(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(11) IDP000090291 B

(45) 27 Oktober 2023

(51) Klasifikasi IPC[8] : C 12Q 1/68(2017.01), G 01N 33/00(2017.01)

(21) No. Permohonan Paten : P00201800256

(22) Tanggal Penerimaan: 11 Januari 2018

(30) Data Prioritas :

(43) Tanggal Pengumuman: 06 September 2019

(56) Dokumen Pembanding:
EP2258878 (A1)
WO2014136124 (A2)
CN101614738 (A)
CN103616510 (A)

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
1. PT. BIO FARMA (PERSERO)
Jl. Pasteur No. 28 Bandung 40161
2. INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
Divisi HaKI dan Hukum LPIK ITB Jl. GanesaNo 15 F Bandung

(72) Nama Inventor :
Wardono Niloperbowo, ID
Ramadhani Qurrota A'yun, ID
Alfi Taufik Faturrahman, ID
Emawati Arifin Giri-Rachman, ID
Debbie Soefie Retnoningrum, ID
Marselina Irasonia Tan, ID
Meutia Diva Hakim, ID
Anindyajati, ID
Tina Lusiany, ID
Neni Nurainy, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Drs. Abdi Saputra Sembiring.,M.Si.

Jumlah Klaim : 4

(54) Judul Invensi : KIT DIAGNOSTIK UNTUK MENDETEKSI INFEKSI VIRUS HEPATITIS B MENGGUNAKAN ANTIBODI PRIMER IGY ANTI HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg) DAN ANTIBODI SEKUNDER MONOKLONAL ANTI-HBSAG YANG TERKONJUGASI HORSERADISH PEROXIDASE (HRP) DAN PROSES PEMBUATANNYA

(57) Abstrak :

Invensi ini berkaitan kit diagnostik yang digunakan untuk menegakkan diagnosis infeksi virus Hepatitis B melalui deteksi keberadaan Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) dan proses pembuatannya. Kit diagnostik sesuai invensi ini dicirikan dengan penggunaan komponen antibodi primer IgY anti-HBsAg dan antibodi sekunder monoklonal anti-HBsAg yang terkonjugasi Horseradish peroxidase (HRP).

IgY anti-HBsAg yang digunakan adalah berupa *crude extract* yang diperoleh dari isolasi kuning telur ayam. Antibodi monoklonal anti-HBsAg yang terkonjugasi HRP digunakan sebagai antibodi sekunder. Tujuan dari invensi ini adalah menyediakan kit diagnostik yang dapat digunakan untuk mendeteksi infeksi Hepatitis B di Indonesia, dengan menggunakan komponen yang dapat dihasilkan dalam jumlah besar tanpa menyakiti hewan yang digunakan.

Deskripsi

KIT DIAGNOSTIK UNTUK MENDETEKSI INFEKSI VIRUS HEPATITIS B MENGGUNAKAN ANTIBODI PRIMER IGY ANTI HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg) DAN ANTIBODI SEKUNDER MONOKLONAL ANTI-HBSAG YANG TERKONJUGASI HORSERADISH PEROXIDASE (HRP) DAN PROSES PEMBUATANNYA

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berkaitan dengan suatu kit diagnostik yang digunakan untuk menegakkan diagnosis infeksi virus Hepatitis B melalui deteksi keberadaan Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) dan proses pembuatannya. Lebih khusus, invensi ini dicirikan dengan penggunaan komponen antibodi primer IgY anti-HBsAg dan antibodi sekunder monoklonal anti-HBsAg yang terkonjugasi Horseradish peroxidase (HRP).

Latar Belakang Invensi

Penyakit Hepatitis B merupakan salah satu penyakit yang memiliki persebaran yang luas. Sekitar 2 milyar penduduk dunia diperkirakan terinfeksi Virus Hepatitis B (VHB), yang mengakibatkan sekitar 600 ribu orang meninggal setiap tahunnya akibat chirrhosis hati dan hepatocellular carcinoma (Sung, et al., 2010). Salah satu wilayah yang memiliki tingkat infeksi VHB kronis cukup tinggi adalah kawasan Asia Tenggara (Previsani dan Lavanchy, 2002), termasuk Indonesia. Menurut Kementerian Kesehatan, Indonesia merupakan negara kedua di wilayah Asia Tenggara setelah Myanmar yang memiliki kasus Hepatitis B yang tinggi (Kemenkes, 2013). Orang yang terinfeksi VHB tidak memiliki gejala-gejala yang muncul pada masa awal infeksi (Peter, 2008; Fong, et al., 1994). Oleh karena itu, perlu adanya uji laboratorium yang cepat dan akurat untuk mengetahui apakah seseorang terinfeksi VHB, sehingga penanganan dan

pencegahan penyebaran penyakit ini dapat dilakukan dengan segera. Pada uji laboratorium, salah satu biomarker yang digunakan untuk diagnosis adalah *Hepatitis B Surface Antigen* (HBsAg). Antigen ini merupakan salah satu komponen penyusun selubung bagian luar VHB. Antigen ini muncul di serum darah pada masa awal infeksi, yaitu sekitar 1- 2 minggu atau paling lama sekitar 11-12 minggu setelah infeksi dan dihasilkan dalam jumlah banyak pada masa awal infeksi tersebut (Liang, 2009).

Tingginya angka prevalensi Hepatitis B di Indonesia menyebabkan penyakit ini menjadi salah satu perhatian utama Departemen Kesehatan. Untuk menurunkan angka prevalensi, maka dibutuhkan alat kesehatan/kit diagnostik yang akurat dan selalu tersedia. Kebutuhan Indonesia terhadap kit diagnostik yang sangat tinggi ini ternyata tidak diikuti dengan berkembangnya industri pembuatan kit diagnostik di Indonesia. Hal ini disebabkan oleh terbatasnya sumber daya manusia yang tersedia, cepatnya perkembangan teknologi diagnostik, dan mahalnya alih teknologi untuk industri ini.

Sampai saat ini, sudah ada beberapa paten yang terkait dengan kit diagnostik untuk mendeteksi Hepatitis B, diantaranya adalah metode diagnostik berbasis molekuler, seperti pada paten no US 7344837 B2, EP 2258878 A1 WO 2014136124 A2. Namun demikian paten-paten tersebut memiliki beberapa kelemahan, diantaranya peralatan dan reagen yang harganya mahal, ketersediaannya yang tidak terjamin, karena harus diimpor dari luar negeri, digunakannya komponen utama kit diagnostik yang tidak ramah terhadap hak-hak hewan, sulitnya penyediaan komponen-komponen tersebut, dan harus dioperasikan oleh operator yang terampil.

Tujuan invensi ini adalah menyediakan suatu kit diagnostik pendeteksi VHB serta proses pembuatannya, yang memiliki akurasi tinggi dengan harga yang relative murah, ketersediaannya terjamin, digunakannya komponen utama kit

diagnostik yang ramah terhadap hak-hak hewan serta mudah disediakan dan dalam penggunaannya, tidak memerlukan operator yang terampil untuk mengoperasikannya

Uraian Singkat Gambar

Agar invensi dapat dijelaskan sepenuhnya, maka perwujudan invensi akan diuraikan secara terperinci dengan mengacu pada gambar-gambar yang menyertai dengan rincian sebagai berikut.

Gambar 1 adalah komponen kit diagnostik HBsAg berbasis ELISA sesuai invensi ini.

Gambar 2 adalah diagram cara kerja kit Diagnostik mendeteksi keberadaan VHB pada sampel serum darah manusia melalui deteksi antigen HBsAg.

Gambar 3 adalah alur kerja pembuatan dan isolasi antibodi primer IgY anti-HBsAg dari kuning telur ayam.

Gambar 4 adalah hasil analisis SDS PAGE IgY anti-HBsAg.

Gambar 5 adalah alur kerja pembuatan antibodi sekunder anti-HBsAg terkonjugasi HRP.

Gambar 6 adalah performa antibodi sekunder sesuai invensi ini dibandingkan antibodi sekunder komersial.

Ringkasan Invensi

Sesuai invensi ini disediakan suatu kit diagnostik untuk menegakkan diagnosis infeksi virus Hepatitis B melalui deteksi keberadaan Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) dan proses produksinya. Kit diagnostik sesuai invensi ini terdiri dari komponen yaitu : buffer pencuci, yang berfungsi untuk menghilangkan protein yang bukan HBsAg dari sumur 96 *well ELISA plate*; larutan substrat pewarna yang berfungsi sebagai substrat penghasil warna; larutan pelarut sampel yang berfungsi sebagai pengencer sampel serum atau plasma darah; larutan kontrol positif HBsAg yang berupa HBsAg rekombinan, yang berfungsi sebagai pembanding positif; larutan kontrol

negative yang berfungsi sebagai pembanding negatif; larutan penghenti reaksi yang berfungsi untuk menghentikan reaksi pembentukan warna; antibodi primer yang berfungsi sebagai pendeteksi HBsAg; larutan antibodi sekunder, yang menggunakan antibodi monoklonal anti HBsAg yang terkonjugasi HRP, yang berfungsi sebagai pendeteksi HBsAg dan reaksi pembentukan warna dan *96 well ELISA plate* yang telah dilapisi antibodi primer, yang berfungsi sebagai antibodi untuk mengikat HBsAg yang terdapat pada sampel serum atau plasma darah, yang memiliki ciri antibodi primer adalah IgY anti-HBsAg dan antibodi sekunder monoklonal anti-HBsAg terkonjugasi HRP.

Uraian Lengkap Invensi

Invensi ini berkaitan dengan kit diagnostik dan komponen utamanya yang digunakan untuk menegakkan diagnosis infeksi virus Hepatitis B melalui deteksi keberadaan Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Lebih khusus, suatu kit diagnostik yang digunakan untuk menegakkan diagnosis infeksi virus Hepatitis B melalui deteksi keberadaan Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) yang terdiri dari komponen sebagai berikut (Gambar 1): Buffer pencuci, yang komponennya terdiri dari PBS (Phosphate Buffer Saline), Tween 20 dan Thimerozal, dimana berfungsi untuk menghilangkan protein yang bukan HBsAg dari sumur 96 well ELISA plate; Larutan substrat pewarna, yang komponennya adalah Tetra metil benzidine, dimana berfungsi sebagai substrat penghasil warna; Larutan pelarut sampel, yang komponennya terdiri dari Phosphate Buffer Saline, Tween 20 dan Thimerozal, dimana berfungsi sebagai pengencer sampel serum atau plasma darah; Larutan kontrol positif HBsAg, yang komponennya adalah HBsAg rekombinan, dimana berfungsi sebagai pembanding positif; Larutan kontrol negatif, yang komponennya terdiri adalah phosphate buffer saline, dimana berfungsi sebagai pembanding negatif; Larutan penghenti reaksi, yang

komposisinya terdiri dari 2 M H_2SO_4, dimana berfungsi untuk menghentikan reaksi pembentukan warna; Larutan antibodi sekunder, yang komponennya adalah antibodi monoklonal anti HBsAg yang terkonjugasi HRP, blocking buffer, Thimerozal dimana berfungsi sebagai antibody pendeteksi, yang dicirikan dengan antibodi monoklonal anti HBsAg yang terkonjugasi HRP; 96 well ELISA plate yang telah dilapisi antibodi primer, dimana berfungsi sebagai antibodi untuk mengikat HBsAg yang terdapat pada sampel serum atau plasma darah yang dicirikan dengan 96 well ELISA plate yang dilapisi dengan antibodi IgY anti HBsAg serta protein pelindung (blocking agent).

Kit diagnostik pendeteksi HBsAg ini terdiri dari ekstrak kasar IgY anti-HBsAg sebagai antibodi primer dan antibodi monoklonal anti-HBsAg yang terkonjugasi HRP sebagai antibodi sekunder. Prinsip kerja kit diagnostik ini dapat dilihat pada Gambar (2). 100 µl Larutan serum atau plasma darah sampel dimasukan kedalam sumur ELISA plate dan diinkubasi pada suhu 37±1 oC selama 60 menit, untuk memberi kesempatan HBsAg di dalam sampel serum atau plasma berinteraksi dengan antibodi IgY anti HBsAg pada sumur ELISA plate dan terikat pada sumur ELISA plate. Sampel didalam sumur ELISA plate kemudian dibuang dan ELISA plate dicuci lima kali dengan menggunakan bufer pencuci untuk menghilangkan HBsAg atau komponen serum/plasma yang tidak terikat pada sumur ELISA plate. Pencucian dilakukan dengan cara memasukan 320 µl bufer pencuci kedalam sumur-sumur ELISA plate, diinkubasi selama satu menit pada suhu kamar dan kemudian bufer pencuci dibuang. Pada setiap akhir pencucian, setelah bufer pencuci dibuang, sumur-sumur ELISA plate dikeringkan dengan cara menepuk-nepuk ELISA plate pada paper towel beberapa kali untuk meyakinkan bahwa tidak ada sisa air pencuci atau gelembung yang tertinggal didalam sumur-sumur ELISA plate. Selanjutnya kedalam sumur ELISA plate dimasukan antibodi sekunder terkonjugasi HRP yang spesifik mengenali

HBsAg. ELISA plate kemudian diinkubasi pada suhu 37±1 oC selama 30 menit untuk memberi kesempatan antibodi sekunder terkonjugasi HRP berinteraksi dan berikatan dengan HBsAg yang terikat di sumur ELISA plate. Larutan antibodi sekunder di dalam sumur ELISA plate kemudian dibuang dan ELISA plate dicuci sebanyak sepuluh kali dengan cara seperti sebelumnya. Setelah itu kedalam sumur-sumur ELISA plate dimasukan 100 µl larutan Tetra metil benzidin yang tersedia dan diinkubasi selama 1-2 menit. Kedalam sumur ELISA plate kemudian dimasukan 100 uL larutan penghenti reaksi, untuk menghentikan reaksi perubahan warna terus berlanjut. Keberadaan virus Hepatitis B pada sampel serum atau plasma darah dapat diketahui dengan terjadinya perubahan warna, yang dapat diukur dengan menggunakan ELISA plate reader pada panjang gelombang 450 nm. Serum atau plasma seorang pasien dianggap positif mengandung virus Hepatitis B, apabila hasil pengukuran kepekatan warna angkanya diatas nilai kontrol positif dan seorang pasien dianggap negatif apabila hasil pengukuran kepekatan warna angkanya dibawah nilai kontrol negatif.

Invensi selanjutnya adalah berkaitan dengan IgY anti-HBsAg yang digunakan sebagai komponen antibodi primer pada kit diagnostik ini. IgY anti-HBsAg yang digunakan ini merupakan ekstrak kasar antibodi yang diisolasi dari kuning telur yang dihasilkan dari ayam yang telah diimunisasi menggunakan HBsAg. Untuk produksi IgY anti HBsAg ini, ayam petelur jenis Isa Brown yang telah mendekati masa bertelur dipelihara dalam kandang individual berukuran 60 cm x 60 cm x50 cm (Panjang x Lebar x tinggi) dan diberi makan serta minum secukupnya dan perlakuan gelap terang 12 jam/12 jam. Sesaat setelah ayam mulai bertelur dilakukan imunisasi dengan 1 ml larutan imunogen, yang dibuat dengan cara mencampurkan 0,5 ml larutan HBsAg dengan konsentrasi 0,001-2 mg/mL dengan 0,5 ml larutan complete Freud’s adjuvant. Campuran ini dihomogenisasi menggunakan

three ways stop cock hingga membentuk emulsi. Dua minggu setelah imunisasi pertama, dilakukan lagi imunisasi yang kedua dengan imunogen yang dibuat dengan cara mencampurkan 0,5 ml larutan HBsAg dengan konsentrasi 0,001-2 mg/mL dengan 0,5 ml larutan incomplete Freud's adjuvant. Dua minggu setelah imunisasi kedua, dilakukan imunisasi yang ketiga dengan imunogen seperti pada imunisasi kedua. Dua minggu setelah imunisasi ketiga, dilakukan imunisasi yang keempat dengan imunogen seperti pada imunisasi kedua. Penyuntikan dilakukan secara intramuscular pada kedua sisi dada ayam masing-masing dengan 0,5 mL immunogen. Telur ayam dikumpulkan setiap hari untuk diisolasi antibodinya.

Antibodi dipanen pada minggu ke tujuh dengan cara sebagai berikut : kuning telur dipisahkan dari putih telur dan dicampurkan dengan Phosphate Buffer Saline dengan volume satu hingga dua kali lipatnya. Kemudian kedalamnya ditambahkan PEG-6000 industrial hingga konsentrasinya mencapai 1-9%. Campuran ini kemudian disentrifugasi dengan besaran gravitasi 2.000 – 15.000g. Supernatan diambil dan disaring dengan menggunakan penyaring kapas hingga larutannya menjadi bening. Ke dalamnya kemudian ditambahkan PEG-6000 industrial hingga konsentrasi akhirnya mencapai 5,5-17,5%. Campuran ini kemudian disentrifugasi dengan besaran gravitasi 2.000 – 15.000g dan supernatannya dibuang. Endapan yang diperoleh kemudian dilarutkan kembali ke pada 10 mL Phosphate Buffer Saline. Ke dalam larutan ini kemudian ditambahkan PEG-6000 industrial hingga konsentrasinya mencapai 8,5-20,4%. Larutan kemudian disentrifugasi kembali dengan besaran gravitasi 2.000 – 15.000g, kemudian supernatannya dibuang dan endapan yang diperoleh dilarutkan ke dalam 2 mL larutan Phosphate Buffer Saline yang mengandung PEG-600 dengan konsentrasi 0-2%. Alur kerja untuk produksi antibodi primer IgY anti-HBsAg dapat dilihat pada Gambar (3).

IgY hasil isolasi tersebut kemudian di uji kemurniaanya dengan SDS-PAGE. Jika ukuran IgY yang didapat sudah sesuai dengan referensi, yakni sekitar 25 kD untuk Light Chain (LC) dan 68 kDa untuk heavy chain (HC) dan kemurniannya mencapai lebih dari 80%, maka sediaan IgY anti HBsAg tersebut dapat digunakan sebagai koponen kit HBsAg. Gambar 4 menunjukkan IgY yang ditandai dengan dua pita yang tebal. Adapun pita-pita tipis lainnya adalah protein lain yang masih tersisa dalam larutan sampel. Berdasarkan analisis dengan aplikasi ImageJ, tingkat kemurnian IgY yang dihasilkan dengan metode presipitasi menggunakan PEG 6000 adalah sekitar 86%.

Antibodi monoklonal (mAb) anti-HBsAg dari ARISTA dikonjugasikan dengan enzim Horseradish Peroxidase. Konjugat mAb-HRP selanjutnya digunakan sebagai antibodi sekunder dalam ELISA untuk mendeteksi HBsAg. Alur kerja konjugasi HRP pada antibodi monoklonal anti-HBsAg dapat dilihat pada Gambar (5). Kedalam 0,1-1,5 mL larutan 0,4-8,0 mg/ml HRP dalam dH2O steril direaksikan denan 0,01-0,5 mL NaIO4 0,1 M dalam dH2O. Campuran kemudian diinkubasi dan dicampur menggunakan stirrer pada suhu ruang selama 10-60 menit, dalam keadaan gelap. Terjadinya reaksi akan ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan dari merah menjadi kuning kehijauan. Larutan yang dihasilkan selanjutnya didialisis dalam bufer NaOAc 1 mM pH 2,4-4,4 selama 1 - 18 jam pada suhu 4oC. kemudian kedalamnya ditambahkan 10-30 µL bufer natrium karbonat 0,2-4,4 M pH 9,5. Pada saat yang sama, larutan antibodi anti-HBsAg (0,4-4,4 mg antibodi) ditambahkan 50 µL bufer natrium karbonat 0,2 M pH 9,5. Kemudian larutan antibodi monoklonal dicampurkan kedalam larutan HRP hasil dialisis dan diaduk selama 2 jam pada suhu ruang dengan mengguanakan stirer. Selanjutnya kedalam campuran tersebut ditambahkan 50 µL NaBH4 (4mg/mL) dan diaduk menggunakan stirrer selama 2 jam pada suhu 4 oC, dalam keadaan gelap. Campuran kemudian didialisis dengan bufer PBS 1x pH7,4 selama overnight.

Bovin serum albumin dan pengawet thymerosal kemudian ditambahkan pada larutan hasil dialisis hingga konsentrasi akhirnya mencapai 5 mg/mL dan 0,1%. Campuran dialiquot dan disimpan pada suhu -20 oC. Antibodi sekunder hasil konjugasi ini selanjutnya diuji menggunakan ELISA dan dibandingkan kinerjanya dengan antibodi terkonjugasi HRP yang komersial. Hasil konjugasi produksi sendiri kit diagnostk sesuai invensi ini memiliki performa yang setara dengan antibodi sekunder terkonjugasi HRP yang komersial seperti pada Gambar 6.

Klaim

1. Suatu kit diagnostik untuk menegakkan diagnosis infeksi virus Hepatitis B melalui deteksi keberadaan Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg), dimana terdiri dari komponen sebagai berikut :
   a. buffer pencuci, yang komponennya terdiri dari PBS (*Phosphate Buffer Saline*), Tween 20 dan Thimerozal;
   b. larutan substrat pewarna yang berupa Tetra metil benzidine;
   c. larutan pelarut sampel, yang terdiri dari *Phosphate Buffer Saline*, Tween 20 dan Thimerozal;
   d. larutan kontrol positif HBsAg yang berupa HBsAg rekombinan;
   e. larutan kontrol negative, yang berupa *phosphate buffer saline*;
   f. larutan penghenti reaksi yang berupa 2 M H_2SO_4;
   g. *ELISA plate* yang dicirikan :
      dimana sumur-sumur pada ELISA platenya telah dilapisi dengan ekstrak kasar antibodi primer IgY anti-HBsAg;
   h. larutan antibodi sekunder yang dicirikan :
      dengan penggunaan antibodi monoklonal anti HBsAg yang terkonjugasi HRP.

2. Suatu proses pembuatan antibodi primer IgY anti-HBsAg seperti pada kit diagnostik pendeteksi HBsAg seperti pada klaim 1, dimana memiliki tahapan sebagai berikut :
   a. melakukan imunisasi terhadap ayam dengan menggunakan HBsAg sebanyak dua hingga enam kali dengan jumlah antigen per penyuntikan sebanyak 1 μg-1mg;
   b. memisahkan kuning telur dari putih telur;
   c. mencampurkan kuning telur dengan Phosphate Buffer Saline;
   d. mencampurkan larutan kuning telur dengan PEG-6000 hingga rentang konsentrasi akhir 1-9%;

e. mengendapkan partikel tersuspensi dengan cara sentrifugasi dengan besaran gravitasi 2000 – 15.000*g*;
f. menyaring supernatant dengan menggunakan filter kapas atau fulter kertas;
g. menambahkan PEG-6000 kedalam filtrat yang diperoleh, hingga konsentrasi akhirnya mencapai 5,5-17,5%;
h. mengendapkan partikel tersuspensi dengan cara sentrifugasi dengan besaran gravitasi 2000 – 15.000g;
i. meresuspensikan endapan yang diperoleh dengan larutan Phosphate Buffer Saline yang mengandung PEG-6000 dengan konsentrasi 8,5-20,4%;
j. mengendapkan partikel tersuspensi dengan cara sentrifugasi dengan besaran gravitasi 2000 – 15.000g;
k. meresuspensikan endapan yang diperoleh dengan larutan *Phosphate Buffer Saline* yang mengandung PEG-6000 dengan konsentrasi 0-2%.

3. Suatu proses pembuatan antibodi monoklonal anti-HBsAg yang terkonjugasi HRP sebagai antibodi sekunder pada kit diagnostik pendeteksi HBsAg seperti pada klaim 1, dimana memiliki tahapan sebagai berikut :
a. mereaksikan 0,1-1,5 ml larutan 0,4-8 mg/ml HRP dengan 0,1-0,2 mL NaIO4 0,01-0,5 M;
b. menginkubasi campuran tersebut pada suhu ruang selama 10-60 menit dalam keadaan gelap;
c. melakukan dialisis dalam bufer NaOAc 1 mM pH 2,4-4,4 selama 1 - 18 jam;
d. menambahkan 10-30 µL bufer natrium karbonat 0,2-4,5 M pH 9,5 kedalam hasil dialisis;
e. mereaksikan larutan antibodi anti-HBsAg (0,4-4 mg) dengan 50 µL bufer natrium karbonat 0,2 M pH 9,5;
f. mencampurkan antibody anti HBsAg yang telah direaksikan kedalam larutan HRP hasil dialisis;

g. menambahkan 50 µL NaBH4 (4mg/mL) kedalam campuran tersebut;
h. melakukan dialisis dengan bufer PBS 1x pH7,4 selama 1 - 18 jam;
i. menambahkan bovine serum albumine dan pengawet thymerosal kedalam larutan hasil dialisis.

4. Suatu proses pembuatan kit diagnostik untuk menegakkan diagnosis infeksi virus Hepatitis B melalui deteksi keberadaan Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg), seperti pada klaim 1, dimana memiliki tahapan sebagai berikut :
a. memasukan larutan IgY anti HBsAg, yang memiliki konsentarsi sebesar 100-700 ng/ml, sebanyak 10 - 300 *µl* kedalam setiap sumur-sumur ELISA;
b. memasukan *ELISA plate* kedalam sebuah kontainer yang telah dialasi oleh kertas atau kain basah;
c. menginkubasi *ELISA plate* yang berada didalam kontainer pada suhu 1-10°C selama 1 - 18 jam;
d. mencuci *ELISA plate* dengan menggunakan larutan *Phosphate Buffer Saline*, yang mengandung 0,001 – 0,1% Tween-20;
e. menepuk-nepuk *ELISA plate*, dengan permukaan sumur-sumur ELISA menghadap kebawah, pada kertas tisu, untuk menghilangkan sisa air pencuci dan gelembung yang tertinggal di dalam sumur-sumur ELISA;
f. memasukan larutan 0,005 - 5,0% *bovine serum albumine* atau larutan 0,005 - 5,0% *casein* atau larutan 0,005 - 5,0% susu skim sebanyak 10 – 300 µl kedalam sumur-sumur ELISA;
g. memasukan *ELISA plate* kedalam sebuah kontainer yang telah dialasi oleh kertas atau kain basah;
h. menginkubasi *ELISA plate* yang berada didalam kontainer pada suhu 1-10°C selama 1 - 18 jam;
i. mencuci *ELISA plate* dengan menggunakan larutan *Phosphate Buffer Saline*, yang mengandung 0,001 – 0,1% Tween-20;

j. menepuk-nepuk *ELISA plate*, dengan permukaan sumur-sumur ELISA menghadap kebawah, pada kertas tisu, untuk menghilangkan sisa air pencuci dan gelembung yang tertinggal di dalam sumur-sumur ELISA;

k. menginkubasi *ELISA plate* pada sebuah oven pengering yang memiliki suhu antara 20 – 60 °C, dengan kelembaban relatif antara 5 – 40 %, selama 1 - 18 jam;

l. menempatkan *ELISA plate* yang telah dikeringkan pada sebuah kontainer kedap udara yang berisi *silica gel* dan memiliki kelembaban relatif antara 5 – 40 %;

m. menyimpan *ELISA plate* yang berada didalam kontainer berisi *silica gel* pada sebuah lemari pendingin dengan suhu antara 1 – 20 °C paling lama selama 30 hari atau langsung mengemas *ELISA plate* yang telah dikeringkan kedalam kantung alumunium yang berisi kantung *silica gel*, pada ruangan yang memiliki kelembaban relatif antara 5 – 40 %;

n. memasukan *ELISA plate*, yang telah dikemas didalam kantung alumunium kedalam sebuah tempat penyimpanan dan kemudian menempatkannya di dalam lemari pendingin dengan suhu antara 1 – 20 °C;

o. menyiapkan lembaran kardus kemasan kit diagnostik dan membentuknya menjadi sebuah kotak;

p. memasukan komponen buffer pencuci kedalam kotak kemasan kit diagnostik;

q. memasukan larutan substrat pewarna kedalam kotak kemasan kit diagnostik;

r. memasukan larutan pelarut sampel kedalam kotak kemasan kit diagnostik;

s. memasukan larutan kontrol positif HBsAg kedalam kotak kemasan kit diagnostik;

t. memasukan larutan kontrol negatif kedalam kotak kemasan kit diagnostik;

u. memasukan larutan penghenti reaksi kedalam kotak kemasan kit diagnostik;
v. memasukan ELISA plate yang telah terkemas didalam kantung alumunium kedalam kotak kemasan kit diagnostik;
w. memasukan larutan antibodi sekunder kedalam kotak kemasan kit diagnostik;
x. menutup kotak kemasan kit diagnostik;
y. menyegel dengan segel;
z. menempelkan informasi waktu produksi dan waktu kadaluarsa kit diagnostik pada permukaan kotak kemasan kit diagnostik;
aa. menyimpan kit diagnostik pada tempat yang memiliki suhu antara 1 – 20 °C;

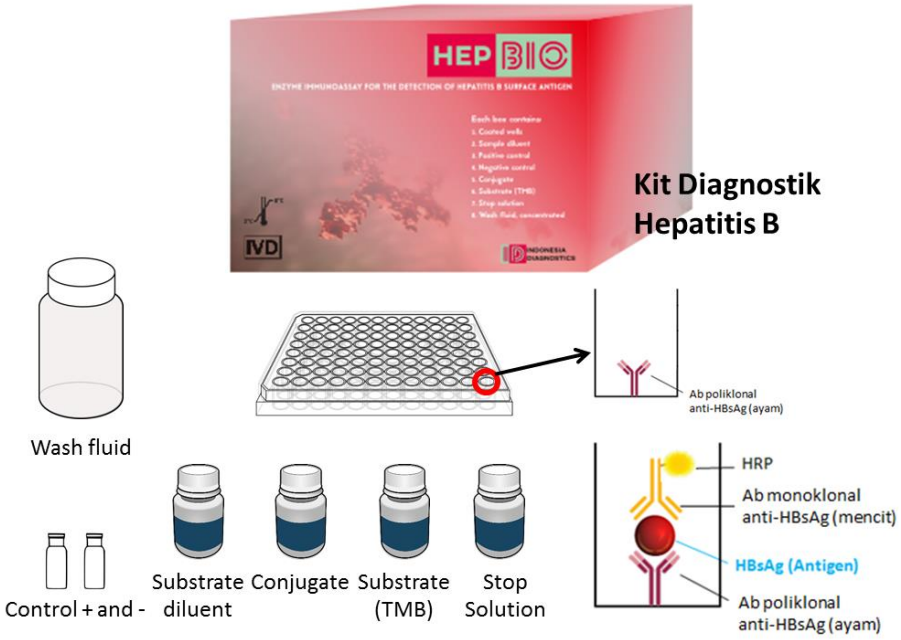
Abstrak

KIT DIAGNOSTIK UNTUK MENDETEKSI INFEKSI VIRUS HEPATITIS B MENGGUNAKAN ANTIBODI PRIMER IGY ANTI HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg) DAN ANTIBODI SEKUNDER MONOKLONAL ANTI-HBSAG YANG TERKONJUGASI HORSERADISH PEROXIDASE (HRP) DAN PROSES PEMBUATANNYA

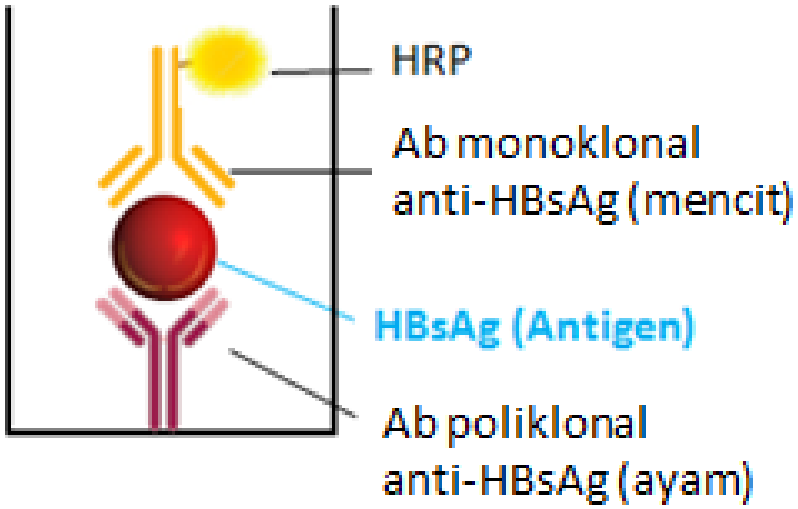
`

Invensi ini berkaitan kit diagnostik yang digunakan untuk menegakkan diagnosis infeksi virus Hepatitis B melalui deteksi keberadaan Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) dan proses pembuatannya. Kit diagnostik sesuai invensi ini dicirikan dengan penggunaan komponen antibodi primer IgY anti-HBsAg dan antibodi sekunder monoklonal anti-HBsAg yang terkonjugasi Horseradish peroxidase (HRP).

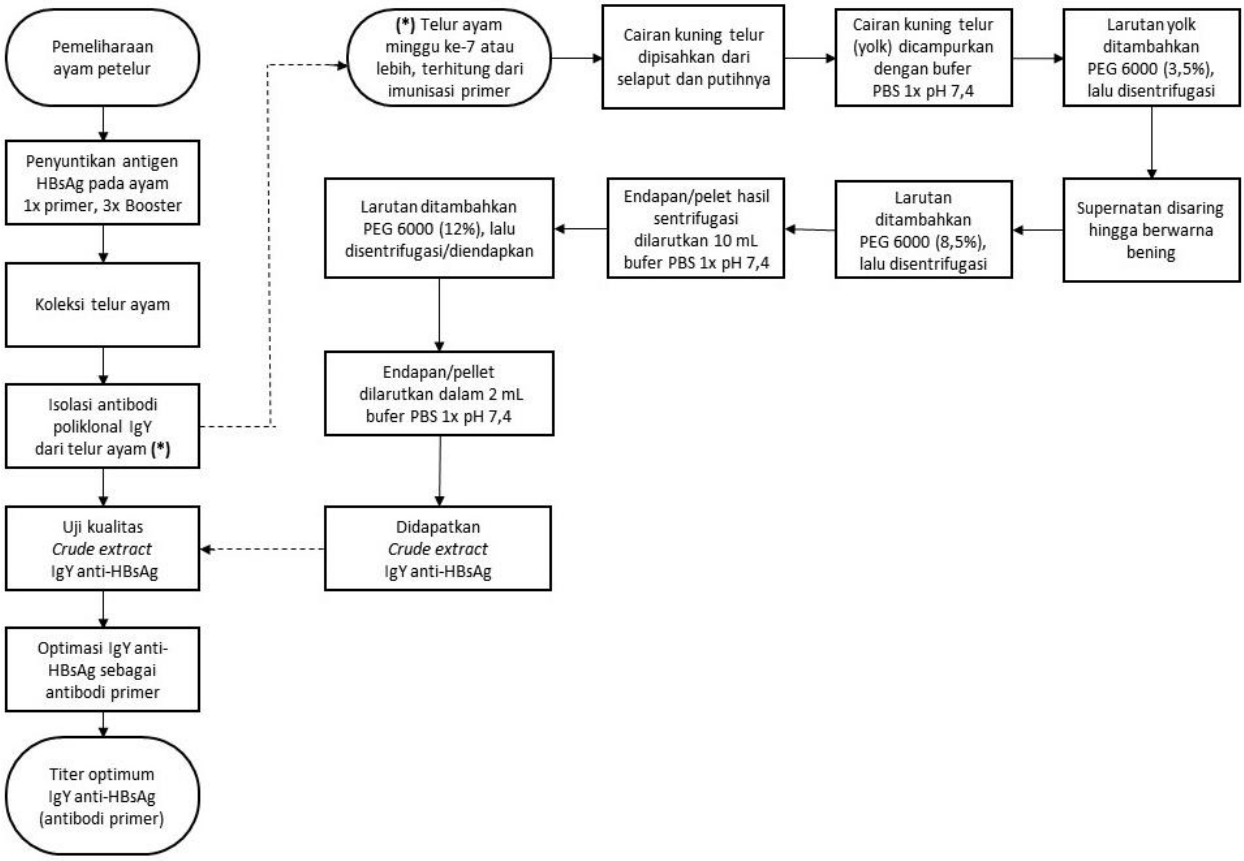
IgY anti-HBsAg yang digunakan adalah berupa *crude extract* yang diperoleh dari isolasi kuning telur ayam. Antibodi monoklonal anti-HBsAg yang terkonjugasi HRP digunakan sebagai antibodi sekunder. Tujuan dari invensi ini adalah menyediakan kit diagnostik yang dapat digunakan untuk mendeteksi infeksi Hepatitis B di Indonesia, dengan menggunakan komponen yang dapat dihasilkan dalam jumlah besar tanpa menyakiti hewan yang digunakan.



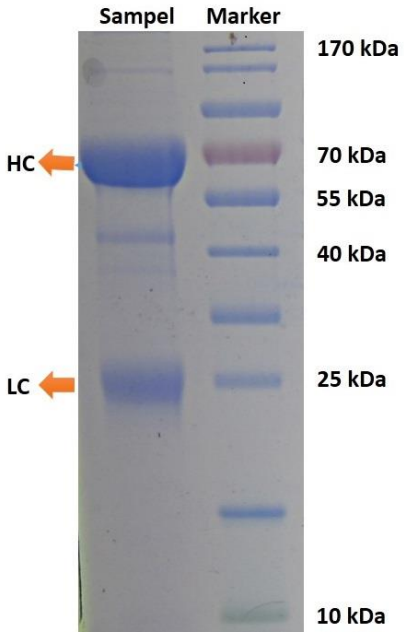
Gambar 1



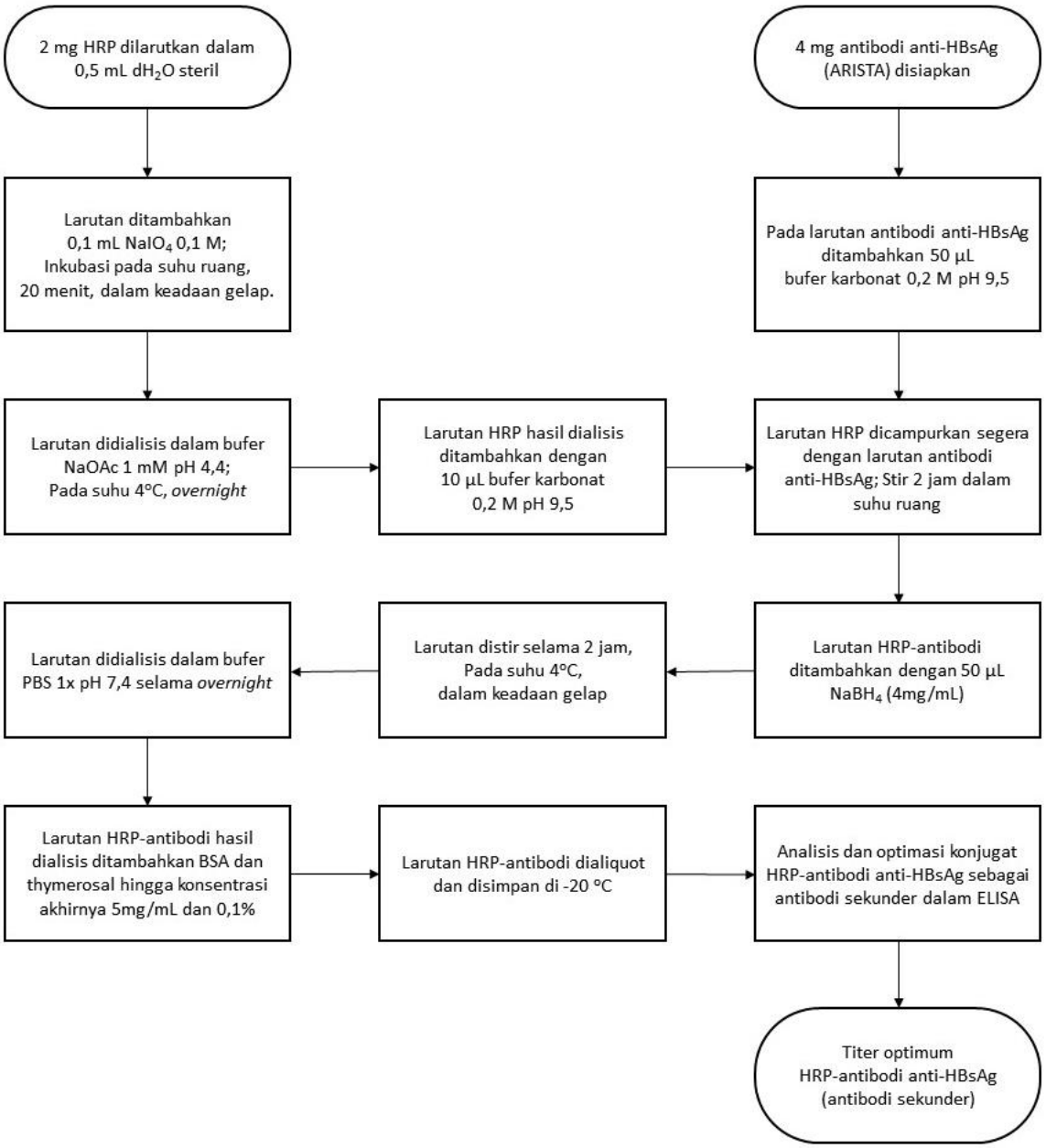
Gambar 2


Pemeliharaan ayam petelur
Penyuntikan antigen HBsAg pada ayam 1x primer, 3x Booster
Koleksi telur ayam
Isolasi antibodi poliklonal IgY dari telur ayam (*)
Uji kualitas Crude extract IgY anti-HBsAg
Optimasi IgY anti-HBsAg sebagai antibodi primer
Titer optimum IgY anti-HBsAg (antibodi primer)
(*) Telur ayam minggu ke-7 atau lebih, terhitung dari imunisasi primer
Cairan kuning telur dipisahkan dari selaput dan putihnya
Cairan kuning telur (yolk) dicampurkan dengan bufer PBS 1x pH 7,4
Larutan yolk ditambahkan PEG 6000 (3,5%), lalu disentrifugasi
Supernatan disaring hingga berwarna bening
Larutan ditambahkan PEG 6000 (8,5%), lalu disentrifugasi
Endapan/pelet hasil sentrifugasi dilarutkan 10 mL bufer PBS 1x pH 7,4
Larutan ditambahkan PEG 6000 (12%), lalu disentrifugasi/diendapkan
Endapan/pellet dilarutkan dalam 2 mL bufer PBS 1x pH 7,4
Didapatkan Crude extract IgY anti-HBsAg

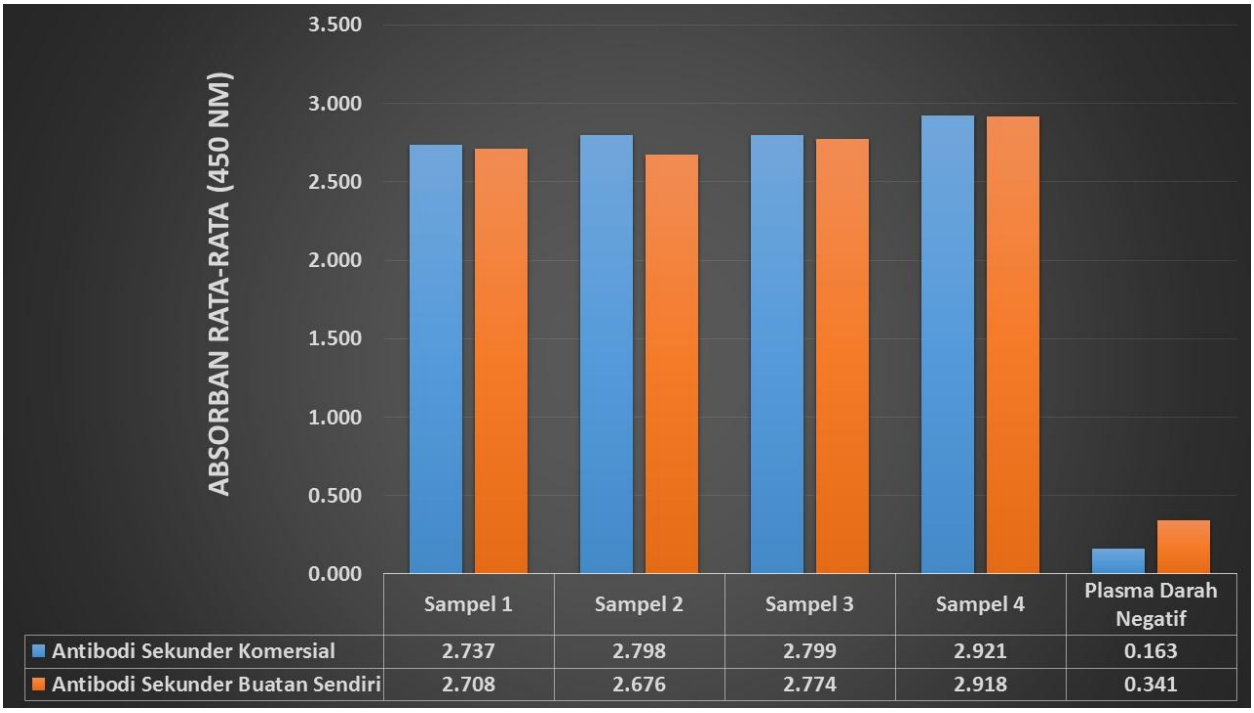
Gambar 3



Gambar 4


2 mg HRP dilarutkan dalam 0,5 mL dH_2O steril
4 mg antibodi anti-HBsAg (ARISTA) disiapkan
Larutan ditambahkan 0,1 mL $NaIO_4$ 0,1 M; Inkubasi pada suhu ruang, 20 menit, dalam keadaan gelap.
Pada larutan antibodi anti-HBsAg ditambahkan 50 µL bufer karbonat 0,2 M pH 9,5
Larutan didialisis dalam bufer NaOAc 1 mM pH 4,4; Pada suhu 4°C, *overnight*
Larutan HRP hasil dialisis ditambahkan dengan 10 µL bufer karbonat 0,2 M pH 9,5
Larutan HRP dicampurkan segera dengan larutan antibodi anti-HBsAg; Stir 2 jam dalam suhu ruang
Larutan didialisis dalam bufer PBS 1x pH 7,4 selama *overnight*
Larutan distir selama 2 jam, Pada suhu 4°C, dalam keadaan gelap
Larutan HRP-antibodi ditambahkan dengan 50 µL $NaBH_4$ (4mg/mL)
Larutan HRP-antibodi hasil dialisis ditambahkan BSA dan thymerosal hingga konsentrasi akhirnya 5mg/mL dan 0,1%
Larutan HRP-antibodi dialiquot dan disimpan di -20 °C
Analisis dan optimasi konjugat HRP-antibodi anti-HBsAg sebagai antibodi sekunder dalam ELISA
Titer optimum HRP-antibodi anti-HBsAg (antibodi sekunder)

Gambar 5



	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3	Sampel 4	Plasma Darah Negatif
Antibodi Sekunder Komersial	2.737	2.798	2.799	2.921	0.163
Antibodi Sekunder Buatan Sendiri	2.708	2.676	2.774	2.918	0.341

Gambar 6