

DAFTAR PUSTAKA

- Asimakopoulos B., Milousis A., Gioka T., Kabouromiti G., Gianisslis G., Troussa A.. (2009), Serum pattern of circulating adipokines throughout the physiological menstrual cycle, *Endocr .J.*, 56: 425 – 433.
- Avram MM, Avram AS, James WD, 2007. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 56:472–492.
- Auguet, T., Quintero, Y., Riesco, D., Morancho, B., Terra, X., Crescenti, A., Broch, M., Aguilar, C., Olona, M., Porras, J.A, Hernandez, M. Sabench, F., Castillo, Daniel del and Richart, C., (2011), New Adipokines Vaspin and Omentin. Circulating Levels and Gene Expression in Adipose Tissue from Morbidly Obese Women. *BMC Med. Gen.*,12: 1-8
- Bluher, M., (2012), Vaspin in obesity and diabetes: pathophysiological and clinical significance, *Endocrine*, 41: 176–182
- Boos, C.J., Lip, G.Y.H., (2006), Is Hypertension an Inflammatory Process?, *Curr. Pharmacol. Des.*, 12: 1623-1635
- Cenik, B., Sephton, C.F., Cenik, B.K., Herz, J. and Yu, G., (2012), Progranulin: A Proteolytically Processed Protein at the Crossroads of Inflammation and Neurodegeneration, *J Biol Chem* 287: 1-13
- Chiu, C.P., Chen. S. D., (2009), Study on the Relationship Between Body Mass Index (BMI) and Serum Alanine Aminotransferase (ALT) in Taiwanese with Non-Metabolic Obesity, *Formos J. Endocrinol. Metab.*, 1:16-22
- Choi, Sung Hee, Kwak, Soo Heon, Lee, Y., Min, K.M, Lim, Soo., Park, Y. J., Jang, H.C. and Kim, M.S., (2011), Plasma Vaspin Concentrations are Elevated in Metabolic Syndrome in Men and are Correlated with Coronary Atherosclerosis in Women, *Clin. Endocrinol.*, 75: 628-635
- Egger, G., (2011), Obesity, Chronic Disease, and Economic Growth: A Case for “Big Picture” Prevention. *Adv Prev Med*, 2011: 1-6

- Emanuela, F., Grazia, M., Marco, D.R., Paola, L.M., Giorgio, F. and Marco, B., (2011), Inflammation as a Link Between Obesity and Metabolic Syndrome, *J. Nutr. Metab.*, 2012: 1-7
- Gonzalez, C. R., Caminos, J. E., Vazquez, M. J., Garces, M. F., Cepeda, Angel, A., L. A., Gonzalez, A. C., Garcia-Rendueles, M. E., Sangiao-Alvarellos, S., Lopez, M., S.B.Bravo, S. B., Nogueiras, R., Dieguez, C.,(2009), Regulation of visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor by nutritional status, metformin, gender and pituitary factors in rat white adipose tissue, *J. Physiol.*, 587:3741-3750
- Gustafson, B., (2010), Adipose Tissue, Inflammation and Atherosclerosis, *J. of Atheroscler. and Thromb.*, 17:1-10
- Hida, K., Wada, J., Eguchi, J., Zhang, H., Baba, M., Seida, A., Hashimoto, I., dkk., (2005), Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(30): 10610-10615
- Jialal, I., Devaraj, S. 2001. Inflammation and Atherosclerosis The Value of the High-Sensitivity C-Reactive Protein Assay as a Risk Marker. *Am. J. Clin. Pathol.*, 116: 108-105.
- Koiou, E., Kalaitzakis, E., Tziomalos, K., Mavridis, S., Dinas, K., Tantanasis, T., Katsikis, I., Loufopoulos, A., Panidis, D., (2011), Vaspin: a novel adipokine, member of the family of serine protease inhibitors, *Aristotle Univ Med J*, 38: 7-18
- Li, Q., Chen, R., Moriya, J., Yamakawa, J., Sumino, H., Kanda, T., Takahashi, T., (2008), A Novel Adipocytokine, Visceral Adipose Tissue-Derived Serine Protease Inhibitor (Vaspin), and Obesity. *J. Intern. Med. Res.*, 36: 625-629
- Lumeng, C. N., Saltiel, A. R., (2011),Inflammatory links between obesity and metabolic disease, *J. Clin. Invest.*,121: 2111-2117
- Marques, B.G., Hausman, D. B., dan Martin, R. J. (1998). Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of obesity. *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.*, 275: 1898 – 1908.
- Matsubara, T., Mita, A., Minami, K., Hosooka, T., Kitazawa, S., Takahashi, K., Tamori, Y., Yokoi, N., Watanabe, M., Matsuo, E., Nishimura, O., Seino, S., (2012), PGRN is a Key Adipokine Mediating High Fat Diet-Induced

- Insulin Resistance and Obesity through IL-6 in Adipose Tissue, *Cell Metab.*, 15: 38–50
- Monteiro, R., Azevedo, I., (2010), Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome, *Mediators Inflamm.*, 2010: 1-10
- Muynck, L. E., Damme, P. V., (2011), Cellular Effects of Progranulin in Health and Disease, *J. Mol. Neurosci.*, 45:549–560
- Nathan, C., Ding, A., (2010), Nonresolving Inflammation, *Cell*, 140: 871–882
- Okamoto, Y., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, T., Libby, P., (2006), Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome, *Clin. Sci.*, 110: 267-278
- Okura, H., Yamashita, S., Ohama, T., Saga, A., Kakuta, A. Y., Hamada, Y., Sougawa, N., Ohyama, R., Sawa, Y., dan Matsuyama, A., (2010), HDL/Apolipoprotein A-I Binds to Macrophage-Derived Progranulin and Suppresses its Conversion into Proinflammatory Granulins, *J. Atheroscler. Thromb.*, 17(6): 568 - 577
- Ong, C.H.P., dan Bateman, A., (2003), Progranulin (Granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, Acrogranin) in proliferation and tumorigenesis, *Histol. Histopathol.*, 18: 1275 - 1288
- Papizan, James B.,(2007), Phosphorylation of Fetuin-A. Physiological inhibitor of Insulin Action, Regulated by Insulin and Leptin. Alabama: Program Pascasarjana Universitas Auburn
- Pearson, T.A., Mensah, G.A., dan Alexander, R.W., (2003), Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice a Statement for Healthcare Professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association, *Circulation*, 107: 499-511
- Pepys, M. B., Hirschfield, G. M.,(2003),C-reactive protein: a critical update, *J. Clin. Invest.*, 111: 1805-1812
- Rocha, V. Z., Folco, E. J., (2011), Inflammatory Concepts of Obesity, *Int. J. Inflamm*, 2011 : 1-14
- Rabe, K., Lehrke, M., Parhofer, K. G., Broedl, U.C., (2008), Adipokines and Insulin Resistance, *Mol. Med.*, 14: 741-751

- Saalbach, A., Vester, K., Rall, K., Tremel, J., Anderegg, U., Sickinger, A.G.B., Bluher, M., Simon, J.C., (2012), Vaspin – a link of obesity and psoriasis?, *Exp. Dermatol.*, 21 : 299–319
- Shehzad, A., Iqbal, W., Shehzad, O, Lee, Y. S., (2012), Adiponectin: Regulation of its production and its role in human diseases, *HORMONES*, 11: 8-20
- Tilg H, Hotamisligil, GS., (2006), Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance, *Gastroenterology*, 131:934–45
- Tonjes, A., Fasshauer, M., Kratzsch, J., Stumvoll, M., Bluher, M. (2010), Adipokine Pattern in Subjects with Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance in Comparison to Normal Glucose Tolerance and Diabetes, *Plos One*, 5 : 2-6
- Trayhurn, P., Wood, I. S., (2004), Adipokines: Inflammation and The Pleiotropic Role of White Adipose Tissue, *Br. J. Nutr.*, 92: 345-355.
- Tang, W., Lu, Y., Tian, Q. Y., Zhang, Y., Guo, F. J., Liu, G. Y., Syed, N. M., Lai, Y., Lin, E. A. Kong, L., Su, J., Yin, F., Ding, A. H., Zhorov, A. Z., Dustin, M. L., Tao, J., Craft, J., Yin, Z., Feng, J. Q., Abramson, S.B., Yu, X. P., Liu, C.J., (2011), The Growth Factor Progranulin Binds to TNF Receptors and Is Therapeutic Against Inflammatory Arthritis in Mice, www.scienceexpress.com
- Verrijken, A., Francque, S., Gaal, L.V., (2011), The Role of Visceral Adipose Tissue in the Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease, *Eur Endocrinol*, 7(2): 96–103
- Wang, Z. and Nakayama, T., (2010), Inflammation, a Link between Obesity and Cardiovascular Disease, *Mediators. Inflamm.*, 2010: 1-17
- Youn, Byung-Soo, Bang, Sa-Ik, Kloting, N. Park, J.W., Lee, N., Oh, Ji-Eun, Pi, Kyung-Bae, Lee, T. H., Ruschke, K., Fasshauer, M., Stumvoll, M. and Bluher, M., (2009), Serum Progranulin Concentration May Be associated With Macrophage Infiltration Into Omental Adipose Tissue, *Diabetes*, 58: 627-636

Zhu, J., Nathan, C., Jin, W., Sim, D., Ashcroft, G.S., Wahl, S.M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wright, C.D., Ding, A., (2002), Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair, *Cell*, 111: 867-878

Lampiran 1. Lembar *Inform Consent*

FORMULIR PERSETUJUAN MENGIKUTI PENELITIAN SETELAH MENDAPAT PENJELASAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama :

Umur :

Alamat :

setelah mendengar/membaca dan mengerti penjelasan yang diberikan baik mengenai tujuan, manfaat apa yang akan diperoleh pada penelitian ini, serta risiko yang mungkin terjadi, maka dengan ini saya menyatakan setuju untuk ikut dalam penelitian ini secara sukarela tanpa paksaan. Saya dengan ini menyetujui semua data saya yang dihasilkan dalam penelitian ini disajikan dalam bentuk lisan maupun tulisan.

Saya memahami bahwa keikutsertaan saya ini bersikat sukarela tanpa paksaan, sehingga saya bisa menolak ikut atau mengundurkan diri dari penelitian ini tanpa kehilangan hak saya untuk mendapat pelayanan kesehatan. Juga saya berhak bertanya atau meminta penjelasan bila masih ada hal yang belum jelas atau masih ada hal yang ingin saya ketahui tentang penelitian ini.

	NAMA	TANDA TANGAN	TG/BLN/THN
Klien
Saksi 1
Saksi 2

Penanggung Jawab Penelitian :

Nama : Rosalia Englina Napitupulu, S. Si., Apt.
 Alamat : Prodia Tower, Lantai 6, Jl. Kramat Raya No. 150, Jakarta Pusat
 Telepon : 08119502768

Penanggung jawab Medis :

Nama : dr. Diah
 Alamat : Prodia Tower, Lantai 2, Jl. Kramat Raya No. 150, Jakarta Pusat
 Telepon : 021-3144182

<p>DISETUJUI OLEH KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FK UNHAS Tgl 18 April 2013</p>
--

Lampiran 2. Lembar Wawancara Pasien Penelitian

LEMBAR WAWANCARA PASIEN PENELITIAN

No Pasien	:	_____	Lingkar Perut	:	_____	cm
Nama Pasien	:	_____	Tinggi Badan	:	_____	cm
Jenis Kelamin	:	Laki-laki	Berat Badan	:	_____	kg
Tanggal Lahir	:	_____	Tekanan Darah	:	_____	mmHg
No Telp / HP	:	_____	Suhu Tubuh	:	_____	
E-mail	:	_____				Demam / Tidak Demam
Alamat	:	_____	Tgl Wawancara	:	_____	
		_____	Tgl Pengambilan	:	_____	
		_____	Sampel /Jam	:	_____	

Riwayat penyakit yang pernah diderita

Riwayat Keluarga Obesitas	:	Ya / Tidak
Diabetes	:	Ya / Tidak
Hipertensi	:	Ya / Tidak
Riwayat PJK	:	Ya / Tidak
Dislipidemia	:	Ya / Tidak
Penyakit/Gangguan Ginjal	:	Ya / Tidak
Hepatitis	:	Ya / Tidak
Gangguan Fungsi Hati	:	Ya / Tidak
Sakit Gigi	:	Ya / Tidak
Demam/Flu dalam 2 minggu Terakhir	:	Ya / Tidak

Obat / Suplemen yang sedang dikonsumsi dalam 2 minggu terakhir

Penurun Lipid	:	Ya / Tidak	Jenis Obat	:	
Kortikosteroid	:	Ya / Tidak	Jenis Obat	:	
Antibiotik	:	Ya / Tidak	Jenis Obat	:	
Suplemen Antioksidan	:	Ya / Tidak	Frekuensi	:	Ya
Suplemen lainnya	:	/ Tidak	Frekuensi	:	
Sedang dalam Terapi Pengobatan Lain	:	Ya / Tidak	Jenis Obat	:	

Rutinitas

Merokok	:	Ya / Tidak	Jumlah/hari	:	
Minum Alkohol	:	Ya / Tidak	Jumlah/hari	:	
Olah Raga	:	() < 1 kali seminggu			
		() 1-3 kali seminggu @ jam			
		() > 4 kali seminggu @ jam			

Lampiran 3. Rekomendasi Persetujuan Etik



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN**

Sekretariat : Lantai 3 Gedung Laboratorium Terpadu
JL.PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10, Makassar. Telp. (0411)5780103, Fax (0411) 581431.
Contact person **dr. Agussalim Bukhari,PhD,SpGK** (HP. 081241850858), email agussalimbukhari@yahoo.com

REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK
Nomor : 611 /H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2013

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, setelah melalui pembahasan dan penilaian, pada rapat tertanggal **20 Maret 2013**, telah memutuskan, protokol penelitian berjudul:

Dinamika Kadar Programulin, Adiponektin dan Vaspin Pada Pria Obesitas Sentral Dibandingkan dengan Pria Non Obesitas Sentral Kajian Terhadap Proses Metaflamasi (hs-CRP)

dengan Peneliti Utama: **Rosalia Englina Napitupulu.,S.Si, Apt**

No. Register

U	H	1	3	0	3	0	0	9	8
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

yang diterima pada tanggal: **5 Maret 2013**

Perbaikan diterima tanggal: **16 April 2013**

dapat disetujui untuk dilaksanakan di Jakarta Indonesia.
Persetujuan Etik ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian.

Pada akhir penelitian, **laporan pelaksanaan penelitian** harus diserahkan kepada KEPK Fakultas Kedokteran Unhas. Jika ada perubahan protokol dan /atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Makassar, 18 April 2013

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fak. Kedokteran Unhas



Prof.Dr.dr.Suryani As'ad,M.Sc,Sp.GK
NIP 19600504 1986 01 2 002

Lampiran 4. Kualitas Mutu (QC) Pemeriksaan Progranulin

No.	Standar	CV (%)
1.	Standar 1	0,00
2.	Standar 2	5,44
3.	Standar 3	9,06
4.	Standar 4	6,38
5.	Standar 5	6,06
6.	Standar 6	2,33
7.	Standar 7	0,51

Lampiran 5. Kualitas Mutu (QC) Pemeriksaan Granulin

No.	Standar	CV (%)
1.	Standar 1	6,43
2.	Standar 2	2,24
3.	Standar 3	1,11
4.	Standar 4	2,32
5.	Standar 5	3,32
6.	Standar 6	1,37
7.	Standar 7	0,96

Lampiran 6. Kualitas Mutu (QC) Pemeriksaan Vaspin

No	Kontrol	Hasil Kontrol	Range control ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)
1	Positif	1,372	0.031 - 2 ng/mL	0,00
2	Negatif	0,22	0.031 - 2 ng/mL	0,00

No.	Standar	CV (%)
1.	Standar 1	0,00
2.	Standar 2	3,31
3.	Standar 3	5,53
4.	Standar 4	0,29
5.	Standar 5	4,32
6.	Standar 6	0,00
7.	Standar 7	0,00

Lampiran 7. Prosedur Kerja Pemeriksaan Progranulin

Prinsip :

Pemeriksaan ini menggunakan teknik kuantitatif *sandwichenzyme immunoassay technique*. Progranulin sebelumnya dilapisi di atas *microplate*. Standar dan sampel di-pipet ke dalam *well-well* dan Progranulin yang ada akan diikat oleh antibodi. Setelah pencucian senyawa yang tidak terikat, antibodi *enzyme-linked monoclonal* spesifik untuk Progranulin dimasukkan ke dalam *well-well*. Kemudian dilakukan pencucian untuk menghilangkan reagen antibodi-enzim yang tidak terikat, setelah itu ditambahkan larutan substrat ke dalam *well-well* dan terbentuklah warna yang sesuai dengan jumlah Progranulin yang diikat. Pembentukan warna berhenti dan dilakukan pengukuran intensitas warna.

Spesimen:

Serum.

Prosedur:

1. Persiapkan reagen, standardan sampel.
2. Lepaskan strip *microplate* yang berlebih dari bingkai plat, kembalikan ke kantong foil yang mengandung pak pengering.
3. Tambahkan 100 μ l Assay Diluent RD1-5 pada masing-masing *well*
4. Tambahkan 50 μ l Standar, control atau sampel di tiap *well* dalam waktu 15 menit. Tutup dengan strip yang disediakan. Inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Susunan plat untuk mencatat letak standardan sampel sudah disediakan.
5. Aspirasi tiap *well* dan cuci, ulangi proses sebanyak tiga kali sehingga total pencucian empat kali. Cuci dengan cara mengisi tiap *well* dengan Wash Buffer (400 μ l) menggunakan botol semprot, atau *autowasher*. Penghilangan sempurna cairan di setiap langkah merupakan hal yang sangat penting. Setelah pencucian terakhir, hilangkan Wash Buffer yang tersisa dengan cara aspirasi atau dituang. Balikkan plat dan hadapkan ke kertas tisu yang bersih.
6. Tambahkan 200 μ l konjugat progranulin ke tiap *well*. Tutup dengan strip. Inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang.

7. Ulangi aspirasi/pencucian seperti tahap 5.
8. Tambahkan 200 μ l larutan substrat ke tiap *well*. Inkubasi selama 30 menit di suhu ruang. Lindungi dari cahaya.
9. Tambahkan 50 μ l *Stop Solution* ke tiap *well*. Warna di dalam *well* akan berubah dari biru menjadi kuning. Jika warna dalam *well* adalah hijau atau warna tidak seragam, maka perlahan ketukkan plat untuk memastikan pencampuran menyeluruh.
10. Tentukan densitas optik di tiap *well* selama 30 menit, menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450nm. Jika koreksi panjang gelombang tersedia, atur pada 540 nm atau 570 nm. Kurangi pembacaan dari 540 nm atau 570 nm sampai pembacaan 450 nm. Pembacaan yang langsung pada 450 nm tanpa koreksi, dapat memberikan hasil lebih besar dan kurang akurat.

Lampiran 8. Prosedur Kerja Pemeriksaan Granulin

Prinsip :

Pemeriksaan menggunakan teknik *quantitative sandwich enzyme immunoassay*. Antibodi spesifik terhadap GRN sebelumnya dilapisi di atas *microplate*. Standar dan sampel di-pipet ke dalam *well-well* dan GRN yang ada akan diikat oleh antibodi. Setelah pencucian senyawa yang tidak terikat, antibody *biotin-conjugated* spesifik untuk GRN dimasukkan ke dalam *well-well*. Setelah pencucian, *avidin conjugated Horseradish Peroxidase (HRP)* ditambahkan ke dalam *well-well*. Setelah pencucian untuk menghilangkan reagen avidin-enzim yang tidak terikat, setelah itu ditambahkan larutan substrat ke dalam *well-well* dan terbentuklah warna yang sesuai dengan jumlah GRN yang diikat, Pembentukan warna berhenti dan dilakukan pengukuran intensitas warna.

Spesimen:

Serum

Prosedur:

1. Persiapkan reagen, standar dan sampel.
2. Mengacu ke *Assay Layout Sheet* untuk menentukan jumlah *well* yang digunakan dan letakkan sisa *well* dan pengering ke dalam kantong dan tutup, simpan *well* tidak terpakai pada suhu 4°C.
3. Tambahkan 100 µl Standar dan sampel di tiap *well*. Tutup dengan strip yang disediakan. Inkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Susunan plat untuk mencatat letak standardan sampel sudah disediakan.
4. Hilangkan cairan pada tiap *well*, jangan dicuci.
5. Tambahkan 100 µl **Biotin-antibody (1x)** ke tiap *well*. Tutup dengan strip yang baru. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. (**Biotin-antibody (1x)** bias terlihat berawan. Hangatkan sampai suhu ruang dan goyangkan perlahan sampai larutan merata).
6. Aspirasi tiap *well* dan cuci, ulangi proses sebanyak dua kali sehingga total pencucian tiga kali. Cuci dengan cara mengisi tiap *well* dengan *Wash*

Buffer (200 μ l) menggunakan botol semprot, pipet *multi-channel* atau *autowasher* dan biarkan selama 2 menit. Penghilangan sempurna cairan di setiap langkah merupakan hal yang sangat penting. Setelah pencucian terakhir, hilangkan *Wash Buffer* yang tersisa dengan cara aspirasi atau dituang. Balikkan plat dan hadapkan ke kertas tisu yang bersih.

7. Tambahkan 100 μ l **HRP-avidin (1x)** ke tiap *well*. Tutup plat *microtiter* dengan strip. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
8. Ulangi aspirasi/pencucian seperti tahap 6.
9. Tambahkan 90 μ l **TMB Substrate** ke tiap *well*. Inkubasi selama 15-30 menit di suhu 37°C. Lindungi dari cahaya.
10. Tambahkan 50 μ l *Stop Solution* ke tiap *well*. Ketukkan plat secara perlahan untuk memastikan pencampuran menyeluruh.
11. Tentukan densitas optik di tiap *well* dalam waktu 5 menit, menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm. Jika koreksi panjang gelombang tersedia, atur pada 540 nm atau 570 nm. Kurangi pembacaan dari 540 nm atau 570 nm sampai pembacaan 450 nm. Pembacaan yang langsung pada 450 nm tanpa koreksi, dapat memberikan hasil lebih besar dan kurang akurat.

Lampiran 9. Prosedur Kerja Pemeriksaan Vaspin

Prinsip:

Standar, *quality controls*, dan sampel diinkubasi di *microtitration well* yang sebelumnya dilapisi dengan antibody *polyclonal anti-human vaspin*. Setelah inkubasi 60 menit diikuti pencucian, *biotin labeled polyclonal anti-human vaspin antibody* ditambahkan dan diinkubasi dengan vaspin selama 60 menit. Setelah pencucian berikutnya, *streptavidin-HRP conjugate* ditambahkan. Setelah inkubasi 30 menit dan pencucian terakhir, sisa konjugasi dibiarkan untuk bereaksi dengan larutan substrat (TMB). Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan asam dan diukur absorbansi produk yang dihasilkan yang berwarna kuning. Absorbansi sebanding dengan konsentrasi vaspin. Kurva standar dibuat dengan cara menempatkan nilai-nilai absorbansi standar, dan konsentrasi sampel yang tidak diketahui dapat ditentukan.

Spesimen:

Serum

Prosedur:

1. Pipet 100 µl standar, *quality controls*, *Dilution Buffer* dan larutan sampel, sebaiknya diduplikatkan, ke dalam *well-well*.
2. Inkubasi plat pada suhu ruang (25°C) selama 1 jam, goyang pada 300 rpm pada *orbital microplate shaker*.
3. Cuci *well* sebanyak 5 kali menggunakan larutan pencuci (0,35 ml tiap *well*). Setelah pencucian terakhir, balikkan dan ketukkan plat dengan kuat menghadap kertas tisu.
4. Tambahkan 100 µl larutan *Biotin Labelled Antibody* ke tiap *well*.
5. Inkubasi plat pada suhu ruang (25°C) selama 1 jam, goyang pada 300 rpm pada *orbital microplate shaker*.
6. Cuci *well* sebanyak 5 kali menggunakan larutan pencuci (0,35 ml tiap *well*). Setelah pencucian terakhir, balikkan dan ketukkan plat dengan kuat menghadap kertas tisu.
7. Tambahkan 100 µl konjugat *Streptavidin-HRP* ke tiap *well*.

8. Inkubasi plat pada suhu ruang (25°C) selama 30 menit, goyang pada 300 rpm pada *orbital microplate shaker*.
9. Cuci *well* sebanyak 5 kali menggunakan larutan pencuci (0,35 ml tiap *well*). Setelah pencucian terakhir, balikkan dan ketukkan plat dengan kuat menghadap kertas tisu.
10. Tambahkan 100 µl larutan substrat ke tiap *well*. Hindari paparan plat *microtiter* terhadap cahaya langsung. Tutup plat (misal dengan *aluminium foil*).
11. Inkubasi plat selama 10 menit pada suhu ruang. Waktu inkubasi dapat dilebihkan (sampau 20 menit) jika suhu reaksi di bawah 20°C. Jangan aduk plat selama inkubasi.
12. Hentikan pembentukan warna dengan penambahan 100 µl *Stop Solution*.
13. Tentukan absorban di tiap *well* menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450nm. Lebih baik dimulai dari 630 nm (rentang yang diterima: 550-650 nm). Kurangi pembacaan dari 630 nm (550-650 nm) untuk pembacaan 450 nm. Pembacaan harus berlangsung dalam waktu 5 menit setelah langkah ke-12.