

PENANDAAN ALFA FETOPROTEIN (AFP) DENGAN ^{125}I UNTUK PEREAKSI RADIOIMMUNOASAY

T.Hasan Basry, Rukmini Ijns
Pusat Penelitian Teknik Nuklir-Badan Tenaga Atom Nasional

ABSTRAK

PENANDAAN ALFA FETOPROTEIN (AFP) DENGAN ^{125}I UNTUK PEREAKSI RADIOIMMUNOASAY. Pendeteksian adanya tumor hati seperti hepatoma, teratocarcinoma dan metastatik tumor hati dapat dilakukan dengan menggunakan teknik RIA. Untuk maksud ini telah dilakukan pembuatan senyawa bertanda alfa fetoprotein ^{125}I (^{125}I -AFP) yang digunakan sebagai pereaksi RIA. Alfa fetoprotein (AFP) ditandai dengan ^{125}I menurut metode kloramin-T. Parameter yang diteliti adalah mencari kondisi penandaan yang baik untuk mendapatkan antigen bertanda yang baik, karena hasil analisis RIA tergantung pada kualitas antigen bertanda yang tersedia. Parameter tersebut antara lain penentuan jumlah AFP yang digunakan, volume campuran reaksi, kemurnian radiokimia, aktivitas jenis, imunoreaktivitas dan stabilitas ^{125}I -AFP. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan jumlah AFP 5 μg dalam 25 μl larutan kloramin-T (100 μg) dan ^{125}I (1 mCi) memberikan hasil penandaan 62,4% dengan kemurnian radiokimia 80 % dan aktivitas jenis 69,7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Dari hasil penentuan RIA menunjukkan imunoreaktivitas 64 % pada titer antibodi 1:5000. Stabilitas ^{125}I -AFP yang disimpan pada 4°C selama 60 hari kemurnian radiokimianya berkurang sekitar 5%.

ABSTRACT

LABELLING OF ALPHA FETOPROTEIN (AFP) WITH IODINE-125 AS REAGENT FOR RADIOIMMUNOASSAY (RIA). The detection of liver tumour such as hepatoma, teratocarcinoma and liver metastatic tumour can be done by RIA. Concerning to that, syntheses of iodine-125 alpha fetoprotein labelled compound (^{125}I -AFP) as reagent of RIA have been carried out. The labelling of AFP with ^{125}I was done using chloramin-T method. The parameters studied were to seek for optimum condition in labelling in order to get a good labelled compounds, because the result of RIA analysis is dependent on the quality of the available labelled antigen. Among the parameters studied were quantity of AFP, volume of reaction mixture, radiochemical purity, specific activity, immunoreactivity and stability of ^{125}I -AFP. The results show that of 5 μg AFP in 25 μl chloramin-T (100 μg) and ^{125}I (1 mCi) gave yield of labelling of 62,4% with radiochemical purity of 80% and specific activity of 69,7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Determination on RIA showed immunoreactivity of 64% at antibodies titer of 1:5000. The stability study of ^{125}I -AFP which was stored at 4°C for 60 days showed that its radiochemical purity reduced around 5%.

PENDAHULUAN

Alfa fetoprotein adalah antigen yang dikeluarkan dalam darah fetus dan manusia yang menderita kanker/tumor. Pengukuran kadarnya dalam serum digunakan untuk maksud diagnosis, terapi dan penentuan langkah selanjutnya dari pasien dengan karsinoma primer hepatoselular, teratokarsinoma dan tumor hati metastatik. Pendeteksian tumor-tumor ini, sekarang telah banyak dilakukan dengan metode teknik RIA.

Alfa fetoprotein (AFP) terdiri dari rantai tunggal polipeptida dengan berat molekul 69.000 serta mengandung protein 96 % dan sakarida 4% [1]. Meskipun fungsi biologis AFP belum jelas diketahui, tetapi kelihatannya

mempunyai peranan penting dalam transportasi zat aktif biologis dan dalam pengembangan reaksi kekebalan (imun). Sifat kimia AFP hampir sama dengan albumin [2,3]. AFP dapat menggantikan albumin dalam fetus sampai lahir. Setelah lahir kadarnya berkurang cepat dalam serum darah dari 2 - 10 ng/ml.

Banyak metode iodinasi untuk protein telah dilaporkan, termasuk antara lain metode kloramin-T (Greenwood, dkk., 1963), metode laktoperoksidase (Marchalonis, 1969), konjugasi tidak langsung (Bolton dan Hunter, 1973), Iodogen (Salacinsk dkk., 1981 ; Paus dkk., 1982), dan terakhir ini dengan metode iodo-bead (Markwell, 1982). Akan tetapi, setiap metode tersebut

masing-masing mempunyai keunggulan dan kerugiannya. Seperti teknik enzimatis adalah lambat dan peka terhadap inhibitor (azida dan sianida), metode konjugasi menjemukan dan bensen yang digunakan racun dan berbahaya. Demikian juga dengan metode iodogen menjemukan dan lambat. Metode yang populer adalah metode kloramin-T, karena metode ini lebih cepat, sederhana dan mudah dikerjakan serta dapat menghasilkan aktivitas jenis yang tinggi, tetapi metode ini mempunyai kelemahannya yaitu mudah merusak protein, karena kloramin-T adalah oksidator kuat. Dalam penelitian ini, penandaan AFP dilakukan dengan metode kloramin-T.

Tujuan dari penelitian ini adalah penyediaan kit RIA AFP dengan membuat pereaksi-pereaksinya yang selama ini didapat secara impor dengan harga yang mahal dan waktu yang lama. Sesuai dengan program BATAN untuk menunjang program pemerintah dalam bidang kesehatan masyarakat, maka dicoba melakukan pembuatan kit RIA AFP di PPTN-BATAN. Untuk tahap pertama dilakukan penandaan AFP dengan ^{125}I .

BAHAN DAN PERALATAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan ialah alfa fetoprotein, Protein Serum Kuda (HSP) dari Sigma, ^{125}I dari Polatom (Polandia), sephadex G-50 dan sephacryl (Sigma) dan bahan kimia lainnya dengan tingkat kemurnian pro analisis dari E. Merck.

Peralatan

Peralatan yang dibutuhkan antara lain mikropipet Eppendorf, fraction collector (Buchler Fractomette Alpha 200), kolom kromatografi, pencacah mini assay tipe 620, sentrifuga.

TATA KERJA

Penentuan kondisi penandaan

Ke dalam tabung reaksi kecil dimasukkan 5 μl larutan AFP, 2 μl larutan $\text{Na } ^{125}\text{I}$ (1 mCi), 25 μl larutan kloramin-T (100 μg). Volume reaksi diatur menjadi 40, 60, 80 μl dengan penambahan dapar fosfat pH 5,0 ; 7,0 ; 9,0 ; 11,0 dan iodinasi dilakukan selama 5, 10, 20, 30 detik. Reaksi iodinasi dihentikan dengan penambahan 100 μl natrium metabisulfid.

Penentuan hasil penandaan

Hasil iodinasi diteteskan ke dalam 1 ml larutan BSA 5%. Kemudian beberapa tetes larutan BSA ini diteteskan ke dalam 1 ml larutan

TCA 15%. Campuran didekantasi, lalu endapan dan supernatan dicacah dengan pencacah γ .

Pemisahan AFP bertanda ^{125}I dari pengotor-pengotornya

Pemisahan dilakukan dengan metode kromatografi kolom sephadex G50 (0,9x17 cm). Kolom sebelum digunakan dikondisikan dahulu dengan HSP. Sebagai pengelusi digunakan dapar barbitol. Fraksi ditampung dalam vial yang berisi HSP 500 μl . Kemudian tiap fraksi dicacah dengan mini γ counter.

Pemurnian dan penentuan kemurnian radiokimia

Pemurnian dilakukan dengan metode kromatografi kolom sephacryl (1,5x90 cm) yang telah dikondisikan dengan dapar barbitol. Hasil (eluat) ditampung setiap 2 ml dan masing-masing fraksi di cacah dengan pencacah γ .

Penentuan aktivitas imunologi

Aktivitas imunologi ditentukan dengan menginkubasikan 100 μl serum bebas AFP dengan 100 μl ^{125}I -AFP dan 100 μl anti AFP (1:5000) selama 24 jam pada suhu kamar [6]. Setelah itu dilakukan penambahan 500 μl antibodi kedua dan PEG 11% dan diinkubasi kembali selama 1 jam. Antigen yang terikat dan yang bebas dipisahkan dengan cara disentrifugasi lalu didekantasi kemudian dicacah.

Penentuan kemurnian radiokimia

Kemurnian radiokimia ditentukan dengan cara melewati setiap fraksi hasil iodinasi melalui kolom sephadex G50 (0,9x17 cm) (sama dengan cara pemisahan AFP- ^{125}I dari pengotor-pengotornya). Dari sini dapat dihitung kemurnian radiokimia masing-masing fraksi yang ditampung.

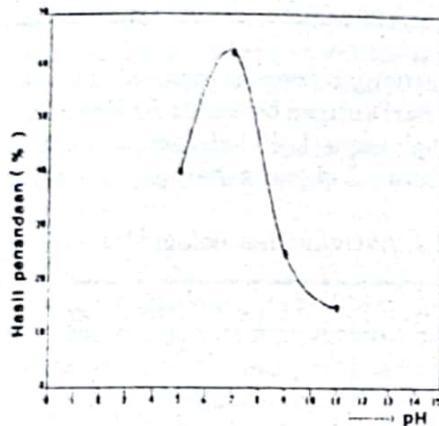
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan antigen bertanda AFP mengikuti reaksi substitusi elektrofilik. Dalam reaksi ini iodium yang masuk dalam bentuk I^+ . Untuk penandaan digunakan larutan $\text{Na } ^{125}\text{I}$, jadi I^- diubah menjadi I^+ dengan menggunakan oksidator tertentu. Oksidator-oksidator yang biasa digunakan dalam iodinasi ialah kloramin-T, natrium hipoklorid, iodogen, laktoperoksidase. Dari sekian banyak oksidator yang paling sering digunakan adalah oksidator kloramin-T, karena oksidator ini mempunyai beberapa keunggulan yaitu cepat dan mudah dikerjakan serta dapat menghasilkan aktivitas jenis yang tinggi disamping kelemahannya dapat merusak protein.

Dalam pembuatan antigen bertanda AFP ini, terlebih dahulu dilakukan percobaan pendahuluan yaitu mencari kondisi optimal penan-

daan untuk mendapatkan hasil penandaan yang maksimal. Parameter yang diteliti yaitu penentuan pH optimal, pengaruh waktu iodinasi, pengaruh volume reaksi. Setelah itu dilakukan pembuatan senyawa bertanda ^{125}I -AFP dengan kondisi yang telah didapat dan dilanjutkan dengan pemeriksaan kualitas dari senyawa bertanda ^{125}I -AFP yang dihasilkan tersebut.

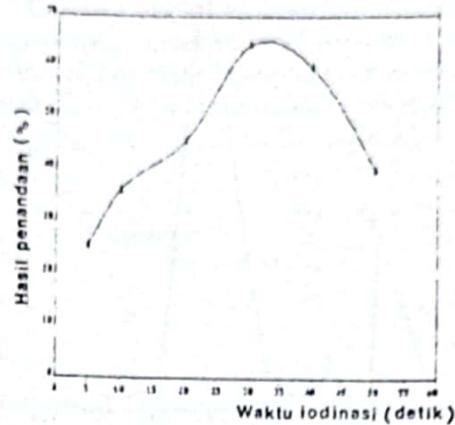
Dari hasil penelitian pendahuluan terlihat bahwa reaksi iodinasi berlangsung dengan baik pada pH 7,0 (Gambar 1) sedang pada pH yang rendah dan tinggi memberikan hasil penandaan yang rendah.



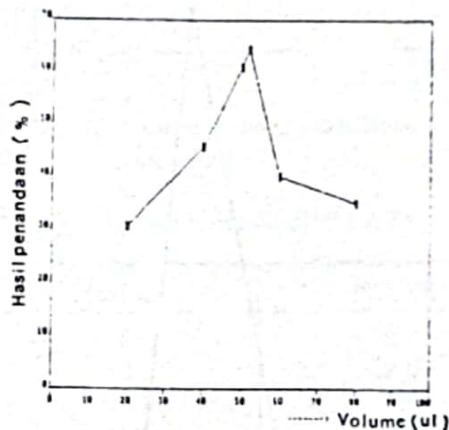
Gambar 1. Pengaruh pH terhadap hasil penandaan

Ini dapat dimengerti karena AFP mempunyai sifat mudah rusak dalam suasana asam/basa. Pada pH 7,0 ini reaksi iodinasi berjalan dengan cepat yaitu 20-30 detik. Hasil iodinasi, tergantung pada lamanya reaksi berjalan. Dalam penelitian ini terlihat bahwa reaksi iodinasi berjalan dalam waktu 30 detik memberikan hasil penandaan 64,2% sedang di atas 30 detik hasil penandaan mulai menurun (Gambar2).

Ini mungkin disebabkan karena AFP telah dirusak oleh kloramin-T sehingga sebagian proteinnya terurai. Disamping kedua parameter tersebut di atas, juga diperhatikan jumlah volume reaksi. Pada Gambar 3 terlihat bahwa volume yang terbaik untuk penandaan AFP adalah 52 μl . Apabila volumenya lebih besar terlihat adanya penurunan hasil penandaan. Hal ini dapat dimengerti, karena dengan volume reaksi yang lebih besar berarti konsentrasinya menjadi kecil, sehingga kecepatan reaksi jadi lambat. Dengan data-data yang diperoleh dari percobaan pendahuluan ini, dilakukanlah pembuatan senyawa bertanda ^{125}I -AFP yang kemu-



Gambar 2. Pengaruh waktu iodinasi terhadap hasil penandaan

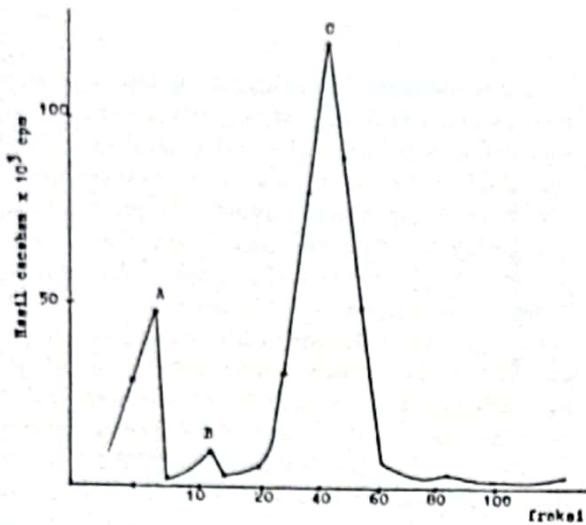


Gambar 3. Pengaruh volume reaksi terhadap hasil penandaan

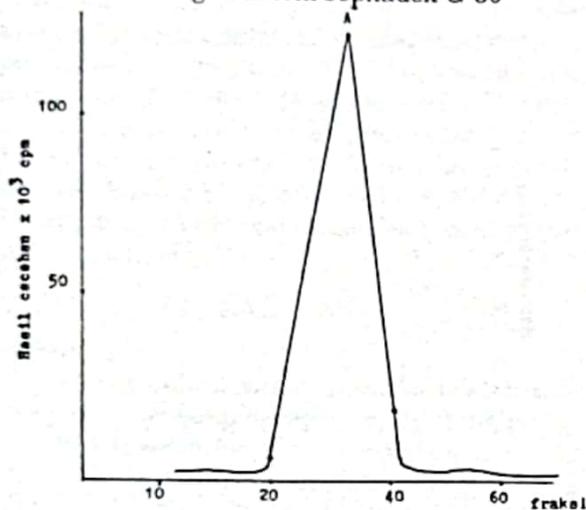
dian dilanjutkan dengan pemeriksaan kualitas terhadap hasil penandaan ini yaitu pemeriksaan kemurnian radiokimia, pemeriksaan reaksi imunologi dan pemeriksaan stabilitas.

AFP bertanda hasil iodinasi harus segera dipisahkan dari pengotor-pengotornya yaitu ^{125}I bebas dan AFP yang rusak. Pemisahan dilakukan dengan metode kromatografi kolom sephadex G50. Fraksi-fraksi ditampung dalam vial yang berisi 500 μl HSP, lalu dicacah dengan γ counter. Hasil kromatogram dapat dilihat pada Gambar 4. Dari Gambar 4 terlihat bahwa setelah ^{125}I bebas, keluar hasil urai ^{125}I -AFP baru kemudian keluar ^{125}I -AFP [6]. Antigen bertanda ^{125}I -AFP kemudian dimurnikan dengan metode kromatografi kolom sephacryl. Dari hasil pemurnian ini terlihat bahwa ^{125}I -AFP telah bebas dari pengotornya (Gambar 5).

Hasil pemeriksaan kualitas antigen bertanda AFP antara lain aktivitas jenis yang dapat



Gambar 4. Kromatogram pemisahan ^{125}I -AFP dengan kolom sephadex G-50



Gambar 5. Kromatogram pemurnian ^{125}I -AFP dengan sephacryl

Keterangan: A = ^{125}I -AFP

dihitung baik dari hasil percobaan pendahuluan dengan TCA maupun dari hasil kromatografi. Dari hasil perhitungan ternyata hasil penandaan atau iodinasi dengan metode kloramin-T menghasilkan aktivitas spesifik sekitar $69,7 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas jenis} = \frac{E \times A \text{ (mCi)}}{B \text{ (mg)}} = \text{mCi/mg}$$

E = efisiensi penandaan, A = aktivitas ^{125}I sebelum iodinasi, B = berat antigen yang akan ditandai.

Selanjutnya dari kromatogram pemurnian tiap fraksi puncak antigen bertanda dapat diketahui kemurnian radiokimianya. Dari perhitungan diketahui bahwa tiap fraksi mempunyai

kemurnian yang hampir sama yaitu rata-rata 80% (Tabel 1).

Tabel 1. Kemurnian radiokimia ^{125}I -AFP

No. Iodinasi	Kemurnian radiokimia (%)		
	Fraksi 20	Fraksi 40	Fraksi 60
1	80,4	80,1	80,5
2	80,0	80,3	80,4
3	80,5	80,2	80,0
Rata-rata	$80,3 \pm 0,3$	$80,2 \pm 0,1$	$80,3 \pm 0,3$

Selanjutnya pemeriksaan aktivitas imunologi dari antigen bertanda AFP yang didapat dari beberapa kali iodinasi memberikan aktivitas imunologi yang hampir sama yaitu

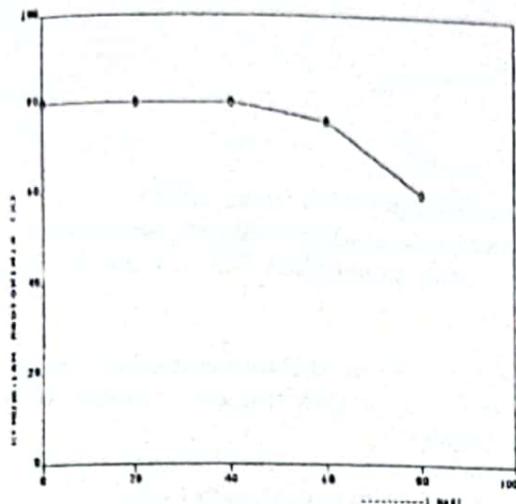
Tabel 2. Aktivitas imunologi ^{125}I -AFP

No. Iodinasi	Aktivitas imunologi (%)
1	64,3
2	64,2
3	64,5
Rata-rata	$64,3 \pm 0,2$

rata-rata 64,0% (Tabel 2).

Dari hasil yang didapat ini ternyata antigen bertanda AFP dapat dipakai sebagai pereaksi RIA.

Penelitian selanjutnya adalah pemeriksaan stabilitas dari antigen bertanda AFP yang disimpan pada suhu 4°C dengan interval waktu 30 - 60 hari. Dalam penelitian ini uji stabilitas ditinjau dari tiga aspek yaitu dari sudut kemurnian radiokimia, aktivitas imunologi dan NSB (Gambar 6,7 dan Tabel 3). Uji stabilitas ini perlu dan dilakukan secara periodik yaitu untuk menentukan waktu kadaluarsa antigen bertanda. Gambar 6 menunjukkan uji stabilitas dari segi aspek kemurnian radiokimianya yang memperlihatkan bahwa antigen bertanda AFP setelah disimpan 60 hari kemurnian radiokimianya turun 5 %. Demikian juga bila ditinjau dari segi aktivitas imunologi ternyata ikatan maksimum dengan anti AFP turun 5% (Gambar7). Tabel 3 memperlihatkan nilai NSB naik dari 2,4% menjadi 3,6 % setelah mengalami penyimpanan selama 60 hari. Ini berarti antigen bertanda AFP telah mulai terurai pada penyimpanan 60 hari. Ini dapat dimengerti karena pada



Gambar 6. Pemeriksaan stabilitas terhadap kemurnian radiokimia ¹²⁵I-AFP

umumnya antigen bertanda itu mudah terurai oleh radioiodium itu sendiri dan oksidator yang digunakan.

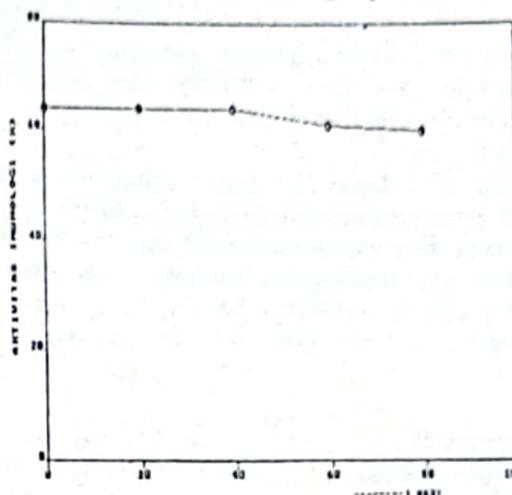
KESIMPULAN

Dari data-data yang diperoleh dapat ditarik kesimpulan alfa fetoprotein dapat ditandai dengan ¹²⁵I dengan menggunakan metode kloramin-T dengan waktu iodinasi 30 detik pada pH 7,0 dan volume reaksi 52 µl. Hasil penandaan sekitar 62,4% dengan aktivitas spesifik 69,7 µCi/µg. Dari hasil pemeriksaan kualitas yaitu kemurnian radiokimia 80% dan aktivitas imunologi 64% dapat disimpulkan bahwa ¹²⁵I-AFP dapat dipakai sebagai pereaksi RIA.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chudy, D., Zizkovsky, V., A simple and rapid method for the isolation of human alpha-fetoprotein from human cord serum neoplasma, 34, 4 (1987) 491-495.
2. Lee David, S.C., and Bertram W. Griffiths, Comparative studies of iodo-bead and chloramine-T methods for the radioiodination of human alpha-fetoprotein, Jurnal of Immunological Methods, 74 (1984) 181-189.
3. Twomey Stanley L., and Randy, V. Sweet, Purification of α - fetoprotein, Clin.Chem., 22, 8, (1976) 1306-1309.
4. Wong Lawrence T., High performance liquid chromatography of proteins: Purification of α-Fetoprotein From Fetal Calf Serum, Journal of Chromatography, 310 (1984) 19-29.
5. Thorell Jan I., and Steven M. Larson, Radioimmunoassay and Related Techniques, The CV.Mosby Company, Saint Louis (1978) 239 - 241.
6. Szpocinska Byszewska Ewa, Jolanta Amerek, Jadwiga Wasowicz and Grazyna Janorska, Opracowanie Wytwarzania Zestawu do Radioimmunologicznego Oznaczenia ludzkiego Alfa-Fetoproteido, (RIA-AFP, kod MJ-102), Nr: 0-84/Oripi/85, Instytut Energii Atomowej, Osrodek Reaktorow I Produkcji Izotopow, Poland, 1-14 (1985).

Dari uji stabilitas ternyata ¹²⁵I-AFP setelah penyimpanan 60 hari kemurnian radiokimia dan aktivitas imunologi turun 5%, tetapi masih dapat digunakan sebagai pereaksi RIA.



Gambar 7. Pemeriksaan stabilitas terhadap imunologi

Tabel 3. Nilai NSB ¹²⁵I-AFP

Hari ke	NSB(%)
20	2,4
40	2,9
60	3,6
80	3,9

DISKUSI

Nanny Kartini:

1. Apa sebabnya bahwa kit RIA AFP dapat digunakan untuk mendeteksi tumor hati?
2. Berapa batas hubungannya aktivitas jenis AFP yang akan digunakan sebagai pereaksi RIA dan apakah reagen AFP-¹²⁵I yang diperoleh cukup untuk penentuan RIA karena hanya mempunyai aktivitas jenis 69,7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Hasan Basry:

1. Kit RIA AFP dapat digunakan untuk mendeteksi tumor hati karena AFP tersebut dikeluarkan oleh fetus dan manusia yang menderita tumor hati. Sehingga dengan mengukur kadar AFP dalam serum penderita dapat mendeteksi tumor hati penderita.
2. Aktivitas jenis setiap hormon/protein yang bertanda radioaktif berlainan untuk mengukur AFP batas aktivitas jenisnya belum jelas, tetapi dengan aktivitas jenis yang didapat (69,7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) ini mendekati dengan aktivitas jenis AFP-¹²⁵I yang dihasilkan oleh peneliti terdahulu (Pol Atom).

Ratnawati K.:

Persyaratan suatu antigen bertanda yang baik yaitu mempunyai kemurnian radiokimia > 90% dan imunoreaktivitas > 80%. Dari hasil penelitian ternyata kemurnian radiokimianya 80% dan imunoreaktivitas 64%. Apa penyebabnya?

Hasan Basry:

Penyebab kemurnian radiokimia 80% adalah kemungkinan antigen AFP yang didapat dari luar negeri kemurniannya telah menurun. Sebagaimana diketahui AFP adalah suatu protein, jika dalam penyimpanan selama perjalanan kurang baik dapat menyebabkan rusak/terurai sehingga kurang murni. Penyebab imunoreaktivitas 64% adalah kemungkinan karena antibodi yang digunakan adalah yang telah diencerkan (1:5000), dimana seharusnya dalam penentuan imunoreaktivitas digunakan antibodi yang pekat/berlebih.