

EVALUASI TIGA JENIS PARTIKEL MAGNETIK SEBAGAI PENDUKUNG FASA PADAT PADA RIA T₃

Darlina⁽¹⁾, Wayan Rediatning⁽²⁾

ABSTRAK

EVALUASI TIGA JENIS PARTIKEL MAGNETIK SEBAGAI PENDUKUNG FASA PADAT PADA RIA T₃. Telah dilakukan evaluasi tiga jenis partikel magnetik yaitu; partikel selulosa magnetik, partikel *magnetite*, partikel *IAE-silanised iron oxide* sebagai pendukung fasa padat pada RIA T₃. Evaluasi dimaksudkan untuk mendapatkan pereaksi pemisah yang kualitas *assay*-nya baik, prosedur pembuatannya sederhana, dan biayanya murah. Metode evaluasi dilakukan melalui tahap; imobilisasi antibodi kedua pada partikel, optimasi imobilisasi, desain *assay*, dan evaluasi tampilan *assay* yaitu; % Bo, %NSB, kisaran daerah kerja, dan konsentrasi serum kontrol. % Bo yang tertinggi diperoleh pada partikel selulosa magnetik, dan ikatan tidak spesifik (NSB) yang terendah pada partikel *magnetit*. Partikel *magnetite* mempunyai daerah kerja yang terluas sedang yang tersempit diperoleh pada partikel *IAE-silanised iron oxide*. Hasil pengujian konsentrasi tiga macam serum kontrol (kontrol 1, kontrol 2, kontrol 3) masih dalam kisaran yang diperbolehkan. Tampilan *assay* partikel *magnetite* dan selulosa magnetik mempunyai kualitas yang sama tetapi jumlah partikel pertabung pada partikel *magnetite* jauh lebih kecil dan butiran partikelnya paling halus. Dari evaluasi ketiga partikel yang terbaik adalah partikel *magnetite*.

ABSTRACT

THE EVALUATION OF THREE KINDS MAGNETIC PARTICLE AS A SOLID SUPPORT PHASE IN RIA T₃. Evaluation has been carried out in three kinds magnetic particles i.e: cellulose magnetic particle, magnetite particle, IAE particle-silanised iron oxide as solid phase support in RIA T₃. The purpose of evaluation is to obtain separator reactant which has high quality assay, and simple production process, low cost. The evaluation is performed in the immobilisation of second antibody, on the particles optimisation, design assay, and the evaluation of assay performance i.e: %Bo, %NSB, estimation of the operation range, and the concentration of control serum. The highest %Bo obtained in magnetic cellulose particle, the lowest non specific bound is in magnetite particle. Magnetite particle has widest range operation and on the other side IAE-silanised iron oxide particle has the lowest one.

⁽¹⁾ Pusat Pendayagunaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir

⁽²⁾ Pusat Pengembangan Radioisotop dan Radiofarmaka

Assays of three control serum (control 1, control 2, control 3) show that the concentration are in acceptable range. Magnetic particles is the best particles from the others. The assay performance of magnetite particle and magnetic cellulose particle are same even however the weight of particles per-tube in magnetite particle is much lower and the granulates are much smaller. Magnetite particles is the best ones of the three particles.

PENDAHULUAN

Pereaksi pemisah fasa padat lebih disukai dibandingkan pereaksi pemisah fasa cair, terutama karena teknik pengerjaannya lebih sederhana dan cepat [3]. Pada teknik ini antibodi diikatkan pada pendukung padat seperti tabung reaksi (*coated tube*), *makro bead*, dan butiran halus. Teknik pemisahan dengan *coated tube* dan *makro bead* mempunyai kelemahan antara lain reaksinya lambat, karena kontak antara campuran reaksi dengan permukaan tabung atau makro bead terbatas, sehingga seringkali reaksi terhenti sebelum kesetimbangan tercapai, yang mengakibatkan menurunnya sensitivitas. Teknik pemisahan dengan butiran halus memberikan efisiensi pemisahan yang lebih tinggi dari pada *coated tube* dan makro "bead" karena mempunyai permukaan yang luas. Kini telah dikembangkan teknik antibodi fasa padat magnetik, dimana antibodi diikatkan secara kimia pada butiran halus yang bersifat magnetik sehingga untuk pengendapannya hanya memerlukan plat magnetik kecil yang harganya murah.

Partikel magnetik sebagai pendukung fasa padat bisa terbuat dari bermacam-macam bahan, dengan prosedur pengikatan antibodi pada partikel juga akan berbeda-beda. Dalam usaha produksi kit RIA secara lokal, perlu dicari partikel magnetik sebagai pendukung fasa padat yang kualitasnya baik, prosedur pengikatan antibodi pada partikel yang sederhana dan biaya pembuatannya murah. Pada penelitian ini akan dievaluasi tiga jenis partikel magnetik sebagai pendukung fasa padat pada pereaksi pemisah kit RIA T_3 yaitu ; selulosa magnetik (SCIPAC Inggris), magnetite (Hungaria), dan IAE-silanized iron oxide (China). Evaluasi ketiga macam partikel magnetik meliputi optimasi imobilisasi antibodi kedua pada partikel magnetik , optimasi pemakaiannya sebagai pendukung pereaksi pemisah antibodi kedua fasa padat serta evaluasi penampilan assaynya.

Optimasi imobilisasi antibodi kedua pada partikel magnetik dilaksanakan dengan tujuan untuk mencari jumlah antibodi kedua yang akan diikatkan (imobilisasi) pada partikel magnetik.

Penentuan titer bertujuan untuk mencari jumlah pereaksi pemisah antibodi kedua fasa padat magnetik yang optimum, yang menghasilkan kapasitas ikatan (%B) yang dihasilkan optimum. Pada optimasi pemakaian pereaksi pemisah antibodi fasa padat magnetik pada *assay*, beberapa parameter divariasikan antara lain; volume antibodi pertama, volume standar, volume larutan perunut, lama inkubasi, dan temperatur inkubasi antibodi kedua pada partikel magnet dilaksanakan untuk mendapatkan kapasitas ikatan yang tinggi dan persen ikatan tidak spesifik (NSB) yang rendah, serta daerah kerja yang luas. Penampilan *assay* dievaluasi dengan membandingkan parameter kontrol ketiga macam partikel magnetik.

TATA KERJA DAN PERALATAN

Bahan dan Peralatan.

Antibodi kedua yang digunakan buatan P2RR BATAN, DEAE cellulose buatan sigma, bahan kimia lainnya buatan E.Merck, partikel selulosa magnetik (M100) dari Scipac, dan Inggris, Partikel magnetite dari Hongaria, partikel IAE-silanized iron oxide dari China, larutan perunut buatan P2RR BATAN.

Alat pencacah yang digunakan adalah gamma mini *assay* type 6-20, sebagai alat pemisah digunakan plat magnetik (magnetic separator) buatan Amersham. Alat pemutar (rotator) diperoleh dari Netria.

Isolasi IgG dari serum antibodi kedua

Metode pengendapan (NH₄)₂SO₄

3 mL antiserum diencerkan sampai 7 mL dengan larutan fisiologis NaCl 0,9%, ditambahkan sedikit demi sedikit 2,7 gr (NH₄)₂SO₄ sambil diaduk selama 60 menit kemudian disentrifuge selama sekitar 30 menit pada rpm 2000. Endapan dipisahkan lalu dilarutkan dengan larutan bufer fosfat 0,05M pH 7,4, kemudian didialisa dengan larutan bufer fosfat 0,05M pH 7,4.

Imobilisasi antibodi kedua pada partikel magnetik.

Partikel selulosa magnetik (SCIPAC, Inggris)

Aktivasi partikel selulosa magnetik dengan 1,1-Karbodiimidazol (CDI)

Sebanyak 10 mL (0,5 gr) larutan partikel selulose magnetik diaduk menggunakan alat pemutar selama 30 menit pada 30 rpm. Partikel selulose magnetik diendapkan menggunakan plat magnetik. Partikel yang mengendap dicuci dengan air (10 mL) sebanyak 3 kali, pencucian dilanjutkan menggunakan aseton (20 mL) sebanyak 5 kali. Endapan partikel disuspensikan dalam aseton hingga volume menjadi 5 mL, kemudian ditambahkan 60 mg CDI. Suspensi selanjutnya diputar pada alat pemutar pada 30 rpm selama 1 jam pada temperatur kamar. Partikel diendapkan, selanjutnya dicuci berturut-turut dengan aseton (20 mL) sebanyak 4 kali, air (20 mL) sebanyak 4 kali dan larutan bufer bikarbonat pH 8 (20 mL) sebanyak 4 kali. Partikel yang telah diaktivasi dengan CDI disimpan dalam 5 mL larutan bufer bikarbonat pH 8 sampai digunakan.

Imobilisasi IgG pada partikel magnetik

Pada tabung reaksi yang berisi 50 μ L partikel magnetik, ditambahkan IgG yang jumlahnya divariasikan dari 5 μ L sampai 200 μ L, diputar semalam pada temperatur kamar. Partikel diendapkan dan dicuci dengan 200 μ L bufer bikarbonat dilanjutkan dengan pencucian memakai 200 μ L bikarbonat yang mengandung 0,3% etanolamin. Endapan disuspensikan dengan bufer bikarbonat yang mengandung etanolamin yang sama lalu diputar selama 30 menit pada temperatur kamar. Partikel diendapkan lalu dicuci dengan bufer asetat pH 4 sambil diputar selama 30 menit pada temperatur kamar. Setelah diendapkan, IgG yang telah terimobilisasi dicuci dengan 2 x 400 μ L bufer fosfat 0,05M pH 7,4 dan disuspensikan dalam 200 μ L bufer fosfat 0,05M pH 7,4.

Menurunkan ikatan tidak spesifik (NSB)

Untuk menurunkan ikatan tidak spesifik (NSB), dilaksanakan beberapa perlakuan antara lain (seperti pada Tabel 1):

- Memvariasikan pH larutan etanolamin dari pH 7 hingga 11
- Mencampurkan antibodi kedua yang telah diimobilisasi dengan *Bovine serum albumin* (BSA) jenuh.

- Mencuci antibodi kedua yang telah diimobilisasi dengan larutan bufer assay dengan larutan bufer fosfat yang mengandung 1% triton x-100 ,dan bufer fosfat yang mengandung 1% tween 20.

Tabel 1. Optimasi % NSB pada partikel selulosa magnetik dengan menggunakan beberapa perlakuan.

Perlakuan	% NSB
1	23,7 ± 2,0 %
2	15,1 ± 1,3 %
3	6,8 ± 1,0 %
4	6,5 ± 1,1 %
5	5,6 ± 0,6 %
6	1,7 ± 0,3 %
7	1,6 ± 0,4 %
8	1,8 ± 0,3 %

Catatan: Perlakuan:

1. Setelah imobilisasi, tidak ada penambahan etanolamin.
2. Setelah imobilisasi, dalam suspensi partikel magnetik ditambahkan 3µl/mL etanolamin pH 10-11 dalam bufer bikarbonat.
3. Setelah imobilisasi, ditambahkan 3µl/mL etanolamin pH 8 dalam bufer bikarbonat ke dalam suspensi partikel magnetik.
4. Setelah imobilisasi, partikel magnetik dijenuhkan dengan etanolamin pH 7
5. Setelah imobilisasi, partikel magnetik dijenuhkan dengan BSA
6. Setelah imobilisasi, partikel magnetik dijenuhkan dengan BSA dan etanolamin pH 8, kemudian dilakukan pencucian dengan bufer fosfat yang mengandung 1% triton x-100
7. Setelah imobilisasi, partikel magnetik dijenuhkan dengan BSA, kemudian dicuci dengan bufer fosfat mengandung 1% triton x-100.
8. Setelah imobilisasi, partikel magnetik dijenuhkan dengan BSA dan etanolamin pH 8, kemudian dicuci dengan bufer fosfat mengandung 1% Tween 20

Partikel magnetite (Fe_3O_4) dari Hongaria

Pada suspensi magnetite (1mg/mL) ditambahkan antibodi kedua yang dimurnikan. Jumlah antibodi kedua divariasikan untuk optimasi. Campuran diinkubasi pada 4°C selama 1 jam. Setelah inkubasi, 5 mg EDAC ditambahkan per 1 mg IgG. Kemudian campuran diinkubasi semalam pada 4°C. Setelah inkubasi suspensi dicuci 2 kali dengan bufer fosfat salin atau PBS (0,01 M KH_2PO_4 , dan 0,15 M NaCl) pH 7,2. Kemudian didiamkan selama satu malam pada 4°C.

Partikel IAE-silanized iron oxide dari China.

Sejumlah 100 mg partikel magnetik IAE silanized dicuci 2 kali dengan 2 mL air. Kemudian itu volume larutan diatur sampai 4 mL dan ditambahkan 16 mg EDAC. PH diatur menjadi pH 5,6. Partikel dicampur (diaduk) selama 24 jam pada temperatur kamar, menggunakan "vertikal rotator". Partikel dicuci dengan 20 mL air, kemudian dicuci kembali dengan PBS (pH 7,4) sebanyak 5 kali, dan disimpan dalam PBS sampai digunakan.

Penentuan Titer hasil imobilisasi antibodi kedua.

Suspensi antibodi kedua yang telah terimobilisasi pada partikel magnetik, diambil sebanyak 5, 10, 25, 50, 100, 200 μL dimasukkan ke dalam tabung reaksi plastik, masing-masing ditambahkan 50 μL larutan perunut $^{125}\text{I-T}_3$ dan 25 μL anti- T_3 . Pada akhir inkubasi, fraksi terikat dipisahkan menggunakan plat magnetik, kemudian radioaktivitas diukur, dan nilai % B/T dihitung.

Optimasi penggunaan pereaksi pemisah antibodi kedua fasa padat

Optimasi penggunaan pereaksi pemisah antibodi kedua fasa padat dilakukan untuk mendapatkan sensitifitas dalam kisaran daerah kerja yang diinginkan dengan memvariasikan volume pereaksi dan waktu inkubasi. Beberapa protokol assay telah dilakukan, dan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Variasi volume pereaksi dan lama inkubasi pada prosedur assay T_3

Protokol	Volume Pereaksi	Inkubasi
1 A	50 μ L standar 50 μ L perunut 50 μ L anti- T_3	2 jam, (TK)
2 A	50 μ L standar 50 μ L perunut 25 μ L anti- T_3	2 jam, TK
3 A	100 μ L standar 50 μ L perunut 25 μ L anti- T_3	2 jam, TK
4 A	100 μ L standard 50 μ L perunut 25 μ L anti- T_3	1 jam, TK
5 A	100 μ L standar 50 μ L perunut 25 μ L anti- T_3	1 jam, 37°C

Catatan: TK = temperatur kamar

Penentuan parameter kontrol kualitas

Protokol penentuan parameter kontrol kualitas dilakukan sesuai dengan protokol assay pada Tabel 3. Kurva standar serta kurva profil presisi (*imprecision profile*) disusun menggunakan data dari hasil assay yang telah diolah menggunakan program komputer IAEA.

Tabel 3. Protokol assay RIA T₃ yang digunakan

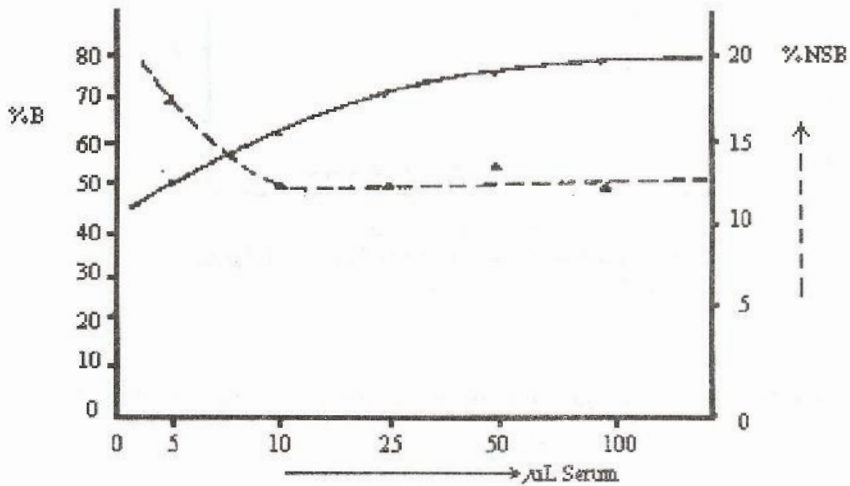
Tabung Pereaksi	Total Radioaktivitas	NSB	Konsentrasi Standar T ₃ (nmol/L)						
			0	0,5	1,5	3	6	12	sampel
T ₃ Free serum	-	100	-	-	-	-	-	-	-
Perunut	50	-	50	50	50	50	50	50	50
Standar	-	-	100	100	100	100	100	100	-
Anti-T ₃	-	-	25	25	25	25	25	25	25
Suspensi 2nd-Ab magnetik	-	25	25	25	25	25	25	25	25
Sampel	-	-	-	-	-	-	-	-	100

- Tabung dikocok, kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C
- Supernatan dipisahkan dari endapan dengan menggunakan magnetik separator
- 500 µL larutan dapar pencuci ditambahkan, dikocok.
- Supernatan dipisahkan dari endapan dengan menggunakan magnetik separator
- Endapan dicacah.

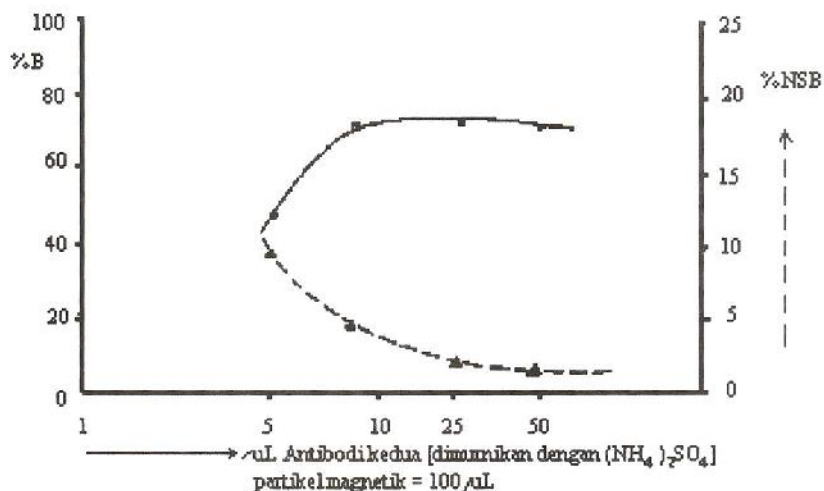
HASIL PEMBAHASAN

Dalam imobilisasi antibodi kedua pada partikel magnetik, dilakukan optimasi untuk mendapatkan kapasitas ikatan yang optimum. Pada optimasi dilakukan variasi volume antibodi kedua pada partikel magnetik dalam jumlah tertentu.

Pada (Gambar 1) terlihat pada partikel selulosa magnetik perbandingan antara antibodi kedua dan partikel magnetik : (50 μ L : 5 mg) memberikan kapasitas ikatan yang optimum, sedangkan pada partikel *magnetite* 10 μ L antibodi kedua dengan 100 μ g partikel, ikatan maksimumnya (% Bo) tidak meningkat lagi dan ikatan tidak spesifiknya (NSB) cukup rendah (lihat Gambar 2).

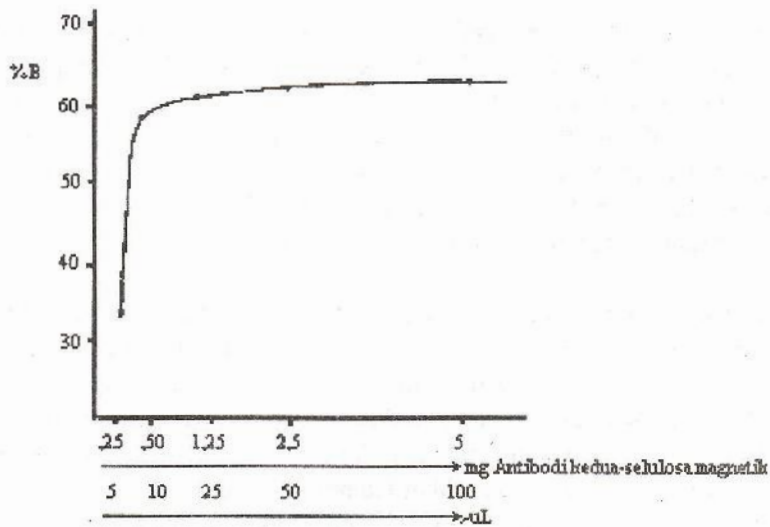


Gambar 1. Kurva optimisasi volume antibodi kedua yang diimmobilisasi pada 5 mg selulosa magnetik.

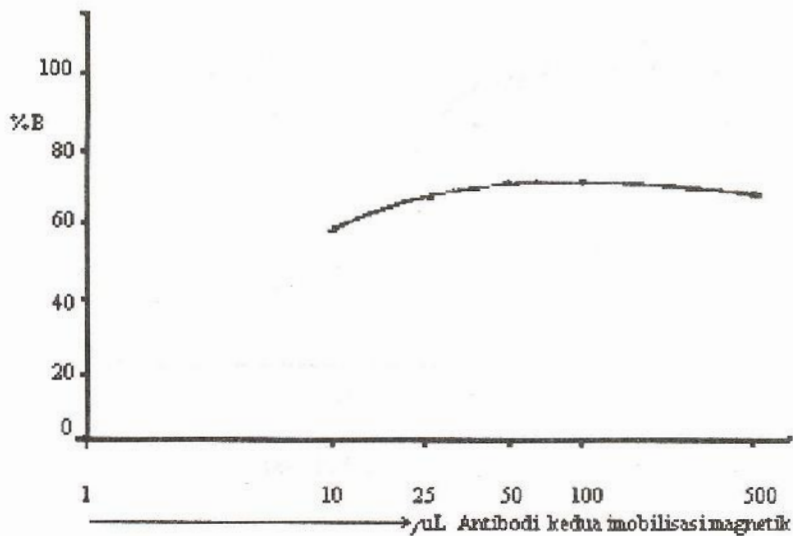


Gambar 2. Kurva optimisasi volume antibodi kedua yang akan diimmobilisasi pada partikel magnetik.

Penentuan jumlah partikel magnetik yang diperlukan per tabung dalam assay ditentukan dari kurva titrasi. Partikel magnet yang dibutuhkan per tabung pada partikel selulosa magnetik adalah 25 µL atau 1,25 mg (lihat Gambar 3), pada partikel *magnetite* adalah 25 µL atau 2,5 µg (lihat Gambar 4), pada partikel *IAE-Silanized iron oxide* adalah 0,05 mg.



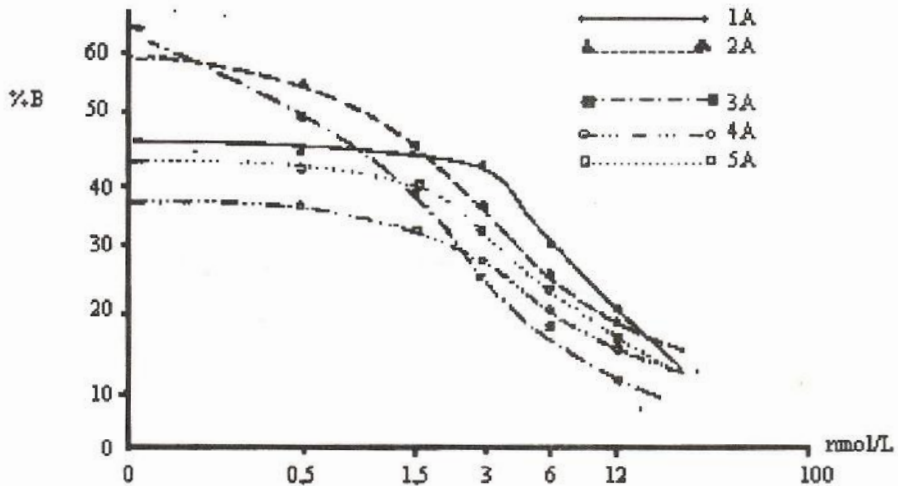
Gambar 3. Kurva titrasi pereaksi pemisah antibodi kedua-selulosa magnetik



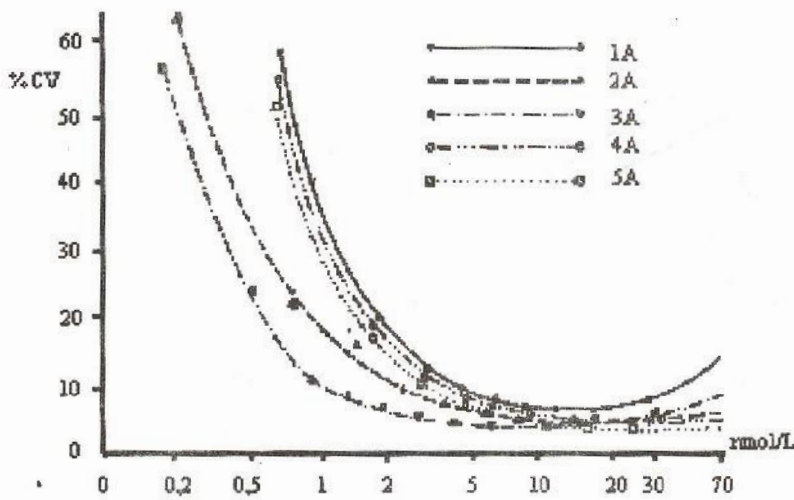
Gambar 4. Kurva titrasi antibodi kedua yang diimobilisasi pada partikel magnetik

Pada imobilisasi antibodi kedua pada partikel selulosa magnetik diperoleh ikatan maksimum yang tinggi tetapi ikatan tidak spesifiknya (NSB) cukup tinggi sehingga diperlukan beberapa perlakuan pada saat imobilisasi untuk menurunkannya. Beberapa perlakuan yang telah diaplikasikan untuk menurunkan NSB antara lain; pengaturan pH etanolamin yang digunakan menjadi pH 7-8, penjuenan dengan *bovine serum albumin* (BSA), dan pencucian dengan bufer fosfat yang mengandung 1% triton x-100 atau 1% tween 20. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1, dimana perlakuan 7 memberikan NSB yang paling kecil.

Setelah diperoleh volume antibodi kedua fasa padat yang optimum, dilakukan optimasi penggunaan pereaksi pemisah antibodi kedua fasa padat untuk mendapatkan protokol yang memberikan hasil *assay* yang baik. Optimasi dilakukan dengan memvariasikan volume pereaksi dan lamanya waktu inkubasi. Beberapa protokol yang dilakukan pada optimasi *assay* dapat dilihat pada Tabel 2. Dari ikatan maksimum yang paling tinggi serta kecuraman kurva standar (lihat Gambar 5), dan kisaran daerah kerjanya yang paling luas (lihat Gambar 6) maka protokol 3A merupakan yang terbaik

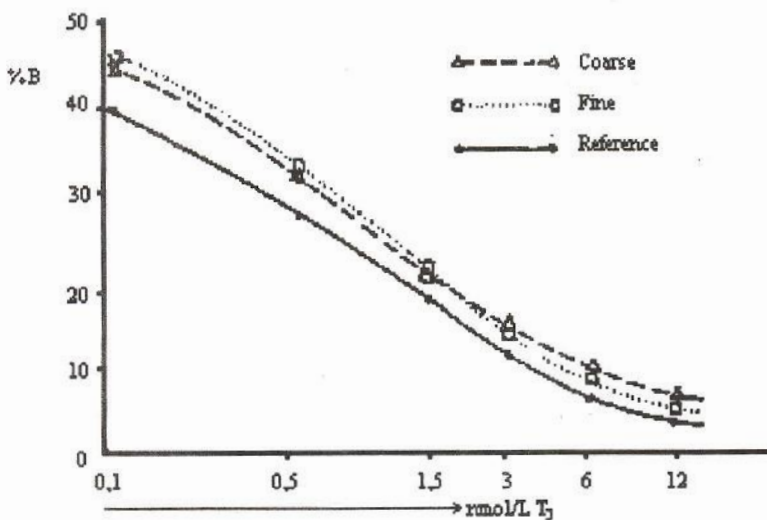


Gambar 5. Kurva standar dari berbagai protokol assay kit RIA T₃

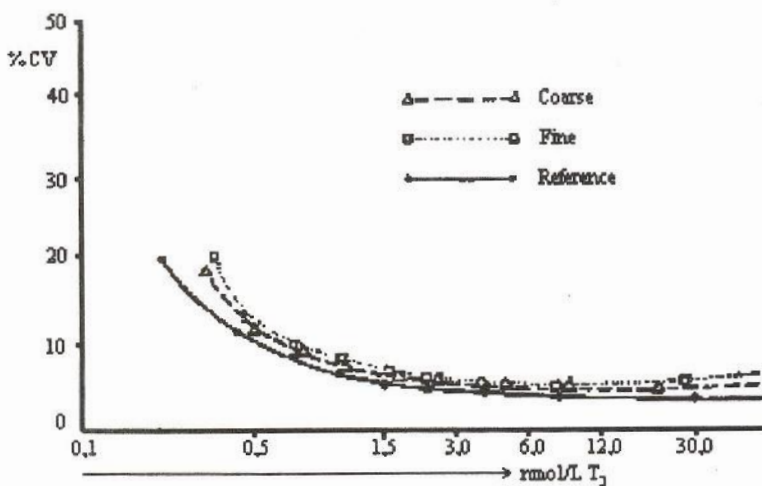


Gambar 6. Kurva profil presisi dari berbagai protokol assay pada kit RIA T_3

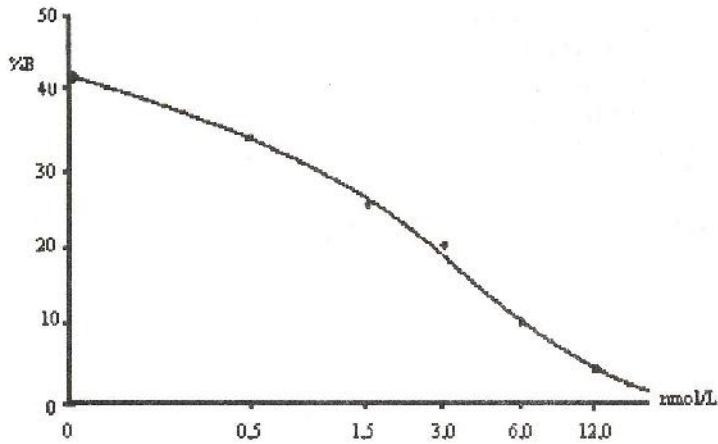
Telah dilakukan imobilisasi antibodi kedua pada dua macam partikel *magnetite* yaitu partikel *magnetite coarse* (kasar) dan *fine* (halus). Kurva standar dari hasil *assay* pada kedua jenis partikel (Gambar 7) terlihat partikel *fine* mempunyai kecuraman kurva yang lebih baik dari pada *coarse*, tetapi kedua jenis partikel mempunyai luas kisaran daerah kerja yang tidak jauh berbeda (lihat Gambar 8).



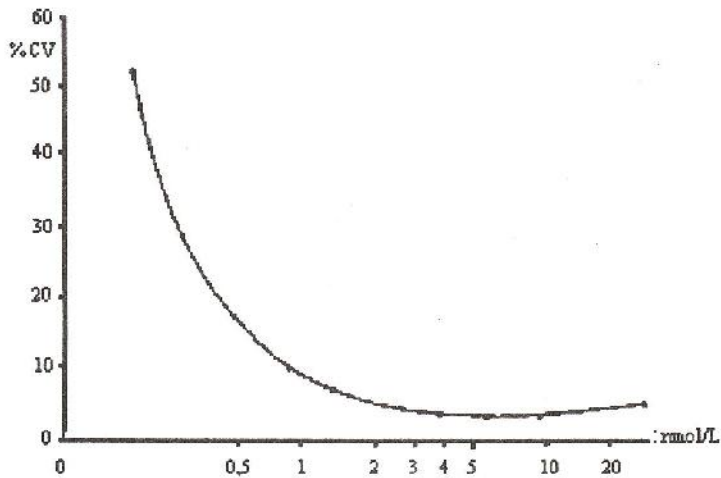
Gambar 7. Kurva standar assay T₃ menggunakan pereaksi pemisah antibodi kedua-magnetik



Gambar 8. Kurva profil presisi assay T₃ menggunakan pereaksi pemisah antibodi kedua-magnetik



Gambar 9. Kurva standar assay T_3 menggunakan pereaksi pemisah antibodi kedua-IAE silanized



Gambar 10. Kurva profil presisi assay T_3 menggunakan pereaksi pemisah antibodi kedua-IAE silanized iron oxide dan kit RIA T_3 Amersham's

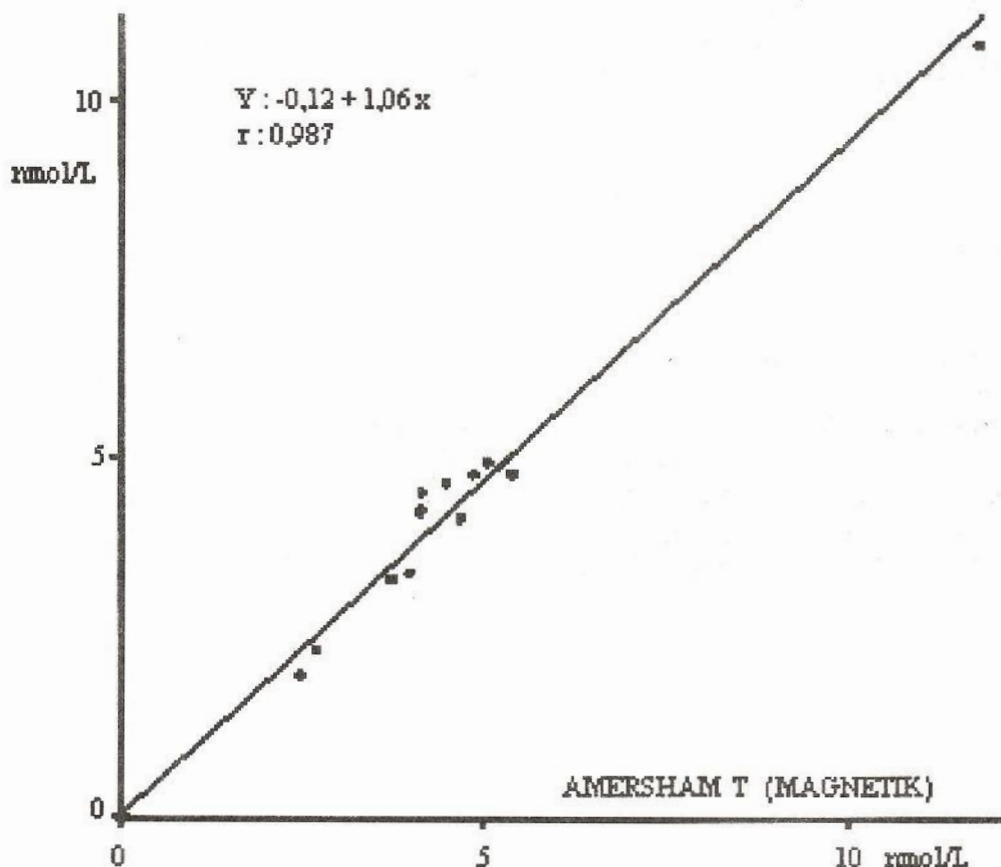
Assay kit RIA T_3 dilakukan dengan menggunakan protokol seperti pada Tabel 3. Dari parameter karakteristik yang diperoleh dari assay pada ketiga jenis partikel (lihat Tabel 4) terlihat kelebihan dan kekurangan masing-masing partikel. Kapasitas ikatan maksimum (%Bo) yang tertinggi diperoleh dari assay pada partikel selulosa magnetik, dan ikatan tidak spesifik (%NSB) yang terendah pada partikel *magnetite*. Kisaran daerah kerja yang terluas terdapat pada partikel *magnetite* sedangkan yang tersempit pada partikel *IAE-silanised iron oxide*. Nilai kontrol sera (kontrol 1, 2, dan 3) yang diperoleh dari ketiga macam partikel hampir semuanya terletak dalam kisaran konsentrasi yang diperbolehkan, kecuali kontrol sera rendah (kontrol 1) pada partikel *IAE-silanised iron oxide* sedikit diatas batas konsentrasi.

Tabel 4. Parameter karakteristik assay pada ke tiga partikel magnetik

Parameter	Selulosa magnetik	Magnetited	IAE-silanised Iron oxide	Nilai yang diharapkan
% Bo	60,5	45,7	41,4	
% NSB	2,5	0,08	2,3	
Bo/NSB	24,2	571,3	18	
Slope	1,13	0,99	1,19	
Kisaran daerah kerja (nmol/L)	0,92->70	0,62- >70	0,95 - 50	
ED 50		1,3	2,12	
Kontrol 1 (nmol/L)	0,82	0,73	0,99	0,18 - 0,92
Kontrol 2 (nmol/L)	1,86	1,79	2,0	1,32 - 2,06
Kontrol 3 (nmol/L)	3,21	3,22	3,08	2,54 - 3,28
Berat magnetik/tabung	2,5 mg	0,0025 mg	0,05 mg	

Dilihat dari parameter karakteristik yang telah disebutkan di atas, partikel selulosa magnetik dan partikel *magnetite* mempunyai kualitas yang sama, tetapi berat partikel *magnetite* pertabung jauh lebih kecil dibandingkan selulosa magnetik dan butiran partikelnya paling halus sehingga tersuspensi lebih lama pada saat inkubasi. Prosedur imobilisasi partikel selulosa magnetik lebih rumit dan memerlukan beberapa tahapan pencucian sedangkan pada partikel *magnetite* lebih sederhana.

Dari kurva regresi pada Gambar 11 memperlihatkan bahwa kit RIA T₃ dengan pereaksi pemisah antibodi kedua-selulosa magnetik mempunyai korelasi yang baik dengan kit RIA T₃ magnetik Amersham (Tg $\alpha = 1,06$, $r = 0,987$)



Gambar 11. Korelasi antara kit RIA T₃ BATAN

KESIMPULAN

Dari penentuan titer hasil imobilisasi antibodi kedua pada ketiga partikel magnetik diketahui jumlah partikel pertabung paling sedikit adalah pada partikel *magnetite* yaitu 2,5 µg, dan partikel *magnetite* mempunyai butiran yang paling halus. Teknik imobilisasi antibodi kedua pada partikel selulosa magnetik paling rumit dibandingkan dengan teknik imobilisasi antibodi kedua pada partikel magnetik yang lainnya.

Dari hasil evaluasi parameter kontrol pada tiga jenis partikel magnetik tersebut di atas dapat ditarik kesimpulan bahwa ketiga jenis partikel magnetik mempunyai kualitas yang baik dan sebanding.

Korelasi antara kit RIA T₃ BATAN yang memakai partikel *magnetite* sebagai pendukung fasa padat dengan kit RIA T₃ Amersham menunjukkan kedua kit RIA T₃ mempunyai korelasi yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. CHARD T., "An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Biomedical", New York, 1982.
2. MERRA VENKATESH, SIVAPRASAD N., MANI R.S., IAEA-RSA Training Course in, "Radioimmunoassay and its Clinical Applications", Conducted as Radiopharmaceuticals Division Isotope Group, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Bombay-40085, India.
3. WIDE, L., "Solid Phase Radioimmunoassay", IAEA-SM-20/220.