

## PEMBUATAN ANTIBODI PROGESTERON

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

### ABSTRAK

**PEMBUATAN ANTIBODI PROGESTERON.** Antiserum merupakan komponen utama dalam sistem RIA, sebab antiserum mengandung antibodi yang diperlukan agar reaksi antigen-antibodi dapat berlangsung. Dalam penelitian ini antibodi progesteron dibuat dengan cara menyuntikkan kompleks progesteron-3-karboksimetil oksim-BSA bersama ajuvan Freund pada hewan kelinci. Suntikan ulang dilakukan secara teratur setiap bulan dan serum diambil secara berkala 2 minggu setelah suntikan dilakukan untuk diamati titernya. Serum dipanen pada bulan ke 6 setelah diperoleh titer yang cukup tinggi. Mutu antibodi yang dihasilkan selanjutnya diuji dengan menentukan nilai aviditas dan kespesifikan. Kespesifikan dievaluasi dengan mempelajari reaksi silang antiserum progesteron terhadap senyawa testosteron, deoksikortikosteron, kortison. Hasil analisis menunjukkan bahwa antiserum progesteron yang dihasilkan cukup spesifik untuk penentuan RIA. Aviditas antiserum ditentukan dengan menggunakan kurva Scatchard, dan diperoleh nilai  $K = 2,76 \times 10^7$  l/mol. Limit deteksi yang dapat dicapai dengan antibodi progesteron adalah  $3,6 \times 10^{-8}$  mol/l. Dari hasil seluruh percobaan dapat disimpulkan bahwa antiserum progesteron yang dihasilkan cukup memenuhi persyaratan untuk digunakan sebagai bahan pereaksi RIA.

### ABSTRACT

**THE PREPARATION OF PROGESTERONE ANTIBODIES.** The antiserum is an essential component in a radioimmunoassay system, because it contains the antibodies required for antigen-antibody reaction. In the present study progesterone antiserum was prepared by injecting a progesterone-3-carboxymethyl oxime-BSA together with Freund's adjuvant into rabbits. Booster injections were administered monthly and serum samples withdrawn every two weeks and the titre determined. The antisera was harvested after 6 months when the titre was sufficiently high. The quantity of the antisera was further examined by avidity and specificity tests. Specificity was evaluated by making a study on cross reactions of the serum with testosterone, deoxycorticosterone and cortisone. The results showed that the progesterone antiserum obtained was sufficiently specific for radioimmunoassay purposes. The avidity was determined by means of a Scatchard plot, which yielded a value of  $K = 2,76 \times 10^7$  l/mole. The detection limit was  $3,6 \times 10^{-8}$  mole/l. In general it can be concluded that the progesterone antiserum obtained meet the requirements for radioimmunoassay.

### PENDAHULUAN

Antibodi merupakan komponen terpenting dalam sistem RIA. Antibodi terbentuk sebagai respons terhadap masuknya benda asing dalam tubuh. Tanggapan pertama oleh tubuh terhadap konfigurasi asing umumnya berbentuk sebagai respons imun. Apabila tubuh mendapat rangsangan imunogenik, maka terjadilah keterlibatan sel-sel makrofag, limfosit T, dan limfosit B.

Mekanisme pembentukan antibodi dapat diterangkan sebagai berikut: bila suatu antigen ditelan oleh makrofag, ia akan diolah dan komponen-komponen yang dihasilkannya diperlihatkan bersama-sama dengan protein histokompatibilitas utama (MHC) pada permukaan sel. Sel-sel T dalam peredaran darah tidak memiliki kemampuan untuk mengenali antigen, kecuali bila disertai suatu persenyawaan

MHC. Adanya senyawa MHC ini memungkinkan pengikatannya dengan kompleks antigen protein tersebut pada membran luar makrofag. Hubungan antara makrofag dan sel T ini memulai serangkaian aksi, reaksi dan interaksi yang kompleks di dalam sistem imun. Adanya ikatan tersebut akan merangsang pelepasan interleukin-1 yang merangsang pertumbuhan sel T dan sel B. Sel T yang berinteraksi dengan protein MHC berkembang menjadi sel T pembantu yang kemudian berinteraksi mengaktifkan sel B. Selanjutnya sel tersebut dapat berdeferensiasi melalui 2 jalan yang berbeda, yaitu berdeferensiasi menjadi sel plasma yang nantinya mampu memproduksi dan mensekresi sejumlah antibodi, serta dapat membelah diri kembali dalam keadaan istirahat dengan merekam kekhasan



dari antigen yang semula merangsangnya [1,2]. Sel-sel tersebut dinamakan sel ingatan (sel memori).

Tidak semua benda asing menghasilkan imunospons. Imunogen yang dengan mudah menimbulkan respons imun yang nyata kebanyakan berbentuk sebagai makromolekul protein, namun zat-zat lain seperti polisakarida, polipeptida buatan dan senyawa polimer lainnya dapat bersifat imunogenik apabila digunakan dalam kondisi yang sesuai.

Mengingat bahwa antibodi merupakan faktor utama yang berperan dalam analisis RIA, maka tujuan penelitian ini adalah mempelajari pembuatan antibodi progesteron yang memenuhi persyaratan sebagai bahan pereaksi RIA.

Senyawa progesteron mempunyai bobot molekul rendah, sehingga tidak dapat merangsang pembentukan antibodi. Agar senyawa progesteron dapat bersifat imunogenik harus dikaitkan secara kovalen pada protein pengemban yang besar. Pada penelitian ini sebagai imunogen digunakan progesteron-3-karboksi-metil oksim-BSA yang dicampur dengan ajuvan Freund. Campuran imunogen kemudian disuntikkan pada kelinci. Imunisasi dilakukan dengan suntikan intradermal dan suntikan ulang dilakukan dengan cara subkutan.

Agar antiserum dapat digunakan untuk keperluan RIA maka harus memenuhi beberapa persyaratan yaitu mengandung antibodi dengan spesifikan dan aviditas yang tinggi, cukup peka pada daerah kerja yang diinginkan, serta mempunyai titer yang tinggi [4,5].

Penentuan titer dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya antibodi dalam serum hewan yang telah diimunisasi, dan diikuti selama proses imunisasi berlangsung. Setelah diperoleh titer yang cukup tinggi maka antiserum dapat dipanen.

Mutu antiserum yang dihasilkan diuji dengan menentukan titer, nilai aviditas dan spesifikan. Spesifikan dievaluasi dengan mempelajari reaksi silang antiserum progesteron terhadap senyawa testosteron, kortison dan deoksikortikosteron dan nilai aviditas ditentukan dari harga K yang dapat dipelajari dengan menggunakan kurva Scatchard [4].

#### TATAKERJA

Bahan yang digunakan adalah Progesteron-3-karboksi-metil oksim-BSA, ajuvan Freund lengkap, ajuvan Freund tak lengkap, testosteron, kortison, deoksikortikosteron, dari

Sigma, Kit Progesteron [<sup>125</sup>I] produksi Farnos Diagnostica Spectra. Bahan pereaksi yang lain diperoleh dari E. Merck dengan tingkat kemurnian analitik.

Peralatan yang digunakan adalah alat pencacah sinar  $\gamma$  (Miniassay type 6-20), alat pemusing yang dilengkapi pendingin (IEC Centra-7R), alat pH meter (Metrohm Herisau E 520), alat komputer IBM/PC, program disket dari WHO dan alat freeze dryer (Labconco).

Sebagai hewan percobaan digunakan kelinci jantan dengan umur 4-5 bulan dan berat 2-2,5 kg yang diperoleh dari peternakan kelinci di Lembang.

#### Pembuatan campuran imunogen-ajuvan

Ke dalam senyawa kompleks progesteron-3-karboksimetil oksim-BSA ditambahkan 1 ml larutan salin dan 2 ml larutan ajuvan Freund lengkap. Larutan emulsi progesteron-3-karboksimetil oksim-BSA dalam ajuvan dibuat dengan menggunakan alat suntikan dengan cara dihisap dan disemprotkan ke dinding tabung berulang-ulang (kira-kira 20 kali). Hasil emulsi diuji dengan meneteskan pada permukaan air. Bila emulsi air dalam minyak belum terbentuk maka tetesan itu akan menyebar pada permukaan air.

#### Prosedur imunisasi

Mula-mula imunisasi dilakukan dengan cara suntikan intradermal pada punggung kelinci sebanyak 30-40 kali hingga seluruh campuran emulsi habis. Dosis yang diberikan pada suntikan imunisasi pertama ialah 0,5 mg/kg berat. Suntikan ulang dilakukan setiap bulan secara teratur dengan cara suntikan subkutan pada paha kelinci dan dosis yang diberikan 0,25 mg/kg berat.

Pengambilan darah dilakukan 2 minggu setelah booster. Untuk memperoleh serum yang mengandung antibodi, darah didiamkan pada suhu kamar selama 1 jam, kemudian pada suhu 4°C selama 3 jam, dan selanjutnya disentrifuga pada suhu 4°C. Untuk menghindarkan adanya kontaminasi bakteri dan fungi ditambahkan 5  $\mu$ l larutan natrium azida (1g/l). Penyimpanan dilakukan pada suhu -20°C atau diliofilisasi.

#### Pengujian antibodi yang dihasilkan

Respons antibodi dapat dilihat dari hasil penentuan titer. Penentuan titer dilakukan melalui suatu seri pengenceran antibodi progesteron antara 10 sampai 5120 kali dengan menggunakan larutan dapar BSA pada pH 7,5. Ke dalam tabung reaksi dicampurkan 100  $\mu$ l



serum bebas, 100 µl antibodi progesteron (hasil pengenceran), dan 100 µl progesteron bertanda  $^{125}\text{I}$ . Campuran kemudian diaduk dengan pengaduk vortex, diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Untuk memisahkan fraksi bebas dan fraksi terikat digunakan larutan PEG 18%. Fraksi terikat dipisahkan dengan alat sentrifuga, dan endapan dicacah menggunakan pencacah sinar  $\gamma$ . Selanjutnya dibuat grafik antara fraksi terikat terhadap faktor pengenceran. Dari grafik ini dapat ditentukan pengenceran antibodi yang menghasilkan 50% perunut terikat. Penentuan titer diamati terus, dan bila telah diperoleh titer yang cukup tinggi maka antiserum dapat dipanen.

*Penentuan daerah kerja dengan kepekaan yang diinginkan*

*Pembuatan kurva baku dengan berbagai variasi pengenceran antiserum.*

Mula-mula dilakukan pembuatan kurva baku dengan pengenceran antiserum 1/500; 1/750; 1/1000. Untuk pembuatan kurva baku digunakan 50 ml larutan baku progesteron dengan konsentrasi 0; 0,8; 2,0; 4,0; 10; 20; 40; dan 100 nmol/l. Kemudian ditambahkan 100 µl progesteron bertanda  $^{125}\text{I}$  dan 100 µl antiserum progesteron (hasil pengenceran). Campuran diaduk dengan pengaduk vortex, diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Selanjutnya untuk memisahkan fraksi terikat dan fraksi bebas ditambahkan 1 ml larutan PEG 18%. Setelah disentrifuga, cairan dari setiap tabung didekantasi dan keaktifan residu dicacah dengan menggunakan pencacah sinar  $\gamma$  (mini-assay). Protokol RIA untuk percobaan ini dapat dilihat pada Tabel 1. Kemudian dibuat grafik antara fraksi terikat dan konsentrasi progesteron, serta grafik profil presisi yang

menggambarkan hubungan antara % koefisien variasi (% CV) dengan konsentrasi.

*Penentuan volum pereaksi optimal*

Setelah diperoleh pengenceran antiserum optimal, ditentukan pula jumlah pereaksi optimal untuk mendapatkan daerah kerja dengan kepekaan yang diinginkan.

Untuk maksud ini dilakukan kombinasi dengan desain percobaan sebagai berikut:

1. 50 µl larutan baku progesteron, 100 µl progesteron bertanda  $^{125}\text{I}$ , dan 100 µl antiserum progesteron.
2. 100 µl larutan baku progesteron, 100 µl progesteron bertanda  $^{125}\text{I}$ , dan 100 µl antiserum progesteron.

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

*Penentuan aviditas*

Setelah diketahui pengenceran antiserum dan jumlah pereaksi optimal, selanjutnya dilakukan penentuan aviditas dari kurva Scatchard yaitu hubungan antara B/F (fraksi terikat/fraksi bebas) terhadap jumlah antigen terikat/(mol/l). Aviditas dinyatakan dengan harga K pada reaksi antigen-antibodi. Nilai K ini diperoleh dari koefisien arah (slope) pada kurva Scatchard.

*Penentuan kespesifikan antibodi progesteron*

Kespesifikan ditentukan dari reaksi silang testosteron, kortison, dan deoksikortikosteron terhadap antibodi progesteron. Untuk maksud ini dilakukan 4 seri percobaan. Seri pertama dibuat kurva baku progesteron dengan konsentrasi 0; 0,8; 2,0; 4,0; 10; 20; 40; 100 nmol/l dan seri ke 2 hingga 4 dibuat kurva pengenceran

Tabel 1. Protokol RIA Progesteron

Pereaksi	Volume Perbandingan (µl)	Blangko (µl)	Konsentrasi baku Progesteron								
			0	0,8	2,0	4,0	10,0	20,0	40,0	100,0	Cuplikan
Serum bebas $^{125}\text{I}$ -Progesteron	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Larutan baku	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antibodi Progesteron	-	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Cuplikan	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar											
+ 1 ml PEG 18%											

- Fraksi terikat dipisahkan dengan alat sentrifuga; - Keaktifan endapan dicacah dengan pencacah sinar  $\gamma$



berbagai senyawa tersebut dengan konsentrasi 10;100; 1000; 10000; dan 100000 nmol/l. Prosedur percobaan dilakukan sesuai dengan protokol yang terdahulu.

Derajat reaksi silang dapat dihitung dengan membandingkan Ed 50 pada kurva baku progesteron dengan Ed 50 pada pengenceran senyawa-senyawa testosteron, kortison, dan deoksikortikosteron.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebagai imunogen pada pembuatan antibodi progesteron digunakan kompleks progesteron-3-karboksimetil oksim BSA. Derivat yang dipilih sebagai jembatan untuk mengkonjugasikan progesteron dengan molekul BSA adalah derivat oksim, suatu derivat yang berbeda dengan derivat pada pembuatan progesteron bertanda  $^{125}\text{I}$  yaitu derivat hemisuksinat. Hal ini dilakukan untuk mencegah kemungkinan dihasilkan antibodi yang spesifik terhadap jembatannya, dan bukan terhadap senyawa progesteron yang diinginkan. Akibatnya akan memberikan bentuk kurva baku yang landai, yang akan menyebabkan kesalahan analisis [4].

Penggunaan adjuvan Freund akan mempertinggi respons imun terhadap imunogen yang disuntikkan. Adjuvan Freund lengkap merupakan campuran yang terdiri dari arlcel A, parafin cair, dan mikobakterial yang telah dilemahkan. Adjuvan Freund berkhasiat sebagai penampungan. Antigen bebas biasanya menyebar secara cepat dari tempat penyuntikan, dan tugas penting dari adjuvan adalah menghalangi hal ini dengan cara menyedilkan penampungan antigen jangka panjang, baik pada tempat-tempat di luar sel atau di dalam makrofag. Makrofag memegang peran yang sangat penting untuk menginduksi respons imun dalam menyajikan antigen. Di bawah pengaruh adjuvan yang mempunyai sifat penyimpanan akan mengaktifkan makrofag. Makrofag yang terangsang diharap dapat meningkatkan respons imun dengan cara meningkatkan jumlah antigen pada permukaan dan meningkatkan proliferasi limfosit. Komponen mikobakteria berkhasiat meningkatkan peranan sel T yang akan mengenal bagian imunogenik dari antigen dalam awal respons imun tersebut [3].

Agar terbentuk emulsi air dalam minyak maka volume adjuvan yang dicampurkan sebanding atau dua kali volume imunogen.

Percobaan imunisasi dimulai dengan 3 ekor kelinci. Penentuan titer dipantau setiap 2 minggu setelah imunisasi/suntikan ulang. Data

perkembangan titer dapat dilihat pada Gambar 1. Pengamatan menunjukkan bahwa pada minggu ke dua setelah imunisasi belum tampak munculnya antibodi, terlihat dari hasil titer yang sangat rendah. Dalam periode ini terjadi perubahan fungsional limfosit yang dimulai dengan pengenalan antigen. Lama periode ini tidak selalu tetap, terlihat pada kelinci III yang memberikan nilai titer 28,5% pada minggu ke dua setelah suntikan imunisasi.

Apabila hewan disuntik imunogen yang sama untuk kedua kali, terjadilah respons imun sekunder yang ditandai oleh pembentukan antibodi yang lebih cepat dan lebih banyak, sebab sistem pembentukan antibodi telah mengalami pemanasan setelah imunisasi pertama dan telah menyediakan sekelompok sel-sel ingatan.

Dari grafik perkembangan titer mulai saat imunisasi pertama hingga suntikan ulang ke 7 (Gambar 1) menunjukkan bahwa di antara ketiga ekor kelinci, hanya kelinci III yang memberikan respons imun yang cukup baik.

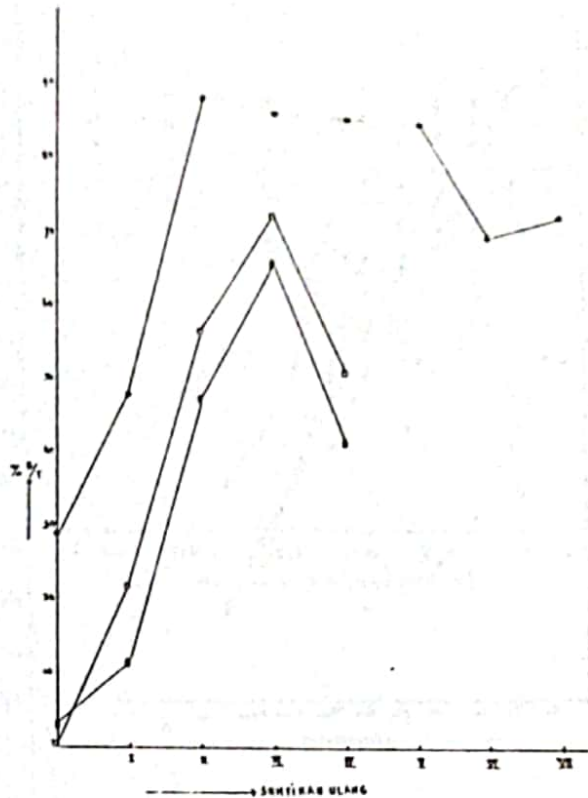
Kedua kelinci lainnya hingga suntikan ulang ke 3 belum memberikan respons imun yang tinggi, dan mengalami penurunan pada suntikan ulang yang berikutnya, sehingga untuk kedua kelinci tersebut tidak dilakukan suntikan ulang lagi. Perbedaan respons imun sangat bergantung dari faktor biologik dan susunan genetik dari hewan yang bersangkutan [2].

Suntikan ulang pada kelinci III dilanjutkan hingga suntikan ulang ke 7. Grafik perkembangan titer dapat dilihat pada Gambar 1. Dari grafik terlihat bahwa titer maksimum diperoleh pada suntikan ulang yang ke dua dan tidak lagi mengalami kenaikan pada suntikan ulang yang berikutnya. Ini menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi imunogen tidak dapat lagi meningkatkan pembentukan antibodi.

RIA merupakan salah satu cara penentuan yang digolongkan dalam analisis kejenuhan. Antibodi merupakan pereaksi utama dalam sistem RIA dan sering ditambahkan dalam jumlah kurang dari setengah jumlah antigen yang merupakan analit yang harus diukur. Itulah sebabnya antiserum yang digunakan perlu diencerkan.

Dalam sistem RIA titer didefinisikan sebagai pengenceran antiserum yang menyebabkan 50% perunut terikat. Dari kurva titrasi antiserum progesteron pada Gambar 2 dapat dipantau perkembangan produksi antibodi pro-





Gambar 1. Perkembangan hasil titer mulai dari suntikan imunisasi hingga suntikan ulang ke 7 c e

gesteron dari sejak suntikan ulang pertama hingga suntikan ulang ke 7.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa setelah suntikan ulang ke 5 antiserum yang dihasilkan memberikan nilai titer paling tinggi yaitu 1/1250.

Umumnya titer antiserum untuk keperluan RIA berkisar antara 10-10 [4]. Bila dibandingkan dengan titer antiserum, pada umumnya titer antiserum progesteron cukup rendah, hal ini disebabkan karena hormon steroid (progesteron) mempunyai pengaruh menghambat fagositosis yang akan menekan terjadinya reaksi imun pada proses pembentukan antibodi [6].

Antiserum tidak dapat diseleksi hanya atas dasar titer saja. Keuntungan antiserum dengan titer tinggi ialah sedikit antiserum dapat digunakan untuk sejumlah besar penentuan.

Untuk memperoleh pengenceran antiserum yang optimal pada daerah kerja yang diinginkan, dilakukan pembuatan kurva baku dan kurva profil presisi dari beberapa pengan-

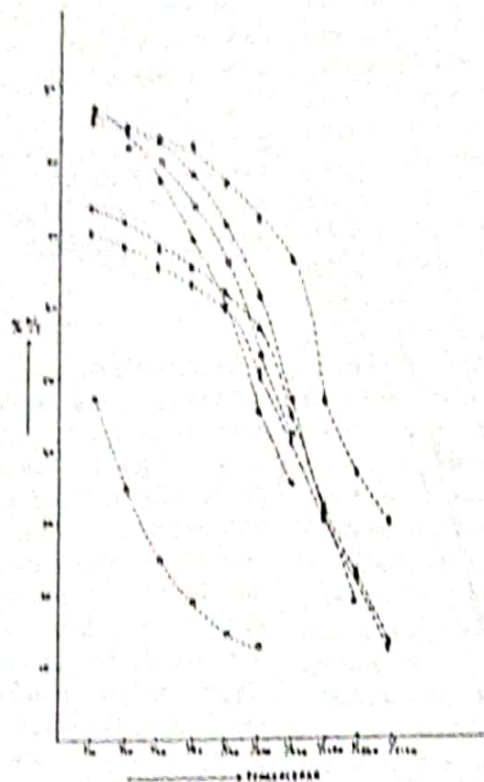
ran antiserum yaitu 1/500, 1/750, dan 1/1000. Hasil optimasi pengenceran antiserum dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 2.

Dari hasil pengamatan diperoleh bahwa pengenceran antibodi optimal adalah 1/750 yang memberikan ikatan maksimum ( $B_0/T$ ) yang cukup tinggi dan memberikan daerah kerja yang cukup lebar.

Dengan kondisi pengenceran ini, dilakukan pula penentuan jumlah pereaksi optimal. Hasil penentuan kombinasi pereaksi dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 4.

Dari data yang diperoleh ternyata desain penentuan dengan 100  $\mu$ l larutan baku progesteron (cuplikan), 100  $\mu$ l progesteron bertanda  $^{125}$ I, dan 100  $\mu$ l antiserum progesteron memberikan hasil percobaan yang cukup peka pada daerah kerja yang diinginkan 6 - >100 nmol/l.

Mengingat bahwa untuk penentuan progesteron dengan metode RIA tidak diperlukan pemisahan antibodi progesteron dari antibodi lainnya, maka perlu dilakukan uji kespesifikan. Kespesifikan dievaluasi dengan mempelajari



Keterangan:

B = fraksi terikat; T = keaktifan total

2 minggu setelah booster 1

2 minggu setelah booster 3

2 minggu setelah booster 5

2 minggu setelah booster 7

2 minggu setelah booster 2

2 minggu setelah booster 4

2 minggu setelah booster 6

Gambar 2. Kurva titrasi antiserum progesteron dari suntikan ulang pertama hingga ke 7

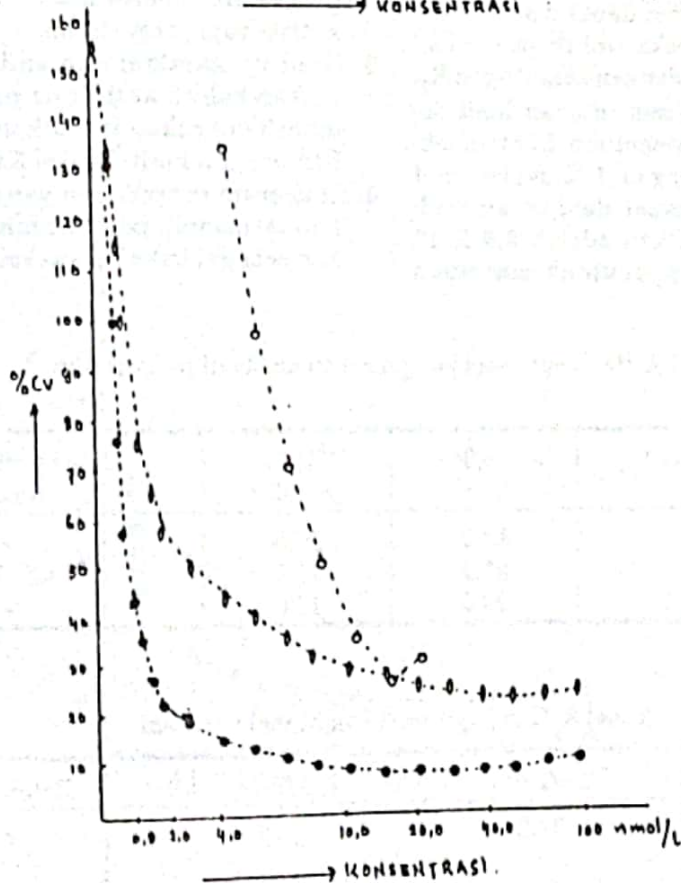
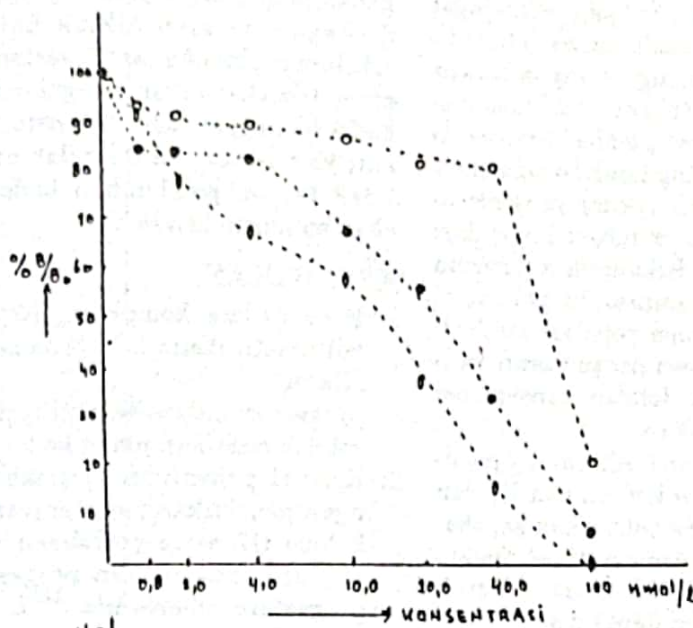
reaksi silang antiserum progesteron terhadap senyawa-senyawa yang mempunyai struktur yang hampir sama diantaranya senyawa testosteron, kortison, dan deoksikortikosteron. Adanya reaksi silang akan menyebabkan hasil pengukuran cenderung terlalu tinggi. Derajat reaksi silang ditentukan sebagai perbandingan konsentrasi antigen spesifik (progesteron) terhadap konsentrasi senyawa yang mengadakan reaksi silang pada Ed 50 ( $B/B_0 = 50\%$ ) [5]. Hasil penentuan reaksi silang terhadap antibodi progesteron dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 5.

Dari data yang diperoleh deoksikortikosteron memberikan reaksi silang sebesar 0,35 %, sedang untuk senyawa testosteron, dan kortison derajat reaksi silangnya sangat kecil. Kadar deoksikortikosteron dalam darah normal sangat rendah, sehingga adanya reaksi silang tidak

signifikan pengaruhnya terhadap hasil pengukuran konsentrasi progesteron. Dari hasil analisis dapat disimpulkan bahwa antiserum progesteron yang dihasilkan cukup spesifik untuk penentuan RIA.

Kepakaan analisis RIA erat hubungannya dengan aviditas atau harga K. Harga K dapat diperoleh dari kurva Scatchard. Dengan menganggap bahwa antibodi yang dihasilkan bersifat homogen sehingga hanya mempunyai satu harga K, maka kurva Scatchard dapat dialurkan dengan B/F (perbandingan fraksi terikat dan fraksi bebas) sebagai sumbu vertikal dan konsentrasi fraksi terikat sumbu horizontal (Gambar 6). Harga K dapat diperoleh dari kemiringan garis [4].

Pada Gambar 6 terlihat bahwa kurva Scatchard merupakan superposisi dua fungsi linier dengan kemiringan masing-masing  $K = 2,76 X$



Keterangan:

B = fraksi terikat; B<sub>0</sub> = fraksi pada konsentrasi 0  
 pengenceran 1/500; pengenceran 1/750; pengenceran 1/100

Gambar 3. Kurva baku dan kurva profil presisi pada berbagai pengenceran antiserum progesteron



$10^7$  l/mol dan  $K = 1,9 \times 10^6$  l/mol. Mengingat bahwa antibodi yang dihasilkan adalah anti-serum poliklonal yang mengandung beberapa populasi antibodi, dan setiap antibodi memberikan harga K yang berbeda, maka kurva Scatchard yang diperoleh sering tidak berupa garis lurus tetapi berupa garis lengkung yang merupakan superposisi beberapa fungsi linier dari setiap antibodi spesifik. Sekalipun antiserum yang dihasilkan adalah antiserum poliklonal yang mengandung beberapa populasi antibodi tetapi dengan dilakukannya pengenceran antiserum maka antiserum dengan konsentrasi yang rendah dapat diabaikan.

Antiserum progesteron terdiri dari 2 populasi antibodi yaitu dengan kemiringan  $K_1$  dan  $K_2$ . Kedua nilai K ini menggambarkan kepekaan analisis untuk kedua jenis antibodi dalam serum yang dihasilkan. Dari baku progesteron pada berbagai konsentrasi dapat disimpulkan bahwa antibodi yang peka untuk penentuan progesteron ialah kurva dengan kemiringan  $K_1$ .

Aviditas antiserum menentukan limit deteksi dari suatu sistem penentuan. Limit deteksi adalah sebanding dengan  $1/K$ , maka limit deteksi yang dapat dicapai dengan antibodi progesteron yang dihasilkan adalah  $3,6 \times 10$  mol/l. Ini berarti cukup peka untuk penentuan

kadar progesteron. Kadar progesteron sangat dipengaruhi oleh siklus haid, umumnya sebelum ovulasi kadar progesteron rendah (1,6 nmol/l) dan kemudian mengalami kenaikan dan kadar tertinggi (25,6 - 47,9 nmol/l) dicapai pada hari ke 6 hingga ke 8 setelah ovulasi, dan bila tidak terjadi pembuahan kadar progesteron akan menurun kembali.

#### KESIMPULAN

1. Penyuntikan kompleks progesteron-3-karboksimetil oksim-BSA pada kelinci menghasilkan antibodi progesteron, dan titer tertinggi diperoleh setelah suntikan ulang ke 5.
2. Kondisi penentuan optimal diperoleh dengan melakukan pengenceran 1/750 untuk kelinci III, serta percobaan menggunakan 100  $\mu$ l baku/cuplikan progesteron, 100  $\mu$ l progesteron bertanda  $^{125}$ I, dan 100  $\mu$ l antiserum progesteron.
3. Hasil uji karakteristik antiserum menunjukkan bahwa antiserum progesteron yang dihasilkan cukup spesifik untuk penentuan RIA dengan limit deteksi  $3,6 \times 10$  nmol/l.
4. Antiserum progesteron yang dihasilkan cukup memenuhi persyaratan untuk digunakan sebagai bahan pereaksi RIA.

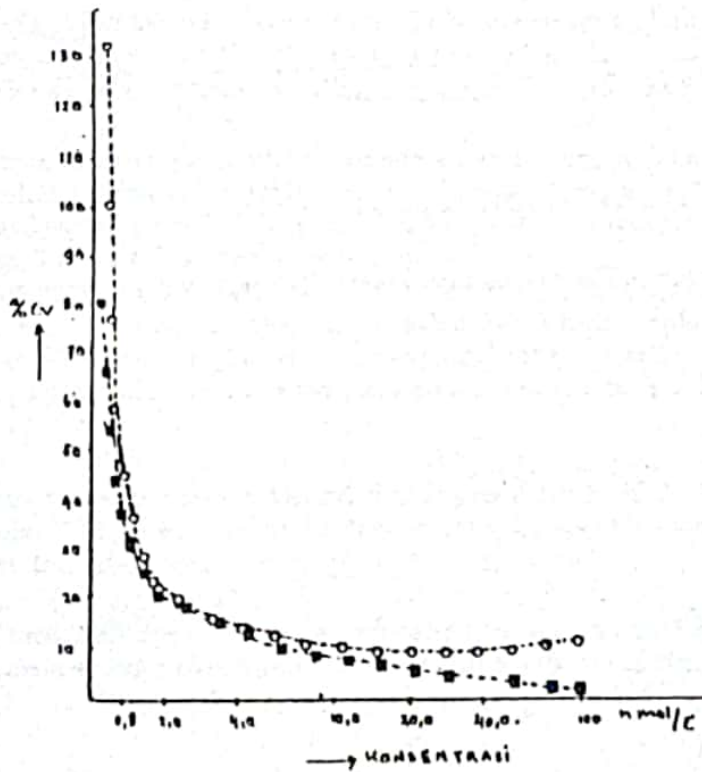
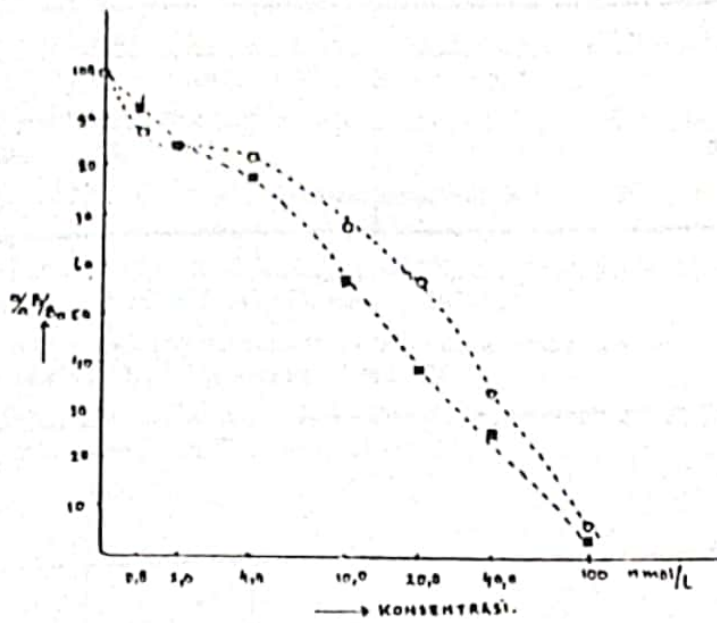
Tabel 2. Hasil optimasi pengenceran antibodi progesteron

Pengenceran antibodi	Bo/T (%)	ED 50 (nmol/l)	Batas profil presisi (nmol/l)
1/500	54,3	70,0	-
1/750	37,2	25,0	8,5 - 73,3
1/1000	20,0	15,0	-

Tabel 3. Hasil optimasi kombinasi pereaksi

Kombinasi pereaksi	Bo/T (%)	ED 50 (nmol/l)	Batas profil presisi
1. 50 $\mu$ l baku 100 $\mu$ l $^{125}$ I-progesteron 100 $\mu$ l antibodi	37,2	25,0	8,5 - 73,3
2. 100 $\mu$ l baku 100 $\mu$ l $^{125}$ I-progesteron 100 $\mu$ l antibodi	42,6	13,0	6,0 - $\pm$ 100





Keterangan:

B = fraksi terikat;  $B_0$  = fraksi pada konsentrasi 0; X = larutan baku; Y =  $^{125}\text{I}$ - progesteron; Z = antibodi progesteron

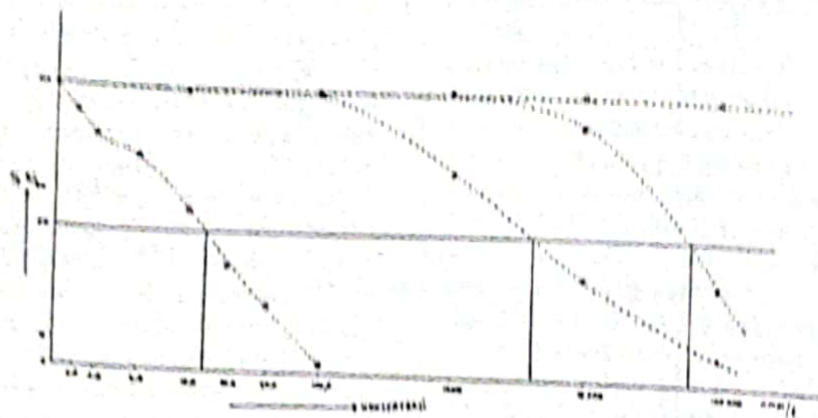
50  $\mu\text{l}$  X, 100  $\mu\text{l}$  Y, 50  $\mu\text{l}$  Z,

100  $\mu\text{l}$  X, 100  $\mu\text{l}$  Y, 100  $\mu\text{l}$  Z

Gambar 4. Kurva baku dan kurva profil presisi pada berbagai kombinasi pereaksi

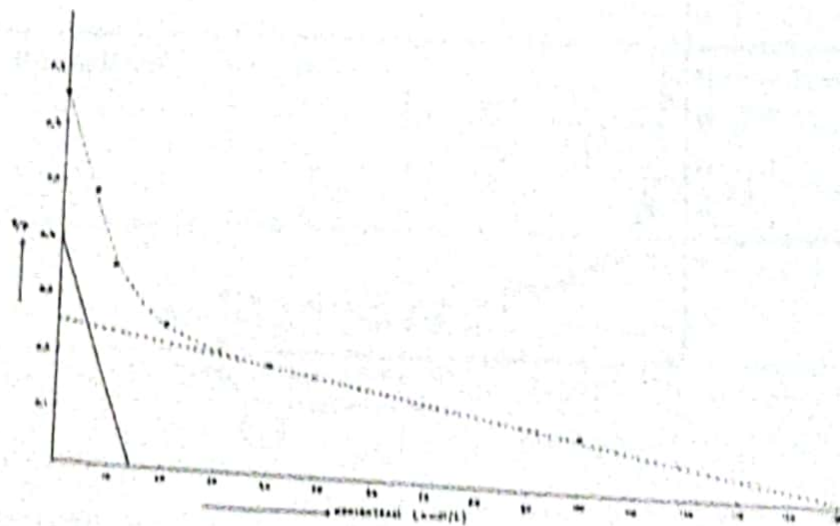
Tabel 4. Hasil penentuan reaksi silang terhadap antibodi progesteron

Senyawa	% Reaksi silang
Progesteron	100
Tbasteron	0,023
Deoksikortikosteron	0,35
Kortison	< 0,0001



Keterangan: B = fraksi terikat; B<sub>0</sub> = fraksi pada konsentrasi 0

Gambar 5. Hasil penentuan reaksi silang antibodi progesteron



Keterangan: B = fraksi terikat; F = fraksi bebas

Gambar 6. Kurva penentuan aviditas antiserum progesteron



## DAFTAR PUSTAKA

1. Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H., Wells, J.V., Basic & Clinical Immunology, 4<sup>th</sup> ed., Lange Medical Publication, Los Altos, California, (1982) 17-22.
2. Harlow, Ed., Lane, David, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1988) 37-45.
3. Ivan, M., M.A. Roitt, P. Oxon, Pokok-pokok Ilmu Kekebalan, P.T. Gramedia, Jakarta, (1985) 240-241.
4. Thorell, J.I., Larson, S.M., Methodology and Clinical Application. Radioimmunoassay and Related Techniques, The C.V. Mosby Company, (1978) 11-31.
5. Anonim, Laboratory training manual on radioimmuno assay in animal reproduction, Technical Report Series No 223, IAEA, Vienna, (1984) 100-102.
6. Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., Review of Medical Microbiology, 16<sup>th</sup> ed., Lange Medical Publication, Los Altos, California, (1984) 231.

## DISKUSI

**Dadang S.:**

1. Bagaimana anda yakin bahwa kurva aviditas terjadi siperposisi, bukannya 1 garis dengan penyimpangan-penyimpangan akibat kesalahan percobaan?
2. Harga K yang mana yang digunakan untuk menghitung limit deteksi?

**Ratnawati:**

1. Mengingat bahwa antibodi yang dihasilkan adalah antiserum poliklonal yang mengandung beberapa populasi antibodi, dan setiap antibodi memberikan harga K yang berbeda, maka kurva Scatchard yang diperoleh sering tidak berupa garis lurus tetapi merupakan superposisi beberapa fungsi linier dari setiap antibodi spesifik.
2. Antiserum progesteron terdiri dari 2 populasi antibodi yaitu dengan kemiringan  $K_1$  dan  $K_2$ . Kedua nilai K ini menggambarkan kepekaan analisis untuk kedua jenis antibodi dalam serum yang dihasilkan. Dari baku progesteron pada berbagai konsentrasi dapat disimpulkan bahwa antibodi yang peka untuk penentuan progesteron ialah kurva dengan kemiringan  $K_1$ .

**Nanny K.:**

Metode pemisahan fraksi bebas dan terikat digunakan dengan PEG 18%, tetapi saya tidak melihat berapa nilai NSB yang diperoleh dengan metode ini, karena biasanya tinggi, dan apakah tidak mengganggu terhadap hasil?

**Ratnawati:**

Nilai NSB yang diperoleh dengan metode pemisahan menggunakan PEG 18% adalah lebih-kurang 7% dan dalam setiap penentuan telah dikurangi dengan nilai NSB.