., Müller, M., Afman., A.L., 2009. A Saturated Fatty Acid-Rich Diet Induces an Obesity-Linked Proinflammatory Gene Expression Profile in Adipose Tissue of Subjects at Risk of Metabolic Syndrome. *Am J Clin Nutr.* 90:1656–64
- Fuentes, L., Roszer, T., Ricote, M., 2010. Inflammatory Mediators and Insulin Resistance in Obesity: Role of Nuclear Receptor Signaling in Macrophages. *Mediators of Inflammation.* Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2010/219583
- Gaal, L.F.V., Mertens, I.L., and DeBlock, C.E. 2006. Mechanism Linking Obesity with Cardiovascular Disease. *Nature* 444: 875 – 880
- George, S.J., and Johnson, J. 2010. Atherosclerosis. Molecular and Cellular Mechanism. Wiley Blackwell publisher. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim. Germany
- Geraghty, P., Greene, M.C., O'Mahony, M., O'Neill, J.S., Taggart, C. C., and McElvaney, G. N., 2007. Secretory Leucocyte Protease Inhibitor Inhibits Interferon γ Induced Cathepsin S Expression. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 282 (46) 33389–95
- Gnacińska, M., Małgorzewicz, S., Guzek, M., Szydłowska, W.L., and Sworczak, K. 2010. Adipose Tissue Activity in Relation to Overweight or Obesity. *Pol. J. Endocrinol.* 61:160–8
- Grant, W. R., Dixit, D.V. 2013. Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front Immunol.* 4: 50
- Grundy, S.M. 2004. Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 : 2595 – 2600
- Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and Metabolic Disorders. *Nature* 444: 860-67

- Jobs, E., Rise´rus, U., Ingelsson, E., Helmersson, J., Nerpin, E., Jobs, M., Sundstro¨m, J., Lind, L., Larsson, A., Basu, S., and Rnlo, J.A. 2010. Serum Cathepsin S Is Associated with Serum C-Reactive Protein and Interleukin-6 Independently of Obesity in Elderly Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 95:4460–4
- Jung, C., Gerdes, N., Fritzenwanger, M., Figulla, R.H. 2010. Circulating Levels of Interleukin-1 Family Cytokines in Overweight Adolescents. *Mediators of Inflammation*. Volume 2010. doi:10.1155/2010/958403
- Kerns J. K., 2011. Azepanone-Based Inhibitors of Human Cathepsin S: Optimization of Selectivity Via The P2 Substituent, *Biororganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 21 Issue 15, 4409-15
- Kit Insert Cathepsin S SK00371-01 (Adipobiotech)
- Kit Insert IL-1 beta HS HSLB00C (R&D)
- Kit Insert Immulite ® High Sensitivity CRP
- Koenig, W., and Khuseyinov, N. 2007. Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability and Rupture. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 15 - 26
- Krishnan S, Rosenberg L, Djousse L, Cupples LA, Palmer JR. 2007. Overall and Central Obesity and Risk of Type 2 Diabetes in U.S. Black Women. *Obesity.* 15:1860-1866
- Lachmann, H, J., Quartier, P., So, A. 2010. Hawkins, P, H., The Emerging Role of Interleukin-1 in Autoinflammatory Diseases, 24 DOI 10.1002/art.30105 Vol. 63, No. 2, 314–3
- Lee CD, Jacobs DR, Schreiner PJ, Iribarren C, Hankinson A. 2007. Abdominal Obesity and Coronary Artery Calcification in Young Adults: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Clin Nutr.* 86:48-54
- Leemans, C., J., Cassel, L., S., Sutterwala, S., F. 2011. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunol.* 243(1): 152–162
- Liu, J., Ma, L., Yang, J., Ren, A., Sun, Z., Yan, G., Sun, J., Fu, H., Xu, W., and Hu, C, Shi GP. 2006. Increased Serum Cathepsin S in Patients with Atherosclerosis and Diabetes. *Atherosclerosis.* 186 : 411 – 419
- Lyon, C.J., Law, R.E., and Hsueh, W.A. 2003. Minireview: Adiposity, Inflammation, and Atherogenesis. *Endocrinology.* 144: 2195–2200
- Mills, G.H.K., Dunne, A. 2009. Immune Modulation: IL-1, Master Mediator Or Initiator Of Inflammation. *Nature Medicine* 15: 1363 -1364

- Mitchell, R.N., Cotran, R.S., 2003. Acute and Chronic Inflammation. *In* Kumar. V, Cotran R.S, Robbins S.L ed. Robbins Basic Pathology 7th. Philadelphia, PA
- Naour, N., Christine, R., Fellahi, S., Lavoie, E.M., Poitou, C., Rouault, Keophiphath, M., Basdevant, A., Ebetle, D., Shoelson, S., Bastard, J.P., Clément, K., and Guerre-Millo, M. 2010. Cathepsin in Human: Changes in Energy Balance Predominantly Affect Cathepsin S in Adipose Tissue and in Circulation. *J. Clin Endocrinol Metabol.* 95 (4):1861-1868
- Nooijer, R.D., Bot, I., Thusen, D.V., Leeuwenburgh, M.A., Overkleeft, H.S., Kraaijeveld, A. O., Dorland, R., Santbrink, V.H., Westra, M.M., Kovanen, P.T., Jukema, J.W., Wall, V.Der, Berkel, V., Shi, G.P., Biessen, E.A.L., 2009, Leukocyte Cathepsin S is a Potent Regulator of Both Cell and Matrix Turnover in Advanced Atherosclerosis. *AHA Journals.* 188-94
- Nov., O, Shapiro, H., Ovadia, H., Tarnovscki, T., Dvir, I., Shemesh, E., Kovanen, J., Shelef, I., Carmi, Y., Voronov, E., Apte, R.N., Lewis., Haim, Y., Konrad, D., Bashan, N., Rudich A., 2013. Interleukin-1 β Regulates Fat-Liver Crosstalk in Obesity by Auto-Paracrine Modulation of Adipose Tissue Inflammation and Expandability. *Journal Pone PLoS ONE.* 8(1): e53626. doi:10.1371
- Pearson, T.A., Mensah, G.A., Alexander, R.W., Anderson, J.L., Cannon, R.O., *et al.* 2003. Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice : A Statement for Healthcare Professionals from The Centers for Disease Control and Prevention and The American Heart Association. *Circulation.* 107 : 499 - 511
- Paffen, E., and Moniek, P.M. 2006. C-Reactive Protein in Atherosclerosis: A Causal Factor ? *Cardiovascular Research.* 71 : 30 – 39
- Ren, K., Torres, R., 2009. Role of Interleukin-1 β During Pain and Inflammation. doi:10.1016/j.brainr. 60(1): 57–64
- Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). 2007. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan, Republik Indonesia. Jakarta: Balitbangkes Depkes RI, 2008
- Rull, A., Camps, J., Villoverde, C.A., Joven J. 2010. Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity: Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (or CCL2) in the Regulation of Metabolism. *Mediators of Inflammation.* Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2010/326580
- Robbins, Cotran, 2010, Pathologic Basis of Disease 8th edition. 260-311
- Roudbary, S.A., Saadat, F., Forghanparast, K., and Sohrabnejad, R. 2011. Serum C-Reactive Protein Level as a Biomarker for Differentiation

- of Ischemic from Hemorrhagic Stroke. *Acta. Medica Iranica*. 49: 149-152
- Santos, A-C., Lopes C., Guimaraes J. T., Barros, H. 2005. Central Obesity as a Major Determinant of Increased High-Sensitivity C-Reactive Protein in Metabolic Syndrome. *International Journal of Obesity*. 29: 1452-1456
- Shen W et al. 2006. Waist Circumference Correlates with Metabolic Syndrome Indicators Better Than Percentage Fat. *Obesity*. 14:727-736.
- Surmi, B.K., Hasty, A.H., 2008. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol*. 3(5): 545–556.
- Sun, K., Kusminski, C.M., et al. 2010. Adipose remodeling and Obesity. *J.Clin Invest*;121 (6); 2094-2101.
- Taglieri, N., Koenig, W., and Kaski, C.J. 2009. Cystatin C and Cardiovascular Risk. *Clin. Chem*. 55:1932–43
- Taleb, S. 2005. Cathepsin S, A Novel Biomarker of Adiposity: Relevance to Atherogenesis. *FASEB J*. 19 :1540 – 1542
- Taleb, S., Canello, R., Poitou, C., Rouault, C., Sellam, P., Levy, P., Bouillot, J.B., Coussieu, C., Basdevant, A., Guerre-Millo, M., Lacasa, D., and Clemen, K. 2006. Weight Loss Reduces Adipose Tissue Cathepsin S and Its Circulating Levels in Morbidly Obese Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 91 : 1042 – 1047
- The IDF Consensus Worldwide Definition of Metabolic Syndrome. 2005. Berlin
- Tsai CJ, Leitzmann MF, Willett WC, Giovannucci EL. 2004. Prospective Study of Abdominal Adiposity and Gallstone Disease in US Men. *Am J Clin Nutr* 80:38-44
- Wang Y, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. 2005. Comparison of Abdominal Adiposity and Overall Obesity in Predicting Risk of Type 2 Diabetes Among Men. *Am J Clin Nutr*. 81:555-563
- Weinbrenner, T., Schroder, H., Escurriol, V., Fito, M., Elosua, R., Vila, J., Marrugat, J., and Covas, M.I. 2006. Circulating Ox-LDL is Associated with Increased Waist Circumference Independent of Body Mass Index in Men and Women. *Am. J. Clin. Nutr*. 83:30-35
- Wellen, K., Hotamisligil, G.S. 2003. Obesity Induces Inflammatory Changes in Adipose Tissue. *J. Clin. Invest*. 112 : 1785–88
- Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S. 2005. Inflammation, Stress and Diabetes. *J. Clin. Invest*. 115:1111–1119

- Wildman RP et al. 2005. Are Waist Circumference and Body Mass Index Independently Associated with Cardiovascular Disease Risk in Chinese Adults? *Am J Clin Nutr.* 82:1195–1202.
- Yeh, E.T.H., Paul, A., and Chan L. 2005. A Proatherogenic Role for C-Reactive Protein In Vivo. *Curr. Opin. Lipidol.* 16:512-7
- Zhang, H., Cui, J., and Zhang, C. 2010. Emerging Role of Adipokines As Mediators in Atherosclerosis. *World J. Cardiol.* 26:370–6
- Xiang L., Liu, Z., Cheng, Z., and Cheng, X, 2012. CysteinyI Cathepsins: Multifunctional Enzymes in Cardiovascular Disease. *Chonnam Med J* 2012;48:77-85

Lampiran 1. Lembar Informed Consent

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama :

Umur :

Alamat :

setelah mendengar/membaca dan mengerti penjelasan yang diberikan mengenai tujuan, manfaat apa yang akan dilakukan pada penelitian ini, menyatakan setuju untuk ikut dalam penelitian ini secara sukarela tanpa paksaan.

Saya mengerti bahwa dari semua hal yang dilakukan petugas, pada saya pengambilan darah saya yang bisa menyebabkan masalah, namun saya percaya kemungkinan tersebut sangat kecil karena dilakukan secara bebas hama oleh petugas yang terlatih.

Saya tahu bahwa keikutsertaan saya ini bersifat sukarela tanpa paksaan, sehingga saya bisa menolak ikut atau mengundurkan diri dari penelitian ini tanpa kehilangan hak saya untuk mendapat pelayanan kesehatan. Juga saya berhak bertanya atau meminta penjelasan pada peneliti bila masih ada hal yang belum jelas atau masih ada hal yang ingin saya ketahui tentang penelitian ini.

Saya juga mengerti bahwa semua biaya yang dikeluarkan sehubungan dengan penelitian ini, akan ditanggung oleh peneliti. Demikian juga biaya perawatan dan pengobatan bila terjadi hal-hal yang tidak diinginkan akibat penelitian ini, akan dibiayai oleh peneliti.

Saya percaya bahwa keamanan dan kerahasiaan data penelitian akan terjamin dan saya dengan ini menyetujui semua data saya yang dihasilkan pada penelitian ini untuk disajikan dalam bentuk lisan maupun tulisan.

Bila terjadi perbedaan pendapat dikemudian hari kami akan menyelesaikannya secara kekeluargaan.

	NAMA	TANDA TANGAN	TG/BLN/THN
Peserta
Saksi 1
Saksi 2

Peneliti,

(Adriana Todingrante, S.Farm., Apt)

Lampiran 2. Lembar Wawancara Pasien Penelitian

No. Pasien		Lingkar Perut	cm
Nama Pasien		Tinggi Badan	cm
Jenis Kelamin	Laki – Laki	Berat Badan	Kg
Ras Suku		Tekanan Darah	mmHg
Suku Ibu Nenek		Lamanya Obesitas	<input type="checkbox"/> 1 tahun
Suku Bapak Kakek			<input type="checkbox"/> 1 – 3 tahun
Pendidikan Terakhir			<input type="checkbox"/> 3 – 5 tahun
Tanggal Lahir/Umur			<input type="checkbox"/> 5 tahun
No Telp/Hp		Suhu Tubuh Demam/Tidak Demam
Email		Tgl Wawancara	
Alamat		Tgl pengambilan	
		Sampel Jam	

Riwayat Penyakit yang Pernah Diderita

Riwayat Keluarga Obesitas	Ya/Tidak
Diabetes	Ya/Tidak
Hipertensi	Ya/Tidak
Riwayat PJK	Ya/Tidak
Dislipidemia	Ya/Tidak
Penyakit Gangguan Ginjal	Ya/Tidak
Hepatitis	Ya/Tidak
Gangguan Fungsi Hati	Ya/Tidak

Obat/ Suplemen yang Sedang Dikonsumsi dalam 2 Minggu Terakhir

Riwayat Keluarga Obesitas	Ya/Tidak
Diabetes	Ya/Tidak
Hipertensi	Ya/Tidak
Riwayat PJK	Ya/Tidak
Dislipidemia	Ya/Tidak
Penyakit Gangguan Ginjal	Ya/Tidak
Hepatitis	Ya/Tidak
Gangguan Fungsi Hati	Ya/Tidak

Rutinitas

Merokok	Ya/Tidak	Jumlah batang/hari/hari
Minum susu	Ya/Tidak	Berapa gelas/hari/hari
Minum Alkohol	Ya/Tidak	Jumlah gelas/hari/hari

Lampiran 3. Rekomendasi Persetujuan Etik



REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK
Nomor : 610 /H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2013

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, setelah melalui pembahasan dan penilaian, pada rapat tertanggal **3 April 2013**, telah memutuskan, protokol penelitian berjudul:

Korelasi Antara Cathepsin S dan High Sensivity C Reactive Protein Pada Populasi dengan Sindrom Metabolik

dengan Peneliti Utama: **Adriana Todingrante.,S.Farm, Apt**

No. Register

U	H	1	3	0	3	0	1	1	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

yang diterima pada tanggal: **11 Maret 2013**

Perbaikan diterima tanggal: **12 April 2013**

dapat disetujui untuk dilaksanakan di Manado dan Jakarta.

Persetujuan Etik ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian.

Pada akhir penelitian, **laporan pelaksanaan penelitian** harus diserahkan kepada KEPK Fakultas Kedokteran Unhas. Jika ada perubahan protokol dan /atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Makassar, 18 April 2013

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fak. Kedokteran Unhas



Lampiran 4. Kualitas Mutu (QC) Pemeriksaan IL-1 β

No.	Standar	Mean (OD)	Standar Deviasi	%CV	Konsentrasi (pg/mL)
1.	Standar 1	0,163	0,00	0	0,125
2.	Standar 2	0,219	0,00	0	0,25
3.	Standar 3	0,435	0,00	0	1
4.	Standar 4	0,722	0,05	7,44	2
5.	Standar 5	1,188	0,00	0	4
6.	Standar 6	1,797	0,04	2,2	8

Lampiran 5. Kualitas Mutu (QC) Pemeriksaan *Cathepsin S*

No	Kontrol	Mean	Konsentrasi (pg/mL)
1	Kontrol Positif	0,19	78,545

No.	Standar	Mean (OD)	Konsentrasi (pg/mL)
1.	Standar 1	0,05	15,625
2.	Standar 2	0,09	31,25
3.	Standar 3	0,15	62,5
4.	Standar 4	0,29	125
5.	Standar 5	0,56	250
6.	Standar 6	1,06	500

Lampiran 6. Prosedur Kerja Pemeriksaan IL-1 β

Prinsip :

Pemeriksaan menggunakan teknik *quantitative sandwich enzyme immunoassay*. Suatu antibodi monoklonal spesifik untuk IL-1 β telah *pre-coated* pada *microplate*. Standar dan sampel dipipet ke dalam sumur dan setiap IL-1 β yang ada diikat oleh *immobilized antibody*. Setelah pencucian bersih semua zat yang tidak berikatan, *poliklonal enzyme-linked antibody spesifik* untuk IL-1 β ditambahkan ke sumur. Selanjutnya dicuci kembali untuk menghilangkan zat yang tidak berikatan. Kemudian ditambahkan larutan substrat ditambahkan ke sumur. Setelah waktu inkubasi periode, larutan amplifier ditambahkan ke sumur dan perubahan warna sesuai jumlah IL-1 β yang diikat pada langkah awal. Perubahan warna dihentikan dan intensitas warna diukur

Spesimen :

Serum, EDTA plasma

Prosedur :

1. Siapkan reagen, sampel dan standar
2. Tambahkan 100 μ L standar, sampel, kontrol positif pada tiap sumur. Inkubasi selama 2 jam pada *plate shaker* pada suhu kamar
3. Cuci 6 kali
4. Tambahkan 200 μ L *conjugate solution* pada tiap sumur. Inkubasi selama 2 jam pada *plate shaker*.
5. Cuci 6 kali
6. Tambahkan 50 μ L *substrate solution* pada tiap sumur. Inkubasi selama 1 jam pada *plate shaker*.
7. Tambahkan 50 μ L *amplifier solution* pada tiap kamar. Inkubasikan 30 menit menit *plate shaker*.
8. Tambahkan 50 μ L *stop solution* pada tiap sumur. Baca 490 nm dalam 30 menit.

Lampiran 7. Prosedur Kerja Pemeriksaan *Cathepsin S*

Prinsip :

Pemeriksaan menggunakan teknik *quantitative sandwich enzyme immunoassay*. Suatu antibodi poliklonal spesifik terhadap *Cathepsin S* telah *pre-coated* pada *microplate*. Standar dan sampel dipipet ke dalam sumur dan setiap *Cathepsin S* yang ada diikat oleh *immobilized antibody*. Setelah pencucian semua zat yang tidak berikatan, suatu antibodi poliklonal terbiotinilasi spesifik untuk *Cathepsin S* ditambahkan ke sumur. Selanjutnya dicuci kembali untuk menghilangkan setiap reagen antibodi-biotin terikat, HRP yang terikat streptavidin ditambahkan ke dalam sumur. Setelah mencuci setiap enzim terikat, cairan substrat ditambahkan ke sumur dan perubahan warna sebanding jumlah *Cathepsin S* yang diikat pada langkah awal. Perubahan warna berhenti dan intensitas warna diukur.

Spesimen :

Serum, EDTA plasma, Supernatan Kultur Sel

Prosedur :

1. Siapkan reagen, sampel dan standar
2. Tambahkan 100 μ L standar, sampel, kontrol positif pada tiap sumur. Inkubasi selama 2 jam pada *plate shaker* pada suhu kamar
3. *Aspirate* dan cuci 4 kali
4. Tambahkan 100 μ L *detection antibody working solution* pada tiap sumur. Inkubasikan selama 2 jam pada *plate shaker* pada suhu kamar
5. *Aspirate* dan cuci 4 kali
6. Tambahkan 100 μ L Streptavidin-HRP *conjugate working solution* pada tiap sumur. Inkubasikan selama 60 menit pada *plate shaker* pada suhu kamar.
7. *Aspirate* dan cuci 4 kali
8. Tambahkan 100 μ L substrate *solution* pada tiap kamar. Inkubasikan 3-6 menit pada *bench top*. Lindungi dari jauh.
9. Tambahkan 100 μ L stop solution pada tiap sumur. Baca 450 nm dalam 15 menit.