

OPTIMASI PEMBUATAN COATED TUBE HUMAN SERUM ALBUMIN (HSA) UNTUK KIT RADIOIMMUNOASSAY (RIA) MIKROALBUMINURIA

**Sutari, V Yulianti S, Triningsih, Gina Mondrida, Agus Ariyanto,
Sri Setiyowati, Puji Widayati dan Wening Lestari**

Pusat Produksi Radioisotop Batan, Gd.11 Kawasan Puspiptek Serpong
tarisb@batan.go.id

ABSTRAK

OPTIMASI PEMBUATAN COATED TUBE HUMAN SERUM ALBUMIN (HSA) UNTUK KIT RADIOIMMUNOASSAY (RIA) MIKROAMBUMIN. *Radioimmunoassay (RIA) adalah suatu metoda analisis berdasarkan pada reaksi imunologi yakni ikatan antigen-antibodi, metoda ini sangat spesifik dan peka digunakan untuk menentukan kadar zat-zat yang ada di dalam cairan tubuh seperti serum, urine dan lainnya sehingga dapat digunakan untuk mengevaluasi suatu penyakit metabolik seperti diabetes melitus. Penelitian dan pengembangan teknologi Kit RIA mikroalbuminuria dengan metode coated tube dilakukan melalui beberapa tahap yakni optimasi pembuatan komponen kit, optimasi assay, validasi assay dan uji klinis. Telah dilakukan penelitian tentang optimasi pembuatan coated tube HSA salah satu komponen kit RIA mikroalbuminuria untuk pemisah fasa padat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan coated tube HSA yang dapat menghasilkan % B/T yang optimum dengan % NSB yang minimum dan memenuhi persyaratan untuk assay. Penelitian dilakukan dengan cara melakukan optimasi larutan dapar sebagai pelarut poliklonal antibodi (Pab)- HSA, optimasi volume coating (volume Pab-HSA) dan optimasi konsentrasi larutan blocking. Hasilnya menunjukkan bahwa larutan dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6 memberikan hasil yang optimum sebagai pelarut Pab- HSA pada titer 1:3000, volume Pab-HSA 750 µL dengan 750 µL larutan bovine serum albumin (BSA) 1 % sebagai blocking dan diperoleh % B/T dan % NSB masing-masing $46,49\% \pm 0,57$ dan $0,77\% \pm 0,04$ serta memenuhi persyaratan Kit RIA untuk assay.*

Kata kunci : Coated tube, Radioimmunoassay, Mikroalbuminuria

ABSTRACT

OPTIMAZATION OF MANUFACTURING COATED TUBE HUMAN SERUM ALBUMIN (HSA) FOR KIT RADIOIMMUNOASSAY (RIA) MIKROAMBUMIN. *Radioimmunoassay (RIA) is a method of analysis based on the immunological reaction of antigen - antibody binding which is very specific and sensitive to be used to determine the levels of substances present in body fluids such as serum , urine , and others and to evaluate a disease metabolic like diabetes mellitus, as well. A research and technology development of RIA Kit mikroalbuminuria with coated tube method was done through several stages of the optimization of the components producing kit , assay optimization, assay validation and clinical trials . A study of the optimization of HSA coated tube as RIA mikroalbuminuria kit components for solid phase separator has been carried out . This study aimed to obtain HSA coated tube that can produce an optimum of % B / T with minimum of % NSB and met the requirements for the assay . The study was conducted by optimizing: the buffer solution as solvent polyclonal antibody (Pab) – HSA, coating volume (volume Pab - HSA) and blocking solution concentration, as well. The result showed that the carbonate bicarbonate buffer solution of 0.05 M pH 9.6 gave optimum results as a solvent Pab - HSA at 1:3000 titer , volume of Pab-HSA 750 mL to 750 mL solution of 1 % bovine serum albumin (BSA) as blocking and obtained % B / T and % NSB of $46.49\% \pm 0.57$ and $0.04 \pm 0.77\%$ respectively, and met the requirements for the RIA assay kit.*

Keywords : Coated tube, Radioimmunoassay, Mikroalbuminuria.

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) atau kencing manis adalah kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik peningkatan kadar gula (glukosa) dalam darah (hiperglikemika). Hal ini disebabkan oleh kekurangan insulin atau reseptor insulin tidak berfungsi dengan baik. Insulin merupakan suatu hormon yang diproduksi oleh pankreas dan berfungsi mengendalikan kadar glukosa dalam darah dengan cara mengatur produksi dan penyimpanannya^[1].

Berdasarkan *American Diabetes Association* (ADA) penyakit DM diklasifikasikan menjadi DM tipe 1 dan DM tipe 2.^[1] DM tipe 1 disebabkan karena kurangnya insulin secara absolut akibat proses autoimun sedangkan DM tipe 2 merupakan kasus terbanyak (90-95% dari seluruh kasus diabetes) yang umumnya mempunyai latar belakang kelainan diawali dengan resistensi insulin^[4]. DM tipe 2 berlangsung lambat dan progresif, sehingga tidak terdeteksi karena gejala yang dialami pasien sering bersifat ringan seperti kelelahan, iritabilitas, poliuria, polidipsi dan luka yang lama sembuh^[4]. Kasus prevalensi DM cenderung meningkat dan diperkirakan pada tahun 2030 prevalensi DM di seluruh dunia akan meningkat menjadi dua kali lipat^[5]. Menurut survei yang dilakukan World Health Organization (WHO), Indonesia menempati urutan ke-4 dengan jumlah penderita DM terbesar di dunia, setelah India, Cina dan Amerika Serikat.^[6]

Satu pertiga dari pasien dengan DM tipe 1 dan satu perenam dari pasien dengan DM tipe 2 akan berkembang menjadi nefropati. Nefropati atau gagal ginjal adalah keadaan fisiologis seseorang yaitu bila kadar albumin yang diekskresi ke dalam urine lebih besar dari 200 µg/menit atau 300 mg/hari. Konsentrasi albumin 20-200 µg/menit atau 30-300 mg/hari disebut mikroalbuminuria dan merupakan penanda DM.

Salah satu cara untuk mencegah penyakit DM berlanjut sampai gagal ginjal adalah mengetahui secara deteksi dini kadar albumin dalam urin. Untuk itu dibutuhkan suatu metoda atau teknik analisis yang spesifik dan sensitif salah satunya adalah teknik *Radioimmunoassay* atau RIA Di pasaran telah beredar pereaksi-percaksi yang disiapkan dalam bentuk Kit seperti Kit RIA mikroalbuminuria, DIPSTICK dan ELISA

namun masih harus diimport dari luar negeri dengan biaya yang mahal. Untuk menanggulangi hal tersebut Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka PRR- BATAN telah mengembangkan Kit RIA mikroalbuminuria dengan metode *coated tube*.^[2]

TEORI

Radioimmunoassay (RIA) adalah suatu metode analisis berdasarkan pada reaksi imunologi atau ikatan antigen-antibodi, dengan reaksi kompetisi antara antigen bertanda radioaktif (Ag*) dengan antigen tak bertanda (Ag) terhadap antibodi (Ab) yang jumlahnya terbatas. Teknik ini sangat spesifik karena didasarkan pada reaksi imunologi yaitu ikatan antara antigen dan antibodi yang spesifik untuk antigen tertentu dan sangat peka karena menggunakan perunut radioaktif yang dapat dideteksi dengan alat-alat yang kepekaannya tinggi sehingga ketelitiannya tinggi. Oleh karena itu teknik RIA ini banyak digunakan untuk menganalisis zat-zat yang ada di dalam cairan tubuh seperti serum, plasma, urine dan kultur media yang kadarnya rendah akan tetapi matriknya kompleks sehingga teknik ini dapat digunakan untuk mengevaluasi fungsi organ atau suatu penyakit.

Pada teknik RIA, setelah terjadi kesetimbangan reaksi maka akan terdapat ligan yang terikat dan ligan bebas tak terikat, untuk itu perlu dilakukan pemisahan. Sistem pemisahan yang ideal adalah yang mudah, cepat, sederhana, *reproducible*, ekonomis, dan sempurna. Ada dua macam cara pemisahan pada teknik RIA yaitu pemisahan fasa cair dan fasa padat. Pemisahan fasa padat lebih disukai karena cepat, mudah, sederhana dan *reproducible*. Pada teknik pemisahan fasa padat antibodi diimobilisasi (*coated*) pada fasa padat seperti tabung reaksi (*coated tube*), *bead* atau *mikrobead*.^[9]

Teknik pembuatan *coated tube* dilakukan yaitu dengan melarutkan antibodi dalam dapar kemudian ditempelkan /diimobilisasi ke dalam tabung polistiren selama waktu dan suhu tertentu.

Prinsip analisis menggunakan Kit RIA mikroalbuminuria metode *coated tube* adalah didasarkan pada reaksi imunologi antara antisera albumin (antibodi) yang diimobilisasi (*coated*) ke dalam tabung polistiren dasar bintang (*coated tube*) dengan antigen albumin dalam standar/sampel dan

antigen albumin bertanda radioaktif ^{125}I (*tracer*). Maka akan terjadi reaksi kompetisi antara antigen bertanda ^{125}I dan antigen tidak bertanda terhadap antibodi yang jumlahnya terbatas. Setelah diinkubasi dalam waktu tertentu albumin yang terikat dan albumin bebas (tidak terikat) dipisahkan. Besarnya keradioaktifan albumin yang terikat ditentukan dengan pencacah gamma. Besar keradioaktifan yang terikat pada *coated tube* ditentukan dengan cara menghitung menggunakan rumus Persamaan (1) dan Persamaan (2).

$$\text{Persen ikatan maksimum} \\ \left(\% \frac{B}{T}\right) = \frac{\text{Cacahan fase terikat-BG}}{\text{Cacahan Total-BG}} \times 100 \% \quad (1)$$

$$\text{Persen ikatan Tidak Spesifik}^{[3]} \\ (\% \text{NSB}) = \frac{\text{Cacahan fase terikat-BG}}{\text{Cacahan Total-BG}} 100 \% \quad (2)$$

Kit RIA mikroalbuminuria metode *coated tube* yang dikembangkan PRR-BATAN sangat spesifik dan sensitiv karena dapat menentukan kadar albumin dalam jumlah mikrogram.

Tahap-tahap kegiatan pengembangan yang dilakukan meliputi: optimasi pembuatan komponen kit RIA mikroalbuminuria dan optimasi *assay*, validasi *assay* dan uji klinis. Optimasi pembuatan komponen kit terdiri dari pembuatan *coated tube*, *tracer* dan standar dari bahan yang sesuai. Sedang optimasi *assay* meliputi optimasi volume standar, volume dan cacahan *tracer* serta optimasi waktu dan kondisi inkubasi. Validasi *assay* meliputi penentuan akurasi, presisi dan batas deteksi. Uji klinis dilakukan dalam rangka uji banding kit yang dibuat dengan kit komersial yang sudah rutin digunakan laboratorium klinis.

Pada kegiatan penelitian ini telah dilakukan optimasi pembuatan *coated tube* yang terdiri dari pemilihan dapar sebagai pelarut, volume larutan *coating*, volume larutan *blocking* dan konsentrasi larutan *blocking*.

Dalam makalah ini akan dilaporkan tentang hasil-hasil yang telah diperoleh dari kegiatan optimasi pembuatan *coated tube* HSA untuk kit RIA mikroalbuminuria.

METODE

Bahan dan Peralatan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain: Poliklonal anti Human serum Albumin (HSA) produksi PRR-BATAN, Standar HSA (Sigma), natrium karbonat (Merck), natrium bikarbonat (Merck), ^{125}I -HSA PRR-BATAN, human Serum Albumin HSA (Sigma), tabung Polistiren dasar bintang (*Star*) (NUNC), natrium fosfat (Merck), bovin serum albumin (BSA), natrium klorida (Merck), urea dan akuabides (IPHA).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah pipet mikro dengan berbagai ukuran, pengaduk *vortex*, rak tabung dan alat pencacah gamma: *Gamma Management System* (GMS, DPC) dan *Gammatec model 600 (Gammatec II Nucleus Inc)*.

Langkah Kerja

1. Pemilihan Dapar

Dapar digunakan sebagai pelarut pada Proses Imobilisasi Pab-HSA ke dalam tabung polistiren dasar bintang (*Coated Tube*)

Diambil 5 μL Pab-HSA dilarutkan dalam 5 ml dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6. Larutan di *dispensing* ke dalam tabung reaksi polistiren dasar bintang masing-masing 500 μL , tabung ditutup dengan aluminium-*foil*, kemudian diinkubasi semalam pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$. Sisa cairan dibuang dan tabung dicuci dengan 1 \times 1 mL larutan tween 20 0,05% dalam aquades. Setelah kering tabung di *blocking* dengan 1 mL larutan BSA 3% dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6. Tabung ditutup dengan aluminium-*foil* setelah itu diinkubasi selama 24 jam /semalam pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$. Sisa cairan dibuang, tabung dicuci dengan 1 \times 1 mL larutan *tween20* 0,05% dalam aquades. Tabung dibiarkan kering pada suhu ruang dan kemudian dilakukan uji imunologi dengan protokol *assay* 2.2, dan dihitung ikatan maksimum (%B/T), menggunakan Persamaan (1).

Dengan cara dan prosedur yang sama dilakukan untuk pelarut Pab-HSA menggunakan dapar natrium bikarbonat 0,05 M pH 8,5.

2. Protokol Assay

Ke dalam *coated tube* dimasukkan 50 μL standar nol HSA ditambah 500 μL *tracer* HSA dengan cacahan kira-kira 30000 cacahan permenit, (masing-masing dilakukan duplo), campuran diaduk dengan pengaduk *vortex*. Tabung ditutup dengan *aluminium-foil* kemudian diinkubasi selama 24 jam /semalam pada suhu ruang. Sisa cairan dibuang, tabung dicuci dengan 1 \times 1 mL larutan 0,05% tween 20 dalam aquabides. Tabung dibiarkan kering kemudian dicacah dengan pencacah gamma.

3. Pembuatan Titer Pab-HSA

Dapar yang dipilih berdasarkan hasil optimasi pemilihan pelarut Pab -HSA diambil untuk digunakan dalam membuat satu seri larutan pengenceran Pab HSA dengan perbandingan: 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000 dan seterusnya, kemudian masing-masing larutan di-*dispensing* ke dalam tabung polistiren dasar bintang sebanyak 500 μL . Tabung ditutup dengan *aluminium-foil* dan diinkubasi selama 24 jam /semalam pada suhu 4 °C. Sisa cairan dibuang dan tabung dicuci dengan 1 \times 1 mL larutan tween 20 0,05 % dalam aquabides. Setelah kering tabung di *blocking* dengan 1 mL larutan 3 % BSA dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6. Tabung ditutup dengan *aluminium-foil* dan diinkubasi selama 24 jam/semalam pada suhu 4 °C. Sisa cairan dibuang, tabung dicuci dengan 1 \times 1 mL larutan tween 20 0,05 % dalam aquabides. Tabung dibiarkan kering pada suhu ruang, kemudian di lakukan uji imunologi dengan protokol *assay* 2.2 dan dihitung % B/T menggunakan Persamaan (1).

4. Pembuatan *Coated Tube* dengan Variasi Volume Pab-HSA (volume larutan *coating*)

Dibuat larutan Pab-HSA dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6 dengan pengenceran 1:3000 sesuai titer yang diperoleh pada langkah kerja 2.3. Larutan di *dispensing* ke dalam tabung reaksi polistiren dasar bintang dengan membuat variasi volume : 250 μL , 500 μL , 750 μL dan 1000 μL masing- masing dilakukan duplo. Tabung ditutup dengan *aluminium-foil* dan diinkubasi selama 24 jam/semalam pada suhu 4 °C. Sisa cairan dibuang dan tabung dicuci dengan 1 \times 1 mL larutan tween 20 0,05% dalam aquabides. Setelah kering tabung dilakukan *blocking*

dengan 1 mL larutan BSA 3% dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6. Tabung ditutup dengan *aluminium-foil* dan diinkubasi selama 24 jam /semalam pada suhu 4°C. Sisa cairan dibuang dan tabung dicuci dengan 1 \times 1 mL larutan tween 20 0,05% dalam aquabides. Tabung dibiarkan kering pada suhu ruang kemudian di lakukan uji imunologi dengan protokol assay 2.2 dan dihitung %B/T, menggunakan Persamaan (1).

5. Pembuatan *Coated Tube* Pab-HSA dengan Variasi Volume Larutan *Blocking*

Dibuat larutan Pab-HSA dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6 dengan pengenceran 1:3000. Larutan *didispensing* ke dalam tabung reaksi polistiren dasar bintang sebanyak 750 μL sesuai volume yang diperoleh pada langkah 2.4 , (masing-masing dilakukan duplo). Kecuali tabung ikatan tidak spesifik (NSB) tanpa larutan Pab-HSA. Tabung ditutup dengan *aluminium-foil* dan diinkubasi selama 24 jam /semalam pada suhu 4 °C. Sisa cairan dibuang dan tabung dicuci dengan 1 \times 1 mL larutan tween 20 0,05% dalam aquabides. Setelah kering tabung dilakukan *blocking* dengan larutan BSA 3% dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6 dengan melakukan variasi volume : 500 μL , 750 μL dan 1000 μL . Tabung ditutup dengan *aluminium-foil* dan diinkubasi selama 24 jam /semalam pada suhu 4 °C. Sisa cairan dibuang dan tabung dicuci dengan 1 x 1 mL larutan tween 20 0,05% dalam aquabides. Tabung dibiarkan kering pada suhu ruang, kemudian dilakukan uji imunologi dengan protokol 2.2. Lalu dihitung % B/T menggunakan persamaan (1) dan % NSB Persamaan (2)

6. Pembuatan *Coated Tube* Pab-HSA Variasi Konsentrasi Larutan *Blocking*.

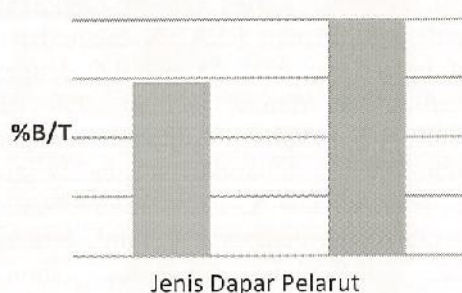
Dibuat larutan Pab-HSA dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6 dengan pengenceran 1:3000. Larutan *didispensing* ke dalam tabung reaksi polistiren dasar bintang sebanyak 750 μL (masing-masing dilakukan duplo). Kecuali untuk tabung ikatan tidak spesifik (NSB) tanpa ditambahkan larutan Pab-HSA. Tabung ditutup dengan *aluminium-foil* kemudian diinkubasi selama 24 jam /semalam pada suhu 4 °C. Sisa cairan dibuang dan tabung dicuci dengan 1 \times 1 mL larutan tween 20 0,05 % dalam aquabides. Kemudian tabung

dibiarkan kering pada suhu kamar kemudian tabung *blocking* dengan 750 μ L larutan BSA, sesuai volume yang diperoleh pada langkah 2.5, dengan membuat variasi konsentrasi : 1%, 2%, 3% 4% dan 5%, dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6,. Tabung ditutup dengan alumunium-*foil* dan diinkubasi selama 24 jam /semalam pada suhu 4 °C, sisa cairan dibuang, tabung dicuci dengan 1x1 mL larutan tween 20 0,05% dalam aquabides. Tabung dibiarkan kering pada suhu kamar kemudian dilakukan uji imunologi dengan langkah kerja 2.2. Lalu dihitung %B/T menggunakan Persamaan (1) dan %NSB Persamaan (2).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan Dapar Sebagai Pelarut Pada Proses Imobilisasi Pab-HSA Ke dalam Tabung Polistiren Dasar Bintang (*Coated Tube*)

Pemilihan dapar sebagai pelarut Pab-HSA dilakukan dengan dua macam dapar yaitu natrium bikarbonat 0,05 M pH 8,5 dan dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6 dan hasilnya seperti pada Gambar 1.



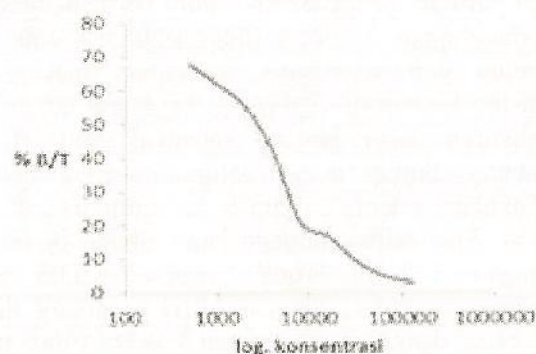
Gambar 1: Kurva Dapar Pelarut Vs % B/T.

Gambar 1 menunjukkan bahwa hasil uji imunologi *coated tube* dengan variasi pelarut Pab-HSA diperoleh B/T 29,43 % untuk dapar natrium bikarbonat 0,05 M pH 8,5 sedang untuk dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6 diperoleh 39,73% B/T, hasil tersebut lebih tinggi dari hasil dapar natrium bikarbonat 0,05 M pH 8,5. Hal ini dikarenakan dapar karbonat bikarbonat mempunyai pH yang lebih tinggi dibanding dapar natrium bikarbonat, pH yang lebih tinggi sangat berpengaruh terhadap kelarutan protein dalam Pab-HSA. [4]. Oleh karena itu untuk langkah selanjutnya dipilih dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6

sebagai pelarut Pab-HSA yang akan diimobilisasi.

Pembuatan Titer Pab-HSA

Setelah diperoleh dapar yang terbaik sebagai pelarut Pab-HSA yang akan diimobilisasi ke dalam tabung polistiren berdasar bintang (*coated tube*). Maka perlu dilakukan titrasi terhadap Pab-HSA untuk menentukan jumlah Pab-HSA yang diperlukan dalam pembuatan *coated tube* HSA. Titer dilakukan dengan membuat satu deret pengenceran Pab-HSA dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6. Hasil uji imunologi dari titer Pab-HSA dapat dilihat pada Gambar 2.

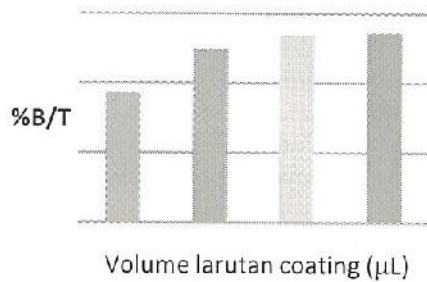


Gambar 2: Kurva titer log Konsentrasi Pab HSA Vs % B/T

Berdasar Gambar 2 diperoleh B/T tertinggi sebesar 69% pada titer 1:500, namun syarat kit RIA dikatakan baik bila B/T \geq 30% [5] maka untuk pembuatan *coated tube* diambil titer/pengenceran 1: 3000, dengan B/T antara 40% sampai 50%.

Pembuatan *Coated Tube* Variasi Volume Pab-HSA (volume larutan *coating*)

Dari titer/pengenceran yang dapat menghasilkan B/T tertinggi akan dipilih dan kemudian dibuat *coated tube* dengan membuat variasi volume larutan Pab-HSA (volume *coating*) : 250 μ L , 750 μ L dan 1000 μ L dan dilakukan uji imunologi terhadap *coated tube*, hasilnya seperti pada Gambar 3 di bawah ini.



Gambar 3: Kurva Volume Larutan Coating Vs Ikatan Maksimum (%B/T)

Berdasar Gambar 3 tampak bahwa hasil uji imunologi *coated tube* dengan variasi volume *coating*, masing-masing adalah untuk volume 250 µL diperoleh B/T = 37,10% ± 0,55; untuk volume *coating* 500 µL diperoleh B/T = 49,80% ± 2,02; untuk volume 750 µL diperoleh B/T = 53,61% ± 0,66 dan untuk volume 1000 µL diperoleh B/T 54,19% ± 0,50. Untuk volume *coating* 750 µL dan 1000 µL diperoleh B/T yang tidak berbeda jauh, hal ini dimungkinkan protein terlarut pada volume tersebut sudah mendekati jenuh. Semua hasil optimasi volume *coating* telah memenuhi syarat untuk kit RIA yakni B/T ≥ 30%, untuk kestabilan 10 minggu diperlukan B/T 40% sampai 50%. Oleh karena hasil % B/T dari volume *coating* antara 750 µL dan 1000 µL tidak berbeda jauh maka untuk efisiensi diambil volume optimal yakni 750 µL.

Pembuatan Coated Tube Pab-HSA dengan variasi Volume Larutan Blocking .

Berdasar hasil optimasi pembuatan *coated tube* dengan volume *coating*, kemudian dilakukan optimasi untuk volume larutan blocking BSA 3% dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6. Hasil optimasi volume larutan blocking BSA 3% dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1: Pengaruh Volume Larutan Blocking Terhadap ikatan Maksimum (%B/T) dan % ikatan tidak Spesific (%NSB) yang Diblocking dan Tanpa Blocking

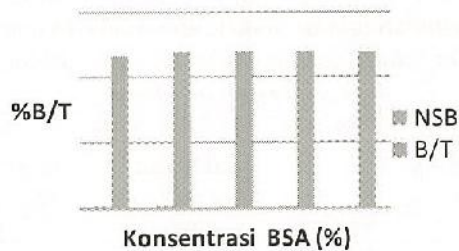
Volume blocking (µL)	% B/T	% NSB dengan blocking	% NSB tanpa blocking
500	47,77 ± 3,42	0,75 ± 0,05	13,81
750	43,46 ± 3,51	0,70 ± 0,06	10,55
1000	43,55 ± 4,02	0,61 ± 0,03	10,52

Berdasar Tabel 1. tampak bahwa volume blocking 500 µL diperoleh % B/T 47,77 ± 3,42; volume blocking 750 µL diperoleh % B/T = 43,46 ± 3,51 dan untuk volume blocking 1000 µL diperoleh % B/T = 43,55 ± 4,02, hasil-hasil tersebut lebih besar dari persyaratan. Demikian halnya untuk %NSB dengan blocking ≤ 5%. Sedang % NSB tanpa blocking tidak memenuhi syarat, karena syarat Kit RIA yang baik adalah mempunyai %B/T ≥ 30% dan NSB ≤ 5% [5]. Pada Tabel 1 terlihat perbedaan yang nyata dari %NSB dengan blocking kurang dari 1% sedang %NSB tanpa blocking lebih dari 10%, karena memang fungsi dari blocking dimaksudkan untuk memperkecil % NSB.

Ikatan maksimum (%B/T) volume blocking 500µL sedikit lebih tinggi dari lainnya yaitu 47,60%, hal ini dimungkinkan ada penyerapan tracer (¹²⁵I-HSA) kepori-pori tabung yang tidak tertutup oleh larutan blocking karena volume coating lebih banyak (750 µL) dari pada volume blocking. Volume blocking sebaiknya lebih banyak atau sama dengan volume coating, maka untuk menghemat bahan dipilih volume blocking 750 µL dengan B/T 43,46%.

Pembuatan Coated Tube Pab-HSA Variasi Konsentrasi Larutan Blocking.

Setelah diperoleh hasil optimasi untuk larutan dapar, volume coating dan larutan blocking maka selanjutnya dilakukan optimasi terhadap konsentrasi larutan blocking BSA dan hasilnya seperti pada Gambar 4.



Gambar 4: Kurva Pengaruh konsentrasi BSA Terhadap % B/T dan %NSB

Berdasar Gambar 4, ditunjukkan bahwa hasil uji imunologi *coated tube* dengan *blocking* untuk konsentrasi BSA dari BSA 1% sampai dengan BSA 5% diperoleh hasil % B/T dan % NSB yang tidak jauh berbeda dan semua memenuhi syarat untuk kit RIA. Hasil % B/T tertinggi adalah 48,01 dan % NSB terendah 0,51 pada konsentrasi larutan BSA 5% sedangkan untuk konsentrasi BSA 1% dapat diperoleh 46,49% ± 0,57 dan NSB 0,77% ± 0,04, hasil tersebut tidak jauh berbeda sehingga untuk efisiensi dipilih konsentrasi BSA 1% sebagai larutan *blocking*.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa telah diperoleh hasil optimasi pada pembuatan *coated tube* sebagai pereaksi pemisah fasa padat pada Kit RIA mikroalbuminuria yakni Pab- HSA dapat larut baik dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05M dan pH 9,6. Untuk membuat larutan *coating* dipakai pengenceran 1:3000 dengan hasil B/T = 40% s/d 50%. Sedang volume *coating* optimum pada 750 µL dengan *blocking* menggunakan larutan BSA 1% sebanyak 750 µL diperoleh B/T 46,49% ± 0,57 dan NSB 0,77% ± 0,04 serta memenuhi persyaratan kit RIA untuk *assay*.

DAFTAR PUSTAKA

- Suyono S., Mikroalbuminuria: Komplikasi mikro dan makroangiopati pada Diabetes Mellitus, Pusat Diabetes dan Lipid, Jakarta, FKUI. (2000)
- American Diabetes Association, *Nephropathy in Diabetes (Position Statements, Original Article)*, *Diabetes Care*, 27 : S79 – S83. (2004)
- American Diabetes Association, *Standard of Medical Care in Diabetes, Diabetes Care*, 29. (2006)
- Smeltzer B., and Hinkle, *Brunner & Suddarth's Textbook of Medical Surgical Nursing, Cheever 11 th Edition*, Lippincott. (2008)
- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., and King H., *Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030, Diabetes care*, Vol 27, 5 : 1047 – 1053. (2008)
- Rockwood K., Philips S., Tan M.H., and McDowell I., *Prevalence of diabetes mellitus in elderly people in Canada. Age Aging*; 27: 573-7". (1998)
- Rockwood K., Awalt E., MacKnight C., and McDowell I., *Incidence and outcomes of diabetes mellitus in elderly people: report from the Canadian Study of Health and Aging. CMAJ*. (2000)
- Sukiyati D.j., Wayan R.S., Gina M., Agus Ariyanto, Sutari, dan Triningsih, *Proceeding Seminar Sains Dan Teknologi Nuklir Menyongsong Reaktor Triga Mark II Bandung 2 Megawatt Sebagai Saran Peningkatan Mutu Litbang Iptek*.
- Darlina, *Pembuatan Larutan Standard an Pereaksi Pemisah kit RIA T₃*, *Jurnal Radioisotop dan Radiofarmaka*, 1(2), 77-91". (1998)
- Rediatning W., *Prinsip Dasar Radioimmunoassay*, *Diklat Pelatihan Radiofarmasi untuk Staf Pengajar Farmasi Perguruan Tinggi Indonesia*, PRR-BATAN, Serpong. (2004)
- Lutfi S, *Fakultas Pertanian Universitas Udayana dalam makalah Studi Perubahan Protein Terlarut Selama Perkecahan Biji Wijen Menggunakan Pendekatan Respon Surface Methodologi*.