



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENETAPAN KADAR ASAM FOLAT SERUM DENGAN
TEKNIK *ENZYME-LABELED PROTEIN LIGAND BINDING*
ASSAY YANG DISEMPURNAKAN**

TESIS

**MUHAMAD ARIF BUDIMAN
1406504352**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
JUNI 2017**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENETAPAN KADAR ASAM FOLAT SERUM DENGAN
TEKNIK *ENZYME-LABELED PROTEIN LIGAND BINDING*
ASSAY YANG DISEMPURNAKAN**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Ilmu Biomedik**

**MUHAMAD ARIF BUDIMAN
1406504352**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN BIOKIMIA
JAKARTA
JUNI 2017**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Muhamad Arif Budiman

NPM : 1406504352

Tanda Tangan :

Tanggal : 13 JUNI 2017



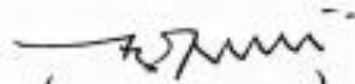
HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Muhamad Arif Budiman
NPM : 1406504352
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Penetapan kadar asam folat serum dengan teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* yang disempurnakan


Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI


Pembimbing I : Dr. dr. Ani Retno Prijanti, MS


(.....)

Pembimbing II : Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc


(.....)

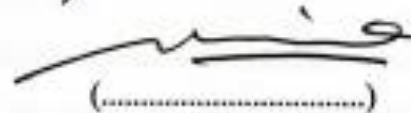
Penguji I : Dr. drg. Dwirini Retno Gunarti, MS


(.....)

Penguji II : Dr. Alida Harahap, SpPK(K), PhD


(.....)

Penguji III : Prof. Dr. dr. Frans Ferdinal, M.S.


(.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 13 Juni 2017

Ketua Program Studi :

Dr. rer Physiol, dr. Septelia Inawati Wanandi



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang senantiasa memberikan rahmat dan nikmat-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis dengan judul “Penetapan kadar asam folat serum dengan teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* yang disempurnakan”.

Tesis ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk menyelesaikan dan memperoleh gelar magister (S2) dalam Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa keberhasilan penelitian dan penulisan tesis ini banyak dibantu oleh berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Dr. dr. Ani Retno Prijanti, M.S selaku ketua departemen biokimia dan pembimbing I, serta Prof. dr. Mohamad Sadikin, DS.c selaku dosen pembimbing II, yang telah banyak membimbing, mengarahkan, memberi masukan, dan meluangkan waktu selama penelitian ini dilakukan hingga penulisan tesis ini selesai.
- Dr. drg. Dwirini Retno Gunarti, MS selaku penguji I, Dr. Alida Harahap, SpPK(K), PhD selaku Penguji II, dan Prof. Dr. dr. Frans Ferdinal, MS selaku Penguji III atas segala saran dan bimbingan dalam penyempurnaan tesis ini.
- Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI,serta seluruh staf pendidik dan kependidikan di departmen biomedik FKUI, atas bimbingan dan bantuan yang diberikan selama penulis menjalani pendidikan magister.
- Prof.Dr. dr. Sri Widya A. Jusman, MS selaku Ketua Kekhususan, serta seluruh staf pengajar dan staf laboratorium biokimia di kekhususan biokimia dan biologi moleker, atas bimbingan dan dukungan yang diberikan selama penulis menjalani pendidikan magister
- Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan dana penelitian melalui Hibah PITTA 2017.

- Keluarga: Kedua orang tua Bpk Muqodam dan Ibu Gusneti, kedua kakak Zulhanif dan Zulandri yang selalu memberikan semangat dan doa dalam menjalankan pendidikan.
- Rekan seangkatan dikekhususan biokimia (Bu Mega, Mbak Tika, Bang Nanda, Suci, Dewi, dan Mbak Hijrah), rekan angkatan 2015 Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia atas semua yang telah dilewati bersama selama menjalani pendidikan.
- Teman seperjuangan : The Matrikulasi (Mbak Helsy, Mbak Nurul, Mbak Hijrah, Mbak Lulu, Mbak Santi, Faizah, Andam, Rike, April, Bang Ganjar dan Mas Heri). Terimakasih atas segala semangat dan dukungannya.

Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan dari seluruh pihak yang telah memberi bantuan dan kerjasama selama pendidikan maupun penyelesaian dalam penyusunan tesis ini. Akhir kata, saya menyadari banyak kekurangan dalam tesis ini. Untuk saya mohon saran yang bersifat membangun dalam penyempurnaan tesis ini.

Jakarta, 21 Juni 2017

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Muhamad Arif Budiman
NPM : 1406504352
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Biokimia dan Biologi Molekuler
Fakultas : Kedokteran Universitas Indonesia
Jenis Karya : Tesis

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty-Free Right)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

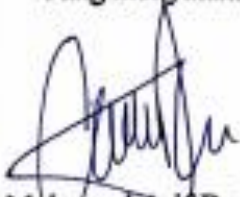
“Penetapan kadar asam folat serum dengan teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* yang disempurnakan“ beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 12 Juni 2017

Yang menyatakan


(Muhamad Arif Budiman)

ABSTRAK

Nama : Muhamad Arif Budiman
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Penetapan kadar asam folat serum dengan teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* yang disempurnakan

Latar Belakang. Penelitian ini bertujuan untuk membakukan teknik pengukuran folat serum menggunakan protein ikat folat (PIF) yang diisolasi dan dimurnikan secara utuh dari susu sapi segar dengan teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* (ELPLBA).

Metode. Metode yang digunakan adalah metode eksperimen yang menguji validitas dan perbandingan teknik ELPLBA untuk pembakuan teknik pengukuran folat serum.

Hasil. Hasil isolasi dan pemurnian PIF menghasilkan kadar 3 (tiga) mg/mL. Identifikasi SDS-PAGE dan *Western blot* menunjukkan 3 (tiga) pita protein yang diperiksa adalah protein ikat folat. Validitas teknik uji keterulangan menunjukkan nilai yang dapat diterima (%CV <10%), sedangkan uji ketertiruan menunjukkan hasil yang buruk pada selang 5 hari. Hasil uji akurasi *enzyme labeled protein ligand binding assay* menunjukkan nilai akurasi yang baik, sedangkan linieritas teknik menunjukkan hasil yang cukup linier. Perbandingan pemeriksaan folat dalam serum darah dengan teknik ELPLBA dan kompetitif ELISA menghasilkan nilai tidak berbeda makna berdasarkan uji *T test independent* pada tingkat kepercayaan 95%.

Kesimpulan. Teknik ELPLBA yang disempurnakan pada pengukuran folat serum cukup valid dan setara dengan hasil yang diperoleh dari ELISA kompetitif.

Kata kunci : asam folat serum, protein ikat folat, uji kebakuan teknik, *enzyme labeled protein ligand binding assay*.

ABSTRACT

Name : Muhamad Arif Budiman
Study Program : Magister of Biomedical Sciences
Judul Tesis : Determination of Serum Folic Acid Concentration Using
Improved Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay

Background. This study was aimed to standarized technique of folate level serum measurement using folate binding protein (FBP) that isolated and purified from fresh bovine milk with enzyme labeled protein ligand binding assay (ELPLBA) technique.

Method in this study, we performed an experiment research validated dan compared measurement techniques of ELPLBA with competitive ELISA for the standardization of the serum folic acid measurement technique.

Results. FBP concentration yielded from isolated and purification was resulted 3 mg/mL. SDS-PAGE and western blot result showed 3 (three) protein bands that was confirmed to be FBP. Validity test repeatability indicate an acceptable (%CV < 10%), whereas reproducible test showed poor results over a 5 day period. The results of the accuracy test of the enzyme labeled protein ligand binding assay technique showed good accuration. Linearity test of two samples showed quite linear results. Comparison of folic acid level measurement in serum between ELPLBA and ELISA technique showed there is no difference between both technique based on independent test T test at 95% confidence level.

Conclusion. the enzyme labeled protein ligand binding assay technique on serum folic acid measurements were quite valid dan equivalent to the results obtained by competitive ELISA techniques.

Keywords: Folic acid serum, folate binding protein, standardization technique, enzyme labeled protein ligand binding assay

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Pertanyaan penelitian	3
1.4 Hipotesis.....	3
1.5 Tujuan Penelitian	3
1.5.1 Tujuan Umum	3
1.5.2 Tujuan Khusus.....	3
1.6 Manfaat	4
1.7 Kerangka Teori.....	5
1.8 Kerangka Konsep.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Definisi Folat.....	7
2. 1. 1 Struktur Molekul Folat	7
2. 1. 2 Sifat Folat.....	8
2. 1. 3 Sumber dan Kebutuhan Folat	9

2. 1. 4 Peranan Folat	10
2. 1. 5 Status folat dalam tubuh	12
2. 2. Protein Ikat Folat (PIF)	13
2. 2. 1 Struktur Protein Ikat Folat	13
2. 2. 2 Karakteristik Protein Ikat Folat.....	14
2. 2. 3 Peranan Protein Ikat Folat.....	14
2. 2. 4 Teknik isolasi dan pemurnian protein ikat folat	15
2. 3. Metode Pengukuran Folat	16
2. 3. 1 Metode Mikrobiologi.....	16
2. 3. 2 Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	17
2. 3. 3 Metode <i>Radioassay</i>	17
2. 3. 4 Metode <i>chemiluminescence</i>	18
2. 3. 5 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	18
2.4 <i>Enzyme labeled Protein Ligand Binding Assay</i>	19
BAB III METODE PENELITIAN	21
3.1 Metode Penelitian	21
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	21
3.3 Bahan dan Alat Penelitian.....	21
3.3.1 Bahan	21
3.3.2 Alat.....	22
3.4 Prosedur kerja	22
3.4.1 Isolasi Protein Ikat Folat dari Susu Sapi Segar.....	22
3.4.2 Purifikasi Protein Ikat Folat dengan Kromatografi Penukar Ion	23
3.4.3 Purifikasi Protein Ikat Folat dengan Kromatografi Afinitas.....	24
3.4.4 Penentuan Kadar PIF Menggunakan Metode <i>Warburg-Christian</i>	25
3.4.5 Elektroforesis SDS-PAGE.....	25
3.4.6 <i>Western Blot (WB)</i>	26
3.4.7 Optimasi Teknik <i>Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay</i>	26
3.4.8 ELISA Folat Serum	28
3.4.9 Uji Validitas dan Uji Perbandingan Teknik.....	29
3.5 Analisis Data	30

3.6 Izin Etik.....	30
3.7 Alur Penelitian	31
BAB IV HASIL PENELITIAN.....	32
4.1 Isolasi Protein Ikat Folat	32
4.2 Pemisahan PIF dengan Kromatografi Penukar Ion (<i>Ion Exchange</i>).....	32
4.3 Pemisahan PIF menggunakan Kromatografi Afinitas	33
4.4 Perhitungan Kadar Protein	34
4.5 Hasil Elektroforesis SDS-PAGE.....	35
4.6 Uji <i>Western Blot</i>	36
4.7 Optimasi <i>Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay</i>	36
4.7.1 Titrasi protein ikat folat.....	36
4.7.2 Uji kompetisi	37
4.8 Uji Perbandingan dan Validitas Hasil Teknik Pengukuran	39
4.8.1 Uji Validitas	39
4.8.2 Uji perbandingan hasil teknik pengukuran.....	41
BAB V PEMBAHASAN	42
5.1 Isolasi PIF Susu Sapi Segar	42
5.2 Kromatografi Penukar Ion	43
5.3 Kromatografi Afinitas	43
5.4 Uji Konfirmasi SDS-PAGE dan Western blot.....	45
5.5 Optimasi Teknik <i>Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay</i>	46
5.6 Uji Validitas dan Perbandingan Teknik <i>Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay</i>	46
5.6.1. Uji Validitas Teknik	46
5.6.2. Uji Perbandingan Teknik Pengukuran	49
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	51
6.1 Kesimpulan	51
6.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52

LAMPIRAN.....	55
RIWAYAT HIDUP.....	79
DRAFT ARTIKEL	80

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kebutuhan standar folat per hari seseorang menurut AKG	9
Tabel 2. Gambaran status folat dalam tubuh yang diukur dari serum/plasma dan sel darah merah	13
Tabel 3. Perbandingan hasil pengukuran folat serum	20
Tabel 4. Komposisi gel pemisah dan gel penumpuk.....	26
Tabel 5. Kadar protein hasil isolasi dan pemurnian susu sapi	35
Tabel 6. Hasil uji keterulangan ELPLBA pada pengukuran folat	39
Tabel 7. Hasil uji ketertiruan ELPLBA pada pengukuran folat serum	39
Tabel 8. Hasil uji akurasi pemeriksaan folat dengan spike asam folat	40
Tabel 9. Hasil linieritas ELPLBA pada pengukuran folat serum.....	40
Tabel 10. Hasil uji perbandingan ELPLBA dan ELISA folat serum.....	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur molekul asam folat	7
Gambar 2. Jenis turunan folat dan struktur molekulnya	8
Gambar 3. Pembentukan dTMP yang melibatkan 5,10-metilen-THF	10
Gambar 4. Reaksi konversi kobalamin menjadi metil kobalamin	10
Gambar 5. Struktur basa purin	11
Gambar 6. Asam folat atau turunannya mengurangi disfungsi endotel melalui beberapa mekanisme	12
Gambar 7. Model Struktur Molekul Protein Ikat Folat dari Susu Sapi.....	13
Gambar 8. Prinsip teknik <i>enzyme labeled protein ligand binding assay</i> dalam pengukuran folat serum.....	19
Gambar 9. Alur isolasi protein ikat folat dari susu sapi segar	22
Gambar 10. Model pengikatan PIF pada fasa diam (agarosa - asam folat)	24
Gambar 11. Reaksi pembuatan konjugat asam folat-avidin.....	26
Gambar 12. Hasil fraksinasi kolom kromatografi DEAE-Selulosa. (A) protein bermuatan positif, (B) protein bermuatan negatif.....	33
Gambar 13. Hasil fraksinasi kolom kromatografi afinitas	34
Gambar 14. Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA).....	34
Gambar 15. Hasil elektroforesis SDS-PAGE	35
Gambar 16. Hasil deteksi protein ikat folat dengan teknik western blot.	36
Gambar 17. Hasil serapan titrasi protein ikat folat menggunakan 1µmol/L konjugat asam folat-avidin pada panjang gelombang 490 nm	37
Gambar 18. Uji kompetisi dengan PIF 1/10 pada suhu kamar (a) dan PIF 1/10 pada suhu 37°C(b).....	38
Gambar 19. Uji kompetisi dengan PIF 1/50 pada suhu kamar (a) dan PIF 1/50 pada suhu 37°C (b).....	38
Gambar 20. Uji kompetisi dengan PIF 1/100 pada suhu kamar (a) dan PIF 1/100 pada suhu 37°C (b).....	38

DAFTAR SINGKATAN

AKG	: Angkat kecukupan gizi
ASI	: Air susu ibu
ATP	: <i>Adenosine triphosphate</i>
BSA	: <i>Bovine serum albumin</i>
DEAE	: <i>Dietil amonioetil</i>
dTMP	: <i>Deoxythymidine monophosphate</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELPLBA	: <i>Enzyme labeled protein ligand binding assay</i>
FBP	: <i>Folate binding protein</i>
Figlu	: <i>Formiminoglutamic acid</i>
HPLC	: <i>High performance liquid chromatography</i>
OPD	: <i>o-Phenylenediamine dihydrochloride</i>
PIF	: Protein ikat folat
PIR	: Protein ikat ribovflavin
PBS	: Phosphate buffer saline
PABA	: Para aminobenzoic acid
SDS-PAGE	: <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
THF	: <i>Tetrahidrofolate</i>
Temed	: <i>Tetramethylethylenediamine</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan massa resin DEAE-selulosa	56
Lampiran 2. Preparasi kromatografi DEAE selulosa.....	58
Lampiran 3. Hasil Fraksinasi Kolom Kromatografi DEAE-Selulosa.....	59
Lampiran 4. Hasil Serapan Cahaya Standar BSA.....	60
Lampiran 5. Hasil Fraksi PIF dengan Kromatografi Afinitas.....	61
Lampiran 6. <i>Western blot</i> (asli).....	62
Lampiran 7. Panjang gelombang maksimal asam folat	63
Lampiran 8. Pengenceran konsentrasi PIF 1/5, 1/50, 1/500, 1/5000, 1/ 50000, dan 1/500000	64
Lampiran 9. Pengenceran konsentrasi PIF dalam teknik <i>enzyme labeled protein</i> <i>ligand binding assay</i> pada suhu kamar	65
Lampiran 10. Pengenceran konsentrasi PIF dalam teknik <i>enzyme labeled protein</i> <i>ligand binding assay</i> pada suhu 37°C	66
Lampiran 11. Kurva standar ELISA folat	67
Lampiran 12. Kurva standar ELPLBA (1).....	68
Lampiran 13. Kurva standar ELPLBA (2).....	69
Lampiran 14. Hasil perbandingan teknik ELPLBA dan ELISA pada pengukuran asam folat serum	70
Lampiran 15. Hasil keterulangan teknik ELPLBA	71
Lampiran 16. Kadar folat serum tanggal 9 Mei 2017	72
Lampiran 17. Hasil uji ketertiruan (<i>reproducibility</i>) teknik ELPLBA pada pengukuran folat serum.....	73
Lampiran 18. Hasil uji akurasi pada dua serum dengan spike asam folat	74
Lampiran 19. Hasil Linieritas folat serum menggunakan teknik <i>ELPLBA</i>	75
Lampiran 20. Surat Etik	76
Lampiran 21. Persetujuan pasien dalam penelitian.....	77

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asam folat merupakan nama lain dari vitamin B₉ yang tidak dapat disintesis dalam tubuh sehingga hanya didapatkan dari suplemen dan makanan.¹ Struktur turunan asam folat terdiri dari tiga bagian yaitu cincin pterin (pteridin untuk folat alami), P-aminobenzoat, dan asam glutamat (mono/poli).² Walaupun asam folat diperlukan dalam jumlah sedikit, tetapi kebutuhan folat tidak dapat dielakkan karena perannya berhubungan pada sintesis nukleotida (purin dan timidin), interkonversi asam amino dalam sel yang tidak dapat digantikan dengan zat lain.³ Peran asam folat bukan hanya sebagai koenzim dalam reaksi pemindahan penggal satu karbon melainkan juga dapat sebagai antioksidan dalam menekan peningkatan lipid peroksidasi. Beberapa penyakit akibat defisiensi folat seperti anemia megaloblastik, hiperhomosistein, preeklampsia, dan sebagainya dapat disembuhkan dengan adanya asupan tinggi folat.³⁻⁶ Defisiensi asam folat dalam konteks ini menunjukkan dampak yang luas pada masyarakat sehingga pemeriksaan status folat pada seseorang penting untuk dilakukan guna mencegah atau menanggulangi pengaruh negatif yang ditimbulkan dari defisiensi folat.⁷

Indikator rendah (defisiensi), normal dan tingginya status folat seseorang dapat diukur dalam serum, plasma, atau sel darah merah. Kadar asam folat dalam serum/ plasma pada kondisi defisiensi, normal, dan tinggi yaitu < 3 ng/mL, 6-20 ng/mL dan >20 ng/mL, sedangkan pada sel darah merah hanya dapat mengecek status defisiensi folat dengan kisaran <100 ng/mL.⁸ Metode analisis mikrobiologi dianggap sebagai “*gold standar*” pada pengukuran kadar asam folat karena sifatnya yang sensitif, murah, peralatan dan media mudah diperoleh. Namun, kelemahan dari metode ini tidak dapat diabaikan yakni menghasilkan limbah bakteri, membutuhkan keterampilan khusus, dan ruang yang steril.⁹⁻¹¹ Pendekatan metode lain saat ini yang diketahui sensitif, tidak menghasilkan limbah bakteri yang berbahaya bagi lingkungan, dapat dilakukan laboratorium biasa (tidak steril) dan tidak memerlukan keterampilan khusus dalam bidang kultur sel sehingga deteksi pengukuran asam folat dalam tubuh hanya melibatkan protein pengikat

dan senyawa penanda berupa enzim yang dapat diukur dengan spektrofotometer yaitu metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)¹²⁻¹⁵

Umumnya, antibodi sebagai protein pengikat spesifik asam folat/folat dalam ELISA folat sangat diperlukan sehingga pembuatannya menjadi kebutuhan dasar dalam metode ini. Beberapa penelitian menyebutkan terdapat protein lain yang dapat mengikat asam folat dengan sumber utama yang mudah diperoleh dan hanya didapatkan dengan cara pemisahan yang relatif sederhana, sehingga dapat menjadi alternatif pengganti antibodi.¹⁴ Protein tersebut diketahui sebagai protein ikat folat (PIF).¹⁵⁻¹⁷ Peranan protein ikat folat diketahui untuk mengikat folat di sirkulasi dan mentransfer folat ke jaringan. Protein ikat folat juga memiliki afinitas yang tinggi terhadap asam folat dengan nilai tetapan kesetimbangan disosiasi (K_D) sebesar ± 20 pM atau lebih rendah.¹⁷

Protein ikat folat dapat ditemukan pada susu sapi segar dengan kadar 211 ± 7 nmol/L ($n = 10$) dan berat molekul berkisar 30.000 – 35.000 Da.¹⁶⁻¹⁸ Persentasi homologi protein ikat folat dari susu sapi segar dengan protein ikat folat dari manusia sebesar $\pm 83\%$.¹⁹ Berdasarkan penjelasan yang telah dipaparkan maka potensi protein ikat folat dari susu sapi segar dapat digunakan sebagai pengganti antibodi ELISA dalam mengukur kadar folat dalam tubuh.

Karakterisasi dan penggunaan protein ikat folat pada pengukuran kadar folat telah dilakukan pada penelitian sebelumnya di laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI. Pengukuran kadar folat tersebut dilakukan dengan teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* (analog ELISA kompetitif) yang diujicobakan dalam serum.^{20,21} Namun, larutan standar asam folat yang dipakai hanya pada rentang 25-100 ng/mL padahal kadar normal serum manusia berkisar pada 6-20 ng/mL sehingga keakuratan teknik ini masih dipertanyakan. Oleh karena itu, perlu adanya penyempurnaan teknik pengukuran folat serum ini ke arah yang lebih baik dengan meninjau keakuratan teknik.²¹

Dalam mencapai tujuan tersebut, langkah-langkah yang perlu dilakukan untuk penyempurnaan teknik pengukuran folat ini antara lain: memurnikan protein ikat folat dari susu sapi segar, memvalidasi teknik ELPLBA dengan PIF murni sebagai pengganti antibodi dari ELISA kompetitif pada pengukuran kadar folat serum dan membandingkan teknik *enzyme labeled protein ligand binding*

assay (ELPLBA) dengan teknik ELISA kompetitif. Kompetitor folat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah konjugat asam folat-avidin karena avidin dapat mengikat 4 molekul biotin maupun peroksidase, sehingga diharapkan dapat menghasilkan nilai absorbansi atau OD (*optical density*) yang besar agar dapat mengukur kadar folat serum yang kecil (6-20ng/mL).²⁰

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, fokus masalah dalam penelitian ini adalah belum diketahui apakah teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* dengan penggunaan PIF murni dapat valid dalam mengukur kadar folat serum dan belum diketahui apakah hasil teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* dapat sebanding dengan teknik pengukuran standar folat dalam menganalisis kadar folat serum.

1.3 Pertanyaan penelitian

1. Apakah teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* (ELPLBA) dengan penggunaan PIF murni dapat valid dalam mengukur kadar folat serum?
2. Apakah hasil teknik ELPLBA dapat sebanding dengan hasil ELISA kompetitif dalam menganalisis kadar folat serum?

1.4 Hipotesis

Hasil pengukuran teknik ELPLBA menggunakan protein ikat folat murni tidak berbeda nyata dengan hasil teknik pengukuran standar folat serum.

1.5 Tujuan Penelitian

1.5.1 Tujuan Umum

Membakukan teknik ELPLBA menggunakan protein ikat folat dan konjugat asam folat-avidin pada pengukuran folat di serum.

1.5.2 Tujuan Khusus

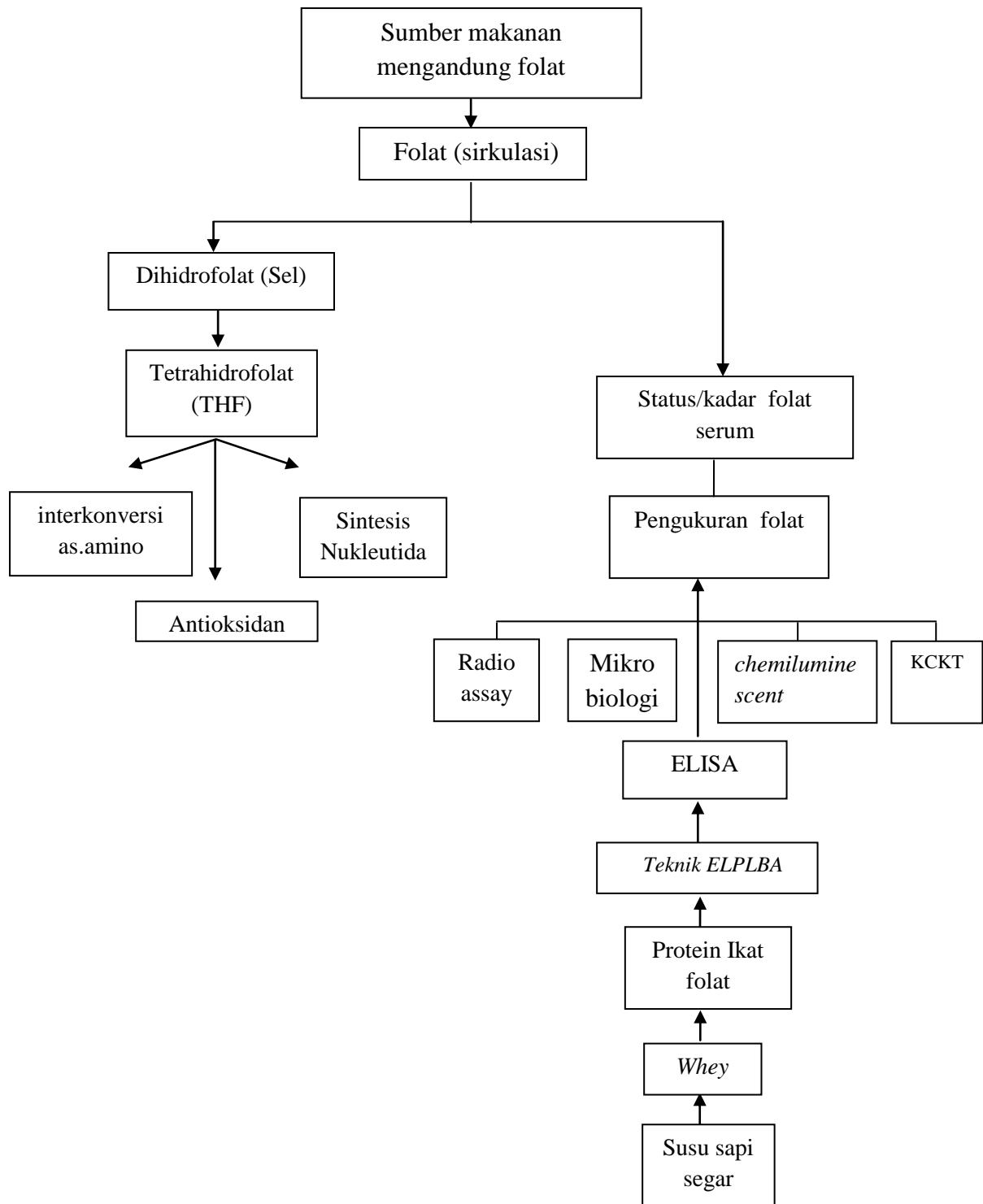
1. Mengisolasi dan purifikasi protein ikat folat dari susu sapi segar
2. Menguji validitas (uji kebakuan) teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* dari segi linieritas, akurasi dan presisi berdasarkan hasil yang diperoleh dari perbandingan teknik.

3. Membandingkan hasil dari teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* yang dibuat dengan teknik standar pengukuran folat yaitu ELISA kompetitif

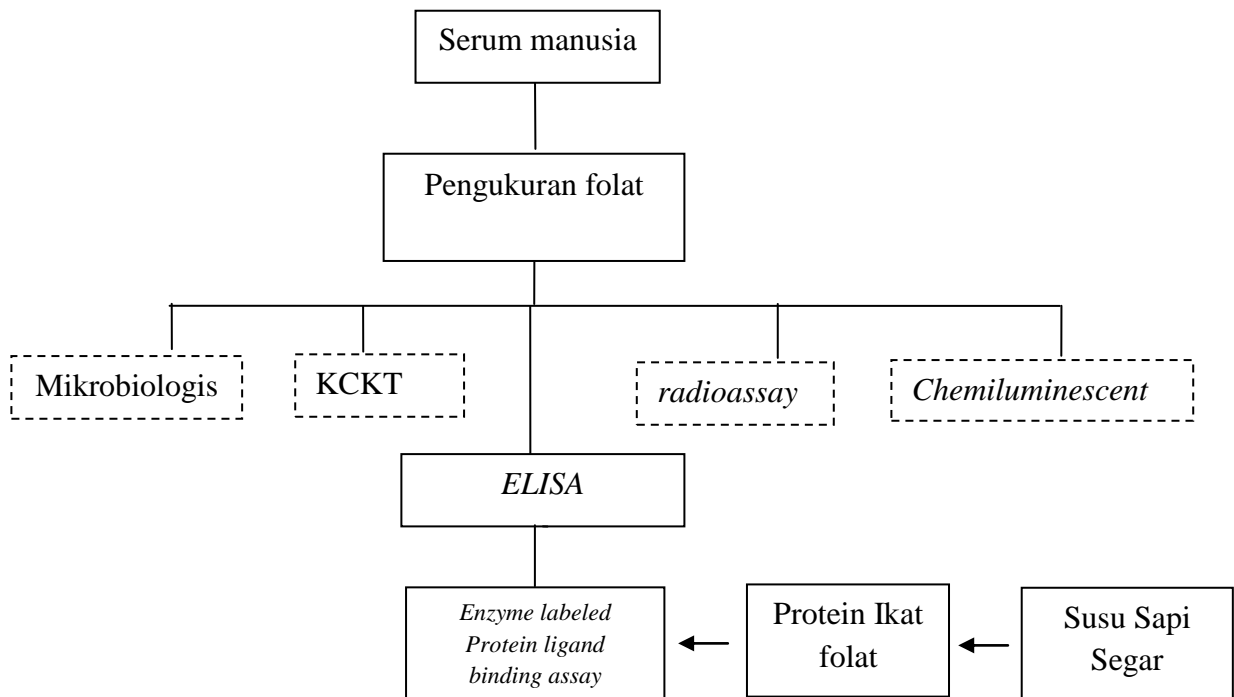
1.6 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan membuka peluang usaha dalam pemurnian PIF dari susu sapi segar dan PIF menjadi salah satu bahan baku alternatif selain antibodi yang terlibat dalam pengukuran folat serum sesuai standar dengan pengerjaan yang sederhana dan hasil yang akurat sehingga dapat melayani keperluan masyarakat.

1.7 Kerangka Teori



1.8 Kerangka Konsep



⋯ Tidak diteliti

▭ Diteliti

BAB II

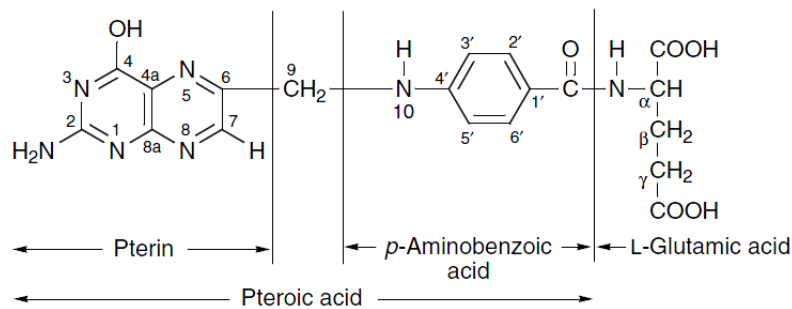
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Definisi Folat

Vitamin merupakan mikronutrien yang dibutuhkan untuk berbagai fungsi kehidupan dan umumnya tidak dapat disintesis oleh tubuh sehingga harus dipasok dari luar tubuh. Jenis vitamin terbagi dalam dua golongan yaitu vitamin larut lipid dan vitamin larut air. Salah satu jenis vitamin larut air yaitu folat atau dikenal sebagai vitamin B₉. Folat pertama kali di isolasi daun bayam dan kata “folate” diambil dari nama *folium* yang berarti daun. kemudian, folat berhasil dibuat secara sintetik yang dinamakan folat. Nama folat menjelaskan secara umum tentang semua bentuk folat termasuk bentuk sintesis (asam folat) dan bentuk alami dalam makanan.¹⁻³

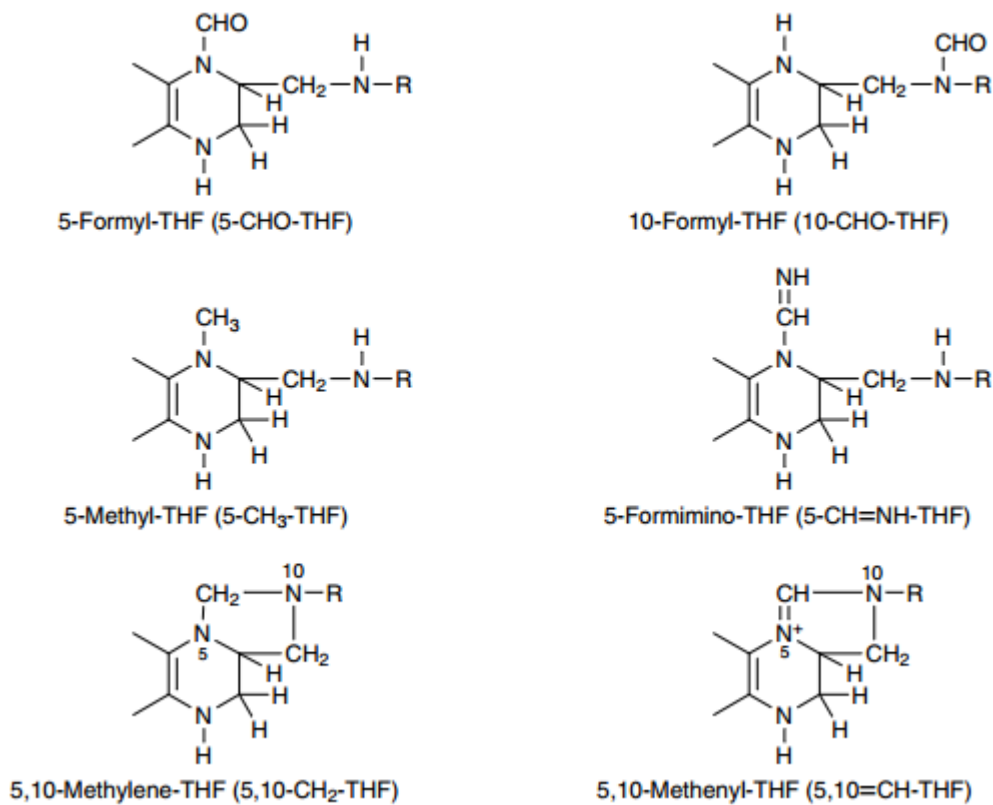
2. 1. 1 Struktur Molekul Folat

Struktur asam folat dibentuk dari tiga komponen yaitu P-Aminobenzoat, turunan *pterin*, dan glutamat. (Gambar 1) Asam folat merupakan bentuk tidak aktif dan bukan bentuk alami dari folat. Umumnya, cincin pteridin akan direduksi menjadi 5,6,7,8-tetrahidrofolat (THF).^{1,2,3}



Gambar 1. Struktur molekul asam folat³

THF adalah bentuk aktif folat yang dapat direaksikan dengan fragmen satu karbon secara kovalen pada atom N-5 atau N-10. Bentuk folat yang dihasilkan dari reaksi fragmen satu karbon dan THF yaitu 5, formil-, 10-formil-, 5-metil-, 5-formimino-, 5,10-metilene-, and 5,10-methenil-THF.³(Gambar 2)



Gambar 2. Jenis turunan folat dan struktur molekulnya²

2. 1. 2. Sifat Folat

Asam folat memiliki sifat fisik kristal berwarna kuning, tidak berbau, dan hambar. Asam folat dapat larut dalam larutan alkali (natrium hidroksida atau natrium bicarbonat dan sedikit larut dalam air dingin (20 mg/100mL). Asam folat tidak stabil terhadap tingkat keasamaan ($\text{pH} < 5$), cahaya dan panas ($> 100^\circ\text{C}$). Degradasi asam folat membentuk *p-aminobenzoylglutamic acid* (PABG) dan pterin 6 *carboxylic acid*. Tidak seperti asam folat, folat alami larut dalam air, memiliki bentuk struktur yang tidak stabil/labil dan rentan pemutusan ikatan secara oksidatif pada posisi C₉-N₁₀. Ketidakstabilan folat alami bukan hanya dipengaruhi oleh pH, cahaya, dan panas melainkan juga dari ion logam seperti Zn²⁺, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, dan Na⁺.^{2,15} Umumnya, asam askorbat dan protein ikat folat dari susu diketahui dapat meningkatkan kestabilan folat dalam makanan dengan mencegah oksidasi folat tereduksi.^{2,3}

2. 1. 3. Sumber dan kebutuhan folat

Asam folat dapat ditemukan pada suplemen, sereal, roti dan sebagian jus juga telah ditambahkan dengan asam folat, sedangkan folat alami dapat ditemukan dalam makanan/minuman. Sumber folat alami dari jamur, sayuran hijau kacang – kacangan dan buah-buahan (terutama stroberi dan jeruk). sedangkan pada hewan, folat banyak terkandung dalam susu dan hati. Kandung folat dalam susu sekitar $6\mu\text{g}/100\text{g}$ dan bentuk dominan folat pada susu yaitu 5 metil tetrahidrofolat. Susu hasil fermentasi (yogurt) memiliki kadar folat sekitar $18\mu\text{g}/100\text{g}$ dengan bentuk terbanyak adalah formil folat. Tingginya kadar folat dalam yogurt disebabkan oleh adanya biosintesis folat dari *Streptococcus salivarius sub sp.*^{2,4,21-23}

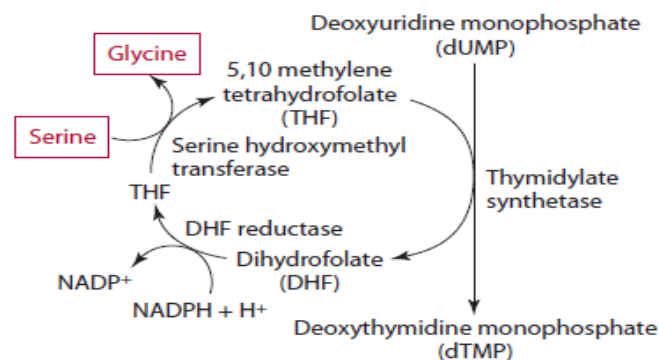
Umumnya, bioavaibilitas folat dari makanan bervariasi salah satunya bergantung dari kondisi usus seperti pH, dan aktivitas enzim yang dibutuhkan untuk pencernaan folat. karena penyerapan folat (folat alami/asam folat) dalam tubuh tiap orang berbeda-beda maka dianjurkan kebutuhan standar konsumsi folat per hari seseorang menurut AKG tahun 2013 seperti pada tabel 1.^{3,7}

Tabel 1. Kebutuhan standar folat per hari seseorang menurut AKG tahun 2013⁷

Kelompok	Umur	Kebutuhan Folat (μg)
Bayi hingga anak-anak	0- 6 bulan	65
	7- 11 bulan	80
Laki-laki	1-3 tahun	160
	4-6 tahun	200
	7-9 tahun	300
	10-12 tahun	400
	13-15 tahun	400
	16-18 tahun	400
	19-29 tahun	400
Perempuan	30-49 tahun	400
	50-64 tahun	400
	19-29 tahun	400
	10-12 tahun	400
	13-15 tahun	400
	16-18 tahun	400

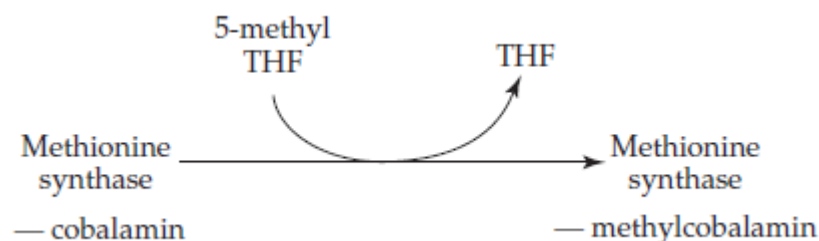
2. 1. 4. Peranan Folat

Folat secara umum berfungsi sebagai ko-enzim dalam reaksi pemindahan penggal satu karbon dalam sintesis asam nukleat (sintesis purin dan pirimidin) dan metabolisme asam amino (glisin dan metionin). Asam folat adalah bentuk vitamin belum aktif. Untuk itu, inti pteridin yang terkandung dalam salah satu anggota vitamin ini harus direduksi terlebih dahulu menjadi dihidrofolat kemudian menjadi tetrahidrofolat atau langsung menjadi tetrahidrofolat. Reduksi asam folat menjadi tetrahidrofolat dikatalisis oleh suatu enzim yang disebut folat reduktase. asam amino glisin menjadi asam amino serin dan menjadi koenzim hanya dapat diubah oleh dihidrofolat atau tetrahidrofolat, sedangkan asam folat saja tidak bisa.^{3,23-25} THF dapat menerima gugus hidroksimetil dari asam amino serin sehingga terbentuk 5,10-metilen-THF dan asam amino glisin. Proses ini dikatalisis oleh serin transhidroksimetilase. 5,10-metilen-THF sangat berperan penting dalam pembentukan basa timidin. (Gambar 3)^{3,23,24}



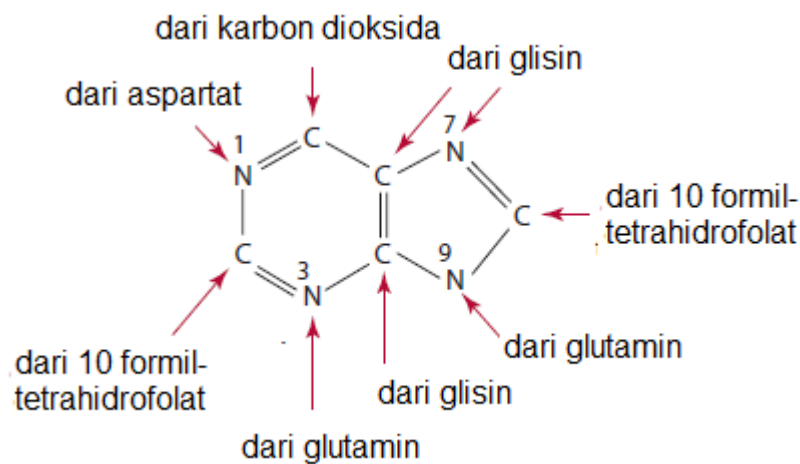
Gambar 3. Pembentukan dTMP yang melibatkan 5,10-metilen-THF²⁶

Reduksi metilen THF akan membentuk 5 metil THF yang digunakan sebagai donor metil dalam sintesis metionin.(Gambar 4).



Gambar 4. Reaksi konversi kobalamin menjadi metil kobalamin.²⁶

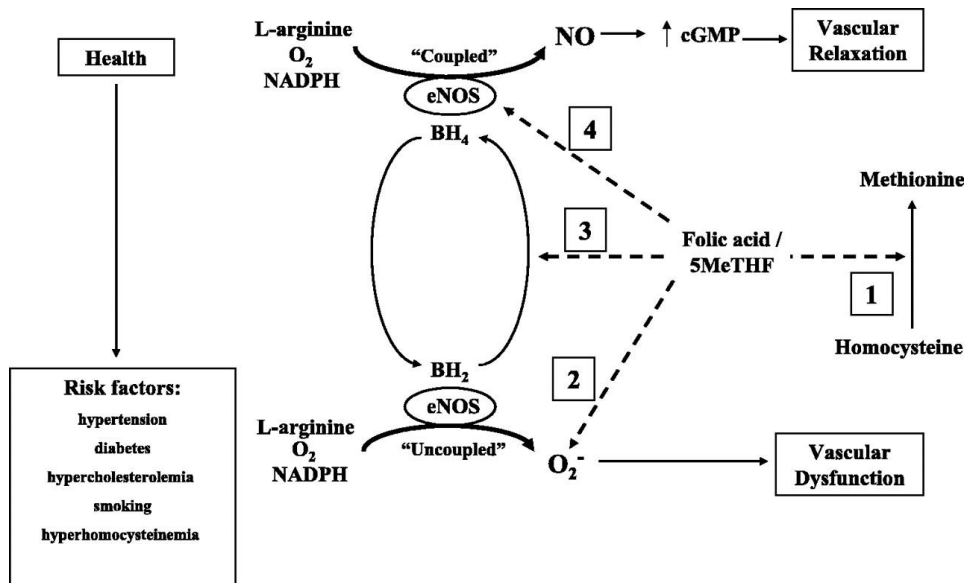
Degradasi asam amino seperti degradasi histidin berupa formiminoglutamat akan dikonversi menjadi glutamat dengan melibatkan turunan tetrahidrofolat. THF juga berperan sebagai koenzim *transformatinase* dengan menerima gugus formimino dari formiminoglutamat (FIGLU) sehingga terbentuk 5-formimino THF dan glutamat. Hasil oksidasi triptopan berupa format dapat bereaksi dengan THF untuk membentuk N¹⁰-formyl-THF. Reaksi ini membutuhkan sintetase dan ATP sebagai sumber energi. N¹⁰-formil-THF dapat mendonorkan bagian formil pada cincin purin posisi C-8 dan C-2. (Gambar 5) ^{3,4,23,26}



Gambar 5. Struktur basa purin²⁶

10 formil tetrahidrofolat dapat teroksidasi menjadi karbon dioksida dengan tujuan untuk menjaga homeostasis folat bebas yang tidak diperlukan. Metilen-, metenil-, dan 10 formil tetrahidrofolat dapat saling dikonversi, kecuali 5 metil THF yang tidak dapat dikonversi kembali menjadi 5,10 metilen THF. ^{4,23,26}

Folat bukan hanya berfungsi sebagai koenzim transfer 1 karbon melainkan juga sebagai antioksidan yang dapat menurunkan lipid peroksidasi sehingga mencegah terjadinya kerusakan endotel. Bagian aktif dari asam folat yang bertanggung jawab sebagai antioksidan yaitu gugus 4-hidroksil dari cincin pterin. ^{27,28} Asam folat memiliki aktivitas antioksidan yang paling rendah pada penghambatan lipid peroksidasi dan penguraian peroksinitrit jika dibandingkan dengan folat lainnya. ²⁹ mekanisme asam folat sebagai antioksidan secara umum dapat menguraikan radikal superoksida. (Gambar 6)



Gambar 6. Asam folat atau turunannya mengurangi disfungsi endotel melalui beberapa mekanisme: (1) menurunkan kadar homosistein yang berlebih dalam darah; (2) antioksidan secara langsung untuk menetralkan O₂⁻. (3) menstabilisasi BH₄, dan (4) menekan eNOS secara langsung melalui pengikatan BH₄.²⁹

2. 1. 5 Status folat dalam tubuh

Apabila defisiensi folat terjadi dalam tubuh, maka dapat menyebabkan pasokan THF menurun sehingga ketersediaan nukleotida purin dan timin yang berfungsi sebagai prekursor sintesis DNA, serta interkonversi asam amino ikut terganggu. Hal ini dapat mempengaruhi pembentukan DNA, proses perbaikan kerusakan DNA (*DNA repair*), metilasi DNA, dan lain-lain. Beberapa penyakit yang disebabkan defisiensi asupan folat antara lain anemia megaloblastik, hiperhomosistein, preeklampsia, dan lain-lain.^{20,23,26}

Folat yang berlebih dalam tubuh (suplemen/makanan alami) disimpan di hati dalam bentuk metil tetrahidrofolat dan sisanya akan diekskresikan melalui empedu. WHO menyebutkan gambaran normal, rendah (defisiensi), dan tingginya status folat seseorang yang diukur dalam serum, plasma, atau sel darah merah dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Gambaran status folat dalam tubuh yang diukur dari serum/plasma dan sel darah merah⁸

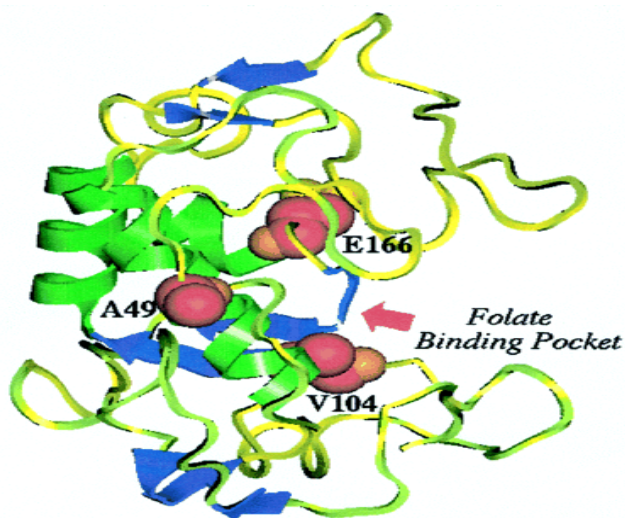
Kadar folat serum/plasma (ng/mL)	Kadar folat sel darah merah (ng/mL)	Interpretasi
<20		Tinggi
6-20		Normal
3-5,9		Dugaan defisiensi
<3	<100	Defisiensi

2. 2. Protein Ikat Folat (PIF)

Protein ikat folat merupakan glikopeptida yang mengikat folat dengan afinitas yang tinggi.^{14,15} Protein ikat folat mulanya ditemukan pada susu sapi sebagai suatu makromolekul tidak tahan panas (*heat-labile*) yang dapat menahan adsorpsi folat susu pada karbon aktif.²⁷ Makromolekul tersebut kemudian dipisahkan dan diidentifikasi sebagai protein dalam susu sapi dan ASI. Sejak saat itu, protein ikat folat dipelajari dan dilakukan karakterisasi PIF seperti struktur kimia, sekuens asam amino, afinitas terhadap folat dan lain-lain.³⁰⁻³²

2. 2. 1 Struktur Protein Ikat Folat

Protein ikat folat yang diisolasi dari susu sapi mengandung 222 asam amino, memiliki delapan ikatan disulfida dan berat molekul $\pm 25,700$ Da. Protein ini juga memiliki dua situs *N-linked glycan* sehingga berat molekul total yaitu sekitar 30,000-35,000 dalton dengan bagian glikosilasi mencapai 7-10%^{13,17}



Gambar 7. Model Struktur Molekul Protein Ikat Folat dari Susu Sapi³²

Struktur molekul protein ikat folat dari susu sapi memiliki kesamaan dengan protein ikat riboflavin dari ayam, yaitu keduanya mengandung enam residu triptofan dan delapan sistein yang membentuk ikatan disulfida pada daerah pengikatan ligan (*ligand-binding domain*). Walaupun folat dan riboflavin secara fungsional berbeda, namun keduanya memiliki struktur molekul yang mirip yaitu adanya gugus cincin aromatik hidrofobik. Hal ini mengindikasikan adanya kemungkinan daerah ikatan PIF dengan folat sama halnya dengan daerah ikat PIR dengan riboflavin. (Gambar 7)^{33,34}

2. 2. 2 Karakteristik Protein Ikat Folat

Perbandingan ikatan antara PIF dengan folat secara stoikiometri yaitu 1:1.¹⁶ Titik isolistrik protein ikat folat dari susu sapi, ASI dan susu kambing berkisar pada rentang pI 7-9. Nilai titik isolistrik PIF yang beragam menunjukkan adanya heterogenitas bentuk glikosilasi dari PIF. Pengikatan PIF terhadap folat bergantung pada pH. pH 7,4 merupakan pH optimum dalam ikatan PIF dengan folat, sedangkan disosiasi ikatan PIF dengan folat seperti 5-metil tetrahydrofolat dan asam folat terjadi pada pH < 5.¹⁴ PIF juga rentan terhadap suhu tinggi yang dapat menyebabkan denaturasi dengan suhu berkisar antara 70-80°C.^{35,36} Selain pH dan suhu, peran *alkylating agent* seperti iodoasetat dan agen pereduksi seperti β -merkaptotanol dapat menyebabkan berkurangnya pengikatan folat oleh PIF karena keduanya dapat mengalkilasi residu sistein (gugus SH) dan mereduksi jembatan disulfida pada protein.^{15,16,20}

Secara umum, protein ikat folat dari susu sapi dapat mengikat asam folat lebih kuat dari pada 5-metil tetrahydrofolate. Hal ini dibuktikan dari nilai K_D folat sebesar 20 ± 9 pM dan 5 metil tetrahydrofolat sebesar 160 ± 50 pM.^{15,16,17} Karakteristik glikosilasi (*N-linked glycans*) protein ikat folat dari susu sapi dengan protein ikat folat dari ASI adalah keduanya memiliki sekuens yang homolog dengan persentasi berkisar 83% sehingga terdapat kemungkinan protein ikat folat dari susu sapi segar dapat digunakan dalam mengikat folat dari tubuh manusia.¹⁸

2. 2. 3. Peranan Protein Ikat Folat

Dugaan peran PIF di dalam susu yang memfasilitasi penyerapan folat pada usus. Dalam sel intestinal tikus menunjukkan bahwa penyerapan folat dengan

adanya protein ikat folat lebih tinggi daripada folat bebas. Ford juga menduga fungsi PIF dalam susu sebagai perangkap folat yang memastikan transfer folat dari plasma darah menuju ke kelenjar payudara. Lebih lanjut peran PIF terlibat dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang butuh akan folat.^{16,31,32} Dengan demikian, PIF secara umum berperan sebagai mediator pengangkutan folat dalam tubuh yang penting untuk menjamin folat tidak mengalami degradasi.

2. 2. 4. Teknik Isolasi dan Pemurnian Protein Ikat Folat

2. 2. 4. 1. Teknik isolasi

Isolasi protein ikat folat dari susu sapi pertama kali dilakukan dengan cara pemusingan (*centrifugation*) dan penambahan asam kuat untuk mendapatkan *whey* susu.^{4,14} *Whey* yang dihasilkan akan ditambahkan garam amonium sulfat untuk mengurangi kelarutan protein dalam air. Pengurangan interaksi protein dengan air dan protein dapat membentuk gumpalan. Secara prinsip isolasi ini dinamakan dengan teknik *salting out*.^{15,36-39} Ammonium sulfat yang berlebih pada suspensi dimurnikan dengan pemasukan suspensi ke dalam kantong selofan kemudian direndam dengan pelarut air/ dapar sehingga ammonium sulfat yang berukuran kecil akan keluar dari kantong secara difusi sedangkan protein dengan ukuran besar akan tertahan pada kantong selofan. Pemurnian ini dinamakan dialisis.³⁸

2. 2. 4. 2. Teknik pemurnian kromatografi penukar ion

Kromatografi penukar ion adalah salah satu teknik pemurnian berdasarkan pada daya saling tarik menarik molekul yang bermuatan berlawanan dengan fasa diam atau resinnya. Molekul yang bermuatan positif akan berikatan dengan fasa diam bermuatan negatif dan sebaliknya. Fasa diam merupakan fasa yang dilewati oleh fasa gerak sehingga tidak keluar dari kolom kromatografi. Umumnya fasa diam penukar ion berupa bahan padat berpori atau resin polistirena. Kromatografi penukar ion dibagi menjadi dua jenis yaitu penukar kation dan penukar anion. Penukar kation mempunyai gugus bermuatan negatif sehingga dapat mengikat senyawa yang bermuatan positif, sedangkan penukar anion mempunyai gugus bermuatan positif sehingga dapat mengikat senyawa bermuatan negatif (anion).^{19,20}

Pemurnian protein biasanya dilakukan dengan penukar anion atau kation dari selulosa atau agarose. Protein ikat folat merupakan protein bermuatan negatif sehingga dapat dipisahkan dengan fasa diam atau resin yang bermuatan positif. DEAE selulosa merupakan resin bermuatan positif, sehingga hanya dapat mengikat senyawa bermuatan negatif. Pelepasan protein dari resin penukar ion dapat dilakukan dengan mengubah pH atau konsentrasi ion yaitu melewati senyawa lain yang dapat mengusir protein yang terikat keluar kolom karena memiliki daya ikat yang lebih besar terhadap resin.³⁷ Penambahan larutan buffer fosfat pH 7,2 yang mengandung NaCl 0,1M akan digunakan dalam proses pemisahan protein-protein bermuatan negatif (termasuk protein ikat folat) dari resin DEAE selulosa untuk keluar kolom.^{4,14,39-40}

2. 2. 4. 3. Teknik pemurnian kromatografi afinitas

Pemurnian senyawa menggunakan kromatografi afinitas didasari pada interaksi spesifik senyawa yang akan dipisahkan dengan fasa diam/bahan pemisahannya. Teknik pemurnian ini secara teori dapat memurnikan senyawa yang diinginkan sepenuhnya dari campuran yang kompleks dalam sekali jalan.^{3,4,37}

Jika campuran bahan termasuk senyawa khusus dimasukkan pada fasa diam pada kolom kromatografi, maka hanya senyawa khusus saja yang dapat melekat pada fasa diam sedangkan senyawa lainnya akan keluar dari kolom. Senyawa khusus yang terikat tidak tetap atau dapat dilepaskan kembali dengan cara mengubah kondisi eksternal seperti pH, kekuatan ionik, atau suhu sehingga ikatan kompleks antara senyawa khusus dan pasangannya menjadi tidak stabil dan keluar dari kolom.^{4,39-40}

2. 3. Metode Pengukuran Folat

2. 3. 1 Metode Mikrobiologi

Penentuan kadar folat dalam makanan dan sampel biologis lainnya banyak menggunakan metode mikrobiologi karena sensitif, murah, peralatan dan media mudah diperoleh. Prinsip kerja metode ini yaitu kadar folat dalam sampel ditentukan berdasarkan pengukuran turbidimetri (kekeruhan pada media) dari pertumbuhan bakteri dalam suatu medium berisi komponen untuk pertumbuhan kecuali folat sehingga jumlah pertumbuhan sangat bergantung dari banyaknya

vitamin yang diberikan. Bakteri yang biasa digunakan yaitu *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, dan *Pediococcus acidilactici*. Metode ini memiliki kelemahan yaitu lamanya waktu yang diperlukan dalam pertumbuhan bakteri (± 24 jam), membutuhkan ruang steril, menghasilkan limbah bakteri, masa kadaluarsa bahan relatif cepat, dan memerlukan tenaga kerja yang terlatih.^{11,20,41}

2. 3. 2 Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Metode ini merupakan pengembangan dari kromatografi cair dengan menggunakan tekanan tinggi. Prinsip kerja metode ini adalah pemisahan fraksi bahan uji dalam kolom berdasarkan perbedaan distribusi antara fasa diam dengan fasa gerak. Fasa diam adalah fasa yang berada dalam kolom sedangkan fasa gerak adalah fasa yang melewati fasa diam untuk keluar dari kolom. Fraksi yang keluar kolom dideteksi oleh detektor dan hasilnya dibaca dengan bentuk puncak-puncak pada kertas pencatat. Kelebihan metode ini yaitu dapat memisahkan lebih dari satu bentuk folat sehingga dapat diklasifikasikan kadar tiap bentuk folat, memerlukan bahan uji dalam jumlah sedikit dan prosesnya cepat. Walaupun teknik ini spesifik, namun teknik ini membutuhkan pereaksi standar yang beragam dan peralatan yang mahal.⁴⁰⁻⁴¹

2. 3. 3 Metode Radioassay

Dalam pengukuran folat, metode *radioassay* ini bekerja dengan cara kompetisi ikatan antara folat dalam serum yang bekerja sebagai antigen dan folat berlabel ^{125}I sebagai antigen berlabel untuk berikatan dengan protein ikat folat. Folat serum pertama kali dipisahkan dari protein serum dengan cara pemanasan dan penambahan senyawa pereduksi seperti merkaptoetanol atau dithiothreitol (DTT). Kemudian, folat serum dikompetisikan dengan folat berlabel ^{125}I yang diikat oleh protein pengikat. Setelah terjadi kesetimbangan antara antigen dan antibodi, fraksi folat berlabel ^{125}I yang terikat dengan protein pengikat akan diukur dengan pencacah gamma. Satuan pengukuran yang digunakan adalah CPM (*counts per minute*). Keuntungan dari metode ini yaitu pengerjaannya cepat dan tidak dipengaruhi oleh obat yang terdapat dalam sampel sedangkan kerugiannya yaitu pengujian folat pada sampel jaringan masih diragukan, menimbulkan limbah radioaktif dan peralatan yang mahal.⁴²⁻⁴⁵

2. 3. 4 Metode *chemiluminescence*

Prinsip kerja metode ini berdasarkan kompetisi antara folat dari sampel dengan kompetitor untuk berikatan dengan protein pengikat folat (PIF) berlabel zat berpendar. Langkah awal, pereaksi folat dicampurkan dengan sampel untuk melepaskan folat yang terikat dari protein endogen. Selanjutnya folat serum ditambahkan pada microbead yang berisi PIF berlabel zat berpendar, kemudian dilanjutkan dengan penambahan kompetitor folat. kompetitor folat berupa konjugat asam folat-biotin yang dapat berikatan dengan streptavidin/avidin berlapis padatan pendukung untuk membentuk kompleks biotin-avidin. Banyaknya kompleks yang terbentuk dideteksi dengan luminator yang memiliki magnet pada permukaan elektrodanya.^{3,46}

2. 3. 5 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

ELISA merupakan salah satu teknik imunokimia yang digunakan untuk mendeteksi adanya antigen atau antibodi dalam sampel secara kuantitatif. Teknik ELISA menggabungkan kespesifikan antibodi dengan kepekaan uji enzimatik dengan spektrofotometer atau antigen dilekatkan pada enzim yang mudah ditera. Secara umum, Salah satu reaktan/analit diimobilisasi pada permukaan fasa padat. Fasa padat yang dimaksud yaitu *mikroplate* yang berisi 96 sumur.^{47,48}

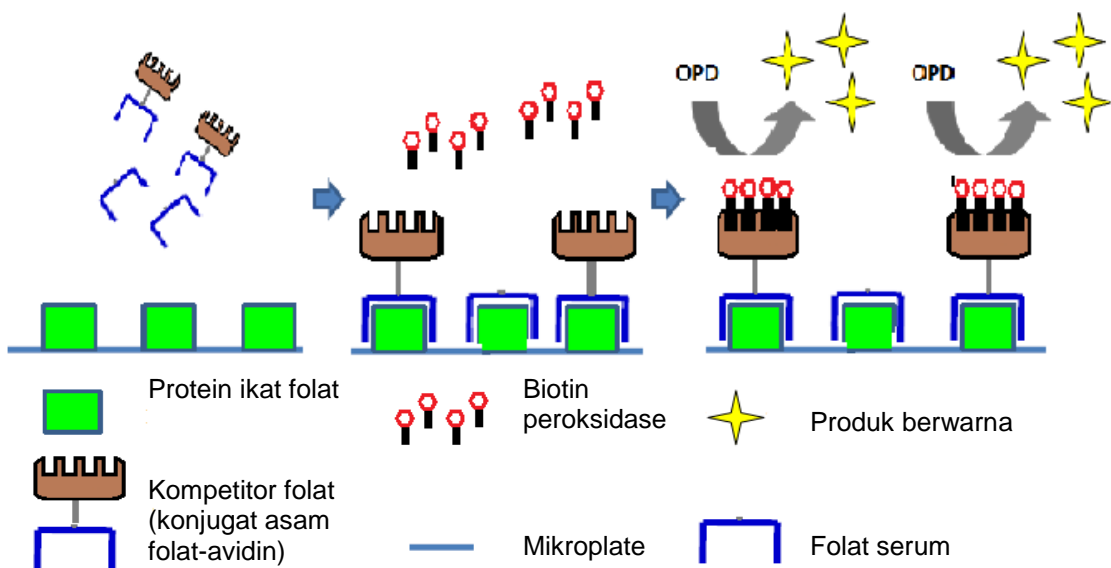
Keunggulan dari uji ini yaitu pengerjaan yang relatif sederhana, tidak menggunakan bahan radioaktif, dan membutuhkan sampel dalam jumlah sedikit. Prinsip umum ELISA dapat dibedakan menjadi dua jenis, yaitu uji kompetitif dan uji non kompetitif.

Uji kompetitif biasanya digunakan untuk pengukuran molekul kecil seperti hormone, vitamin dalam darah yang memiliki hanya satu epitope. Prinsip kerjanya berdasarkan kompetisi antara antigen yang diuji dan kompetitor berlabel enzim sebagai pereaksi deteksi. Substrat ditambahkan sehingga enzim dapat memecah substrat menjadi produk berwarna. Intensitas perubahan warna diukur dengan menggunakan prinsip spektrofotometri.² Dilain hal, **uji non kompetitif** dilakukan dengan menggunakan antibodi ganda sehingga dinamakan *sandwich* ELISA. Prinsip uji ini yaitu antibodi difiksasi pada dasar well akan direaksikan dengan antigen tertentu. Kemudian, antibodi primer direaksikan dengan antigen yang telah terikat pada antibodi pertama. Jika antibodi primer berlabel enzim digunakan

langsung pada pengukuran dapat dinamakan *sandwich* ELISA langsung. Jika antibodi sekunder berlabel enzim yang spesifik terhadap antibodi primer digunakan maka dinamakan *sandwich* ELISA tidak langsung. Kemudian, ditambahkan substrat sehingga enzim dapat memecah substrat menjadi produk berwarna. Intensitas perubahan warna diukur dengan menggunakan prinsip spektrofotometri.^{2,13,19}

2.4 Enzyme labeled Protein Ligand Binding Assay

Kebutuhan pembentukan antibodi pada ELISA dapat diganti dengan protein pengikat alami dalam pengukuran kadar folat dengan prinsip yaitu *enzyme labeled protein ligand binding assay* atau *Enzyme-Labeled Protein-Binding Assays* sehingga antibodi tidak perlu dibuat lagi. Protein pengikat folat yang digunakan yaitu protein ikat folat (PIF) dari susu sapi.^{19,20} Langkah-langkah pengujian dengan teknik ini dapat dilihat pada gambar 8:



Gambar 8. Prinsip teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* dalam pengukuran folat serum. (a) Pelekatan protein pengikat spesifik pada suatu permukaan padat, (b) Penambahan analit dan konjugat asam folat–avidin (kompetitor) yang spesifik terhadap protein pengikat, (c) Pelacak berlabel enzim ditambahkan pada permukaan sumur dan substrat yang dapat bereaksi sehingga menghasilkan warna yang dapat diukur dengan spektrofotometer^{2,19}

Kompetitor folat yang digunakan pada penelitian ini yaitu konjugat asam folat-avidin. Karena avidin dapat mengikat empat molekul biotin dalam bentuk bebas maupun terikat dengan enzim, maka konjugat asam folat-avidin juga dapat mengikat empat molekul *biotin peroxidase* sehingga dihasilkan nilai OD (*optical density*) yang besar untuk pengukuran kadar folat serum yang sangat kecil. Suatu *crosslinker* yaitu karbodiimide digunakan pada pembentukan konjugat asam folat-avidin.¹⁹

Teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* pada pengukuran folat serum ini sudah pernah dilakukan oleh Mardiana pada tahun 2005 dengan hasil pengukuran yang lebih peka dari immulite 2000 (Tabel 3). Namun, larutan standar asam folat yang digunakan hanya pada rentang 25-100 ng/mL padahal kadar normal serum manusia berkisar pada 6-20 ng/mL sehingga kebakuan teknik ini masih dipertanyakan.^{7,19,20}

Tabel 3. Perbandingan hasil pengukuran folat serum¹⁹

Serum	<i>Immulite 2000</i> (ng/mL)	<i>Enzyme labeled Protein ligand binding assay</i> (ng/mL)
1	-	26,4
2	19,4	55,4
3	18,2	31,4
4	20,7	86,4

Oleh karena itu, kelemahan penelitian sebelumnya akan dikembangkan oleh peneliti dengan langkah awal yaitu memurnikan secara utuh protein ikat folat dari susu sapi segar dengan menggunakan kromatografi afinitas. Kemudian teknik pengukuran akan dibandingkan dengan teknik standar, serta pembakuan teknik akan dilakukan dengan meninjau dari segi linieritas, akurasi, dan presisi sehingga didapatkan hasil pengukuran folat yang dapat dipertanggungjawabkan.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan sampel penelitian menggunakan 20 serum darah pasien normal. Semua pasien/individu berumur 24-55 tahun baik pria maupun wanita. Darah yang didapat dari pasien kemudian ditampung pada tabung SST dan didiamkan selama 20-30 menit sampai membeku, kemudian serum dipisahkan dari darah pasien dengan cara sentrifugasi 2000 rpm selama 10-15 menit. Serum disimpan dalam *microtube* pada -20°C .

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jalan Salemba Raya No. 6 Jakarta. Waktu penelitian sampai penyusunan laporan berlangsung selama 9 bulan.

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu susu sapi yang diperoleh dalam keadaan segar dari pemerahan susu sapi di daerah Pancoran, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), K_2HPO_4 (Merck), KH_2PO_4 (Merck), larutan HCl, BaCl_2 10%, kantong selofan (D9652 Sigma) dan kertas whatmann 52, DEAE selulosa (santa cruz), aminohexyl agarose, asam folat, NaHCO_3 , *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide*, natrium asetat, BSA, larutan pencuci (asam asetat 5% dan akuabides), gel poliakrilamid 10% (Sigma A 3553), metilen bis akrilamid (Sigma M 7279), β -merkaptotanol (Merck®), larutan Tris HCl, amonium persulfat (APS), TEMED (tetrametiletildiamin) - (Sigma T 9281), glisin (Sigma G 7126), biru bromfenol (Sigma B 8502), dapar elektroda, asam asetat, methanol, marker protein, dapar transfer, antibodi anti PIF (abcam), substrat aminoetil karbazol, avidin (Sigma, A-9275), *carbodiimide* (EDC), asam folat (sigma), kantong selofan, akuabides. PBS 7,4 (merck), dapar PBS-Tween 20 (Merck) pH 7,4, larutan *bovine serum albumin* (BSA) 1 %, *biotin-peroxidase* (Rockland, B000-03), OPD, larutan H_2SO_4 (asam sulfat, Merck) 2 N, H_2O_2 3%.

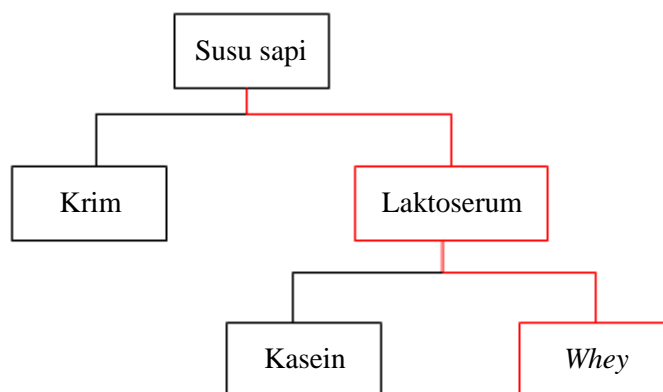
3.3.2 Alat

Gelas kimia, *magnetic stirrer*, pH meter, alat sentrifus berpendingin, pipet ukur dan pompa vakum, kolom kromatografi (Pharmacia) dengan ukuran panjang 15 cm garis tengah 1,5 cm, alat penampung fraksi (*fraction collector* – Bio-Rad®), spektrofotometer UV (Shimadzu), kuvet, alat-alat gelas, dan *freezer* -20/-80°C, kolom kromatografi panjang 152 mm dan garis tengah 8 mm, alat elektroforesis SDS-PAGE, *power supply*, alat elektroforesis *western blot wet*, mikroplat dasar datar 96 lubang, penangas air (Memmert), *microplate reader* (Biotek Elx800), mikropipet berbagai ukuran.

3.4 Prosedur kerja

3.4.1 Isolasi Protein Ikat Folat dari Susu Sapi Segar

Susu sapi segar sebanyak 2,5 liter disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 35 menit untuk memisahkan krim (fase atas) dari laktoserum (fase bawah). Kondisi pH laktoserum hasil pemisahan sebelumnya diubah menjadi 4,6 dengan penambahan larutan HCl 1 M. Sentrifugasi dilakukan kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan *whey* (supernatan) dari kasein (endapan). Setelah itu, supernatan diambil kemudian diukur volumenya untuk fraksinasi bertingkat menggunakan amonium sulfat jenuh.^{15,19,20}



Gambar 9. Alur isolasi protein ikat folat dari susu sapi segar^{15,20}

Kemudian, *whey* (supernatan) ditambahkan 250 gram kristal amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ untuk ukuran satu liter *whey* secara sedikit demi sedikit sambil diaduk dan didiamkan selama 240 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya, campuran tersebut disaring dengan kertas saring *whatman* nomor 42 pada alat penyaring *buchner*. Volume hasil filtrat diukur dan kemudian ditambahkan 190 gram/liter amonium

sulfat, sambil diaduk dan didiamkan selama satu jam pada suhu 4°C. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 45 menit. Presipitat yang didapatkan kemudian disuspensikan dengan 0,02 M dapar fosfat pH 7,2 yang mengandung 3 mM asam askorbat.^{15,20}

Suspensi hasil *salting out* dimasukkan ke dalam kantong selofan dengan batas molekul membran sebesar 12000 Da dan direndam dalam wadah yang berisi dapar fosfat pH 7,2 yang mengandung asam askorbat. Teknik ini dinamakan dialisis. Perendaman dilakukan pada suhu 4°C dan dapar fosfat (dari rendaman) tiap dua kali sehari diganti dengan dapar fosfat yang baru. Uji sulfat dilakukan dalam wadah menggunakan larutan barium diklorida 10% (BaCl₂) dengan suasana asam. Bila uji sulfat positif, dialisis dilanjutkan pada suhu 4°C untuk 24 jam berikutnya sehingga diperoleh uji sulfat negatif.^{15,19,20}

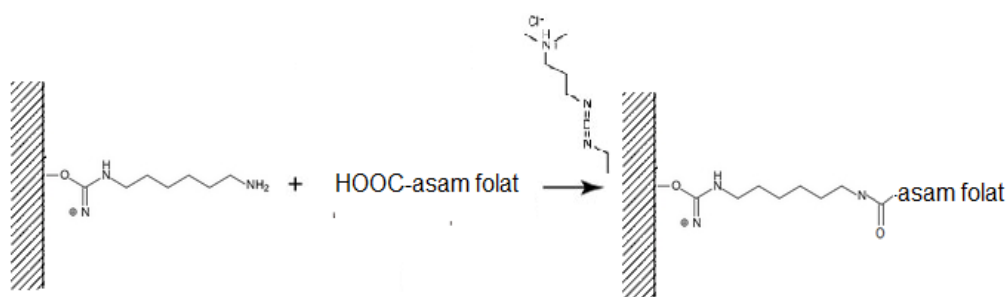
3.4.2 Purifikasi Protein Ikat Folat dengan Kromatografi Penukar Ion

Preparasi fase diam DEAE-selulosa dibuat sesuai prosedur santa cruz. Gel yang sudah dibuat kemudian disuspensikan dalam dapar fosfat 0,02 M pH 7,2 dan dikemas ke dalam kolom kromatografi dengan diameter 1,5 cm dan panjang 15 cm. Sebelum digunakan, gel di dalam kolom kromatografi dicuci dengan dapar fosfat 0,02 M pH 7,2 sampai tetesan stabil dan pembacaan serapan hasil elusinya yaitu lebih dari 0,005 pada λ 280.^{2,15,20}

Setelah kolom siap digunakan, 1 mL dialisat bebas (NH₄)₂SO₄ dimasukkan pada kolom, kemudian dielusi dengan dapar fosfat pH 7,2 dengan konsentrasi masing-masing 5 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, dan 100 mM. Fraksi hasil elusi ditampung sebanyak 2 mL dan diukur serapannya pada λ 280 nm. Elusi dihentikan dan diganti dengan konsentrasi dapar fosfat berikutnya bila absorbansi menunjukkan nilai 0 atau lebih kecil. Berdasarkan literatur, fraksi dengan puncak tertinggi pertama menunjukkan protein yang bermuatan positif terelusi keluar kolom sedangkan fraksi dengan puncak tertinggi kedua menunjukkan protein bermuatan negatif (salah satunya protein ikat folat) terelusi keluar kolom. Fraksi pada puncak tertinggi kedua tersebut dikumpulkan untuk pemurnian berikutnya.^{16,20,21}

3.4.3 Purifikasi Protein Ikat Folat dengan Kromatografi Afinitas

Preparasi fasa diam kolom kromatografi menggunakan *aminohexyl - agarose* dan asam folat yang akan disambung dengan karbodiimide. Kristal asam folat sebanyak 5mg dilarutkan dengan 0,05 M NaHCO_3 sebanyak 5 mL. Kemudian, 50 mg 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropil carbodiimide) ditambahkan dalam campuran sekitar 5 mg pada rentang 10 menit dan digoyangkan dalam keadaan gelap pada suhu kamar. *Aminohexyl-agarose* sebanyak 5-10 mL ditambahkan pada tabung yang berisi asam folat dan karbodiimide, kemudian pH diturunkan sampai menjadi 6 sambil diaduk selama 30 menit sehingga terbentuk dua fasa. Kemudian, campuran dijaga pada pH 6 dan diaduk sampai 1 jam. Gel berubah menjadi kuning, didekantasi dan dicuci dengan 0,05M NaHCO_3 . Medium yang tidak menempel dengan asam folat diblok dengan penambahan etanolamin 1 M pH 7.2 selama dua jam pada suhu ruang dan dicuci dengan 0,02 buffer fosfat pH 7,2 yang mengandung 0,1 M NaCl sebanyak 2-3 kali.^{20,49-52}



Gambar 10. Model pengikatan PIF pada fasa diam (agarosa - asam folat)⁵⁰

pH fraksi hasil kromatografi penukar ion ($\pm 15\text{mL}$) diturunkan menjadi 3 dengan penambahan larutan HCl 1M dan didialisis dengan dapar asetat pH 3,5 untuk memisahkan folat dari PIF. Hasil dialisis dicampurkan dengan resin agarosa yang terikat folat pada gelas kimia dan ditambahkan larutan NaOH 1 M sampai pH berubah menjadi 7,2 diaduk selama 3 jam pada suhu ruang dan dimasukkan kedalam kolom kromatografi bervolume 10 mL. Kemudian, kolom dielusi dengan 0,02 M dapar fosfat pH 7,2 dan hasil fraksi diukur absorbansi sampai 0 pada λ 280. Lebih lanjut, kolom dielusi kembali menggunakan dapar asetat pH 3,5 dengan NaCl 0,5 M. Ikatan PIF dan folat dapat dilepaskan pada pH < 5. Kemudian, fraksi PIF dikumpulkan di puncak tertinggi kedua, dimasukkan

kedalam kantong selofan, dan direndam dalam dapar 0,02 M pH 7,2 dengan tujuan untuk menetralkan pH asam.^{21,50-52}

3.4.4 Penentuan Kadar PIF Menggunakan Metode *Warburg-Christian*

Metode yang digunakan untuk penentuan kadar protein ikat folat dari hasil dialisis, kromatografi penukar ion, dan kromatografi afinitas adalah metode *Warburg-Christian*. Kurva standar dibuat dengan menggunakan larutan standar BSA masing-masing pada konsentrasi 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL; 1 mg/mL; 2 mg/mL; 4 mg/mL; dan 5 mg/mL. Pembacaan absorbansi dilakukan pada λ 280 nm dengan duplo untuk setiap larutan uji.¹⁹⁻²⁰

3.4.5 Elektroforesis SDS-PAGE

Preparasi awal yaitu pembuatan gel pemisah (*resolving gel*) dan gel penumpuk (*stacking gel*) lengkapnya pada tabel 1. Larutan gel pemisah dimasukkan kedalam cetakan antara dua lempeng kaca. Kemudian 1mL air ditambahkan pada permukaan gel secara perlahan-lahan dengan untuk meratakan gel. Setelah gel terpolimerisasi (\pm 45 menit), tiriskan air yang berada pada gel. Langkah berikutnya, larutan gel penumpuk dituangkan dari atas gel pemisah dan disisipkan sisir untuk membentuk sumur sampel. Setelah gel penumpuk berpolimerisasi (\pm 45 menit), pembatas gel diangkat. Lempeng kaca yang berisi gel tersebut diletakkan pada alat elektroforesis dan dapar elektroda dituangkan ke dalam tangki elektroforesis.^{20,53-56}

Sampel (hasil dialisat dan hasil kromatografi afinitas) sebanyak 10 μ L dimasukkan ke dalam tabung mikro. kemudian, ditambahkan larutan dapar sampel (Tris HCl 50mM pH 6,8, gliserol 1%, SDS 1%, biru brom fenol 0,01% dan β -*merkaptobetanol* dengan perbandingan 1 : 20). Tabung mikro tersebut diguncang dengan alat vorteks dan disentrifugasi 1-3 detik lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam sumur gel dan arus listrik dijalankan pada tegangan 180 volt selama 60 menit. Setelah itu, gel dilepaskan, direndam dengan larutan biru *brilian coomasie* selama 30 detik, dan dipanaskan selama 2 menit. Kemudian, gel dicuci dengan larutan *destaining* berkali-kali sampai terlihat pita-pita protein dengan jelas.⁵⁴⁻⁵⁷ (Tabel 4)

Tabel 4. Komposisi gel pemisah dan gel penumpuk elektroforesis SDS-PAGE²⁰

Bahan	Gel Pemisah	Gel penumpuk
Akrilamid/bisakrilamid 30/1	5,0 mL	3,05 mL
Tris - HCl 1,5 M pH 8,6	3,4 mL	-
Tris - HCl 0,5 M pH 6,8	-	2,0 mL
Akuabides	5,1 mL	4,65 mL
SDS 10%	148 μ L	85 μ L
Amonium Persulfat (APS) 10%	100 μ L	75 μ L
TEMED	10 μ L	7,5 μ L

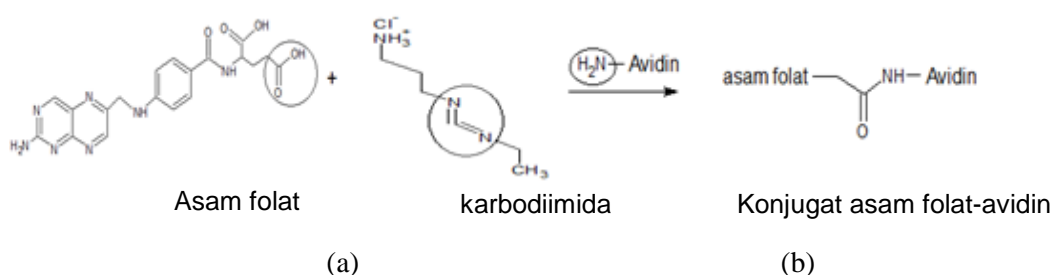
3.4.6 Western Blot (WB)

Hasil elektroforesis SDS-PAGE berupa pita-pita gel akan ditransfer ke membran nitroselulosa secara hati-hati. Setelah itu, larutan antibodi yang berlabel enzim dicampurkan ke kertas nitroselulosa. Nitroselulosa direndam dalam larutan *aminoethyl carbazole* kemudian ditambahkan H_2O_2 sebanyak 30 μ L hingga pita protein yang diinginkan dapat dilihat dengan *scanner*.

3.4.7 Optimasi Teknik *Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay*

3.4.7.1 Pembuatan Kompetitor Folat

Kompetitor folat dibuat dengan mengkonjugasikan folat ke avidin menggunakan karbodiimide. Asam folat dan karbodiimide sebanyak 1 μ mol/L dicampur selama 15 menit, setelah itu 1 μ mol/L avidin dicampurkan selama 45 menit dalam tabung *falcon* pada suhu kamar dan ruang gelap untuk membentuk konjugat avidin-folat. Alat pencampur yang digunakan adalah rotator LEEC RS 30 (Netria). Sebelum dilakukan pemisahan konjugat, terlebih dahulu dicari panjang gelombang maksimum folat.



Gambar 11. Reaksi pembuatan konjugat asam folat-avidin. Gugus karboksil rantai samping glutamat dari asam folat (a) diikat oleh karbodiimida dan (b) gugus amina avidin dipenukargantikan oleh karbodiimida sehingga terbentuk konjugat asam folat-avidin.^{19,58}

Untuk memisahkan konjugat dari campuran yang tidak bereaksi dilakukan dengan cara memasukkan konjugat ke dalam kantong membran selofan dengan batas molekul membran sebesar 12000 Da dan didialisis dengan pertukaran akuabides. Dialisis dihentikan setelah pembacaan sisa folat di luar kantong sudah nol.^{19,49}

3.4.7.2 Uji Kemampuan Fraksi Afinitas PIF pada Pengukuran Folat

Fraksi afinitas diencerkan dengan PBS pH 7,4 secara bertingkat masing-masing 1/5, 1/50, 1/500, 1/50000, dan 1/500000. Hasil pengenceran fraksi afinitas dipipetkan masing-masing 100 µL ke dalam tiap sumur mikroplat, kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C. Cairan dibuang dan dicuci 3 kali dengan 200 µL PBS-tween 20 pH 7,4. 150 µL BSA 1% dimasukkan ke dalam tiap sumur (*blocking*), kemudian didiamkan 24 jam pada suhu 4°C. Cairan dicuci 3 kali dengan 200 µL PBS-Tween 20 pH 7,4.^{19,49}

Konjugat folat-avidin diencerkan dari 1 µmol/L menjadi 1 µg/mL menggunakan PBS pH 7,4, kemudian dimasukan sejumlah 50 µL ke dalam sumur. Selanjutnya, mikroplat didiamkan selama 1 jam pada suhu kamar. Setelah itu, cairan dibuang dan dicuci 3 kali dengan 200 µL PBS-tween 20 pH 7,4. Konjugat enzim *biotin peroxidase* diencerkan dengan PBS pH 6,0 sampai mempunyai konsentrasi 20 µg/mL, kemudian dipipetkan ke dalam tiap sumur mikroplat sebanyak 50 µL. Selanjutnya mikroplat didiamkan selama 1 jam pada suhu kamar. Setelah pengeraman, cairan dalam sumur dibuang dan dicuci 3 kali dengan 200µL PBS-Tween 20 pH 7,4.^{19,49}

Langkah akhir adalah penambahan larutan OPD kemudian dipipetkan ke dalam tiap sumur sebanyak 90 µL dan kemudian didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar dalam keadaan gelap. Setelah itu ditambahkan 50 µL asam sulfat 2 N untuk penghentian reaksi enzimatik dan serapan cahaya dibaca pada panjang gelombang 490 nm dengan *mikroplate reader* (prinsip spektrofotometri) dengan serapan tertinggi. Pengenceran PIF hasil pemurnian afinitas dengan serapan tertinggi selanjutnya disebut protein ikat folat yang akan digunakan untuk pengukuran folat.^{13,19}

3.4.7.3 Pengujian Kompetitor Folat

Fraksi afinitas diencerkan dengan PBS pH 7,4 secara bertingkat masing-masing 1/5, 1/50, 1/500, 1/5000, 1/50000 dan 1/500000 dipipetkan masing-masing 100 μ L ke dalam tiap sumur mikroplat, kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C. Cairan dibuang dan dicuci 3 kali dengan 200 μ L PBS-tween 20 pH 7,4. 150 μ L BSA 1% dimasukkan ke dalam tiap sumur (*blocking*), kemudian didiamkan 24 jam pada suhu 4°C. Cairan dicuci 3 kali dengan 200 μ L PBS-Tween 20 pH 7,4. Larutan folat dengan kadar 2,5; 5; 10; 15; 20 ng/mL dimasukkan ke dalam sumur sekitar 50 μ L dan 50 μ L konjugat folat-avidin dengan kadar 1 μ g/L dimasukkan ke dalam sumur. Selanjutnya, mikroplat didiamkan selama 1 jam pada suhu kamar dan 37°C. Setelah itu, cairan dibuang dan dicuci 3 kali dengan 200 μ L PBS-tween 20 pH 7,4.^{2,19}

Konjugat enzim *biotin peroxidase* diencerkan dengan PBS pH 6,0 sampai mempunyai konsentrasi 20 μ g/mL, kemudian dipipetkan ke dalam tiap sumur mikroplat sebanyak 50 μ L. Selanjutnya mikroplat didiamkan selama 1 jam pada suhu kamar dan 37°C. Setelah pengeraman, cairan dalam sumur dibuang dan dicuci 3 kali dengan 200 μ L PBS-Tween 20 pH 7,4. Langkah akhir adalah penambahan OPD pembuatan : tablet OPD dilarutkan dalam 20mL *deionized water* dan diukur absorbansi maksimumnya) kemudian dipipetkan ke dalam tiap sumur sebanyak 100 μ L dan kemudian didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar dalam keadaan gelap. Setelah itu ditambahkan 100 μ L asam sulfat 2 N untuk penghentian reaksi enzimatik dan serapan cahaya dibaca pada panjang gelombang 490 nm dengan microplate reader (prinsip spektrofotometri) dengan serapan tertinggi. Pengenceran PIF hasil pemurnian afinitas dengan serapan tertinggi selanjutnya disebut protein ikat folat yang akan digunakan untuk pengukuran folat.¹⁹

3.4.8 ELISA Folat Serum

Serum dan larutan standar sebanyak 50 μ L dimasukkan pada sumur mikroplat yang telah terikat antibodi folat. Kemudian, ditambahkan 50 μ L kompleks asam folat-biotin pada tiap sumur (kecuali untuk larutan blanko). Selanjutnya, mikroplat didiamkan selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah pengeraman, cairan dalam sumur dibuang dan dicuci 3 kali dengan 200 μ L dapar

pencuci. Avidin-HRP dipipetkan ke dalam tiap sumur mikroplat sebanyak 100 μ L. Selanjutnya mikroplat didiamkan selama 45 menit pada suhu 37°C. Setelah pengeraman, cairan dalam sumur dibuang dan dicuci 3 kali dengan 200 μ L dapar pencuci. Langkah akhir adalah penambahan TMB sebanyak 100 μ L dipipetkan ke dalam tiap sumur dan kemudian didiamkan selama 15-30 menit pada suhu kamar dalam keadaan gelap. Setelah itu, ditambahkan 100 μ L larutan penghenti (stop solution) untuk penghentian reaksi enzimatik dan serapan cahaya dibaca pada panjang gelombang 450 nm dengan *microplate reader*.^{2,13}

3.4.9 Uji Validitas dan Uji Perbandingan Teknik

3.4.9.1 Validitas Teknik Pengukuran Folat Serum

3.4.9.1.4 Uji presisi

Setelah diketahui suhu inkubasi dan pengenceran PIF optimum dalam pengukuran folat, kemudian dilakukan uji pengukuran folat dalam serum dengan reaksi kompetisi antara folat serum dan konjugat asam folat-avidin dengan langkah yang sama dengan prosedur 3.4.7.3. Uji presisi dapat dibagi menjadi dua kategori yaitu keterulangan (*repeatability*) dan ketertiruan (*reproducibility*).

Penetapan sampel pada uji keterulangan dilakukan secara duplo dengan kondisi yang sama dan dalam interval waktu yang relatif pendek sedangkan uji ketertiruan dilakukan dengan lab yang sama hanya selang waktu yang berbeda (intra lab).

3.4.9.1.2 Uji Akurasi

Kadar folat serum yang sudah diukur kemudian ditambahkan (*spike*) dengan folat standar yaitu 10ng/mL, kemudian diukur kembali absorbansi. Cara ini disebut dengan uji *recovery* yang bertujuan memeriksa kedekatan hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya.

3.4.9.1.3 Linieritas sampel

Linearitas metode analisis menunjukkan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji secara proporsional dengan konsentrasi analat dalam sampel pada rentang tertentu.^{52,53,54} Linieritas sampel serum akan diukur dengan perwakilan 2 sampel serum pasien normal yang ditambahkan folat

standar yaitu 10ng/mL kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:2, 1:4, dan 1:8.

3.4.9.1.4 Uji Perbandingan teknik pengukuran folat serum

Setelah dilakukan optimasi teknik, pengujian folat dalam sampel serum menggunakan teknik *enzyme labeled protein-ligand binding assay* (prosedur 3.4.7.3) akan dibandingkan dengan teknik standar pengukuran folat yaitu ELISA kompetitif. (Prosedur 3.4.8)

3.5 Analisis Data

Analisis uji perbandingan dilakukan dengan uji parametrik menggunakan uji *independent sample t-test* yang masing-masing kelompok dianggap berbeda makna secara statistik ($P < 0,05$). Data yang tidak memenuhi syarat akan dianalisis *non-parametric* menggunakan uji *Mann-Whitney*.^{54,55,56} Data uji keterulangan diukur dari nilai CV yang tidak boleh melebihi 10%, dan analisis regresi data ketertiruan yang umumnya tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%.^{59,60}

Uji akurasi dilakukan secara duplo pada sampel bahan acuan. Akurasi dilihat dari nilai *recovery* yang diperoleh.⁵⁹ % *recovery* dihitung dengan rumus:

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{(\text{konsentrasi terukur} - \text{konsentrasi tanpa spike})}{\text{konsentrasi spiking}} \times 100\%$$

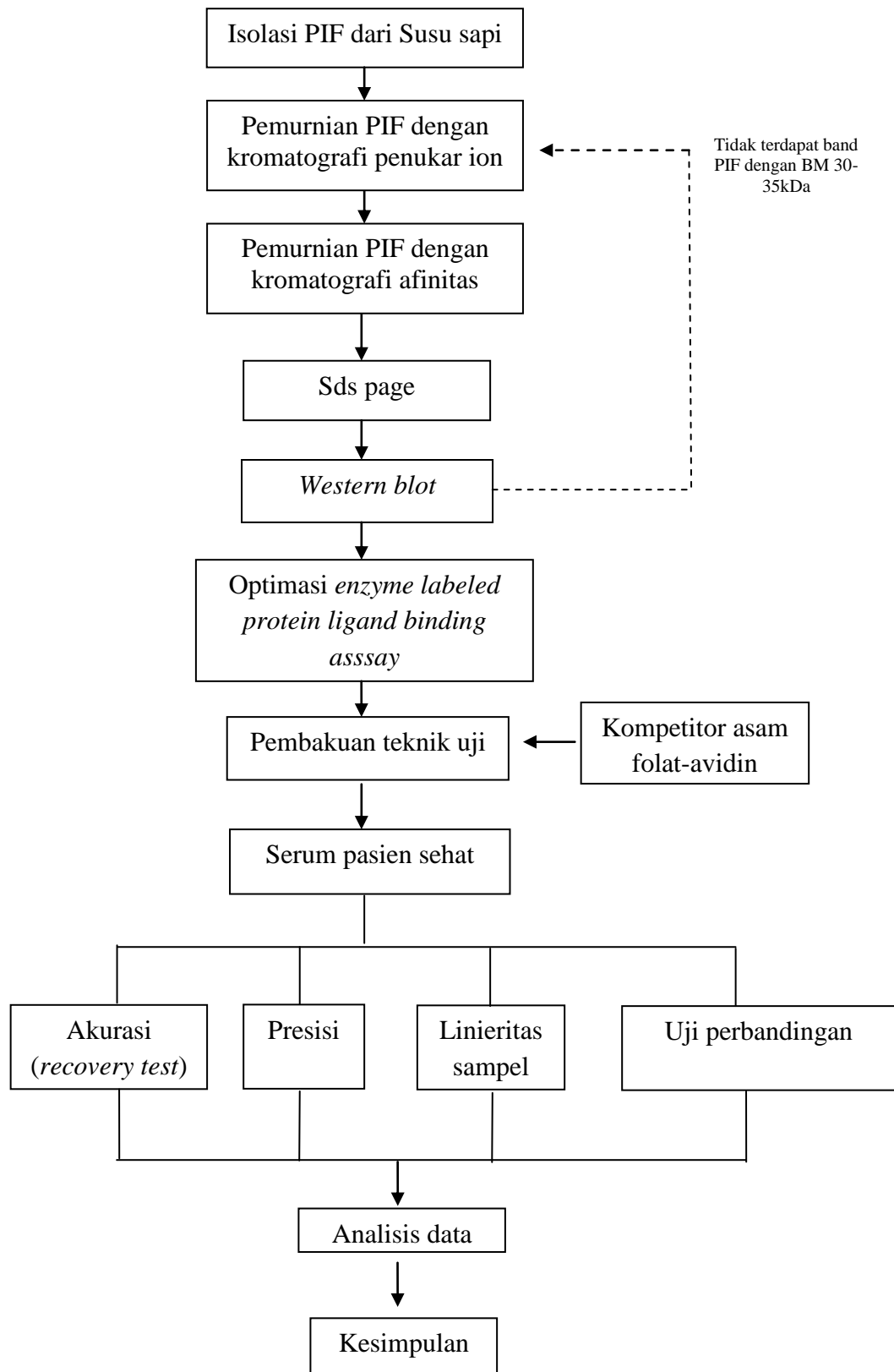
Uji linieritas dilakukan secara triplo. Rentang normal nilai % *recovery* yaitu 80% - 120. Penentuan formula linieritas sampel sebagai berikut:⁵⁹

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Nilai yang terukur}}{\text{Nilai yang diharapkan/pengenceran}} \times 100\%$$

3.6 Izin Etik

Penelitian ini menggunakan serum darah pasien normal. Penelitian ini telah mendapatkan Surat Keterangan Lolos Kaji Etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo dengan nomor : 790/UN2.F1/ETIK/2016, tanggal 19 September 2016.

3.7 Alur Penelitian



BAB IV

HASIL PENELITIAN

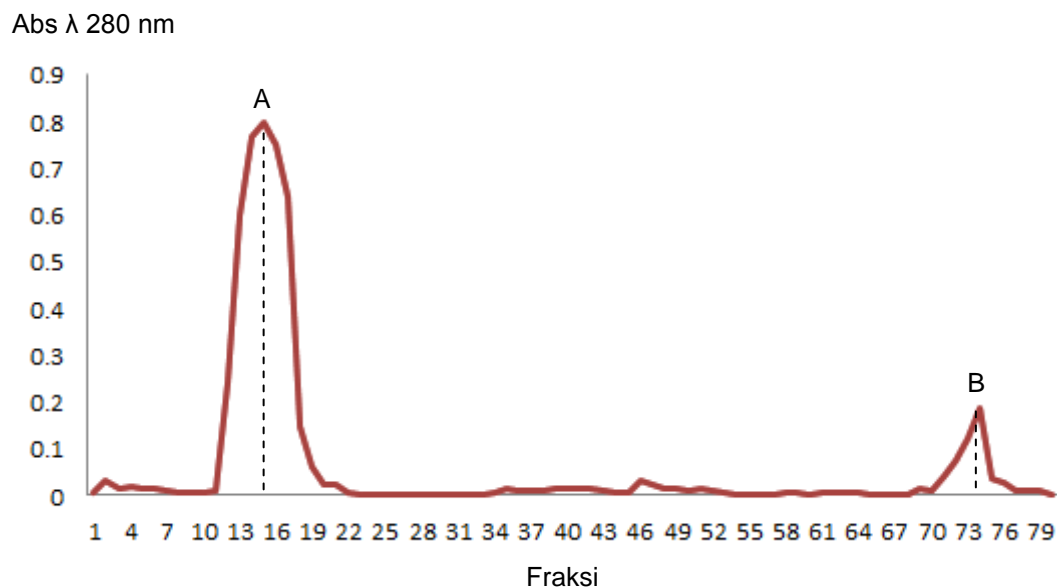
4.1 Isolasi Protein Ikat Folat

Protein ikat folat diisolasi dari susu sapi segar yang diperoleh dari peternakan susu sapi di daerah Jakarta Selatan. 2,5 liter susu sapi disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 35 menit untuk memisahkan krim (endapan) dan laktoserum (supernatan). Larutan HCl 1M ditambahkan pada laktoserum sampai pH turun menjadi 4,6 untuk memisahkan kasein (endapan) dan *whey* (supernatan). *Whey* susu yang didapatkan sebanyak 1700 mL. Kristal amonium sulfat ditambahkan pada *whey* sampai lewat jenuh melalui dua tahap. Tahap pertama, jumlah kristal amonium sulfat ditambahkan pada satu liter *whey* yaitu 250 gram. Setelah disaring, satu liter supernatan ditambahkan dengan ammonium sulfat sebanyak 190 gram. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 45 menit sehingga diperoleh presipitat dan supernatan.¹⁹

Supernatan dibuang dan presipitat disuspensikan dalam dapar fosfat pH 7,2 dengan menghasilkan volume total 1300 mL. Suspensi yang diperoleh kemudian didialisis menggunakan kantong selofan dan direndam dalam 500 mL buffer fosfat pH 7,2. Pemisahan protein susu dari ammonium sulfat memerlukan waktu 2-3 hari dengan cara mengganti buffer fosfat dua kali sehari. Dialisat yang diperoleh pada proses dialisis yaitu sebesar 1250 mL dan disimpan pada -20°C.

4.2 Pemisahan PIF dengan Kromatografi Penukar Ion (*Ion Exchange*)

Hasil dialisat kemudian dimurnikan dengan kromatografi DEAE selulosa, tiap fraksi ditampung sebanyak tiga mL dan dibaca pada panjang gelombang 280 nm. Elusi dihentikan dan diganti dengan konsentrasi dapar fosfat berikutnya bila absorbansi menunjukkan nilai 0 atau lebih kecil. Pola serapan tiap fraksi dapat dilihat pada gambar 12.



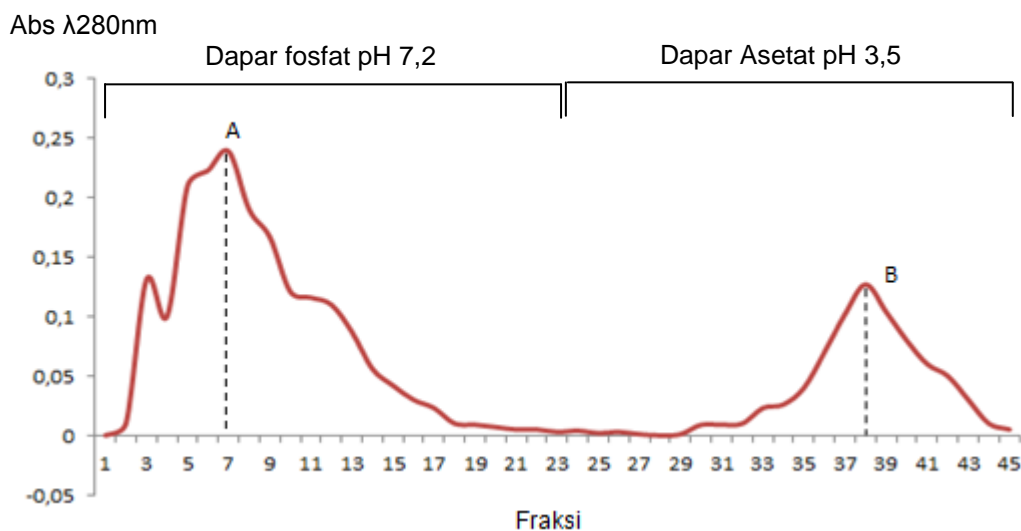
Gambar 12. Hasil fraksinasi kolom kromatografi DEAE-Selulosa. (A) protein bermuatan positif, (B) protein bermuatan negatif

Berdasarkan hasil gambar diatas (gambar 12) bahwa hasil elusi menunjukkan terdapat dua puncak. Puncak pertama memiliki absorbansi tertinggi yaitu pada fraksi 15 dengan nilai absorbansi sebesar 0,8 dan puncak kedua yaitu dari fraksi 72 sampai dengan 74. Fraksi-fraksi dari tiap puncak tersebut masing-masing dikumpulkan dan disimpan.

4.3 Pemisahan PIF menggunakan Kromatografi Afinitas

Hasil fraksi DEAE selulosa dimurnikan kembali untuk mendapatkan PIF murni dengan kromatografi afinitas. Preparasi awal kromatografi afinitas yaitu pada fraksi kromatografi DEAE selulosa dilakukan dengan penambahan larutan asam klorida 1M untuk memutus ikatan kimia antara folat dengan PIF susu dan mendegradasi folat menjadi PABA sehingga tidak dapat berikatan kembali dengan PIF. PIF dan protein lainnya dipisahkan dari molekul kecil seperti folat dengan cara dialisis menggunakan dapar fosfat pH 7.2.¹⁵

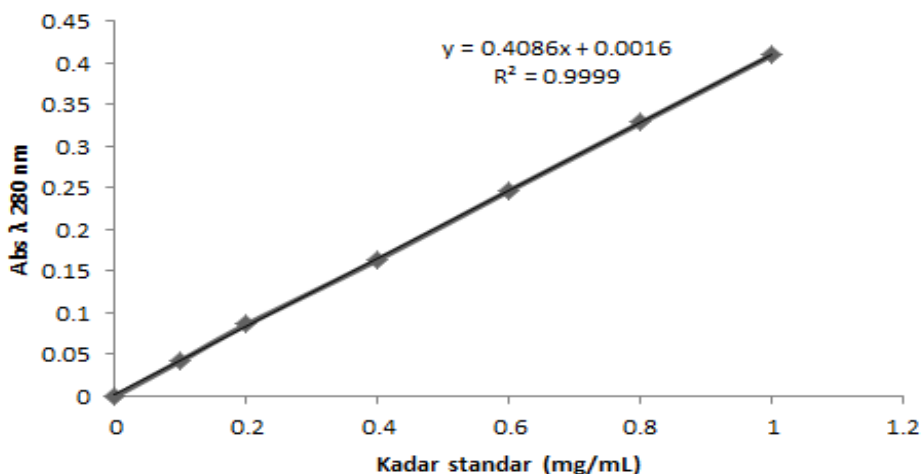
Hasil dialisat yang berisi PIF kemudian dicampurkan dengan agarose yang terikat dengan asam folat kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Proses elusi dilakukan dengan dapar fosfat pH 7,2 dan diteruskan dengan dapar asetat pH 3,5. Hasil pemisahan kromatografi dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Hasil fraksinasi kolom kromatografi afinitas. (a) Puncak ke-1 dari fraksi 7 dengan eluent dapar fosfat pH 7,2 dan (b) puncak ke-2 dengan *eluent* dapar natrium asetat pH 3,5. PIF terdapat pada puncak kedua.

4.4 Perhitungan Kadar Protein

Kadar protein hasil isolasi diukur dengan metode Christian-Wardburg menggunakan kurva standar BSA berbagai konsentrasi.



Gambar 14. Kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

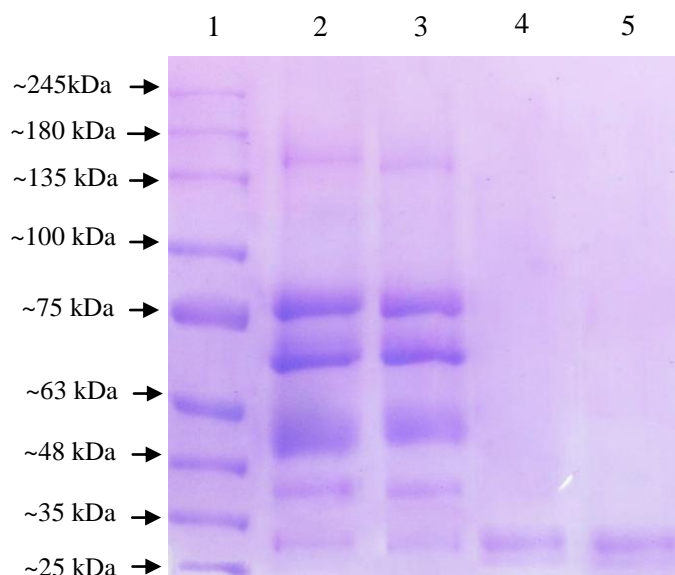
Dari kurva standar diperoleh persamaan garis lurus $y = 0,4086x + 0,0016$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) yaitu 0,999. Berdasarkan persamaan tersebut dapat dihitung konsentrasi protein yang dipisahkan tabel 5.

Tabel 5. Kadar protein hasil isolasi dan pemurnian susu sapi

Sampel	Kadar protein (mg/mL)
<i>Whey</i>	4,113
Hasil Dialisat	3,500
Hasil kromatografi penukar ion puncak II	0,730
Hasil kromatografi afinitas puncak II	0,300

4.5 Hasil Elektroforesis SDS-PAGE

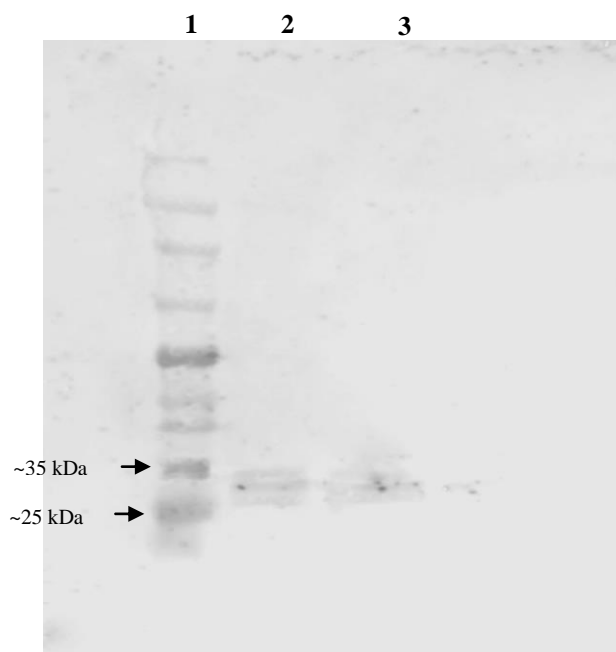
Uji konfirmasi hasil pemurnian protein ikat folat dari kromatografi afinitas dilakukan dengan elektroforesis SDS-PAGE 10% berdasarkan berat molekul. Hasil elektroforesis SDS-PAGE yang didapat dari dialisat menghasilkan banyak pita yaitu pada rentang ~135 sampai ~180 kDa, dan ~25 kDa sampai ~100 kDa, sedangkan eluat kromatografi afinitas menghasilkan dua pita dengan tebal pita yang kurang jelas pada rentang berat molekul ~25 kDa sampai ~35 kDa, sehingga untuk memastikan ada tidaknya protein selain PIF dengan memiliki berat molekul yang mirip dilakukan uji *western blot*.



Gambar 15. Hasil elektroforesis SDS-PAGE; (1) marker, (2) (3) Dialisat, (4) (5) Eluat kromatografi afinitas puncak kedua

4.6 Uji *Western Blot*

Berdasarkan hasil pengujian dari SDS-PAGE, dilakukan pengujian western blot untuk uji konfirmasi protein ikat folat dari fraksi kromatografi afinitas berdasarkan interaksi PIF dengan antibodi anti protein ikat folat dari susu sapi dalam kertas membran.



Gambar 16. Hasil deteksi protein ikat folat dengan teknik western blot ; (1) marker, (2)(3) Eluat kromatografi afinitas.

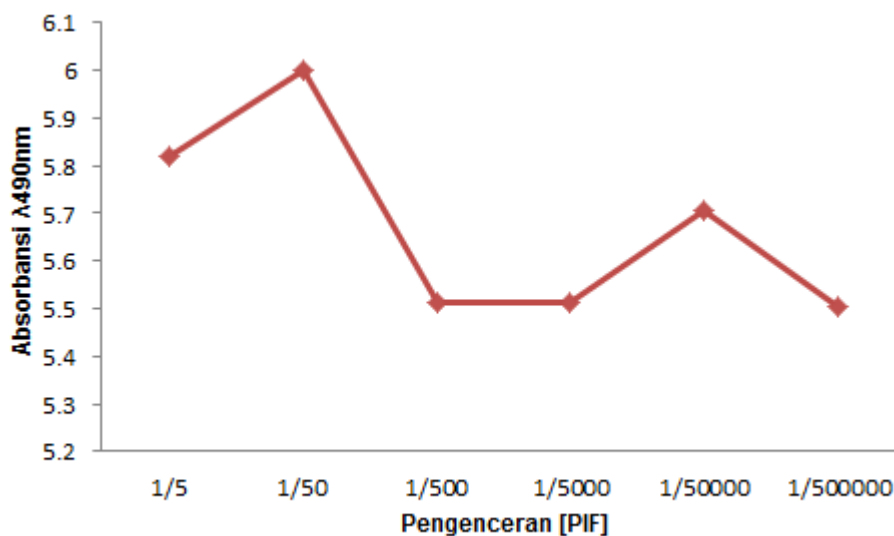
Hasil pengujian *western blot* dari eluat kromatografi menunjukkan bahwa protein ikat folat dari susu sapi memiliki lebih dari 1 satu pita pada rentang 25-35 kDa. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nygren, Sternesjo, dan Bjorck serta Iwai, Tani dan Fushika, T.⁵⁵⁻⁵⁶

4.7 Optimasi *Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay*

4.7.1 Titrasi protein ikat folat

Hasil pemurnian PIF dari kromatografi afinitas digunakan sebagai protein pengikat konjugat asam folat-avidin, kemudian direaksikan dengan *biotin peroxidase*. Substrat yang digunakan adalah OPD untuk membentuk kromogen berwarna kuning. Panjang gelombang maksimal yang digunakan pada *elisa reader* adalah 490 nm sesuai petunjuk. Prinsip pembacaan hasil yang diperoleh

yakni semakin pekat warna yang terbentuk, semakin banyak konjugat asam folat-avidin yang terikat pada PIF. Hasil pengujian dapat dilihat pada gambar 17.

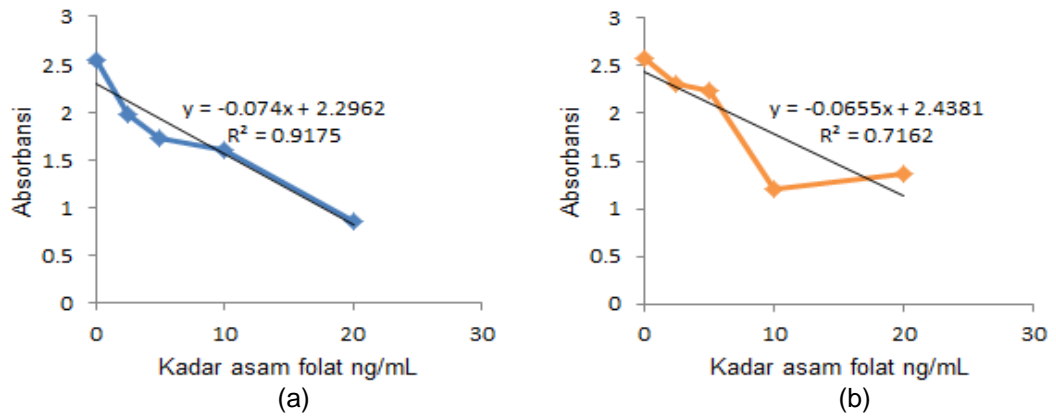


Gambar 17. Hasil serapan titrasi protein ikat folat menggunakan $1\mu\text{mol/L}$ konjugat asam folat-avidin pada panjang gelombang 490 nm

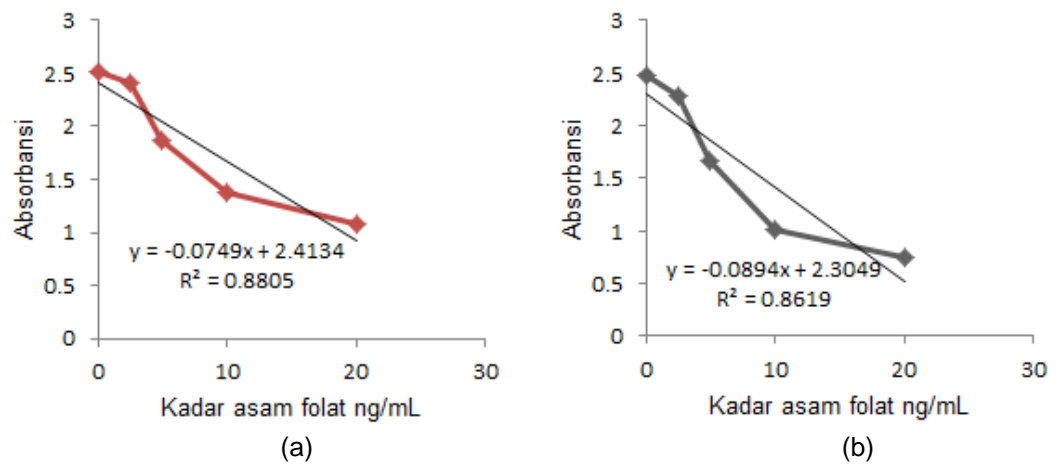
Berdasarkan gambar diatas, diketahui bahwa absorbansi tertinggi terjadi pada konsentrasi PIF dengan pengenceran 1/50. Konjugat asam folat avidin akan diencerkan dari $1\mu\text{mol/L}$ menjadi $1\mu\text{g/L}$ karena nilai absorbansi yang terlalu tinggi.

4.7.2 Uji kompetisi

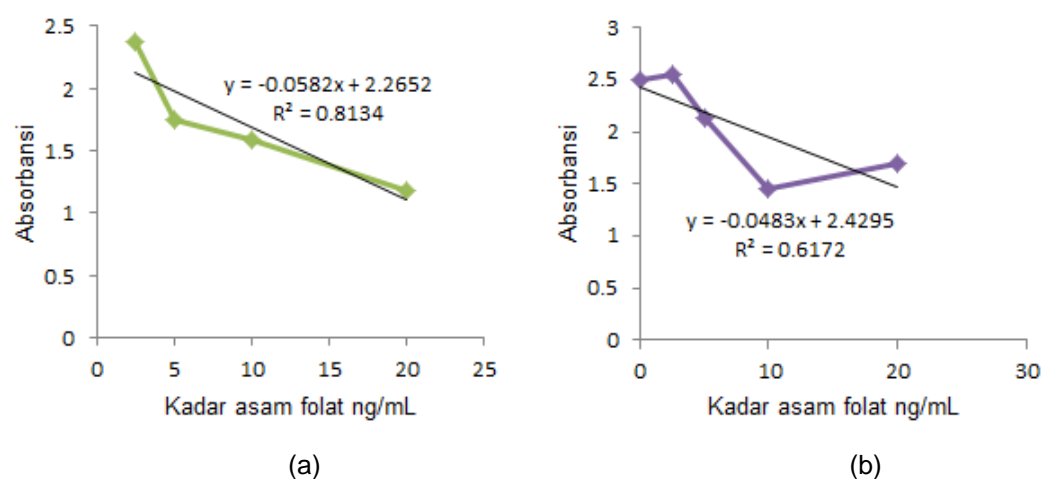
Pengukuran folat dengan teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* setara dengan pemeriksaan folat menggunakan teknik kompetitif ELISA. Kadar folat standar yang digunakan adalah 0; 2,5; 5; 10; 20 ng/mL. Konjugat folat-avidin sebagai kompetitor folat digunakan dengan kadar $1\mu\text{g/mL}$. Pengukuran ELISA kompetisi ini ditinjau dari semakin banyak folat standar yang diikat oleh PIF, maka semakin rendah absorbansinya sedangkan semakin sedikit folat standar yang diikat oleh PIF, maka semakin tinggi absorbansinya. Kadar PIF yang digunakan akan dilakukan dengan pengenceran berbeda yakni 1/10; 1/50; dan 1/100.



Gambar 18. Uji kompetisi dengan PIF 1/10 pada suhu kamar (a) dan PIF 1/10 pada suhu 37°C(b)



Gambar 19. Uji kompetisi dengan PIF 1/50 pada suhu kamar (a) dan PIF 1/50 pada suhu 37°C (b)



Gambar 20. Uji kompetisi dengan PIF 1/100 pada suhu kamar (a) dan PIF 1/100 pada suhu 37°C (b)

Koefisien determinasi ketiga (R^2) pengenceran PIF 1/10, 1/50 dan 1/100 ditunjukkan dari nilai terendah sampai tertinggi yaitu $1/100 < 1/50 < 1/10$. Pada suhu kamar, sedangkan nilai koefisien determinasi pada suhu 37°C memberikan nilai linieritas yang buruk. Dengan demikian, untuk pengukuran folat serum digunakan PIF dengan pengenceran 1/10 dalam suhu kamar sebagai standar folat karena mempunyai nilai linieritas tertinggi. (Gambar 18,19,20)

4.8 Uji Perbandingan dan Validitas Hasil Teknik Pengukuran

4.8.1 Uji Validitas

4.8.1.1 Presisi

Uji keterulangan (*repeatability*) teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* pada pengukuran folat serum dilakukan dalam hari yang sama. Hasil analisis keterulangan sebesar 9.8 % dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil uji keterulangan ELPLBA pada pengukuran folat

Sampel (N=20)	Hasil analisis (ng/mL)		CV (%)	Nilai batas %CV
	Rataan	SD		
Serum pasien	0,91305	0,084	9,8	<10%

Nilai *coefficient of variance* (CV) keterulangan dianggap baik apabila nilai CV kurang dari 10%. Dilain hal, uji ketertiruan (*reproducibility*) teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* pada pengukuran folat serum selang lima hari yang berbeda dengan perhitungan *T test independent* secara keseluruhan dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil uji ketertiruan ELPLBA pada pengukuran folat serum

Sampel	N	Tanggal pengerjaan	Rataan (ng/mL)	SD	P_{obs}	P value
Serum	20	5 Mei 2017	14,8044	2,79	0,00	<0,05
	20	9 Mei 2017	10,3075	3,82		

Analisis regresi data ketertiruan yang umumnya berbeda nyata dengan nilai $P_{value} < 0.05$ pada tingkat kepercayaan 95%, artinya sampel harus diperiksa segera.

4.8.1.2 Akurasi

Akurasi dari teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* pada pengukuran folat serum dilakukan dengan penambahan standar folat yang telah diketahui konsentrasinya (uji *recovery*). Hasil analisis terhadap sampel dengan menggunakan standard asam folat dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil uji akurasi pemeriksaan folat dengan spike asam folat

Sampel	Kadar folat tanpa spiked	Folat spiked (ng/mL)	Kadar folat diperoleh (ng/mL)	Recovery (%)	Recovery yang dapat diterima ^b (%)
Serum (2)	10,58	10,0	19,87 ^a	92,9	80-120
Serum (7)	11,30	10,0	19,47 ^a	81,7	

^apengulangan 5 kali

4.8.1.3 Linieritas

Linieritas sampel folat serum dilakukan dengan penambahan 10ng/mL standar folat (*spike*) kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:2, 1:4, dan 1:8. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Hasil linieritas ELPLBA pada pengukuran folat serum

Sampel	Pengenceran	Kadar folat (ng/mL)	Kadar folat setelah di-spiked	%recovery
Serum 2	0	10,57	19,85 ^a	92,8
	1:2		10,67 ^b	107
	1:4		5,97 ^b	120
	1:8		2,98 ^b	119
Serum 7	0	11,30	19,45 ^a	81,5
	1:2		11,61 ^b	119
	1:4		5,534 ^b	113
	1:8		2,4 ^b	123,58

^apengulangan 5 kali

^bpengulangan 3 kali

4.8.2 Uji perbandingan hasil teknik pengukuran

Uji perbandingan antara teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* dan ELISA menunjukkan bahwa kedua teknik tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%. Hal ini dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Hasil uji perbandingan ELPLBA dan ELISA folat serum

Sampel	N	Teknik	Rataan (ng/mL)	SD	P _{obs}	P value
Serum Manusia	20	ELPLBA	14,8044	2,79526	0,363	>0,05
	20	ELISA	13,8591	3,63765		

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 Isolasi PIF Susu Sapi Segar

Protein ikat folat diisolasi dari susu sapi bertujuan untuk memisahkan lemak dan kasein melalui proses sentrifugasi dan presipitasi sehingga dihasilkan bentuk *whey*. Komposisi *whey* mengandung banyak protein antara lain imunoglobulin, β -lactoglobulin, α -laktoalbumin, protein ikat folat, laktoferin, dsb.⁶⁰ Kemudian, garam amonium sulfat ditambahkan pada *whey* dengan tujuan untuk pengendapan protein-protein *whey* berdasarkan perbedaan kelarutan dalam konsentrasi garam tertentu.

Proses *salting out* dilakukan pada dua tahap yakni untuk mengendapkan kasein secara utuh dan protein *whey* dengan kelarutan yang lebih besar, sedangkan tahap kedua untuk mengendapkan protein *whey* dengan kelarutan lebih kecil. Presipitat tahap kedua yang dihasilkan kemudian disuspensikan dan didialisis menggunakan kantong selofan bertujuan untuk mengembalikan kondisi protein dalam keadaan bebas garam ammonium sulfat. Batas berat molekul membran (*molecular weight cut off*, MWCO) kantong selofan yang digunakan adalah 12 kDa artinya dapat menahan molekul dengan berat molekul minimal 12 kDa. Zat-zat seperti amonium sulfat dengan berat molekul 132,14 g/mol akan keluar dari kantong selofan melalui difusi sehingga suspensi terbebas dari garam amonium sulfat.^{19,20,60}

Dialisis dilakukan pada suhu 4°C agar protein yang berada di dalam membran tidak terdenaturasi selama proses dialisis berlangsung. Untuk mengetahui keberadaan ion garam di dalam membran, maka dilakukan uji sulfat. Uji sulfat dilakukan dengan penambahan 2 tetes BaCl₂ dalam suasana asam pada larutan buffer fosfat di luar membran dalam tabung reaksi. Ion Ba²⁺ akan bereaksi dengan ion sulfat (SO₄²⁻) membentuk endapan putih BaSO₄. Uji sulfat dihentikan dengan tidak terbentuk endapan putih pada hari kedua sehingga sudah dapat diasumsikan bahwa protein telah murni dan telah bebas dari ion-ion garam. Hasil dialisat sebesar 1250 mL disimpan pada -20°C.

5.2 Kromatografi Penukar Ion

Hasil dialisat selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi penukar ion. Pemurnian kromatografi penukar ion ini bertujuan untuk memisahkan protein ikat folat dengan protein lain berdasarkan perbedaan muatan. Laktoferin merupakan protein yang juga dapat mengikat asam folat pada pH 5.5. Protein ini bermuatan positif sedangkan protein ikat folat bermuatan negatif. Untuk memisahkan kedua protein tersebut digunakan fasa diam pada kolom yaitu resin DEAE selulosa. DEAE selulosa merupakan resin bermuatan positif, sehingga hanya dapat mengikat senyawa bermuatan negatif. Protein bermuatan positif seperti laktoferin akan terelusi diawal dari keluar kolom pada puncak pertama.^{19,61}

Protein ikat folat bermuatan negatif pada pH netral sehingga dapat diikat oleh DEAE selulosa. Untuk melepaskan protein bermuatan negatif yang terikat pada matriks DEAE selulosa digunakan larutan buffer fosfat pH 7,2 yang mengandung NaCl 0,1M. Larutan NaCl memiliki kekuatan ionik yang dapat bersaing dengan protein bermuatan negatif yang terikat dengan matriks DEAE selulosa. Hal ini menunjukkan NaCl dapat menukargantikan protein bermuatan negatif dari DEAE selulosa sehingga protein tersebut dapat terelusi keluar dari kolom. Protein puncak pertama merupakan protein bermuatan positif yang tidak berikatan dengan DEAE selulosa sehingga langsung keluar dari kolom dengan *eluent* dapar fosfat pH 7,2. Kemudian, Hasil elusi dengan dapar fosfat pH 7,2 yang mengandung NaCl 0,1M didapatkan protein puncak kedua. Fraksi eluat pada puncak kedua diduga sebagai protein bermuatan negatif yang mengandung protein ikat folat.⁶¹

5.3 Kromatografi Afinitas

Pemisahan PIF dari protein bermuatan negatif lainnya dapat menggunakan kromatografi afinitas. Prinsip pemisahan senyawa pada teknik ini berdasarkan interaksi spesifik antara antigen dan antibodi, enzim dengan substrat atau reseptor dengan ligan sehingga didapatkan senyawa murni yaitu PIF murni.

Kromatografi afinitas biasanya digunakan dalam pemurnian protein melalui interaksi spesifik protein dan *ligand*-nya. Fasa diam atau bahan pemisah yang diperlukan haruslah memiliki sifat sebagai berikut:

- a. Memiliki gugus fungsi atau bagian yang dapat terikat dengan senyawa khusus secara tidak tetap sehingga dapat keluar dari kolom kromatografi pada kondisi tertentu.
- b. Stabil selama pengikatan spesifik dengan senyawa khusus.
- c. Dapat dielusi atau dialiri dengan baik.³⁸

Pemurnian secara utuh protein ikat folat dari susu sapi segar akan dilakukan dengan kromatografi afinitas. Fasa diam yang akan digunakan adalah agarosa yang terikat silang dengan asam folat. *Crosslinker* dalam pengikatan agarosa-asam folat yang digunakan yaitu karbodiimida. Karbodiimida akan menghubungkan bagian gugus amina dari agarosa dan gugus karboksil dari asam folat.⁶⁰ Afinitas protein ikat folat terhadap asam folat sangat tinggi sehingga dapat dijadikan bagian dari fasa diam.

Fasa diam yang digunakan berupa agarose yang terikat asam folat dengan konsentrasi 6,8 μmol folat tiap 1 mL gel agarose. Elusi menggunakan 2 jenis dapar yaitu dapar pH 7,2 untuk elusi protein yang tidak terikat dengan resin pada tahap pertama dan dapar asetat pH 3,5 digunakan pada tahap kedua untuk mengelusi PIF. Destabilisasi ikatan antara PIF dan folat dapat terjadi pada $\text{pH} < 5$.²

Hasil elusi pada kromatografi afinitas menunjukkan dua puncak yaitu puncak ke-1, merupakan protein yang tidak terikat dengan fasa diam sedangkan puncak ke-2 merupakan protein yang mengikat dengan fasa diam. Puncak ke-2 diyakini sebagai PIF murni.⁴ Puncak kedua pada kromatografi afinitas ini dianggap sebagai puncak berekor karena bentuk puncak yang tidak beraturan. Puncak berekor menunjukkan kolom kurang efisien dalam proses elusi dapar asetat sehingga sebagian PIF tidak cukup terlepas dari asam folat-agarosa.⁵³

5.4 Uji Konfirmasi SDS-PAGE dan Western blot

Hasil pemurnian PIF dari kromatografi afinitas dapat dikonfirmasi dengan dua tahap yaitu elektroforesis SDS-PAGE dan *western blot*. Prinsip kerja SDS-PAGE yaitu pemisahan campuran protein berdasarkan berat molekulnya. Proses ini bergantung pada migrasi molekul bermuatan dalam gel yang dipicu oleh suatu medan listrik. Preparasi awal protein dari fraksi kromatografi afinitas didenaturasi protein dengan cara pemanasan dan penambahan senyawa pereduksi (merkaptotanol). Protein juga dibuat bermuatan negatif dengan SDS sehingga pemisahan protein dalam jendalan (gel) poliakrilamid dapat terjadi lebih mudah berdasarkan migrasi protein muatan negatif ke kutub positif.⁵⁴ Hasil SDS-PAGE pada gambar 13 menunjukkan adanya dua pita dari fraksi kromatografi afinitas pada rentang berat molekul 25.000 dalton – 35.000 dalton sehingga diduga adanya protein lain yang berat molekulnya hampir mirip dengan PIF.²⁰ Oleh karena itu, untuk memastikan apakah protein yang dipurifikasi adalah PIF, maka dilakukan uji *western blot* ditahap berikutnya.

Hasil dari elektroforesis gel kemudian di transferkan pada kertas nitroselulosa. Teknik blotting dibagi menjadi dua jenis yaitu *semidry transfer* dan *wet transfer*. Transfer *semidry* merupakan teknik blotting dengan kompetensi lebih mudah, tidak butuh preaksi yang banyak dan hasil transfer cukup sensitif. Sedangkan *wet transfer* (*tank blotting*) memiliki kelebihan hasil transfer gel ke kertas jauh lebih sensitif dari pada *semidry* tetapi membutuhkan waktu yang lama dalam proses transfer dan pereaksi yang banyak.⁵² Dalam penelitian ini peneliti menggunakan *wet transfer* karena hasil yang diharapkan lebih bagus. Setelah proses transfer protein dari gel ke kertas, diberikan antibodi protein ikat folat untuk konfirmasi berlanjut terkait terdapat protein lain yang mirip dengan PIF pada berat molekul yang sama. Antibodi anti PIF yang digunakan berasal dari sapi. Antibodi ini hanya mampu mengenali secara spesifik dengan PIF dari sapi. Hasil yang diperoleh pada gambar 14 sama dengan hasil dari penelitian Iwai, Tani dan Fushika yang menyatakan terdapat pita yang beragam pada daerah berat molekul 25-35 kDa. PIF pada awalnya memiliki berat molekul $\pm 25,700$ Da. Protein ini juga memiliki dua situs *N-linked glycan* sehingga

karena adanya perbedaan glikosilasi berat molekul PIF menjadi sekitar 30,000-35,000 dalton.⁵⁵⁻⁵⁷

5.5 Optimasi Teknik *Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay*

Optimasi teknik ELPLBA dilakukan menggunakan PIF dari fraksi kromatografi afinitas untuk mengikat folat serupa dengan cara kompetitif ELISA. Hal ini berdasarkan kemampuan PIF yang hanya dapat mengikat satu gugus pteridin/pterin folat sehingga dapat digunakan pada prinsip kompetitif ELISA dalam uji coba pengukuran folat.¹⁹

Tahap awal yang dilakukan yaitu pengujian PIF yang diencerkan guna mencari nilai absorbansi tertinggi. Kadar PIF yang digunakan yaitu pengenceran 1/5, 1/50, 1/500, 1/5000, 1/50000 dan 1/500000. Serapan cahaya pada pengenceran PIF 1/50000 seharusnya tidak lebih tinggi jika dibandingkan dengan pengenceran PIF 1/5000 dan 1/500000. Hal ini mungkin terjadi karena kesalahan peneliti dalam hal pemipetan sehingga mempengaruhi nilai serapan cahayanya. Secara umum nilai serapan cahaya tertinggi pada pengenceran PIF yaitu pada pengenceran 1/50. (Gambar 17). Untuk mengurangi nilai serapan yang tinggi > 3, maka kompetitor folat diencerkan dari 1 μ mol/L menjadi 1 μ g/L.(Gambar 17) Setelah itu, uji kompetisi dilakukan untuk mencari konsentrasi terendah yang dapat dibaca secara spektrofotometri dengan nilai koefisien determinasi (R^2) kadar protein ikat folat yang paling tinggi.¹⁹ Pengenceran PIF 1/10, 1/50, dan 1/100 dilakukan untuk penghematan PIF. Linieritas yang baik diantara ketiga pengenceran tersebut dalam pengukuran folat adalah 1/10 dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,917.

5.6 Uji Validitas dan Perbandingan Teknik *Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay*

5.6.1. Uji Validitas Teknik

Validitas teknik yang digunakan pada penelitian ini yaitu uji presisi (ketertiruan, keterulangan), akurasi, dan linieritas. Uji presisi merujuk pada kedekatan antara hasil uji sampel yang dilakukan secara berurutan dengan menggunakan prosedur analisis yang sama. **Pengujian presisi** dibagi menjadi dua

cara yaitu uji keterulangan (*repeatability*) dan uji ketertiruan (*reproducibility*). **Uji keterulangan** bertujuan untuk meninjau adanya keseragaman hasil pada kondisi normal. Acuan keterulangan dapat dilihat dari nilai memenuhi syarat jika memiliki nilai % RSD (*relative standard deviation*) atau koefisien variasi yang lebih kecil dari 10%.⁶⁵ Pengukuran sampel dilakukan secara duplo. Berdasarkan hasil penelitian dari tabel 6 diperoleh nilai % RSD untuk uji keterulangan sebesar 9,84 %. Nilai tersebut memenuhi persyaratan sehingga menunjukkan adanya keseragaman nilai dari analit yang dilakukan secara berulang pada kondisi yang sama dengan menggunakan prosedur teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay*.^{59,60}

Uji ketertiruan (*reproducibility*) bertujuan untuk meninjau adanya penyimpangan/bias dari sampel yang sama pada hari yang berbeda. Uji ini dilakukan pada lab yang sama dengan selang waktu yang berbeda. Perbedaan waktu yang dipakai yaitu 5 hari karena hari pertama dilakukan pada hari jumat tanggal 5 mei 2017 dan selisih hari berikutnya dilakukan tanggal 9 mei 2017 (satu hari sebelumnya digunakan untuk *coating* PIF pada mikroplat). Peninjauan hasil kurva standar yang digunakan pada tanggal 9 mei 2017 menunjukkan nilai koefisien determinasi sebesar 0.9789 dengan 4 standar folat pada pengenceran bertingkat, masih dapat digunakan karena linieritas kurva standar dengan jumlah deret standar (n) 4 nilai koefisien determinasi yang diperoleh minimal 0,811.⁶⁴⁻⁶⁶

Hasil uji ketertiruan menggunakan uji *independent t test* karena untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan dari teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* pada kondisi yang berbeda (hari berbeda). Hasil *independent t test* menunjukkan analisis yang dilakukan pada 5 Mei 2017 untuk 20 serum berbeda nyata dengan analisis yang dilakukan pada 9 Mei 2017. Nilai yang berbeda nyata ini mengindikasikan ketertiruan yang buruk pada pengukuran folat serum yang disimpan selang 5 lima hari (Tabel 7). Pengukuran folat serum secara umum tidak stabil terhadap waktu lama penyimpanan karena mudah terdegradasi menjadi *p-aminobenzoylglutamic acid* (PABG) sehingga mempengaruhi pengukuran teknik itu sendiri. Eugène H.J.M. Jansen dkk (2012) menjelaskan

bahwa penyimpanan folat selama 4 hari menunjukkan penurunan kestabilan hingga mencapai 60% dan hari berikutnya kestabilan menurun hingga 83%.⁶⁶

Setelah uji presisi, dilakukan pengujian ketepatan (kecermatan) teknik yang biasa disebut **uji akurasi**. Suatu pengukuran dikatakan tepat/cermat yaitu sebanding dengan nilai sebenarnya (*true value*). Uji akurasi diketahui dari nilai *recovery* dengan adanya penambahan asam folat yang diketahui kadarnya pada sampel. Nilai *recovery* dibawah 80% atau diatas 120% menunjukkan kecenderungan adanya kesalahan acak pada hasil teknik. Uji *recovery* dengan penambahan asam folat (*spiked*) untuk sampel serum pertama (serum nomor 2) pada Tabel 8 menunjukkan persen *recovery* sebesar 92.9% dan sampel serum kedua (serum nomor 7) didapatkan persen *recovery* sebesar 81.7%. Hasil yang didapatkan pada uji akurasi yaitu serum 2 dan 7 menunjukkan tidak ada bias hasil yang terlihat pada teknik ELPLBA setelah di lakukan *recovery*.^{59,60}

Uji linieritas sampel bertujuan untuk memprediksikan sejauh mana serum yang telah ditambahkan standar folat kemudian diencerkan secara bertingkat masih dalam kisaran kurva standar dengan hasil pengenceran yang linier. Hasil linieritas sampel serum nomor 2 pada tabel 9 menunjukkan persen *recovery* untuk pengenceran 1:2, 1:4, 1:8 sebesar 107.3%, 120%, dan 119%. sedangkan uji linieritas sampel serum nomor 7 pada tabel 10 menunjukkan persen *recovery* untuk pengenceran 1:2, 1:4, 1:8 sebesar 119%, 113%, dan 123.58%. Berdasarkan hasil linieritas menunjukkan secara umum respon serum setelah ditambahkan folat standar (10ng/ml) dan diencerkan secara bertingkat pada serum nomor 2 masih menghasilkan respon yang proporsional pada kisaran atau rentang kurva standar dengan rentang nilai *recovery* 80%-120%.⁵⁸ Namun, nilai *recovery* serum nomor 7 pada pengenceran 1:8 tidak masuk kedalam batas rentang *recovery* sehingga belum menghasilkan respon pengenceran yang sesuai pada rentang kurva standar. (tabel 9) Hal ini mungkin disebabkan oleh terdapat komponen matriks (protein serum) yang mengganggu deteksi folat serum pada pengenceran 1:8 atau dari kesalahan peneliti dalam hal pipetasi tiap pengenceran sehingga hasil yang didapatkan tidak akurat.⁶⁰⁻⁶⁵

5.6.2. Uji Perbandingan Teknik Pengukuran

Uji perbandingan teknik bertujuan untuk menjamin bahwa hasil yang diperoleh sesuai dan dapat diterima layaknya teknik standar pengukuran folat serum yang biasa digunakan oleh lab klinis atau sejenisnya. ELISA kompetitif dalam penelitian ini digunakan sebagai pembandingan teknik ELPLBA pada pengukuran folat serum. Prinsip uji kompetitif ELISA, yaitu kompetisi antigen (folat) dan kompetitornya folat (konjugat antigen-enzim) untuk mengikat antibodi di permukaan padat (mikroplat). Reaksi yang terjadi membentuk dua fase yaitu Fase kompetitor antigen atau kompetitor yang terikat dengan antibodi membentuk kompleks (fase terikat), dan fase antigen atau kompetitor yang tidak terikat dengan antibodi (fase bebas). Dua fase tersebut dapat dipisahkan dengan cara membuang dan mencuci sumur plate (*well*). Jumlah kompetitor yang terikat akan ditentukan dengan penambahan substrat dan pengukuran spektrofotometri dengan produk berwarna. Semakin tinggi nilai serapannya maka konsentrasi antigen dalam bahan uji lebih sedikit daripada konsentrasi kompetitor antigen, atau semakin rendah nilai serapannya maka konsentrasi antigen dalam bahan uji lebih besar daripada konsentrasi kompetitor antigen.^{2,19}

Dengan kata lain, teknik ELISA dan *enzyme labeled protein ligand binding assay* (ELPLBA) ini memiliki prinsip yang sama, tetapi sedikit berbeda pada protein pengikatnya yaitu ELISA menggunakan antibodi sedangkan ELPLBA menggunakan protein ikat folat. Peninjauan hasil kurva standar yang digunakan menunjukkan nilai koefisien determinasi sebesar 0.9753 dengan deret 4 standar folat dengan kadar bertingkat. Menurut Kantasubrata (2008), untuk linieritas kurva standar dengan jumlah deret standar (n) 4 nilai koefisien determinasi minimal 0,811. Hal ini berarti kurva standar folat dalam penentuan kadar folat masih dapat digunakan.^{62,63}

Kemudian, perbandingan teknik pengukuran antara teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* dan teknik ELISA folat menunjukkan hasil tidak ada perbedaan yang nyata menurut uji statistik yang didasari dari nilai kemaknaan $P > 0,05$ sehingga H_0 gagal ditolak pada tabel 10. Hal ini menunjukkan hasil yang

diperoleh dari teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* tidak bertentangan dengan hasil yang diperoleh teknik ELISA kompetitif dalam pengukuran folat serum sehingga hasil hipotesis gagal ditolak.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Pengukuran kadar folat menggunakan teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* dapat diterima layaknya teknik ELISA kompetitif pada sampel serum darah pasien normal dengan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji *T test independent* pada tingkat kepercayaan 95% dan uji validitas teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* menunjukkan nilai yang cukup valid berdasarkan aspek akurasi, presisi, dan linieritas.

6.2 Saran

Penelitian ini hanya diaplikasikan pada serum normal pasien, sehingga perlu dikembangkan dan diujicobakan kembali pada serum pasien yang mengalami defisiensi folat. Perhatian lebih perlu juga diberikan bukan hanya pada serum melainkan sel darah merah atau pun jaringan tertentu. Kompetitor folat perlu dimurnikan menggunakan kromatografi gel. Perlakuan terhadap sampel untuk memisahkan folat dari zat lain perlu dilakukan guna mengurangi interferensi hasil khususnya pada peninjauan nilai akurasi dan linieritas misalnya menggunakan larutan TCA dalam mengendapkan protein atau menggunakan merkaptoetanol untuk mendenaturasi protein dari sampel. Pengujian pada *expired date* PIF pada penyimpanan suhu -20°C dan -80°C . Penggunaan PIF dari susu kambing juga perlu dipertimbangkan dalam pengukuran folat sehingga dapat dibandingkan dari teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* mana hasil yang lebih baik menggunakan PIF dari susu sapi atau PIF dari susu kambing.

DAFTAR PUSTAKA

1. Iyer R, Tomar SK. Folate: a functional food constituent. *Journal of Food Science* 74. 2009: 114–22
2. Ball, GFM. *Vitamins In Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability*. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL. 2006: 231-53
3. Bailey, LB. *Folate in Health and Disease*. Edisi Kedua. CRC Press. Boca roton. 2010: 26-8.
4. Pfeiffer CM, Fazili Z, McCoy L, Zhang M, Gunter EW. Determination of Folate Vitamers in Human Serum by Stable-Isotope-Dilution Tandem Mass Spectrometry and Comparison with Radioassay and Microbiologic Assay. *Clinical Chemistry*. 2004; 50: 429-31.
5. Wen SW, Guo Y, Rodger M, White RR, Yang Q, Smith NG, Perkins LS,⁸ and Walker MC. Folic Acid Supplementation in Pregnancy and the Risk of Pre-Eclampsia—A Cohort Study. *PLoS One*. 2016; 11(2)
6. Ibrahim W, Tousson E, El-Masry T, Arafa N, Akela M. The effect of folic acid as an antioxidant on the hypothalamic monoamines in experimentally induced hypothyroid rat. *Toxicol Ind Health*. 2012; 28: 253-61.
7. Depkes. Tabel angka kecukupan gizi 2013 bagi orang Indonesia. [tanggal akses 21 april 2017], didapat dari : <http://gizi.depkes.go.id/download/Kebijakan%20Gizi/Tabel%20AKG.pdf>.
8. World Health Organization. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations.[internet]. 2012. [tanggal akses 2 juli 2016], didapat dari: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO_NMH_NHD_EPG_12.1_eng.pdf.
9. Iyer R, Tomar SK. Determination of folate/folic acid level in milk by microbiological assay, immuno assay and high performance liquid chromatography. *Dairy research*. 2013; 80 (2) : 233-7.
10. Gregory, JF. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Adv. Food Nutr Res*. 1989; 33: 1-101
11. Shane B, Tamura T, Stokstad ELR. Folate assay: a comparison of radio-assay and microbiological methods. *Clin Chim Acta*. 1980;100:13–9.
12. Lequin, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry*. 2005; 51(12): 2415-18.
13. Crowther JR. *The ELISA guide book methods in molecular biology*. The International Atomic Energy Agency. Humana Press Inc Totawa, New Jersey. 2001.
14. Sadikin M, Jusman SWA, Priyanti AR. Pengembangan perangkat pereaksi untuk pengukuran kadar asam folat dalam serum: isolasi dan purifikasi protein ikat folat (PIF) dari susu sapi. Laporan penelitian FKUI. 2000: 1-8.
15. Salter DN, Scott KJ, Slade H, Andrews P. The preparation and properties of folate-binding protein from cow's milk. *Biochem J*. 1981; 193:469-76.
16. Balbol LN, Jagerstad M. Folate-binding protein in milk: a review of biochemistry, physiology, and analytical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011; 52: 411-2.
17. Wigertz K, Hansen SI, Hoier-Madsen M, Holm J, dan Jagertad M. Effect of milk processing on the concentration of folate-binding protein (FBP), folate-binding capacity and retention of 5-methyltetrahydrofolate. *Int J Food Sci. Nutr*. 1996; 47: 315-22.
18. Svendsen IB, Hansen SI, Holm J, Lyngbye J. Amino acid sequence homology between human and bovine low molecular weight folate binding protein isolated from milk. *Carls berg Res Commun*. 1982; 47: 371–6.
19. Mardiana. Penggunaan protein ikat folat (PIF) dari susu sapi untuk mengukur kadar folat serum [Thesis]. Jakarta. 2005: Universitas Indonesia.
20. Subandrate, Gunarti DR, Sadikin M. Properties of Folate Binding Protein Purified From Cow's Milk. *Hayati J of Biosciences*. 2012; 19(3) : 105-109.

21. Vahteristo L, Lehtikainen K, Ollilainen V, dan Varo P. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland, *Food Chem.* 1997; 59: 589-97.
22. Subar AF, Block G, dan James LD. Folate intake and food sources in the US population. *Am J Clin Nutr.* 1989; 50: 508.
23. Murray RK, Daryl KG, dan Victor WR. *Biokimia Harper (Harper's Illustrated Biochemistry)* Edisi 27. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. 2006 : 515-7.
24. Hoffbrand AV. History of folic acid. *British J Haematology.* 2001; 113 : 579-582.
25. Blakley RL. Tetrahydropteroyl glutamic acid in serine synthesis and degradation. *Nature.* 1954; 173: 729.
26. Gropper SS, Smith LJ, Groff LJ. *Advanced nutrition and human metabolism* fifth edition. Wadsworth Publishing. 2008; 204-355.
27. Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, dan Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free radical Biol. Med.* 2001;30: 1390-99
28. Rezk BM, Haenen GRMM, Van der vijgh WJF dan Bast A. Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity: identification of the antioxidant pharmacophore. *FEBS Let.* 2003; 555: 601-605.
29. Moat JS, Doshi SN, Lang D, McDowell IFW, Lewis MJ, Goodfellow, Jonathan. Treatment of coronary heart disease with folic acid: is there a future?. *American J. Physiology.* 2004; 287:1522-1539
30. Ghitis J. The folate binding in milk. *Am. J Clin Nutr.* 1967; 20: 1-4.
31. Ford JE, Salter DN, dan Scott KJ. The folate binding protein in milk. *J Dairy Res.* 1969; 36:435-446.
32. Ford JE. Some Observation on possible nutritional significance of vitamin B₁₂ and folate binding protein in milk. *Br J Nutr.* 1974; 31: 243-57.
33. Monaco HL. crystal structure of chicken riboflavin-binding protein. *EMBO J.* 1997; 16: 1475-83.
34. Zheng DB, Lim HM., Pene, J.J., and White, H.B. Chicken riboflavin-binding protein – cDNA sequence and homology with milk folate-binding protein. *J Biol Chem.* 1998; 263:11125-29.
35. Nixon PF, Jones M, dan Winzor DJ. Quantitative description of the interaction between folate and the folate-binding protein from cow's milk. *Biochem J.* 2004; 382: 215-21.
36. Jones M dan Nixon PF. Tetrahydrofolates are greatly stabilized by binding to bovine milk folate binding protein. *J Nutr.* 2002; 132: 2690-94.
37. Ford JE, Law BA, Marshal V, dan Reiter B. Influence of heat treatment of human milk on some of its protective constituents. *J Prediatr.* 1977; 90: 29-35.
38. Hansen SI, Holm J, Lyngbye J. Cooperative binding of folate to a protein isolated from cow's *whey*. *Biochim Biophys Acta.* 1978; 535(2):309–18.
39. Hansen SI, Holm J, Lyngbye J. Change in binding properties of folate-binding protein in cow's *whey* due to removal of a cofactor during affinity chromatographic purification. *Biochim Biophys Acta.* 1979; 579(2): 479–482.
40. Sudarmadji S. *Teknik Analisa Biokimiawi.* Liberty. Yogyakarta. 1996. 134-141
41. Kelly P, McPartlin J, Scott J. A combined high performance liquid chromatographic microbiological assay for serum folic acid. *Anal Biochem.* 1996; 238: 179-183.
42. Rothenberg SP, Da costa M, Lawson J, Rosenberg Z. The determination of erythrocyte folate concentrations using a two-phase ligand binding radioimmunoassay. *Blood.* 1974; 43: 437–43
43. Waxman S, Schreiber C. Measurement of serum folate levels and serum folic acid binding protein by 3H-PGA radioassay. *Blood.* 1973; 42: 281–90.
44. Waxman S, Schreiber C, dan Herbert V. Radioisotopic assay for measurement of serum folate levels. *Blood.* 1971; 38:219-28.
45. Givas, JK dan Gutcho S. pH dependence of the binding of folates to milk binder in radioassay of folates. *Clin Chem.* 1975; 21: 427-8.
46. Pfeiffer CM, Fazili Z, Zhung M. Folate analytical methodology. In: Bailey LB (ed.) *Folate in health and diseases*, 2nd ed. Boca Raton. CRC Press, 2010:517-74.

47. Arkbage K, Verwei M, Havenaar R, dan Witthoft C. Bioaccessibility of folic acid and (6S)-5-methyltetrahydrofolate decreases after addition of folate-binding protein to yoghurt as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *J Nutr.* 2003a; 133: 3678–3683.
48. Verwei M, Arkbage K, Havenaar R, Van den Berg H, Witthoft C, dan Schaafsma G. Folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastro-intestinal model. *J Nutr.* 2003; 133: 2377–83.
49. Gunarti DR. Analisis protein ikat tiamin bekatul kacang hijau sebagai usaha pengembangan teknik pengukuran tiamin dalam cairan biologis [Disertasi]. Jakarta. 2016: Universitas Indonesia.
50. Salter DN, Ford JE, Scott KJ, dan Anderson, P. Isolation of folate binding protein from cows milk by the use of affinity chromatography. *Fe Eur Biochem Soc Lett.* 1972; 20: 302-6.
51. Treloar T, Grieve PA, Nixon PF. One-step affinity purification of folate-binding protein, a minor whey protein. *Australian J of Dairy Technology.* *Australian J Dairy Technology.* 2000; 55(2) : 96-96.
52. Selhub J, Ahmad O, dan Rosenberg IH. Preparation and use of affinity columns with bovine milk folate-binding protein covalently linked to Sepharose 4B. *Methods Enzymol.* 1980; 66: 686-690.
53. Wahab MF, Anderson JK, Abdelrady M, dan Lucy CA. Peak distortion effects in analytical ion chromatography. *Nal Chem.* 2014; 86 (1):559–566
54. Osborne C dan Brooks SA. SDS-PAGE and western blotting to detect proteins and glycoproteins of interest in breast cancer research. In *Methods in Molecular Medicine, Breast Cancer Research Protocols.* 2006; 120:217-220.
55. Iwai K, Tani M dan Fushika T. Electrophoretic and immunological properties of folate-binding protein isolated from bovine milk. *Agric Biol Chem.* 1983; 47: 1523–30.
56. Nygren L, Sternesjo A, Bjorck L. Determination of folate-binding proteins from milk by optical biosensor analysis. *International Dairy J.* 2003; 13: 283–90.
57. Hong BS, Rashid MB, Santiago-Vazquez LZ. *Method of biotechnology.* John Wiley & sons. 2016: 199-200.
58. Nakajima N, Ikada Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chem.* 1995; 6:123-130.
59. Thomsson O, Ström-Holst B, Sjunnesson Y, Bergqvist AS. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay developed for measuring cortisol concentration in human saliva and serum for its applicability to analyze cortisol in pig saliva. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2014. 56(1): 55
60. Andreasson U, Liaudet AP, Van wallwijk vandoorn LJC, Ienow K, Chiasserini D, Engelborghs S, et al. A practical guide to immunoassay method validation. *Front Neurol.* 2015; 6: 93-101
61. O'Riordan N, Kane M, Joshi L dan Hisckey RM. Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology J.* 2014; 24: 220-36.
62. Tavares GM, Croguennec T, Lê S, Lerideau O, Hamon P, Carvalho AF, dan Bouhallab S. Binding of folic acid induces specific self-aggregation of lactoferrin: thermodynamic characterization. *Langmuir.* 2015; 31: 12481–12488.
63. Kantasubrata, J. *Validasi metode.* Bandung: Pusat Penelitian LIPI. 2008.
64. Riyanto. *Validasi & verifikasi metode uji.* Depublish. Yogyakarta. 2014. 32-33.
65. ICH Guideline Q2(R1). *Validation of analytical procedures: text and methodology.* International conference on harmonization. 2005. [tanggal akses 5 Mei 2017], didapat dari: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>.
66. Jansen EHJM, Beekhof P, Cremers JWJM, dan Schenk E. Long-term (in)stability of folate and vitamin B-12 in human serum. 2012; 50: 1761-63

LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan massa resin DEAE-selulosa

Pengemasan kolom dilakukan dengan menghitung volume gel dan kapasitas volume Q

Formula :

$$\begin{aligned} \text{Volume kolom (Vt)} &= \left(\frac{d_c}{2}\right)^2 \times 3,14 \times t \\ &= \left(\frac{1,5 \text{ cm}}{2}\right)^2 \times 3,14 \times 15 \text{ cm} \\ &= 26,49 \text{ cm}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume Void (V}_0\text{)} &= V_t \times \varepsilon \\ &= 26,49 \text{ cm}^3 \times 0,4 \\ &= 10,59 \text{ cm}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume gel} &= V_t - V_0 \\ &= (26,49 - 10,59) \text{ cm}^3 \\ &= 15,89 \text{ cm}^3 / 15,89 \text{ mL} \end{aligned}$$

Kemudian, berat resin diperoleh dari formula :

$$Q_v = \frac{(1 - b) \times d \times (100 - W)}{100} \times Q_w$$

Ket : Q_v = kapasitas volum kolom dalam satuan equivalen

Q_w = kapasitas dalam satuan meq/g (dari kemasan)

b = void fraksi (0,4)

W = kandungan air pada resin, satuan % (1,06 meq/g dari kemasan)

d = berat jenis resin

Untuk memperoleh berat resin yang harus ditimbang, maka dihitung kapasitas volume Q_v dan gram resin disesuaikan dengan volume gelnya (formula 2).

Hasil perhitungan :

$$Q_v = \frac{(1 - b) \times d \times (100 - W)}{100 \times Q_w}$$

$$Q_v = \frac{(1 - 0,4) \times 0,9 \frac{\text{kg}}{\text{L}} \times (100 - 10) \times \frac{1000\text{g}}{\text{kg}} \times 1,06 \text{ meq/g}}{100}$$

$$Q_v = 515,16 \text{ meq/L}$$

$$\frac{515,16 \text{ meq}}{1000\text{mL}} = \frac{\text{meq}}{15,89\text{mL}}$$

$$\text{Meq} = 8,18 \text{ meq}$$

$$\frac{8,18 \text{ meq}}{\text{gram resin}} = \frac{1,06 \text{ meq}}{1 \text{ gram resin}}$$

$$\text{Berat resin} = 7,71 \text{ gram resin}$$

Jadi, berat resin yang dimasukkan ke dalam kolom dengan diameter 1,5 cm dan panjang 15 cm yaitu 7,71 gram resin

Lampiran 2. Preparasi kromatografi DEAE selulosa

Preparing sc-211213 for ion exchange chromatography

This procedure should be conducted in a Buchner funnel. If done in a column, channeling may result, which may not be apparent to the operator.

1. Suspend dry resin in 5 volumes of distilled water and allow resin to settle for 30-45 minutes.
2. Measure the settled volume of the resin. This is the Column Volume (CV) to be used for measuring the washing solutions.

For Suspended Resin (used or new):

3. Filter the suspension.
4. Suspend the resin in 2 CV of 0.1 M NaOH containing 0.5 M NaCl for 10 min (maximum 30 min.) and pour the slurry into a Buchner funnel (volume = 3 CV) while applying GENTLE suction, and allowing a flow of 1 V buffer in 5 minutes. Continue pouring in slurry until all the resin is added to the funnel. Continue washing with 2 CV of the above solution.
5. Repeat Step 4 using 0.5 M NaCl (no 0.1 M NaOH). If resin is very dirty, add 3-5 CV of 0.5 M NaCl after the basic or/and acidic washes. Allow washes to go as fast as possible using this rate as a maximum.
6. Repeat Step 4 using 0.1 M HCl containing 0.5 M NaCl.
7. Repeat Step 4 using distilled or deionized water.
8. Continue washing with 5-10 CV of distilled or deionized water or until the effluent pH is 5 or greater.
9. Suspend the resin in 2 CV of 1 M NaCl and adjust pH of slurry to 7-8 with NaOH. Material is now ready to store or use.

To Store Resin:

10. Label container and store material at 0-5°C. To use resin from storage buffer, start at step 11. If bacterial contamination is suspected, begin at step 4.

To Use Resin:

11. Filter resin then pass 5 CV of water through the resin on the filter.
12. Re-suspend the resin with 2 CV of 10X buffer of your choice and then filter.
13. Remove resin from funnel and re-suspend with 5 CV of 1 X buffer and filter.
14. Re-suspend resin with 2 CV of 1 X buffer. Filter a small portion of the suspension and measure the pH of the filtrate; if the pH is within 0.15 pH units of the 1X buffer, resin is ready for use. If not, repeat Step 11-14.
15. Pack resin into column. Gravity flow of buffer is best. Pumping may cause channeling.
16. Apply sample, wash resin, and elute sample.
17. Regenerate as in Steps 3-8.

Lampiran 3. Hasil Fraksinasi Kolom Kromatografi DEAE-Selulosa

Fraksi	A	Fraksi	A	Fraksi	A	Fraksi	A
1	0.005	21	0.022	41	0.015	61	0.005
2	0.032	22	0.007	42	0.014	62	0.008
3	0.013	23	0.004	43	0.010	63	0.007
4	0.018	24	0.002	44	0.007	64	0.005
5	0.017	25	0.003	45	0.006	65	0.004
6	0.015	26	0.001	46	0.031	66	0.003
7	0.009	27	0.003	47	0.023	67	0.003
8	0.007	28	0.002	48	0.014	68	0.004
9	0.007	29	0.003	49	0.014	69	0.017
10	0.005	30	0.002	50	0.011	70	0.012
11	0.01	31	0.002	51	0.016	71	0.04
12	0.243	32	0.002	52	0.011	72	0.074
13	0.60	33	0.004	53	0.005	73	0.121
14	0.77	34	0.006	54	0.003	74	0.287
15	0.80	35	0.015	55	0.001	75	0.036
16	0.75	36	0.010	56	0.003	76	0.027
17	0.64	37	0.012	57	0.004	77	0.012
18	0.147	38	0.012	58	0.005	78	0.01
19	0.062	39	0.013	59	0.005	79	0.009
20	0.024	40	0.013	60	0.000	80	0.003

Keterangan:

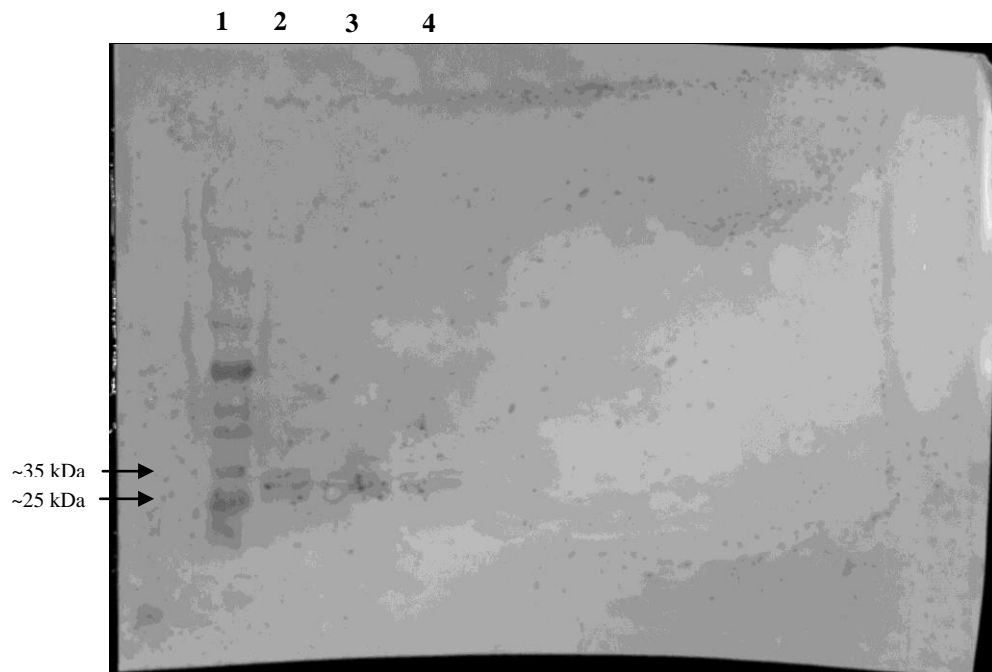
	Buffer fosfat pH7		Buffer fosfat pH 7,2 + NaCl 40mM
	Buffer fosfat pH 7,2 + NaCl 5mM		Buffer fosfat pH 7,2 + NaCl 60mM
	Buffer fosfat pH 7,2 + NaCl 10mM		Buffer fosfat pH 7,2 + NaCl 80 mM
	Buffer fosfat pH 7,2 + NaCl 20mM		Buffer fosfat pH 7,2 + NaCl 100mM

Lampiran 4. Hasil Serapan Cahaya Standar BSA

Kadar (mg/mL)	A1	A2	Rata-rata
0	0	0	0
0,1	0,0421	0,0427	0,0424
0,2	0,083	0,089	0,086
0,4	0,061	0,067	0,164
0,6	0,239	0,255	0,247
0,8	0,3272	0,33	0,3286
1	0,39	0,43	0,41

Lampiran 5. Hasil Fraksi PIF dengan Kromatografi Afinitas

Fraksi	A	Fraksi	A	Fraksi	A
1	0,000	16	0,030	31	0,009
2	0,010	17	0,023	32	0,01
3	0,131	18	0,010	33	0,023
4	0,100	19	0,009	34	0,026
5	0,210	20	0,007	35	0,04
6	0,223	21	0,005	36	0,07
7	0,239	22	0,005	37	0,102
8	0,190	23	0,003	38	0,127
9	0,167	24	0,004	39	0,104
10	0,121	25	0,002	40	0,08
11	0,116	26	0,003	41	0,06
12	0,110	27	0,001	42	0,05
13	0,087	28	0,000	43	0,03
14	0,056	29	0,001	44	0,01
15	0,042	30	0,009	45	0,005

Lampiran 6. Western blot (asli)

Hasil deteksi protein ikat folat dengan teknik western blot ; (1) marker, (2)(3) Eluat kromatografi afinitas, (4) eluat kromatografi afinitas pengenceran 10 kali. (scanner LiDE 110, hitam putih)

Lampiran 7. Panjang gelombang maksimal asam folat

λ	Abs	Λ	Abs
250	0,254	295	0,543
255	0,276	300	0,502
260	0,356	305	0,487
265	0,482	310	0,466
270	0,54	315	0,449
275	0,58	320	0,378
280	0,639	325	0,359
285	0,611	330	0,335
290	0,606	335	0,319

Lampiran 8. Pengenceran konsentrasi PIF 1/5, 1/50, 1/500, 1/5000, 1/ 50000, dan 1/500000

No	Pengenceran PIF	Absorbansi
1	1/5	5.818
2	1/50	6
3	1/500	5.512
4	1/5000	5.513
5	1/50000	5.706
6	1/500000	5.506

Lampiran 9. Pengenceran konsentrasi PIF dalam teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* pada suhu kamar

1. Pengenceran PIF 1/10

[Asam folat] (ng/mL)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Rata-rata
0	2.542	2.542	2.542
2,5	1.98	1.98	1.98
5	1.722	1.722	1.722
10	1.6	1.6	1.6
20	0.861	0.861	0.861

2. Pengenceran PIF 1/50

[Asam folat] (ng/mL)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Rata-rata
0	2.58	2.46	2.52
2,5	2.513	2.325	2.419
5	1.887	1.945	1.916
10	1.4	1.546	1.473
20	1.18	0.98	1.08

3. Pengenceran PIF 1/100

[Asam folat] (ng/mL)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Rata-rata
0	2.53	2.62	2.575
2,5	2.41	2.35	2.38
5	1.8	1.68	1.74
10	1.43	1.73	1.58
20	1.47	0.89	1.18

Lampiran 10. Pengenceran konsentrasi PIF dalam teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* pada suhu 37°C

1. Pengenceran PIF 1/10*

[Asam folat] (ng/mL)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Rata-rata
0	2.682	2.482	2.582
2.5	2.22	2.417	2.3185
5	2.47	2.023	2.2465
10	1.19	1.238	1.214
20	1.325	1.421	1.373

2. Pengenceran PIF 1/50*

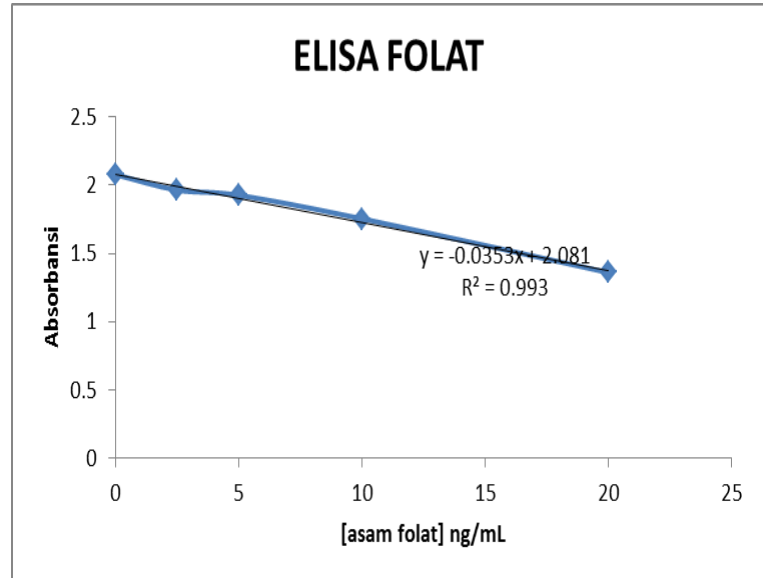
[Asam folat] (ng/mL)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Rata-rata
0	2.663	2.301	2.482
2,5	2.036	2.52	2.278
5	1.748	1.57	1.659
10	1.072	0.95	1.011
20	0.633	0.851	0.742

3. Pengenceran PIF 1/100*

[Asam folat] (ng/mL)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Rata-rata
0	2.6	2.402	2.501
2,5	2.472	2.646	2.559
5	2.163	2.089	2.126
10	1.371	1.547	1.459
20	1.664	1.72	1.692

Lampiran 11. Kurva standar ELISA folat

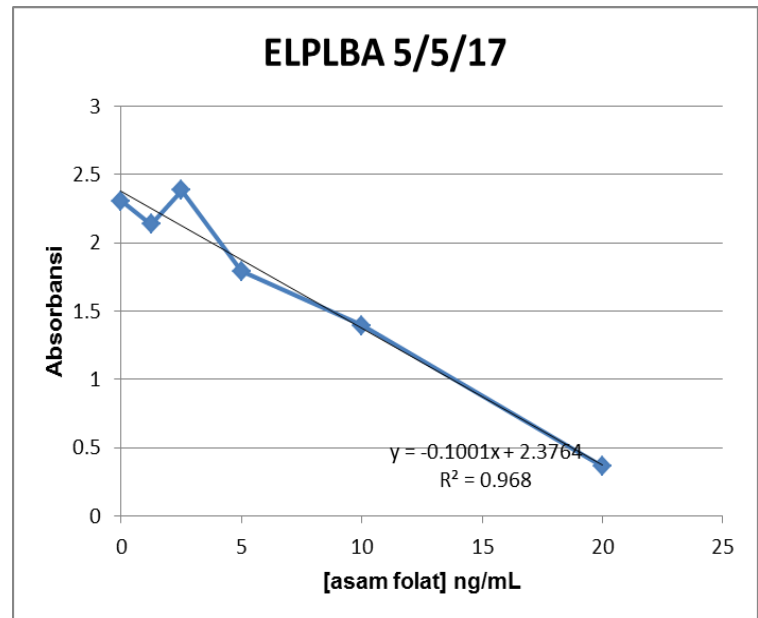
[asam folat] (ng/mL)	Absorbansi
0	2.077
2.5	1.964
5	1.926
10	1.754
20	1.36



Lampiran 12. Kurva standar ELPLBA (1)

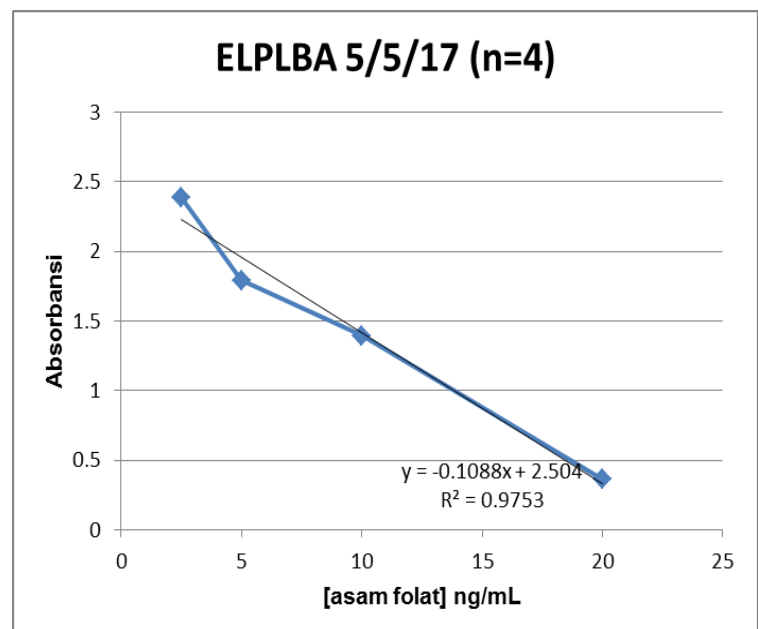
Tanggal 5 Mei 2017

[asam folat] (ng/mL)	Absorbansi
0	2.3079
1.25	2.137
2.5	2.3875
5	1.792
10	1.395
20	0.36



[asam folat] (ng/mL)	Absorbansi
0*	2.3079
1.25*	2.137
2.5	2.3875
5	1.792
10	1.395
20	0.36

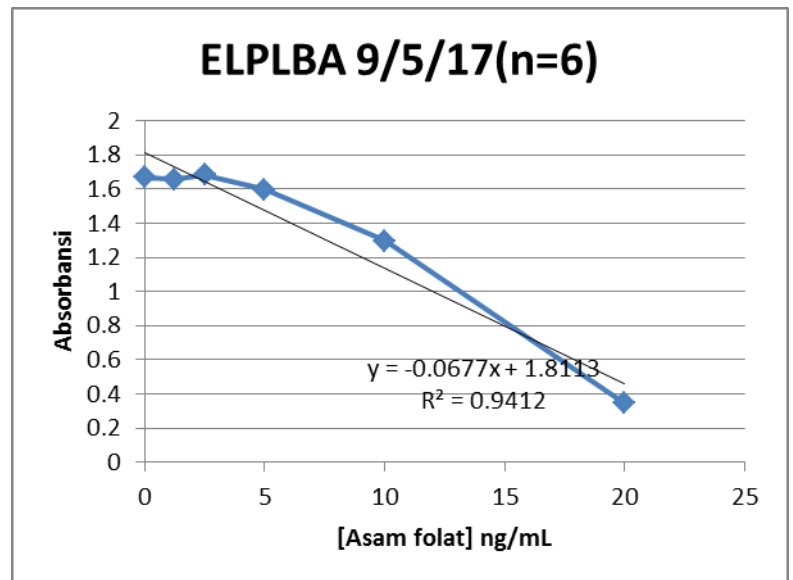
*tidak digunakan untuk menghilangkan bias linieritas kurva standar.



Lampiran 13. Kurva standar ELPLBA (2)

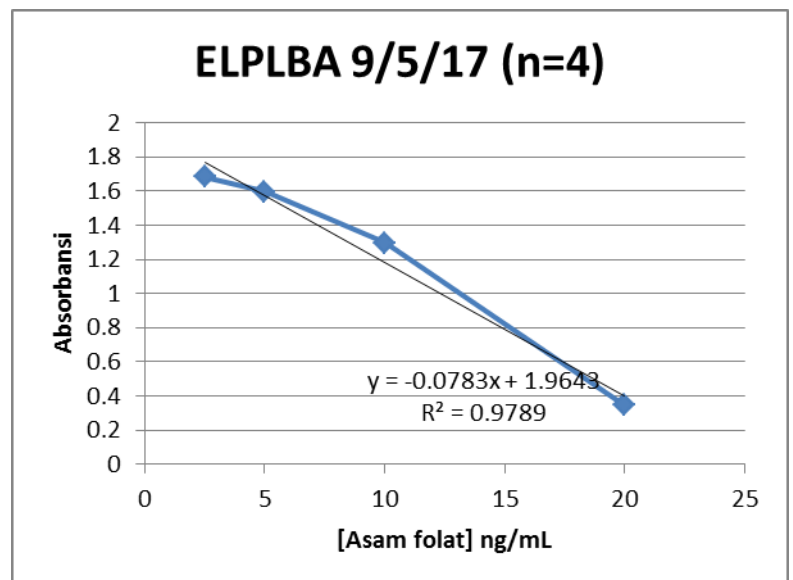
Tanggal 9 Mei 2017

[asam folat] (ng/mL)	Absorbansi
0	1.668
1.25	1.657
2.5	1.182
5	1.598
10	1.295
20	0.346



[asam folat] (ng/mL)	Absorbansi
0*	1.668
1.25*	1.657
2.5	1.182
5	1.598
10	1.295
20	0.346

*tidak digunakan untuk menghilangkan bias linieritas kurva standar



Lampiran 14. Hasil perbandingan teknik ELPLBA dan ELISA pada pengukuran folat serum

	UJI	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DATA	ELPLBA	,168	20	,139	,947	20	,319
	ELISA	,133	20	,200*	,953	20	,420

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

	UJI	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
DATA	ELPLBA	20	14,8044	2,79526	,62504
	ELISA	20	13,8591	3,63765	,81340

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
DATA	Equal variances assumed	1,788	,189	,921	38	,363	,94529	1,02582	-1,13137	3,02194
	Equal variances not assumed			,921	35,637	,363	,94529	1,02582	-1,13590	3,02647

Lampiran 15. Hasil keterulangan teknik ELPLBA

Sampel	Abs ₁ ^a	Abs ₂ ^a	B ₁ ^b	B ₂ ^b	Rerata	[as.folat](ng/mL)	St.dev	CV (%)	
1	0,962	0,911	0,879	0,828	0,8535	15,282	0,036062	4,225	
2	1,4521	1,436	1,3691	1,353	1,36105	10,583	0,011384	0,836	
3	1,4327	1,425	1,3497	1,342	1,34585	10,724	0,005445	0,404	
4	0,903	0,8934	0,82	0,8104	0,8152	15,637	0,006788	0,832	
5	0,824	0,798	0,741	0,715	0,728	16,44	0,018385	2,525	
6	0,944	0,925	0,861	0,842	0,8515	15,3	0,013435	1,577	
7	1,313	1,419	1,23	1,336	1,283	11,3	0,074953	5,842	
8	1,153	1,125	1,07	1,042	1,056	13,4	0,019799	1,874	
9	1,177	0,843	1,094	0,76	0,927	14,6	0,236174	25,477	
10	1,07	0,954	0,987	0,871	0,929	14,58	0,082024	8,829	
11	0,809	0,961	0,726	0,878	0,802	15,75	0,10748	13,40	
12	0,839	0,946	0,756	0,863	0,8095	15,69	0,07566	9,346	
13	0,877	1,008	0,794	0,925	0,8595	15,22	0,092631	10,77	
14	0,556	0,744	0,473	0,661	0,567	17,93	0,132936	23,44	
15	1,47	0,942	1,387	0,859	1,123	12,787	0,373352	33,24	
16	1,519	1,75	1,436	1,667	1,5515	8,81	0,163342	10,52	
17	0,839	0,741	0,756	0,658	0,707	16,63	0,069296	9,801	
18	0,677	0,683	0,594	0,6	0,597	17,65	0,004243	0,71	
19	0,556	0,534	0,473	0,451	0,462	18,9	0,015556	3,367	
20	0,657	0,457	0,574	0,374	0,474	18,7	0,141421	29,83	
					Rerata	0,90513	14,804	0,084	9,8443

^aAbsorbansi

^bAbs Blanko = 0,083

*Kurva standar yang dipakai pada tanggal 5 Mei 2017

Lampiran 16. Kadar folat serum tanggal 9 Mei 2017

Sample	Abs1	Abs2	Total	blanko ^a	[as.folat]
1	0,98	0,907	0,9435	0,8915	13,7
2	1,372	1,572	1,472	1,42	6,95
3	1,463	1,411	1,437	1,385	7,4
4	0,971	0,886	0,9285	0,8765	13,9
5	1,036	0,812	0,924	0,872	14
6	0,882	1,009	0,9455	0,8935	13,7
7	1,086	0,892	0,989	0,937	13,1
8	0,828	0,991	0,9095	0,8575	14,1
9	1,154	1,219	1,1865	1,1345	10,6
10	1,315	1,325	1,32	1,268	8,89
11	1,33	1,436	1,383	1,331	8,09
12	1,36	1,39	1,375	1,323	8,19
13	1,46	1,408	1,434	1,382	7,44
14	1,236	1,918	1,577	1,525	5,61
15	1,72	1,58	1,65	1,598	4,68
16	1,56	1,572	1,566	1,514	5,75
17	1,33	1,524	1,427	1,375	7,53
18	1,203	1,391	1,297	1,245	9,19
19	0,912	0,648	0,78	0,728	15,8
20	0,746	0,534	0,64	0,588	17,6

^aAbs blanko = 0,052

Lampiran 17. Hasil uji ketertiruan (*reproducibility*) teknik ELPLBA pada pengukuran folat serum

Tests of Normality

	UJI	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
DATA	5-MEI-2017	,168	20	,139	,947	20	,319
	9 MEI 2017	,169	20	,136	,923	20	,114

a. Lilliefors Significance Correction

Group Statistics

	UJI	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
DATA	5-MEI-2017	20	14,8044	2,79526	,62504
	9 MEI 2017	20	10,3075	3,82108	,85442

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
DATA	Equal variances assumed	5,224	,028	4,248	38	,000	4,49688	1,05863	2,35379	6,63997
	Equal variances not assumed			4,248	34,857	,000	4,49634	1,05863	2,34731	6,64788

Lampiran 18. Hasil uji akurasi pada dua serum dengan spike asam folat

Sampel	Kadar folat (ng/mL)	Folat <i>spiked</i> (ng/mL)	Absorbansi folat setelah di- <i>spiked</i>					Mean	[folat](ng/mL)	%recovery
			Abs 1*	Abs 2*	Abs 3*	Abs 4*	Abs 5*			
1	10,57	10	0,209	0,439	0,324	0,423	0,392	0,3574	19,87	92,9
2	11,29	10	0,423	0,392	0,4075	0,427	0,352	0,4003	19,47	81,7

*absorbansi sudah dikurangi dengan blanko

Formula uji akurasi:

$$Recovery(\%) = \frac{(konsentrasi\ terukur - konsentrasi\ tanpa\ spike)}{konsentrasi\ spiking} \times 100\%$$


Lampiran 19. Hasil Linearitas folat serum menggunakan teknik *ELPLBA*

Sampel	Kadar folat (ng/mL)	Pengenceran	Pengenceran folat <i>spiked</i> (ng/mL)	Absorbansi setelah dispike d			mean	Kadar folat setelah di- <i>spiked</i>	%recovery
				Abs1*	Abs2*	Abs3*			
2	10,57	0	10	-	-	-	-	-	-
		1:2	5	1,325	1,506	1,223	1,3515	10,67	107,38
		1:4	2,5	1,801	1,883	1,893	1,855	5,97	120,19
		1:8	1,25	2,12	2,134	2,295	2,183	2,89	119,48
7	11,29	0	10	-	-	-	-	-	-
		1:2	5	1,21	1,31	1,31	1,244	11,61	119,87
		1:4	2,5	1,98	1,826	1,826	1,906	5,53	112,79
		1:8	1,25	2,15813	2,165	2,214	2,217	2,4	123,58

*absorbansi sudah dikurangi dengan blanko

$$\% Recovery = \frac{\text{Nilai yang terukur}}{\text{Nilai yang diharapkan/pengenceran}} \times 100\%$$

Lampiran 20. Surat Etik



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO.Box 1358
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,
3922977, 3927360, 3153296,
F 62 21 3912477, 31930372, 3157288
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fk.ui.ac.i

Nomor : 790 /UN2.F1/ETIK/2016

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:


The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

“Penyempurnaan Teknik Protein Ligand Binding Assay Menggunakan Protein Ikat Folat dari Susu Sapi Segar pada Pengukuran Asam Folat Serum”.

Peneliti Utama : Muhamad Arif Budiman
Principal Investigator

Nama Institusi : Biokimia FKUI
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approved the above mentioned protocol.



19 SEP 2016
Ketua
Chairman
Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

* *Ethical approval* berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.
** Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.
2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical approval* harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan.
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*).
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*.

Lampiran 21. Persetujuan pasien dalam penelitian

LEMBAR INFORMASI UNTUK PASIEN





















Kami tim peneliti dari Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, sedang melakukan penelitian untuk menggunakan protein ikat folat dalam pengukuran kadar asam folat dalam serum manusia non-penderita. Adapun tujuan penelitian ini adalah menerapkan teknik pengukuran asam folat di serum menggunakan protein ikat folat dengan teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* (analog dengan kompetitif ELISA). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai memberikan manfaat yaitu didapatkan teknik **pengukuran folat serum yang terstandarisasi**, lebih sederhana, dan akurat sehingga dapat melayani keperluan yang lebih luas di masyarakat.

Kami mengajak Saudara untuk ikut serta sebagai subjek dalam penelitian ini karena Saudara merupakan subjek non-penderita. Apabila bersedia ikut, peneliti akan mengambil darah dari pembuluh darah vena di bagian lengan Saudara sebanyak 5-6 mL. Perlu diberitahukan, bahwa pada proses penyuntikan akan terasa sedikit sakit. Namun, terkadang pada tindakan ini juga dapat terjadi infeksi dan/atau bengkak dan warna biru yang baru sembuh setelah beberapa hari. Hal ini akan diminimalisasi dengan teknik pengambilan darah yang benar. Keikutsertaan Saudara dalam penelitian bersifat sukarela dan rahasia. Saudara dapat keluar di tengah penelitian maupun dikeluarkan oleh peneliti atas dasar pertimbangan klinis atau akademis.

Setelah Saudara membaca surat ini, Saudara berkesempatan untuk menanyakan semua hal yang belum jelas tentang penelitian ini kepada kami, Muhamad Arif Budiman (HP:08176603083).

FORMULIR PERSETUJUAN

Semua keterangan yang diberikan oleh peneliti tentang manfaat dan pentingnya pemeriksaan darah ini. Oleh karena itu kami bersedia untuk ikut dalam penelitian ini

No	Nama	Jenis kelamin	Tanda tangan
1	Ganjar Noviar	Laki-laki	
2	Ny. Nurhayati	Perempuan	
3	Syahroni	Laki-laki	
4	Nurcholis	Laki-laki	
5	Sarmin	Laki-laki	
6	Syamsudin	Laki-laki	
7	Siti mairah	Perempuan	
8	Salminah	Perempuan	
9	Soniah hutapeah	Perempuan	
10	Nofita indah	Perempuan	
11	M. Arif Budiman	Laki-laki	
12	Eric	Laki-laki	
13	Nanda rizki	Laki-laki	
14	Novianti handayani	Perempuan	
15	Kasiyadi Y	Laki-laki	
16	Siti aidah	Perempuan	
17	Agustinus	Laki-laki	
18	Amsah	Laki-laki	
19	Aspas	Laki-laki	
20	Sapardi	Laki-laki	

RIWAYAT HIDUP



Muhamad Arif Budiman

Kampung Melayu Kecil III, RT/RW. 010/009, Kelurahan Bukit Duri, Jakarta Selatan

Email: arifira09@gmail.com

Tempat, tanggal lahir : Manado, 14 Maret 1992

Jenis Kelamin: Laki-laki

Agama : Islam

Status : belum menikah

Pendidikan	Institusi	Lulus
Magister Ilmu Biomedik	Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia	2015-2017
Sarjana Pendidikan	FMIPA, Universitas Negeri Jakarta	2009-2014
Sekolah Menengah Umum	MAN 3 Jakarta	2006-2009
Sekolah Menengah Pertama	SMP Negeri 71	2003 -2006
Sekolah Dasar	SD Negeri 02 petang SDN Pejuang Bekasi SDN Bukit Duri	1997 - 2003

Riwayat Pekerjaan

2016-2017 : Asisten Dosen Kimia Universitas Krisnadwipayana

2010-2012 : Asisten Praktikum Lab. Kimia Organik dan Analitik UNJ

Hibah penelitian:

Publikasi internasional terindeks untuk tugas akhir mahasiswa UI (PITTA) 2017

Penetapan kadar folat serum dengan teknik *Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay* yang disempurnakan

Muhamad Arif Budiman¹, Ani Retno Prijanti², Mohamad Sadikin³

¹Biomedical Program, Faculty of Medicine, University of Indonesia

²Departement Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine,
University of Indonesia

Jl. Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat, Indonesia

¹[Email: arifira09@gmail.com]

Abstract

Penelitian ini bertujuan untuk membakukan teknik pengukuran folat serum menggunakan protein ikat folat untuk pengukuran folat serum. Protein ikat folat bertujuan untuk menggantikan fungsi antibody dalam ELISA untuk pengukuran folat dalam tubuh. Teknik ini berbasis kompetitif ELISA menggunakan 20 serum sampel. PIF dimurnikan dari susu sapi dengan kromatografi penukar ion dan kromatografi afinitas. Konfirmasi PIF dengan *western blot* menunjukkan pita pada rentang ~30-35 kDa dan membuktikan bahwa protein tersebut adalah protein ikat folat. Uji keterulangan menunjukkan nilai 9,8% (batas normal) dan uji keteriruan selama 5 hari menunjukkan hasil yang buruk pada tingkat kepercayaan 95%. Uji akurasi untuk kadar folat dalam dua serum yaitu 92,8% and 81,5% sesuai dengan batas normal uji *recovery*. Uji linieritas untuk pengukuran kadar folat dalam dua serum (diencerkan 1:2, 1:4, and 1:8) sebesar 107,38%; 120%; 119,48% dan 119%; 113 %; 123,58%. Berdasarkan uji perbandingan teknik, teknik ini dapat digunakan pada penentuan kadar folat dalam serum yang sama dengan pengukuran standar folat

Key word : Folat serum, Protein ikat folat (PIF) susu sapi, teknik *enzyme-labeled protein ligand binding assay*.

Abstract

In this study, we described *enzyme-labeled protein ligand binding assay* method for determined folate in serum using folate binding protein. FBP was aimed to replace the role of antibodies in the ELISA measurement of folate levels in the body. The method is based on analog competitive ELISA using 20 serum samples. FBP were purified from bovine milk with anion exchange chromatography and affinity chromatography. Identification FBP with SDS-PAGE and western blot analysis showed single protein band and proved that the protein was FBP. Repeatability test was 9,8% and reproducible test showed poor result over a 5 day period with an independent T test at 95% confidence level. The accuracy test for folate levels in 2 serum were 92,8% and 81,5% respectively The linearity test for folate levels in 2 serum (dilution 1:2, 1:4, and 1:8) were 107.38%; 120.19%; 119.48% and 119.87%; 112.79%; 123.58 % respectively. *Based on the comparison result*, The method was successfully eligible for determination of folate in serum which quite valid as same as standard folate measurement.

Key word : Folate serum, Folate binding protein (FBP) bovine milk, technique enzyme-labeled protein ligand binding assay

Pendahuluan

Folat merupakan vitamin B₉ yang tidak dapat disintesis dalam tubuh sehingga hanya didapatkan dari suplemen, makanan berfortifikasi, dan makanan alami.¹ Struktur turunan folat terdiri dari tiga bagian yaitu cincin pteridin (pterin untuk asam folat), P-aminobenzoat, dan asam glutamat (mono/poli).² Peranan folat dalam tubuh yakni sebagai koenzim terlibat dalam sintesis nukleotida (purin dan timin) dan interkonversi asam amino, serta sebagai antioksidan dalam menurunkan kerusakan pembuluh endotel.^{3,4} Walaupun folat diperlukan dalam jumlah sedikit ($\pm 400\mu\text{g}$ untuk usia dewasa), tetapi kebutuhannya tidak dapat digantikan oleh zat lain.⁵

Indikator rendah (defisiensi), normal dan tingginya status folat seseorang dapat diukur dalam serum, plasma, atau sel darah merah.⁵ Kadar folat dalam serum/ plasma pada kondisi defisiensi, normal, dan tinggi yaitu $< 3 \text{ ng/mL}$, $6\text{-}20 \text{ ng/mL}$ dan $>20 \text{ ng/mL}$.⁶ Dalam pengecekan status folat, salah satu pendekatan metode saat ini yang diketahui cukup akurat, sensitif, dan waktu pengerjaan yang relatif cepat dalam pengukuran folat dalam tubuh adalah *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).⁷

Umumnya, kebutuhan antibodi dalam ELISA folat sangat diperlukan sebagai protein khusus pengikat folat sehingga pembuatannya menjadi kebutuhan dasar dalam metode ini. Beberapa penelitian menyebutkan adanya protein alami yang dapat mengikat asam folat dengan hanya didapatkan dari cara pemisahan yang relatif sederhana sehingga kebutuhan adanya pembuatan antibodi tidak diperlukan. Protein tersebut diketahui sebagai protein ikat folat (PIF).^{8,9,10}

Protein ikat folat dapat ditemukan pada susu sapi segar dengan kadar $211 \pm 7 \text{ nmol/L}$ ($n = 10$) dan berat molekul berkisar $30 - 35 \text{ kDa}$.¹⁰ Persentasi homologi protein ikat folat dari susu sapi segar dengan protein ikat folat dari manusia sebesar $\pm 83\%$.¹¹ Berdasarkan penjelasan yang telah dipaparkan maka potensi protein ikat folat dari susu sapi segar dapat digunakan dalam mengukur kadar folat dalam tubuh.¹² Penggunaan protein ikat folat pada pengukuran kadar folat dari serum telah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Namun, larutan standar asam folat yang dipakai hanya pada rentang $25\text{-}100 \text{ ng/mL}$ padahal kadar normal serum manusia berkisar pada $3\text{-}20 \text{ ng/mL}$ sehingga keakuratan teknik ini masih dipertanyakan.¹³

Berdasarkan uraian diatas, untuk memperoleh hasil pengukuran folat yang

baku/standar (uji perbandingan, linieritas, akurasi, dan presisi) akan dilakukan pemurnian protein ikat folat dari susu sapi segar secara utuh dengan menggunakan kromatografi afinitas dan menerapkan PIF murni pada metode *Enzyme Labeled Protein Ligand Binding Assay* dengan konjugat asam folat-avidin dipakai sebagai kompetitor folat untuk penyempurnaan penelitian sebelumnya.

Bahan dan Metode Penelitian

Bahan-bahan

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dapar fosfat pH 7.2, $\text{HCl}_{(\text{aq})}$, BaCl_2 10%, kantong selofan (**D9652 Sigma**) dan kertas whatmann 52, DEAE selulosa (santa cruz), 1,6-hexanediamine dihydrochloride, cyanogen bromida-agarose, asam folat, NaHCO_3 , 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, natrium asetat_(aq), BSA 10%, gel poliakrilamid 10% (Sigma A 3553), Metilen bis akrilamid (Sigma M 7279), β -merkaptotanol (Merck®), larutan Tris HCl, APS, TEMED, glisin, biru bromfenol, dapar elektroda, asam asetat, dapar transfer antibody yang terkonjugasi HRP, substrat aminoetil karbazol atau substrat berpendar, avidin,

Metode

Isolasi dan pemurnian PIF. Susu sapi sebanyak 2,5 liter disentrifugasi 2000 rpm, penurunan pH sedemikian rupa sehingga terbentuk *whey*. Amonium sulfat ditambahkan pada *whey* hingga 90% jenuh kemudian dilakukan sentrifugasi 2000 rpm untuk mendapatkan supernatan dan presipitat. Presipitat disuspensikan dalam kantong selofan untuk dialisis.^{8,14}

Pemurnian kromatografi penukar ion.

Preparasi fasa diam DEAE-selulosa dibuat dari Prosedur sigma-aldrich. Gel yang sudah dibuat kemudian disuspensikan dalam dapar fosfat 0,02 M pH 7,2 dan dikemas ke dalam kolom kromatografi dengan diameter 1,5 cm dan panjang 15 cm.

Setelah kolom siap digunakan, 1 mL dialisis bebas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dimasukan pada kolom, kemudian dielusi dengan dapar fosfat pH 7,2 dengan konsentrasi masing-masing 5 mM, 20 mM, 40 mM, 60mM, 80 mM, dan 0,1 M. Fraksi hasil elusi ditampung sebanyak 2 mL dan diukur serapannya pada $\lambda 280 \text{ nm}$. Elusi dihentikan dan diganti dengan konsentrasi dapar fosfat berikutnya bila absorbansi menunjukkan nilai 0 atau lebih kecil.¹⁴

Pemurnian kromatografi afinitas.

Preparasi fasa diam kolom kromatografi menggunakan *aminohexyl-agarose* dan asam folat yang akan disambung dengan

karbodiimide. Gel berubah menjadi kuning, didekantasi dan dicuci dengan 0,05M NaHCO₃. Medium yang tidak menempel dengan asam folat diblok dengan penambahan etanolamin 1 M pH 7.2 selama dua jam pada suhu ruang dan dicuci dengan 0,02 buffer fosfat pH 7,2 yang mengandung 0,1 M NaCl sebanyak 2-3 kali.¹⁵

pH Fraksi hasil kromatografi penukar ion diturunkan menjadi 3 dengan penambahan larutan HCl 1M/ H₃PO₄ 1M dan didialisis dengan dapar asetat pH 3,5 untuk memisahkan folat dari PIF. Hasil dialisis dicampurkan dengan resin agarosa yang terikat folat pada gelas kimia dan ditambahkan larutan NaOH 1 M sampai pH berubah menjadi 7,2 diaduk selama 3 jam pada suhu ruang dan dimasukkan kedalam kolom kromatografi bervolume 10 mL. Kemudian, kolom dielusi dengan 0,02 M dapar fosfat pH 7,2 dan hasil fraksi diukur absorbansi sampai 0 pada λ 280. kolom dielusi kembali menggunakan dapar asetat pH 3,5 dengan NaCl 0,5 M. Fraksi PIF dikumpulkan di puncak tertinggi kedua, dimasukkan kedalam kantong selofan, dan direndam dalam dapar 0,02 M pH 7,2 dengan tujuan untuk menetralkan pH asam.^{8,14-16}

Western blot. Uji konfirmasi hasil pemurnian PIF dari kromatografi afinitas dilakukan dengan elektroforesis SDS-PAGE 10% berdasarkan berat molekul dan western blot berdasarkan interaksi antigen (PIF) dengan antibodi PIF.¹⁷

Penggunaan PIF dalam metode enzyme labeled ligand binding assay pada pengukuran folat serum.

100 μ L protein ikat folat dilekatkan pada mikroplat kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C. Setelah pengeraman dan pencucian, 150 μ L BSA 1% dimasukkan ke dalam tiap sumur (*blocking*), kemudian didiamkan 24 jam pada suhu 4°C. Setelah pengeraman dan pencucian, 50 μ L serum dimasukkan ke dalam tiap sumur dan konjugat folat-avidin dengan kadar 1 μ g/mL, kemudian dimasukan sejumlah 50 μ L ke dalam sumur. Selanjutnya, mikroplat didiamkan selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah pengeraman dan pencucian, Konjugat enzim *biotin peroxidase* diencerkan dengan PBS pH 6,0 sampai mempunyai konsentrasi 20 μ g/mL, kemudian dipipetkan ke dalam tiap sumur mikroplat sebanyak 50 μ L. Selanjutnya mikroplat didiamkan selama 1 jam pada suhu 37°C.¹³

Setelah pengeraman dan pencucian, OPD ditambahkan (diukur absorbansi maksimumnya terlebih dahulu) kemudian dipipetkan ke dalam tiap sumur sebanyak 100

μ L dan kemudian didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar dalam keadaan gelap. Setelah itu ditambahkan 100 μ L asam sulfat 2 N untuk penghentian reaksi enzimatik dan serapan cahaya dibaca pada panjang gelombang 490 nm dengan microplate reader.*^{13,18}

Preparasi sampel

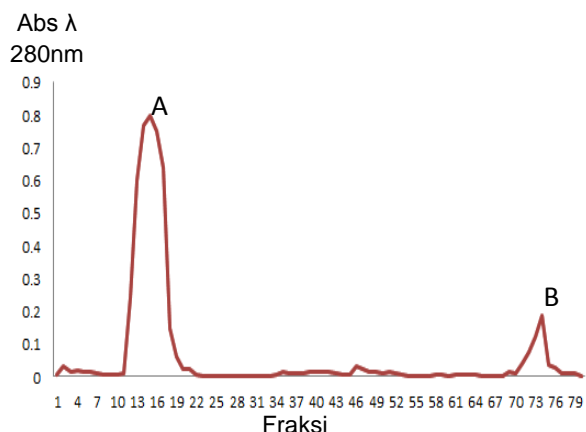
Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan sampel penelitian menggunakan 20 serum darah pasien normal. Semua pasien/individu berumur 24-50 tahun baik pria maupun wanita. Darah yang didapat dari pasien kemudian ditampung pada tabung SST dan didiamkan selama 20-30 menit sampai membeku, kemudian serum dipisahkan dari darah pasien dengan cara sentrifugasi 2000 rcm selama 10-15 menit. Serum disimpan dalam *microtube* pada -20/-80°C.

Analisis statistik teknik dilakukan dengan uji parametrik menggunakan uji *independent sample t-test* dengan hasil uji pada masing-masing kelompok dianggap bermakna secara statistik pada tingkat kepercayaan 95%. Data yang tidak memenuhi syarat akan dianalisis *non-parametric* menggunakan uji *Mann-Whitney*.¹³

Uji Akurasi dianggap akurat dengan rentang % *recovery* 80-120%. Data uji keterulangan diukur dari nilai CV yang tidak boleh melebihi 10%, dan analisis regresi data ketertiruan yang umumnya tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%. Linieritas sampel serum dianggap normal jika rentang nilai % *recovery* masih berkisar 80% - 120%.

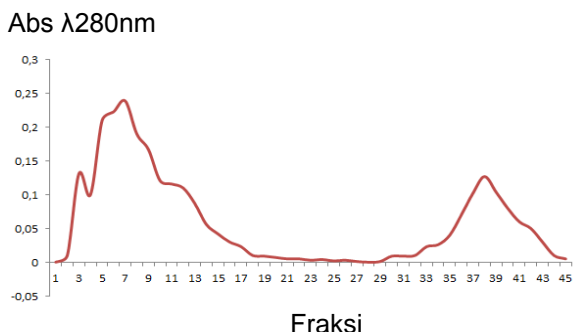
Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi susu sapi berupa 1250 ml dialisis dimurnikan dalam kolom DEAE-selulosa dan dihasilkan dua puncak pada pembacaan absorbansi dengan panjang gelombang 280 nm. Puncak pertama menunjukkan protein bermuatan positif yang keluar dari kolom seperti laktoferin akan terelusi diawal dari keluar kolom pada puncak pertama, sedangkan puncak kedua adalah protein-protein bermuatan negatif termasuk protein ikat folat. (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil fraksinasi (A) protein bermuatan positif, (B) protein bermuatan negatif

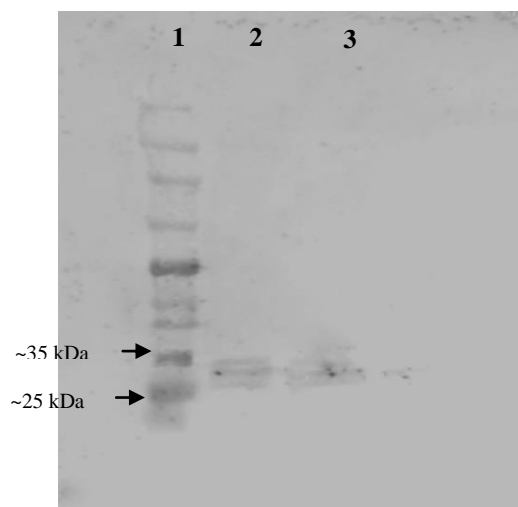
Fraksi puncak kedua kromatografi DEAE selulosa dimurnikan kembali dalam kolom afinitas (konjugat asam folat-agarose) dihasilkan dua puncak pada pembacaan absorbansi dengan panjang gelombang 280 nm. Puncak pertama menunjukkan protein yang tidak terikat dengan asam folat, sedangkan puncak kedua adalah protein yang dapat mengikat asam folat yaitu protein ikat folat. (Gambar 2)



Gambar 2. Hasil fraksinasi kolom kromatografi afinitas. (a) Puncak ke-1 dari fraksi 7 dengan eluent dapar fosfat pH 7,2 dan (b) puncak ke-2 dengan *eluent* dapar natrium asetat pH 3,5. PIF terdapat pada puncak kedua.

Antibodi anti PIF yang digunakan berasal dari sapi. Antibodi ini hanya mampu mengenali secara spesifik dengan PIF dari sapi. Hasil yang diperoleh pada gambar 3 sama dengan hasil dari penelitian Iwai, Tani dan Fushika yang menyatakan terdapat pita yang beragam pada daerah berat molekul 25-35 kDa. PIF pada awalnya memiliki berat molekul $\pm 25,700$ Da. Protein ini juga memiliki dua situs *N-linked glycan* sehingga karena adanya

perbedaan glikosilasi berat molekul PIF menjadi sekitar 30,000-35,000 dalton.¹⁷



Gambar 3. Hasil deteksi protein ikat folat dengan teknik western blot ; (1) marker, (2)(3) Eluat kromatografi afinitas.(gambar telah diedit dengan photoshop untuk pencerahan gambar)

Koefisien determinasi ketiga (R^2) pengenceran PIF 1/10, 1/50 dan 1/100 ditunjukkan dari nilai terendah sampai tertinggi yaitu $1/100 < 1/50 < 1/10$ pada suhu kamar, sedangkan nilai koefisien determinasi pada suhu 37°C memberikan nilai linieritas yang buruk. Dengan demikian, untuk pengukuran folat serum digunakan PIF dengan pengenceran 1/10 dalam suhu kamar sebagai standar karena mempunyai nilai linieritas tertinggi.(Gambar 4)

Uji perbandingan hasil teknik menunjukkan hasil tidak ada perbedaan yang nyata sebesar 0,363 menurut uji statistik yang didasari dari nilai kemaknaan $P > 0.05$ sehingga H_0 gagal ditolak. Hal ini menunjukkan hasil yang diperoleh dari teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* tidak bertentangan dengan hasil yang diperoleh teknik ELISA kompetitif dalam pengukuran folat serum pada tingkat kepercayaan 95%.

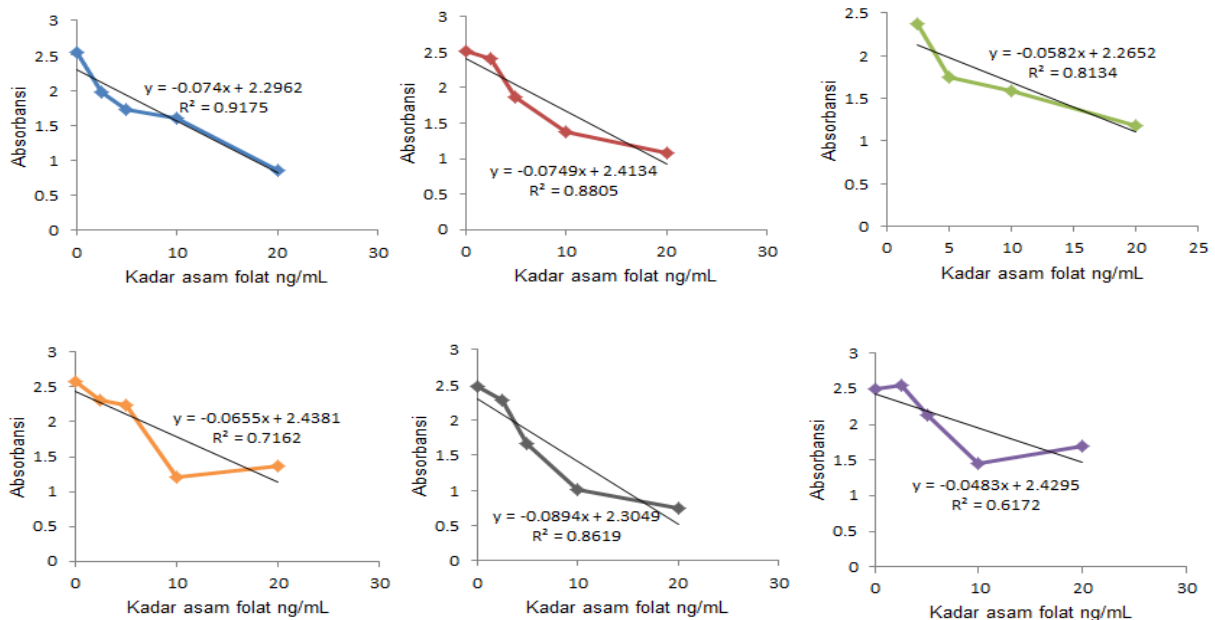
Uji keterulangan (repeatability) teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* pada pengukuran folat serum dilakukan dalam hari yang sama. Hasil analisis keterulangan sebesar 9.8 %. Nilai CV repeatability dianggap baik apabila nilai C.V kurang dari 10%.

Dilain hal, **uji ketertiruan (reproducibility)** teknik *enzyme labeled protein ligand binding assay* pada pengukuran folat serum selama lima hari yang berbeda dengan perhitungan *T test independent*. Analisis regresi data ketertiruan yang umumnya berbeda nyata

dengan nilai $P < 0.05$ pada tingkat kepercayaan 95%. Pengukuran folat serum secara umum tidak stabil terhadap waktu lama penyimpanan karena mudah terdegradasi yang mempengaruhi pengukuran sehingga folat serum perlu secepat mungkin untuk diperiksa.

^apengulangan 5 kali

^bpengulangan 3 kali



Gambar 4. Uji kompetisi PIF pengenceran 1/10 (a), 1/50 (b), 1/100 (c) pada suhu kamar dan Uji kompetisi PIF pengenceran 1/10(d), 1/50 (e), dan 1/100 (f) pada suhu 37°C

Uji akurasi diketahui dari nilai *recovery* dengan rentang 80%-120% yang menunjukkan batas normal akurasi suatu teknik. Uji *recovery* dengan penambahan asam folat (*spiked*) untuk sampel serum pertama menunjukkan persen *recovery* sebesar 92,9% dan sampel serum kedua didapatkan persen *recovery* sebesar 81,7%. Berdasarkan uji rekovery menunjukkan nilai rekovery kedua serum dapat diterima berdasarkan batas *recovery* yang dapat diterima (80%-120%).

Tabel 1. Nilai akurasi dan linieritas teknik

Sampel	Kadar folat (ng/mL)	Kadar folat setelah di- <i>spiked</i>	% <i>recovery</i>
Serum a	10,57	19,85 ^a	92.8
1:2		10,67 ^b	107
1:4		5,97 ^b	120
1:8		2,98 ^b	119
Serum b	11,30	19,45 ^a	81.5
1:2		11,61 ^b	119
1:4		5,534 ^b	113
1:8		2,4 ^b	123,58

Linieritas sampel folat serum dilakukan dengan penambahan 10ng/mL standar folat (*spike*) kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:2, 1:4, dan 1:8.

Berdasarkan hasil linieritas menunjukkan secara umum respon serum setelah ditambahkan folat standar (10ng/ml) dan diencerkan secara bertingkat pada serum a masih menghasilkan respon yang proporsional pada kisaran atau rentang kurva standar dengan rentang nilai *recovery* 80%-120%. Namun, nilai *recovery* serum b pada pengenceran 1:8 tidak masuk kedalam batas rentang *recovery* sehingga belum menghasilkan respon pengenceran yang sesuai pada rentang kurva standar.(tabel 1) Hal ini mungkin disebabkan oleh terdapat komponen matriks (protein serum) yang mengganggu deteksi folat serum pada pengenceran 1:8

DAFTAR PUSTAKA

- Iyer R & Tomar SK. Folate: a functional food constituent. Journal of Food Science 74. 2009: 114–122

2. Ball, G. F. M. *Vitamins In Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability*. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL., 2006. 231-237
3. Bailey LB. *Folate in Health and Disease*. Edisi Kedua. CRC Press. Boca roton. 2010: 26-28.
4. Ibrahim W, Tousson E, El-Masry T, Arafa N, Akela M. The effect of folic acid as an antioxidant on the hypothalamic monoamines in experimentally induced hypothyroid rat. *Toxicol Ind Health*. 2012; 28: 253-61.
5. Depkes. Tabel Angka Kecukupan Gizi 2013 bagi orang Indonesia. Diunduh dari <http://gizi.depkes.go.id/download/Kebijakan%20Gizi/Tabel%20AKG.pdf> [21 april 2017]
6. World Health Organization. Serum and Red Blood Cell Folate Concentrations for Assessing Folate Status in Populations.[internet]. 2012. [tanggal akses 2 juli 2016], didapat dari: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO_NMH_NHD_EPG_12.1_eng.pdf.
7. Sigdel TK and Sarwal, M.M. Discovery and Customized Validation of Antibody Targets by Protein Arrays and Indirect ELISA. *Methods Mol Biol*. 2013 ; 1034: 373–84.
8. Salter DN, Scott KJ, Slade H, Andrews P. The preparation and properties of folate-binding protein from cow's milk. *Biochem J*. 1981; 193:469-476.
9. Nixon, P.F., Jones, M., dan Winzor, D.J. Quantitative description of the interaction between folate and the folate-binding protein from cow's milk. *Biochem J*. 2004; 382: 215-21
10. Balbol LN, Jagerstad M. Folate-binding protein in milk: a review of biochemistry, physiology, and analytical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011; 52: 411-412.
11. Svendsen I.B , Hansen S.I., Holm J., Lyngbye J. Amino acid sequence homology between human and bovine low molecular weight folate binding protein isolated from milk. *Carls berg Res Commun*, 47 (1982), pp. 371–376
12. Hoier-Madsen, M., Hansen, S.I., and Holm, J. Rabbit antibodies against the folate binding protein from cow's milk-production, characterisation and use for development of an enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). *Biosci Rep*.1986; 6: 895–900.
13. Mardiana. Penggunaan protein ikat folat (PIF) dari susu sapi untuk mengukur kadar folat serum [Thesis]. Jakarta. 2005: Universitas Indonesia.
14. Subandrate, Gunarti DR, Sadikin M. Properties of Folate Binding Protein Purified From Cow's Milk. *Hayati J of Biosciences*. 2012; 19(3) : 105-109.
15. Salter, D. N., Ford, J. E., Scott, K. J., dan Anderson, P. Isolation of folate binding protein from cows milk by the use of affinity chromatography. *Fe Eur Biochem Soc lett*. 1972; 20: 302-6.
16. Selhub, J., Ahmad, O., and Rosenberg, I.H. Preparation and use of affinity columns with bovine milk folate-binding protein covalently linked to Sepharose 4B. *Methods Enzymol*. 1980; 66: 686-690.
17. Iwai, K., Tani, M. and Fushika, T. *Electrophoretic and immunological properties of folate-binding protein isolated from bovine milk*. *Agric Biol Chem*. 1983; 47: 1523–30.
18. Crowther, J.R. *The ELISA Guide Book Methods in Molecular Biology*. The International Atomic Energy Agency. Vienna. Austria. Humana Press Inc Totawa, New Jersey. 2001.
19. Riyanto. Validasi & verifikasi metode uji. Depublish. Yogyakarta. 2014. 32-33.
20. Andreasson, U., Liaudet, A.P, Van wallwijk vandoorn, L.J.C, Iennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, et al. A practical guide to immunoassay method validation. *Front Neurol*. 2015; 6: 93-101

