

METODE PREKONJUGASI ANTIBODI UNTUK PENENTUAN T₄

Natalia Adventini, Daniel Santoso, Ratnawati Hartono
Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

ABSTRAK

METODE PREKONJUGASI ANTIBODI UNTUK PENENTUAN T₄. Suatu penyederhanaan tata kerja *radioimmunoassay* (RIA) untuk penentuan T₄ telah dilakukan. Yaitu melalui prekonjugasi terhadap campuran pereaksi yang terdiri dari: antibodi pertama, antibodi kedua, serum domba normal, dan larutan dapar fosfat, yang kemudian ditambahkan pula larutan polietilenglikol. Campuran ini siap dipakai sebagai pereaksi *assay*. Dalam melakukan *assay*, kepada larutan baku atau cuplikan ditambahkan perunut ¹²⁵I-T₄ serta larutan pereaksi di atas. Setelah melalui tahap inkubasi dan centrifugasi, endapan yang diperoleh dicacah dengan cara seperti yang tercantum dalam tata kerja NETRIA-BATAN. Hasil percobaan menunjukkan bahwa, baik kurva baku maupun profil presisi yang diperoleh, antara metode prekonjugasi dengan metode NETRIA tidaklah berbeda banyak. Karena nilai parameter kontrol kualitas seperti: NSB (%), ED₂₀ (nmol/l), ED₅₀ (nmol/l), dan ED₈₀ (nmol/l), untuk yang menggunakan metode NETRIA adalah 1,7; 18,2; 60,9 dan 257,4. Sedangkan untuk yang menggunakan metode prekonjugasi, diperoleh hasil : 2,3; 20,2; 60,9 dan 275,6. Demikian pula hasil *assay* terhadap cuplikan kontrol, masih terletak dalam interval normal kit NETRIA-BATAN. Dengan demikian dapat disimpulkan, bahwa metode prekonjugasi dapat digunakan untuk mempercepat serta menyederhanakan tata kerja penentuan T₄ dengan cara *radioimmunoassay*, baik di rumah sakit maupun di laboratorium yang melayani cuplikan dalam jumlah banyak.

ABSTRACT

IN ORDER TO SIMPLIFY RADIOIMMUNOASSAY PROCEDURES FOR THE DETERMINATION OF T₄. A reagent mixture consisting of first antibody, second antibody, normal sheep serum, and phosphate buffer solution was pre-conjugated; after incubation polyethylene glycol solution was added and the resulting mixture is ready for use as a reagent for radioimmunoassay. Only ¹²⁵I labeled T₄ and the reagent mixture above need to be added to the standard or sample solution. After incubation and centrifugation the sediment was counted in accordance with the procedure of NETRIA-BATAN. The experimental results showed that standard curves and precision profiles obtained using the pre-conjugation method do not differ significantly from those obtained using NETRIA'S. Values obtained for quality control parameters such as NSB (%), ED₂₀ (nmol/l), ED₅₀ (nmol/l), and ED₈₀ (nmol/l) were 1.7, 18.2, 60.9 and 257.4 respectively, for Netria's Kit. Using the pre-conjugation method, the values found were 2.3, 20.2, 63.8 and 275.6. Assay of quality control samples also yielded value within the normal interval of NETRIA-BATAN'S Kit. It can be concluded from the experimental results, that the pre-conjugation method is useful to simplify and shorter the time needed for radioimmunoassay determination of T₄ in hospitals or laboratories with large numbers of samples.

PENDAHULUAN

Dalam *radioimmunoassay*, untuk menentukan besarnya fraksi antigen yang terikat diperlukan pemisahan antigen bebas dan antigen yang terikat secara fisikal. Dalam pemisahannya digunakan berbagai metode yang didasarkan pada perbedaan sifat kimiawi atau immunologis antara kedua bentuk antigen tersebut. Dan umumnya metode yang banyak dipakai digolongkan ke dalam empat kelompok besar:

1. Pemisahan berdasarkan atas perbedaan kelarutan.
2. Pemisahan berdasarkan perbedaan adsorpsi pada suatu bahan padat.
3. Pemisahan menggunakan antibodi kedua.

4. Pemisahan menggunakan pereaksi fase padat.

Pengendapan fraksi terikat yang menggunakan antibodi kedua telah banyak dilakukan serta digunakan, juga dalam kit T₄ buatan NETRIA-BATAN. Yaitu antigen bereaksi dengan antibodi primer, yakni antibodi yang berasal dari domba. Sedangkan antibodi kedua berasal dari spesies hewan lain, yaitu keledai yang diimunisasi dengan immunoglobulin domba. Serum inti domba yang diperoleh dari keledai ini akan berikatan dengan antibodi primer membentuk kompleks yang dapat mengendap. Pengendapan ini dipermudah dengan penambahan larutan polietilenglikol 4%.

Cara pemisahan yang menggunakan antibodi kedua ini pada kit RIA buatan NETRIA-BATAN memberikan hasil yang cukup baik. Pemisahan fisik antara antigen bebas dan antigen yang terikat hampir sempurna, dan kopresipitasi antigen bebas non-spesifik hanya terjadi sedikit. Tetapi, dalam pelaksanaannya metode ini memerlukan banyak tahap pengerjaan, misalnya pipetannya banyak serta tahap inkubasinya lama. Sehingga pada penelitian ini digunakan pereaksi yang berupa antibodi kedua yang telah diprekonjugasi terlebih dahulu. Metode prekonjugasi ini diharapkan dapat mempercepat dan menyederhanakan penentuan T_4 dengan cara RIA, karena meniadakan beberapa tahap pengerjaan.

TATA KERJA

Pereaksi

Kit T_4 NETRIA-BATAN terdiri atas antigen bertanda ^{125}I yang telah mengandung ANS (8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid), sediaan baku T_4 , serta cuplikan kontrol hasil produksi PPTN. Antibodi pertama yang berasal dari domba dan antibodi kedua yang berasal dari keledai, diperoleh dari NETRIA. Dan untuk mempermudah pengendapannya digunakan pula polietilen glikol.

Pereaksi prekonjugasi

Ke dalam vial ukuran 50 ml dimasukkan 500 μ l larutan antibodi pertama, 500 μ l larutan antibodi kedua, 10 μ l serum domba normal, dan 4 ml dapar fosfat. Campuran diaduk hingga homogen menggunakan pengaduk magnetik, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 2 jam. Setelah inkubasi, ditambah 5 ml larutan polietilenglikol 6% dan diaduk kembali dengan pengaduk magnetik selama kurang lebih 5 menit. Larutan campuran tersebut siap digunakan sebagai pereaksi prekonjugasi dalam melakukan *assay*.

Assay Netria

Untuk pembuatan kurva baku digunakan 25 μ l larutan standard yang masing-masing mengandung 0, 10, 50, 100, 150, dan 250 nmol/l T_4 , dimasukkan ke dalam sejumlah tabung plastik. Pada *assay* cuplikan digunakan 25 μ l larutan cuplikan sebagai pengganti larutan baku. Kemudian pada masing-masing tabung ditambahkan 50 μ l larutan senyawa bertanda $^{125}I-T_4$, 50 μ l larutan antibodi pertama, 50 μ l larutan antibodi kedua, dan 50 ml larutan dapar fosfat. Campuran diaduk dengan pengaduk vortex, lalu diinkubasikan selama 2 jam pada suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 500 μ l larutan polietilenglikol 4%, kemudian disentrifugasi supaya fraksi terikat mengendap. Setelah didekantasi, endapan dicacah

dengan pencacah sinar gamma. Untuk penentuan ikatan non-spesifik, dibuat campuran 25 μ l serum bebas T_4 , 50 μ l larutan senyawa bertanda $^{125}I-T_4$, 50 μ l larutan antibodi kedua dan 50 μ l larutan dapar fosfat tanpa antibodi pertama.

Assay metode prekonjugasi

Kurva baku dibuat dengan menggunakan larutan baku T_4 , yang konsentrasinya antara 0 dan 250 nmol/l seperti pada tata kerja NETRIA. Ke dalam sejumlah tabung plastik dimasukkan 25 μ l larutan standar atau cuplikan, 50 μ l larutan senyawa bertanda $^{125}I-T_4$ (dengan ANS) dan 1 ml larutan pereaksi prekonjugasi yang telah dibuat. Campuran dibuat homogen dengan pengaduk vortex, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 jam. Untuk memisahkan endapan fraksi terikat, campuran disentrifugasi selama 30 menit pada suhu 10°C, selanjutnya endapan dicacah dengan menggunakan pencacah sinar γ .

Untuk penentuan ikatan non-spesifik, dibuat campuran pereaksi tersendiri yang tidak mengandung antibodi pertama. Larutan ini ditambahkan sebanyak 1 ml pada waktu *assay* dan dicampurkan ke dalam tabung plastik dengan larutan serum bebas T_4 serta larutan senyawa bertanda $^{125}I-T_4$.

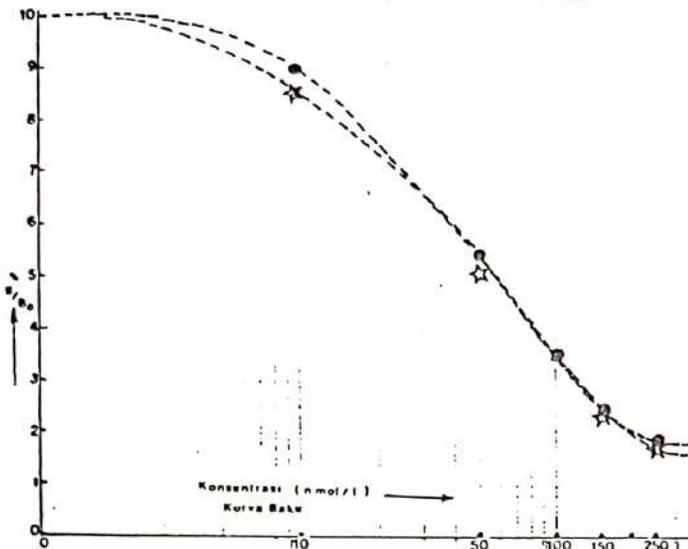
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva baku (standard) untuk *assay* T_4 memakai Kit Netria-BATAN dan memakai metode prekonjugasi dapat dilihat pada gambar 1, serta profil presisinya pada gambar 2. Sedangkan tabel 1 memperlihatkan perbandingan nilai parameter kontrol kualitas dari kedua cara tersebut. Hasil-hasil tersebut di atas menunjukkan, baik kurva standard maupun profil presisi untuk metode prekonjugasi dan metode Netria pada umumnya tidaklah terlalu berbeda. Hanya terdapat pergeseran sedikit pada kurva baku, mungkin disebabkan oleh pergeseran kesetimbangan ke arah bentuk antigen yang terikat. Namun untuk keperluan praktisi tidak terlalu penting dibandingkan dengan keuntungan yang diperoleh dari percepatan waktu serta penyederhanaan prosedur *assay*.

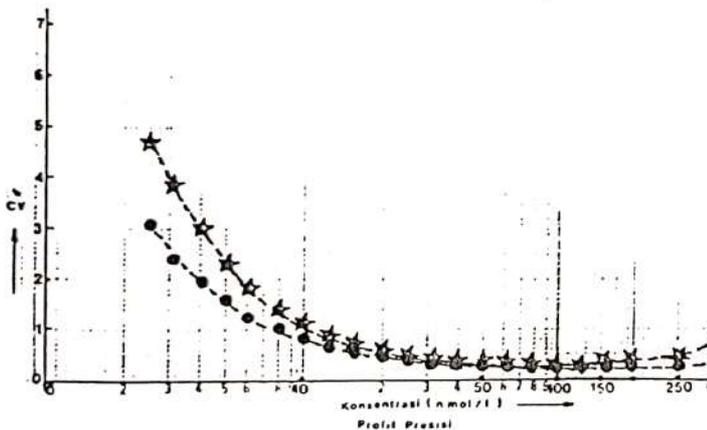
Hal yang sama terlihat pula pada nilai hasil pengukuran cuplikan kontrol yang masih terletak dalam interval normal yang diberikan oleh kit NETRIA-BATAN, seperti yang ditunjukkan pada tabel 2.

Pada tabel 3 dapat dilihat hasil perolehan kembali (recovery) yang menggunakan metode prekonjugasi dan metode Netria, yang dalam batas-batas kesalahan eksperimen juga tidak banyak berbeda satu dengan lainnya. Perolehan

kembali ini dihitung dari hasil assay terhadap contoh yang ditambahkan sejumlah tertentu.



Gambar 1. Kurva baku assay T₄ dengan kit NETRIA-BATAN (Metode Prekonjugasi).



Gambar 2. Profil Presisi.

Tabel 1. Perbandingan nilai parameter kontrol kualitas.

Parameter assay	NETRIA	Metode Prekonjugasi
Bo/T (%)	59,5	74,3
NSB (%)	1,7	2,3
ED 80	18,2	20,2
ED 50	60,9	63,8
ED 20	257,4	275,6

Sebagai contoh digunakan cuplikan QC kadar rendah yang ditambah T₄ sejumlah 50, 100, dan 150 nmol/l.

Assay T₄ dilakukan baik dengan metode prekonjugasi maupun metode Netria

Tabel 2. Hasil assay cuplikan kontrol.

Cup. kont.	Interval normal	Hasil assay			
		1	2	3	4
A	39,5-53,8	43,7	50,0	47,3	46,2
B	79,2-105,2	106,0	101,8	101,6	99,9
C	145,4-184,9	174,5	183,6	176,0	178,6

Tabel 3. Hasil perolehan kembali (Recovery)

Con-toh	Hasil penentuan		Nilai nominal		Perolehan kembali (%)	
	N	P	N	P	N	P
I	88,5	98,1	94,5	101	93,7	97,1
II	137,1	160,6	153,9	168,9	89,1	95,1
III	203,9	210,6	222,4	234,4	91,7	89,8

Keterangan:

I = QCA + T₄ 50 nmol/l

II = QCA + T₄ 100 nmol/l

III = QCA + T₄ 150 nmol/l

N = NETRIA

P = Prekonjugasi

KESIMPULAN

Dari hasil tersebut di atas menunjukkan, bahwa prekonjugasi antibodi pertama dan kedua tidak menyebabkan perbedaan besar, baik terhadap kurva baku dan profil presisi, maupun terhadap nilai parameter kualitas assay. Hasil assay terhadap cuplikan kontrol kualitas (kadar rendah, menengah dan tinggi) juga terletak dalam interval yang diharapkan. Dengan demikian metode prekonjugasi dapat digunakan untuk mempercepat serta menyederhanakan suatu teknik radioimmunoassay, khususnya untuk penentuan T₄, baik di rumah sakit maupun laboratorium yang harus melayani cuplikan dalam jumlah banyak.

DAFTAR PUSTAKA

1. WONG, P.Y., MEE A.V., and ALSPECTOR, F.E., *Asean J. Clin. Sci.*, 1, 52, 1980.
2. EDWARD, R., *Immunoassay, An Introduction*, William Heinemann Medical Books, London , 1985.