

## PEMBUATAN DAN EVALUASI ANTIGEN T<sub>3</sub> BERTANDA <sup>125</sup>I SEBAGAI PEREAKSI RADIOIMMUNOASSAY

Misyetti, Wayan R.S, D. Santoso, A. Suparman, Ratnawati, K, M. Yamin  
Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

### ABSTRAK

PEMBUATAN DAN EVALUASI ANTIGEN T<sub>3</sub> BERTANDA <sup>125</sup>I SEBAGAI PEREAKSI RADIOIMMUNOASSAY. Antigen T<sub>3</sub> bertanda dapat dibuat dari hasil iodinasi T<sub>2</sub> dengan Na<sup>125</sup>I menggunakan kloramin T sebagai oksidator. Hasil iodinasi dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan sephadex G-25 fine sebagai fase diam. Penentuan efisiensi iodinasi dilakukan dengan cara pengendapan dengan TCA. Kualitas perunut yang dihasilkan dievaluasi dengan menggunakan beberapa parameter yaitu: aktivitas spesifik, aktivitas imunologi, kemurnian radiokimia, dan ikatan tidak spesifik. Dengan metode penandaan seperti diatas, diperoleh efisiensi iodinasi  $83,0 \pm 7,2 \%$ , kemurnian radiokimia  $96,7 \pm 2,8 \%$  serta aktivitas imunologi  $89,8 \pm 3,1 \%$ . Hasil perhitungan terhadap aktivitas spesifik adalah  $3,3 \text{ mCi}/\mu\text{g}$ . Ikatan tidak spesifik  $7,6 \pm 1,1 \%$  dan  $0,7 \pm 0,3 \%$ , masing-masingnya menggunakan metode pemisahan dengan PEG 18% dan antibodi kedua. Perunut ini dapat disimpan selama satu sampai 2,5 bulan dalam bentuk cair pada suhu 4°C, dengan menggunakan stabilisator etanol.

### ABSTRACT

PREPARATION AND EVALUATION OF LABELED T<sub>3</sub> AS A REAGENT IN RADIOIMMUNOASSAY. Labeled T<sub>3</sub> can be prepared from T<sub>2</sub> by iodination using Na<sup>125</sup>I and chloramine T as an oxidizing agent. The iodination product was purified by column chromatography making use of Sephadex G-25 fine as the stationary phase. The iodination efficiency was determined after precipitation with trichloroacetic acid. The quality of the tracer produced was evaluated from the values of a number of parameters, such as specific activity, immunological activity, radiochemical purity and non specific binding. The labeling method described above, yielded a iodination efficiency of  $83,0 \pm 7,2 \%$ , a radiochemical purity of  $96,7 \pm 2,8 \%$ , an immunological activity of  $89,8 \pm 3,1 \%$ . The specific activity calculated was  $3,3 \text{ mCi}/\mu\text{g}$ . Non specific binding values of  $7,6 \pm 1,1 \%$  and  $0,7 \pm 0,3 \%$  were found for separation methods using PEG 18 % and double antibody respectively. The tracer was stable for 2,5 months, when stored at 4°C in liquid form using ethanol as stabilizing agent.

### PENDAHULUAN

Untuk memperoleh performance RIA assay yang baik dibutuhkan antigen bertanda (tracer) dengan kualitas yang baik pula.

Untuk itu, dalam pembuatan antigen bertanda yang perlu diperhatikan beberapa hal yaitu: pemilihan radionuklida, penandaan antigen (mengikatkan radionuklida yang dipilih pada antigen), pemurnian antigen bertanda, dan evaluasi kualitas perunut yang dihasilkan [1].

Pada pemilihan radionuklida, perlu memperhatikan beberapa hal diantaranya: aktivitas spesifik, sifat-sifat kimia dan struktur dari antigen yang akan ditandai, kestabilan dari perunut yang dihasilkan, serta kemudahan pencacahan. Penggunaan radionuklida <sup>131</sup>I dan <sup>125</sup>I lebih menguntungkan dibandingkan dengan menggunakan radionuklida <sup>14</sup>C dan <sup>3</sup>H, karena radionuklida iodium tersebut lebih mudah dicacah tanpa membutuhkan perlakuan terlebih dahulu [1, 2, 3].

Gugus tirosin sangat reaktif dalam menangkap iodium. Karena triiodotironin (T<sub>3</sub>) mengandung gugus tirosin, maka untuk menandainya paling baik digunakan radioiodium. Dalam teknik RIA, radionuklida <sup>125</sup>I lebih banyak digunakan dibandingkan dengan <sup>131</sup>I, karena <sup>125</sup>I memiliki beberapa keunggulan. Yaitu waktu paruh yang tidak terlalu pendek (60,2 hari), energi yang dipancarkan lebih rendah (27-34 keV) dibandingkan <sup>131</sup>I (364 keV), dan bebas dari energi β [1,2].

Pada prinsipnya iodinasi antigen bertanda T<sub>3</sub> dilakukan dengan mengoksidasikan I<sup>-</sup> menjadi I<sup>+</sup>, selanjutnya I<sup>+</sup> akan bereaksi secara substitusi dengan cincin fenol pada posisi orto dari gugus hidroksil [3,4,5]. Dalam hal ini dapat digunakan beberapa macam oksidator yang salah satu diantaranya adalah kloramin T.

Antigen bertanda ini dapat terurai oleh beberapa hal, antara lain radioiodium itu sendiri,

oksidator, reduktor dan sebagainya. Untuk mencegah penguraian lebih lanjut, antigen bertanda tersebut harus segera dimurnikan sesudah iodinasi.

Kualitas antigen bertanda yang terbentuk dievaluasi dengan menggunakan beberapa parameter, yaitu: kemurnian radiokimia, aktivitas spesifik, aktivitas imunologi, ikatan tidak spesifik, dan kestabilan [1].

## TATAKERJA

### Bahan dan peralatan

Bahan-bahan yang digunakan a.l. : diiodotironin ( $T_2$ ) dari Sigma, natrium metabisulfid,  $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ , asam trikloroasetat, kalium iodida, amonium 8-anilino-1 naftalen sulfonat (E.Merck), sephadex G-25 fine, bovine serum albumin (Fluka), antibodi  $T_3$  (PPTN), kit RIA  $T_3$  (NETRIA).

Peralatan yang dibutuhkan a.l. mikropipet eppendorf, *fraction collector* (Buchler Fractomette Alpha 200), kolom kromatografi, pencacah *miniassay type-620*, *refrigerated centrifuge IEC-Centra-7R*, dan Mixer Retsch.

### Penentuankondisiiodinasi:

Ke dalam tabung reaksi kecil dimasukkan larutan 1  $\mu g$   $T_3$ , larutan  $Na^{125}I$  dan 100  $\mu g$  kloramin T. Volume reaksi diatur menjadi 35, 40, 60, 80, 100, dan 130  $\mu l$  dengan penambahan dapar fosfat pH 5; 7,5; 9 dan 11,6, dan iodinasi dilakukan selama 5, 10, 20, 25, 30, dan 40 detik.

Penghentian reaksi iodinasi dilakukan dengan penambahan 25  $\mu l$  natrium metabisulfid (10 mg/ml).

### Pemurniandanpenentuankemurnianradiokimia:

Pada campuran hasil iodinasi (yang akan ditentukan kemurniannya) ditambahkan 100  $\mu l$  KI (10 mg/ml), kemudian dimasukkan ke dalam kolom sephadex G-25 fine yang sudah disiapkan (setinggi 15 cm). Campuran dielus dengan dapar fosfat 0,05 M pH 11,6 dengan kecepatan alir 0,7 - 1 menit / ml. Eluat ditampung setiap 2 ml dan masing-masing fraksi dicacah dengan pencacah  $\gamma$ .

### Penentuanefisiensiiodinasi:

Hasil iodinasi diteteskan ke dalam satu ml larutan BSA 5%. Beberapa tetes larutan BSA ini kemudian dicampurkan ke dalam satu ml larutan TCA 15%. Endapan yang terjadi dipisahkan dari larutannya dengan sentrifugasi. Masing-masing fraksi dicacah kemudian dengan pencacah  $\gamma$ .

### Penentuanaktivitasimunologi:

Aktivitas imunologi ditentukan dengan menginkubasi 100  $\mu l$  serum bebas  $T_3$  dengan 100

$\mu l$   $^{125}I-T_3$  dalam larutan ANS dan 100  $\mu l$  anti  $T_3$  (pekat) selama dua jam. Perunut yang terikat dan yang bebas dipisahkan dengan PEG 18%, disentrifugasi, didekantasi dan dicacah.

### Penentuanikatantidakspesifik:

Ikatan tidak spesifik ditentukan dengan menginkubasi serum darah dengan antigen bertanda dalam larutan ANS. Antigen bertanda yang terikat dan yang bebas dipisahkan dengan PEG 18% atau dengan menggunakan antibodi kedua. Setelah disentrifugasi, didekantasi, lalu dicacah.

Studi perbandingan dilakukan dengan perunut yang sudah andal, yaitu untuk membandingkan perunut yang baru dibuat dengan perunut yang sudah andal tersebut (dalam percobaan ini digunakan perunut dari NETRIA) dengan tata kerja seperti ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Assay  $T_3$

Percaksi ( $\mu l$ )	TRA	NSB	Standar
serum normal	-	50	
standar		-	50
perunut	50	50	50
antibodi $T_3$	-	-	50
DASS	-	50	50
dapar fosfat	-	100	50
PEG 4%	inkubasi - sentrifugasi, dicacah	semalam 1000 dekantasi	dan

Keterangan:

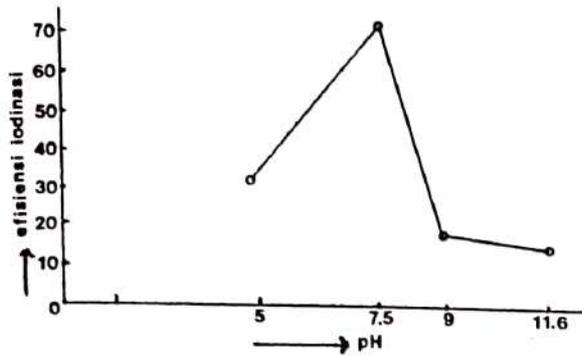
TRA = Tabel Radioaktif

NSB = ikatan tidak spesifik

DASS = antibodi kedua

## HASIL DAN DISKUSI

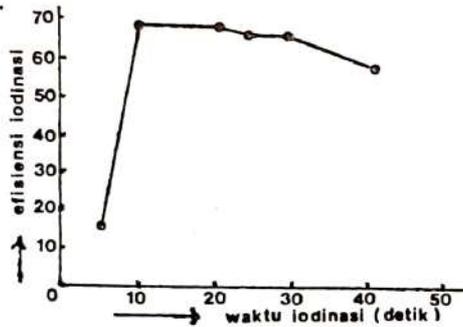
Pembuatan perunut  $T_3$  dari  $T_2$  mengikuti reaksi substitusi elektrofilik. Dalam reaksi ini iodium yang masuk pada senyawa  $T_2$  dalam bentuk  $I^+$ . Radioiodium yang digunakan untuk penandaan biasanya dalam bentuk  $Na^{125}I$ , karena itu perlu diubah menjadi  $I^+$ . Untuk mengubah  $I^-$  menjadi  $I^+$ , bermacam-macam oksidator dapat digunakan antara lain: kloramin T, natrium hipoklorit, iodogen, dan lakto peroksidase (enzimatis) [2,5]. Kloramin T adalah oksidator yang paling banyak digunakan untuk iodinasi, kecuali bila senyawa yang akan ditandai rusak atau terurai dengan kloramin T. Untuk senyawa yang cepat rusak ini biasanya digunakan laktoperoksidase.



Gambar 1. Pengaruh pH terhadap efisiensi iodinasi

Gambar 1 menunjukkan bahwa reaksi iodinasi berlangsung pada pH 7,5 sedangkan pada pH rendah (5) dan pH tinggi (9 dan 11,6) efisiensi iodinasi kecil. Pada pH 7,5 reaksi iodinasi berlangsung sangat cepat, hanya membutuhkan waktu 10-20 detik.

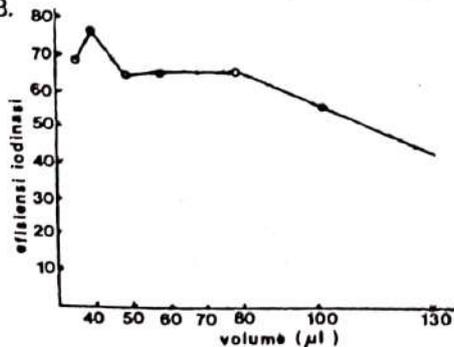
Gambar 2 menunjukkan pengaruh waktu iodinasi.



Gambar 2. Pengaruh waktu iodinasi terhadap efisiensi iodinasi

Disini terlihat bahwa iodinasi sudah sempurna dalam waktu sepuluh detik. Bila waktu reaksi lebih lama, efisiensi penandaan sedikit menurun. Hal ini mungkin disebabkan oleh oksidator kloramin T yang dapat merusak  $T_3$ , atau iodium teroksidasi ke tingkat yang lebih tinggi membentuk  $IO_3$  atau  $IO_4$ . [3].

Pengaruh volume reaksi dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh volume terhadap efisiensi iodinasi

Dari gambar ini terlihat bahwa volume yang terbaik untuk iodinasi  $T_3$  adalah 40 µl. Dengan volume reaksi yang lebih besar terlihat adanya penurunan efisiensi iodinasi. Hal ini dapat dimengerti, karena dengan volume reaksi yang lebih besar maka konsentrasi pereaksi akan menjadi semakin kecil, sehingga akan memperlambat kecepatan reaksi.

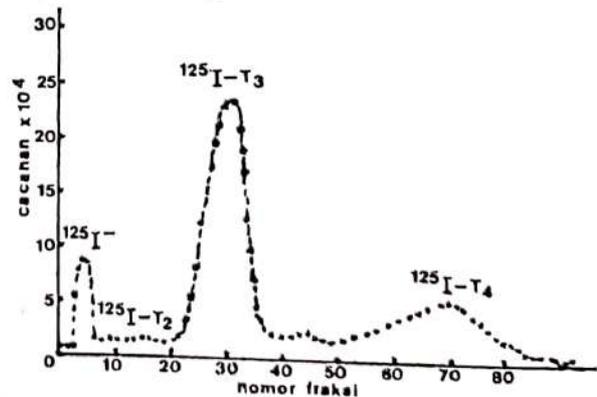
Efisiensi iodinasi ditentukan dengan metode pengendapan dari asam trikloroasetat. Iodinasi yang dilakukan pada pH 7,5 selama 10-20 detik dan volume 40 µl, maka diperoleh efisiensi penandaan sekitar 83% (tabel 2).

Tabel 2. Karakteristik perunut  $T_3$

No.	Parameter	Metode pemeriksaan	Harga
1	efisiensi iodinasi	pengendapan dengan TCA	83,0 ± 7,9%
2	kemurnian radiokimia	kromatografi kolom	96,7 ± 2,8%
3	aktivitas spesifik	perhitungan	3,3 mci/µg
4	aktivitas imunologi	RIA-PEG 18%	89,8 ± 3,1%
5	ikatan tak spesifik	RIA-PEG 18% RIA-2 <sup>nd</sup> anti-bodi	7,6 ± 1,1% 0,7 ± 0,3%

$T_3$  bertanda hasil iodinasi ini harus segera dimurnikan dari pengotor-pengotornya, yaitu  $^{125}I$ -dan  $T_2$  sisa serta  $T_4$  yang merupakan hasil sampingan. Pemurnian dilakukan dengan teknik kromatografi kolom, dengan fasa diam sephadex G-25 fine setinggi 15 cm dan fase gerak dapar fosfat 0,05 M pH 11,6.

Fasa gerak dengan kecepatan alir 0,7-1,0 ml/menit memberikan resolusi yang baik seperti yang ditunjukkan dalam gambar 4.



Gambar 4. Kromatogram pemurnian tracer  $T_3$  menggunakan kolom sephadex 0-25

Pengujian kualitas terhadap perunut ini meliputi penentuan aktivitas spesifik, kemurnian radiokimia, aktivitas imunologi, ikatan tidak spesifik, dan kestabilan.

Dengan menggunakan metode penandaan diatas, T<sub>3</sub> yang terjadi bebas pengemban, sehingga semua molekul T<sub>3</sub> bersifat radioaktif. Biasanya satu molekul T<sub>3</sub> diisi oleh satu atom iodium radioaktif (<sup>125</sup>I), sehingga aktivitas spesifik T<sub>3</sub> dapat dihitung dengan rumus :

$$As = \frac{1}{BM} \times 6,02 \times 10^{23} \times \frac{0,693}{T^{1/2}} \times \frac{1}{3,7 \times 10^{10}} \text{ Ci/g}$$

As = aktivitas spesifik

BM = berat molekul

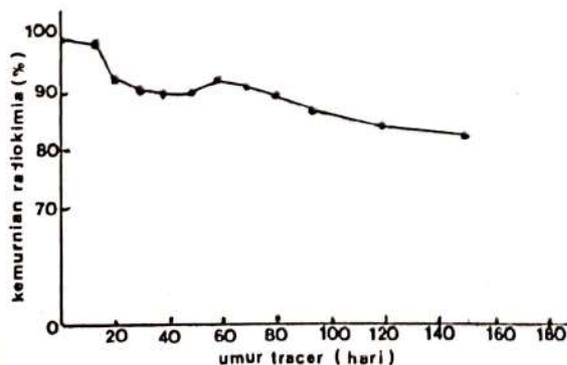
T<sup>1/2</sup> = waktu paruh,.

Waktu paruh <sup>125</sup>I adalah 60,2 hari [4] dan berat molekul T<sub>3</sub> 650,98 [4], maka aktivitas spesifik T<sub>3</sub> - <sup>125</sup>I adalah 3,3 mCi/μg.

Aktivitas yang tinggi menghasilkan sensitivitas assay yang tinggi pula walaupun menggunakan antibodi yang mempunyai aviditas agak rendah. Apalagi dalam darah, konsentrasi T<sub>3</sub> sangat rendah (80-160 ng/100 ml). Aktivitas spesifik perunut yang tinggi lebih menguntungkan dari segi sensitivitas, tetapi bila aktivitas spesifik lebih tinggi dari 3,3 mCi/μg, berarti sebagian dari atom T<sub>3</sub> diisi oleh dua atau lebih iodium aktif, hal ini akan menyebabkan senyawa tersebut cepat terurai [1].

Kelemahan dari suatu perunut adalah selalu mengalami penguraian pada penyimpanan. Untuk mengatasi hal ini, dalam penyimpanannya perlu ditambahkan stabilisator, seperti: etanol atau albumin [2].

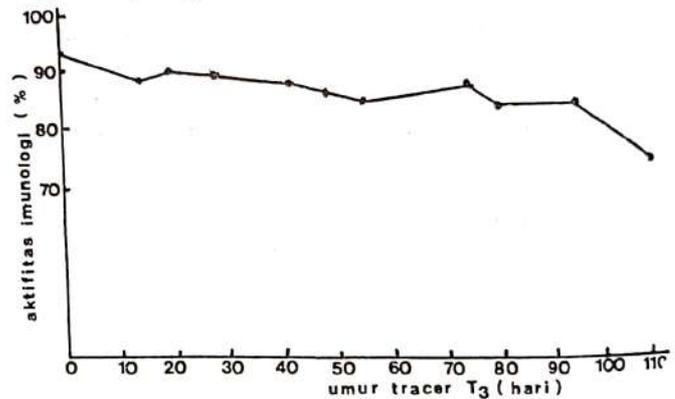
Untuk penentuan kemurnian radiokimia digunakan teknik kromatografi kolom, sama seperti pada pemurnian hasil iodinasi. Uji kemurnian radiokimia ini ditentukan secara periodik, untuk menentukan waktu kadaluarsa dari perunut.



Gambar 5. Uji kestabilan perunut T<sub>3</sub> dievaluasi dari kemurnian radiokimia

Gambar 5 menunjukkan bahwa perunut T<sub>3</sub> tidak terlalu terurai. Dan sampai 2,5 bulan, perunut T<sub>3</sub> masih menunjukkan kemurnian radiokimia yang tinggi (80%). Dengan kemurnian 80% ini, perunut masih dapat digunakan sebagai pereaksi *radioimmunoassay*.

Selain uji kemurnian radiokimia, aktivitas imunologi juga ditentukan secara periodik. Uji ini dilakukan dengan menginkubasi perunut dengan antibodi T<sub>3</sub> (berlebih), kemudian untuk memisahkan perunut yang bebas dan yang terikat digunakan polietilenglikol 18%. Hasil pemeriksaan ditunjukkan pada gambar 6.



Gambar 6. Uji kestabilan perunut T<sub>3</sub> dievaluasi dari aktivitas imunologi.

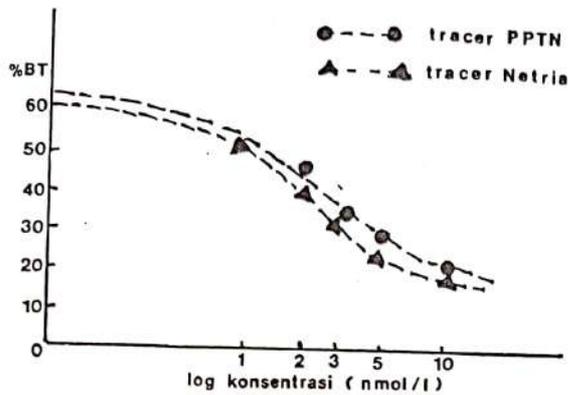
Dalam gambar 6 ini terlihat bahwa sampai 2,5 bulan perunut masih mempunyai aktivitas imunologi yang tinggi. Dengan aktivitas imunologi 80%, masih memenuhi syarat sebagai pereaksi *Radioimmunoassay*

Ikatan tidak spesifik pada penandaan T<sub>3</sub> ditentukan dengan teknik RIA menggunakan dua macam senyawa untuk memisahkan antigen bebas dan yang terikat, yaitu PEG 18% dan antibodi kedua.

Dengan menggunakan PEG 18% dihasilkan ikatan tidak spesifik yang cukup tinggi, tetapi masih dibawah batas yang diizinkan (10%). Sedangkan bila digunakan antibodi kedua, ikatan tidak spesifik didapatkan hanya sekitar 1% (tabel 2).

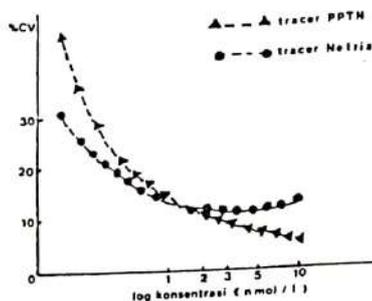
Disini terlihat perbedaan nyata antara kedua metoda tersebut. Menggunakan antibodi kedua jauh lebih spesifik dibandingkan dengan PEG 18%. Tingginya ikatan tidak spesifik dengan menggunakan PEG 18% dapat juga disebabkan adanya ko-presipitasi perunut dengan endapan protein.

Selain pengujian parameter diatas, untuk menentukan keandalan dari perunut ini dilakukan juga studi perbandingan dengan perunut yang sudah andal, dalam hal ini dari NETRIA.



Gambar 7. Perbandingan kurva standar T3 menggunakan perunut PPTN dan NETRIA.

Gambar 7 memperlihatkan perbandingan kurva standar antara perunut yang baru dibuat dengan perunut dari NETRIA. Terlihat bahwa perunut yang baru dibuat (PPTN) lebih sensitif dari perunut NETRIA. Hal ini mungkin disebabkan karena aktivitas spesifik dari perunut PPTN tersebut lebih tinggi. Ditinjau dari *precision profile* (gambar 8), terlihat bahwa perunut PPTN memberikan daerah kerja yang lebih luas dibandingkan dengan perunut NETRIA.



Gambar 8. Perbandingan imprecision profile menggunakan perunut PPTN dan NETRIA.

Berdasarkan pada nilai cuplikan kontrol yang menggunakan kedua macam perunut tersebut, ternyata harga cuplikan kontrol yang menggunakan perunut PPTN tidak berbeda jauh dibandingkan dengan yang menggunakan perunut NETRIA (tabel 3).

Tabel 3. Perbandingan perunut PPTN dan NETRIA berdasarkan harga QC sera yang didapat dari hasil *assay*.

QC sera	PPTN (nmol/l)	Netria (nmol/l)
A	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,4
B	1,6 ± 0,3	1,9 ± 0,5
C	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,5

### KESIMPULAN

1. Penandaan T<sub>3</sub> dari T<sub>2</sub> menggunakan kloramin T sebagai oksidator membutuhkan waktu reaksi yang sangat pendek (10-20 detik) pada pH 7,5 dan volume reaksi 40 µl. Dan efisiensi iodisasi yang dihasilkan cukup tinggi yaitu 83,0 ± 7,9 %.
2. Pemisahan T<sub>3</sub> dari T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> dan I menggunakan kolom sephadex G-25 fine, dan memberikan resolusi yang baik.
3. T<sub>3</sub> dapat disimpan dalam keadaan cair menggunakan etanol sebagai stabilisator, dan ternyata dapat bertahan selama 2,5 bulan.
4. Evaluasi T<sub>3</sub> yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan parameter-parameter: kemurnian radiokimia, aktivitas imunologi, aktivitas spesifik dan ikatan tidak spesifik. Dan menunjukkan bahwa perunut ini memenuhi syarat untuk digunakan sebagai pereaksi RIA.
5. Studi perbandingan dengan perunut NETRIA, perunut yang diperoleh mempunyai kualitas yang tidak berbeda jauh.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Besch P.K : "Clinical Radioassay Procedures. A Compendium"; The American Association of Clinical Chemist, Washington 1975.
2. Thorel J.I and Larson S.M : "Radioimmunoassay and related Techniques ", the CV Mosby Company, Saint Louis 1978. p 37.
3. Wilfrid R. Butt : "Practical Immunoassay." Marcel Dekker, Inc, New York 1983.
4. T, Chard: " An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques," Elsevier Biomedical Press, Amsterdam 1982.
5. G. Toth : "A General Method for The production of <sup>125</sup>I-labeled low-molecular weight tracer for Radioimmunoassay, Radiopharmaceutical and Labeled Compound 1984 conference proceedings, Tokyo, IAEA, Vienna 1985 p:359.