
PENGARUH WAKTU DAN SUHU INKUBASI PADA OPTIMASI ASSAY KIT RIA MIKROALBUMINURIA

V. Yulianti Susilo, G. Mondrida, S. Setiyowati, Sutari dan W. Lestari
Pusat Pengembangan Radioisotop dan Radiofarmaka (P2RR), BATAN

ABSTRAK

PENGARUH WAKTU DAN SUHU INKUBASI PADA OPTIMASI ASSAY KIT RIA MIKROALBUMINURIA. Penentuan kadar albumin dalam jumlah mikro dalam urin pasien sangat penting dilakukan untuk deteksi dini mikroalbumin sebelum menjadi *nephropathy* (gagal ginjal). Penentuan kadar mikroalbumin tersebut menggunakan teknik *radioimmunoassay* (RIA) dengan kit RIA Mikroalbuminuria. Kit RIA yang baru harus memberikan kinerja *assay* yang baik, maka setelah diproduksi komponen kit RIA Mikroalbuminuria yang memenuhi syarat perlu dilakukan rancangan *assay* yang tepat agar diperoleh kondisi *assay* yang optimum. Telah dilakukan optimasi rancangan *assay* kit RIA Mikroalbuminuria untuk memperoleh waktu dan suhu inkubasi yang terbaik, yaitu variasi waktu inkubasi 1 jam, 3 jam, 5 jam dan 18 jam dan suhu inkubasi 4°C, 25°C dan 37°C. Protokol *assay* yang optimum dicapai dengan inkubasi selama 3 jam pada 37°C, yang menghasilkan % ikatan maksimum sebesar 52% dan ikatan non spesifik (NSB) cukup rendah 0,15%. Kit RIA Mikroalbuminuria ini stabil memenuhi syarat %B/T dan %NSB dan dapat dipertahankan selama 8 minggu.

Kata kunci : Optimasi, *Radioimmunoassay*, Mikroalbuminuria

ABSTRACT

THE INFLUENCE OF INCUBATION TIME AND TEMPERATURE ON THE OPTIMUM ASSAY OF MICROALBUMINURIA. Determination of albumin content at micro quantity in a patient urine is very important for an early detection of microalbuminuria before a *nephropathy* (kidney failure) state to occur. Determination of albumin content in a patient urine is by *radioimmunoassay* technique using microalbuminuria RIA kit. In a production of a new. microalbuminuria RIA Kit, a good assay performance should be guaranteed, therefore after RIA reagent that fulfil the required quality were obtained, an optimum assay condition should be designed. Optimization for assay design of microalbuminuria RIA kit have been carried out in order to obtained the best incubation time and temperature. Incubation time and temperature investigated were 1 hour, 3 hour, 5 hour and 18 hour and 4°C, 25°C dan 37°C respectively. The optimum assay protocol was achieved by 3 hour incubation at 37°C, resulting a high maximum binding of 52% and very low non spesific binding (NSB) of 0,15% respectively. The microalbuminuria RIA kit was stable and comply the required %B/T and %NSB up to 8 weeks.

Keywords : Optimize, *Radioimmunoassay*, Microalbuminuria.

PENDAHULUAN

Dewasa ini penggunaan teknik RIA untuk analisis berbagai senyawa yang ada dalam serum darah atau urin manusia semakin berkembang sejalan dengan ilmu pengetahuan dan teknologi. Salah satu senyawa yang dapat dianalisis dengan teknik ini adalah albumin yang diekskresi ke dalam urin pasien dalam kondisi patologis tertentu. Penentuan kadar albumin dalam jumlah mikro pada urin pasien sangat penting dilakukan untuk deteksi dini mikroalbumin agar dapat dilakukan pencegahan sebelum menjadi *nephropathy* atau gagal ginjal [1]. Mikroalbuminuria adalah keadaan fisiologis seseorang dimana kadar albumin yang diekskresi ke dalam urin sebesar 30 – 300 mg dalam 24 jam. Konsentrasi albumin diatas nilai tersebut disebut proteinuria dan pasien dinyatakan *nephropathy* atau gagal ginjal [2].

Penentuan kadar albumin dalam urin pasien dengan menggunakan teknik RIA memerlukan komponen kit RIA Mikroalbuminuria yang terdiri dari : *Human Serum Albumin (HSA)* yang ditandai dengan radioisotop ^{125}I sebagai perunut (*tracer*), antibodi HSA yang disalutkan dalam tabung dasar bintang, larutan standar HSA dengan pelarut urin sintesis, dan larutan pencuci (0,1% *Tween 20* dalam aquabides).

Dalam produksi kit RIA yang baru, agar diperoleh kinerja *assay* yang baik, maka setelah didapat pereaksi RIA yang memenuhi persyaratan perlu dilakukan rancangan *assay* agar diperoleh kondisi *assay* yang optimum. Setelah kondisi *assay* yang optimum diperoleh untuk menjamin keandalan *assay* yang diberikan, masih perlu dilakukan validasi terhadap kit RIA yang dibuat.

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam optimasi *assay*, yaitu [3] :

- a. Limit deteksi harus sesuai dengan konsentrasi yang diukur sehingga mampu menganalisis cuplikan pada batas konsentrasi yang dikehendaki dengan ketelitian tinggi.
- b. Persen B/T di atas 30%.
- c. NSB (*non spesific binding*) diusahakan sekecil mungkin.
- d. Ketelitian maksimal terletak di daerah kurva standar.
- e. Pengerjaan mudah dan cepat.
- f. Biaya murah.

Optimasi dapat diartikan sebagai suatu proses untuk mencari kondisi yang optimum, dalam arti paling menguntungkan. Dalam pembuatan kit RIA, optimasi *assay* sangat diperlukan karena berpengaruh dalam karakterisasi *assay*. Faktor yang mempengaruhi optimasi *assay* adalah kondisi inkubasi, meliputi waktu dan suhu inkubasi. Waktu dan suhu inkubasi memegang peranan penting dalam optimasi *assay*. Optimasi *assay* yang dilakukan dengan didasarkan pada protokol *assay* standar kit Mikroalbuminuria yang sudah komersial [4].

Waktu inkubasi tergantung pada aviditas antibodi dan kadar zat yang ditentukan. Makin tinggi kadar zat yang ditentukan, makin pendek waktu inkubasi yang diperlukan untuk mencapai kesetimbangan.

Suhu inkubasi mempengaruhi kecepatan tercapainya kesetimbangan reaksi, sehingga menaikkan suhu inkubasi dapat mempercepat tercapainya kesetimbangan reaksi, namun pada suhu tinggi lebih dominan terjadi disosiasi daripada asosiasi, sehingga persen B/T menjadi lebih rendah dan dapat menurunkan limit deteksi dan ketelitian. Suhu inkubasi banyak dilakukan pada 4°C, 25°C atau 37°C, perlu ditentukan pula waktu inkubasi pada suhu tersebut.

Tujuan dari penelitian ini adalah tindak lanjut dari penelitian sebelumnya [3], yaitu menetapkan rancangan *assay* kit RIA Mikroalbuminuria yang optimum dan menguji kestabilan kit tersebut.

TATA KERJA

Bahan

Satu set kit RIA Mikroalbuminuria buatan Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka BATAN yang terdiri dari *tracer* HSA-¹²⁵I 1 vial (55 mL) mengandung ± 300 kBq albumin bertanda, larutan standar HSA 0 µg/mL - 150 µg/mL, tabung bersalut anti-HSA dan larutan pencuci (0,1% *Tween* 20 dalam aquabides).

Peralatan

Pencacah Gamma Management System (GMS), DPC, Berhold, Germany, alat pengaduk model vorteks, inkubator dengan pengatur suhu (Soft Incubator SL 1-600), berbagai ukuran pipet *Eppendorf* beserta tipnya.

Protokol untuk Optimasi Assay.

Coated tube (tabung bersalut antibodi HSA) diberi nomor, nomor 1 sampai dengan 6. Sebanyak 50 µL larutan standar 0 µg/mL HSA ditambahkan ke dalam tabung nomor 1 sampai dengan 4 menggunakan pipet *Eppendorf*, dan ke dalam tabung nomor 5 sampai 6 ditambahkan 50 µL standar 150 µg/mL HSA. Semua tabung ditambah 500 µL *tracer* (HSA-¹²⁵I) dengan cacahan ± 30.000 cpm. Semua tabung dikocok dengan vorteks kemudian diinkubasi dengan variasi waktu inkubasi, 1 jam, 3 jam, 5 jam, 18 jam dan 44 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya supernatan dibuang dan semua tabung dicuci dengan 1 x 1 mL larutan pencuci (0,1% *Tween* 20 dalam aquabides). Tabung dikeringkan dan diukur radioaktivitasnya menggunakan GMS. *Assay* dilakukan juga dengan waktu inkubasi, 1 jam, 3 jam, 5 jam, 18 jam dan 44 jam pada suhu 25 °C dan 37 °C. Protokol *assay* optimum yang diperoleh digunakan untuk uji imunologi kit RIA

Mikroalbuminuria dan uji kestabilannya. Pengujian dilakukan setiap 2 minggu sekali selama 8 minggu.

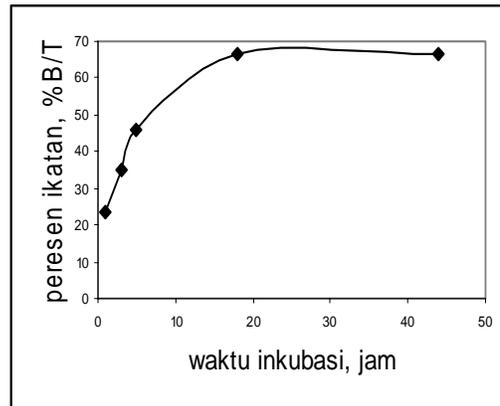
HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi rancangan *assay* meliputi variasi lamanya waktu inkubasi dan suhu inkubasi. Variasi waktu inkubasi dilakukan pada 1 jam, 3 jam, 5 jam dan 1 malam, sedangkan variasi suhu inkubasi dilakukan pada 4°C, 25°C dan 37°C. *Assay* dilakukan dengan menggunakan standar 0 dan standar tertinggi HSA. Pemilihan waktu inkubasi 1 jam berdasarkan protokol *assay* standar dari kit komersial. Pemilihan waktu inkubasi 3 jam dengan pertimbangan kemungkinan akan diperoleh persen ikatan (%B/T) yang lebih besar, dan waktu inkubasi 5 jam dengan pertimbangan jam kerja yang 8 jam, sehingga pekerjaan dapat selesai dalam 1 hari tanpa menambah jam kerja efektif dalam satu hari. Waktu inkubasi 18 jam (1 malam) dilakukan dengan pertimbangan pekerjaan dapat dilanjutkan esok hari tanpa menambah jam kerja di malam hari. Waktu inkubasi ditambah sampai 44 jam untuk menguji kemungkinan kenaikan persen B/T, walaupun waktu tersebut tidak lagi operasional. Inkubasi dilakukan pada 4°C untuk menyesuaikan kondisi penyimpanan (lemari es) semua komponen kit yang digunakan. Inkubasi pada suhu 25°C dilakukan yaitu asumsi suhu kamar agar inkubasi dapat dilakukan tanpa peralatan khusus, sedangkan inkubasi pada suhu 37°C didasarkan pada suhu tubuh normal.

Hasil persen B/T yang dilakukan pada berbagai waktu inkubasi pada suhu 4°C dirangkum dalam Tabel 1 dan Gambar 1 menunjukkan bahwa semakin lama waktu inkubasi, persen B/T yang dihasilkan semakin tinggi, dan waktu inkubasi 18 jam diperoleh hasil yang optimum. Waktu inkubasi 1 jam dihasilkan persen B/T dibawah 30%, dan waktu inkubasi 3 jam diperoleh persen B/T hanya sedikit di atas 30%. Waktu inkubasi 5 jam dan 18 jam masih menghasilkan kenaikan persen B/T, namun setelah itu tidak ada peningkatan persen B/T lagi.

Tabel 1. Persen B/T yang dihasilkan dari berbagai waktu inkubasi pada suhu 4°C.

Konsentrasi standar	Persen B/T pada variasi waktu inkubasi				
	1 jam	3 jam	5 jam	18 jam	44 jam
0	23,70%	34.85%	45,80%	66,54%	66, 51%
150	0,42%	0,53%	0,57%	0,67%	0,65%

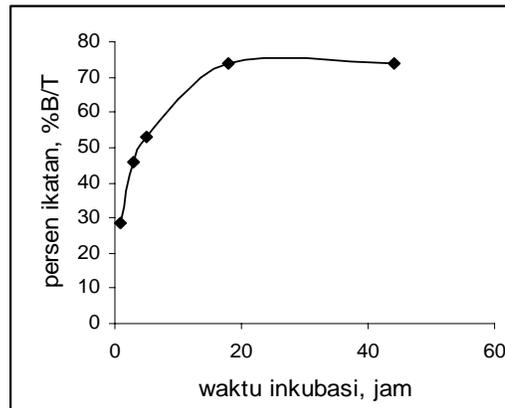


Gambar 1. Kurva % B/T pada berbagai waktu inkubasi pada suhu 4°C.

Tabel 2 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin lama waktu inkubasi pada suhu 25°C persen B/T yang dihasilkan juga semakin tinggi, dengan hasil yang optimum dicapai pada waktu inkubasi 18 jam. Waktu inkubasi 1 jam, persen B/T yang diperoleh dibawah 30% sedangkan pada 3 jam hasilnya di atas 30%. Waktu inkubasi 5 jam dan 18 jam menghasilkan persen B/T yang tinggi, namun inkubasi selama 44 jam diperoleh persen B/T yang hampir sama dengan 18 jam.

Tabel 2. Persen B/T yang dihasilkan dari berbagai waktu inkubasi pada suhu 25°C

Konsentrasi standar	Persen B/T pada variasi waktu inkubasi				
	1 jam	3 jam	5 jam	18 jam	44 jam
0	28,65%	45,67%	53,04%	73,89%	73,85%
150	0,56%	0,65%	0,81%	1,32%	1,33%

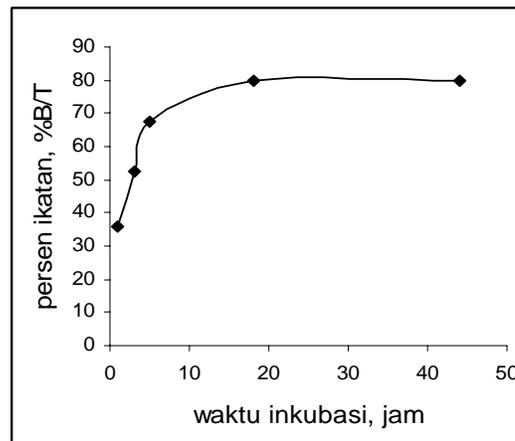


Gambar 2. Kurva % B/T pada berbagai waktu inkubasi pada suhu 25°C

Demikian juga pada Tabel 3 dan Gambar 3 bahwa semakin lama waktu inkubasi, persen B/T yang dihasilkan juga semakin tinggi, dengan hasil yang optimum juga dicapai pada waktu inkubasi 18 jam. Waktu inkubasi 1 jam, persen B/T yang diperoleh sedikit di atas 30% sedangkan pada 3 jam hasilnya di atas 50%. Waktu inkubasi 5 jam dan 18 jam menghasilkan persen B/T semakin tinggi, namun inkubasi selama 44 jam diperoleh persen B/T yang hampir sama dengan inkubasi 18 jam.

Tabel 3. Persen B/T yang dihasilkan dari berbagai waktu inkubasi pada suhu 37°C

Konsentrasi standar	Persen B/T pada variasi waktu inkubasi				
	1 jam	3 jam	5 jam	18 jam	44 jam
0	35.84%	52.57%	67.31%	79.79%	79,77%
150	0,66%	1.03%	1.06%	2.10%	2,11%

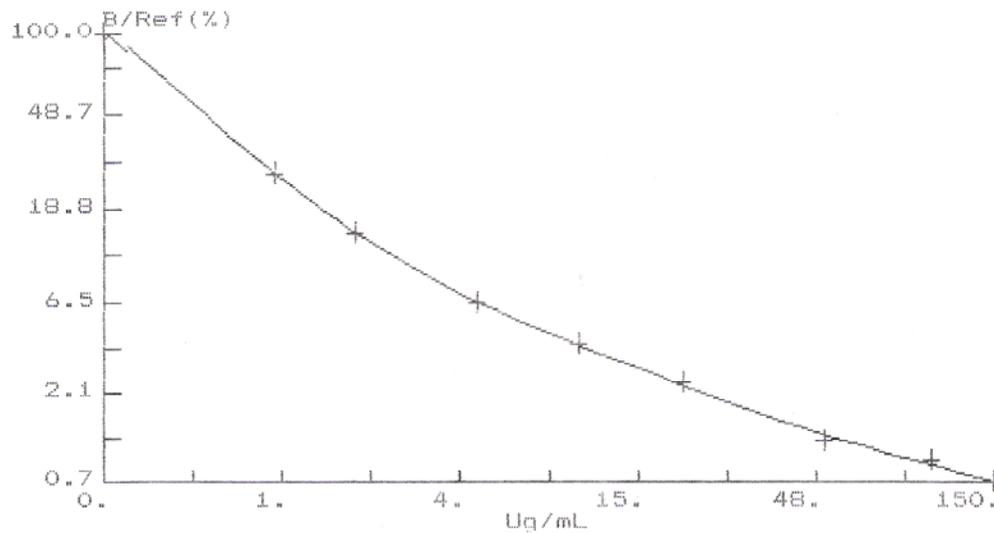


Gambar 3. Kurva %B/T pada berbagai waktu inkubasi pada suhu 37°C

Optimasi untuk mendapatkan keadaan yang maksimum dalam penelitian ini dicapai pada waktu inkubasi 18 jam dalam berbagai variasi percobaan. Rancangan *assay* dapat dipilih pada waktu inkubasi 3 jam pada suhu 37°C atau waktu inkubasi 18 jam pada suhu 25°C. Penggunaan kit ini adalah untuk diagnosa pada pasien sehingga perlu dipikirkan untuk meminimalkan penggunaan waktu dan biaya. Dari segi waktu, inkubasi 3 jam lebih efisien karena pasien tidak perlu menunggu terlalu lama untuk memperoleh hasil diagnosa, sedangkan untuk laboratorium klinis yang tidak mempunyai inkubator dapat melakukan *assay* dengan waktu inkubasi 18 jam. Untuk laboratorium di Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka dipilih kondisi *assay* dengan waktu inkubasi selama 3 jam pada 37°C. Setelah diperoleh kondisi *assay* yang optimum kit Mikroalbuminuria tersebut diuji imunologi dan kestabilannya dengan protokol *assay* yang optimum, menghasilkan persen ikatan maksimum (B/T) sebesar 52%, ikatan non spesifik (NSB) 0,15% dan kurva standar yang linier. Uji imunologi dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel 4. Data hasil uji imunologi

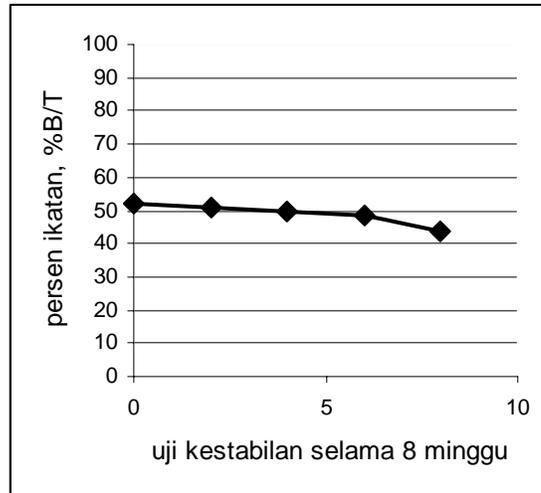
No.	Konsentrasi standar ($\mu\text{g/mL}$)	Persen B/T (%)
1.	0	0,15 (% NSB)
2.	0	52,0
3.	1	25,8
4.	2	14,8
5.	5	7,6
6.	10	4,4
7.	20	2,6
8.	50	1,8
9.	100	1,1
10.	150	0,1



ID #	cpm	%C.V.	%B/B0	CONC.	AVG CONC.	PAT #
23	0.0		ERROR	OFF CURVE+	OFF CURVE+	1
24	0.0		ERROR	OFF CURVE+	OFF CURVE+	2

Gambar 4. Kurva standar kit RIA Mikroalbuminuria.

Stabilitas kit masih baik dan dapat dijaga selama 8 minggu, menghasilkan persen B/T yang lebih dari 30% dan ikatan non spesifik rendah. Kurva kestabilan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Kurva kestabilan kit Mikroalbuminuria selama 8 minggu.

KESIMPULAN

Hasil penelitian optimasi rancangan assay kit RIA Mikroalbuminuria menunjukkan protokol *assay* yang optimum adalah dengan waktu inkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C yang menghasilkan ikatan maksimum (%B/T) yang tinggi sebesar 52% dan ikatan non spesifik (NSB) cukup rendah 0,15%. Kit RIA Mikroalbuminuria ini stabil selama 8 minggu dengan persen B/T yang lebih dari 30%.

DAFTAR PUSTAKA

1. E.COOPER, Pathogenesis Prevention and Treatment of Diabetic Nephropathy, *The Lancet*, vol 352, 1998.
2. H.H. PARVING, B. OXENBOLL, P.A. SVENSEN, J.S. CHRISTIANSEN, A.R. ANDERSEN, Early Detection of Patient at Risk of Developing Diabetic Nephropathy Longitudinal Study of Urinary Albumin Excretion, *Acta Endocrinologica*, 100, 1982.
3. W. REDIATNING, "Prinsip Dasar Radioimmunoassay", Diktat Pelatihan Radiofarmasi untuk Staf Pengajar Farmasi Perguruan Tinggi Indonesia, P2RR-BATAN, Serpong, 2004
4. IMMUNOTECH, "Albumin RIA Kit", brosur insert, 2003