

PEMBUATAN KIT RADIOIMMUNOASSAY (RIA) MIKROALBUMINURIA DENGAN METODE *COATED TUBE* : PERBANDINGAN TABUNG POLISTIREN “PLAIN” DAN “DASAR BINTANG”

V. Yulianti Susilo dan Sutari

Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka, BATAN
Kawasan Puspitpek, Gedung 11, Serpong, Tangerang, 15314
yuli-ratri@yahoo.co.id

ABSTRACT

Microalbuminuria is a physiological condition of patient in which albumin is excreted in urine at 20-200 µg/min or 30-300 mg/day. Determination of microalbumin content in the patient urine is very important for early detection of microalbuminuria before nephropathy occurred. Detection of microalbumin in the urine is commonly performed by radioimmunoassay (RIA) technique. Human serum albumin labeled with ^{125}I is commonly used as a tracer and bound and unbound phases in the reaction mixture that can be separated easily and quickly with a coated tube method. Production of RIA kit of microalbuminuria involves preparation of antibody coated into two solid phases of polystyrene tube plain and polystyrene bottom star tube, HSA- ^{125}I tracer and standard solution. The polyclonal anti-human serum albumin (anti-HSA) generated in the rabbit with titer 1 : 15000 was obtained after one year then was coated into polystyrene tubes, the tracer HSA- ^{125}I was prepared using an iodogen method. Series of HSA standard were made by dilution of HSA with synthetic urine. The yield of HSA- ^{125}I tracer was about 83,94% with radiochemical purity of 92% and specific activity of 3,3576 µCi/µg. The microalbuminuria RIA kit shows good assay performance of 1,05% NSB (Non Spesific Binding) and 78,6% B/T. The polystyrene bottom star tube shows more higher B/T of bound and could be maintained within 70 days.

Keywords : Radioimmunoassay, Coated Tube, Microalbuminuria, HSA, HSA- ^{125}I

PENDAHULUAN

Mikroalbuminuria adalah keadaan fisiologis seseorang di mana kadar albumin yang diekskresi ke dalam urin sebesar 20–200 mg/menit atau 30–300 mg/hari. Konsentrasi di atas nilai tersebut disebut proteinuri dan dinyatakan *nephropathy* atau gagal ginjal¹. Penentuan kadar albumin dalam jumlah mikro (<200 mg/menit) pada pasien sangat penting untuk deteksi dini mikroalbumin sebelum menjadi *nephropathy* agar dapat dilakukan pencegahan penyakit lebih awal².

Saat ini penentuan kadar albumin dalam urin dilakukan dengan metode *DIPSTICK* atau metode pengendapan dengan *polyethyleneglycol* (PEG)³. Meskipun demikian penentuan kadar albumin dengan cara *DIPSTICK* tidak sensitif, sehingga tidak dapat mendeteksi kadar albumin

dalam orde mikrogram⁴. Karena itu diperlukan metode yang lebih sensitif dan spesifik untuk mendeteksi kadar albumin dalam orde mikrogram, biasanya dilakukan dengan teknik *radioimmunoassay* (RIA). Teknik RIA merupakan teknik yang sensitif dan spesifik sehingga dapat digunakan untuk penentuan kadar albumin dalam jumlah mikro gram, dan dapat digunakan untuk penentuan kadar mikroalbuminuria^{4,5}.

Dalam penentuan dengan teknik RIA diperlukan beberapa pereaksi yang umumnya dibuat dalam suatu bentuk kit RIA yang kini banyak beredar secara komersial. Pereaksi utama yang diperlukan dalam teknik RIA adalah *tracer* (antigen bertanda radioaktif/Ag*), antibodi dan standar. Antigen bertanda adalah suatu senyawa yang salah satu atau lebih atom atau gugus diganti oleh radioisotop. Radioisotop yang

sering digunakan dalam RIA adalah I^{125} . Antigen bertanda radioaktif dibuat dengan cara penandaan secara langsung^{6,7}. Antibodi merupakan salah satu pereaksi RIA yang sangat penting dalam menentukan kespesifikan reaksi. Antibodi adalah suatu gugusan protein sejenis di dalam plasma darah dan cairan ekstra seluler lainnya yang umumnya disebut gugusan immunoglobulin (IgG). IgG adalah immunoglobulin yang secara kuantitatif merupakan gugusan yang dominan di dalam plasma. IgG adalah kelas immunoglobulin yang digunakan dalam RIA. Antibodi terbentuk di dalam plasma darah sebagai akibat dari induksi suatu zat asing yang dimasukkan ke dalam tubuh. Analisis antibodi mencakup penentuan titer, kesensitifan dan kespesifikan. Titer antibodi adalah nilai pengenceran antibodi yang memberikan %B/T = 50%. Titer berguna untuk menentukan banyaknya pengenceran antibodi yang digunakan dalam *assay*. Makin tinggi titer suatu antibodi maka pemakaian antibodi akan makin hemat⁸. Ketepatan suatu *assay* dengan metode RIA berkaitan dengan kualitas material standar yang digunakan, kurva standar harus sesuai dengan kurva standar dalam RIA, yaitu semakin tinggi jumlah antigen yang terkandung dalam standar (semakin tinggi nilai konsentrasi standar) maka persen ikatan semakin kecil⁸.

Kit RIA mikroalbuminuria yang sekarang digunakan di Indonesia adalah kit RIA yang metode pemisahannya dengan metode pengendapan menggunakan PEG. Kit RIA mikroalbuminuria yang terdiri atas *tracer* HSA- I^{125} , standar albumin, dan antisera albumin dari India⁹. Metode ini memerlukan peralatan tambahan seperti sentrifuge dan zat-zat pereaksi yang lebih banyak serta pada saat pengiriman ke rumah sakit kendala yang ada adalah apabila PEG langsung dicampur dengan bahan-bahan lain maka campuran tersebut akan cepat rusak. Mengingat pentingnya kit RIA mikroalbuminuria tersebut, maka diperlukan usaha untuk memproduksi kit RIA mikroalbuminuria dengan metode yang lebih sederhana, yaitu metode *coated tube*.

Metode RIA untuk penentuan kadar mikroalbuminuria dengan metode *coated tube*, prinsipnya yaitu dalam suatu tabung yang sudah disalut dengan antisera albumin (antibodi), kemudian ditambahkan sampel urin yang mengandung albumin dan albumin bertanda I^{125} (HSA- I^{125}) maka akan terjadi reaksi kompetisi

antara antigen dalam sampel urin dengan antigen bertanda (HSA- I^{125}) terhadap antibodi tersebut dalam jumlah terbatas. Setelah diinkubasi dalam waktu tertentu, selanjutnya dilakukan pemisahan antara albumin yang terikat antibodi dengan albumin bebas (tidak terikat), dengan cara memisahkan supernatan. Besarnya radioaktivitas fraksi terikat antibodi ditentukan dengan pencacah gamma (g)⁸.

Kit RIA yang baik harus menunjukkan kinerja *assay*, yaitu nilai *Non Spesific Binding* (NSB) yang rendah dan ikatan maksimum (%B/T) yang tinggi. Kit yang baik umumnya mempunyai nilai NSB < 10%. Bila nilai NSB tinggi, maka dapat diduga bahwa *tracer* (HSA- I^{125}) atau antibodi telah rusak. Kit RIA haruslah mempunyai nilai %B/T > 30%. Nilai ini tidak boleh turun drastis sebelum kit tersebut mencapai waktu daluwarsa. Bila nilai B/T rendah sebelum waktu daluwarsa, maka dapat diduga *tracer* (HSA- I^{125}) atau antibodi telah rusak⁸.

Penelitian ini bertujuan membuat kit RIA mikroalbuminuria yang memenuhi syarat. Membandingkan penggunaan tabung polistirena plain dan tabung polistirena dasar bintang pada hasil *assay* serta menguji kestabilan kit RIA tersebut.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada tahun 2007 di Laboratorium Radioassay, Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR) – Batan, Gedung 11, Kawasan Puspipetek, Serpong, Tangerang, 15314

Bahan yang digunakan dalam penelitian seperti: *Human Serum Albumin* (HSA) standar (Sigma). Kolom PD-10 (Pharmacia), radioisotop I^{125} dari Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR), Anti-HSA (PRR) dan *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Sigma).

Peralatan untuk pengolahan data digunakan Gamma mini *assay*, model 600 (Gammatec II The Nucleus Inc), *Gamma Management System* (GMS) (DPC, Berthold).

Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini mengikuti metode Christopidis *et al*¹⁰.

Pembuatan *coated tube* iodogen, ke dalam tabung reaksi dilarutkan 2 mg iodogen dalam 2 ml kloroform. Untuk setiap penandaan diambil 10 ml larutan, dimasukkan ke dalam tabung reaksi

pendek (volume 2 ml), dan dikeringkan pada suhu 37°C selama 5–6 jam di dalam inkubator. *Coated tube* iodogen ditutup dengan parafilm dan siap digunakan untuk penandaan.

Penandaan HSA dengan radioisotop ^{125}I ke dalam *coated tube* yang telah berisi 10 mg iodogen dimasukkan 50 ml larutan (100 mg HSA dalam dapar fosfat 0,2 M pH 7,4), kemudian ditambahkan 2 ml $\text{Na-}^{125}\text{I}$ (± 400 mCi). Larutan diaduk dengan vorteks, dan reaksi dibiarkan berlangsung selama 90 detik. Reaksi dihentikan dengan ditambahkan 250 ml larutan dapar fosfat 0,2 M pH 7,4, kemudian campuran reaksi dimurnikan dengan menggunakan kolom PD – 10 dan dielusi dengan larutan dapar tris 0,1 M pH 7,5, ^{125}I yang tidak terikat pada HSA tertahan di kolom. Hasil elusi ditampung dalam tabung reaksi volume 4 ml, masing-masing sebanyak 1 ml sebanyak 15 tabung. Setiap tabung reaksi kemudian diukur radioaktivitasnya menggunakan gamma, mini assay, dan radioaktivitas masing-masing fraksi diplot menjadi kroma-togram. Kemurnian radiokimia hasil penandaan fraksi 3 dan 4 dianalisis dengan kromatografi kertas menggunakan fasa diam kertas Whatman no. 1 dan fasa gerak campuran n-butanol etanol NH_4OH 0,1 M dengan (3:2:1). Immunoreaktivitas dan stabilitas tracer HSA- ^{125}I ditentukan dengan assay protocol.

Pembuatan Urin Sintetik

Urin sintetik digunakan untuk melarutkan HSA, dalam pembuatan standar HSA, pembuatan standar 0, dan untuk menentukan nilai (%) NSB. Urin sintetik disiapkan sebagai berikut. Ke dalam botol 1 liter dimasukkan berturut-turut 42,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 15 g KH_2PO_4 , 2,5 g NaCl dan 5 g NH_4Cl kemudian ditambahkan 900 ml aquabides. Campuran larutan selanjutnya disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 120°C selama 30 menit. Setelah dingin larutan hasil sterilisasi dimasukkan ke dalam labu ukur 1 liter, kemudian ditambahkan 25 g urea, dikocok dan ditambahkan aquabides sampai larut. Kemudian sebanyak 2 ml gentamycin sulfat ditambahkan dan akhirnya ditambahkan aquabides sampai volume 1000 ml. Campuran dikocok perlahan-lahan dan siap digunakan, dan disimpan pada suhu 4°C.

Pembuatan Larutan Standar Albumin

Larutan standar disiapkan dengan melarutkan sejumlah tertentu HSA dengan pelarut urin sintetik. Konsentrasi larutan standar yang dibuat adalah antara 0–150 mg/ml dan diberi label sebagai standar A = 0 mg/ml, B = 1 mg/ml, C = 2 mg/ml, D = 5 mg/ml, E = 10 mg/ml, F = 20 mg/ml, G = 50 mg/ml, H = 100 mg/ml dan I = 150 mg/ml. Pembuatan standar dilakukan mulai dari standar tertinggi 150 mg/mL sebagai standar I. Standar yang lebih rendah H, G, F, E, D, C, B, dan A dibuat melalui pengenceran standar I dalam labu takar 100 ml dengan menggunakan urin sintetik sebagai pengencer. Linieritas dan nilai konsentrasi standar yang sebenarnya ditentukan dengan *protocol assay*.

Penentuan Titer Antibodi HSA

Dibuat seri pengenceran antibodi HSA, yaitu 1:100; 1:250; 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000; 1:32000; 1:64000; 1:128000; 1:256000; 1:512000; 1:1024000 dengan dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6. Masing-masing larutan diambil 500 ml dan dimasukkan ke dalam tabung dasar bintang dan tabung plain, kemudian diinkubasi 1 malam pada suhu 4°C. Setelah inkubasi tabung-tabung tersebut dicuci 3 kali dengan 1 mL larutan pencuci (0,1% Tween 20 dalam aquabides). Selanjutnya tabung dikeringkan, dan titer yang terbaik ditentukan dengan *assay protocol*.

Pembuatan Coated Tube HSA

Dari hasil penentuan titer antibodi HSA terbaik kemudian dibuat pengenceran lebih banyak antibodi HSA sesuai dengan titer terbaik. Pengenceran dilakukan dengan dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6. Larutan tersebut dibagi-bagi ke masing-masing tabung dasar bintang dan tabung plain sebanyak 500 ml, diinkubasi 1 malam pada suhu 4°C. Setelah inkubasi tabung dicuci 3 kali dengan 1 ml larutan pencuci dan dikeringkan. Selanjutnya *coated tube* HSA ditentukan dengan *assay protocol*.

Penyiapan tabung untuk penentuan *Non Spesific Binding*. Dibuat dapar *blocking* (1% BSA dalam dapar karbonat bikarbonat 0,05 M pH 9,6). Larutan tersebut dibagi-bagi ke masing-masing tabung dasar bintang dan tabung plain

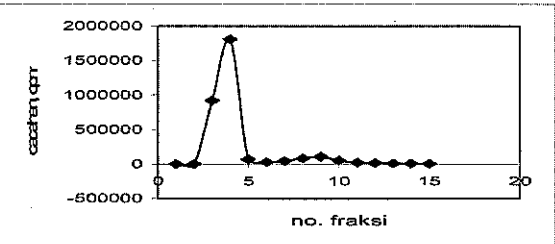
sebanyak 500 ml dan diinkubasi 1 malam pada suhu 4°C. Tabung dicuci dengan 1 ml larutan pencuci kemudian dikeringkan dan siap digunakan.

Assay Protocol

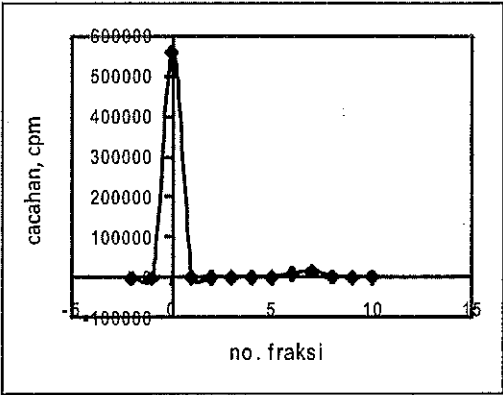
Coated tube sebanyak 20 tabung (tabung yang sudah disalut dengan antibodi HSA) diberi nomor. Ditambahkan 50 ml larutan standar 0 HSA ke dalam tabung NSB. Ke dalam *coated tube* yang lain ditambahkan 50 ml masing-masing seri larutan standar HSA. Ke dalam semua tabung ditambahkan 500 mL *tracer* (HSA-¹²⁵I) dengan cacahan ± 30.000 cpm. Semua tabung dikocok dengan alat vortex kemudian diinkubasi 1 malam pada suhu 25°C. Selanjutnya supernatan dibuang dan semua tabung dicuci dengan 1 ml larutan pencuci. Tabung dikeringkan dan diukur radioaktivitasnya menggunakan *Gamma Management System* (GMS).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan *tracer* dengan metode iodogen menghasilkan rendemen penandaan rata-rata sebesar 83,94% dengan aktivitas spesifik 3,3576 mCi/mg, kemurnian radiokimia 92%, *tracer* tersebut stabil dalam waktu 70 hari. Hasil pemurnian *tracer* (HSA-¹²⁵I) menggunakan kolom PD-10 dapat dilihat sebagai kromatogram pada Gambar 1. Hanya fraksi 3 dan 4 yang digunakan dalam proses selanjutnya. Hasil penentuan kemurnian radiokimia *tracer* (HSA-¹²⁵I) fraksi 3 dan 4 menggunakan kromatografi kertas dapat dilihat sebagai kromatogram pada Gambar 2.

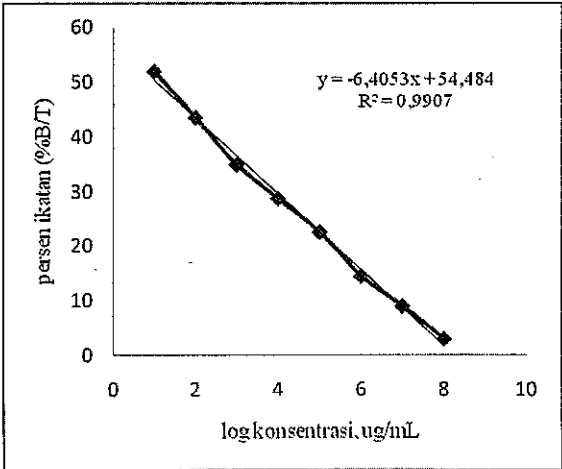


Gambar 1. Kromatogram pemurnian HSA-¹²⁵I pada kolom PD-10.



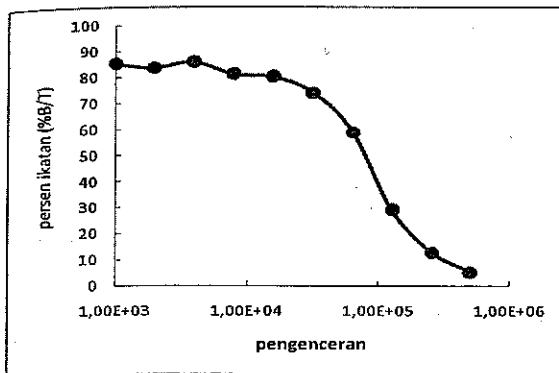
Gambar 2. Kromatogram pengujian kemurnian HSA-¹²⁵I pada kromatografi kertas

Dari *assay protocol* pengujian standar diperoleh hasil konsentrasi standar yang mendekati konsentrasi sebenarnya. Hasil penghitungan konsentrasi standar dan kurva standar dapat dilihat pada Gambar 3 (Persamaan garis, $y = -6,4053x + 54,484$ dengan $R^2 = 0,9907$).



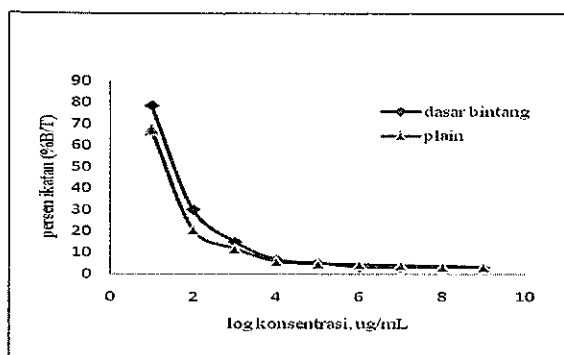
Gambar 3. Kurva standar pada uji pembuatan standar kit mikroalbuminuria

Untuk pembuatan *coated tube* terlebih dahulu dilakukan titer antibodi HSA untuk memperoleh pengenceran antibodi yang sesuai dalam pembuatan *coated tube*. Titer antibodi diuji dengan *assay protocol* dan diperoleh pengenceran antibodi terbaik sebesar 1 : 15000. Kurva titer antibodi HSA dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva titer antibodi HSA untuk pengenceran anti-HSA

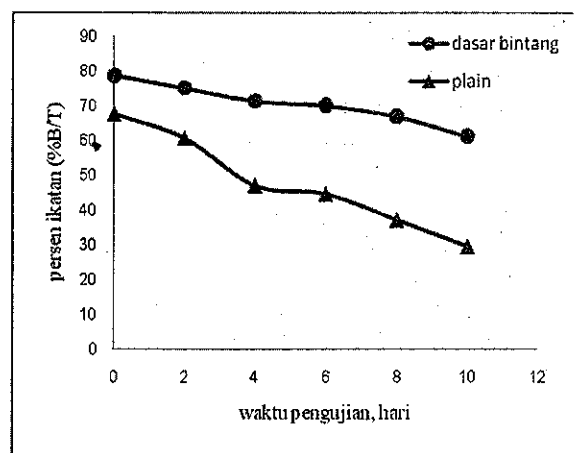
Coated tube dibuat dengan pengenceran antibodi berdasarkan titer antibodi yang telah dilakukan. *Coated tube* diuji dengan *assay protocol* dan diperoleh kinerja *assay* yang baik. Kinerja *assay* dari uji pembuatan *coated tube* dapat dilihat pada Gambar 5. Pembuatan kit menunjukkan kinerja *assay* yang baik yaitu dengan ikatan maksimum (%B/T) yang tinggi sebesar 78,6% untuk tabung polistirena dasar bintang dan 67,4% untuk tabung polistirena plain, serta menghasilkan ikatan nonspesifik (%NSB) yang rendah sebesar 1,05% untuk tabung polistirena dasar bintang dan 0,98% untuk tabung polistirena plain. Kinerja *assay* ini tidak boleh turun drastis sebelum kit tersebut mencapai waktu daluwarsa (Rediatning, 2004). Kinerja *assay* dapat dipertahankan selama 70 hari sesuai dengan pengujian kestabilan kit.



Gambar 5. Kinerja *assay* dari uji pembuatan *coated tube* kit mikroalbuminuria

Kestabilan kit dilakukan selama 70 hari sesuai dengan waktu paruh dari radioisotopnya yaitu ^{125}I , $t_{1/2}$ 60 hari. Kurva kestabilan dapat dilihat pada Gambar 6. Tabung polistirena dasar bintang menunjukkan ikatan %B/T lebih tinggi

dan lebih stabil daripada tabung plain. *Assay* menggunakan tabung dasar bintang menunjukkan ikatan maksimum %B/T 78,6% pada awal pengamatan, dan %B/T tetap tinggi di atas 30% sampai dengan 70 hari, walaupun menurun dari minggu ke minggu. *Assay* menggunakan tabung plain menunjukkan ikatan maksimum %B/T 67,4% pada awal pengamatan, dan %B/T tetap tinggi di atas 30% sampai dengan 70 hari, laju penurunan ikatan %B/T pada tabung plain jauh lebih besar. Ikatan maksimum (%B/T) pada tabung polistirena dasar bintang lebih tinggi dibandingkan pada tabung polistirena plain karena permukaan tabung polistirena dasar bintang lebih luas, sehingga antibodi yang disalutkan lebih banyak untuk berikatan dengan *tracer* (HSA- ^{125}I).



Gambar 6. Kurva kestabilan kit mikroalbuminuria selama 70 hari

KESIMPULAN

Kit RIA mikroalbuminuria hasil pengembangan penelitian ini menghasilkan kinerja *assay* yang baik, yaitu %NSB 1,05% dan %B/T 78,6%. Kinerja ini dapat dipertahankan sampai dengan 70 hari untuk tabung dasar bintang maupun tabung plain.

SARAN

Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan optimasi, validasi, dan uji klinis agar kit RIA mikroalbuminuria tersebut dapat dipakai di laboratorium klinis dengan data-data yang valid.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. Abdul Mutalib, selaku Kepala Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka yang telah

memberikan dukungan dan fasilitas di PRR-Batan. Rasa terima kasih juga diucapkan kepada Bapak Prof. Swasono R. Tamat, PhD, yang telah memberikan pengarahan pada saat penelitian dan penulisan karya tulis ilmiah. Demikian juga kepada Bapak Dr. Ir. M. Ahkam Subroto, M.App.Sc, yang telah membimbing penulisan karya tulis ilmiah pada Diklat Fungsional Peneliti Pertama LIPI Gelombang I tahun 2008. Penulis mengucapkan terima kasih Kepada Ibu Dra. Siti Darwati, M.Sc selaku Kepala Bidang Radiofarmaka yang telah memberikan kesempatan melakukan penelitian. Pada kesempatan ini penulis juga mengucapkan terima kasih kepada rekan-rekan di Bidang Radiofarmaka yang turut membantu dan tidak dapat disebutkan satu persatu.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Parving, H.H. et al. 2006. "Prevalence and risk factors for microalbuminuria in a referred cohort of type II diabetic patients : a global perspective". *Kidney Int*, 69: 2057.
- ²Rajan, M.G.R. 2003. Radioimmunoassay Kit for Urinary Albumin for The Detection and Quantitative Determination of Microalbuminuria for the used by the IAEA participant of RAS/6/208 ". Diabetic Nephropathy Thematic Programme on Health Care.

- ³Vibreti, G. C.et al. 1982." Microalbuminuria as a Predictor of Clinical Nephropathy in Insulin Dependent Diabetes Mellitus". *The Lancet*, 1430 – 1432.
- ⁴Mogensen, C. 1987. "Microalbumin a Predictor of Clinical Diabetic Nephropathy", (review). *Kidney Int*, 31: 687–689.
- ⁵Edwards, R. 1985. *Immunoassay an Introduction*, William Heinemann. London: Medical Books.
- ⁶Wild, David. 2005. "Immunoassay are Sensitive Analytical Tests that Harness The Unique Properties of Antibodies". *The Immunoassay Handbook*, Third edition.
- ⁷Rediatning, Wayan. 2004. "*Prinsip Dasar Radioimmunoassay*". Diklat Pelatihan Radiofarmasi untuk Staf Pengajar Farmasi Perguruan Tinggi Indonesia, PRR-Batan, Serpong.
- ⁸Sudiyati, S. et al.2002. "Pendahuluan Pembuatan Kit Ria Mikroalbuminuria untuk Pemeriksaan Albuminuria". Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian & Pengembangan Aplikasi Isotop&Radiasi, Jakarta, Industri, Lingkungan, Kesehatan, Peternakan, 137-142.
- ⁹Christopidis, Kakabakos, S., Petrou, P. 2003. "International Atomic Energy Agency group training programme in antibody coated tubes production and evaluation for use in RIA/IRMA, (C&-RAS-2009-003)". Institute of Radioisotopes and Radiodiagnostic Product Immunoassay Laboratory, Athena, Greece.