



Production of Anti-Recombinant Human Insulin Antibody and Validation by Indirect ELISA

Christy Ambarsari¹, Herman Suryadi^{2*}, Arry Yanuar³

¹Department of Pharmaceutical, Medicinal Chemistry, and Bioanalysis, Faculty of Pharmacy, Universitas Indonesia

²Department of Microbiology and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Universitas Indonesia

³Department of Biomedical Computation and Drug Design Laboratory, Faculty of Pharmacy, Universitas Indonesia

Submitted 11 July 2022; Revised 31 October 2022; Accepted 31 October 2022; Published 30 October 2023

*Corresponding author: hsuryadi@farmasi.ui.ac.id

Abstract

Human insulin potential has become an interest and is important in maintaining the success of therapy in patients with the availability of chemical-based analytical methods, however, only a few have been using immunoassays. This study aimed to produce IgG polyclonal antibodies from rabbits immunized with 1 mg/mL rhINS subcutaneously and validated by indirect ELISA. Antibody was precipitated and fractionated on a HiTrap® Protein A HP column before being quantified with a UV spectrophotometer at λ 280 nm. The characterization was conducted by Dot Blot test on a BCIP-NBT substrate, as well as SDS-PAGE and Western Blot with polyacrylamide gel concentrations of 7.5% and 17.5%. Validation was performed using solutions containing glycerol and m-cresol as matrices spiked with rhINS. The linearity test in the rhINS concentration range of 80.11-200.28 μ g/mL ($r = 0.99$) showed the linear result. The accuracy and precision obtained an average of 99.11% $\pm$ 5.01 and 3.91%, while the LOD and LOQ were 22.05 μ g/mL and 73.51 μ g/mL, respectively. Human insulin was stable at 2-8°C for 24 hours (α : 0.05, ANOVA). In conclusion, in-house produced IgG polyclonal antibodies and goat anti-IgG peroxidase conjugate can be used for routine testing of human insulin.

Keywords: Indirect ELISA, glycerol and m-cresol, method validation, rabbit IgG polyclonal antibody, recombinant human insulin.

Pembuatan Antibodi Anti-Insulin *Human* Rekombinan dan Validasi secara ELISA *Indirect*

Abstrak

Potensi insulin *human* telah menjadi minat dan penting dalam menjaga keberhasilan terapi pada pasien, yaitu dengan tersedianya metode analisis berbasis kimia, namun sedikit dengan *immunoassay*. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi antibodi poliklonal IgG dari kelinci yang diimunisasi dengan 1 mg/mL rhINS secara subkutan dan dilakukan validasi secara ELISA *indirect*. Antibodi dimurnikan dan fraksinasi dengan kolom HiTrap® Protein A HP, serta dikuantifikasi dengan spektrofotometer UV λ 280 nm. Karakterisasi dilakukan dengan uji Dot Blot menggunakan substrat BCIP-NBT, serta SDS-PAGE dan Western Blot dengan konsentrasi gel poliakrilamid 7,5% dan 17,5%. Validasi dilakukan menggunakan larutan uji yang mengandung gliserol dan m-kresol sebagai matriks yang di-*spike* dengan rhINS. Uji linearitas pada rentang konsentrasi rhINS 80,11-200,28 μ g/mL ($r = 0,99$) menunjukkan hasil linear. Hasil akurasi dan presisi masing-masing diperoleh rerata 99,11% $\pm$ 5,01 dan 3,91%, sedangkan LOD dan LOQ masing-masing 22,05 μ g/mL dan 73,51 μ g/mL. Insulin *human* menunjukkan stabil pada suhu 2-8°C selama 24 jam (ANOVA, α : 0,05). Kesimpulan, penggunaan antibodi poliklonal IgG yang diproduksi secara in-house dengan anti-IgG konjugat peroksidase dari kambing dapat digunakan untuk pengujian rutin insulin human.

Kata Kunci: ELISA *indirect*, gliserol dan m-kresol, validasi metode, antibodi poliklonal IgG kelinci, insulin *human* rekombinan.

1. Pendahuluan

Pada tahun 2020, lebih dari 420 juta orang di seluruh dunia menderita Diabetes Melitus (DM), yang mayoritas tinggal di negara berpenghasilan menengah dan rendah. Jumlah ini diperkirakan akan meningkat menjadi 570 juta pada tahun 2030 dan menjadi 700 juta pada tahun 2045¹. Sampai saat ini, terapi insulin tetap menjadi landasan manajemen DM^{2,3} dimana insulin eksogen digunakan untuk mengontrol kadar glukosa⁴. Selain proses produksi, pengangkutan dan penyimpanan yang tidak tepat dapat mengganggu potensi atau kualitas obat biologi^{1,5}. Karena banyaknya produk jenis ini di pasaran, maka diperlukan metode analisis yang spesifik, efisien, dan cepat untuk menentukan potensinya. Metode ini digunakan untuk memastikan ketersediaan obat tersebut dengan kualitas, keamanan, dan kemanjuran yang dibutuhkan. Hal ini sejalan dengan salah satu tujuan *global World Health Organization* (WHO) yang disampaikan dalam *WHO Stakeholder Workshop* pada 21, 23 – 25 September 2020 yaitu meningkatkan ketersediaan dan keterjangkauan insulin yang terjamin kualitasnya¹.

Metode yang telah dikembangkan untuk insulin di antaranya menggunakan metode immunoassay dan kromatografi⁴. Dalam monografi USP, insulin human dapat dikuantisasi menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik. Beberapa publikasi juga melaporkan baik secara KCKT sistem isokratik maupun gradien⁶⁻¹⁰. Karena telah tersedia metode secara kimia, maka dilakukan pengembangan metode secara *immunoassay* yang lebih selektif dan peka¹¹ yaitu *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)¹². Studi ini membuat salah satu antibodi yaitu antibodi poliklonal (pAB) anti-rekombinan insulin human dari kelinci secara *in-house* yang disebut imunoglobulin G (IgG), dan dianalisis secara ELISA *indirect*. Produksi pAB menjadi pilihan dibanding antibodi monoklonal (mAb) karena tahap pembuatan lebih sederhana, biaya tidak terlalu mahal, keterampilan lebih mudah¹³ dan waktu produksi yang lebih pendek. Validasi dilakukan menggunakan

larutan uji mengandung matriks berupa gliserol dan m-kresol yang di-*spike* dengan insulin *human* rekombinan (rhINS) dalam rentang konsentrasi yang diinvestigasi. Kedua komponen matriks ini merupakan eksipien umum dalam obat insulin. Metode *immunoassay* ini hanya membutuhkan satu buah *microplate* 96-well untuk satu kali pengujian dengan jumlah sampel lebih banyak. Hal ini akan menghemat waktu, tenaga dan biaya untuk pekerjaan rutin di laboratorium. Selain itu, pAB yang diperoleh juga dapat disimpan sebagai stok selama periode tertentu.

2. Metode

2.1. Alat

Reader (BMG Labtech, FLUOstar Omega), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), inkubator suhu 37°C (Memmert), sentrifuse suhu dingin (Sakuma), perangkat SDS-PAGE dan *Western Blot* (Bio-Rad), *shaker* (Thermo Scientific), *hotplate*, dan *stirrer* (Thermo Scientific), mikropipet (Eppendorf), mikroplate Nunc Maxisorb 96-well (Thermo Fisher Scientific), dan *visking tubing cut-off* 120 kDa (Carolina Biologica).

2.2. Bahan

Sigma Aldrich menyediakan antigen insulin *human* rekombinan (rhINS, Roche), *Freund's Complete Adjuvant* (FCA), *Freund's Adjuvant Incomplete* (FIA), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), anti-IgG kelinci konjugat peroksidase dari kambing, anti-IgG kelinci konjugat alkalin fosfatase dari kambing, X-phosphate disodium salt (BCIP), nitrotetrazolium blue chloride (NBT), natrium klorida 0,5 M, natrium hidroksida, dimetil sulfoksida (DMSO) untuk biologi molekular, bovine serum albumin (BSA), Laemmli 2X, magnesium klorida 1 M untuk biologi molekular, natrium dodesil sulfat 10% (SDS) untuk biologi molekular, β -merkaptotanol untuk biologi molekular, asam sitrat monobasa, N,N-dimetilformamida, dan *Trizma base*. Cytiva menyediakan AB *Buffer Kit* dan kolom HiTrap® Protein A *High-Performance*. Bahan dari BioRad meliputi akrilamid 40%, bis akrilamid 2%,

N,N,N,N-tetrametiletilediamin (TEMED), amonium per sulfat (APS), Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, dan marker protein Mini-Protean, Coomassie Brilliant Blue G250, dan membran nitroselulosa 0,45 μ m 20x20 cm. Merck mensuplai amonium sulfat, meta-kresol, gliserol 85%, natrium karbonat, natrium hidrogen karbonat anhidrat, natrium klorida, natrium hidrogen fosfat, natrium dihidrogen fosfat, Tween 80, Tween 20, hidrogen peroksida 30%, asam sulfat, asam asetat, metanol, dan barium klorida. Bahan lainnya yang digunakan adalah Actrapid® (Novo Nordisk), glisin (Himedia), natrium klorida 0,9% (Otsu-NS), air untuk injeksi (WFI, Otsuka), air dari Milli-Q®, dan susu tropikana slim.

2.3. Prosedur

2.3.1. Pembuatan Larutan

Stok meta-kresol: Stok dibuat dari 1,03 kg/L m-kresol menjadi konsentrasi 50 μ g/mL dalam air Milli-Q®.

Stok matriks: 1 mL stok m-kresol ditambahkan 0,3 mL gliserol 85%, dan di-add 25 mL WFI.

Stok rhINS: Stok disiapkan dengan konsentrasi 1001,4 μ g/mL dalam air Milli-Q®.

Coating buffer: 1,28 g natrium karbonat dan 2,36 g natrium hidrogen karbonat (anhidrat) di-add 1000 mL air Milli-Q®, pH 9,6 diatur dengan NaOH 1 N atau HCl 1 N.

Blocking buffer: 5 g BSA di-add 1000 mL PBS pH 7,2.

Larutan uji validasi: Larutan berbagai konsentrasi rhINS disiapkan dalam *coating buffer*, sedangkan pAB IgG dan anti-IgG kelinci dalam *blocking buffer*. Kurva baku dibuat dari 7 larutan yang di-*spike* dengan 5,01-300,42 μ g/mL rhINS tanpa mengandung matriks. Persamaan garis dari kurva baku digunakan untuk perhitungan akurasi, presisi, stabilitas, dan penentuan potensi produk. Larutan untuk uji linearitas, akurasi, presisi, dan stabilitas masing-masing ditambahkan 0,3 mL larutan matriks. Uji linearitas dilakukan terhadap 5 larutan yang di-*spike* dengan 80,11-200,28 μ g/mL rhINS, masing-masing dibuat dua seri. Sedangkan uji akurasi

dan presisi dilakukan terhadap larutan *spiked* 100,14 μ g/mL, 140,2 μ g/mL, dan 200,28 μ g/mL rhINS, masing-masing dibuat tiga seri. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dihitung menggunakan perhitungan $3,3 \sigma/S$ dan $10 \sigma/S$. Uji stabilitas dilakukan pada larutan *spiked* 80,11 μ g/mL, 140,2 μ g/mL, dan 200,28 μ g/mL rhINS, dibuat dua seri, dan disimpan pada suhu 2-8°C selama 24 jam. Pembuatan larutan lain terdapat pada *Supplementary File*.

2.3.2. Penyiapan Hewan

Ethical approval diterbitkan oleh Kementerian Kesehatan Indonesia dengan nomor LB.02.01/2/KE.436/2021 tanggal 19 Juli 2021. Dua ekor kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dengan galur *Japanese white* jantan diaklimatisasi selama 2 minggu. Hewan dipelihara dalam kandang yang memiliki wadah yang berlubang untuk membuang kotoran ke arah bawah dan berada di ruangan bersuhu 22-23°C. Perlakuan dan pemeliharaan hewan mengikuti kaidah *refinement, reduction, replacement* (3R) yang diberi makanan dan minum secara ad libitum. Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah jantan, umur minimal 3 bulan, bobot badan 2,0-2,5 kg, dan sehat. Kriteria kelinci sehat adalah struktur anatomi normal, kulit dan bulu halus, mata terang, gerakan lincah, tidak agresif, tanpa luka, dan tidak terdapat tanda abnormal. Sedangkan kriteria eksklusi berupa kelinci yang sakit atau mati selama penelitian. Kelinci yang sudah dipakai percobaan diterminasi oleh personil yang terlatih dengan cara disembelih pada bagian leher¹⁴ dengan pisau yang tajam. Hewan mati dimasukkan ke dalam kantong hitam dan disimpan dalam freezer suhu -20°C sebelum dimusnahkan dengan insenerator suhu 450°C selama 4 jam. Abu yang dihasilkan dikirim ke perusahaan pengolah limbah.

2.3.3. Penyiapan antigen dan imunisasi hewan

Sebanyak 4,0 mg rhINS direkonstitusi dengan 1 mL WFI dalam tabung steril, diencerkan dengan 1 mL NaCl 0,9%, lalu dicampur 2 mL FCA membentuk emulsi. Homogenisasi dilakukan dengan cara sedot-

semprot menggunakan mikropipet secara perlahan. Kelinci diimunisasi pada hari ke-0, ke-7, ke-10, dan ke-18¹⁵. Pada hari ke-0, tiap kelinci disuntik dengan 1 mL antigen-FCA secara subkutan pada bagian leher belakang, yang dibagi dalam 2 titik masing-masing 0,5 mL. Penyuntikan *booster* dengan antigen-FIA dilakukan pada hari ke-7, ke-10, dan ke-18 dengan metode yang sama.

2.3.4. Pengambilan darah dan pembuatan serum

Darah diambil pada hari ke-0, ke-21, dan ke-28¹⁵ dimana volume yang dikumpulkan lebih rendah dari kaidah yang ditetapkan *Institutional Animal Care and Use Committee*^{16,17}. Hari ke-0 dilakukan pengambilan darah 2 mL sebelum imunisasi antigen melalui vena marjinalis telinga untuk mendapatkan serum pre-imunisasi sebagai blanko. Darah ditampung dalam tabung tanpa koagulan dan dibiarkan selama 30 menit hingga mengendap. Serum disentrifugasi kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit untuk memisahkan dari sel darah merah. Supernatan disimpan pada suhu -20°C untuk pengujian selanjutnya. Cara yang sama dilakukan pada hari ke-21 dan ke-28 sebanyak 5 mL darah.

2.3.5. Pemurnian pAB IgG

Serum ditambahkan larutan 50% (NH₄)₂SO₄ dengan perbandingan 1:1 setetes demi setetes sambil diaduk dengan *stirrer*¹⁸. Larutan diaduk selama 3 jam lagi dan diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Larutan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C, dan supernatan dibuang. Endapan pAB IgG yang masih mengandung sisa (NH₄)₂SO₄ dimasukkan dalam *visking tubing* yang sebelumnya telah direndam air selama 2 menit. Kantong direndam dengan PBS pH 7,6 pada suhu 4°C selama 5 hari yang diganti dua kali sehari. PBS dicek tiap hari dengan larutan 5% BaCl₂ untuk deteksi sisa (NH₄)₂SO₄.

Proses fraksinasi pAB IgG menggunakan kolom HiTrap® Protein A HP yang dirakit dengan jarum suntik 5 mL dan dilakukan dengan kecepatan laju alir 5 ml/

menit. Kolom dicuci dengan 25 mL WFI, disetimbangkan dan dibilas masing-masing dengan 50 mL *binding buffer* 0,02 M natrium fosfat pH 7,0. Sampel pAB IgG ditambahkan *binding buffer* (1:1, v/v), dimasukkan dalam kolom, dan dibilas kembali dengan 25 mL *binding buffer*. Elusi dilakukan dengan 25 mL *elution buffer* 0,1 M glisin-HCl pH 2,7. Tiap fraksi ditampung sebanyak 1,5 mL dalam *microtube* yang telah berisi 100 µL *neutralizing buffer* 1 M tris-HCl pH 9.

2.3.6. Kuantitasi pAB IgG

Tiap fraksi tanpa pengenceran diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV 280 nm. Dari semua fraksi diambil alikot dan disimpan pada suhu -20°C hingga pengujian berikutnya. Konsentrasi IgG (mg/mL) dihitung dengan rumus: (*extinction coefficient* IgG = 1,36).

$$\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{absorbansi}_{280 \text{ nm}} \times \text{faktor pengenceran}}{1,36}$$

2.3.7. Karakterisasi pAB IgG

Dot Blot: Dua lembar membran nitroselulosa 3,5 x 5 cm diberi titik kendali negatif dan positif, sedangkan 1 lembar ukuran 3,5 x 8,5 cm diberi titik kendali fraksi. Tiap membran diletakkan dalam cawan petri, direndam dengan WFI selama 30 menit, dan dikeringkan pada suhu ruang. Sebanyak 20 µL rhINS 1 mg/mL dalam Laemmli 2X ditotolkan ke semua titik, dibiarkan meresap, lalu dikeringkan. Membran direndam dalam 20 mL larutan 5% *blocking blotto*, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam sambil dikocok lembut menggunakan *shaker*, dan *blocking blotto* dibuang. Sebanyak 20 µL fraksi pAB IgG dan 20 µL 5% *blotto* masing-masing diteteskan pada titik kendali fraksi dan titik kendali negatif, dibiarkan meresap dan kering. Membran dicuci 3 kali dengan 20 mL PBS-T masing-masing selama 5 menit menggunakan *shaker*, dan sisa larutan dibuang. Sejumlah 20 µL anti-IgG kelinci terkonjugat alkalin fosfatase (1:5000) ditotolkan pada semua titik kendali, dan diinkubasi pada suhu ruang hingga kering. Membran dicuci 3 kali dengan 20 mL PBS-T masing-masing selama 5 menit. PBS-T dibuang dan membran direndam dalam

5 mL substrat BCIP-NBT sambil dikocok lembut selama 5 menit pada suhu ruang.

SDS-PAGE: Elektroforesis vertikal dilakukan dengan konsentrasi SDS dalam separating gel 7,5% dan 17,5%, serta stacking gel 4%. Fraksi pAB IgG diencerkan dengan Laemmli 2X (1:1), ditambah 50 μ L β -merkaptoetanol, dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Fraksi-fraksi dan Mini-Protean® masing-masing di-loading ke dalam sumur stacking gel. Proses elektroforesis dilakukan pada 140 Volt selama 50 menit. Gel diwarnai dengan pewarna coomassie brilliant blue G250 selama 2 jam sambil digoyang perlahan. Warna tersebut dihilangkan menggunakan destaining buffer selama 30 menit.

Western Blot: Sejumlah 20 μ L rhINS 1 mg/mL dalam buffer Laemmli 2X di-run dengan gel poliakrilamida 7,5% dan 17,5% seperti tahap elektroforesis tanpa penambahan coomassie blue. Protein tersebut dipindahkan secara *electrotransfer* ke membran nitroselulosa 0,45 μ m menggunakan medan listrik. Membran diblok dengan 5% *blotto*, ditotolkan 20 μ L fraksi pAB IgG, dan diinkubasi semalaman pada suhu 2–8°C. Membran dicuci 3 kali dengan 20 mL 0,1% PBS-T dan diinkubasi dengan 20 μ L anti-IgG kelinci konjugat alkalin fosfatase (1:5000) selama 1 jam. Membran dicuci kembali 3 kali dengan 0,1% PBS-T, dan diwarnai dengan substrat BCIP-NBT.

2.3.8. Validasi Metode

Validasi secara ELISA *indirect* dilakukan dengan mengaplikasikan 100 μ L berbagai konsentrasi rhINS ke dalam *microplate*. *Coating buffer* dan *blocking buffer* digunakan sebagai kontrol negatif. Tahap *coating* ini memerlukan inkubasi pada 2–8°C semalaman, sisa *coating buffer* dibuang, dicuci dengan 200 μ L *washing buffer* PBS-T sebanyak 3 kali, dan *washing buffer* dibuang. Pada tahap *blocking*, 200 μ L *blocking buffer* ditambahkan, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1,5 jam, larutan *blocking* dibuang, dan dicuci dengan 200 μ L *washing buffer* 2 kali. Stok pAB IgG dibuat konsentrasi 20 μ g/mL menggunakan *blocking buffer*,

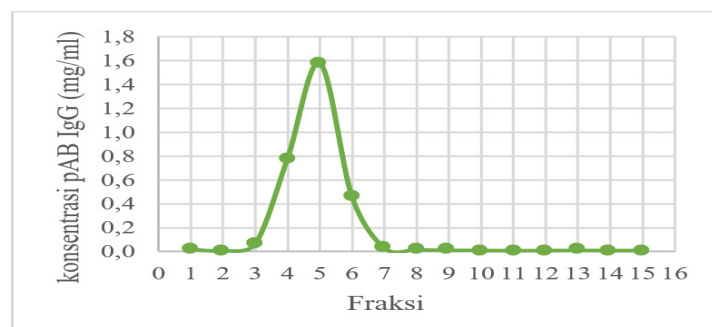
dimasukkan 100 μ L ke dalam *microplate*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1,5 jam, sisa pAB IgG dibuang, dan dicuci dengan 200 μ L *washing buffer* 2 kali. Anti-IgG kelinci konjugat peroksidase dari kambing (1:10000) disiapkan dalam *blocking buffer*, dimasukkan 100 μ L ke dalam *microplate*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, sisa antibodi dibuang, dan dicuci dengan 200 μ L *washing buffer* 4 kali. Sejumlah 100 μ L substrat TMB ditambahkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15–30 menit hingga hingga terbentuk warna biru kehijauan. Sebanyak 100 μ L H₂SO₄ 2 M ditambahkan sebagai stop solution. Pembacaan *optical density* dilakukan pada panjang gelombang 450 nm.

2.3.9. Penentuan sampel di pasaran

Sampel setara 3470 μ g/mL dipipet 0,25 mL dan di-add 5 mL *coating buffer*. Analisis secara ELISA *indirect* dilakukan dalam rangkap dua pada panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi dihitung menggunakan kurva baku dan persentase potensi terhadap klaim label dihitung.

3. Hasil

Setelah penyuntikan antigen-FCA, timbul lesi pada kedua kelinci yang menyebabkan kelinci 1 gelisah selama beberapa hari namun tidak terjadi pada kelinci 2. Lesi tersebut perlahan hilang hingga minggu ke-2. *Booster* antigen-FIA dilakukan pada lokasi berbeda dan tidak menimbulkan lesi seperti pada FCA. Kondisi fisik, aktivitas motorik, defekasi, dan urinasi kedua kelinci secara umum normal, yang ditandai dengan kenaikan bobot badan selama penelitian yang berlangsung 28 hari. Kedua kelinci menghasilkan serum yang mengandung pAB IgG dengan total 9 mL. Pada proses dialisis, ion sulfat tidak terdeteksi lagi dalam larutan PBS pada hari ke-5 dan menghasilkan pAB IgG sebanyak 3 mL. Tahap fraksinasi menggunakan kolom HiTrap® Protein A HP menghasilkan 15 fraksi masing-masing bervolume 1,5 mL. Konsentrasi dari 15 fraksi pAB IgG ditunjukkan Gambar 1. Perolehan pAB IgG mulai meningkat pada fraksi 3, mencapai puncaknya pada fraksi 5, dan mulai



Gambar 1. Profil Perolehan pAB IgG Kelinci

menurun pada fraksi 6. Fraksi 4, 5, 6 memiliki konsentrasi terbesar yaitu masing-masing 0,781 mg/mL, 1,581 mg/mL, dan 0,459 mg/mL. Konsentrasi fraksi 7–15 cenderung kecil yaitu rentang 0,009 – 0,03 mg/mL. Jumlah keseluruhan pAB IgG yang dihasilkan adalah 3,038 mg/mL.

Hasil karakterisasi fraksi 3, 4, 11, 13 dengan uji *Dot Blot* dan *SDS-PAGE* ditunjukkan Gambar 2a dan 2b. Titik kontrol negatif dan titik kontrol positif tidak terbentuk warna biru, sedangkan titik kendali keempat fraksi menghasilkan warna biru (Gambar 2a). Elektroforesis empat fraksi masing-masing hanya terbentuk dua pita yaitu pada 50 kDa dan 20 – 25 kDa (Gambar 2b). Hasil uji Western Blot dari fraksi 3, 4, 11 masing-masing membentuk 1 spot berwarna gelap sebagai bukti terbentuknya sinyal adanya reaksi enzimatis antara rhINS, pAB IgG, dan anti-IgG dari kambing (Gambar 2c).

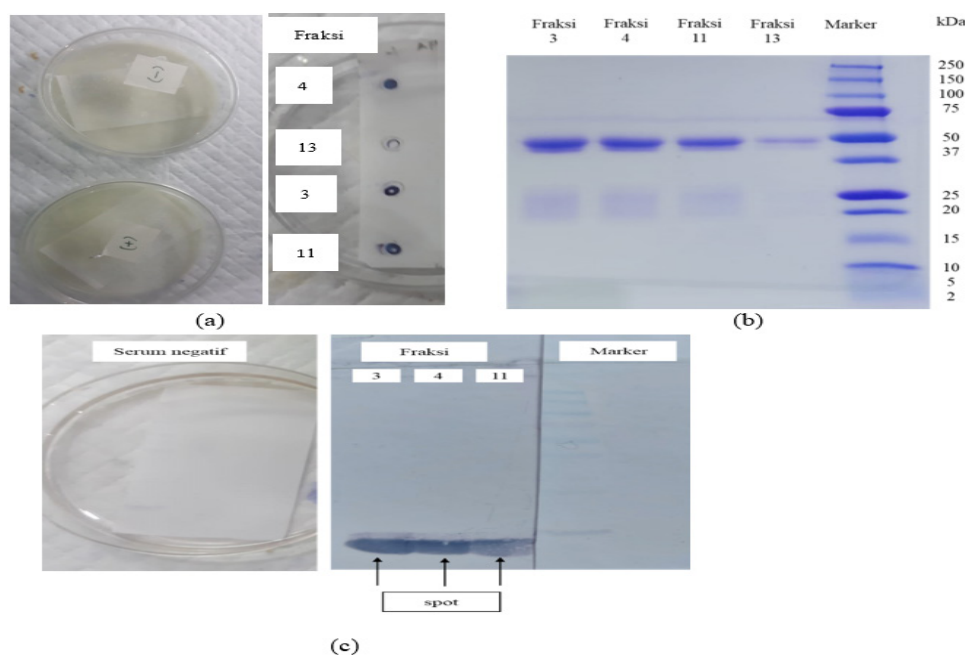
Pada validasi, kurva baku dari larutan

5,01– 300,42 $\mu\text{g/mL}$ rhINS tanpa matriks menghasilkan persamaan garis $y = 0,003 + 0,6169 (r = 0,9803)$. Sedangkan larutan 80,11 – 200,28 $\mu\text{g/mL}$ rhINS yang mengandung matriks membentuk kurva linearitas (Gambar 3) dengan perolehan LOD dan LOQ masing-masing 22,05 $\mu\text{g/mL}$ dan 73,51 $\mu\text{g/mL}$.

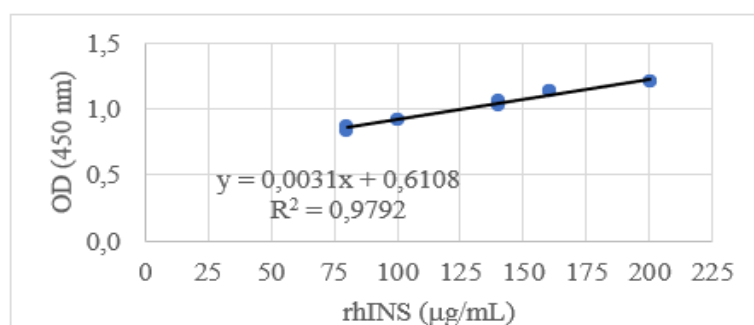
Hasil uji akurasi dan presisi berupa persentase *recovery* (%R) dan persentase koefisien variasi (%KV) diperoleh rerata masing-masing adalah $99,11 \pm 5,01\%$ dan 3,91% (Tabel 1). Hasil pengukuran larutan rhINS pada uji stabilitas saat 0 (*fresh*) dan 24 jam tertera pada Tabel 2, dan diperoleh nilai $p = 0,435$ dengan ANOVA ($\alpha 0,05$). Sedangkan persentase potensi sampel tertera pada Tabel 3 dimana persyaratan potensi produk adalah 95–105%.

4. Pembahasan

Antibodi merupakan protein yang diproduksi oleh sistem kekebalan (sel B



Gambar 2. Karakterisasi pAB IgG Kelinci (a) Uji *Dot Blot*; (b) Uji *SDS-PAGE*; (c) Uji *Western Blot*



Gambar 3. Kurva Linearitas rhINS (80,11 – 200,28 µg/mL)

plasma) sebagai respon terhadap antigen^{13,15,19}. Perbedaan utama antara mAb dan pAB adalah mAb diproduksi oleh klon sel B plasma yang sama dan mengikat epitop tertentu, sedangkan pAB diproduksi oleh klon sel B plasma yang berbeda dan mengikat epitop yang berbeda dalam antigen yang sama¹³. Produksi antibodi berkualitas tinggi membutuhkan imunogen (antigen) murni dan berkualitas tinggi. Kadar antigen yang disuntikkan tersebut tergantung pada spesies hewan, adjuvan, protokol imunisasi dan sifat antigen¹⁵. Jumlah minimum antigen yang disuntikkan dengan BM < 18 kDa adalah 200 µg, sedangkan BM > 18 kDa adalah 100 µg per injeksi¹⁵. Insulin human memiliki BM 5800 Da⁶ sehingga pada penelitian ini digunakan dengan kadar 1 mg/mL. Antigen tersebut terkadang tidak cukup untuk memicu respon imun yang memuaskan, sehingga diberikan bersama dengan adjuvan untuk meningkatkan respon. Adjuvan *Freund's* umum digunakan dalam penelitian, sangat efektif, tetapi dapat menghasilkan efek samping inflamasi yang menyakitkan jika tidak diberikan dengan benar. Adjuvan ini merupakan emulsi air dalam minyak mineral yang sangat kental dan sulit untuk disuntikkan.

Kandungan minyak ini akan memicu inflamasi dan granuloma di sekitar suntikan²⁰. *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) mengandung microbacterium mati sedangkan *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA) tanpa komponen bakteri. Pada studi ini, FCA digunakan hanya sekali pada imunisasi awal karena bersifat sangat iritan dan sering menyebabkan abses jika diberikan berulang. FIA diberikan pada saat *booster* karena akan menstimulasi sel plasma untuk menghasilkan antibodi yang berlangsung lebih lama. Pencampuran larutan antigen rhINS dengan adjuvan menghasilkan emulsi berwarna putih yang kental seperti santan. Selain penggunaan adjuvan, respon imun juga dapat ditingkatkan dengan memperbanyak tempat suntikan. Imunogen akan terdistribusi ke area permukaan yang lebih luas dan mencapai jaringan limfoid lebih banyak. Cara ini akan memicu kekebalan dan menghasilkan titer antibodi yang lebih tinggi. Selain itu juga akan mengurangi kejadian respon inflamasi lokal yang parah dan abses sehingga meningkatkan keamanan hewan uji. Penyuntikan secara subkutan lebih baik dari intramuskular karena tidak terbentuk lesi dan sedikit rasa sakit.¹⁹

Tabel 1. Hasil Uji Akurasi dan Presisi Insulin *Human* Rekombinan

<i>Spike</i> (µg/ mL)	OD (450 nm)	C	% R	Rerata ^a	Rerata ^b	SD ^a	% KV ^a
100,14	0,916	100,41	100,27	95,94	95,81	6,62	6,90
	0,912	99,07	98,93				
	0,880	88,34	88,22				
	1,030	138,41	98,73				
140,20	1,066	150,48	107,34	144,19	102,85	6,05	4,20
	1,045	143,66	102,47				
	1,207	197,76	197,76				
	1,210	198,76	198,76				
200,28	1,210	198,76	198,76	197,61	98,67	1,24	0,63
	1,202	196,30	196,30				

C: rhINS (µg/mL), ^a : Rerata C (n =3), ^b : Rerata %R (n =3)

Tabel 2. Hasil Uji Stabilitas Insulin *Human* Rekombinan Selama 24 Jam

<i>Spike</i> (µg/mL)	0 jam (<i>fresh</i>)		24 jam	
	% R ^c	% KV	% R ^c	% KV
80,11	97,65 ± 10,56	10,81	92,35 ± 5,23	5,66
140,20	103,03 ± 6,09	5,91	92,67 ± 0,68	0,73
200,28	98,99 ± 0,36	0,36	103,15 ± 5,84	5,66

^c Data berupa rerata ± SD (n =2)

Penelitian protein seperti antibodi IgG memiliki tahap kritis pada proses pemurnian, karena masih terdapat banyak cemaran dalam serum. Penggunaan 50% (NH₄)₂SO₄ setetes demi setetes pada proses pemurnian bertujuan untuk membatasi jumlah ikatan hidrogen antara antibodi dan pelarutnya agar pAB IgG mengendap. Proses ini akan menghilangkan protein lain agar diperoleh bahan yang lebih bersih pada tahap fraksinasi. Namun, cara ini tidak boleh digunakan sebagai pemurnian satu langkah, karena masih mengandung sejumlah besar protein pencemar yang memiliki berat molekul lebih kecil. Dialisis dilakukan sebagai tahap pemurnian lanjutan untuk menghilangkan pengotor dan sisa (NH₄)₂SO₄ yang dapat mengganggu aktivitas antibodi yang diproduksi. pAB IgG kelinci memiliki ukuran molekul 150–160 kDa yang akan tertahan dalam membran dialisis, sedangkan molekul pengotor dengan ukuran ≤ 120 kDa akan keluar melewati membran menuju larutan PBS. Pemurnian antibodi selektif umumnya dilakukan dengan menggunakan kromatografi afinitas atau kromatografi berbasis tag-afinitas, karena memiliki selektivitas dan kemurnian tinggi²². Kolom HiTrap Protein A HP terbuat dari polipropilen yang tidak berinteraksi dengan biomolekul dan mengandung protein A dari *Staphylococcus aureus* untuk mengisolasi pAB IgG. Protein A memiliki enam bagian berbeda, bersifat kuat dan spesifik, dan akan berikatan dengan area Fc dari antibodi IgG target. Ikatan ini berupa reaksi hidrofobik yang akan melemah pada pH rendah, sehingga memungkinkan

elusi IgG²². Kemampuan protein A mengikat fragmen Fc IgG menjadikannya ligan yang baik untuk analisis antibodi²³. Pemakaian *visking tubing* dan kolom afinitas dalam studi ini dapat menahan protein target pAB IgG secara efektif.

Pada tahap karakterisasi dengan uji *Dot Blot*, antigen diimobilisasi pada membran nitroselulosa dan dideteksi dengan pAB IgG. Setelah terikat, antibodi divisualisasikan menggunakan antibodi sekunder (anti-IgG konjugat alkalin fosfatase) yang mengenali domain antibodi pAB IgG. Warna biru yang terbentuk berasal dari reaksi alkalin fosfatase dengan substrat BCIP-NBT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keempat fraksi mengandung pAB IgG target yang diinginkan dan memberikan sinyal reaksi enzimatik antigen-antibodi. pAB IgG kelinci memiliki struktur yang terdiri dari rantai berat (50 kDa) dan rantai ringan (25 kDa) yang dihubungkan dengan ikatan nonkovalen dan jembatan disulfida^{19,21}. Publikasi lain melaporkan berat molekul rantai berat IgG kelinci sekitar 50 kDa, sedangkan rantai ringan 20–30 kDa^{20,21}. Karakterisasi 4 fraksi IgG secara elektroforesis dalam studi ini menghasilkan dua pita, hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya. Tidak adanya pita lain yang terdeteksi menunjukkan tidak ada protein lain dalam sampel, sehingga proses pemurnian serum kelinci berjalan dengan baik. Elektroforesis dengan SDS-PAGE memisahkan protein berdasarkan bobot molekul²². Pemanasan sampel IgG dan *marker* dengan SDS akan memutuskan ikatan disulfida protein dan melingkupi

Tabel 3. Hasil Penentuan Produk Insulin *Human* Rekombinan secara Metode ELISA *Indirect*

No	OD (450 nm) ^c	C ^c	% Potensi ^c
1	1,14 ± 0,01	176,47 ± 4,82	101,71 ± 2,78
2	1,13 ± 0,004	171,94 ± 1,26	99,10 ± 0,73
3	1,12 ± 0,01	169,20 ± 3,56	97,52 ± 2,05

^c Data berupa rerata ± SD (n =2)

protein sehingga bermuatan negatif. Buffer Laemmli 2X mengandung gliserol sebagai pemberat dan bromfenol biru sebagai penanda protein, sementara β -merkaptoetanol untuk memecah ikatan sulfida pada protein, sehingga protein akan terurai dan mudah dipisahkan. Penggunaan gradien separating gel memisahkan pita-pita protein berdasarkan berat molekul. Konsentrasi 7,5% berada pada lapisan atas karena memiliki pori-pori yang lebih besar dan konsentrasi 17,5% pada lapisan bawah. Ketika diberikan medan elektromagnetik, sampel yang mengandung rantai berat dan rantai ringan akan bermigrasi bersamaan dari katoda (muatan negatif, atas) menuju anoda (muatan positif, bawah). Rantai berat akan bergerak lambat dan rantai ringan akan menuju anoda lebih cepat karena pengaruh perbedaan pori-pori dari separating gel. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa rantai berat (50 kDa) berada di atas dan rantai ringan (20 – 25 kDa) berada di bawah (Gambar 2.b). Uji *Western Blot* (WB) merupakan tahap lanjutan setelah protein dielektroforesis dan dilakukan transfer elektroforetik dari gel ke membran nitroselulosa²⁵. Pada tahap WB, antigen dilakukan elektroforesis dan membran diinkubasi dengan antibodi berlabel yang sesuai. *Spot* tunggal yang terbentuk menunjukkan bahwa ketiga sampel mengandung pAB IgG yang mampu berikatan dengan antigen rhINS dan anti-IgG dari kambing, sehingga memberikan sinyal adanya reaksi enzimatis. Antibodi hanya akan mengikat antigen yang sesuai, sehingga hanya terbentuk 1 spot²⁶. Antibodi sekunder yang digunakan umumnya dihasilkan dari spesies yang kekerabatannya jauh dari penghasil IgG, agar terjadi reaksi penolakan atau melawan spesies antibodi primer¹⁵. Spektrofotometer UV 280 nm digunakan untuk mengukur absorbansi pAB IgG karena akan menyerap sinar UV dalam larutan pada panjang gelombang tersebut. Metode ini cukup sederhana karena tidak memerlukan standar protein atau perlakuan apapun dengan hasil absorbansi setara dengan konsentrasi.

Pada ELISA *indirect*, umumnya digunakan *coating buffer*, *washing buffer*, H_2SO_4 sebagai *stop solution*, substrat

tetrametilbenzidin (TMB), dan *horseradish peroksidase* (HRP) sebagai enzim pelabel¹⁹. *Coating buffer* berupa karbonat dan *washing buffer* berupa PBS (campuran KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl, KCl, 0,05% Tween-20). Validasi dilakukan sesuai pedoman *International Conference on Harmonisation* (ICH) 1995 dan FDA dokumen Q1A(R2). Menurut ICH, stabilitas obat harus dievaluasi selama periode waktu tertentu, karena dekomposisi kimia dapat terjadi selama penyimpanan. Kurva baku dan kurva linearitas memperlihatkan hasil yang linear dalam rentang konsentrasi yang dicoba. Keberterimaan %R pada uji akurasi *immunoassay* adalah 80-120%,^{22,23} sedangkan uji presisi dikatakan memuaskan jika perolehan $\%KV \leq 10\%$ ²² atau $\leq 20\%$ ²³. Mengacu pada nilai ini, maka hasil uji akurasi dan presisi yang diperoleh masih berada dalam batas yang dapat diterima. Perolehan %KV pada uji stabilitas $\leq 20\%$ ²³ menunjukkan rhINS bersifat stabil pada suhu 2–8°C selama 24 jam. Ketiga sampel di pasaran yang diuji menunjukkan potensi yang memenuhi persyaratan 95 – 105 % terhadap klaim label dan memiliki kemanjuran yang dapat dipercaya.

Imunisasi kelinci dengan 1 mg/mL rhINS dan pengambilan darah 5 mL tiap kelinci menghasilkan pAB IgG untuk pengembangan metode hingga tahap validasi. Lebih baik jika pengambilan darah ditingkatkan volumenya hingga 15 mL agar diperoleh konsentrasi pAB IgG yang lebih pekat untuk dilakukan optimasi-optimasi lain. Selain itu, antigen insulin human sebagai imunogen dapat ditingkatkan konsentrasinya agar dapat diperoleh titer pAB IgG yang lebih tinggi, namun batas toksisitasnya terhadap hewan uji perlu diketahui. *Institutional Animal Care and Use Committee* mengizinkan pengambilan darah 0,5% dari bobot badan (Gram) tiap 7 hari atau 1% tiap 14 hari¹⁷. Kelinci dengan bobot 3 kg dapat diambil darah maksimal 30 mL tiap 14 hari, namun diperlukan metode yang cukup efektif tanpa menyebabkan penggumpalan darah dan ketidaknyamanan hewan. Walaupun hasil validasi menghasilkan keberterimaan yang baik, sebaiknya antibodi

yang diproduksi dilakukan formulasi terlebih dahulu agar diperoleh sinyal yang lebih stabil. Metode lain seperti ELISA *sandwich* dapat dikembangkan agar ikatan antigen-antibodi lebih kuat dan spesifik. Dalam studi ini tidak menganalisis insulin jenis lain, sehingga tidak dapat memberikan gambaran apakah pAB IgG yang dihasilkan akan memberikan sinyal yang sama jika bereaksi dengan analog insulin.

5. Kesimpulan

Proses pemurnian, fraksinasi, dan karakterisasi telah menghasilkan anti-insulin *human* rekombinan yang memiliki aktivitas cukup baik dalam memberikan sinyal pada panjang gelombang 450 nm. ELISA *indirect* dapat menjadi metode alternatif selain metode KCKT yang dapat digunakan untuk uji produk insulin *human*. Metode *immunoassay* lain juga dapat dikembangkan untuk sediaan yang mengandung lebih dari satu jenis insulin.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Badan Pengawas Obat dan Makanan Nasional (BPOM), Universitas Indonesia, dan Pusat Studi Satwa Primata - IPB atas dukungan fasilitas, instrumen, dan material. Penelitian didanai oleh BPOM, surat KP.07.03.2.82.09.19.2817 Tahun 2019.

Referensi

1. World Health Organization. Insulin and associated devices: access for everybody [diunduh 22 Februari 2021]. Tersedia dari: <http://apps.who.int>.
2. Bahendeka S, Kaushik R, Swai AB, Otieno F, Bajaj S, Kalra S, et al. EADSG Guidelines: Insulin storage and optimisation of injection technique in diabetes management. *Diabetes Ther*. 2019;10(2):341–66.
3. Soffe R, Nock V, Chase JG. Towards point-of-care insulin detection. *ACS sensors*. 2019;4(1):3–193.
4. Shen Y, Prinyawiwatkul W, Xu Z. Insulin: a review of analytical methods. *Analyst*. 2019;144(14):4139–48.
5. Carter AW, Heinemann L, Klonoff DC, Fellow AIMBE. Quality control of insulins and biosimilar insulins: what do we know? *J Diabetes Sci Technol*. 2016;10(4):811–5.
6. Iyire A, Russell C, Dennison T, Rajoli R, Saleem I, Rahman A, et al. Development, optimisation, validation and inter-laboratory verification of a reversed phase HPLC method for quantification of human recombinant insulin. *J Adv Biotechnol*. 2018;7(1):984–98.
7. Arkell K, Knutson H-K, Frederiksen SS, Breil MP, Nilsson B. Pareto-optimal reversed-phase chromatography separation of three insulin variants with a solubility constraint. *J Chromatogr A*. 2018;1532:98–104.
8. Zuben E de S Von, Eloy JO, Araujo VHS, Gremião MPD, Chorilli M. Rapid and sensitive analytical method for the determination of insulin in liposomes by reversed-phase HPLC. *Acta Chim Slov*. 2020;67(4):1273–80.
9. Moses A, Bjerrum J, Hach M, Wæhrens LH, Toft AD. Concentrations of intact insulin concurs with FDA and EMA standards when measured by HPLC in Different parts of the distribution cold chain. *J Diabetes Sci Technol*. 2019;13(1):55–9.
10. De Haro Moreno A, Beatriz Bastos Lucchesi M, Atala Dib S, Regina Nunes Salgado H. Development of a new HPLC method for the determination of lispro and glargine insulin analogues in pharmaceutical preparations. *J Anal Pharm Res*. 2018;7(1).
11. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med*. 2018;72(1):32–42.
12. Okita N, Higami Y, Fukai F, Kobayashi M, Mitarai M, Sekiya T, et al. Modified Western blotting for insulin and other diabetes-associated peptide hormones. *Sci Rep*. 2017;7(1):6949.
13. Panawala L. Difference between monoclonal and polyclonal antibodies.

- Pediaa. 2017.
14. Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Grandin T, Greenacre C, et al. AVMA guidelines for the euthanasia of animals Edisi 2020 Edition. Schaumburg: The: BRILL; 2020.
 15. Delahaut P. Immunisation - Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. *Methods*. 2017;116:4–11.
 16. IACUC. IACUC Policy : Blood Collection in Small Laboratory Animals. 2019;1–4.
 17. Davis UC. Title: Blood collection: volumes, frequency and sites. [diunduh 1 Desember 2021]. Tersedia dari: <https://research.ucdavis.edu/wp-content/uploads/IACUC-31>.
 18. Fusvita A, Maryam R, Pribadi ES. Karakterisasi antibodi poliklonal terhadap aflatoksin M1. *Sain Veteriner*. 2017;34(1):9–15.
 19. Wiesner R, Scheller C, Krebs F, Wätzig H, Oltmann-Norden I. A comparative study of CE-SDS, SDS-PAGE, and Simple Western: Influences of sample preparation on molecular weight determination of proteins. *Electrophoresis*. 2021;42(3):206–18.
 20. Bunyamin M. Produksi serum rabbit anti-catfish terhadap penyakit Motile Aeromonas Septicemia (MAS) pada ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*). *J MINA SAINS*. 2017;1(1):24.
 21. Abdel-Rahman EH, El-Jakee JK, Hatem ME, AtaNS, Fouad EA. Preparation of goat and rabbit anti-camel immunoglobulin G whole molecule labeled with horseradish peroxidase. *Vet World*. 2017;10(1):92–100.
 22. Murphy C, Kennedy RO. ANTI-64762-technology-advancements-in-antibody-purification. *Dove Press J*. 2016;17–33.
 23. Eivazi S, Majidi J, Maleki LA, Abdolalizadeh J, Yousefi M, Ahmadi M, et al. Production and purification of a polyclonal antibody against purified mouse igg2b in rabbits towards designing mouse monoclonal isotyping kits. *Adv Pharm Bull*. 2015;5(1):109–13.
 24. Talib NAA, Salam F, Sulaiman Y. Development of polyclonal antibody against clenbuterol for immunoassay application. *Molecules*. 2018;23(4):789.
 25. Wangler MF, Bellen HJ. In vivo animal modeling. In: *basic science methods for clinical researchers*. London: Elsevier; 2017.
 26. Iqbal J. Western Blot: proteins separating technique, protocol, theory and trouble shooting. *J Bacteriol Mycol Open Access*. 2017;4(2):62–7.
 27. Minic R, Zivkovic I. Optimization, validation and standardization of ELISA. In: *Norovirus*. IntechOpen; 2021.
 28. Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, et al. A practical guide to immunoassay method validation. *Front Neurol*. 2015 ;6:179.