

## PEMBUATAN KIT-RIA T<sub>4</sub> FASE PADAT COATED TUBE

Nanny Kartini H., Ratnawati K., Daniel Santoso, Mimin R.  
Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

### ABSTRAK

PEMBUATAN KIT-RIA T<sub>4</sub> FASE PADAT COATED TUBE. Kit RIA-T<sub>4</sub> *Coated tube* dibuat dengan mengikatkan IgG-anti-T<sub>4</sub> hasil isolasi, pada dinding dalam tabung reaksi polistiren secara adsorpsi (fisika). Penentuan karakteristik *coated tube* meliputi : *assay design* (dipelajari faktor-faktor yang mempengaruhinya) penentuan besaran-besaran karakteristik, tes keparalelan (parallelism test) dan mempelajari kestabilannya selama penyimpanan. Dengan kondisi penentuan yang optimal, diperoleh besaran-besaran karakteristik kit-RIA T<sub>4</sub> *coated tube*-PPTN (yang dibuat), ialah sebagai berikut: ikatan maksimum 62,3 ± 7,1 %, serum kontrol rendah (QC-A) 40,3 ± 8,1 nmol/l, serum kontrol normal (QC-B) 70,2 ± 10,3 nmol/l dan serum kontrol tinggi (QC-C) 156,1 ± 6,9 nmol/l. Sedangkan kadar pada 20% ikatan spesifik (ED-20) = 190,5 ± 28,7 nmol/l, pada 50% (ED-50) = 53,4 ± 10,3 nmol/l dan pada 80% (ED-80) = 19,7 ± 4,8 nmol/l. Penyimpanan selama 9 bulan dalam keadaan kering pada 4 °C, tidak banyak mengubah karakteristik dari Kit-RIA T<sub>4</sub> tersebut.

### ABSTRACT

PREPARATION OF SOLID COATED TUBE T<sub>4</sub> RADIOIMMUNOASSAY KITS. T<sub>4</sub> - radioimmunoassay coated tube kits were prepared by physical adsorption of purified anti-T<sub>4</sub> IgG onto the walls of polystyrene tubes. In the present study characteristic parameters of the coated tube were determined including factors which exert influence on assay design, parallelism test and stability studies. Under optimum assay conditions the following values were obtained: 62,3 ± 7,1 % for maximum binding, 40,3 ± 8,1 nmol/l for low quality control serum (QC), 70,2 ± 10,3 nmol/l for normal QC serum and 156,1 ± 6,9 nmol/l for high QC serum. Values of ED-20, ED-50 and ED-80 were found to be 190,5 ± 28,7 nmol/l, 53,4 ± 10,3 nmol/l and 19,7 ± 4,8 nmol/l respectively. The storage during nine months at 4 °C in dry condition did not change its kit-RIA T<sub>4</sub> characteristics.

### PENDAHULUAN

Keberadaan *Kit Radioimmunoassay* (Kit-RIA) fase padat memberikan banyak kemudahan dan keuntungan dari pada Kit-RIA fase cair, karena kit ini umumnya tidak memerlukan alat sentrifuga pada proses pemisahan fraksi antigen-antibodi dari fraksi antigen bebasnya. Selain itu analisis dapat dilakukan lebih praktis [1].

Kit-RIA fase padat umumnya dibuat dengan mengikatkan antibodi baik primer maupun sekunder, pada suatu bahan padat atau *solid-phase* yang dapat berupa butir plastik (micro atau macro immobilized beads), tabung plastik atau *coated tube* dan butir-butir magnetik [1,2].

Dalam suatu sistem *coated tube*, antibodi primer atau sekunder diikatkan pada dinding bagian dalam tabung reaksi plastik, dan kompleks antigen-antibodi akan berada pada dinding tabung, sedangkan fraksi bebasnya tetap berada dalam supernatan.

Jadi hanya dengan menuangkan supernatannya, fraksi bebas sudah dapat dipisahkan dari fraksi terikat [1,3].

Kit-RIA *coated tube* dalam penelitian ini dibuat dengan cara mengikatkan atau menempelkan antibodi primer pada dinding tabung reaksi plastik (polistiren) secara fisika (adsorpsi). Sebelumnya antibodi diisolasi IgG-anti T<sub>4</sub> dari antisera anti-T<sub>4</sub> dengan cara kromatografi afinitas memakai protein-A sepharosa CL-4B sebagai kolom [1].

Imobilisasi IgG-anti-T<sub>4</sub> dilakukan dengan kadar berkisar antara 8-10 µg/tabung dalam dapar EDTA 0,008 M pH=8,0 diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu kamar [1].

Di dalam merakit suatu kit RIA, tahap *assay design* (rancangan penentuan) adalah pekerjaan yang sangat penting, karena ini merupakan salah satu tahap pekerjaan yang akan menentukan kualitas kit RIA tersebut.

Dalam penelitian ini akan dipelajari rancangan penentuan bagi kit-RIA *coated tube* T<sub>4</sub> yang dibuat, serta diamati juga parameter yang berpengaruh terhadap *assay design* tersebut, a.l.: jumlah ANS ( $\alpha$ -anilin naftalen sulfonat) yang terkandung dalam larutan antigen bertanda (<sup>125</sup>I-T<sub>4</sub>), jumlah atau volume antigen

tidak bertanda (standar  $T_4$ ), waktu dan suhu inkubasi pada saat penentuan tersebut.

Karakteristik suatu kit RIA ditentukan oleh besaran-besaran karakteristik yang menunjukkan kehandalan dari kit RIA tersebut. Yang dimaksud dengan besaran karakteristik kit-RIA, adalah besarnya ikatan maksimum, penunjukkan kadar serum kontrol, baik yang rendah, normal maupun tinggi dan besarnya kadar yang ditunjukkan oleh kurva standar pada 20%, 50% dan 80% B/Bo (persentase perbandingan antara ikatan spesifik dengan ikatan maksimum), biasa disebut dengan ED-20, ED-50 dan ED-80. Kehandalan kit RIA biasanya ditentukan dengan membandingkan kit-RIA yang dibuat dengan kit-RIA komersial lain yang sudah mantap. Selain itu juga kestabilan kit RIA dalam jangka waktu tertentu merupakan indikasi kemantapan dari kit-RIA itu. Dalam penelitian ini dilakukan penentuan besaran-besaran karakteristik, tes keparalelan (parallelism test), dan penentuan kestabilan dari kit-RIA  $T_4$ , yang dibuat.

#### BAHAN DAN PERALATAN

Bahan yang digunakan adalah, natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), natrium hidoksida, asam klorida, garam natrium-EDTA, bovine serum albumin (BSA), dan ANS ( $\alpha$ -anilino naphthalene sulphonic acid) semuanya mempunyai kualitas untuk analisis buatan E.Merk.

IgG-anti- $T_4$  hasil isolasi dari antisera- $T_4$  menggunakan protein-A sepharosa CL-4B dengan kadar tertentu yang dipersiapkan di PPTN [1]. Tabung plastik polistiren buatan Taiwan, dan Kit-RIA  $T_4$  coated tube buatan DPC-USA, Kit-RIA  $T_4$  cair (DA) buatan Amersham, larutan standar Kit-RIA  $T_4$ , larutan antigen-bertanda  $T_4$  ( $^{125}\text{I}-T_4$ ), dan serum kontrol  $T_4$  rendah, normal dan tinggi buatan PPTN.

Alat yang digunakan adalah alat pencacah saluran tunggal (Mini Assay, tipe 620), inkubator merek Memmert dan pH-meter merek Beckman tipe Zeromatic-SS-3.

#### TATA KERJA

##### Penyalutan tabung polistirene dengan IgG-anti- $T_4$

Larutan IgG-anti- $T_4$  hasil isolasi yang telah diketahui kadarnya diencerkan dengan dapar EDTA 0,008 M pH.8,00, sampai kadar antara 8-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . pH larutan kemudian diatur dengan larutan natrium hidoksida 0,1 N, atau HCl 0,1 N supaya tetap 8,00.

Ke dalam sejumlah tabung plastik (500-1000 buah) dimasukkan masing-masing 1010  $\mu\text{l}$  larutan IgG-anti- $T_4$  tersebut dan diinkubasi pada temperatur kamar selama 2x24 jam. Setelah itu larutan dibuang tabung-tabung dicuci dengan 3x1 ml NaCl 0,9%. Pada tiap tabung dimasukkan 1 ml larutan BSA 5% dalam NaCl 0,9% dan dibiarkan pada temperatur kamar selama satu jam. Kemudian tabung dicuci masing-masing 3x 1 ml dengan NaCl 0,9% dan dikeringkan. Tabung-tabung ini siap untuk digunakan dalam percobaan selanjutnya.

##### Assay design (Rancangan penentuan)

Dicari kondisi penentuan yang optimal, sambil dipelajari faktor-faktor yang mempengaruhinya.

##### Protokol penentuan yang umum

Sejumlah tertentu antigen- $T_4$  tidak bertanda, seperti standar- $T_4$ , serum kontrol ataupun serum cuplikan, dimasukkan ke dalam coated tube yang akan dianalisis. Kemudian ditambah 1000  $\mu\text{l}$  antigen- $T_4$  bertanda iodium-125 dalam dapar fosfat 0,05 M pH 7,40 yang mengandung sejumlah ANS, dan mempunyai aktivitas sekitar 2000 cpm/ml. Setelah itu diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Kemudian larutan dibuang, tabung dicuci tiga kali masing-masing dengan 1 ml NaCl 0,9%, ditiadakan dan dicacah.

##### Pengaruh kadar ANS dalam larutan $^{125}\text{I}-T_4$ (Ag-bertanda) terhadap ikatan maksimum.

Penentuan besarnya ikatan maksimum dilakukan menggunakan 50  $\mu\text{l}$  larutan standar nol dan 1 ml larutan Ag-bertanda yang mengandung beberapa macam kadar ANS yaitu 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 dan 5  $\text{mg}/\text{ml}$  larutan. Inkubasi dilakukan satu malam pada temperatur kamar, kemudian tabung dicuci dengan 3x 1 ml NaCl 0,9% dan dicacah.

Setelah diketahui jumlah ANS yang terbaik, yaitu yang memberikan ikatan maksimum tertinggi, percobaan diulangi menggunakan ANS, dengan kadar yang lebih kecil; 0, 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  perunut (tracer).

##### Pengaruh kadar / volume antigen tidak bertanda ( $T_4$ ) terhadap penentuan

Penentuan dilakukan dengan bermacam-macam volume larutan standar, yaitu 10, 25 dan 50  $\mu\text{l}$ . Antigen bertanda yang digunakan tetap 1 ml dan mengandung ANS 100  $\mu\text{g}$ . Inkubasi dilakukan satu malam pada suhu kamar, dan kurva standar masing-masing penentuan dibandingkan.

#### *Pengaruh waktu dan suhu inkubasi dalam penentuan $T_4$ coated tube*

Setelah diketahui jumlah antigen tidak bertanda (10  $\mu$ l) dan kadar ANS (100  $\mu$ g/ml tracer) yang optimal, maka penentuan dilakukan dengan memvariasikan waktu dan suhu inkubasi, yaitu ; 1 dan 2 jam pada 37 °C, dan satu malam pada temperatur kamar.

Kemudian kurva standar dari masing-masing percobaan tersebut dibandingkan.

#### *Penentuan daerah kerja dan besaran karakteristik Kit-RIA $T_4$ coated tube*

Dari kurva standar yang diperoleh setelah dilakukan penentuan dengan *coated tube* tersebut, dihitung besarnya koefisien variasi (% C/V). Kurva yang dibuat antara % C/V dan kadar  $T_4$  dapat menunjukkan daerah kerja dari Kit-RIA  $T_4$  coated tube yang dianalisis.

Dicoba beberapa kali penentuan dengan *coated tube* tersebut, kemudian dari hasilnya dapat dihitung besaran-besaran karakteristiknya, seperti ; ikatan maksimum, penunjukan kadar untuk serum kontrol, dan kadar pada 20 % B/Bo (ED-20), pada 50 % B/Bo (ED-50) dan pada 80 % B/Bo (ED-80).

#### *Penentuan keparalelan Kit-RIA $T_4$ coated tube*

Tes keparalelan dilakukan dengan membuat tigamacam pengenceran dari serum kontrol tinggi (QC-H), memakai standar nol, yaitu 1:1, 1:3 dan 1:7. Kemudian kadar  $T_4$  dari masing-masing pengenceran tadi ditentukan dengan penentuan- $T_4$  coated tube.

Hasilnya digambarkan dalam suatu kurva ( % B/Bo v/s kadar  $T_4$  ) dan dibandingkan bentuknya dengan kurva standar.

#### *Penetapan kehandalan Kit-RIA $T_4$ coated tube*

Empat macam percobaan yang dilakukan untuk mengetahui kehandalan Kit-RIA *coated tube* :

##### *Perbandingan kurva standar*

Kurva standar dari Kit-RIA  $T_4$  coated tube yang dibuat, dibandingkan dengan kurva standar Kit-RIA  $T_4$  komersial lain, seperti: Kit-RIA  $T_4$  coated tube buatan DPC-USA, dan Kit-Cair DA (double antibody-PEG) dari Amersham- Inggris.

Kurva standar antara % B/Bo v/s kadar- $T_4$  hasil dari masing-masing kit-RIA tersebut dibandingkan dan dianalisis.

##### *Perbandingan penentuan kadar serum kontrol*

Serum kontrol rendah (QC-Low), normal (QC-Normal) dan tinggi (QC-High) buatan PPTN ditentukan kadarnya menggunakan Kit-

RIA  $T_4$  coated tube PPTN, Kit-RIA  $T_4$  coated tube DPC-USA dan *coated tube* PPTN dan standar  $T_4$  buatan DPC. Hasilnya dibandingkan.

##### *Perbandingan penentuan serum cuplikan*

Tiga macam serum cuplikan ditentukan menggunakan tiga macam Kit-RIA  $T_4$  , yaitu : D.A-Netria (double- antibody), *coated tube*-PPTN dan *coated tube*-PPTN tetapi standar-DPC. Hasilnya dibandingkan.

##### *Kestabilan Kit-RIA $T_4$ coated tube PPTN dalam penyimpanan*

Tabung-tabung yang telah disalut dengan IgG-anti  $T_4$  disimpan pada temperatur 4 °C dalam keadaan kering. Pada perioda waktu tertentu besaran-besaran karakteristiknya ditentukan, sehingga terlihat seberapa lama kestabilannya.

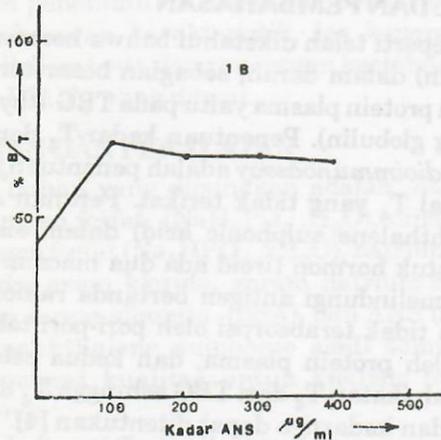
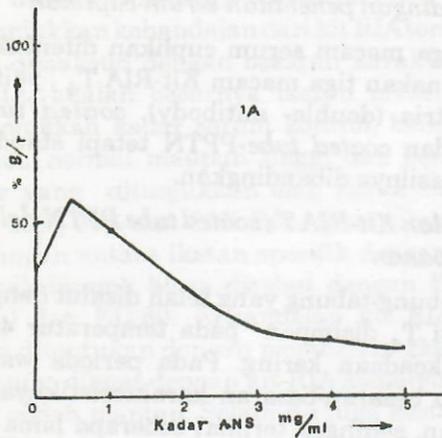
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Seperti telah diketahui bahwa hormon  $T_4$  (tiroksin) dalam darah, sebagian besar terikat dengan protein plasma yaitu pada TBG (thyroid binding globulin). Penentuan kadar- $T_4$  dengan cara *radioimmunoassay* adalah penentuan jumlah total  $T_4$  yang tidak terikat. Peranan ANS ( $\alpha$ -naphthalene sulphonic acid) dalam sistem RIA untuk hormon tiroid ada dua macam: pertama, melindungi antigen bertanda radioaktif supaya tidak terabsorpsi oleh pori-pori tabung atau oleh protein plasma, dan kedua sebagai pemecah ikatan  $T_4$  dari TBG sehingga  $T_4$  dapat bebas dan kadarnya dapat ditentukan [4].

Karena sedemikian pentingnya peranan ANS itu, sehingga kadarnya dalam suatu sistem RIA harus tepat dan dapat memberikan hasil yang paling baik.

Gambar 1A dan 1B menunjukkan sejauh mana pengaruh ANS terhadap besarnya ikatan spesifik (% B/T) dari kit-RIA *coated tube* yang sedang dirakit. Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa kadar optimal ANS adalah 100  $\mu$ g untuk tiap ml larutan antigen bertanda.

Besarnya antigen tidak bertanda dalam suatu sistem RIA mempengaruhi kinerja (performance) kurva standar dari sistem tersebut. Dalam percobaan merakit suatu kit-RIA, jumlah antigen yang optimal dalam penentuan sangat diperlukan. Pada Gambar 2 terlihat pengaruh antigen tersebut pada kit-RIA  $T_4$  coated tube - PPTN. Jumlah standar (antigen tidak bertanda) yang optimal dalam penelitian ini adalah 10  $\mu$ l. Gambar 2 juga menunjukkan kalau volume standar sebanyak 25  $\mu$ l dan 50  $\mu$ l, maka kurva standar yang terbentuk tidak baik.



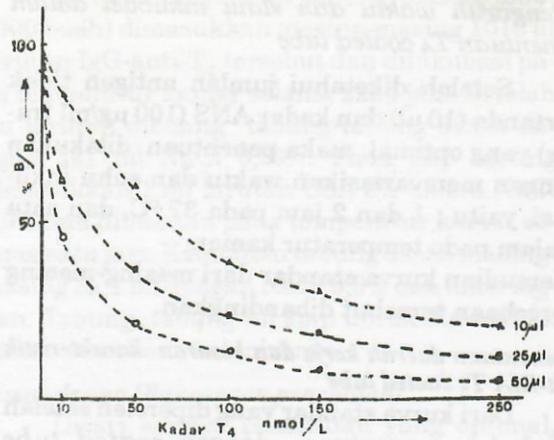
Gambar 1. (A+B) Pengaruh kadar ANS yang terkandung dalam larutan  $^{125}\text{I-T}_4$  terhadap persen ikatan spesifik (% B/T).

Hal ini dapat dilihat, kalau besar ikatan 50%  $B/B_0$ , maka besarnya kadar yang diperoleh jauh di bawah 50 nmol/l.

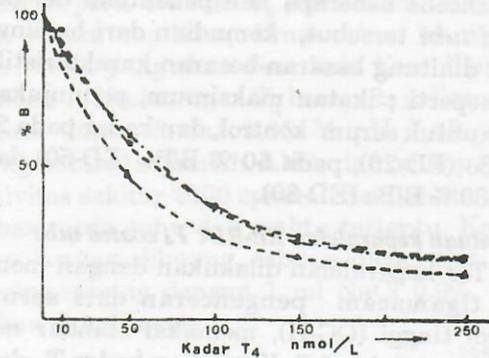
Sedangkan kurva standar yang ideal, pada ikatan 50%  $B/B_0$  tersebut harus menunjukkan kadar  $T_4$  pada daerah normal (50 - 80 nmol/l).

Pada Gambar 3 terlihat pengaruh dari lamanya waktu dan tingginya suhu inkubasi. Dicoba 3 macam kondisi inkubasi yaitu semalam pada suhu kamar, satu jam pada 37 °C dan dua jam pada 37 °C.

Ternyata parameter ini hanya sedikit mempengaruhi hasil (kinerja penentuan). Hasil yang terbaik diperoleh dengan inkubasi selama satu malam pada temperatur kamar. Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa ketiga



Gambar 2. Pengaruh jumlah/volume larutan standar  $T_4$  terhadap kinerja (performance) kurva standar Kit-RIA  $T_4$  coated tube PPTN.



Gambar 3. Pengaruh waktu dan suhu inkubasi assay terhadap kinerja (performance) kurva standar Kit RIA- $T_4$  coated tube.

kondisi inkubasi tersebut dapat dilakukan sesuai dengan kebutuhan pemakai.

Besaran-besaran karakteristik kit-RIA  $T_4$  coated tube yang diperoleh dari 10 kali pengulangan pada kondisi penentuan seperti tercantum pada Tabel 1, menunjukkan bahwa kit-RIA ini cukup baik dengan harga besaran karakteristiknya seperti dicantumkan dalam Tabel 2.

Dari hasil penentuan dengan kondisi seperti termuat dalam Tabel 1 dapat diketahui sejauh mana daerah kerja dari kit-RIA ini yang masih memberikan hasil baik dengan kesalahan yang masih dapat diterima (ditunjukkan dengan persen koefisien variasi).

Gambar 4 menunjukkan daerah kerja yang dicapai oleh kit-RIA ini adalah dari kadar  $T_4$  10 - 300 nmol/l, masih tetap memberikan koefisien variasi di bawah 10%.

Kehandalan kit-RIA  $T_4$  coated tube PPTN diuji dengan bermacam-macam percobaan.

Tabel 1. Protokol assay kit-RIA  $T_4$  coated tube PPTN yang terbaik.

No. Tabung	Nama Tabung	$^{125}I-T_4$	Standar	QC-serum	Cuplikan
1 + 2	TRA	1000 $\mu$ l	-	-	-
3 + 4	standar 0 **	1000 $\mu$ l	10 $\mu$ l	-	-
5 + 6	standar 10	1000 $\mu$ l	10 $\mu$ l	-	-
7 + 8	standar 50	1000 $\mu$ l	10 $\mu$ l	-	-
9 + 10	standar 100	1000 $\mu$ l	10 $\mu$ l	-	-
11 + 12	standar 150	1000 $\mu$ l	10 $\mu$ l	-	-
13 + 14	standar 250	1000 $\mu$ l	10 $\mu$ l	-	-
15 + 16	QC-rendah	1000 $\mu$ l	-	10 $\mu$ l	-
17 + 18	QC-normal	1000 $\mu$ l	-	10 $\mu$ l	-
19 + 20	QC-tinggi	1000 $\mu$ l	-	10 $\mu$ l	-
21 - dst.	cuplikan	1000 $\mu$ l	-	-	10 $\mu$ l

vortex, dan inkubasi semalam pada temperatur kamar.

besoknya larutan dibuang kecuali tabung TRA dan tabung dicuci dengan 3 x 1 ml NaCl 0,9 %, kemudian tabung dicacah

\*\* satuan larutan standar = nmol/l.

Tabel 2. Besaran-besaran karakteristik Kit-RIA  $T_4$  coated tube.

No.	Nama besaran		Harga
1	Ikatan maksimum	B/T	62,3 $\pm$ 7,1 %
2	Serum kontrol rendah	QC-A	40,3 $\pm$ 8,1 nmol/l
3	Serum kontrol normal	QC-B	70,2 $\pm$ 12,6 nmol/l
4	Serum kontrol tinggi	QC-C	156,1 $\pm$ 6,9 nmol/l
5	Kadar pada ikatan 20 %	ED-20	190,5 $\pm$ 28,7 nmol/l
6	Kadar pada ikatan 50 %	ED-50	53,4 $\pm$ 10,3 nmol/l
7	Kadar pada ikatan 80 %	ED-80	19,7 $\pm$ 4,8 nmol/l

Hasil diperoleh dari 10 kali pengulangan.

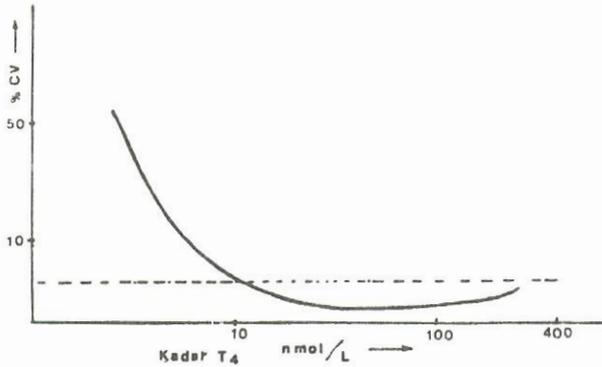
Yang pertama dengan tes keparalelan (paralelism test). Melalui percobaan ini dapat diketahui coated tube yang dibuat cocok atau tidak dengan matriks standar  $T_4$  yang sudah biasa diproduksi di PPTN-BATAN. Gambar 5 menunjukkan hasil dari percobaan ini, di mana QC-C (serum kontrol tinggi) diencerkan beberapa kali dengan matriks standar (standar 0).

Setelah dibandingkan dengan kurva standar, ternyata kurva hasil pengenceran ini memberikan kurva yang sejajar. Ini menunjukkan bahwa sistem coated tube yang dibuat cocok dengan standar  $T_4$  PPTN.

Uji kehandalan yang kedua yaitu membandingkan kurva standar dari coated tube PPTN dengan kurva standar kit RIA coated tube DPC-USA dan kit-RIA cair-DA dari Amersham. Hasilnya menunjukkan bahwa kurva standar

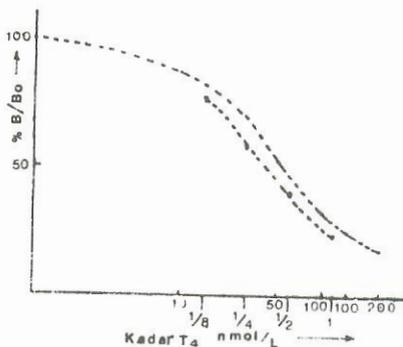
dari ketiga kit tersebut sangat mirip (Gambar 6). Demikian juga penentuan serum kontrol (QC-PPTN) dengan kit-RIA coated tube PPTN memberikan nilai  $T_4$  yang berada dalam daerah kadar serum kontrol PPTN (Tabel 3). Sedangkan kalau standar yang digunakan dari DPC dan tabung PPTN, memberikan hasil yang kurang memuaskan.

Sedangkan percobaan yang ketiga adalah penentuan kadar serum cuplikan. Tiga macam serum cuplikan ditentukan dengan tiga macam kit-RIA, yaitu kit-RIA coated tube PPTN, kit-RIA cair-DA Netria dan kombinasi antara coated tube PPTN sedangkan standar dari DPC. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4. Dari hasil terlihat bahwa standar DPC kurang cocok bila digunakan dengan coated tube PPTN.



Gambar 4. Kurva daerah kerja Kit-RIA  $T_4$  fase padat (coated tube).

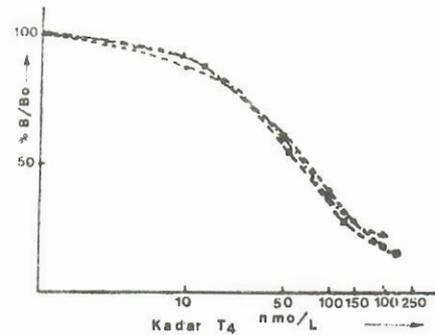
Percobaan yang terakhir adalah uji kestabilan. Kit-RIA  $T_4$  coated tube PPTN itu disimpan pada temperatur 4 °C dalam keadaan kering, dan pada periode waktu tertentu ditentukan kembali besaran-besaran karakteristiknya. Dari percobaan ini dapat diketahui sejauh mana kestabilan kit-RIA coated tube tadi pada penyimpanan, dan ini sangat penting untuk menentukan batas daluwarsanya. Pada Tabel 5 dapat terlihat bahwa Kit-RIA fase padat ini



Gambar 5. Kurva hasil tes keparalelan.

setelah disimpan 9 bulan masih tetap memberikan hasil yang baik, kecuali nilai ED-80 menunjukkan hasil yang lebih kecil dari pada sebelumnya.

Hal ini sesuai dengan sifat dari Kit-RIA ini seperti terlihat pada kurva daerah kerja (Gambar 4), di mana pada daerah kadar  $T_4$  rendah (nmol/l) akan memberikan hasil analisis yang kurang akurat seperti ditunjukkan oleh nilai % C/V yang lebih besar dari 10%. Selain itu juga terlihat pada Tabel 5, besarnya ikatan maksimum dari waktu ke waktu agak menurun, hal ini disebabkan oleh perbedaan kualitas antigen bertanda yang tersedia di PPTN.



Gambar 6. Perbandingan kurva standar dari 3 macam kit-RIA  $T_4$ .

: coated tube PPTN  
: coated tube DPC  
: Kit-cair DA Amersham

Tabel 3. Perbandingan hasil penentuan serum kontrol (QC-PPTN) oleh dua macam kit-RIA  $T_4$ .

Kit-RIA $T_4$	QC-rendah nmol/l	QC-normal nmol/l	QC-tinggi nmol/l
DA-PPTN	26,3 - 42,7	59,4 - 75,6	123,1-193,2
coated tube PPTN	40,3	70,2	156,1
coated tube DPC	29,2	58,4	117,8
tab.PPTN-stan. DPC	21,2	41,7	160,2

## KESIMPULAN

Dari hasil percobaan dapat ditarik beberapa kesimpulan :

1. Kit-RIA  $T_4$  fase padat dapat dibuat dengan menempelkan Ig-G anti- $T_4$  hasil isolasi dengan kadar 8-10  $\mu\text{g}/\text{tabung}$ , pada tabung polistirene.
2. Besaran-besaran karakteristik yang diperoleh setelah dilakukan optimasi kondisi assay adalah sebagai berikut: ikatan maksimum  $62,3 \pm 7,1 \%$ , kadar serum kontrol rendah (QC-A)=  $40,3 \pm 8,1 \text{ nmol/l}$ , kontrol normal (QC-B)= $70,2 \pm 10,3 \text{ nmol/l}$ , kontrol tinggi  $156,1 \pm 6,9 \text{ nmol/l}$ . Sedangkan ED-20 =  $190,5 \pm 28,7 \text{ nmol/l}$ , ED-50 =  $53,4 \pm 10,3 \text{ nmol/l}$  dan ED-80 =  $19,7 \pm 4,8 \text{ nmol/l}$ .
3. Dari studi perbandingan dengan Kit-RIA  $T_4$  lain seperti, kit-RIA  $T_4$  coated tube DPC-USA, maupun dengan kit-RIA cair (DA) Netria atau Amersham, memberikan hasil yang mirip atau hampir sama.

Tabel 4. Perbandingan hasil penentuan serum cuplikan dengan 3 macam Kit-RIA T<sub>4</sub>.

Kit-RIA T <sub>4</sub>	Serum 1 nmol/l	Serum 2 nmol/l	Serum 3 nmol/l
DA-NETRIA	124,6	179,1	138,8
Coated tube	125,3	187,9	123,9
PPTN			
Coated tube	110,7	203,8	103,1
PPTN/Std.			
DPC			

4. Kestabilan kit-RIA T<sub>4</sub> ini setelah disimpan dalam keadaan kering selama 9 bulan, masih tetap memberikan hasil yang baik, kecuali pada daerah kadar T<sub>4</sub> yang rendah hasilnya kurang akurat.

Tabel 5. Penentuan kestabilan kit-RIA T<sub>4</sub> coated tube PPTN.

Besaran karakteristik Kit-RIA fase padat	Waktu penyimpanan Bulan ke .....		
	0	1	9
I. Ikatan Maksimum (%)	62,3 ± 7,0	57,5 ± 3,1	48,1
II. Ikatan serum QC (nmol/l)			
* Serum kontrol rendah	40,3 ± 8,1	40,8 ± 11,0	38,3
* Serum kontrol normal	70,2 ± 12,6	68,5 ± 10,0	76,0
* Serum kontrol tinggi	156,1 ± 6,9	143,0 ± 33,6	143,0
III. Kadar pada B/B <sub>0</sub> (nmol/l)			
* ED-20	190,5 ± 28,7	199,4 ± 29,4	234,4
* ED-50	53,4 ± 10,3	54,2 ± 8,7	51,6
* ED-80	19,7 ± 4,8	16,8 ± 2,2	9,6

#### DAFTAR PUSTAKA

1. NANNY, K. HANAFIAH dkk, "Imobilisasi anti-T<sub>4</sub> ; isolasi imunogamaglobulin anti-T<sub>4</sub> dari antisera", Seminar Pendayagunaan Reaktor Untuk Kesejahteraan Masyarakat, PPTN-BATAN, Bandung, 26-27 (September 1990).
2. CANTARERO, L.A., BUTLER, J.E. and OSBORNE, J.W. The Characteristic of Proteins for Polystyrene and Their Significance in Solid-Phase Immunoassays, Analytical Biochemistry 105 (1980) 375-382.
3. CATT, K.J., G.W.TREGGEAR, H.G.BURGER, Radioimmunoassay of Polipeptide Hormones in Antibodi-Coated Tubes, IAEA-SM-124/62.
4. THORELL, J.I., S.M. LARSON, Radioimmunoassay and Related Techniques, The C.V.Mosby Company, Saint Louis [1978].

#### DISKUSI

##### Sukiyati Dj. :

1. Apakah NSB ( tanpa antibodi T<sub>4</sub> ) perlu dilakukan ?
2. Mengapa dalam penentuan kadar T<sub>4</sub> yang rendah tidak masuk dalam range kadar yang ditentukan ( QC sera rendah ) ?
3. Berapa lamakah stabilitas coated tube yang telah dibuat ?

##### Nanny Kartini H.:

1. Biasanya dalam suatu Kit-RIA fase padat *coated tube* tidak dilengkapi dengan tabung NSB ( tabung tanpa IgG-anti T<sub>4</sub>) jadi NSB bukan suatu keharusan untuk Kit-RIA jenis ini. Tetapi walaupun demikian pada percobaan kami sebelumnya ( tahun lalu) NSB ini dilakukan juga pada saat mencari kondisi optimum dari imobilisasi, dan ternyata NSB < 1 %.
2. Ini sesuai dengan karakteristik/sifat dari *coated tube* , yang dapat dilihat pada gambar daerah kerja. Disini ditunjukkan bahwa pada daerah kadar rendah ( < 10 nmol/l) mempunyai presisi yang rendah ( % CV > 10 % ). Jadi kemungkinan terjadinya kesalahan pada daerah kadar rendah lebih besar.
3. Sampai bulan September 1991 ini, sudah tersimpan selama 9 bulan, dan besaran-besaran karakteristiknya tidak mengalami perubahan yang berarti.

**Endang Kumolowati :**

Bagaimana uji kestabilan suatu kit itu pada umumnya, agar dapat diantisipasi sampai waktu tertentu ( umurnya). Karena kalau untuk obat-obatan dapat melalui peningkatan suhu yang kemudian setelah dihitung melalui rumus kinetiknya, dapat diantisipasi umur kestabilan obat tersebut.

**Nanny Kartini H. :**

Memang dapat juga kestabilan itu ditentukan dengan menyimpan obat-obatan/kit RIA itu pada suhu yang lebih tinggi, untuk memperpendek waktu yang diperlukan dalam uji kualitas ini. Tetapi dalam hal ini, kami melakukannya pada temperatur 4 °C/ lemari es yang biasa digunakan untuk penyimpanan kit-RIA pada umumnya. Dan setelah itu pada periode-periode waktu tertentu, dilakukan penentuan besaran-besaran karakteristiknya.