

PENANDAAN DAN UJI KUALITAS SENYAWA PROGESTERON -11- α - HIDROKSI HEMISUKSINAT ¹²⁵I *)

Sukiyati Dj.**) dan Adria H.***)

ABSTRAK

PENANDAAN DAN UJI KUALITAS PROGESTERON-11- α -HIDROKSI HEMISUKSINAT

¹²⁵I. Progesteron adalah hormon steroid yang disekresi oleh korpus luteum dan korteks adrenal dari kelenjar hipofisis. Hormon tersebut dapat digunakan untuk memonitor kehamilan atau menentukan kesuburan pada wanita atau hewan. Penandaan hormon Progesteron dengan ¹²⁵I dilakukan untuk pembuatan "tracer" pada Kit Progesteron-¹²⁵I untuk menentukan kadar Progesteron dalam darah atau susu pada hewan. Percobaan iodinasi progesteron menggunakan derivatnya progesteron-11- α -hidroksi hemisuksinat telah dilakukan. Penandaan dilakukan secara bertahap. Pertama dilakukan aktivasi derivat progesteron menggunakan N-metil morfolin dan isobutil kloroformat, berikutnya iodinasi histamin menggunakan oksidator kloramin T dan terakhir konjugasi histamin bertanda ¹²⁵I pada derivat progesteron yang sudah diaktivasi. Hasil penandaan dimurnikan dengan HPLC. Kemurnian radiokimianya ditentukan dengan elektroforesis. Imunoreaktivitasnya ditentukan dengan menentukan ikatan maksimum dan nilai "non specific binding" (NSB). Hasil penandaan progesteron-11- α -hidroksi hemisuksinat dengan rendemen 22.15% , kemurnian radiokimia 92,30% dan radioimunoreaktivitas dengan ikatan maksimum 51% (untuk standar 0) serta NSB 0,67% (kurang dari 1%). Aktifitas jenis yang diperoleh 7,72 Ci/g. Validasi "tracer" dilakukan dengan menentukan 3 sera kontrol (QC sera) progesteron untuk nilai QC sera rendah (L) $2,72 \pm 0,49$ nmol/L (1,2 - 2,5 nmol/L), sedang (M) $11,33 \pm 1,15$ nmol/L (6 - 15 nmol/L) dan tinggi (H) $15,95 \pm 5,32$ nmol/L (10 - 23 nmol/L) (Tabel 1.). Dari penentuan sensitifitas "assays" memberikan nilai $(0,70 \pm 0,024)$ nmol/L.

ABSTRACT

LABELLING AND VALIDATION OF PROGESTERONE-11- α -HIDROXY HEMI SUCCINATE (¹²⁵I). Progesterone is a steroid hormone secreted by the corpus luteum and the adrenal cortex in the hypophyse gland. The hormone can be used for monitoring pregnancy and even more for the assessment of the corpus luteum in fertile woman (4). The labeling of progesterone with ¹²⁵I was carried out for tracer production in the preparation of Progesterone Kit used in the determination of the progesteron in serum and cattle milk. Iodination of progesterone-11- α -hidroxy hemisuccinate as a progesterone derivat has been done. The labelling was carried out in two steps reaction. First the progesterone derivat was activated using N- methyl morpholine and isobutylchloroformate.

*) Bagian dari Program IAEA Regional Cooperative Agreement For Asia And The Pacific, RAS/5/035.

**) Staf Bidang Radiofarmasi, Pusat Pengembangan Radioisotop dan Radiofarmaka, BATAN.

***) Staf Bidang Peternakan, P3TIR - BATAN.

The second step was performed by conjugating the labelled ^{125}I Histamin to the activated progesterone derivate. The labelled compound was purified with HPLC followed with the determination of the chemical purity using electrophoresis, the immunoreactivity controled with the maximum binding of the zero standard and the non specific binding using the Progesterone Kit. Experimental results showed that the iodination of Progesterone-11- α -hidroxy hemisuccinate (^{125}I) yield 22.15%, chemical purity 92.30 %, the radioimmunoreactivity 51% as maximum binding (for zero standard), with NSB 0.67% , and the specific activity obtained 7.72 Ci/ g. Validation of the tracer using controls (low, medium and high) shows the results as follows : (2.72 ± 0.49) nmol/L for low standard and control (1.2 - 2.5 nmol/L), (11.33 ± 1.15) nmol/L for medium standard and control (6 - 15 nmol) and (15.95 ± 5.32) nmol/L for high standard and control (10 - 23 nmol/L). The sensitivity of the assay was (0.70 ± 0.024 nmol/L) for zero standard.

PENDAHULUAN

Pada umumnya hormon steroid bertanda radioaktif digunakan sebagai perunut ("tracer") dalam teknik Radioimmunoassay (RIA). Umumnya zat radioaktif yang digunakan adalah tritium (^3H) dan ^{125}I . Hormon steroid bertanda ^{125}I mempunyai aktivitas jenis yang relatif lebih tinggi bila dibandingkan dengan hormon steroid bertanda ^3H pemancar beta (1). Demikian pula bila digunakan untuk "assay", hormon steroid bertanda ^{125}I lebih sensitif dan mudah dicacah dengan menggunakan pencacah γ , dibandingkan hormon steroid bertanda ^3H pemancar beta yang memerlukan pencacah scintilasi cair ("Liquid Scintillation Counter") (1).

Progesteron merupakan hormon steroid dengan berat molekul 314,5 Dalton. Hormon tersebut disekresi oleh korpus luteum dan korteks adrenal dari kelenjar hipofisa (1 - 3). Pada fase pembentukan sel telur (folikuler) pada siklus menstruasi, progesteron diproduksi dengan kadar rendah, tetapi pada hari ovulasi ke 11 - 14 korpus luteum menghasilkan progesteron dengan kadar tinggi (2) ,yang berlanjut sampai 24 jam sebelum menstruasi. Bila terjadi pembuahan (kehamilan) progesteron akan terus diproduksi oleh korpus luteum sampai placenta berkembang dan mengambil alih produksi progesteron (4).

Penentuan kadar progesteron dalam serum darah penting untuk mengetahui fungsi korpus luteum dalam menentukan kesuburan wanita dan menentukan kehamilan. Kadar progesteron pada wanita dewasa normal 1,2 - 30 ng/mL, wanita hamil 30 - 300 ng/mL dan pada pria dewasa normal < dari 1,0 ng/mL (4).

Hormon steroid progesteron tidak dapat diiodinasi langsung dengan ^{125}I karena tidak mengandung gugus tirosin. Kesulitan tersebut dapat diatasi dengan menempelkan molekul atau senyawa lain, seperti tiramin atau histamin yang telah terlebih dahulu diiodinasi dengan ^{125}I , kemudian ditempelkan pada molekul progesteron yang telah diaktifasi melalui molekul perantara ("bridge").

Dalam penelitian ini dilakukan penandaan senyawa progesteron dengan ¹²⁵I melalui pembentukan rantai peptida dari derivat hormon steroid progesteron dengan isobutil kloroformat (aktivator) yang kemudian dikonjugasi dengan senyawa histamin yang telah ditandai dengan ¹²⁵I. N-metil morfolin dalam reaksi digunakan sebagai basa yang menetralkan HCl yang terbentuk sebagai hasil reaksi samping dari reaksi tersebut, sehingga kesetimbangan reaksi diharapkan bergeser kekanan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan teknik penandaan derivat progesteron dengan ¹²⁵I yang layak digunakan sebagai "tracer" dalam Kit Progesteron yang selanjutnya digunakan pada diagnosa/penentuan kadar progesteron dalam sampel serum darah atau susu ternak dengan teknik RIA.

TATA KERJA

Persiapan Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan antara lain : Progesteron-11- α -hidroksi hemisuksinat buatan Steraloids Inc, USA, Histamin (Sigma), Kloramin-T (Merck), Na-metabisulfit (Sigma), N-metil morfolin (Sigma), Isobutil kloroformat (Sigma), NaOH (Merck), HCl (BDH), Acetonitril derajat kemurnian HPLC dari Mallinkord, Na-Acetate (Merck), 1,4 Dioxan (BDH), Etil Asetat (BDH), dan dapar fosfat 0,5 M pH 7,4 (Sigma). Standar progesteron dalam susu skim dengan konsentrasi progesteron masing-masing 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; dan 40 nmol/L. Antibodi monoclonal (terhadap progesteron-11- α -hidroksi hemisuksinat-BSA), diperoleh dari IAEA Wina, Austria.

Untuk pemurnian hasil penandaan digunakan HPLC dengan pompa gradient dan injector Rheodyne yang dihubungkan dengan loop 1 mL "LCD Analytical" (Waters), Gamma detector (Raytest), Kolom μ Bondapak C₁₈ ukuran 3,9 x 300 mm (Waters). Hasil pemurnian dikumpulkan dengan "Fraction Collector" (Eldex). Pengaduk larutan campuran digunakan Mixer Vortex (Vortex - Genie 2). Pencacahan setiap fraksi yang ditampung dalam tabung reaksi dilakukan dengan pencacah γ (mini-assay Model 6-20). Uji kemurnian nya dilakukan menggunakan alat elektroforesis dan "Radiochromatogram Scanner" (Raytest).

Reaksi Penandaan Derivat Progesteron dengan ^{125}I

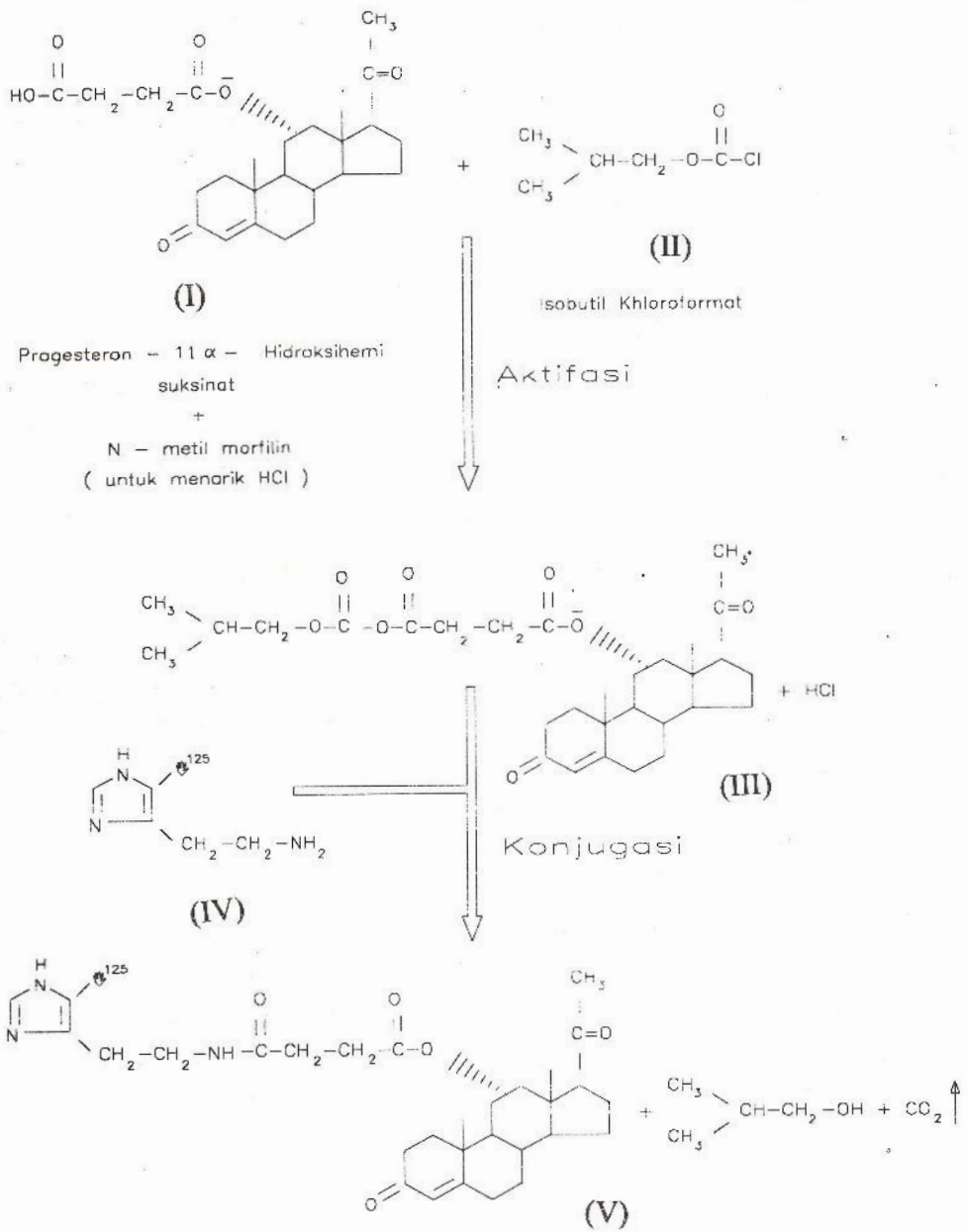
Sintesa “tracer” derivat progesteron- ^{125}I dilakukan secara bertahap. Pertama, aktivasi derivat progesteron menggunakan N-metil morfolin dan isobutil khloroformat, kemudian iodinasi histamin menggunakan metoda khloramin-T dan terakhir konjugasi histamin ^{125}I dengan derivat progesteron yang sudah diaktifasi. Hasil konjugasi dimurnikan dengan HPLC. Tahap reaksi pembuatan progesteron bertanda ^{125}I dan prosedur pembuatannya dapat dilihat pada Skema reaksi Gambar 1., dan Bagan Prosedur Penandaan Progesteron (Lampiran 1.)

Aktivasi Progesteron-11- α -hidroksi hemisuksinat

Dalam tabung reaksi 5 mL (A) dimasukkan 50 μL Progesteron-11- α -hidroksi hemisuksinat (6,4 $\mu\text{mol}/500 \mu\text{L}$ dioxan) dan ditambahkan 10 μL N-metil morfolin dalam dioxan (1 : 50) dan 10 μL isobutil khloroformat dalam dioxan (1 : 100), kemudian tabung reaksi dimasukkan kedalam “water bath” suhu 10 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 - 45 menit. Setiap 5 menit campuran dikocok. Ke dalam campuran ditambahkan 200 μL dioxan yang terlebih dahulu telah didinginkan, dan diaduk dengan vortex. Kemudian hasil aktivasi diambil 50 μL untuk reaksi konjugasi.

Penandaan Histamin dengan ^{125}I

Ke dalam tabung reaksi bertutup (2 mL) (tabung B) dimasukkan 10 μL larutan histamin (2.2 mg/10 mL dalam dapar fosfat 0,5 M pH 8,0), 10 μL (0,5 mCi) Na^{125}I , dan 10 μL kloramin T (5 mg/mL H_2O), campuran diaduk-aduk dengan vortex selama 20 detik pada suhu kamar agar bereaksi dan untuk menghentikan reaksi ditambahkan 10 μL reduktor $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (30 mg/mL H_2O) untuk mereduksi kelebihan oksidator, kemudian diinkubasi di “waterbath” (air es) suhu 10 $^{\circ}\text{C}$ - 12 $^{\circ}\text{C}$, selama 15 - 30 menit.



Progesteron 11 α - hemi - suksinat - 2 - [¹³¹I] Iodohistamin

Gambar 1. Skema tahap reaksi iodinasi "tracer" Progesteron
 dari Progesteron 11 α - hidroksihemisuksinat

Konjugasi Histamin-¹²⁵I dengan derivat Progesteron.

Ke dalam tabung reaksi B (campuran hasil iodinasi histamin) dimasukkan 50 µL larutan progesteron yang sudah diaktifasi, kemudian ditambahkan 10 µL NaOH 0,2 M, lalu diaduk dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Kemudian ditambahkan 1,0 mL HCL 0,1 M kemudian diaduk dan dimurnikan dengan HPLC.

Pemurnian Derivat Progesteron-¹²⁵I

Hasil penandaan yang telah diinkubasi semalam dimurnikan dengan HPLC. Kolom yang digunakan µ bondapak C 18 ukuran : 3,9 x 300 mm. Larutan pengelusi asetonitril dan dapar Na-acetat 0,05 M pH 4,0. Proses elusi menggunakan pompa gradien dan detektor gamma, dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Eluat ditampung secara berfraksi dengan volume setiap fraksi sebanyak 1 mL.

Pemeriksaan kemurnian radiokimia derivat Progesteron-¹²⁵I

Kemurnian radiokimia hasil penandaan derivat Progesteron-¹²⁵I dianalisis dengan elektroforesa menggunakan fasa diam kertas Whatman No.1 dan larutan pengelusi dapar karbonat 0,05 M, pH 9,6. Tegangan alat elektroforesis yang digunakan 240 Volt dan waktu elusi selama 50 menit.

Penentuan aktifitas jenis derivat Progesteron-¹²⁵I

Aktivitas jenis hasil penandaan dinyatakan dalam radioaktifitas per unit massa senyawa progesteron yang ditandai (senyawa yang mengandung radionuklida ¹²⁵I) (mCi/mg atau µCi/µg).

$$\text{Aktivitas jenis } (\mu\text{Ci}/\mu\text{g}) = \frac{\% \text{ radiokimia hasil penandaan} \times \text{aktivitas total iodium } (\mu\text{Ci})}{\text{masa derivat progesteron } (\mu\text{g})}$$

Pengujian imunologi derivat Progesteron-¹²⁵I

Derivat Progesteron-¹²⁵I diencerkan dengan larutan PBS 0,05 M pH 7,4 yang mengandung 0,01 % BSA, sehingga aktivitas larutan dalam setiap 200 μ L "tracer" memberikan cacahan 25.000 - 30.000 cpm. "Tracer" hasil penandaan diuji immuno reaktifitasnya terhadap standar progesteron 0; 1,25 ; 2,5 ; 5,0 ; 10 ; 20; dan 40 ng/L dan QC sera progesteron (Tabel 1.)

Protokol uji imunologi

Ke dalam tabung reaksi 5 mL, (tanpa "coated" serum anti progesteron) dimasukkan masing-masing 200 μ L "tracer" T (radioaktifitasnya 25.000 - 30.000 cpm /200 μ L) (2 tabung) dan 2 tabung reaksi tanpa "coated" anti progesteron untuk NSB (duplo).

Ke dalam "coated tube" anti progesteron dimasukkan 40 μ L larutan standar (Standar progesteron 0,00; 1,25; 2,50; 5,00; 10,00; 20,00; dan 40 nmol/L) dan QC sera (3 tabung). Masing-masing standar dan QC sera dilakukan duplo.

Campuran diinkubasi semalam pada suhu 4 °C, dan dididkantasi. Pencucian (kecuali tabung T "tracer") dilakukan dengan larutan pencuci Tween-20 (1%) sebanyak 500 μ L untuk setiap tabung dan dilakukan dua kali. Seluruh tabung dicacah selama 1 menit seperti ditunjukkan pada Protokol asay (Lampiran 2.) Data hasil asay terlihat pada Tabel 1.

Pengujian kadar dan sensitifitas "assay" perunut derivat Progesteron-¹²⁵I

Pengujian perunut dilakukan dengan menentukan kadar QC sera progesteron (Tabel 1.) dan penentuan sensitifitas "assay" dengan cara penentuan kadar standar 0 sebanyak enam kali dan perhitungan deviasi standarnya (5).

Tabel 1. Hasil "Assay" Menggunakan "Tracer" derivat Progesteron bertanda ^{125}I dengan teknik RIA

No. Tabung	Nama	Cacahan rata-rata (cpm)	%B/B0	%B/T	Konsentrasi (nmol/L)
1, 2	"Tracer"	22143 ± 66	-	-	-
3, 4	Standar 1	13067 ± 43	100	59,0	0
5, 6	Standar 2	11662 ± 31	89,2	52,7	1,25
7, 8	Standar 3	8899 ± 24	68,1	40,2	2,5
9, 10	Standar 4	6790 ± 20	52,0	30,7	5,0
11, 12	Standar 5	4621 ± 27	35,4	20,9	10,0
13, 14	Standar 6	2795 ± 18	21,4	12,6	20,0
15, 16	Standar 7	1722 ± 15	13,2	7,8	40,0
17, 18	QC 1	9081,5 ± 37,1	69,5	41,0	2,4
19, 20	QC 2	4794,3 ± 26,8	36,7	21,7	9,5
21, 22	QC 3	3099,5 ± 21,4	23,7	14,0	18,0

Catatan :

Nilai batas

: QC₁ = 1,2 - 2,5 nmol/L

: QC₂ = 6 - 15 nmol/L

: QC₃ = 10 - 23 nmol/L

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada aktivasi derivat progesteron digunakan N-metil morfolin dan isobutil khloroformat, N-metil morfolin dalam aktivasi bertindak sebagai basa yang dapat mengikat HCl sebagai hasil reaksi samping yang terbentuk dari reaksi antara progesteron -11- α -hidroksi hemisuksinat dan isobutil khloroformat. Hasil aktivasi derivat progesteron kemudian di konjugasikan pada senyawa histamin yang telah bertanda ¹²⁵I.

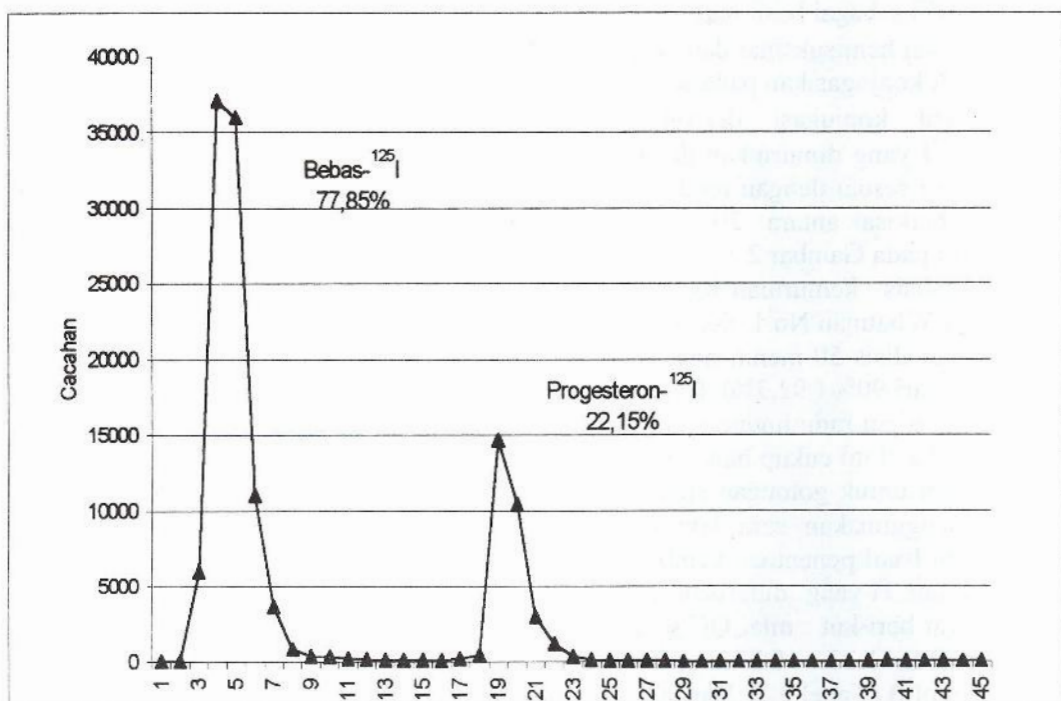
Hasil konjugasi derivat Progesteron-11- α -hidroksi hemisuksinat dengan Histamin-¹²⁵I yang dimurnikan dengan HPLC memberikan yield ~ 22.15% (lebih dari 20%), hal ini sesuai dengan rendemen hasil penandaan dari golongan steroid yang pada umumnya berkisar antara 20 - 30% (1). Profil kromatogram HPLC hasil pemurnian ditunjukkan pada Gambar 2.

Analisis kemurnian hasil penandaan menggunakan elektroforesis dengan fasa diam kertas Whatman No.1, fasa gerak dapar karbonat 0,05M, tegangan operasi 240 Volt, dan waktu analisis 50 menit, memberikan hasil kemurnian radiokimia yang cukup baik, lebih besar dari 90% (92,3%), (Lihat Gambar 3.)

Pengujian radioimuno reaktifitasnya menggunakan standar 0 memberikan ikatan 51% (B/T) hasil ini cukup baik karena rendemen hasil penandaan masih kurang dari 30 - 40 % , tetapi untuk golongan steroid sudah memadai untuk "assay", karena dalam uji perunut menggunakan sera kontrol rendah (L), sedang (M) dan tinggi (H) yang memberikan hasil penentuan kembali berada di dalam daerah lingkup konsentrasi "QC" sera L, M, dan H yang diberikan. Pengujian kadar tiga cuplikan QC sera memberikan hasil sebagai beri-kut : nilai QC sera rendah (L) 2,72 + 0,49 nmol/L (1,2 - 2,5 nmol/L), menengah (M) 11,33 + 1,15 nmol/L (6 - 15 nmol/L) dan tinggi (H) 15,95 + 5,32 nmol/L (10 - 23 nmol/l) (Tabel 1.). Dari hasil "assay" kadar QC sera kadar ketiganya masih ada dalam batas yang ditentukan, jadi perunut yang dibuat memenuhi syarat. Penentuan NSB memberikan hasil yang baik, karena kurang dari 1% menunjukkan adanya pengotor steroid lain atau senyawa yang mirip senyawa progesteron yang berikatan dengan perunut kurang dari 1% (0,66%). Bila NSB tinggi penentuan kadar progesteron menjadi tidak akurat atau tidak sensitif.

Penentuan aktifitas jenis yang dilakukan menurut rumus penentuan aktifitas jenis ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ atau Ci/g) dari perkalian % hasil iodinasi (% rendemen) dengan aktifitas iodium yang digunakan dibagi masa progesteron yang ditanda diperoleh aktifitas jenis 7,72 Ci/g . Besarnya aktifitas jenis hasil penandaan masih rendah sehingga, perlu dilakukan optimasi penandaan dengan misalnya menaikkan aktifitas ¹²⁵I yang digunakan untuk menandai histamin atau mengaktifasi derivat progesteron dengan lebih baik.

Dengan aktifitas jenis progesteron yang terlalu tinggi akan merusak molekul progesteron yang ditanda atau kemungkinan akan terjadi degradasi senyawa progesteron dan menurunkan imunoreaktifitas perunut dalam kit Progesteron- ^{125}I .



Gambar 2. Pemurnian hasil penandaan derivat Progesteron dengan ^{125}I menggunakan HPLC.

Catatan : Kolom μ bondapak C18, 3,9 x 300 mm

Pengelusi A : CH_3CN

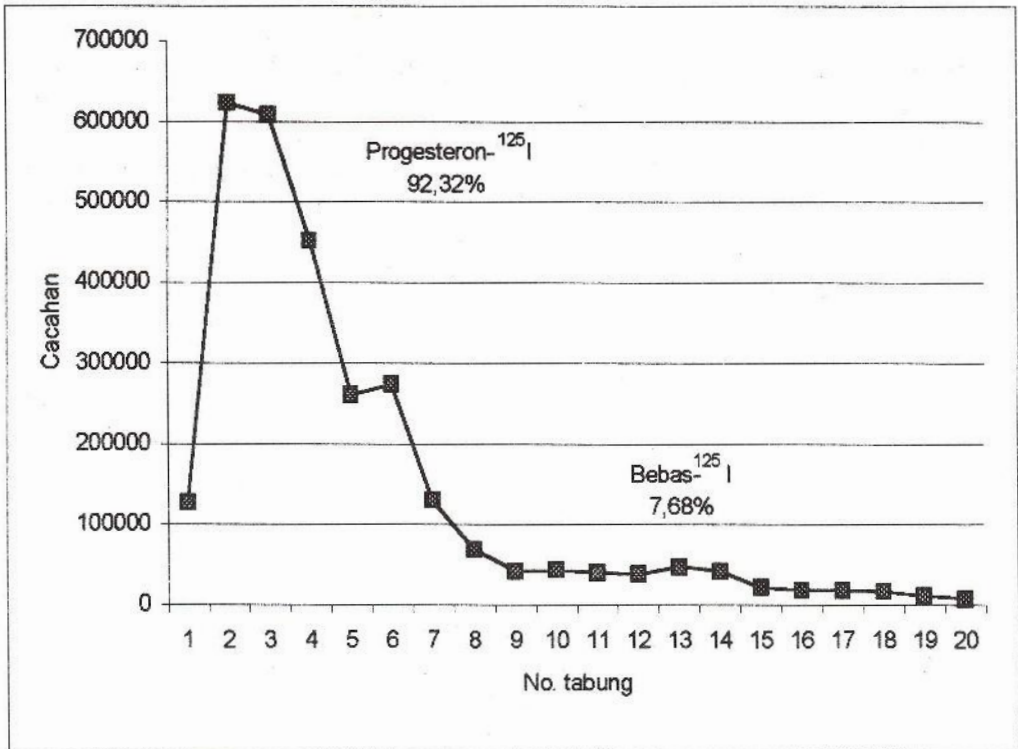
B : CH_3COONa , pH 4

Gradien : 0 – 5 menit CH_3CN 20%

5 – 80 menit CH_3CN 20 – 60%

Detector : Gamma

Kecepatan alir : 1 mL/menit



Gambar 3. Kemurnian “tracer” derivat Progesteron- ^{125}I dengan Elektroforesa Fasa diam kertas Whatman No. 1, fasa gerak dapar karbonat 0,05 M, pH 9,6

Keterangan : Tegangan 240 Volt
: waktu 50 menit

KESIMPULAN

Pembuatan derivat Progesteron-¹²⁵I telah dapat dilakukan dengan hasil yang cukup memuaskan walaupun dari hasil penandaan progesteron masih rendah, tetapi kemurnian radiokimia dan imunoreaktivitasnya cukup tinggi. Aktivitas jenis hasil penandaannya cukup tinggi karena pada validasi sebagai "tracer" dapat dipenuhi dengan pengujian QC sera L, M dan H ketiganya masih ada dalam rentang konsentrasi yang ditentukan. Sensitifitas "tracer" masih dapat diterima.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Ibu Dra. Wayan M.Sc, dan Bapak Dr. Abdul Mutalib yang telah memberikan kepercayaan kepada kami untuk melakukan pelatihan di Bangkok.

DAFTAR PUSTAKA

1. IAEA Regional Cooperative Agreement For Asia And The Pacific RAS/5/035 , "Feed supplementation and Reproductive Management of Cattle in Practical Training Workshop of the Production of Iodinated Tracer for Self- coating RIA of Progesterone", Bangkok, Thailand, 8 - 12 May 2000.
2. Joint FAO/IAEA Programme, " Animal Production And Health in Self-Coating Milk Progesterone RIA KIT, Seiberdorf ", Austria., January 1997.
3. IAEA Regional Cooperative Agreement For Asia And The Pacific RAS/5/035 ." Feed supplementation and Reproductive Management of Cattle in Lecture Notes Trainig Workshop on the Production of Iodinated Tracer for Self - Coating RIA of Progesterone" , Bangkok, Thailand, 8 - 12 May 2000.
4. Radioimmunoassay KIT For Progesterone " RIAK - 12 " Board of Radiation And Isotope Technology, Vashi Complex, Navi Numbai, INDIA..
5. DARLINA, " Evaluasi Kit TSH Imunoassay Komersial Di Indonesia", Jurnal Radioisotop Dan Radiofarmaka, Vol.1 No.1, hal.37 - 50

Lampiran 1.

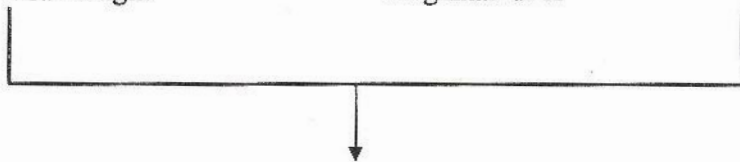
PROSEDUR IODINASI DERIVAT PROGESTERON

A

50 μ L Progesteron-11- α - Hidroksi hemisuksinat
10 μ L N-metil morfolin (1:50 dalam dioksan)
10 μ L Isobutil khloroformat (1:100 dalam dioksan)
Campur, inkubasi pada 10 - 12°C selama 45 menit
Tambahkan 200 μ L dioksan dingin

B

Masukkan kedalam tabung reaksi :
10 μ L Histamin (2,2mg/10mL 0,5 M DP)
10 μ L (0,5 mCi) Na
10 μ L Khloramin-T (5 mg/mL H₂O)
Campur selama 20 detik
Tambahkan 10 μ L Na₂S₂O₅ (30mg/mL H₂O)
Dinginkan di es



Tambahkan 50 μ L campuran A kedalam campuran B
Tambahkan 10 μ L NaOH 0,2 M
Aduk dan diinkubasi semalam pada 4 °C
Keesokan harinya tambahkan 1,0 mL HCl 0,1 M diaduk dan dimasukkan ke dalam HPLC

Lampiran 2.

PROTOKOL "ASSAY"

Disiapkan tabung salut ("coated tubes") duplo untuk "assay" standar, QC dan sampel

Standar / QC/ Cuplikan	40 μL
"Tracer"	100 μL
Inkubasi semalam pada 4 °C	
Dekantasi	
Ditambahkan 500 μL larutan pencuci, kemudian dekantasi	
Pencucian diulangi	
Tabung reaksi dicacah selama 1 menit	