

## KONJUGAT TIROKSIN DENGAN TIROGLOBULIN ( $T_4$ -Tg) SEBAGAI IMUNOGEN PEMBENTUK ANTIBODI ANTI- $T_4$

Nanny Kartini H.\* , A.Hanafiah Ws.\* , V.Diana Z.A. \*\* , Sukanta \*\*

\* Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

\*\* Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam - UNPAD, Bandung.

### ABSTRAK

KONJUGAT TIROKSIN DENGAN TIROGLOBULIN ( $T_4$ -Tg) SEBAGAI IMUNOGEN PEMBENTUK ANTIBODI ANTI- $T_4$ . Telah dilakukan penelitian pembuatan antibodi anti- $T_4$  dari kompleks hasil konjugasi  $T_4$ -tiroglobulin dengan tujuan untuk mendapatkan antibodi anti- $T_4$  yang mempunyai titer dan kualitas tinggi serta memenuhi persyaratan sebagai bahan pereaksi dalam kit RIA. Metode konjugasi antara molekul  $T_4$  dan molekul tiroglobulin, imunisasi kelinci dengan imunogen dan pengujian kualitas dari antibodi anti- $T_4$  yang dihasilkan, merupakan masalah yang dipelajari. Metode konjugasi dilakukan dua macam yaitu metode glutaraldehid dan metode karbodiimida. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kompleks  $T_4$ -Tg dengan metode glutaraldehid lebih baik digunakan sebagai imunogen dalam menghasilkan antibodi anti- $T_4$ .

### ABSTRACT

THYROXINE AND THYROGLOBULIN ( $T_4$ -Tg) CONJUGATE AS AN IMMUNOGEN FOR THE PRODUCTION OF ANTI- $T_4$  ANTIBODY. The production of high titre and high quality anti- $T_4$  antibody by using  $T_4$ -Tg conjugate as immunogen has been carried out. The preparation method for the  $T_4$ -Tg conjugate, rabbit immunization with immunogen and the quality of produced antibodies are the parameters to be studied. Conjugation has been carried out by the glutaraldehyde and carbodiimide methods. The results show that the  $T_4$ -Tg complex from glutaraldehyde is the better immunogen for the production of anti- $T_4$  antibody.

### PENDAHULUAN

Radioimmunoassay  $T_4$  merupakan salah satu cara yang baik untuk diagnosis gangguan fungsi tiroid. Akhir-akhir ini telah banyak rumah sakit di Indonesia yang menggunakan cara RIA untuk maksud tersebut.

Kit-RIA adalah suatu perangkat komersial yang mengandung komponen-komponen sebagai berikut : standar (antigen tidak bertanda), antigen bertanda radioaktif (perunut = tracer), antiserum dan bahan pemisah serta dilengkapi dengan protokol khusus untuk suatu pengujian [1]. Kit-RIA ini sekarang masih harus didatangkan dari luar negeri.

Dalam upaya untuk dapat memproduksi suatu kit-RIA sendiri, khususnya RIA- $T_4$  didapatkan kepada suatu masalah yaitu membuat antibodi  $T_4$  yang bermutu tinggi sehingga dapat digunakan untuk suatu sistem RIA. Antibodi dapat diperoleh dengan mengimmunisasi hewan percobaan dengan imunogen, yaitu suatu zat yang dapat menimbulkan respon imun.

Tiroksin ( $T_4$ ) dengan ukuran molekul yang kecil ( $BM \pm 750$ ) tidak akan bersifat imunogenik, sedangkan salah satu kriteria agar suatu

senyawa bersifat imunogenik adalah harus mempunyai berat molekul yang lebih besar dari 10.000. Maka agar bersifat imunogenik, molekul  $T_4$  harus digabungkan dengan molekul protein pembawa yang besar seperti serum albumin atau makromolekul lain [7,8].

Selama ini untuk membuat antibodi- $T_4$  digunakan imunogen dari senyawa konjugat  $T_4$ -BSA (bovine serum albumin), akan tetapi titer antibodi yang diperoleh masih kurang memuaskan. Senyawa konjugat  $T_4$  yang digabungkan dengan tiroglobulin (Tg) sebagai imunogen diduga dapat menyebabkan pembentukan antibodi yang mempunyai titer yang lebih tinggi karena tiroglobulin sendiri mengandung 3- 4 molekul  $T_4$  [2,6].

Berdasarkan atas pemikiran tersebut, di dalam penelitian ini dicari metode pembentukan kompleks  $T_4$ -Tg yang tepat sehingga kompleks yang diperoleh dapat digunakan sebagai imunogen yang dapat menghasilkan antibodi anti- $T_4$ . Kemudian antibodi yang dihasilkan ditentukan aviditas dan kespesifikannya, sehingga dapat diketahui apakah antibodi

tersebut mempunyai kualitas yang baik atau tidak untuk digunakan dalam sistem RIA- $T_4$ .

## BAHAN, PERALATAN DAN HEWAN PERCOBAAN

### Bahan dan peralatan

Bahan yang digunakan adalah L-tiroksin ( $T_4$ ), 3-monoiodo L-tirosine (MIT), 3,5-diiodo L-tirosine (DIT), 3,5-diiodo L-tironin ( $T_4$ ), 3,5,3'-triiodo L-tironin ( $T_4$ ), tiroglobulin sapi (Tg), albumin serum sapi (BSA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida HCl (EDAC), glutaraldehida, asam 8-anilin-1 naftalen sulfonat (ANS), ajuvan Freund lengkap, ajuvan Freund tidak lengkap, N,N-dimetilformamida dan  $NaN_3$  (natrium azida) yang semuanya buatan Sigma dengan kualitas untuk analisis. Selain itu digunakan juga polietilenglikol-6000 (PEG),  $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ , NaCl, indikator universal Art.9175, karbon aktif dan celite-545 semuanya buatan E.Merck. Larutan NaCl fisiologis steril dan air untuk injeksi (IPHA), sedangkan  $Na^{125}I$  dari POLATOM-Polandia dan kit-RIA  $T_4$  PPTN-Bandung.

Alat yang digunakan adalah sentrifuga yang dilengkapi dengan pendingin (Herause), mikropipet (Ependorf) berbagai ukuran, pengaduk vortex, pH-meter (Metrohm Herisau E 520), alat freeze dryer (Labconco), seperangkat alat dialisa dan alat-alat gelas lainnya.

### Kondisi hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah kelinci dengan umur 4-5 bulan dengan berat badan 2-2,5 kg yang sebelumnya dipelihara dahulu dalam kandangnya selama satu minggu, untuk memberikan kesempatan kepada kelinci tersebut membiasakan diri terhadap lingkungannya. Untuk tujuan imunisasi, kelinci disuntik pada bagian punggung secara intradermal sebanyak kurang lebih 20 buah titik suntik, sedangkan untuk suntikan ulang (booster) disuntik pada bagian paha secara subkutan.

## TATAKERJA

### Pembuatan kompleks $T_4$ -Tg.

Kompleks  $T_4$ -Tg dibuat dengan dua macam metode, yaitu:

#### Metode karbodiimida

Dua miligram L-tiroksin dilarutkan dalam 500 ml dimetilformamida dengan cara membiarkan campuran tersebut beberapa jam pada suhu 4 °C sampai larut sempurna. Kemudian

ditambahkan satu tetes larutan  $^{125}I-T_4$  sehingga satu ml larutan L-tiroksin memberikan cacahan sekitar 2000 cpm.

Sebanyak 20 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida HCl (EDAC) dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,9%, lalu dicampur dengan 6 mg tiroglobulin yang telah dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,9%. Ke dalam larutan tiroglobulin-EDAC ditambahkan larutan L-tiroksin tetes demi tetes sambil dikocok hingga larutan menjadi keruh. Campuran ditetapkan pH nya dengan pertolongan indikator universal pada pH 4-5 memakai larutan HCl 0,1N.

Campuran tersebut dikocok pada suhu kamar selama 2 jam sambil dilindungi dari cahaya. Kemudian pH larutan diperiksa kembali dan tetap dipertahankan pada pH 4-5. Pengocokan dilanjutkan lagi selama satu malam pada suhu kamar dengan pengocok rotasi sambil tetap dilindungi dari cahaya.

Kompleks  $T_4$ -Tg yang terjadi dimurnikan dengan metode dialisis selama 2 hari di dalam air suling pada suhu 4 °C. Efisiensi konjugasi yang terjadi dapat diketahui dengan membandingkan besarnya keradioaktifan dari 1 ml larutan sebelum dan sesudah dialisis. Sediaan yang terjadi didistribusikan ke dalam vial 2 ml, masing-masing berisi 1 ml larutan dan dikeringkan dengan sistem liofilisasi.

#### Metode Glutaraldehida

Cara kerja, sama dengan metode karbodiimida hanya mengganti senyawa karbodiimida dengan 18,5  $\mu$ l senyawa glutaraldehida, dan pH reaksi pada metode ini adalah 9-10.

#### Imunisasi dan pengambilan darah pada kelinci percobaan.

Dosis imunogen yang diberikan pada imunisasi awal adalah 1 mg/kg berat badan kelinci dan volumenya 1-2 ml. Imunisasi awal dilakukan secara intra dermal pada punggung kelinci sebanyak kurang lebih 20 titik suntik. Suntikan ulang (booster) dilakukan setiap bulan secara subkutan pada paha kelinci dengan dosis 0,5 mg/kg berat badan.

Darah diambil dari vena marginalis setiap minggu, kemudian didiamkan selama 1-2 jam pada suhu kamar sampai serum terpisah dari komponen darah lainnya. Setelah itu serum dipisahkan dengan pemusingan pada suhu 4 °C dan serum yang diperoleh diawetkan dengan natrium azida 0,2 % kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

### *Pengujian antibodi anti-T<sub>4</sub> yang dihasilkan Penentuan titer antibodi anti-T<sub>4</sub>*

Dari antiserum yang diperoleh tiap minggu dilakukan beberapa pengenceran yaitu antara 1 sampai 1280 kali menggunakan dapar fosfat 0,05 M pH.7,5 . Selanjutnya dilakukan penentuan titer yaitu untuk mengetahui jumlah antibodi yang ada di dalam antiserum tersebut.

Penentuan titer antibodi dilakukan sebagai berikut :

Ke dalam tabung reaksi dicampurkan berturut-turut 50 µl serum bebas T<sub>4</sub>, 100 µl antibodi T<sub>4</sub> yang diperiksa (hasil pengenceran) dan 100 µl larutan perunut <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> yang telah mengandung 3 mg/ml ANS. Campuran diaduk dengan pengaduk vortex, lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Kemudian ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1 ml larutan PEG-6000 18%, selanjutnya dilakukan pemusingan untuk memisahkan fraksi terikat dari fraksi bebas. Setelah didekantasi, endapan dicacah keradioaktifannya menggunakan pencacah sinar γ. Selanjutnya dibuat grafik yang menyatakan hubungan antara fraksi terikat dengan pengenceran.

### *Penentuan pengenceran optimal dari antiserum anti-T<sub>4</sub>*

Untuk menentukan pengenceran yang optimal dibuat dua buah kurva titrasi antiserum T<sub>4</sub> dengan menggunakan baku T<sub>4</sub> yang 0 nmol/l dan baku T<sub>4</sub> 100 nmol/l. Untuk maksud ini dilakukan percobaan yang sama dengan penentuan titer antibodi T<sub>4</sub>, hanya mengganti serum bebas T<sub>4</sub> dengan larutan-larutan baku tersebut. Kemudian dibuat grafik antara fraksi terikat dan faktor pengenceran dari kedua seri percobaan. Dari kedua kurva titrasi ini ditentukan pengenceran antiserum yang optimal yaitu dengan memilih pengenceran yang menghasilkan jarak terjauh antara dua kurva tersebut di dalam daerah kerja yang dimaksud.

### *Penentuan daerah kerja dan kepekaan yang diinginkan*

Setelah didapat pengenceran optimal kemudian dilakukan pembuatan kurva baku dan kurva profil presisi dari beberapa pengenceran antiserum disekitar pengenceran optimal. Caranya adalah sebagai berikut : Berturut-turut ke dalam tabung reaksi dimasukkan 25 µl baku T<sub>4</sub> (0, 10, 50, 100, 150, 250 nmol/l), 100 µl antiserum dari hasil beberapa pengenceran sekitar pengenceran optimal dan

100 µl <sup>125</sup>I- T<sub>4</sub>, dan dikocok dengan pengaduk vortex. Setelah diinkubasi selama 1 jam ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1 ml PEG 18%, dan diaduk kembali dengan pengaduk vortex dan disentrifuga pada 10 °C selama 30 menit pada 3000 rpm untuk memisahkan fraksi terikat dan fraksi bebasnya. Lalu cairan dalam tabung didekantasi, dan endapan dicacah radioaktivitasnya.

### *Penentuan aviditas*

Penentuan aviditas dilakukan setelah diperoleh pengenceran optimal antiserum. Aviditas ditentukan dari kurva Scatchard dengan mengalurkan B/F sebagai ordinat dan konsentrasi baku T<sub>4</sub> sebagai absis. Aviditas dinyatakan sebagai nilai K di mana nilai K ini didapat dari koefisien arah (slope) pada kurva Scatchard.

### *Penentuan kespesifikan*

Kespesifikan antibodi ditentukan dengan melakukan reaksi silang antara antibodi T<sub>4</sub> dengan senyawa-senyawa yang strukturnya mirip dengan antigen T<sub>4</sub>. Senyawa yang dipergunakan untuk tujuan ini adalah: T<sub>3</sub> (3,5,3'-triiodo L-tironin), T<sub>2</sub> (3,5-diiodo L-tironin), DIT (3,5-diiodo L-tirosin) dan MIT (3-iodo L-tirosin).

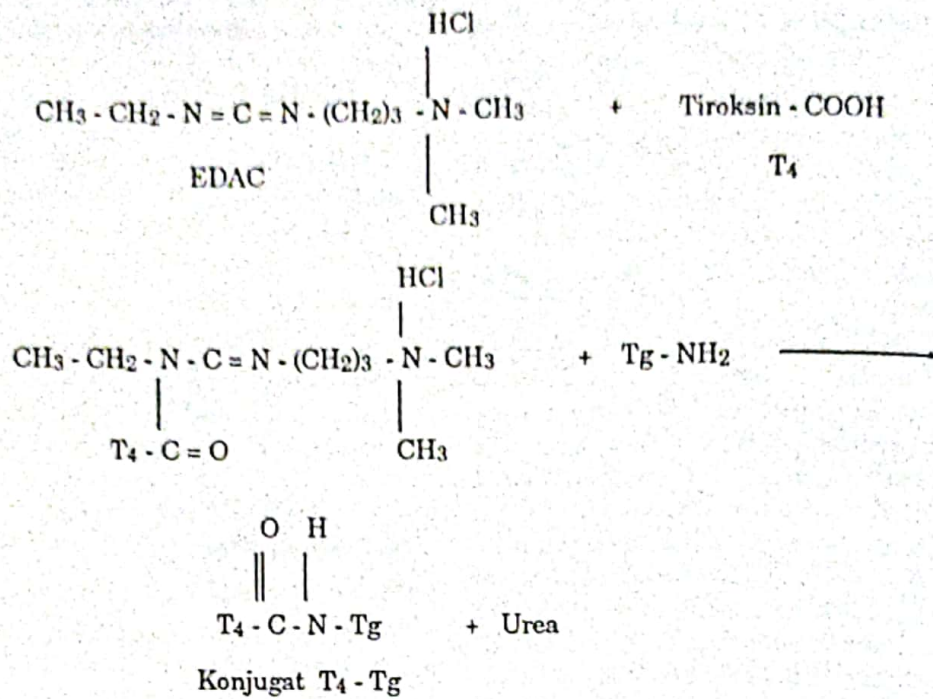
Dibuat kurva baku T<sub>4</sub> dengan konsentrasi 0, 10, 50, 100, 150 dan 250 nmol/l, kemudian dibuat juga kurva pengenceran dari T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, DIT dan MIT dengan konsentrasi 10, 100, 1000, 10.000 dan 100.000 nmol/l. Prosedur percobaan dilakukan sama seperti pada pembuatan kurva baku T<sub>4</sub>. Derajat reaksi silang diperoleh dari perbandingan ED-50 kurva baku T<sub>4</sub> terhadap ED-50 kurva pengenceran senyawa-senyawa T<sub>3</sub>, T<sub>2</sub>, DIT dan MIT.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembentukan kompleks tiroksin-tiroglobulin (T<sub>4</sub>-Tg) dilakukan dengan dua macam metode, yaitu metode karbodiimida dan metode glutaraldehida.

Metode karbodiimida reaksi konjugasi berlangsung pada pH 4-5. Karbodiimida berfungsi sebagai pereaksi penggabung dalam pembentukan ikatan peptida antara gugus karboksil dalam molekul T<sub>4</sub> dengan gugus amino bebas dari molekul tiroglobulin.

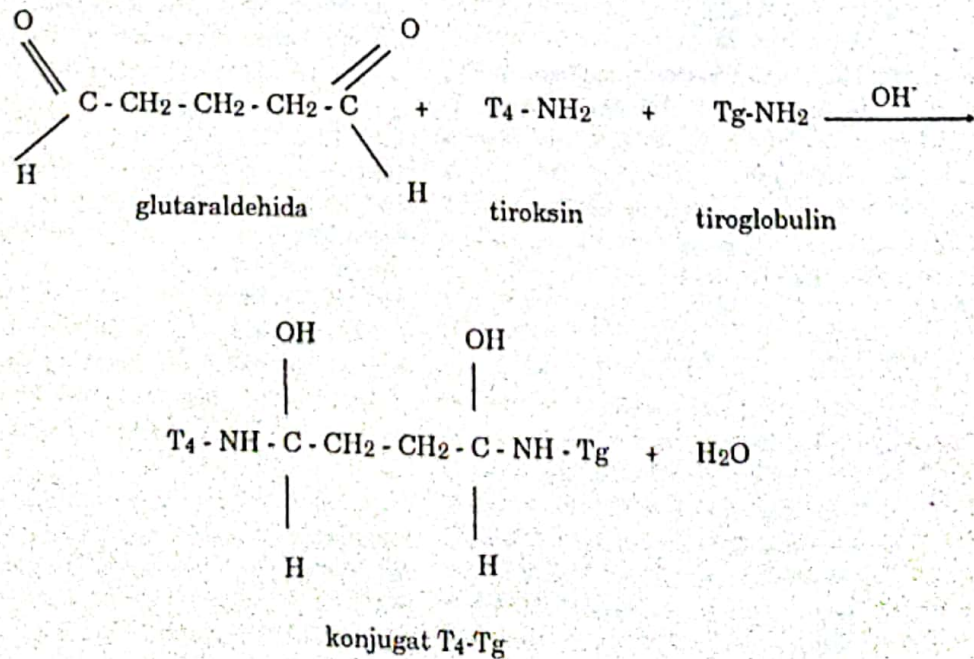
Seperti terlihat pada reaksi di atas, pengaruh asam (pH) sangat penting sehingga selama berlangsungnya reaksi pH tetap harus dipantau. Persentase penggabungan T<sub>4</sub>-Tg dengan metode ini memberikan hasil 53 %.



Konjugasi menggunakan metode glutaraldehida, di mana glutaraldehida berfungsi sebagai pereaksi penggabung yang akan mengikat gugus amina primer dari molekul tiroksin dan molekul tiroglobulin. Pada reaksi ini pengaruh basa sangat penting, karena itu reaksi berlangsung pada pH 9-10.  
 Reaksi yang terjadi :

Persentase penggabungan T<sub>4</sub>-Tg dengan metode glutaraldehida memberikan hasil 62%.

Bila dilihat bentuk kedua sediaan yang terjadi dari dua metode yang berlainan, ternyata menghasilkan bentuk sediaan cair yang berbeda. Pada metode pertama sediaan yang terbentuk didalamnya terdapat endapan, sedangkan



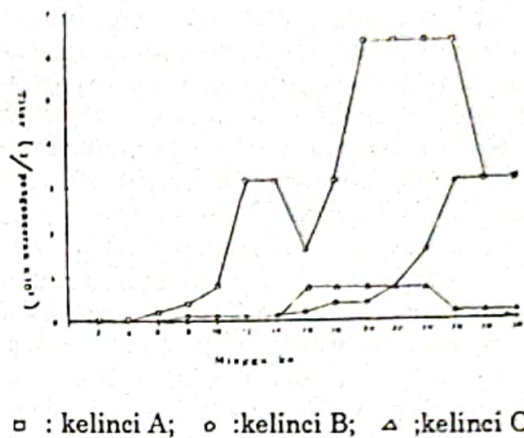
pada metode kedua sediaan berbentuk koloid yang terdispersi secara sempurna.

Dilihat dari persentase konjugasi  $T_4$ -Tg dan bentuk sediaan yang dihasilkan, ternyata bahwa pembuatan kompleks  $T_4$ -Tg dengan metode glutaraldehid memberikan hasil yang lebih baik dari pada metode karbodiimida. Karena pada metode karbodiimida reaksi berlangsung pada pH 4-5, maka kemungkinan tiroglobulin akan terdenaturasi lebih dahulu sebelum terjadi penggabungan dengan  $T_4$ . Sedangkan dengan metode glutaraldehid reaksi berlangsung pada pH 9-10, maka kemungkinan tiroglobulin terdenaturasi kecil sekali dan ikatan peptida dari kompleks  $T_4$ -Tg yang terjadi cukup stabil. Hal ini sesuai dengan pustaka [6] yang menyebutkan bahwa tiroglobulin stabil pada pH antara 5 - 10, di atas pH 11 dapat menyebabkan terpecahnya ikatan peptida yang ada sedangkan di bawah pH 5 tiroglobulin dapat terdenaturasi.

Meskipun terdapat perbedaan hasil dari kompleks  $T_4$ -Tg yang terjadi dari kedua metode tersebut, dalam penelitian ini kedua konjugat dicoba disuntikkan pada dua ekor kelinci yang berbeda (A dan B) untuk melihat sejauh mana perbedaan respon imun yang akan dihasilkan. Setelah dicampur dengan ajuvan Freund sampai terbentuk emulsi yang sempurna sediaan tersebut disuntikkan ke dalam tubuh kelinci secara intradermal sebagai imunisasi awal, yang selanjutnya setiap kelinci diberi suntikan ulang (booster) yang dilakukan setiap bulan dengan cara subkutan hingga diperoleh titer yang tinggi. Titer dalam hal ini didefinisikan sebagai besarnya pengenceran antibodi yang memberikan perunut terikat sebesar 50%. Sebagai pembanding kepada kelinci C disuntikkan juga tiroglobulin murni yang dicampur dengan ajuvan Freund, untuk mengetahui apakah Tg yang pada strukturnya mengandung molekul  $T_4$  dapat menyebabkan timbulnya antibodi anti- $T_4$  atau tidak.

Pengambilan cuplikan darah dilakukan setiap minggu untuk memantau perkembangan titer antibodi yang ada. Penentuan titer ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya anti- $T_4$  di dalam serum kelinci yang telah diimunisasi. Antiserum yang didapat setiap minggu dititer kadar antibodinya dengan melakukan satu seri pengenceran dari antiserum tersebut, hingga didapat pengenceran tertinggi yang memberikan perunut terikat sebesar 50%. Gambar 1

menunjukkan perkembangan antibodi dari semua kelinci terhadap waktu.



Gambar 1. Perkembangan titer antibodi anti- $T_4$  dari kelinci A, B dan C (antiserum A, B, dan C)

Dari grafik perkembangan titer terlihat bahwa 1 bulan setelah imunisasi awal telah ada pembentukan antibodi di dalam tubuh kelinci walaupun nilai titernya masih sangat rendah yaitu antara 1/20 - 1/40. Dengan diberikannya imunisasi awal, tubuh kelinci akan memberikan respon primer di mana pada periode ini terjadi pengenalan dan pembuatan ingatan terhadap antigen oleh sel-sel limfosit. Periode ini disebut periode laten dan lamanya tergantung pada imunogenitas, bentuk dan kelarutan imunogen, jenis hewan yang disuntik serta pada cara pemberian imunogen [2].

Kemudian hingga bulan ke 5 (setelah booster ke 4) perkembangan nilai titer bertambah naik hingga mencapai pengenceran antibodi 1/640 untuk kelinci A, 1/320 untuk kelinci B. Kelinci C yang disuntik dengan Tg saja nilai titernya sangat rendah yaitu 1/80. Hal ini membuktikan bahwa Tg tidak dapat menghasilkan antibodi anti- $T_4$ .

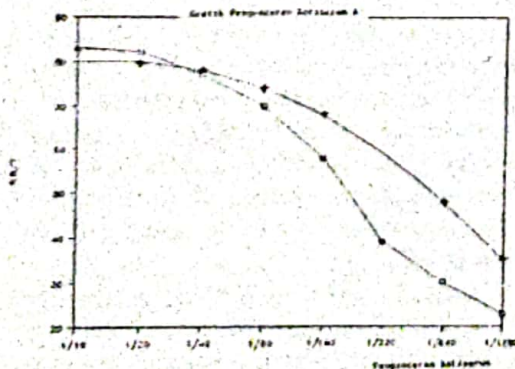
Dengan adanya suntikan ulang pada setiap bulan maka didapat kenaikan titer antibodi yang cukup berarti. Hal ini dapat dimengerti karena pada suntikan ulang, akan terbentuk respon imun sekunder di mana kelinci akan mengalami pengenalan antigen untuk kedua kalinya setelah respon imun primer. Respon imun sekunder akan ditandai oleh pembentukan antibodi yang lebih cepat dan lebih banyak sebab sistem pembentukan antibodi telah mengalami "pemanasan" setelah suntikan

imunisasi pertama dan telah menyediakan sekelompok sel-sel ingatan (memory cells) [2].

Setelah bulan ke 5 atau setelah suntikan ulang ke 4 hingga bulan ketujuh atau booster keenam nilai titer tidak bertambah secara berarti. Hal ini menunjukkan adanya gejala penjeñuhan karena adanya inhibisi balik (feedback inhibition) yang akan membatasi produksi antibodi. Setelah diperoleh nilai titer yang tinggi, darah kelinci dipanen.

Antiserum dengan titer yang tinggi ini tidak langsung dipergunakan untuk suatu penentuan RIA, tetapi harus dilakukan optimasi pengenceran dahulu. Untuk maksud tersebut maka dilakukan pembuatan kurva baku dan kurva profil presisi dari berbagai jenis pengenceran.

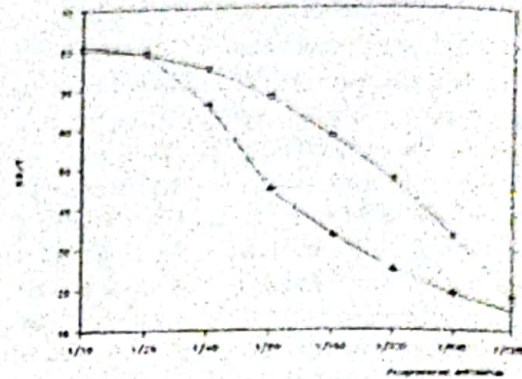
Sebagai tahap pertama untuk penentuan ini dilakukan pembuatan kurva titrasi dari antiserum- $T_4$  dengan dua macam larutan baku  $T_4$  yaitu 0 nmol/l dan 100 nmol/l. Kemudian dibuat grafik antara besarnya fraksi terikat dengan faktor pengenceran dari kedua seri percobaan tersebut. Pengenceran optimal antiserum anti- $T_4$  didapat dengan menarik jarak terjauh antara dua kurva tersebut. Dengan perkataan lain bahwa pengenceran optimal didapat bila pada pengenceran yang sama dengan standar yang berbeda yaitu standar 0 nmol/l dan 100 nmol/l akan didapat harga cacahan radioaktif atau %B/T yang berbeda jauh. Grafik hasil dari percobaan ini dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.



□ : standar  $T_4 = 0$  nmol/l; + : standar  $T_4$  100 nmol/l

Gambar 2. Kurva pengenceran antiserum dari kelinci A.

Setelah diperoleh pengenceran yang optimal tersebut, kemudian dibuat kurva baku dan kurva profil presisi dengan bermacam-macam



□ : standar  $T_4 = 0$  nmol/l; + : standar  $T_4$  100 nmol/l

Gambar 3. Kurva pengenceran antiserum dari kelinci B.

pengenceran antiserum di sekitar pengenceran optimal itu. Maksud dari percobaan ini adalah untuk mengetahui sejauh mana kepekaan dan daerah kerja yang dapat dicapai dari pengenceran yang berbeda.

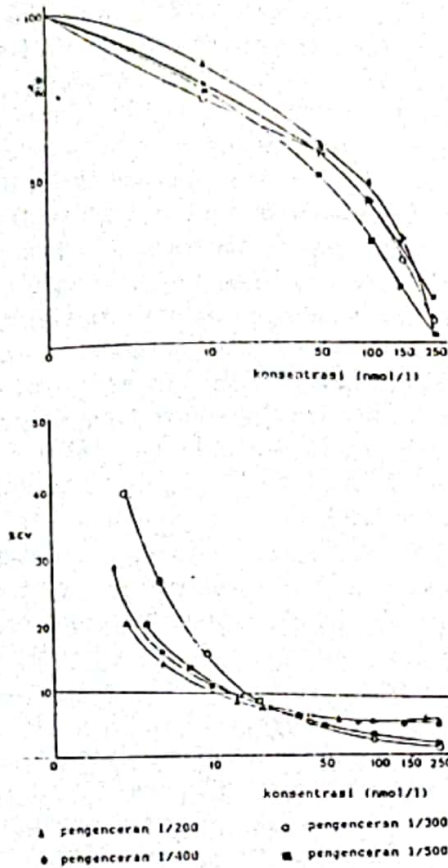
Kurva profil presisi dibuat dengan mengalurkan %C/V terhadap log konsentrasi baku  $T_4$ . Daerah kerja yang diinginkan adalah daerah konsentrasi yang memberikan kesalahan %C/V maksimal 10%. Kurva baku dan kurva profil presisi dengan berbagai pengenceran antiserum- $T_4$  dari kelinci A dan B dapat dilihat pada Gambar 4 dan 5.

Dari hasil-hasil ini kemudian ditransformasikan ke dalam besaran atau tetapan yang biasa digunakan dalam sistem RIA, maka hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

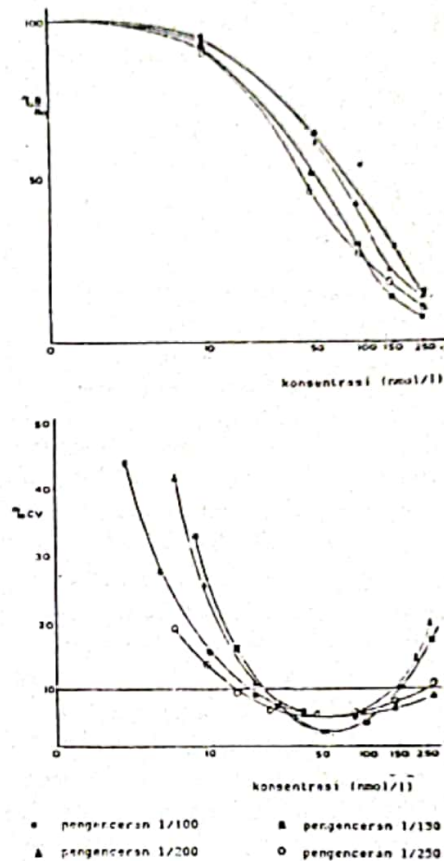
Tabel 1. Hasil optimasi dari berbagai pengenceran antiserum A.

Pengenceran anti-serum	Bo/T (%)	ED 50 (nmol/l)	Batas presisi (nmol/l)
1/200	47	60	9 - 250
1/300	50	70	19 - 250
1/400	59	70	12 - 250
1/500	47	50	12 - 250

Bo/T merupakan nilai ikatan maksimum yang memberikan informasi mengenai ikatan maksimum antigen bertanda pada antibodi. Dalam sistem RIA umumnya nilai Bo/T ini berkisar antara 40%-50%. ED-50 adalah besaran yang



Gambar 4. Kurva baku dan kurva profil presisi antiserum A dengan berbagai pengenceran.



Gambar 5. Kurva baku dan kurva profil presisi antiserum B dengan berbagai pengenceran.

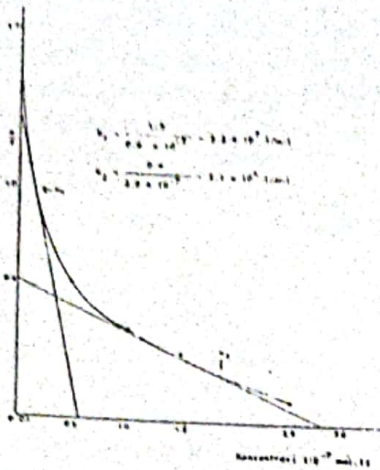
Tabel 2. Hasil optimasi dari berbagai pengenceran antiserum B.

Pengenceran anti-serum	B <sub>0</sub> /T (%)	ED 50 (nmol/l)	Batas presisi (nmol/l)
1/100	53	90	15 - 250
1/150	52	80	25 - 150
1/200	49	58	25 - 150
1/250	47	46	15 - 200

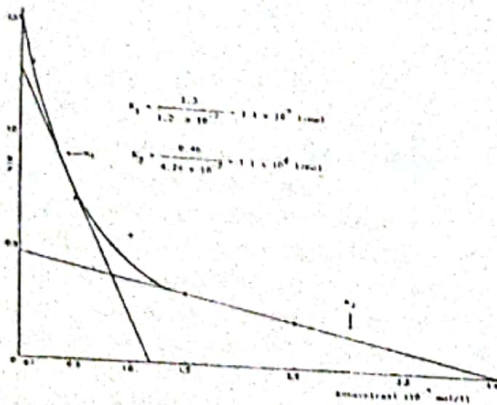
menunjukkan konsentrasi yang menghasilkan persen ikatan B/B<sub>0</sub> 50%. Nilai di sekitar ini merupakan daerah kerja dengan kepekaan merupakan daerah kerja dengan kepekaan analisis maksimum. Makin lebar batas profil presisi makin baik karena dapat mendeteksi daerah hipotiroid, normal dan hipertiroid. Dari

hasil penentuan, diperoleh pengenceran antiserum optimal untuk kelinci A adalah 1/400 dan kelinci B 1/100. Pada kondisi pengenceran tersebut diperoleh daerah kerja yang cukup lebar.

Untuk mengetahui aviditas dari antiserum tersebut dilakukan dengan membuat kurva Scatchard yaitu dengan mengalurkan B/F (perbandingan antara fraksi terikat dengan fraksi bebas) sebagai sumbu vertikal dan konsentrasi fraksi terikat sebagai sumbu horisontal, sehingga harga K diperoleh sebagai nilai kemiringan garis (slope). Dari Gambar 6 dan 7 diperoleh masing-masing dua K untuk setiap antibodi anti-T<sub>4</sub>, hal ini menunjukkan bahwa antibodi yang diperoleh/dibuat tidak homogen dan setiap antibodi memberikan nilai K yang berbeda (antibodi poliklonal). Adapun nilai K dari setiap kelinci A dan B adalah sebagai berikut: antisera dari kelinci A: K<sub>1</sub> = 2,2 x 10<sup>7</sup> l/mol dan K<sub>2</sub> = 2,1



Gambar 6. Kurva penentuan aviditas antiserum A



Gambar 7. Kurva penentuan aviditas antiserum B

$\times 10^6$  l/mol. sedangkan dari kelinci B :  $K_1 = 11 \times 10^7$  l/mol dan  $K_2 = 1,1 \times 10^6$  l/mol.

Dari hasil yang diperoleh ternyata harga K yang didapat mempunyai nilai yang berkisar antara  $10^6 - 10^7$  l/mol, nilai ini cenderung rendah dibandingkan dengan nilai K untuk antibodi yang biasa digunakan dalam RIA yaitu antara  $10^7 - 10^{12}$  l/mol [1]. Hal tersebut dapat dimengerti karena imunogen yang disuntikkan identik dengan material endogen pada hewan penerima dalam hal ini  $T_4$ . Antibodi yang dihasilkan akan bereaksi dengan  $T_4$  tersebut dan menyebabkan perubahan karakteristik antiserum yang didapat, sehingga harga K yang diperoleh relatif rendah.

Antibodi yang mempunyai harga K yang tinggi akan memberikan sensitifitas atau limit deteksi yang tinggi, maka dari percobaan ini diambil harga K yang relatif lebih tinggi dari

harga K. Aviditas suatu antiserum menentukan limit deteksi dari suatu sistem penentuan dan harga ini sebanding dengan  $1/K$ , maka limit deteksi yang dicapai oleh antibodi yang dihasilkan oleh kelinci A =  $4,5 \times 10^{-8}$  mol/l, sedangkan kelinci B =  $9,1 \times 10^{-8}$  mol/l. Dari limit deteksi yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa antibodi- $T_4$  yang dibuat cukup peka untuk penentuan kadar  $T_4$  di mana kadar hormon  $T_4$  dalam darah cukup tinggi yaitu antara 60-150 nmol/l.

Penentuan kespesifikan dari antibodi yang didapat dilakukan dengan mengadakan reaksi silang terhadap senyawa-senyawa yang mempunyai struktur yang mirip dengan  $T_4$ . Pada percobaan ini senyawa-senyawa yang digunakan adalah  $T_2$  (3,5-diiodo l-tironin),  $T_3$  (3,5,3'-triiodotironin), DIT (3,5-diiodo l-tirosin), dan MIT (3-monoiodo tirosin).

Derajat reaksi silang biasanya ditentukan sebagai perbandingan konsentrasi antigen spesifik terhadap konsentrasi senyawa yang mengadakan reaksi silang pada ED-50 ( $B/B_0=50\%$ ). Grafik hasil penentuan reaksi silang ini dapat dilihat pada Gambar 8 dan 9.

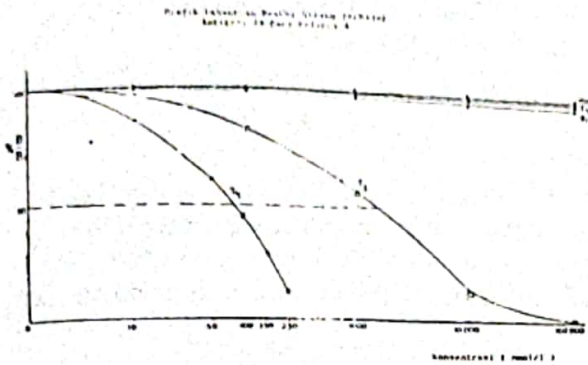
Dan secara lebih sederhana dapat dilihat pada Tabel 3. Dari data diperoleh bahwa antibodi  $T_4$  mempunyai derajat reaksi silang yang sangat rendah terhadap antigen-antigen MIT, DIT dan  $T_2$  sedangkan dengan  $T_3$  terlihat agak besar yaitu 5,0% untuk antibodi dari kelinci A dan 2,0% dari kelinci B.

Tabel 3. Derajat reaksi silang dari antiserum anti- $T_4$  terhadap senyawa-senyawa

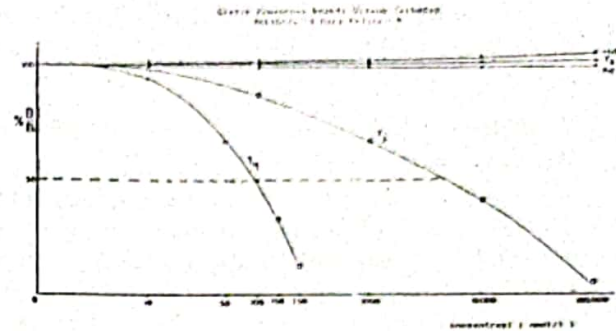
Senyawa	Derajat reaksi silang (%)	
	Antiserum A	Antiserum B
$T_4$	100	100
$T_3$	5	2
$T_2$	< 0,1	< 0,1
MIT	< 0,1	< 0,1
DIT	< 0,1	< 0,1

Meskipun ada reaksi silang antara antibodi anti- $T_4$  dengan antigen  $T_4$ , tetapi reaksi tersebut tidak berarti pengaruhnya terhadap hasil pengukuran kadar  $T_4$  karena kadar  $T_4$  normal dalam darah rendah sekali yaitu antara 1,5-2,2 nmol/l yang jauh lebih kecil dari kadar  $T_4$  normal yaitu antara 60-150 nmol/l. Sehingga dari





Gambar 8. Kurva penentuan reaksi silang (spesifikasi) antiserum A



Gambar 9. Kurva penentuan reaksi silang (spesifikasi) antiserum A

hasil ini dapat disimpulkan bahwa antiserum anti- $T_4$  yang dihasilkan cukup spesifik untuk penentuan dengan teknik RIA.

#### KESIMPULAN

Pembuatan kompleks  $T_4$ -Tg dengan metode glutaraldehid memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan metode karbodiimida. Hal ini terlihat dari besarnya hasil konjugat yang diperoleh dan kestabilan dari pada sediaan kompleks yang terjadi.

Hasil penyuntikan  $T_4$ -Tg yang diperoleh dengan metode glutaraldehid pada kelinci A menghasilkan antibodi dengan titer tertinggi setelah suntikan ulang ke 4 pada minggu ke 20, yaitu mencapai 1/400, sedangkan dengan metode karbodiimida titer antibodi yang tertinggi baru dicapai pada minggu ke 26 dan hanya

mencapai 1/100. Sedangkan hasil penyuntikan Tg pada kelinci C menghasilkan antibodi anti- $T_4$  yang sangat rendah (1/20).

Aviditas antibodi anti- $T_4$  yang diperoleh pada pengenceran optimum, untuk kelinci A :  $4,5 \times 10^{-8}$  mol/l dan untuk kelinci B  $3,3 \times 10^{-8}$  mol/l.

Dari penentuan kespesifikan antibodi, diperoleh hasil bahwa antiserum yang didapat memberikan derajat reaksi silang yang sangat rendah dengan senyawa-senyawa lain yang mempunyai struktur mirip dengan  $T_4$ .

Dari uji karakteristik di atas dapat disimpulkan bahwa antiserum yang diperoleh dari konjugat  $T_4$ -Tg menggunakan metode glutaraldehid mempunyai kespesifikan dan sensitifitas yang memenuhi syarat untuk digunakan dalam suatu sistem RIA

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Chard, T., Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, 2<sup>nd</sup>, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1982) 22 - 24, 95 - 109.
2. Edelhoed, Harold, Jacob, R., Thyroglobulin : Chemistry and Biosynthesis, Pergamon Press, Paris (1987) 98 - 109.
3. Ekins, R. P., Quality control and assay design, Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, vol, 2, IAEA, Vienna (1978) 39 - 56.
4. Ratnawati, H. dkk., Desain dan optimasi teknik RIA untuk menentukan  $T_4$ , Majalah Batan, XX, 1 (1987) 12 - 26.
5. Rikrik, I., Masjhur, J.S., Diagnosis in vitro penyakit tiroid dengan teknik radioimmunoassay, Medika, Jurnal Kedokteran dan Farmasi, No 3, 14 (1988) 241 - 248.
6. Meera, V., Preparation and Characterization of Antibody, Diklat Radioimmunoassay II, PPTN-Batan, Bandung (1988).
7. Premchandra, B.M., "Thyroxine Binding Globulin (TBG) and Thyroglobulin (Tg): Measurement and Significance", in HETZEL B.S. et.al., Current Thyroid Problems in South East Asia and Oceania, Singapore (1978) 167 - 186.

8. Thorell, Jan, I., et al., Radioimmunoassay and Related Techniques, Methodology and Clinical Applications, The Mosby Company, Saint Louis (1978) 11 - 31, 114 - 118.

#### DISKUSI

**Ratnawati K.:**

Apakah tidak terlalu dini menyimpulkan bahwa penggunaan konjugat glutaraldehid memberikan titer yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan konjugat karbodiimida? Berdasarkan pengalaman dengan konjugat yang sama (karbodiimida) juga dapat menghasilkan antibodi dengan titer yang jauh berbeda. Apakah perbedaan titer ini bukan disebabkan oleh individual hewan yang digunakan?

**Nanny Kartini :**

Menurut pendapat kami tidak, karena selain kami membandingkan kedua metode teori dalam pembentukan konjugat T<sub>4</sub>-Tg, kami buat juga konjugat T<sub>4</sub>-BSA dengan metode yang sama dan tetap metode glutaraldehid lebih baik dari metode karbodiimida.