

## DAFTAR PUSTAKA

- Alter, M.L., Kreschmer, A., Websky, K.V., Tsuprykov, O., Reichetzeder, Simon, A., Stasch, J.P., Hocher, B., 2012, Early Urinary and Plasma Biomarkers for Experimental Diabetic Nephropathy in *Clin. Lab* 58: 659-671
- Ambade, V., Singh, P., Somani, B.L., Basannar, D., 2006, Urinary N-Acetyl beta Glucosaminidase and Gamma Glutamyl Transferase are Early Markers of Diabetic Nephropathy in *Indian J Clin Biochem*: 21(2):142-148
- Andy, K.H.L. dan Tesch, G.H., 2012, Inflammation in Diabetic Nephropathy in *Mediators of Inflammation*. 2012:1-12
- Arsono, S., 2005, *Diabetes Mellitus sebagai Faktor Risiko Kejadian Gagal Ginjal Terminal (Studi Kasus Pada Pasien RSUD Prof. Margono Soekarjo Purwokerto)*. Tesis tidak diterbitkan. Semarang: Program Pasca Sarjana UNDIP
- Arya, A., Aggarwal, S., Yadav, H.N., 2010, Pathogenesis of Diabetic Nephropathy in *Int Journ of Pharm Pharm Sci*. 2 (4) : 24-29
- Brownlee, M., 2005, Banting Lecture 2004 : The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism in *Diabetes* 54 :1615-1625
- Choudhary, N., dan Ahlawat, R.S., 2008, Interleukin-6 and C-Reactive Protein in Pathogenesis of Diabetic Nephropathy: New evidence Linking Inflammation, Glycemic Control and Microalbuminuria in *IJKD*. 2(2):72-79

- Cohen-Bucay, A. and Viswanathan, G., 2012, Urinary Markers of Glomerular Injury in Diabetic Nephropathy in *Int J Nephrol.* 2012:1-11
- Cohen P. Margo, Shearman, C.W., Lautenslager, G.T., 2001, Serum Type IV Collagen in Diabetic Patients at Risk for Nephropathy in *Diabetes Care.* 24 (8): 1324 – 1327
- Cohen P. Margo, Gregory T. Lautenslager, Clyde W. Shearman, 2001, Increased Collagen IV Excretion in Diabetes: a Marker of Compromised Filtration Function in *Diabetes Care.* 24(5): 914-918
- Dronovalli, S., Duka, I., and Bakris, G.L., 2008, The Pathogenesis of Diabetic Nephropathy in *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 4(8): 444 - 452
- Festa, A., D'Agustino, R., Howard, G., Mykkanen, L., Tracy, R.P, Haffner, S.M., 2000, Inflammation and Microalbuminuria in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Subjects: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study in *Kidney Intl.* 58:1703-1710
- Fucks, T.C., and Hewitt, P. (2011), Preclinical Perspective of Urinary Biomarkers for the Detection of Nephrotoxicity: What We Know and What We Need to Know in *Biomarkers Med* 5(6):763-779
- Gatua, W.K., Makumi, J.N., Njagi, E.M., Kigundu, C.S., Mcligeyo SO, Waithaka SK, 2011, Evaluation of Urinary Tubular Enzymes as Screening Markers of Renal Dysfunction in Patients Suffering from Diabetes Mellitus in *Asian J Med Sci.* 3(3):84- 90
- Giacco, F. and Brownlee, M., 2010, Oxidative Stress and Diabetic Complications in *Circ Res.*107:1058-1070
- Girton, R., Sundin, D.P., Rosenberg, M.E., 2002, Clusterin Protect Renal Tubular Epithelial Cells from Gentamicin-Mediated Cytotoxicity in *Am J Physiol Renal Physiol.* 282:F703-F709

- Goldin, A., Beckam, J.A., Schimdt, A.M., and Creager, M.A., 2006, Advanced Glycation End Product: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury in *Circulation*.114:597-605
- Granier, C., Makni K., Molina L., Jardin-Watelet B., Ayadi H., and Jaraya F., 2008, Gene and Protein Markers of Diabetic Nephropathy in *Nephrol Dial Transplant*. 23:792-799
- Gupta, J., Mitra N, Kanetsky P.A, Devaney J, Wing MR, Reily, et al, 2012, Association Between Albuminuria, Kidney Function, and Inflammatory Biomarker Profile in CKD in CRIC in *Clin J Am Soc Nephrol*. 7(12):1938-1946
- Hanigan, M.H., Iykissa E.D., Townsend, D.M, Ou, C.N, Barios, R., Lieberman M.W., 2001, Gamma-Glutamyl Transpeptidase-Deficient Mice are Resistant to The Nephrotoxic Effects of Cisplatin in *Am J Pathol*. 159(5):1889-1894
- Hidaka, S., Kranzlin B., Gretz N., Witzgall R., 2002, Urinary Clusterin Level in the Rat Correlate with the Severity of Tubular Damage and May Help to Differentiate Between Glomerular and Tubular Injuries in *Cell Tissue Res*. 310: 289-296
- Ikenaga, H., Suzuki, H., Ishii, N., Itoh, H., Saruta, T., 1993, Enzymuria in Non-Insulin Diabetic Patients: Sign Of Tubular Cell Dysfunction in *Clin Sci*. 84 (4): 469-475
- Kawahito, S., Kitahata, H., Oshita, S., 2009, Problems Associated with Glucose Toxicity: Role of Hiperglicemia-induced Oxidative Stress in *Word J Gastroenterol*. 15(33):4137-4142.
- Karakani, A.M., Asgharzadeh-Haghighi, S., Ghazi-Khansari, M., Hosseni, R., 2007, Determination of Urinary Enzymes as a Marker of Early Renal Damage in Diabetic Patients in *J Clin Lab Anal*. 21:413-417

- Khan, M.I., Usman, K., Ashfad F., Himanshu, D., Ali, W., and Idris, M.Z., 2012, Association of hsCRP with Microalbuminuria in Type-2 Diabetic Patients in North India in *Biomed Res.* 23(3): 380-384
- Manaf, 2009, The Common Unifying Mechanism: Pathobiologic of Chronic Complication in T2DM. Makalah disajikan pada simposium ISFI Bukit Tinggi
- Maclsaac R.J., Jerums G., Cooper M.E., 2004. New Insights into The Significance of Microalbuminuria. In *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 13 (1):83-91
- Mohajedi, M.J., Bonakdaran, S., Hami, M., Sheikia, M.R., Shakeri, M.T., Aiotlahi, et al, 2009, Elevated Serum C-Reactive Protein Level in Microalbuminuria Patient with Type 2 Diabetes Mellitus in *Iranian J Kid Dis.* 3 (1):12-16
- Morcos, M., Sayed, A., Angelika, B., Benito, Y., et al, 2002, Activation of Tubular Epithelial Cells in Diabetic Nephropathy in *Diabetes.* 51 (12): 3532-3544
- Navarro, J. F. and Mora, C., 2005, Role of Inflammation in diabetic Complications, *Nephrol. Dial. Transplant.* 20:2601-2604
- Ogawa, S., Matsushima, M., Okamura, M., Senda M., Sakamoto, T., Nako, K., Ito, S., 2012, Urinary Type IV Collagen Excretion Predicts an Increased Urinary-to-Creatinin Ratio in Normoalbuminuric Patients with Diabetes in *Journ Diabetes Mellitus.* 2(4) : 413-426
- Peppia, M., Vlissara, H., 2005, Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications : A General Overview in *Hormones.* 4 (1): 28-37
- Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (PERKENI ), 2011, Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Mellitus Tipe 2 di Indonesia

- Qian, Y., Feldman E., Pennathur, S., Kretzler, M., Brosius, F.C., 2008, Mechanism of Diabetic Glomerulosclerosis in *Diabetes*. 57:1439-1446
- Rivero, A., Mora, C., Muros, Garcia, Herrera, and Gonzalez, 2009, Pathogenic Perspectives For The Role Of Inflammation In Diabetic Nephropathy in *Clin Sci*. 116:479-492
- Rodriguez et al, 2012, Pathophysiological Role and Therapeutic Implication of Inflammation in Diabetic Nephropathy in *World J Diabetes*. 15(3):7-18
- Roopakala M.S, Pawan, H.R., Krishnamurthy U., Wilmadelphine S., Eshwarappa, M., Kumar, K.M.P., 2012, Evaluation of High Sensitivity C-Reactive Protein and Glycated Hemoglobin Levels in Diabetic Nephropathy in *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 23(2): 286-289
- Rosenberg, M.E., Girton, R., Finkel, D., Chmielewski, D., Barrie, A., Witte, D.P., Zhu, G., Bissler, J.J., Harmony, J.A.K. and Aronow, 2002, Apolipoprotein J/Clusterin Prevents a Glomerulopathy of Aging in *Mol Cel Biol*. 22 (6):1893-1902
- Sahib, M.N., 2009, Pathogenesis of Diabetic Kidney Disease: Review of Cellular Aspects of Renal Lesions in *Afr.J.Pharm. Pharmacol*. 3 (11): 507-514
- Solichova, P., Karpisek, M., Ochmanova, R., Hanulova, Z., Humenanska, V., Stejskal, D., Bartek, J., 2007, Urinary Clusterin Concentration – A Possible Marker of Nephropathy? Pilot Studi in *Biomed Pub Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 151(2): 223-236
- Sthaneshwar, P., and Chan Siew-Peng, 2010, Urinary type IV Collagen Levels in Diabetes Mellitus in *Malays J Pathol*. 32 (1):43-47
- Taal, M.W., 2003, Proteinuria: New Information from an Old Friend. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 12:615-617

- Thomas, C.E., Sexton W., Benson, K., 2010, Urine Collection and Processing for Protein Biomarker Discovery dan Quantification in *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19(4):953-959
- Townsend, R., 2007, Mechanism of Diabetic Nephropathy in [www.renalandurologynews.com](http://www.renalandurologynews.com) diakses 30 Oktober 2012
- Vlatkovic V., Stojimirovic B., Obrenovic R., 2007, Damage of Tubule Cells in Diabetic Nephropathy Type 2: Urinary N-Acetyl- $\beta$ -D-Glukosaminidasis and Gamma-Glutamyl-Transferasis in *Vojnosanitetski Pregled.* 64(2):123-127
- Wiyono, P, 2003, Peranan Hiperglikemia Terhadap Terjadinya Komplikasi Kronik Diabetes Mellitus dalam *Berkala Ilmu Kedokteran.* 35 No. 1

Lampiran 1. Lembar *Informed Consent***FORMULIR PERSETUJUAN MENGIKUTI PENELITIAN SETELAH MENDAPAT PENJELASAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : .....

Umur : .....

Alamat : .....

Setelah mendengar/ membaca dan mengerti penjelasan yang diberikan mengenai tujuan, manfaat, serta hal-hal yang bisa terjadi akibat penelitian ini, saya menyatakan setuju untuk berpartisipasi tanpa paksaan dalam penelitian ini.

Saya mengerti bahwa semua hal yang dilakukan oleh peneliti pada saya hanya pengambilan darah saya yang bisa menyebabkan masalah, namun saya percaya kemungkinan tersebut sangat kecil karena dilakukan secara bebas hama oleh petugas yang terlatih.

Saya tahu bahwa keikutsertaan saya ini bersifat 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.

Saya juga mengerti bahwa semua biaya yang dikeluarkan sehubungan dengan penelitian ini, akan ditanggung oleh peneliti. Demikian juga biaya perawatan dan pengobatan bila terjadi hal-hal yang tidak diinginkan akibat penelitian ini, akan dibiayai oleh peneliti.

Saya percaya bahwa keamanan dan kerahasiaan data penelitian akan terjamin dan dengan ini saya menyetujui data saya yang dihasilkan pada penelitian ini disajikan dalam bentuk lisan dan tulisan.

Bila terjadi perbedaan pendapat di kemudian hari kami akan menyelesaikannya secara kekeluargaan.

	<b>NAMA</b>	<b>TANDA TANGAN</b>	<b>TG/BLN/THN</b>
Klien	.....	.....	.....
Saksi 1	.....	.....	.....
Saksi 2	.....	.....	.....

**Penanggung Jawab Penelitian :**

Nama : **Yuliana Sambara**

Alamat : Jl. Hertasing Raya no. 33 Makassar

Telepon : 0813 425 38977

**Penanggung jawab Medis :**

Nama : **Prof. Dr. Mansyur Arief, PhD., SpPK(K)**

Alamat : Jl. G.Batu Putih no. 25 Makassar

Telepon : 0411-872727

<b>DISETUJUI OLEH KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FK UNHAS Tgl 8 April 2013</b>
--

## Lampiran 2. Lembar Wawancara Pasien Penelitian

**LEMBAR WAWANCARA PASIEN PENELITIAN**

No Pasien	:	_____	Lingkar Perut	:	_____	cm
Nama Pasien	:	_____	Tinggi Badan	:	_____	cm
Jenis Kelamin	:	Laki-laki / Perempuan	Berat Badan	:	_____	kg
Umur	:	_____	Tekanan Darah	:	_____	mmHg
No Telp / HP	:	_____	IMT	:	_____	Kg/m <sup>2</sup>
E-mail	:	_____	Tgl Wawancara	:	_____	
Alamat	:	_____	Tgl Pengambilan	:	_____	
			Sampel /Jam	:	_____	

**Riwayat diabetes mellitus tipe 2**

Pertama kali menderita DM	:	Tahun .....
Monitoring kadar glukosa darah puasa	:	Ya / Tidak, Frekuensi :.....x / thn
Monitoring kadar HbA1c	:	Ya / Tidak, Frekuensi :.....x / thn
Penggunaan obat DM	:	Ya / Tidak
- Jenis obat	:	.....
- Frekuensi	:	.....x / hari
Riwayat Penggunaan insulin	:	Ya / Tidak
-Sejak tahun	:	.....
- Frekuensi	:	.....x / hari atau.....x / minggu
Riwayat keluarga DM		
- Ayah	:	Ya / Tidak
- Ibu	:	Ya / Tidak

**Riwayat penyakit yang pernah diderita**

Hipertensi	:	Ya / Tidak
Riwayat penyakit jantung	:	Ya / Tidak
Malignansi/keganasan	:	Ya / Tidak
Penyakit/ Ginjal	:	Ya / Tidak
Hepatitis	:	Ya / Tidak
Gangguan Fungsi Hati	:	Ya / Tidak



**Obat / Suplemen yang sedang dikonsumsi dalam 2 minggu terakhir**

Anti inflamasi	:	Ya / Tidak	Jenis Obat	:
Kortikosteroid	:	Ya / Tidak	Jenis Obat	:
Antibiotik	:	Ya / Tidak	Jenis Obat	:
Suplemen Antioksidan	:	Ya / Tidak	Frekuensi	:
Suplemen lainnya	:	Ya / 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	:	..... x	seminggu	:

## 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 : 614 /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:

*Patomekanisme Kerusakan Ginjal Pada Individu Penderita Diabetes Mellitus Tipe 2 Terkontrol dan Tida terkontrol Kajian Terhadap HbA1c dengan Biomarker Urin ( Gamma Glutamyl Transferase, Albumin, Clusterin dan Kolagen Tipe IV )*

dengan Peneliti Utama: **Yuliana Sambara, SSI**

No. Register

U	H	1	3	0	3	0	1	0	4
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

yang diterima pada tanggal: **7 Maret 2013**

Perbaikan diterima tanggal: **8 April 2013**

**dapat disetujui untuk dilaksanakan di Makassar dan Jakarta.**

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, 22 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 Clusterin Urin

**Human Clusterin**

Tanggal kerja: 17 Mei 2013

Label	Mean (OD)	Std. Dev.	%CV	Conc. ng/mL	Mean (OD)
<b>Standards</b>					
S1	0,036	0,00	1,18E+01	3,125	0,036
S2	0,068	0,00	2,08E+00	6,25	0,068
S3	0,143	0,00	2,97E+00	12,5	0,143
S4	0,299	0,01	3,55E+00	25	0,299
S5	0,564	0,02	3,64E+00	50	0,564
S6	1,047	0,01	5,40E-01	100	1,047
S7	1,737	0,02	1,18E+00	200	1,737

## Lampiran 5. Kualitas Mutu (QC) Pemeriksaan Kolagen Tipe IV Urin

**Human Urinary Collagen IV**

Tanggal kerja: 17-18 Mei 2013

Label	Mean (OD)	Std. Dev.	%CV	Conc. ug/L
<b>Standards</b>				
S1	0,043	0,001	1,66	0,8
S2	0,116	0,000	0,00	3,2
S3	0,424	0,009	2,17	12,5
S4	1,656	0,103	6,23	50

## Lampiran 6. Prosedur Kerja Pemeriksaan Clusterin Urin

### A. Preparasi Reagen dan Sampel

#### 1. Wash Buffer

Larutkan 20 mL *Wash Buffer Concentrate* dengan air destilasi sampai volume total 500 ml ke dalam botol *wash buffer*.

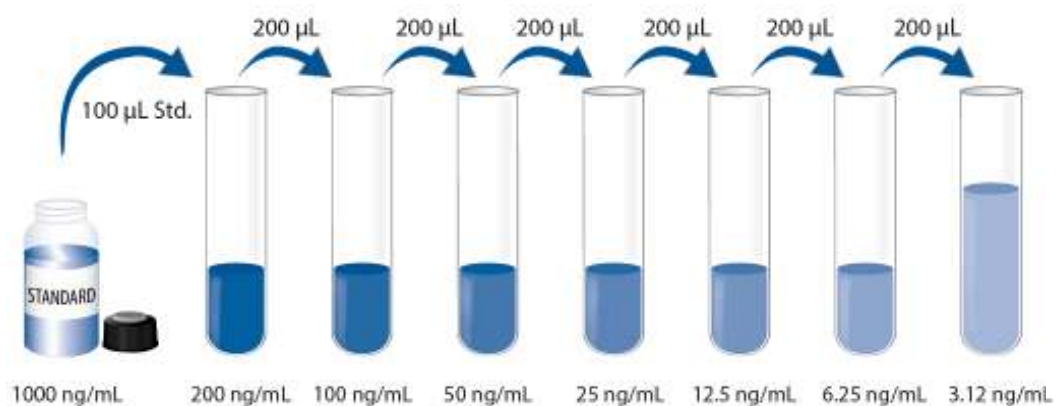
#### 2. Substrat solution

Campurkan reagen warna A dan B dengan jumlah volume yang sama, 15 menit sebelum digunakan. Hindari terkena cahaya. Kebutuhan setiap well adalah 20  $\mu\text{L}$ .

#### 3. Clusterin standard

Rekonstitusi *Standard* clusterin dengan 1.0 mL air deionisasi atau air destilata. Rekonstitusi larutan stok ini mengandung 1000 ng/mL. Campurkan standard pada *shaker* horinsontal dengan agitasi secara perlahan selama minimum 15 menit agar tercampur sempurna

Pipet 400  $\mu\text{L}$  *Calibrator Dlluent RD5T* ke dalam tabung berisi 200 ng/mL. Gunakan larutan stok untuk membuat seri pengenceran selanjutnya (lihat skema). Campurkan dengan baik setiap tabung sebelum melakukan transfer serial berikutnya. Ambil larutan standard 200 ng/mL digunakan sebagai kadar standard yang tinggi. *Calibrator Dlluent RD5T* digunakan sebagai blanko (standard 0 ng/mL)



### B. Preparasi Sampel








Encerkan sampel urine sedikitnya 4 kali tingkat pengenceran. Pipet 50 uL sampel + 150 uL *Calibrator Diluent RD5T*

**C. Prosedur Pemeriksaan:**

1. Siapkan semua reagen, larutan kerja dan sampel seperti yang sudah dibuat sebelumnya
2. Angkat kelebihan microplate dari bingkai plate, simpan pada kantung aluminium berisi paket pengering dan tutup kembali.
3. Tambahkan 100 uL Assay Diluent RD1-19 ke dalam setiap well
4. Tambahkan .50 uL larutan standard, tutup dengan strip perekat yang disediakan. Inkubasi selama 2 jam pada temperatur ruang di atas shaker horisontal (0.12" orbit) yang diatur pada  $500 \pm 50$  rpm. Tata letak plate disiapkan untuk hasil kontrol dan pengukuran sampel
5. Aspirasi dan cuci setiap *well*, ulangi proses ini 3 kali pada 4 kali total pencucian. Pencucian tiap *well* menggunakan *wash buffer* (400 uL) dengan botol semprot, dispenser atau *autowasher*. Buang semua cairan pada setiap tahapan. Setelah pencucian terakhir, buang dengan aspirasi atau dekantasi, hilangkan sisa cairan dengan mengetukkan plate secara terbalik di atas kertas absorban.
6. Tambahkan 200 uL clusterin *conjugate* ke setiap well dan tutup dengan strip penutup baru. Inkubasi selama 2 jam pada temperatur ruang di atas shaker,
7. Ulangi aspirasi/pencucian seperti pada point 5.
8. Tambahkan 200 uL *substrate solution* ke setiap well, inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang di atas *benctop*. Hindarkan dari cahaya
9. Tambahkan 50 uL *Stop Dilution* pada masing-masing well. Warna pada well akan berubah dari biru menjadi kuning. Jika warna dalam sumur hijau atau perubahan warna tidak muncul seragam, tekan dengan lembut plate untuk memastikan pencampuran secara menyeluruh.

10. *Optical density* dibaca pada panjang gelombang 450 nm (panjang gelombang acuan 570-650 nm) dengan *microplate photometer* dalam 30 menit,

#### ASSAY PROCEDURE SUMMARY

1. Prepare reagents, samples, and standards as instructed.  

2. Add 100  $\mu\text{L}$  of Assay Diluent RD1-19 to each well.  

3. Add 50  $\mu\text{L}$  of Standard, control, or sample\* to each well. Incubate for 2 hours on the shaker at RT.  

4. Aspirate and wash 4 times.  

5. Add 200  $\mu\text{L}$  of Conjugate to each well. Incubate for 2 hours on the shaker at RT.  

6. Aspirate and wash 4 times.  

7. Add 200  $\mu\text{L}$  of Substrate Solution to each well. Incubate for 30 minutes **on the benchtop. Protect from light.**  

8. Add 50  $\mu\text{L}$  of Stop Solution to each well. Read at 450 nm within 30 minutes.  
 $\lambda$  correction 540 or 570 nm

\*Most samples require dilution.

## Lampiran 7. Prosedur Kerja Pemeriksaan Kolagen Tipe IV Urin

### A. PREPARASI REAGEN

Buat larutan *Wash Concentrate* 1/10 sebanyak yang dibutuhkan (1 vol *Wash concentrate* : 9 air deionisasi). Setiap baris *well* membutuhkan 15 mL larutan pencuci.

### B. PENGAMBILAN DAN PENYIMPANAN SAMPEL

Gunakan *Urinary Collagen IV Sample Collecting Tubes* untuk menghindari terjadinya hasil yang *low false*. Masukkan urin ke dalam tabung *collecting* menggunakan pipet Pasteur hingga pada tanda garis, campurkan secara perlahan dan homogen. Urin harus dimasukkan ke dalam tabung *collecting* pada hari yang sama dengan utin ditampung meskipun dianalisis dengan segera. Sampel dapat disimpan pada 2 -8 selama seminggu atau 9 bulan pada -20oC. Hindari pembekuan ulang

### C. PROSEDUR PEMERIKSAAN

#### 1. Immunoreaction

- a) Siapkan larutan pencuci yang sudah dibuat sebelumnya
- b) Penempatan sampel pada plate sesuai yang dibutuhkan, 10 well untuk kalibrator
- c) Tambahkan 150 uL Conjugate ke setiap well dengan menggunakan pipet *multichannel*
- d) Tambahkan kalibrator (0 (sebagai buffer), 0.8, 3.2, 12.5 dan 50 ug/L secara duplo dan sampel (50 uL/well) pada *Microassay plate*.
- e) Tutup *Microassay plate* dengan tutup plate dan inkubasi pada suhu ruang (20-27oC) selama 24 jam
- f) Buka tutup plate dan cuci setiap strip sebanyak 5 kali (350 uL/well) dengan *Wash Solution*. Setelah selesai, ketukkan plate dengan kuat pada kertas isap untuk membuang semua larutan pencuci yang masih terdapat pada well.

#### 2. COLOUR DEVELOPMENT

- a) Tambahkan 100 uL Subtrat/well menggunakan pipet *multichannel* dan inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam

#### 3. STOP

- a) Tambahkan 100 uL *Stop Solution/well* menggunakan pipet *multichannel*. Pastikan pencampuran sempurna antara Substrate and Stop Solution
- b) Baca plate pada 450 nm dengan *microplate photometer* dalam waktu 5 menit dan pastikan tidak ada gelembung di setiap *well*.