

## IMOBILISASI ANTIBODI KEDUA PADA PARTIKEL MAGNET POLYACROLEIN UNTUK PENENTUAN T<sub>4</sub>

Ratnawati Kukuh, Daniel Santoso, Natalia Adventini  
Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

### ABSTRAK

IMOBILISASI ANTIBODI KEDUA PADA PARTIKEL MAGNET UNTUK PENENTUAN T<sub>4</sub>. Teknik pemisah antibodi kedua fase padat adalah suatu metode di mana reaksi antigen-antibodi terjadi dalam fase cair dan untuk memisahkan antibodi terikat ditambahkan pereaksi antibodi kedua yang telah diimmobilisasikan pada fase padat. Penggunaan teknik pemisahan antibodi kedua fase padat dapat mengatasi beberapa kekurangan yang dijumpai pada metode pemisah antibodi pertama fase padat. Reaksi antigen-antibodi dapat berlangsung lebih cepat, dan akan memberikan kepekaan analisis yang lebih tinggi (3). Dalam penelitian ini sebagai penunjang fase padat digunakan partikel magnet polyacrolein dan antibodi kedua yang diimmobilisasi adalah  $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci yang telah dimurnikan. Pemurnian dilakukan menggunakan kolom DEAE selulosa. Hasil imobilisasi diuji dengan melakukan penentuan titer. Optimasi disain penentuan dilakukan dengan menentukan volume pereaksi dan waktu inkubasi optimal. Hasil percobaan menunjukkan bahwa disain penentuan dengan 25  $\mu$ l larutan baku T<sub>4</sub>, 50  $\mu$ l senyawa bertanda <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub>, dan 50  $\mu$ l antibodi T<sub>4</sub>, waktu inkubasi pertama selama 1 jam, dan penambahan 50  $\mu$ l suspensi antibodi kedua partikel magnet serta waktu inkubasi kedua selama 1 jam memberikan hasil yang cukup peka pada daerah kerja yang diinginkan yaitu 12,5 - 320 nmol/l. Pengujian kinerja penentuan dilakukan dengan mengevaluasi nilai besaran karakteristik dan sebagai pembanding digunakan kit komersial RIA-T<sub>4</sub> produksi BATAN/ Amersham, dan RIA-T<sub>4</sub> tabung bersalut hasil penelitian yang terdahulu (4). Untuk menguji kestabilan dilakukan penentuan waktu kadaluwarsa. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa untuk jangka waktu 3 bulan masih cukup stabil. Dari seluruh data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa penggunaan antibodi kedua fase padat sebagai pemisah dalam RIA-T<sub>4</sub> memberikan hasil yang cukup memuaskan.

### ABSTRACT

IMMOBILISATION OF SECOND ANTIBODY ON MAGNETIC POLYACROLEIN IRON OXIDE PARTICLES. In the solid phase double antibody separation technique the antigen-antibody reaction occurs in the liquid phase and immobilised second antibody is added to separate the bound fraction. The use of this technique may overcome shortcomings associated with solid phase first antibody separation methods. The higher antigen-antibody reaction rate enables the system to reach equilibrium faster resulting in higher analytical sensitivity. In the present study magnetic polyacrolein iron oxide particles were used as support to immobilise purified goat anti-rabbit  $\gamma$ -globulin. Purification was carried out through a DEAE cellulose column. The titre of the immobilisation product was then determined. Satisfactory separation result were obtained using 50  $\mu$ l of the magnetic second antibody suspension. Assay design was optimized by varying reagents volumes and incubation times to obtain the desired working range. A design employing 25  $\mu$ l of standard T<sub>4</sub> solution, 50  $\mu$ l of <sup>125</sup>I labeled T<sub>4</sub> solution, and 50  $\mu$ l of T<sub>4</sub> antibody solution incubated for 1 hour, followed by addition of 50  $\mu$ l magnetic second antibody suspension and another incubation for 1 hour was shown to yield reasonably sensitive results in the working range of interest i.e 12,5 - 320 nmol/l. Assay performance was evaluated by determining the characteristic parameters of radioimmunoassay and the resulting values were compared with those obtained using magnetic RIA-T<sub>4</sub> kits (BATAN/Amersham) and chemically coated T<sub>4</sub>-tubes reported earlier. The three kits were shown to have similar performance with no significant difference. Stability studies of the magnetic second antibody suspension were carried out for shelf-life determination. The experimental data showed that the kits are stable for more than 3 months. In conclusion it can be said that separation using solid phase second antibody yielded satisfactory results.

### PENDAHULUAN

Teknik pemisahan fase padat dalam penentuan RIA telah banyak dikembangkan mengingat prosedur pengerjaannya sederhana,

memungkinkan untuk dilakukan otomatisasi, memberikan presisi dan kespesifikan yang cukup tinggi (3). Pada teknik pemisahan ini, anti-



gen atau antibodi dikonyugasikan pada suatu fase padat dan dalam penelitian ini antibodi ke 2 ( $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci) diimmobilisasikan pada fase padat.

Teknik pemisahan menggunakan antibodi ke 2 fase padat adalah suatu metode di mana reaksi antigen-antibodi terjadi dalam fase cair dan untuk memisahkan kompleks antibodi terikat ( $Ag*Ab$ ) ditambahkan pereaksi antibodi kedua yang telah diimmobilisasikan pada fase padat. Metode pemisahan dengan prinsip imunologis ini jauh lebih spesifik dari metode pemisahan cara lain, sebab antibodi kedua akan bereaksi secara spesifik terhadap antibodi pertama. Antibodi kedua dibuat dengan cara menyuntikkan  $\gamma$ -globulin hewan tertentu misalnya kelinci ke dalam tubuh hewan lain misalnya kambing. Dalam hal demikian maka kambing akan memproduksi antibodi kedua yang spesifik terhadap antibodi kelinci (1,2).

Penggunaan teknik pemisah antibodi kedua fase padat dapat mengatasi beberapa kesulitan yang dijumpai dalam metode pemisah fase padat. Pada teknik pemisah fase padat reaksi antigen-antibodi terjadi dalam fase padat, sehingga reaksi akan berlangsung lebih lambat bila dibandingkan dengan reaksi dalam fase cair. Selain itu juga, akan mempengaruhi kepekaan analisis, sebab salah satu dari pereaksi tidak mobil (tidak bergerak) dalam larutan. Antigen atau antibodi yang dikonyugasikan pada partikel fase padat sering mempunyai densitas tinggi yang akan mengendap dan terpisah sebelum keseimbangan reaksi tercapai. Untuk mengatasi kekurangan tersebut dikembangkan teknik pemisah antibodi kedua fase padat.

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari teknik pemisah antibodi kedua fase padat untuk penentuan RIA- $T_4$ .

Sebagai penunjang fase padat, digunakan partikel magnet polyacrolein. Partikel magnet jenis ini merupakan suatu bahan fase padat yang otoreaktif, sebab pada permukaan partikel tersebut telah mengandung gugus aldehida yang cukup reaktif untuk bereaksi dengan gugus amino dari senyawa protein.

Untuk memperoleh hasil pemisahan yang optimal, maka antibodi kedua yang akan dikonyugasikan pada partikel magnet harus dalam bentuk  $\gamma$ -globulin murni. Pemurnian dilakukan dengan menggunakan kolom DEAE selulosa (6), dan kemudian  $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci yang telah murni diimmobilisasikan pada partikel magnet polyacrolein.

Hasil immobilisasi antibodi kedua diuji dengan melakukan penentuan titer. Titer ditentukan dengan melakukan suatu seri percobaan menggunakan jumlah suspensi partikel magnet polyacrolein yang berbeda.

Disain dan optimasi penentuan dilakukan dengan menentukan volume pereaksi dan waktu inkubasi optimal untuk memperoleh daerah kerja yang diinginkan. Pengujian kinerja penentuan dilakukan dengan mengevaluasi nilai besaran karakteristik yang diperlukan untuk RIA. Sebagai pembanding digunakan kit RIA- $T_4$  produksi BATAN/Amersham dan tabung bersalut  $T_4$  cara kimia hasil penelitian yang terdahulu(4). Untuk menguji kestabilan dilakukan penentuan waktu kadaluwarsa.

## BAHAN DAN PERALATAN

### Bahan

Bahan yang digunakan  $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci yang digunakan diperoleh dari Pusat Produksi Radioisotop, DEAE selulosa produksi Pharmacia. Larutan dapar fosfat 0,1M pH 6,0; 0,1M pH 7,4 dan 0,05M pH 7,5 larutan dapar bikarbonat 0,1M pH 9,0; larutan dapar asetat 0,1M pH 4,0. Partikel magnet polyacrolein diperoleh dari bantuan IAEA.  $(NH_4)_2SO_4$ , NaOH, HCl, etanolamin, sodium azida, tween 20 dari E.Merk. Kit RIA  $T_4$ , cara magnetik produksi BATAN/Amersham tabung bersalut  $T_4$  cara kimia hasil penelitian yang terdahulu (4).

### Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah alat spektrofotometer UV (Hitachi model 200-20) alat pencacah sinar  $\gamma$  (Miniassay type 6-20), alat pH meter (Metrohim Herisau E 520), pelat magnetik, alat komputer IBM/PC, program disket dari WHO. Kecuali alat-alat tersebut digunakan pula tabung dialisis, pipet ependorf dengan ukuran 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, tabung reaksi, suntikan dengan ukuran 10 ml.

## TATAKERJA

*Isolasi  $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci (antibodi kedua) dengan kolom DEAE selulosa*

*a. Pengendapan  $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci dengan  $(NH_4)_2SO_4$  jenuh*

Tiga ml serum  $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci diencerkan dengan 4 ml NaCl 0,9%. Ke dalam serum yang telah diencerkan tersebut ditambahkan 2,7 gram  $(NH_4)_2SO_4$ . Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil dikocok. Campuran dikocok selama 1 jam dan kemudian disentrifuga pada 2000 rpm selama 30 menit. Endapan yang diperoleh kemudian



dilarutkan dalam dapar fosfat 0,05M pH 7,5 dan selanjutnya didialisis dalam dapar fosfat 0,05M pH 7,5 selama satu malam.

#### *Pembuatan kolom DEAE selulosa*

Mula-mula 1 gram DEAE selulosa dimasukkan ke dalam 7,5 ml akuades, DEAE selulosa dipisahkan dan kemudian ditambahkan 10 ml NaOH 0,1M sambil diaduk. Selanjutnya diendapkan dan dicuci berturut-turut dengan 10 ml akuades, 10 ml HCl 0,1M, dan terakhir dengan akuades hingga pH pencuci sama dengan pH akuades. Agar sesuai dengan eluen yang digunakan, maka dikondisikan dalam dapar fosfat 0,1M pH 6,0 dan kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Sebagai kolom digunakan alat suntikan berukuran 10 ml. Elusi dilakukan dengan dapar fosfat 0,1M pH 6,0.

#### *Pemisahan $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci dengan kolom DEAE selulosa*

Satu ml  $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci hasil dialisis dimasukkan ke dalam kolom DEAE selulosa dan dielusi dengan dapar fosfat 0,1M pH 6,0. Hasil elusi ditampung sebanyak 15 fraksi dan tiap fraksi berisi 1 ml. Fraksi yang mengandung  $\gamma$ -globulin ditentukan resapannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm. Fraksi  $\gamma$ -globulin dikumpulkan dan ditentukan konsentrasinya dengan membandingkan terhadap baku  $\gamma$ -globulin kambing.

#### *Imobilisasi $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci pada partikel magnet polyacrolein.*

Mula-mula botol yang berisi partikel magnet polyacrolein dalam aseton dikocok perlahan-lahan hingga diperoleh campuran yang homogen. Ke dalam vial berukuran 50 ml dimasukkan 20 ml suspensi partikel magnet. Partikel diendapkan menggunakan pelat magnetik dan dicuci 3 kali dengan 20 ml dapar bikarbonat 0,1M pH 9,0. Partikel magnet yang telah dicuci kemudian disuspensi dalam 10 ml dapar bikarbonat. Selanjutnya ke dalam suspensi partikel magnet tersebut ditambahkan 2 ml  $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci hasil pemisahan. Campuran kemudian diputar selama 24 jam pada suhu kamar. Partikel magnet yang telah diimobilisasi dengan  $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci kemudian diendapkan, dan dicuci 2 kali dengan 20 ml dapar bikarbonat. Untuk melindungi sisa gugus aldehida yang bebas maka partikel magnet yang telah diimobilisasi disuspensi dalam 20 ml dapar bikarbonat yang mengandung etanolamin (3 ml/l). Suspensi dilakukan selama 1 jam pada suhu kamar sambil diputar. Partikel diendapkan, dicuci dengan dapar asetat 0,1M pH 4,0

dan kemudian disuspensi dalam dapar asetat selama 30 menit pada suhu kamar sambil diputar. Selanjutnya partikel diendapkan kembali dan dicuci 3 kali dengan 20 ml dapar fosfat. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4 °C.

#### *Penentuan titer $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci yang telah diimobilisasi pada partikel magnet polyacrolein.*

Titer  $\gamma$ -globulin kambing anti kelinci ditentukan dengan melakukan suatu seri percobaan menggunakan jumlah suspensi partikel magnet polyacrolein yang berbeda. Ke dalam suatu seri tabung reaksi dimasukkan berturut-turut 50  $\mu$ l serum bebas atau baku 0, 50  $\mu$ l T<sub>4</sub> bertanda <sup>125</sup>I, 50  $\mu$ l antibodi T<sub>4</sub>. Campuran diinkubasi selama 1 jam dan untuk memisahkan fraksi terikat dan fraksi bebas ditambahkan 10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l suspensi partikel magnet. Campuran diinkubasi kembali selama 1 jam pada suhu kamar sambil diputar. Setelah inkubasi partikel magnet yang mengandung fraksi terikat diendapkan dengan menggunakan pelat magnetik. Endapan dicuci 2 kali dengan larutan dapar pencuci (dapar fosfat 0,05 M pH 7,5; 0,5% tween 20) dan keaktifannya dicacah menggunakan pencacah sinar  $\gamma$ .

#### *Penentuan daerah kerja dengan kepekaan yang diinginkan*

*Pembuatan kurva baku dan kurva profil presisi dengan menggunakan pemisah antibodi kedua fase padat.*

Untuk pembuatan kurva baku digunakan 25  $\mu$ l larutan baku T<sub>4</sub> dengan konsentrasi 0, 10, 50, 100, 150, dan 250 nmol/l. Kemudian ditambahkan 100  $\mu$ l T<sub>4</sub> bertanda <sup>125</sup>I, dan 100  $\mu$ l antibodi T<sub>4</sub>. Campuran diaduk dengan pengaduk vortex, diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Selanjutnya ke dalam campuran ditambahkan 50  $\mu$ l suspensi antibodi kedua partikel magnet. Campuran diinkubasi kembali selama 1 jam pada suhu kamar sambil diputar. Setelah inkubasi partikel magnet yang mengandung fraksi terikat diendapkan menggunakan pelat magnetik. Endapan dicuci 2 kali dengan larutan dapar pencuci (dapar fosfat 0,05M pH 7,5, 0,5% tween 20) dan keaktifannya dicacah menggunakan pencacah sinar  $\gamma$ . Protokol RIA untuk percobaan ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari hasil percobaan kemudian dibuat grafik antara fraksi terikat dan konsentrasi T<sub>4</sub> serta grafik profil presisi yang menggambarkan hubungan antara % koefisien variasi (% CV) dengan konsentrasi.



Tabel 1. Protokol RIA-T<sub>4</sub> menggunakan pemisah antibodi kedua partikel magnet

Pereaksi	Volume pembandingan (μl)	Blangko (μl)	Konsentrasi baku T <sub>4</sub> (nmol/l)						Cuplikan
			0	30	60	120	200	320	
T <sub>4</sub> serum bebas	50	25	-	-	-	-	-	-	-
<sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>	-	50	50	50	50	50	50	50	50
Larutan baku	-	-	25	25	25	25	25	25	-
Antibodi T <sub>4</sub>	-	-	50	50	50	50	50	50	50
Cuplikan	-	-	-	-	-	-	-	-	25
Inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar									
+ 50 μl suspensi antibodi kedua partikel magnet									
Inkubasi kembali selama 1 jam pada suhu kamar sambil diputar									

- Partikel magnet yang mengandung fraksi terikat diendapkan dengan pelat magnet
- Endapan dipisahkan dan dicuci 2 kali dengan larutan dapar pencuci
- Keaktifannya dicacah dengan pencacah sinar -γ

Penentuan volume reaksi optimal untuk mendapatkan daerah kerja dengan kepekaan yang diinginkan.

Untuk maksud ini dilakukan berbagai kombinasi dengan disain percobaan sebagai berikut:

1. 25 μl larutan baku T<sub>4</sub>, 100 μl T<sub>4</sub> bertanda <sup>125</sup>I, 100 μl antibodi T<sub>4</sub>.
2. 50 μl larutan baku T<sub>4</sub>, 50 μl T<sub>4</sub> bertanda <sup>125</sup>I, 50 μl antibodi T<sub>4</sub>.
3. 25 μl larutan baku T<sub>4</sub>, 50 μl T<sub>4</sub> bertanda <sup>125</sup>I, 50 μl antibodi T<sub>4</sub>.

Percobaan dilakukan sesuai dengan protokol RIA yang tertera pada Tabel 1. Dari seluruh percobaan kemudian dibuat grafik antara fraksi terikat dan konsentrasi serta grafik profil presisi.

#### Optimasi waktu inkubasi

Optimasi inkubasi diperoleh dari variasi waktu. Optimasi waktu inkubasi pada reaksi antigen antibodi didapat dari percobaan yang terdahulu (5). Optimasi waktu inkubasi setelah penambahan suspensi antibodi kedua partikel magnet, dilakukan untuk waktu 0,5; 1 dan 2 jam.

#### Pengujian karakteristik RIA T<sub>4</sub> dengan pemisahan antibodi kedua partikel magnet.

Setelah diperoleh disain penentuan secara optimal maka langkah selanjutnya dilakukan pengujian beberapa parameter *internal quality control* yang menggambarkan karakteristik dari suatu kit. Hal ini dilaksanakan dengan mengevaluasi nilai besaran: ikatan non spesifik,

ikatan maksimum, konsentrasi yang memberikan 50% B/Bo, dan koefisien variasi antar penentuan cuplikan kontrol serta profil presisi. Sebagai pembandingan digunakan kit RIA-T<sub>4</sub> produksi BATAN/Amersham serta tabung bersalut T<sub>4</sub> cara kimia hasil penelitian yang terdahulu.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

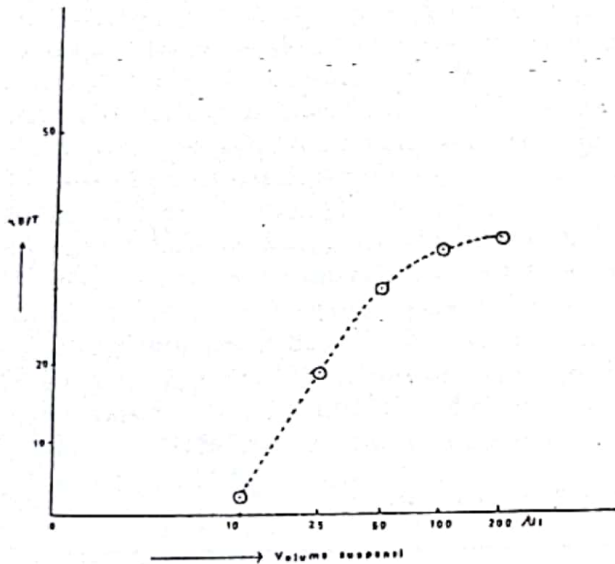
Pemurnian γ-globulin kambing anti kelinci dengan menggunakan kolom DEAE selulosa menghasilkan γ-globulin kambing anti kelinci murni dengan kadar 5,38 mg/ml.

Sebelum dilakukan imobilisasi pada partikel magnet polyacrolein ditentukan terlebih dahulu jumlah maksimal antibodi kedua, dan dari hasil percobaan ternyata penambahan 0,8 ml antibodi kedua dalam 10 ml suspensi partikel magnet polyacrolein memberikan hasil pemisahan yang cukup baik.

Untuk menguji efisiensi pemisahan dan kespesifikan analisis perlu diperhatikan nilai ikatan non spesifik (NSB), yaitu ikatan yang terbentuk antara antigen bertanda selain dengan antibodi. Suatu pemisahan yang baik akan memberikan nilai ikatan non spesifik yang rendah. Untuk maksud ini setelah dilakukan pengikatan antibodi kedua pada partikel magnet polyacrolein perlu ditambahkan etanolamin dengan tujuan untuk melindungi sisa gugus aldehida bebas yang tidak berikatan dengan antibodi kedua. Sementara itu etanolamin sendiri tidak akan berikatan dengan antigen bertanda, sehingga nilai ikatan non spesifik dapat ditekan

serendah mungkin. Dari hasil penelitian yang terdahulu ternyata dengan konsentrasi etanolamin sebesar 0,3%, inkubasi pada pH 8 selama 18 jam pada suhu kamar memberikan hasil penempelan etanolamin yang optimum (4).

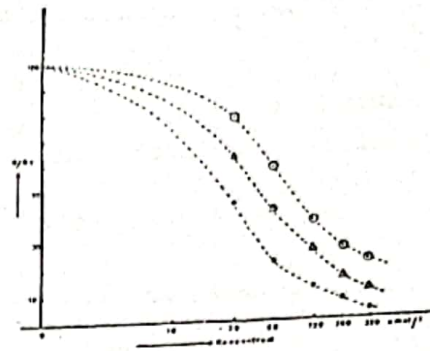
Hasil imobilisasi antibodi kedua pada permukaan partikel magnet diuji dengan melakukan penentuan titer. Dari grafik hubungan % ikatan terhadap jumlah suspensi antibodi kedua partikel magnet pada Gambar. 1 dapat disimpulkan bahwa penggunaan volume suspensi antibodi kedua partikel magnet sebesar 50 ml telah memberikan hasil pemisahan yang cukup baik, walaupun terlihat bahwa kondisi optimal didapat pada penambahan 100 ml suspensi partikel magnet tetapi dengan kondisi tersebut diperoleh nilai NSB yang tinggi.



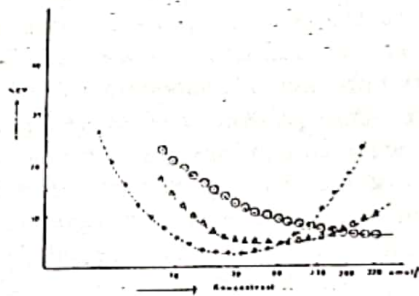
Gambar 1. Grafik hubungan % ikatan terhadap jumlah suspensi antibodi kedua partikel magnet.

Dengan kondisi tersebut kemudian dilakukan disain dan optimasi penentuan. Optimasi dilakukan terhadap volume pereaksi dan waktu inkubasi. Data penentuan hasil optimasi dari berbagai kombinasi volume pereaksi dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 2.

Dari hasil penelitian yang terdahulu, waktu inkubasi optimal untuk reaksi antigen - antibodi adalah 1 jam pada suhu kamar (5), dan dari data yang diperoleh ternyata waktu inkubasi 1 jam setelah penambahan suspensi antibodi kedua partikel magnet memberikan hasil



A. Kurva baku



B. Kurva profil presisi

B = fraksi terikat;  $B_0$  = fraksi pada konsentrasi 0; X = larutan baku; Y =  $^{125}\text{IT}_4$ ; Z = antibodi  $\text{T}_4$   
 25 µl X, 100 µl Y, 100 µl Z  
 50 µl X, 50 µl Y, 50 µl Z  
 25 µl X, 50 µl Y, 50 µl Z

Gambar 2. Kurva baku dan profil presisi pada berbagai kombinasi pereaksi

penentuan yang cukup baik. Bila waktu inkubasi dilakukan kurang dari 1 jam akan memberikan presisi percobaan yang kurang baik. Hal ini disebabkan karena reaksi pembentukan kompleks  $\text{Ag}^*\text{Ab}_1\text{Ab}_2$  belum sempurna. Sebaliknya bila waktu inkubasi dilakukan lebih dari 2 jam akan mempertinggi nilai ikatan non spesifik. Hal ini disebabkan karena antibodi kedua tidak semata-mata mengandung epitope yang spesifik maka makin lama waktu inkubasi akan memungkinkan epitope yang tak spesifik



Tabel 2. Hasil optimasi dari berbagai kombinasi pereaksi

Kombinasi pereaksi	Bo/T (%)	Ed 50 (nmol/l)	Batas profil presisi (nmol/l)
1. 50 µl baku T <sub>4</sub> 50 µl <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub> 50 µl antibodi T <sub>4</sub>	40,9	36,1	13,2 - 71
2. 25 µl baku T <sub>4</sub> 50 µl <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub> 50 µl antibodi T <sub>4</sub>	44,5	72,5	13,2 - 320
3. 25 µl baku T <sub>4</sub> 100 µl <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub> 100 µl antibodi T <sub>4</sub>	36,9	175,1	-

bereaksi dengan antigen bertanda <sup>125</sup>I yang akan mempertinggi nilai ikatan non spesifik.

Dari data yang diperoleh ternyata disain penentuan dengan 25 µl larutan baku T<sub>4</sub>, 50 µl senyawa bertanda <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub>, dan 50 µl anti T<sub>4</sub>, waktu inkubasi reaksi pertama selama 1 jam, dan penambahan 50 µl suspensi antibodi kedua partikel magnet polyacrolein sebagai pereaksi pemisah, serta waktu inkubasi kedua selama 1 jam memberikan hasil percobaan yang cukup peka pada daerah kerja yang diinginkan yaitu antara 12,5 - 320 nmol/l. Nilai normal T<sub>4</sub> berkisar antara 60 - 150 nmol/l.

Hasil pengujian kinerja penentuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Data percobaan menunjukkan bahwa penggunaan antibodi kedua partikel magnet sebagai pemisah fase padat memberikan nilai ikatan maksimum (Bo/T): (48,4 ± 4,2)%, ikatan non spesifik (NSB): (7,4 ± 0,4)%, konsentrasi pada 50% B/Bo (Ed 50) diperoleh nilai (72,4 ± 4,8) nmol/l. Penentuan cuplikan kontrol antar assay memberikan hasil QA: (49,4 ± 5,1) nmol/l, QB: (92,8 ± 5,1) nmol/l dan QC: (157,7 ± 15,4) nmol/l dari 8 kali percobaan. Untuk kit RIA-T<sub>4</sub> cara magnetik (antibodi pertama yang diimmobilisasi pada partikel magnet) produksi BATAN/ Amersham diperoleh nilai ikatan maksimum: (59,9 ± 2,1)%, ikatan non spesifik: (4,5 ± 1,1)%, konsentrasi pada 50% B/Bo: (61,0 ± 3,2) nmol/l, dan cuplikan kontrol memberikan nilai: (46,9 ± 1,5).

Tabel 3. Hasil pengujian kinerja penentuan dari berbagai macam kit

	PPTN (Antibodi ke 2 partikel magnet)	BATAN/Amersham (Antibodi kesatu partikel magnet)	PPTN (Tabung bersalut)
Bo/T (%)	(48,4 ± 4,2)	(59,9 ± 2,1)	(64,0 ± 2,3)
NSB (%)	(7,4 ± 0,4)	(4,5 ± 1,1)	(2,7 ± 0,3)
Ed 50 (nmol/l)	(72,4 ± 4,8)	(61,0 ± 3,2)	(51,5 ± 3,0)
QA (nmol/l)	(49,4 ± 5,1)	(46,9 ± 1,5)	(48,9 ± 1,3)
QB (nmol/l)	(92,8 ± 5,1)	(94,4 ± 3,9)	(90,3 ± 3,9)
QC (nmol/l)	(157,7 ± 15,4)	(179,6 ± 8,5)	(169,3 ± 5,0)
IP (nmol/l)	12,5 - > 320	9,1 - > 320	19,2 - > 320

Catatan :

- QA = cuplikan kontrol rendah
- QB = cuplikan kontrol menengah
- QC = cuplikan kontrol tinggi
- IP = batas profil presisi

nmol/l,  $(94,4 \pm 3,9)$  nmol/l dan  $(179 \pm 8,5)$  nmol/l berturut-turut untuk kadar rendah, menengah dan tinggi. Untuk kit RIA-T<sub>4</sub> tabung bersalut cara kimia hasil penelitian yang terdahulu diperoleh nilai ikatan maksimum:  $(64,1 \pm 2,3)\%$ , ikatan non spesifik:  $(2,7 \pm 0,3)\%$ , konsentrasi pada 50% B/B0 :  $(51,5 \pm 3,0)$  nmol/l dan untuk cuplikan kontrol memberikan nilai  $(48,9 \pm 1,3)$  nmol/l,  $(90,3 \pm 3,9)$  nmol/l dan  $(169,3 \pm 5,0)$  nmol/l berturut-turut untuk kadar rendah, menengah dan tinggi.

Dari hasil pengujian kinerja dapat disimpulkan bahwa ketiga kit tersebut mempunyai persamaan karena tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Pada cara pemisahan menggunakan antibodi kedua fase padat diperoleh nilai ikatan non spesifik yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan cara pemisahan antibodi pertama fase padat, hal ini disebabkan karena antibodi kedua tidak semata-mata mengandung epitope yang spesifik [1].

Selanjutnya dilakukan uji kestabilan terhadap pereaksi pemisah antibodi kedua partikel magnet. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa suspensi partikel magnet tersebut masih cukup stabil untuk jangka waktu lebih kurang tiga bulan. Hasil lengkapnya dapat dilihat pada Gambar 3.

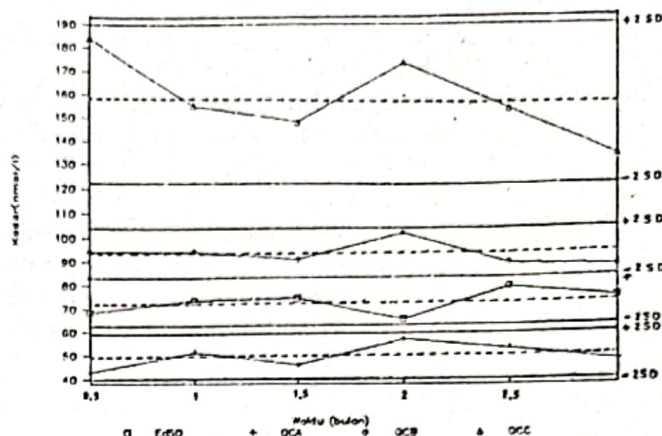
#### KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan antibodi kedua fase padat sebagai pereaksi pemisah RIA-T<sub>4</sub> memberikan hasil yang cukup memuaskan. Diharapkan cara ini akan sangat berguna bagi pengembangan pembuatan kit RIA-T<sub>4</sub> fase padat.

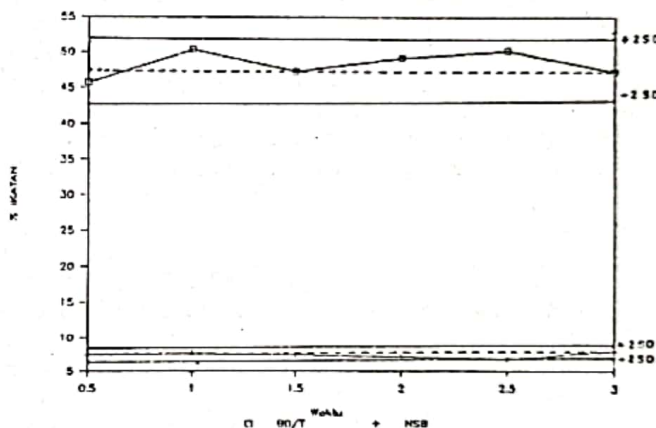
#### DAFTAR PUSTAKA

1. Chard, T., "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology", An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, 2<sup>nd</sup> ed., Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1982) 127-131.
2. Edward, R., "An introduction", Immunoassay, William Heinemann Medical Books, London (1985) 34-36.
3. Wide, L., Solid phase radioimmunoassay, Radioimmunoassay and Related Procedure in Medicine, Vol I, IAEA, Vienna (1978) 143-152.
4. Dian Pertiwi, Analisa T<sub>4</sub> secara radioimmunoassay dengan menggunakan antibodi amobil, Tesis Program Pasca Sarjana Jurusan Kimia Institut Teknologi Bandung (1991).
5. Ibon Suparman, Penentuan karakteristik kit T<sub>4</sub> buatan PPTN, Majalah BATAN, Vol XIX, No. 3, Oktober (1986) 29-33.

#### KURVA CUPLIKAN KONTROL DAN Ed50



#### KURVA KONTROL BO/T, DAN NSB



Gambar 3. Hasil uji kestabilan pereaksi suspensi antibodi kedua partikel magnet



## DISKUSI

### Misyetti:

1. Apa dasar pemikiran untuk memilih teknik pemurnian IgG, karena dapat digunakan beberapa teknik khromatografi yang lain ?
2. Dengan menggunakan teknik penukar ion yang dengan teknik ini pH sangat menentukan lkemurnian. Seperti Ibu Ratna kemukakan bahwa protein yang lain juga ada yang punya muatan positif dan negatif. Berapa pH yang digunakan dan apa dasarnya ?

### Ratnawati Kukuh:

1. Teknik pemurnian IgG melalui pengendapan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan DEAE Cellulose merupakan teknik pemurnian yang relatif cukup murni. Mengingat bahwa kebutuhan antibodi kedua jumlahnya cukup besar dibandingkan dengan metode antibodi kesatu. Teknik tersebut dapat dilakukan untuk pemurnian dalam jumlah besar (volume besar), disamping itu harganya cukup murah.
2. pH yang digunakan adalah pH 6, mengingat bahwa antibodi banyak mengandung protein yang bermuatan positif.