



VALIDASI KIT *RADIOIMMUNOASSAY* AFLATOKSIN B₁

Puji Widayati¹, Agus Ariyanto¹, Triningsih¹, Veronika Yulianti Susilo¹, Wening Lestari¹

¹Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka - BATAN Serpong

Key words :
Radiimmunoassay,
Aflatoksin B₁,
validasi,
kanker,
koefisien variasi

Abstrak

VALIDASI KIT *RADIOIMMUNOASSAY* AFLATOKSIN B₁. Aflatoksin merupakan senyawa mikotoksin yang bersifat sangat toksik sehingga dapat menjadi penyebab terjadinya kanker pada manusia. Aflatoksin berpotensi karsinogenik, mutagenik, teratogenik, dan bersifat immunosupresif oleh karena itu kandungan aflatoksin B₁ dalam bahan dan produk pangan harus dibatasi. Salah satu teknik penentuan kadar aflatoksin B₁ adalah *radioimmunoassay* (RIA) yang didasarkan pada reaksi imunologi antara antigen dan antibodi yang spesifik hanya untuk antigen tertentu saja, serta menggunakan antigen yang ditandai zat radioaktif sebagai perunut. Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka BATAN telah berhasil mengembangkan kit RIA Aflatoksin B₁ yang dapat digunakan untuk penentuan kandungan Aflatoksin B₁ dalam bahan dan produk pangan. Sebelum digunakan di lapangan kit aflatoksin B₁ harus divalidasi meliputi penentuan batas deteksi, kepekaan (sensitivitas), ketelitian (presisi) dan parameter *assay* (*Non Specific Binding*, NSB dan *Maximum Binding*, MB) sehingga dapat digunakan untuk menentukan kadar aflatoksin B₁. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan batas deteksi, ketelitian intra assay dan inter assay serta parameter assay. Telah dilakukan validasi kit RIA aflatoksin yang menghasilkan batas deteksi 0,35 ng/mL dengan ketelitian *intra assay* memberikan koefisien variasi (%CV) QC 9,80% sedangkan ketelitian *inter assay* untuk QC 12,39%. Kit RIA aflatoksin B₁ ini disimpulkan memberikan unjuk kerja yang baik karena menghasilkan %NSB sebesar 6,6 dan B/T sebesar 47,18.

VALIDATION OF *RADIOIMMUNOASSAY* AFLATOKSIN B₁ KIT. Aflatoxins are mycotoxins compounds that are highly toxic and carcinogenic. Aflatoxins are potentially carcinogenic, mutagenic, teratogenic, and immunosuppressive so that the content of aflatoxin B₁ in food products should be limited. One technique of determining the level of aflatoxin B₁ is a radioimmunoassay (RIA) which is based on immunological reactions between antigens and antibodies, and using radioactive substances as a tracer. Center for Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Technology (PTRR) has successfully developed Aflatoxin B₁ RIA kit that can be used to determine the aflatoxin B₁ in food products. Aflatoxin B₁ RIA kit must be validated, which includes determining the limits of detection, sensitivity, accuracy (precision) and assay parameters (*Non Specific Binding*, NSB and *Maximum Binding*, MB) that can be used to determine the level of aflatoxin B₁. This study aims to determine the limit of detection, accuracy intra-assay and inter-assay and assay parameters. The Aflatoxin B₁ RIA kit validation results in the detection limit of 0.35 ng / mL with coefficient of variation (% CV) QC 9.80%, while the inter-assay precision for QC 12.39%. RIA Kit Aflatoxin B₁ is inferred provide good performance because it produces 6.6% for NSB and 47.18 for B/T.

Penulis Korespondensi
e-mail: pujiw@batan.go.id

PENDAHULUAN

Validasi metode analisis bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai untuk peruntukannya. Validasi biasanya diperuntukkan untuk metode analisa yang baru dibuat dan dikembangkan, sedangkan untuk metode yang memang telah tersedia dan baku (misal: AOAC, ASTM dan lainnya) tidak perlu dilakukan validasi, hanya verifikasi. Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis adalah *accuracy* (kepekaan), *precision* (ketelitian), selektivitas (spesifisitas), linieritas, rentang, batas deteksi dan kekuatan (*robustness*) [1,2,3].

Kepekaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kepekaan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kepekaan dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*) [1,2,3].

Ketelitian adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Ketelitian diukur sebagai simpangan baku atau simpangan relatif (koefisien variasi). Ketelitian dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah ketelitian metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi yang sama dan dalam interval waktu yang pendek (*intra assay*). Ketertiruan adalah ketelitian metode

jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda, biasanya dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut dan analis yang berbeda serta sampel yang dianalisa diduga identik sama dari batch yang sama, tetapi dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi dan analis yang berbeda (*inter assay*) [1,2,3].

Selektifitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel, dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*). Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya dengan analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi [1,2,3].

Linieritas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas rendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linieritas yang dapat diterima. Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko [1,2,3].

Radioimmunoassay (RIA) merupakan salah satu teknik *immunochemical assay* yaitu teknik pengukuran yang didasarkan pada reaksi imunologi yang menggunakan radioisotop sebagai perunut. Teknik RIA dapat digunakan untuk mengukur kandungan cemaran mikotoksin seperti aflatoksin B₁ dalam bahan dan produk pangan [4].

Dalam rangka penyediaan bahan pangan dan pakan ternak yang sehat dan tidak membahayakan kesehatan manusia Food and Drug Administration (FDA) telah menetapkan kadar aflatoksin yang diperbolehkan dalam makanan dan pakan ternak. Misalnya kadar aflatoksin yang diperbolehkan dalam semua bahan makanan kecuali susu adalah < 20 ng/g, sementara untuk susu adalah $< 0,5$ ng/g. Demikian pula untuk pakan ternak selain jagung kadar aflatoksin yang diperbolehkan adalah < 20 ng/g. Kandungan aflatoksin yang diperbolehkan pada jagung sebagai pakan ternak adalah antara 20-300 ng/g, tergantung jenis dan tujuan penggunaan ternak [5].

Aflatoksin merupakan senyawa mikotoksin yang bersifat sangat toksik, sehingga diperlukan monitoring kadar aflatoksin dalam bahan pangan atau pakan ternak sehingga dapat mencegah terkonsumsinya bahan pangan atau pakan ternak yang terkontaminasi aflatoksin. Dalam pencegahan kontaminasi aflatoksin yang lebih buruk maka dilakukan pemilihan bahan pangan dan pakan yang utuh, menurunkan kandungan air sampai dengan $< 14\%$, menyimpan pada tempat yang kelembaban dan suhunya terkontrol, menambahkan CO_2 atau N_2 , pemanasan sampai dengan penggunaan fungisida dan bahan kimia (2). Di Indonesia dengan iklim yang sangat mendukung tumbuhnya *aspergillus* yang mengakibatkan gangguan kesehatan yang buruk pada masyarakat yang mengkonsumsinya akan dibutuhkan pemantauan dan penentuan kadar aflatoksin khususnya aflatoksin B_1 pada bahan pangan dan pakan [5].

Penentuan kadar aflatoksin B_1 (AfB_1) dapat dilakukan menggunakan teknik *radioimmunoassay* (RIA) didasarkan pada reaksi imunologi yaitu reaksi antara antigen

dan antibodi yang spesifik hanya untuk antigen tertentu saja. Oleh sebab itu analit yang akan dianalisa dengan teknik pengukuran ini tidak memerlukan prosedur pemisahan yang panjang dan rumit yang memerlukan berbagai jenis pelarut organik yang mahal dan dalam jumlah yang banyak untuk mengekstraksi dan memurni analit. Sebagai konsekuensinya biaya analisa akan lebih murah dan waktu analisa akan jadi lebih cepat [5].

Validasi kit RIA AfB_1 yang akan dilakukan meliputi batas deteksi ketelitian dan parameter assay. Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat diukur yang memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Ketelitian adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Pengujian parameter assay meliputi nilai blanko, nilai ikatan maksimum (*Maximum Binding, MB*) dan nilai serum kontrol. Nilai blanko atau dikenal dengan istilah persen ikatan tidak spesifik (% NSB) dan nilai ikatan maksimum (% B/T) akan menentukan kurva standar yang didapat. Parameter *assay* ditentukan dengan melakukan pengujian sesuai protokol pengujian meliputi nilai *Non Specific Binding (NSB)*, *Maximum Binding (% B/T)* dan daerah kerja (rentang kerja). Persyaratan kit yang baik adalah % CV di bawah 10 % untuk intra assay dan % CV di bawah 15 % untuk inter assay [4].

Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka (PTRR) BATAN telah berhasil mengembangkan Kit RIA AfB_1 yang dapat digunakan untuk penentuan kandungan AfB_1 dalam bahan dan produk pangan. Adapun tahapan proses pembuatan kit RIA AfB_1

adalah pembuatan komponen kit [6], optimasi assay kit [8] dan validasi kit serta uji banding menggunakan kit komersil yang ada dipasaran. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk menjamin kehandalan kit RIA AFB₁ yang meliputi penentuan batas deteksi, ketelitian dan parameter *assay* sehingga kit tersebut dapat digunakan untuk *assay in-vitro* dengan persen ikatan yang tinggi serta ikatan tidak spesifik yang rendah, dengan demikian kit RIA AFB₁ dapat digunakan untuk menganalisis AFB₁ pada industri pengolahan bahan dan produk makanan.

TATA KERJA

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya adalah larutan standar AFB₁, tabung reaksi polistiren dasar bintang bersalut monoklonal antibodi AFB₁, larutan monoklonal antibodi AFB₁ bertanda ¹²⁵I yang selanjutnya disebut larutan perunut, AFB₁ dengan konsentrasi tertentu, dan aquademin. Alat yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya adalah pencacah Gamma (*600 Gammatec II The Nucleus*), *Gamma Management System DPC*, berbagai ukuran pipet mikro beserta tipnya, pH meter (*Fisher Accumet model 810*), pengaduk (*Vortex*), inkubator (*Soft Incubator SL 1-6000*), timbangan analitik (*Mettler AE 160*).

Protokol Pengujian

Enam belas tabung reaksi polistiren dasar bintang bersalut antibodi AFB₁ (*coated tube*, CT) diberi nomor urut (1,2 3, dst). Sejumlah 200 µL larutan AFB₁ standar 0, 1, 2,5, 5, 10, 20, 40 dan 80 ng/mL ditambahkan ke masing-masing tabung CT secara berurutan. Sejumlah 300 µL larutan perunut Na¹²⁵I dengan aktivitas ≈ 30.000 cpm ditambahkan ke masing-masing tabung CT, larutan perunut ¹²⁵I dan standar AFB₁ yang berada didalam tabung CT dihomogenkan dengan alat *vortex* kemudian diinkubasi

selama 3 jam pada suhu ruangan dengan *shaker* kecepatan 400 rpm. Cairan dibuang dan tabung CT dikeringkan kemudian radioaktivitas yang tertinggal di dalam tabung diukur dengan alat pencacah Gamma selama satu menit [8].

Batas Deteksi (*Limit of Detection*)

Batas deteksi suatu kit ditunjukkan oleh konsentrasi minimum antigen yang tidak bertanda yang dapat dibedakan dari sampel yang tidak mengandung antigen. Perbedaan ini berdasarkan batas deteksi (*Confidence Limit*) sama dengan ± 2SD dari nilai rata-rata standar 0 dengan 10 kali pengulangan. Protokol pengujian diatas digunakan untuk menentukan batas deteksi dengan menambahkan larutan standar AFB₁ 0 ng/mL pada tabung CT nomer urut selanjutnya sebanyak 10 kali (17,18,19.... 26). Kepekaan dihitung berdasarkan nilai ± 2 Standar Deviasi (SD) dari rata-rata nilai larutan standar AFB₁ 0 (nol) dalam satuan konsentrasi (ng/mL).

Penentuan Ketelitian

Ketelitian (*precision*) merupakan aspek metode yang memberikan informasi batas (limitasi) pengujian klinis yang relevan, yang menentukan derajat kepercayaan. Ketelitian dinyatakan dalam persen *coeficient variation* (% CV) pengamatan pada pengulangan pengujian pada sampel yang sama, umumnya digunakan pengulangan sampel AFB₁ yang sudah diketahui konsentrasinya. Protokol pengujian diatas digunakan untuk menentukan ketelitian dengan menambahkan sampel AFB₁ yang sudah diketahui konsentrasinya (12,98 ng/mL) pada tabung CT urutan berikutnya (17, 18). Pengujian dilakukan minimal 6 (enam) kali pengulangan [1] untuk penentuan ketelitian *intra assay* dan *inter assay*. Ketelitian ditentukan oleh persen koefisien variasi (% CV) yang dihasilkan dari analisis.

Rumus perhitungan % CV dengan rumus sebagai berikut:

$$\%CV = \frac{SD}{x} \times 100\% \quad (1)$$

Dimana :

% CV : Coeficient Variation

SD : Standar Deviasi

X : X rata-rata

Penentuan Parameter Assay

Parameter *assay* ditentukan dengan melakukan pengujian sesuai protokol pengujian meliputi nilai *Non Specific Binding (NSB)*, *Maximum Binding (% B/T)* dan daerah kerja (rentang kerja).

Rumus perhitungan NSB dengan rumus sebagai berikut:

$$\% NSB = \frac{\text{Cacahan NSB-BG}}{\text{Cacahan Total - BG}} \times 100\% \quad (2)$$

Rumus perhitungan % B/T dengan rumus sebagai berikut:

$$\% B/T = \frac{\text{Cacahan fasa terikat-BG}}{\text{Cacahan total-BG}} \times 100\% \quad (3)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, validasi kit Aflatoksin B1 dilakukan dengan menentukan batas deteksi, penentuan ketelitian yang meliputi ketelitian intra assay dan inter assay serta parameter assay. Kit Aflatoksin B1 mempunyai batas deteksi $\bar{x} \pm 2SD$ sebesar $0,35 \pm 0,23$ seperti terlihat pada Tabel 1. Hasil ini menunjukkan bahwa jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat diukur dan memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko adalah $0,35 \pm 0,23$ ng/mL.

Tabel 1. Penentuan batas deteksi

Pengulangan(n=10)	Konsentrasi AfB ₁ (ng/mL)
1.	0,234
2.	0,458
3.	0,39
4.	0,396
5.	0,552
6.	0,375
7.	0,428
8.	0,358
9.	0,131
10.	0,232
Nilai	Xrerata = 0,355 SD = 0,117 Xrerata ± 2SD = 0,355 ± 0,234

Pengujian ketelitian kit RIA AFB₁ *intra assay* dilakukan dengan 9 kali pengulangan dengan satu orang operator. Nilai % CV hasil pengujian ini adalah 9,80% yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual secara berulang pada sampel campuran yang homogen, dengan kondisi yang sama dan dalam interval waktu yang pendek, dapat dilihat pada Tabel 2. Pengujian ketelitian *inter assay* dilakukan 9 kali pengulangan dengan 9 orang operator. Nilai % CV hasil pengujian adalah 12,39% terlihat pada Tabel 3 yang berarti pengujian

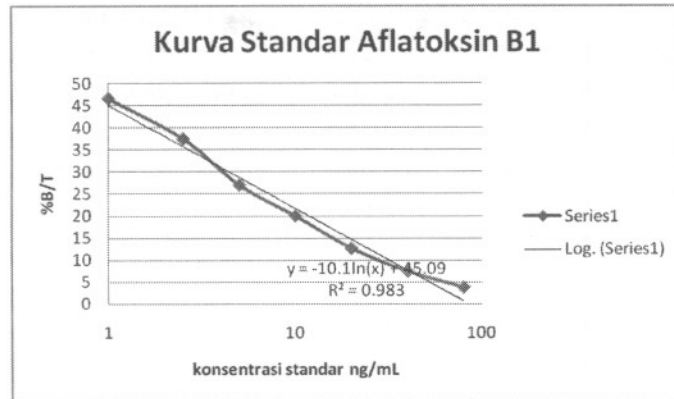
dikerjakan pada kondisi yang berbeda, pada laboratorium berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut dan analisis yang berbeda serta sampel yang dianalisa dari batch yang sama, tetapi dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi dan analisis yang berbeda seperti. Dari kedua pengujian ketelitian *intra assay* dan *inter assay* tersebut kit RIA AFB₁ memenuhi persyaratan kit yang baik yaitu % CV <10% untuk *intra assay* sedangkan % CV <15% untuk *inter assay* [4].

Tabel 2. Hasil Perhitungan konsentrasi AFB₁ untuk *intra assay*

Pengulangan(n=9)	Konsentrasi AFB ₁ (ng/mL)
1.	31,52
2.	37,631
3.	37,812
4.	40,027
5.	38,705
6.	32,138
7.	30,835
8.	38,456
9.	34,723
Nilai	Xrerata =35,761 SD =3,505 % CV = 9,802

Tabel 3. Hasil Perhitungan konsentrasi AFB₁ untuk *inter assay*

Pengulangan (n=9)	Konsentrasi AFB ₁ (ng/mL)
1.	11,18
2.	16,53
3.	15,97
4.	13,68
5.	14,52
6.	12,28
7.	15,13
8.	12,06
9.	13,57
Nilai	X rerata = 13,88 SD = 1,72 % CV = 12,39



Gambar 1. Kurva kalibrasi standar AfB₁

Parameter *assay* ditentukan dengan melakukan pengujian sesuai protokol pengujian meliputi nilai *Non Specific Binding (NSB)*, *Maximum Binding (%B/T)* dengan hasil pengujian parameter *assay* berturut-turut didapatkan nilai NSB 6,6% dan nilai %B/T 47,18% nilai ini memenuhi persyaratan kit yang baik [4] sehingga kit ini dapat digunakan untuk menentukan kadar aflatoksin B₁ pada bahan pangan dan produk pangan dengan kurva standar aflatoksin pada Gambar 1.

KESIMPULAN

Validasi kit RIA AfB₁ yang diproduksi secara lokal di PTRR ini mempunyai batas deteksi 0,35 ng/mL dengan ketelitian *intra assay* yang memberikan koefisien variasi (%CV) 9,802 sedangkan ketelitian *inter assay* 12.39 serta mempunyai parameter *assay* dengan %NSB dan %B/T berturut-turut 6,6% dan 47,18% Dengan demikian kit RIA AfB₁ hasil penelitian ini telah memenuhi persyaratan kit yang baik, sehingga dapat digunakan untuk menentukan kadar aflatoksin B₁ pada bahan pangan dan produk pangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada staf bidang Radioisotop dalam

penyediaan radioisotop Na¹²⁵I sebagai bahan utama pembuatan perunut Aflatoksin B₁, staf bidang Radiofarmaka PT Kacang Garuda yang telah menyediakan sampel yang sudah diketahui kadar Aflatoksin B-1 dan tim KPTP yang memberi masukan sehingga penelitian berjalan sesuai yang direncanakan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harmita, Petunjuk Validasi Metoda dan Cara Perhitungan, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Volume I (3) 2004 , pp. 117-130.
2. Biddlecombe RA, Brian L, *Validation of an immunoassay, in Immunoassay A Practical Guide, Taylor&Francis, 1798, pp. 179-198.*
3. Huber L., "Validation and Qualification in Analytical Laboratories", Second Edition, 1948, pp. 125-154.
4. Rediatning W., *IQC dan EQAs dalam RIA, Diklat Operateor RIA PRR-BATAN Serpong, Pusat Pendidikan dan Latihan, 1993*
5. Rediatning W., Sukiyati Dj, Immunoraiometricassay (IRMA) Dalam Deteksi Dan pemantauan Kanker, *Jurnal Radioisotop dan Radiofarmaka, Volume 3, Nomor 1, 2000, pp. 55-70.*

6. Agus A., Puji W., Wening L., Yulianti S., et.al., Preparasi Kit Radioimmunoassay Aflatoksin B1 Untuk Pengukuran Kandungan Aflatoksin B1 Pada Bahan Pangan dan Produk Pangan, *Prosiding Seminar Nasional Universitas Negeri Yogyakarta*, ISBN:978-602-14548-0-0, 2013, pp, 379-385.
7. Mondrida G., Triningsih, Sutari, et.al., . Optimasi Pembuatan Perunut Aflatoksin B₁, *Prosiding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah Pusat Teknologi Akselerator dan Proses Bahan*, Yogyakarta, 2013
8. Sutari, Triningsih, Mondrida G., et.al., Optimasi Rancangan Assay Kit Radioimmunoassay Aflatoksin B₁, *Prosiding Seminar Penelitian dan Pengelolaan Perangkat Nuklir*, Pusat Sains dan Teknologi Akselerator, Yogyakarta, ISSN:1410-8178, buku II, 2014, pp. 379-384.
9. Susilo V.Y, Ariyanto A., Lestari W., et.al., Penyiapan dan Karakterisasi Konjugat Aflatoksin B₁-O-(Karboksimetil)-Oksim dengan Metode Kromatografi dan Spektrometri, *Prosiding Seminar Nasional Kimia 2014, F MIPA-UNY*, Yogyakarta, ISBN:978-602-14548-1-7, 2014, pp. 347-353.