

VALIDASI KIT IMMUNORADIMETRICASSAY FREE PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN UNTUK PEMANTAUAN PEMBESARAN PROSTAT JINAK SECARA IN VITRO

Puji Widayati, Veronika Yulianti Susilo, Wening Lestari, Agus Ariyanto

Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka - BATAN
Kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan, Banten, Indonesia
pujiw@batan.go.id

ABSTRAK

VALIDASI KIT IMMUNORADIOMETRICASSAY FREE PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN UNTUK PEMANTAUAN PEMBESARAN PROSTAT JINAK SECARA INVITRO. Prostate Specific Antigen (PSA) diproduksi oleh sel-sel epitel yang melapisi asinus dan saluran kelenjar prostat. Peningkatan kadar PSA dalam darah disebabkan oleh peradangan atau kerusakan jaringan prostat yang mengakibatkan kanker prostat atau pembesaran prostat jinak (Benign Prostatic Hyperplasia, BPH). Salah satu metode penentuan kadar free PSA adalah immunoradiometricassay (IRMA) yang didasarkan pada reaksi imunologi antara antigen dan antibodi yang spesifik, serta menggunakan monoklonal antibodi yang ditandai zat radioaktif ^{125}I sebagai perunut. Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka (PTRR-BATAN) telah berhasil mengembangkan kit IRMA free PSA untuk penentuan kadar free PSA. PTRR melakukan validasi kit yang meliputi penentuan batas deteksi, kepekaan (sensitivitas), ketelitian (presisi) dan parameter assay (Non Spesific Binding, NSB dan Maximum Binding, MB). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan batas deteksi, ketelitian intra assay dan inter assay serta parameter assay, dimana diperoleh batas deteksi 0,39 ng/mL, ketelitian intra assay menghasilkan koefisien variasi (%CV) sebesar 7,18%, ketelitian inter assay untuk %CV sebesar 14,95% dan parameter assay kit IRMA free PSA menghasilkan %NSB sebesar 0,9 dan % B/T sebesar 19,57. Hal penelitian ini menunjukkan kit IRMA free PSA memenuhi persyaratan dari IAEA Protocol.
Kata kunci : Immunoradiometricassay, PSA, validasi, kanker, koefisien variasi

ABSTRACT

VALIDATION OF FREE PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN IMMUNO RADIOMETRIC ASSAY KIT FOR IN VITRO MONITORING OF BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA. Prostate Specific Antigen (PSA) is produced by epithelial cells lining the acini and ducts of the prostate gland. Elevated levels of PSA in the blood caused by resulting prostate inflammation or tissue damage resulting prostate cancer or benign prostate enlargement (benign prostatic hyperplasia, BPH). Among methods to determine free PSA is immunoradiometricassay (IRMA) which based on immunological reactions between antigens and specific antibodies, and using monoclonal antibodies labeled with I^{125} as a tracer. The Center for Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Technology BATAN has successfully developed free PSA IRMA kit for the determination of free PSA. PTRR BATAN performed validation of the kit, comprises the determination of detection limit of sensitivity, precision and the assay parameters (non-Specific Binding, NSB and Maximum Binding, MB). This study aims to determine the limit of detection, precision of intra-assay and inter-assay and assay parameters which resulted a detection limit of 0.39 ng/ml, intra-assay precision showed coefficients of variation (% CV) of 7.18% while for inter-assay precision was 14.95% and the assay parameters of free PSA IRMA kits showed 0.9% NSB and 19.57%B/T. These indicate that this free PSA IRMA kit conformed to the requirements.
Key words : Immunoradiometricassay, PSA, validation, cancer, coefficient of variation

PENDAHULUAN

Validasi metode analisis bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai untuk peruntukannya. Validasi biasanya diperuntukkan untuk metode analisa yang baru dibuat dan dikembangkan, sedangkan untuk metode yang memang telah tersedia dan baku (misal: AOAC, ASTM dan lainnya) tidak perlu dilakukan validasi, hanya verifikasi. Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis adalah kepekaan, ketelitian, selektivitas, linieritas, rentang, batas deteksi dan kekuatan (*robustness*) [1,2,3].

Kepekaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kepekaan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kepekaan dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*) [1,2,3].

Ketelitian adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Ketelitian diukur sebagai simpangan baku atau simpangan relatif (koefisien variasi). Ketelitian dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah ketelitian metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi yang sama dan dalam interval waktu yang pendek (*intra assay*). Ketertiruan adalah ketelitian metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda, biasanya dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut dan analis yang berbeda serta sampel yang dianalisa diduga identik sama dari batch yang sama, tetapi dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan

menggunakan peralatan, pereaksi dan analisis yang berbeda (*inter assay*) [1,2,3].

Selektifitas suatu metode adalah kemampuan mengukur zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel, dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*). Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya dengan analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi [1,2,3].

Linieritas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas rendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linieritas yang dapat diterima. Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko [1,2,3].

Prostate Specific Antigen adalah glikoprotein dengan berat molekul 34.000 dalton yang diproduksi terutama oleh sel-sel epitel yang melapisi asinus dan saluran kelenjar prostat. Pada keadaan normal, hanya sedikit PSA yang masuk ke dalam aliran darah tetapi bila terjadi peradangan atau kerusakan jaringan prostat maka kadar PSA dalam darah meningkat. Peningkatan kadar PSA dapat disebabkan oleh kanker prostat atau pembesaran prostat jinak (*Benign Prostatic Hyperplasia*, BPH). PSA dalam darah ditemukan pada keadaan bebas (*free PSA*) dan sebagian besar diikat oleh protein (complexed-PSA, c-PSA). Pada kanker prostat peningkatan c-PSA lebih dominan dibanding konsentrasi *free PSA*, sedangkan pada BPH yang lebih dominan *free PSA*. Pada pria berusia lanjut > 60 tahun hasil pengukuran PSA rancu apakah disebabkan oleh BPH atau kanker prostat oleh karena itu dianjurkan pemeriksaan rasio *free-PSA/PSA-total* atau rasio c-PSA/PSA

total terutama bagi mereka yang kadar PSA totalnya antara 2,6-10 ng/mL. Interpretasi pemeriksaan rasio *free*-PSA/PSA-total adalah < 10% diduga kanker prostat, 10% - 25% diduga BPH atau kanker prostat, >25% diduga BPH. Manfaat pemeriksaan PSA adalah untuk skrining (PSA total), untuk diagnosis (PSA total dan rasio *free*-PSA/PSA-total atau rasio c-PSA/PSA-total), untuk pemantauan penyakit dan pemantauan pengobatan serta pemantauan setelah pengangkatan prostat [4,5,6].

Pengukuran kadar *free* PSA dalam darah dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya metode *immunoradiometric assay* (IRMA) ataupun metode ELISA. Metode IRMA merupakan salah satu teknik *immunoassay* yang menggunakan radionuklida ¹²⁵I sebagai perunut sehingga cuplikan dalam jumlah kecil dapat dideteksi. Teknik ini sangat cocok digunakan untuk penentuan *tumor marker* dalam serum yang mempunyai matriks yang komplek dan kadarnya yang sangat bervariasi. Teknik *assay* ini didasarkan pada reaksi antara antigen (Ag) yang terdapat pada cuplikan atau standar (*tumor marker*) dengan antibodi yang bertanda radioaktif (Ab*) dalam jumlah berlebih membentuk kompleks antigen-antibodi (Ag-Ab*). Dengan demikian semakin tinggi kadar *tumor marker* (Ag), maka kompleks antigen-antibodi yang terbentuk juga semakin tinggi sehingga akan memberikan cacahan radioaktivitas yang semakin tinggi [4,5,6]

Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka (PTRR) BATAN telah berhasil mengembangkan kit IRMA *free* PSA yang digunakan untuk penentuan kadar *free* PSA dalam darah. Adapun tahapan proses pembuatan kit IRMA *free* PSA adalah pembuatan komponen kit, optimasi *assay* kit dan validasi kit serta uji banding menggunakan kit komersil yang ada dipasaran.

Tujuan validasi kit IRMA *free* PSA meliputi penentuan batas deteksi, ketelitian dan parameter *assay*. Pengujian parameter *assay* meliputi nilai blanko, nilai ikatan

maksimum (*Maximum Binding*, MB) dan nilai serum kontrol. Nilai blanko atau dikenal dengan istilah persen ikatan tidak spesifik (%NSB) dan nilai ikatan maksimum (%B/T) akan menentukan kurva standar yang didapat. Adapun persyaratan kit yang baik adalah %CV di bawah 10% untuk *intra assay*, %CV di bawah 15% untuk *inter assay*, untuk %NSB < 2 dan %B/T >10 serta batas deteksi sekecil mungkin.

METODOLOGI

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya adalah larutan standar *free* PSA, tabung reaksi polistiren dasar bintang bersalut monoklonal antibodi *free* PSA, larutan monoklonal antibodi *free* PSA bertanda ¹²⁵I yang selanjutnya disebut larutan perunut *free* PSA dengan konsentrasi tertentu, dan aquademin.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya adalah pencacah Gamma (*600 Gammatec II The Nucleus*), *Gamma Management System DPC*, berbagai ukuran pipet mikro beserta tipnya, pH meter (*Fisher Accumet model 810*), pengaduk (*Vortex*), inkubator (*Soft Incubator SL 1-6000*), timbangan analitik (*Mettler AE 160*).

Protokol Pengujian

Enam belas tabung reaksi polistiren dasar bintang bersalut antibodi *free* PSA (*coated tube*, CT) diberi nomor urut (1,2 3, dst). Sejumlah 50 µL larutan *free* PSA standar 0, 1, 2,5, 5, 10, 20, 40 dan 80 ng/mL ditambahkan ke masing-masing tabung CT secara berurutan. Sejumlah 25 µL larutan perunut Na¹²⁵I dengan aktivitas ≈ 50.000 cpm ditambahkan ke masing-masing tabung CT, larutan perunut ¹²⁵I dan standar *free* PSA yang berada didalam tabung CT dihomogenkan menggunakan alat *vortex* kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruangan dengan *shaker* kecepatan 400 rpm. Cairan dibuang dan tabung CT dikeringkan kemudian radioaktivitas yang tertinggal di dalam tabung diukur dengan alat pencacah Gamma selama satu menit.

Batas Deteksi (*Limit of Detection*)

Batas deteksi suatu kit ditunjukkan oleh konsentrasi minimum antigen yang tidak bertanda yang dapat dibedakan dari sampel yang tidak mengandung antigen. Perbedaan ini berdasarkan batas deteksi (*Confidence Limit*) sama dengan $\pm 2SD$ dari nilai rata-rata standar 0 dengan 8 kali pengulangan. Protokol pengujian diatas digunakan untuk menentukan batas deteksi dengan menambahkan larutan standar *free* PSA 0 ng/mL pada tabung CT nomer urut selanjutnya sebanyak 8 kali (17,18,19.... 24). Kepekaan dihitung berdasarkan nilai ± 2 Standar Deviasi (SD) dari rata-rata nilai larutan standar *free* PSA 0 (nol) dalam satuan konsentrasi (ng/mL).

Penentuan Ketelitian

Ketelitian merupakan aspek metode yang memberikan informasi batas deteksi (*limitasi*) pengujian klinis yang relevan, yang menentukan derajat kepercayaan. Ketelitian dinyatakan dalam persen *coeficient variation* (%CV) pengamatan pada pengulangan pengujian pada sampel yang sama, umumnya digunakan pengulangan sampel *free* PSA yang sudah diketahui konsentrasinya.

Protokol pengujian diatas digunakan untuk menentukan ketelitian dengan menambahkan sampel *free* PSA yang sudah diketahui konsentrasinya pada tabung CT urutan berikutnya (17, 18). Pengujian dilakukan minimal 6 (enam) kali pengulangan [1] untuk penentuan ketelitian *intra assay* dan *inter assay*. Ketelitian ditentukan oleh persen koefisien variasi (%CV) yang dihasilkan dari analisis.

Rumus perhitungan %CV dengan rumus sebagai berikut:

$$\%CV = \frac{SD}{x} \times 100\% \quad (1)$$

Dimana :

% CV : koefisien variasi

SD : Standar Deviasi

X : nilai rata-rata

Penentuan Parameter Assay

Parameter assay ditentukan dengan melakukan pengujian sesuai protokol pengujian meliputi nilai *Non Specific Binding* (NSB), *Maximum Binding* (%B/T).

Rumus perhitungan NSB dengan rumus sebagai berikut:

$$\%NSB = \frac{\text{Cacahan NSB-BG}}{\text{Cacahan Total} - \text{BG}} \times 100\% \quad (2)$$

Rumus perhitungan %B/T dengan rumus sebagai berikut:

$$\%B/T = \frac{\text{Cacahan fasa terikat-BG}}{\text{Cacahan total-BG}} \times 100\% \quad (3)$$

Dimana: BG : Cacahan latar

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini diperoleh batas deteksi $X \pm 2SD$ sebesar $0,39 \pm 0,12$ seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Penentuan batas deteksi

Pengulangan (n=8)	Konsentrasi <i>free</i> PSA (ng/mL)
1.	0,45
2.	0,39
3.	0,30
4.	0,41
5.	0,41
6.	0,41
7.	0,46
8.	0,32
Jumlah	3,15
Nilai	X = 0,39 SD = 0,06 X \pm 2SD = 0,39 \pm 0,12 %CV = 14,43

Pada penelitian ini pengujian ketelitian kit IRMA *free* PSA *intra assay* dilakukan sebanyak 8 kali pengulangan dengan satu orang operator. Nilai %CV hasil pengujian ini adalah 7,18 % dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil perhitungan konsentrasi free PSA untuk *intra assay*

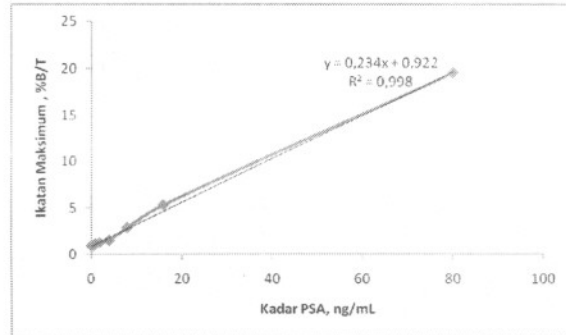
Pengulangan (n=8)	Konsentrasi free PSA (ng/mL)
1.	0,71
2.	0,71
3.	0,71
4.	0,71
5.	0,73
6.	0,78
7.	0,77
8.	0,86
Jumlah	5,98
Nilai	X = 0,75 SD = 0,05 % CV = 7,18

Pengujian ketelitian *inter assay* dilakukan sebanyak 8 kali pengulangan dengan 8 orang operator. Nilai %CV hasil pengujian adalah 14,95% seperti terlihat pada Tabel 3. Dari kedua pengujian ketelitian *intra assay* dan *inter assay* tersebut kit IRMA free PSA yang dibuat telah memenuhi persyaratan kit yang baik yaitu %CV<10% untuk *intra assay* sedangkan %CV<15% untuk *inter assay*.

Tabel 3. Hasil perhitungan konsentrasi free PSA untuk *inter assay*

Pengulangan (n=8)	Konsentrasi free PSA (ng/mL)
1.	0,77
2.	0,91
3.	0,74
4.	0,75
5.	0,70
6.	0,78
7.	1,02
8.	1,00
Jumlah	6,67
Nilai	X = 0,83 SD = 0,12 % CV = 14,95

Dari hasil pengujian parameter *assay* berturut-turut didapatkan nilai blanko sebesar 0,9% dan nilai ikatan maksimum sebesar 19,57 serta nilai r 0,998 seperti ditunjukkan pada Gambar 1, sehingga nilai ini memenuhi persyaratan kit yang baik.



Gambar 1. Kurva kalibrasi standar free PSA

KESIMPULAN

Validasi kit IRMA free PSA yang diproduksi secara lokal di PTRR ini mempunyai batas deteksi 0,39 ng/mL dengan ketelitian *intra assay* yang memberikan koefisien variasi (%CV) sebesar 7,18 sedangkan ketelitian *inter assay* sebesar 14,95 serta mempunyai parameter *assay* dengan %NSB dan %B/T berturut-turut 0,9 dan 19,57 serta nilai r 0,997. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kit IRMA free PSA hasil penelitian ini telah memenuhi persyaratan kit yang baik, sehingga dapat digunakan untuk uji banding dengan kit komersil pada penelitian selanjutnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada staf bidang Radioisotop dalam penyediaan radioisotop Na¹²⁵I sebagai bahan utama pembuatan perunut free PSA, staf bidang Radiofarmaka dan tim KPTP yang memberi masukan sehingga terselesaikannya makalah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harmita, Petunjuk Validasi Metoda dan Cara Perhitungan, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Volume I (3) hal 117-130, 2004
2. RA Biddlecombe, Brian L, Validation of an immunoassay, in *Immunoassay A Practical Guide*, Taylor&Francis, pp 179-198, 1798.
3. Ludwig Huber, Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Second Edition, pp 125-154, 1948
4. Rediatning W, Sukiyati Dj, *Immunoraiometricassay (IRMA)* Dalam

- Deteksi Dan pemantauan Kanker, *Jurnal Radioisotop dan Radiofarmaka*, Volume 3, Nomor 1, hal 55-70, 2000
5. Puji Widayati, Gina Mondrida, Sri Setiyowati, Agus Ariyanto, Yulianti Susilo, Wening Lestari, Preparasi Perekasi Kit immunoradiometricassay free Prostat Specifik Antigen Untuk Deteksi Kanker Prostat, *Jurnal Kimia Terapan Indonesia* Vol 15, No..2, Hal 13-24, Bandung Desember 2013, ISSN 0853-2766,
- Akreditasi No. 540/AU1/P2MI-LIPI/06/2013
6. Puji Widayati, Sutari, Triningsih, Agus Ariyanto, "Optimasi Assay Kit *Immunoradiometricassay*(IRMA) *Prostat specific Antigen*(PSA) Untuk Deteksi Kanker Prostat, Prosiding Seminar Nasional Kimia, Universitas Negeri Yogyakarta, Hal 77-85, Yogyakarta 2013.