

## IMOBILISASI ANTIBODI T<sub>4</sub> PADA TABUNG POLIPROPILEN SECARA KIMIA DENGAN GLUTARALDEHID

Daniel Santoso, Ratnawati Kukuh, Dian Pertiwi

### ABSTRAK

IMOBILISASI ANTIBODI T<sub>4</sub> PADA TABUNG POLIPROPILEN SECARA KIMIA DENGAN GLUTARALDEHID. Pemisahan fraksi antigen bebas dari fraksi terikat merupakan tahap yang penting dalam penentuan radioimmunoassay. Pengembangan teknik pemisahan menggunakan antibodi fase padat, sangat disukai pemakai RIA karena memudahkan pengerjaan di laboratorium sehingga terasa lebih praktis dan sederhana. Pada penelitian ini dilakukan teknik pemisah fase padat dengan mengikat antibodi T<sub>4</sub> secara kimia pada tabung plastik polipropilen yang sebelumnya dilapisi glutaraldehid. Antibodi yang akan ditempelkan terlebih dahulu dimurnikan secara kromatografi afinitas menggunakan protein-A-sepharosa. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kondisi pelapisan tabung optimal diperoleh dengan menggunakan larutan glutaraldehid 2,5%, pH 9-9,5 yang diinkubasikan pada tabung selama 72 jam pada suhu 37°C. Kadar antibodi T<sub>4</sub> yang digunakan 15 µg/ml diinkubasikan pada pH 8-8,5 selama 72 jam pada suhu 25°C. Untuk memperoleh daerah kerja yang diinginkan, ditentukan volume pereaksi dan waktu inkubasi optimal. Data percobaan menunjukkan bahwa disain penentuan dengan menambahkan 20 µl larutan baku T<sub>4</sub>, 300 µl T<sub>4</sub> bertanda <sup>125</sup>I pada tabung yang telah dilapisi dengan antibodi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25°C dapat memberikan hasil yang cukup baik pada daerah kerja 14-780 nmol/l. Evaluasi lebih lanjut dari hasil kinerja penentuan menunjukkan bahwa RIA-T<sub>4</sub> dengan metode tabung berlapis sebanding dengan kit RIA-T<sub>4</sub> cara magnetik produksi Amer-sham. Uji kestabilan berdasarkan harga-harga ikatan maksimum dan ikatan non spesifik, menunjukkan hasil yang masih cukup baik hingga lima bulan penyimpanan.

### ABSTRACT

CHEMICAL IMMOBILIZATION OF T<sub>4</sub> ANTIBODY ON POLYPROPYLENE TUBE COATED WITH GLUTARALDEHYD. The separation of free and bound fractions of antigen is an essential step in radioimmunoassay. Solid phase antibody techniques have gained popularity among radioimmunoassay users as they are considered practical and simple. In the present study solid phase separation was carried out by chemical immobilisation of T<sub>4</sub> antibodies on polypropylene tubes previously control with glutaraldehyde. Prior to immobilisation, the antibodies were purified using affinity chromatography with protein A-sepharose. Optimum conditions for the coating of tubes were found using a 2.5% glutaraldehyde solution, pH 9-9.5, incubation at 37°C for 72 hours. The T<sub>4</sub> antibody concentration used was 15 µg/ml incubated at pH 8-8.5 and 25°C for 72 hours. Optimum reagent volumes and incubation time were determined to obtain the desired working range. An acceptable working range between 14-780 nmol/L was obtained by adding 20 µl of T<sub>4</sub> standard solution and 300 µl of <sup>125</sup>I-labelled T<sub>4</sub> to antibody coated tubes and incubating for 24 hours at 25°C. Further evaluation showed that T<sub>4</sub> assay performance using coated tubes is comparable to that using magnetic separation RIA kits from Amersham. Stability testing based on maximum and non specific bindings indicated that the kits are reasonably stable for 5 months.

### PENDAHULUAN

Pemisahan fraksi antigen bebas dari fraksi terikat merupakan tahap yang sangat penting dan menentukan dalam radioimmunoassay. Untuk pemisahan tersebut, dapat digunakan berbagai metode, yang pada prinsipnya berdasarkan atas perbedaan alat kimiawi atau immunologis antara kedua bentuk antigen tadi. Teknik pemisahan yang banyak dipakai selama ini, antara lain menggunakan prinsip perbedaan pelarutan, misalnya pengendapan fraksi terikat setelah penambahan pelarut seperti polietilen-

glikol atau etanol; perbedaan adsorpsi pada suatu bahan padat, misalnya karbon aktif; atau dengan pengendapan antibodi kedua, yang berasal dari spesies hewan yang berlainan dari yang digunakan untuk memperoleh antibodi pertama.

Teknik pemisahan dengan antibodi fase padat, yang dikembangkan kemudian sangat disukai pemakai radioimmunoassay, karena memudahkan dan menyederhanakan pengerjaan di laboratorium sehingga dirasakan lebih



praktis. Pada pemisahan memakai pereaksi fasa padat ini, antibodi diimmobilisasikan pada suatu fase yang tidak larut dan pada waktu melakukan analisis, sesudah selesai inkubasi, endapan fase padat dipisahkan dari supernatannya. Kompleks antigen-antibodi akan terdapat dalam endapan fase padat, sedangkan antigen yang bebas akan tinggal dalam larutan supernatan.

Berbagai macam bahan padat tak larut dapat digunakan sebagai matriks, misalnya kepingan (immobilised bead), serbuk (microimmobilised bead), atau tabung reaksi (coated tubes).

Pada teknik tabung berlapis, antibodi diimmobilisasikan pada dinding bagian dalam tabung. Pada waktu pemisahan RIA, kompleks antigen-antibodi akan tetap melekat pada dinding tabung, sedangkan fraksi antigen bebanya tertinggal dalam supernatan. Dalam hal ini, ada dua macam cara imobilisasi yang dapat dilakukan, yakni secara fisika atau secara kimia. Secara fisika, imobilisasi antibodi dapat dilakukan melalui adsorpsi pada permukaan sebelah dalam tabung, misalnya tabung polistiren atau polipropilen. Untuk keperluan adsorpsi ini, antibodi yang dipakai dapat berasal dari serum atau immunoglobulin yang telah diisolasi.

Imobilisasi antibodi pada dinding tabung dapat pula dilakukan secara kimiawi. Dalam penelitian ini, imobilisasi kimiawi dilakukan dengan bantuan glutaraldehid yang sebelumnya telah dilekatkan pada dinding tabung sebelah dalam serta mengalami polimerisasi. Gugus amino dari antibodi selanjutnya akan berikatan secara kovalen dengan gugus aldehid yang masih bebas.

## BAHAN DAN PERALATAN

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah antibodi  $T_4$  hasil penelitian terdahulu [1], protein-A-sepharosa (IAEA). Glutaraldehid, etanolamin, albumin serum sapi, glisin, dapar-Tris, HCl, asam borat, NaOH,  $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$ , larutan pH indikator universal dari E.Merk. Kit RIA  $T_4$  cara magnetik dan cuplikan kontrol  $T_4$  kadar rendah, menengah, dan tinggi diperoleh dari BATAN/Amersham. Sebagai pereaksi penunjang digunakan larutan dapar fosfat 0,05 M; pH 7,5; pH 8,0; larutan dapar fosfat 0,1 M; pH 7,4; larutan dapar karbonat 0,05 M; pH 9,5. Larutan dapar

borat 0,05 M, pH 9,6, larutan dapar Tris pH 8,0; dan larutan dapar glisin-HCl pH 2,8.

### Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah pencah sinar  $\gamma$  (Mini assay tipe 6-20), alat pH meter (Metrohm Herisau E 520), alat spektrofotometer UV, alat komputer IBM/PC, program disket dari WHO, alat inkubator. Tabung polipropilen buatan lokal dengan ukuran diameter 1 cm dan panjang 5 cm, tabung dialisis, pipet eppendorf dengan ukuran 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, dan alat suntikan plastik berukuran 2,5 ml.

## TATA KERJA

### Pemurnian antiserum $T_4$ dengan protein-A-sepharosa

Pemurnian anti serum  $T_4$  dilakukan dengan menggunakan kolom protein-A-sepharosa [2]. Ke dalam suntikan plastik berukuran 2,5 ml dimasukkan 0,3 g protein-A-sepharosa dan 2 ml larutan dapar fosfat 0,1 M, pH 7,4. Campuran dikocok dan dibiarkan mengembang selama 15 menit. Setelah mengembang ke dalam kolom dimasukkan 500  $\mu$ l antiserum  $T_4$  yang telah dilarutkan dalam 1 ml dapar fosfat 0,1 M, pH 7,4. Agar seluruh  $\gamma$  globulin teradsorpsi ke dalam kolom protein-A-sepharosa, maka larutan antiserum dikocok bersama dengan seluruh isi kolom dan dibiarkan selama 30 menit. Kolom kemudian dielus dengan dapar fosfat 0,1M, pH 7,4. Eluat ditampung sebanyak 9 fraksi, masing-masing volumenya 2ml. Setiap fraksi ditentukan resapannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm. Setelah resapan menurun, kolom dicuci dengan 3 ml NaCl 0,9%. Desorpsi IgG- $T_4$  dari isi kolom dilakukan dengan mengelusi kolom kembali dengan larutan dapar glisin-HCl pH 2,8. Sebanyak 6 fraksi a 2 ml eluat ditampung ke dalam vial berisi 1 ml dapar Tris. Fraksi yang mengandung IgG dapat ditentukan resapannya dengan spektrometer UV pada panjang gelombang 280 nm. Fraksi IgG dikumpulkan dan didialisis dalam dapar borat pH 9,6 selama 24 jam pada suhu 4°C. Kadar IgG yang diperoleh ditentukan sekali lagi resapannya dan dibandingkan dengan baku IgG.

### Imobilisasi antibodi $T_4$ pada tabung polipropilen

Mula-mula ke dalam tabung polipropilen dimasukkan 2 ml larutan glutaraldehid (2,5%). Tabung yang berisi larutan glutaraldehid kemudian ditutup dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sisa larutan glutaraldehid didekan-



tasi, dan ke dalam tabung yang telah bersalut glutaraldehid kemudian ditambahkan sejumlah tertentu antibodi  $T_4$  yang telah dimurnikan. Reaksi dilakukan selama 24 jam pada suhu kamar. Larutan antibodi yang tidak bereaksi didekantasi dan tabung dicuci 3 kali dengan akuades. Untuk melindungi sisa gugus aldehid yang bebas, ke dalam tabung bersalut antibodi tersebut ditambahkan larutan etanolamin 0,3%. Inkubasi dilakukan selama 3 jam pada suhu kamar, kemudian didekantasi dan tabung dicuci kembali 3 kali dengan larutan dapar fosfat. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.

Untuk memperoleh kondisi penempelan antibodi yang optimal dilakukan variasi percobaan sesuai dengan protokol percobaan yang tertera dalam Tabel 1.

Ke dalam tabung yang telah bersalut antibodi dengan berbagai konsentrasi ditambahkan 100µl serum bebas dan 300µl  $T_4$  bertanda  $^{125}I$ . Campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Supernatan didekantasi, dan fraksi yang terikat pada tabung kemudian dicacah dengan pencacah sinar alpha. Selanjutnya, dibuat grafik antara prosen ikatan terhadap konsentrasi antibodi, dan dari grafik dapat ditentukan konsentrasi antibodi yang memberikan 50% perunut terikat.

*Penentuan daerah kerja dengan kepekaan yang diinginkan*

Setelah diperoleh konsentrasi penempelan antibodi yang optimal, selanjutnya dilakukan optimasi terhadap daerah kerja dan kepekaan analisis. Untuk maksud ini dilakukan penen-

Tabel 1. Protokol percobaan I (amobilisasi antibodi)

| Glutaraldehid |                   |                      |                      | Antibodi          |                      |                      | Etanolamin        |                   |                      |
|---------------|-------------------|----------------------|----------------------|-------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| Kadar (%)     | pH larutan        | Waktu inkubasi (jam) | temp. inkubasi (jam) | pH larutan        | Waktu inkubasi (jam) | temp. inkubasi (jam) | Kadar (%)         | pH larutan        | Waktu inkubasi (jam) |
| ktrl          | 9,5               | 24                   | 37                   | 8,5               | 24                   | 25                   | 0,5               | 8                 | 18                   |
| 2,5           | ktrl <sup>2</sup> | 24                   | 37                   | 8,5               | 24                   | 25                   | 0,5               | 8                 | 18                   |
| 2,5           | 9,5               | ktrl <sup>3</sup>    | 37                   | 8,5               | 24                   | 25                   | 0,5               | 8                 | 18                   |
| 2,5           | 9,5               | 24                   | ktrl <sup>4</sup>    | 8,5               | 24                   | 25                   | 0,5               | 8                 | 18                   |
| 2,5           | 9,5               | 24                   | 37                   | ktrl <sup>5</sup> | 24                   | 25                   | 0,5               | 8                 | 18                   |
| 2,5           | 9,5               | 24                   | 37                   | 8,5               | ktrl <sup>6</sup>    | 25                   | 0,5               | 8                 | 18                   |
| 2,5           | 9,5               | 24                   | 37                   | 8,5               | 24                   | ktrl <sup>7</sup>    | 0,5               | 8                 | 18                   |
| 2,5           | 9,5               | 24                   | 37                   | 8,5               | 24                   | 25                   | ktrl <sup>8</sup> | 8                 | 18                   |
| 2,5           | 9,5               | 24                   | 37                   | 8,5               | 24                   | 25                   | 0,5               | ktrl <sup>9</sup> | 18                   |
| 2,5           | 9,5               | 24                   | 37                   | 8,5               | 24                   | 25                   | 0,5               | 8                 | ktrl <sup>10</sup>   |

Keterangan:

Kontrol<sup>1</sup>: 1; 2; 2,5; 3; 4

Kontrol<sup>2</sup>: 7; 8; 9; 9,5; 10; 11

Kontrol<sup>3</sup>: 4; 25; 37; 50

Kontrol<sup>4</sup>: 24; 4 8; 72; 69

Kontrol<sup>5</sup>: 7; 8; 8,5; 9

Kontrol<sup>6</sup>: 4; 25; 37

Kontrol<sup>7</sup>: 24; 48; 72; 96

Kontrol<sup>8</sup>: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5

Kontrol<sup>9</sup>: 7; 7,5; 8; 9

Kontrol<sup>10</sup>: 6; 18; 24

*Penentuan konsentrasi antibodi optimum pada tabung bersalut*

Mula-mula ke dalam suatu seri tabung polipropilen yang telah dilapisi dengan glutaraldehid ditambahkan larutan antibodi dengan konsentrasi 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 µg/ml (antibodi dilarutkan dalam dapar fosfat 0,05 M pH 8,5), dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu kamar. Pengerjaan selanjutnya dilakukan sesuai dengan prosedur No. 2.

tuan volume pereaksi optimasi dan waktu serta suhu inkubasi optimal. Percobaan dilakukan sesuai dengan protokol percobaan 2 yang tertera pada Tabel 2. Dari seluruh hasil percobaan kemudian dibuat grafik antara fraksi terikat terhadap konsentrasi larutan baku  $T_4$  dan grafik profil presisi.

*Pengujian kualitas*

Pengujian beberapa parameter pengendalian mutu internal dilaksanakan dengan reengavaluasi nilai besaran: ikatan non spesifik (NSB),

Tabel 2. Variasi percobaan untuk menentukan daerah kerja yang optimal

| Vol. serum bebas T <sub>4</sub> (μl) | Waktu inkubasi (jam) | Suhu inkubasi (°C) |
|--------------------------------------|----------------------|--------------------|
| Ktrl <sup>a</sup>                    | 24                   | 25                 |
| 20                                   | Ktrl <sup>b</sup>    | 25                 |
| 20                                   | 24                   | ktrl <sup>c</sup>  |

Keterangan :  
Kontrol<sup>a</sup> : 10, 20, 25, 50μl; Kontrol<sup>b</sup> : 1, 3, 6, 24 jam;  
Kontrol<sup>c</sup> : 35, 37°C

ikatan maksimum (Bo/T), konsentrasi yang memberikan 50% B/Bo (Ed 50), dan koefisien variasi antar penentuan (interassay) cuplikan kontrol serta profil presisi. Sebagai pembandingan digunakan kit-RIA-T<sub>4</sub> cara magnetik produksi BATAN/Amersham.

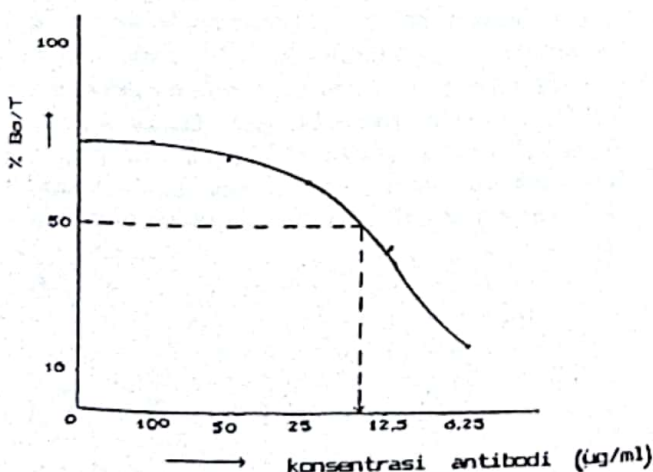
#### Uji kestabilan

Penentuan uji kestabilan dilakukan terhadap tabung yang telah dilapisi antibodi. Untuk maksud ini tabung disimpan dalam keadaan kering pada suhu 4°C. Kemudian ditentukan besaran karakteristiknya berturut-turut dengan selang waktu 15 hari.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemurnian antiserum T<sub>4</sub> dengan menggunakan kolom protein-A-sepharosa didapat IgG-T<sub>4</sub> murni dengan kadar 0,655 mg/ml.

Hasil penentuan konsentrasi optimum IgG-T<sub>4</sub> dapat dilihat pada Gambar 1, harga 50% perunut terikat didapat pada konsentrasi antibodi 15 μg/ml.



Gambar 1. Titer antibodi fasa padat

Untuk memperoleh kondisi imobilisasi antibodi T<sub>4</sub> yang optimal dilakukan percobaan dengan berbagai variasi parameter terhadap penempelan glutaraldehid, antibodi, dan etanolamin. Dari hasil optimasi terhadap penempelan glutaraldehid, terlihat bahwa larutan glutaraldehid dengan kadar 2,5-3% memberikan hasil yang optimum. Data pada Tabel 2, menunjukkan bahwa glutaraldehid dengan kadar lebih dari 2,5% tidak akan memberikan kenaikan harga prosen ikatan yang berarti, sebaliknya apabila konsentrasi glutaraldehid terlalu tinggi akan mempertinggi nilai ikatan non spesifik. Hal ini disebabkan karena semakin banyak gugus aktif dari glutaraldehid yang tersisa, yang dapat menghasilkan ikatan senyawa bertanda non spesifik pada tabung sehingga akan menimbulkan kesalahan misklasifikasi.

Hasil optimasi penempelan glutaraldehid terhadap pH, waktu, dan suhu inkubasi dapat dilihat pada Tabel 3. Kondisi optimum penempelan glutaraldehid diperoleh pada pH 9-9,5 dan waktu inkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C

Tabel 3. Hasil percobaan optimasi penempelan glutaraldehid

| Parameter               | Bo/T (%)  | NSB (%)  |
|-------------------------|-----------|----------|
| Kadar glutaraldehid (%) |           |          |
| 1                       | 19,8± 2,4 | 2,9± 0,4 |
| 2                       | 40,0± 6,1 | 2,6± 0,3 |
| 2,5                     | 46,1± 4,8 | 2,4± 0,3 |
| 3                       | 46,7± 4,3 | 3,0± 0,4 |
| 4                       | 46,9± 7,2 | 7,4± 0,9 |
| pH glutaraldehid        |           |          |
| 7                       | 14,0± 1,9 | 2,0± 0,3 |
| 8                       | 19,6± 2,2 | 2,5± 0,4 |
| 9                       | 45,3± 5,4 | 2,5± 0,3 |
| 9,5                     | 46,1± 4,8 | 2,4± 0,3 |
| 10                      | 25,9± 3,1 | 2,4± 0,2 |
| 11                      | 21,1± 2,7 | 2,6± 0,3 |
| Suhu inkubasi (°C)      |           |          |
| 4                       | 19,5± 2,7 | 3,2± 0,5 |
| 25                      | 37,4± 2,7 | 2,6± 0,4 |
| 37                      | 46,1± 4,8 | 2,4± 0,3 |
| 50                      | 27,3± 4,2 | 2,2± 0,4 |
| Waktu inkubasi          |           |          |
| 24                      | 13,2± 2,4 | 2,9± 0,4 |
| 48                      | 21,7± 3,2 | 2,5± 0,3 |
| 72                      | 46,1± 4,8 | 2,4± 0,3 |
| 96                      | 46,4± 3,6 | 2,6± 0,2 |



memberikan nilai ikatan maksimum tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pada kondisi tersebut, glutaraldehid telah mengalami adsorpsi dengan sempurna karena dengan menaikkan suhu dan melanjutkan inkubasi hingga 96 jam tidak mempengaruhi nilai ikatan maksimum.

Hasil optimasi penempelan antibodi dapat dilihat pada Tabel 4. Data menunjukkan bahwa

Tabel 4. Hasil optimasi penempelan antibodi

| Parameter              | Bo/T (%)   | NSB (%)   |
|------------------------|------------|-----------|
| pH penempelan antibodi |            |           |
| 7                      | 21,3 ± 3,1 | 3,2 ± 0,4 |
| 8                      | 38,9 ± 3,9 | 2,9 ± 0,4 |
| 8,5                    | 46,1 ± 4,8 | 2,4 ± 0,3 |
| 9                      | 34,5 ± 2,9 | 2,5 ± 0,2 |
| Suhu inkubasi (°C)     |            |           |
| 4                      | 36,6 ± 4,2 | 2,6 ± 0,4 |
| 25                     | 46,1 ± 3,8 | 2,4 ± 0,3 |
| 37                     | 24,8 ± 3,2 | 3,0 ± 0,4 |
| Waktu inkubasi (jam)   |            |           |
| 24                     | 17,8 ± 2,7 | 3,4 ± 0,5 |
| 48                     | 30,3 ± 3,6 | 3,0 ± 0,4 |
| 72                     | 46,1 ± 4,8 | 2,4 ± 0,3 |
| 96                     | 38,0 ± 4,1 | 2,5 ± 0,2 |

kondisi optimum penempelan antibodi diperoleh pada pH 8-8,5 dan waktu inkubasi selama 72 jam pada suhu kamar (25°C). Pada kondisi ini telah terbentuk ikatan peptida antara gugus karboksil dari glutaraldehid dengan gugus amina dari antibodi. Faktor waktu dan suhu merupakan parameter yang perlu diperhatikan, sebab bila inkubasi dilakukan terlalu lama atau pada suhu tinggi, akan mengakibatkan kerusakan antibodi sehingga akan memperendah nilai ikatan maksimum.

Untuk melindungi sisa gugus aldehid reaktif yang tidak bereaksi dengan antibodi dilakukan penempelan etanolamin. Tujuan percobaan ini untuk menekan nilai ikatan non spesifik serendah mungkin. Hasil optimasi penempelan etanolamin dapat dilihat pada Tabel 5.

Pada 0% etanolamin didapat nilai NSB yang tinggi, dan konsentrasi optimum diperoleh pada 0,3% etanolamin, akan memberikan nilai NSB yang cukup rendah (2,4%). Hasil variasi pH, waktu, dan suhu inkubasi menunjukkan bahwa kondisi optimum penempelan etanol-

Tabel 5. Hasil optimasi penempelan etanolamin

| Parameter            | NSB (%)    |
|----------------------|------------|
| Kadar etanolamin     |            |
| 0                    | 14,6 ± 2,2 |
| 0,1                  | 9,3 ± 0,9  |
| 0,2                  | 4,8 ± 0,5  |
| 0,3                  | 2,4 ± 0,3  |
| 0,4                  | 2,5 ± 0,4  |
| 0,5                  | 2,4 ± 0,2  |
| pH etanolamin        |            |
| 7                    | 6,7 ± 0,9  |
| 8                    | 2,4 ± 0,3  |
| 8,5                  | 3,0 ± 0,4  |
| 9                    | 4,2 ± 0,6  |
| Waktu inkubasi (jam) |            |
| 6                    | 11,9 ± 1,2 |
| 18                   | 2,4 ± 0,3  |
| 24                   | 2,3 ± 0,2  |

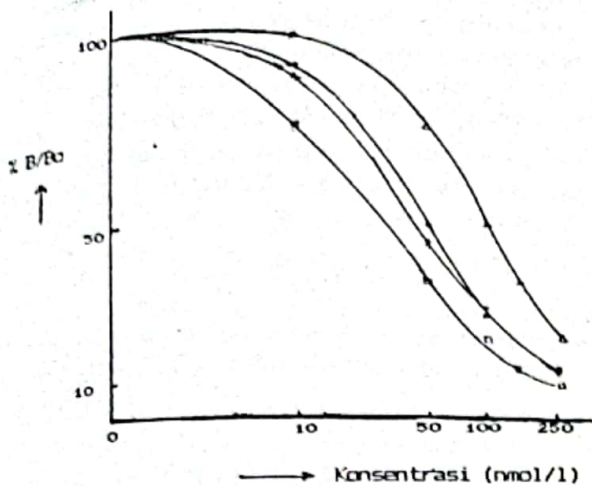
amin diperoleh pada pH 8-8,5 selama 18 jam pada suhu kamar (25°C).

Dengan menggunakan kondisi percobaan di atas, telah diperoleh tabung bersalut yang siap digunakan untuk penentuan.

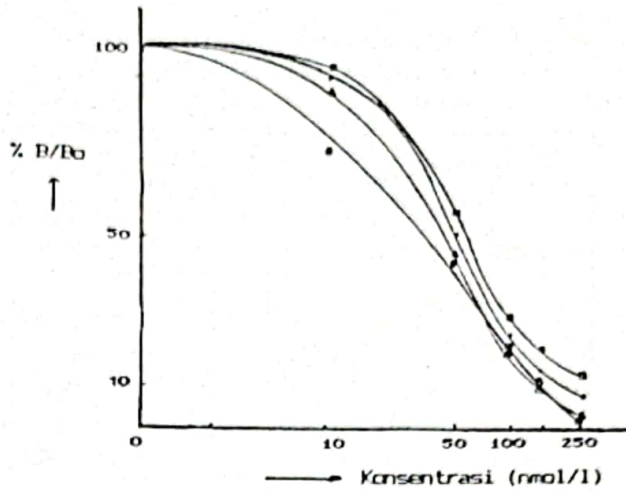
Untuk memperoleh hasil penentuan dan kepekaan analisis yang optimal dilakukan optimasi terhadap volume pereaksi, waktu, dan suhu inkubasi. Mula-mula dibuat kurva baku dan profil presisi dari berbagai variasi konsentrasi antibodi. Dari kurva baku dan profil presisi (Gambar 2) terlihat bahwa antibodi dengan konsentrasi 15 µg/ml memberikan nilai ikatan maksimum yang cukup tinggi (61,1%), serta daerah kerja yang cukup lebar untuk penentuan  $T_4$  yaitu antara 13-850 nmol/l.

Hasil optimasi volume larutan baku dapat dilihat pada Gambar 3. Pengamatan menunjukkan bahwa penggunaan 20 µl larutan baku memberikan hasil yang cukup peka pada daerah kerja yang diinginkan, yaitu antara 12,5-800 nmol/l.

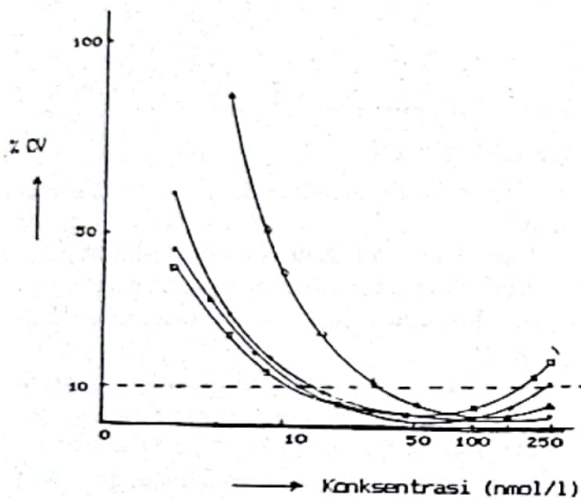
Optimasi waktu, dan suhu inkubasi menunjukkan bahwa inkubasi selama 24 jam pada suhu kamar atau 2 jam pada suhu 37°C memberikan hasil penentuan yang cukup memuaskan. Waktu inkubasi 24 jam pada suhu kamar (25°C) memberikan daerah kerja yang lebih lebar (14-780) nmol/l dibandingkan dengan waktu inkubasi 2 jam pada suhu 37°C yang memberikan daerah kerja (16-460) nmol/l. Jadi, bila diinginkan penentuan pada konsentrasi yang lebih



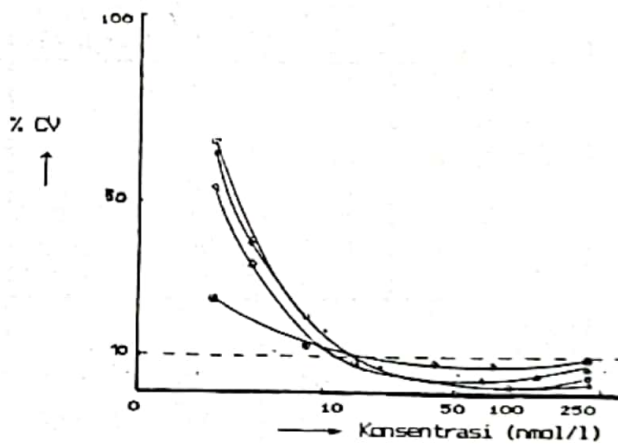
(a)



(a)



(b)



(b)

Keterangan:

□ = 5 µg/ml Ab; X = 10 µg/ml Ab; ● = 15 µg/ml Ab;  
△ = 25 µg/ml Ab.

Gambar 2. Kurva baku (a) dan profil presisi (b) untuk berbagai konsentrasi anti-bodi

Keterangan:

= 10 µl larutan baku; = 20 µl larutan baku;  
= 25 µl larutan baku; = 50 µl larutan baku;

Gambar 3. Kurva baku (a) dan profil presisi (b) untuk berbagai volume larutan baku.

tinggi, inkubasi sebaiknya dilakukan selama 24 jam pada suhu kamar (25°C). Hasil selengkapannya dapat dilihat pada Tabel 6.

Hasil pengujian kinerja penentuan dapat dilihat pada Tabel 7. Data percobaan menunjukkan bahwa penggunaan kit-RIA tabung bersalut memberikan nilai ikatan non spesifik (NSB) berkisar antara (2,6 ± 0,27)%, ikatan maksimum (Bo/T): (64,2 ± 1,7)%. Konsentrasi 50% B/Bo (Ed 50): (51,2 ± 2,2) nmol/l diperoleh dari 10 kali penentuan. Penentuan cuplikan kontrol antar

assay memberikan hasil (48,1 ± 1,4) nmol/l untuk cuplikan kontrol kadar rendah (90,3 ± 2,9) nmol/l untuk cuplikan kontrol kadar menengah dan (170,5 ± 4,7) nmol/l untuk cuplikan kontrol kadar tinggi. Untuk kit RIA-T<sub>4</sub> cara magnetik produksi BATAN/Amersham diperoleh nilai NSB: (4,3 ± 1,1)%, Bo/T: (60,3 ± 2,0)%, Ed 50: (56,8 ± 3,2) nmol/l, dan untuk cuplikan kontrol memberikan nilai: (45,7 ± 2,8) nmol/l, (94,6 ± 3,5) nmol/l dan (179,8 ± 8,5) nmol/l berturut-turut untuk kadar rendah, menengah, dan



Tabel 6. Hasil optimasi penentuan untuk memperoleh kepekaan analisis yang diinginkan

| Parameter                                | Bo/T (%) | Ed 50 (nmol/l) | Batas profil presisi nmol/l |
|--|----------|----------------|-----------------------------|
| Konsentrasi antibodi ( $\mu\text{g/l}$ ) |          |                |                             |
| 5  | 31,3     | 30             | 10-170                      |
| 10                                       | 54,6     | 43             | 12,5-225                    |
| 15                                       | 61,1     | 49             | 13-850                      |
| 25                                       | 67,0     | 105            | 32-500                      |
| Volume larutan baku ( $\mu\text{l}$ )    |          |                |                             |
| 10                                       | 69,3     | 58             | 13,5-600                    |
| 20                                       | 66,9     | 51             | 12,5-800                    |
| 25                                       | 53,6     | 43             | 11,0-380                    |
| 50                                       | 30,4     | 35             | 15,0-260                    |
| Waktu inkubasi pada 25°C (jam)           |          |                |                             |
| 1  | 35,7     | 30             | 9,0-400                     |
| 3  | 38,8     | 44             | 12,0-250                    |
| 6  | 62,9     | 55             | 24,0-380                    |
| 24                                       | 67,4     | 52,5           | 14,0-780                    |
| Waktu inkubasi pada 37°C (jam)           |          |                |                             |
| 1  | 45       | 43             | 13,5-550                    |
| 2  | 59,4     | 55             | 16,0-460                    |
| 3  | 54,9     | 81             | 39,0-440                    |

Tabel 7. Hasil penentuan besaran karakteristik Kit-RIA  $T_4$  metode tabung bersalut dan metode magnetik

| Besaran karakteristik | Tabung bersalut (PPTN) | Cara magnetik (BATAN/Amersham) |
|-----------------------|------------------------|--------------------------------|
| NSB (%)               | $2,6 \pm 0,3$          | $4,3 \pm 1,1$                  |
| Bo/T (%)              | $64,2 \pm 1,7$         | $60,3 \pm 2,0$                 |
| Ed 50 (nmol/l)        | $51,2 \pm 2,2$         | $56,8 \pm 3,2$                 |
| QC A (nmol/l)         | $48,1 \pm 1,4$         | $45,7 \pm 2,8$                 |
| QC B (nmol/l)         | $90,3 \pm 2,9$         | $94,6 \pm 3,5$                 |
| QC C (nmol/l)         | $170,5 \pm 4,7$        | $179,8 \pm 4,7$                |
| IP (nmol/l)           | 15 - 2600              | 3,0 - 1400                     |

tinggi. Dari hasil pengujian kinerja penentuan dapat disimpulkan bahwa kedua kit tersebut mempunyai persamaan karena tidak menunjukkan perbedaan yang nyata.

Hasil uji kestabilan menunjukkan bahwa untuk jangka waktu 5 bulan, tabung bersalut tersebut masih cukup stabil. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil uji kestabilan

| Lama penyimpanan (bulan) | NSB (%) | Bo/T (%) |
|--------------------------|---------|----------|
| 0                        | 2,6     | 67,2     |
| 0,5                      | 2,4     | 68,3     |
| 1                        | 2,9     | 58,1     |
| 1,5                      | 2,2     | 57,9     |
| 2                        | 2,7     | 61,4     |
| 2,5                      | 2,8     | 54,8     |
| 3                        | 2,9     | 49,3     |
| 5                        | 3,1     | 51,4     |

#### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Imobilisasi antibodi  $T_4$  secara kimia dapat dilakukan pada dinding tabung plastik yang sebelumnya telah dilapisi dengan glutaraldehid.
2. Kondisi pelapisan tabung yang optimal diperoleh dengan menggunakan larutan glutaraldehid 2,5% pH 9-9,5 yang diinkubasikan pada tabung selama 72 jam pada suhu 37°C, kadar antibodi  $T_4$  yang digunakan 15  $\mu\text{g/ml}$ , diinkubasikan pada pH 8-8,5 selama 72 jam pada suhu 25°C.
3. Hasil pengujian kinerja penentuan memberikan nilai NSB: ( $2,6 \pm 0,3$ )%, Bo/T: ( $64,2 \pm 1,7$ )%, Ed 50: ( $51,1 \pm 2,2$ )nmol/l, penentuan cuplikan kontrol antar assay memberikan hasil ( $48,1 \pm 1,4$ ) nmol/l, ( $90,3 \pm 2,9$ ) nmol/l, ( $170,5 \pm 4,7$ ) nmol/l berturut-turut untuk kadar rendah, menengah, dan tinggi.
4. Hasil analisis yang diperoleh dengan metode pemisahan tabung bersalut memenuhi persyaratan untuk penentuan RIA- $T_4$ , dan bila dibandingkan dengan hasil analisis menggunakan kit komersial tidak memberikan perbedaan yang nyata.
5. Uji kestabilan menunjukkan bahwa untuk penyimpanan selama lebih kurang 5 bulan masih memberikan hasil yang cukup baik.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Catt. Kevin; Tregear, G., Solid phase radioimmunoassay in antibody coated tubes, Science 158, Department of Medicine, Australia (1967) 1570-1571
2. Chard, T., An introduction to radioimmunoassay and related technique, T.S Work and E. Work, Elsevier Biochemical Press, Amsterdam (1986) 5-10, 56,169.
3. Edward, R., Solid phase radioimmunoassay, Regional Training Course on Production and Use of Bulk Reagen for RIA of Thyroid Hormones, Bangkok, Thailand (1986).
4. Gembicki, M., Polanska, A., Kosowicz, J., T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> solid phase RIA with the spesific antibodies isolated by affinity chromatography, Proceeding of an International Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, IAEA, Viena (1982) 95.
5. Klitzing, I., Comparison between adsorption and covalent coupling of proteins to solid phase using different polymers as support, Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, IAEA, Viena (1982) 57-66