

STUDI TEKNIK DETEKSI ENZIM DAN
RADIOISOTOP PADA IMMUNOASSAYS

M. Soewarsono

STUDI TEKNIK DETEKSI ENZIM DAN RADIOISOTOP PADA IMMUNDASSAYS *

M. Soewarsono

ABSTRAK

STUDI TEKNIK DETEKSI ENZIM DAN RADIOISOTOP PADA IMMUNDASSAY. Suatu studi komperatif membandingkan sistem deteksi enzim dengan radioisotop pada *immunoassay* berdasarkan tinjauan pustaka. Perbandingan terutama ditujukan terhadap prosedur perlakuan pipetasi dan sistem reaksi imunologik. Sejumlah perlakuan pipetasi dan deteksi dengan alat pencacah (spektrofotometer dan gamma counter) merupakan sumber error eksperimental dan error statistik pencacahan. Error-error ini akan mempengaruhi ketelitian hasil tera. Perbandingan jumlah perlakuan pipetasi pada EIA menunjukkan lebih banyak dari RIA, yaitu 9 : 6. Error statistik pencacahan pada EIA disebabkan oleh reaksi enzimatis (perubahan warna) dan efisiensi spektrofotometer, sedang pada RIA hanya berasal dari efisiensi gamma counter. Berdasarkan evaluasi *imprecision profile* standar kurva T3 menunjukkan kesepadanan antara teknik EIA dengan teknik RIA, yaitu pada rentang konsentrasi 1,0 - 8,0 nmol/l dengan CV < 10%. Konsentrasi minimum yang dapat dideteksi oleh IRMA menunjukkan lebih kecil dibandingkan dengan RIA. Perbedaan ini disebabkan reaksi imunologik pada IRMA adalah non-kompetitif, sedangkan RIA adalah reaksi kompetitif.

ABSTRACT

THE STUDY OF TECHNIQUES OF ENZYME AND RADIOISOTOPE DETECTION IN IMMUNDASSAYS. The comparative study compared the system of enzyme detection to the radioisotopes detection in immunoassay according to the literatures study. Especially the comparisons were concerned to the pipetting procedures and the system of immunologic reactions. The number of pipetting and measurements of enzyme reaction and radioactivities using spectrophotometer or gamma counter were the sources of non-counting statistics errors (experimental errors) and counting-statistics errors. Those errors were able to influence the precision of assay products. The number of pipetting procedures in EIA were bigger comparing to the RIA, e.i. 9 : 6. The counting-statistics errors in EIA were contributed by the enzyme reactions (colour reaction) and spectrophotometer efficiency, while the RIA caused by the gamma counter efficiency only. In the evaluation of imprecision profile of T3 standard curve showed the satisfactory precision of both assays at the T3 concentration between 1.0 - 8.0 nmol/l (coefficients of variation < 10 %). The minimum detectable doses of IRMA showed smaller than RIA. Differences of the minimum detectable doses of both IRMA and RIA were basically different in the system of immunologic reactions, IRMA was non-competitive reaction and RIA was competitive reaction.

* Disajikan pada Presentasi Ilmiah
Keselamatan Radiasi dan Lingkungan,
Jakarta, 18 - 19 Agustus 1993

PENDAHULUAN

Teknik *immunoassay* sebagai metode analisis kuantitatif in vitro untuk penteraan substansi biologik konsentrasi rendah makin dikenal dan sangat berguna khususnya dalam bidang Endokrinologi juga telah meluas menunjang berbagai bidang biologi lainnya. Pendeteksiannya juga telah berkembang dengan menggunakan berbagai sistem seperti radioisotop, fluoresensi, aglutinasi, presipitasi, dan enzimatik (1). Peranan radioisotop, fluoresen dan enzim adalah sebagai penanda atau *tagging* salah satu reagen (antigen atau antibodi) agar hasil *immunoassay* dapat ditera secara kuantitatif. Prinsip reaksi *immunoassay* dengan berbagai sistem deteksi pada dasarnya adalah sama, yaitu reaksi imunologik antara *Binder* dengan *Ligand*, atau antara antibodi spesifik dengan antigen menjadi ikatan kompleks BiLi atau Ag.Ab (2). Perkembangan *immunoassay* lainnya ialah dalam sistem separasi antara ikatan kompleks dengan reagen bebas seperti dengan penambahan karbon aktif, *double antibody* (D.A), polyethylene glycol (PEG) atau PEG + D.A, *coating tubes* atau partikel, dan magnetik-antibodi (3,4,5); sedang untuk peningkatan spesifisitas dan sensitivitas digunakan antibodi monoklonal (5,6).

Dari perbedaan sistem deteksi, separasi dan senyawa bertanda yang digunakan dalam *immunoassay* maka timbul berbagai nama (akronim) seperti RIA (*radioimmunoassay*) dan IRMA (*immunoradiometric assay*), FIA (*fluoroimmunoassay*), RLA

(receptor-ligand assay), VIA (viroimmunoassay), EIA (enzymeimmunoassay) atau ELISA (enzyme labbled immunosorbent assay) dan tambahan nama yang menunjukkan ciri khas sistem separasinya seperti C-A-C (coat-A-count) dan MAIA atau MAIAclone (magnetic immunoassay-monoclonal antibody), dan kadang-kadang dirangkaikan pula dengan nama pabrik (contoh AMERLEX - produksi Amersham).

Dengan berbagai nama produk immunoassay yang ditawarkan dan dengan promosi keunggulan-keunggulannya sering berdampak menimbulkan keraguan dan polemik di antara para pemakai immunoassay dan tidak jarang pula perpindahan dari laboratorium yang telah dirancang untuk metode immunoassay tertentu beralih ke metode immunoassay yang lain yang dianggap lebih unggul. Dalam keadaan seperti ini sudah pasti akan menimbulkan kerugian bagi laboratorium penyelenggara immunoassay tersebut karena dengan metode "baru" yang menjadi pilihannya berakibat perombakan rancangan laboratorium, penggantian alat-alat deteksi yang harganya sangat mahal dan penyesuaian kembali keterampilan para pelaksana yang telah terlatih baik kepada cara kerja metode "baru" ini. Setiap metode analisis in vivo dan in vitro sudah pasti akan memiliki keunggulan-keunggulan dan kelemahan-kelemahan, apalagi dengan immunoassay yang digunakan untuk mentera substansi biologik berkadar sangat rendah dalam cairan tubuh.

Dalam makalah ini akan diuraikan perbandingan immunoassay

sistem deteksi radioisotop (RIA dan IRMA) dengan *immunoassay* sistem deteksi enzim (EIA atau ELISA) karena ke dua sistem deteksi ini sering menimbulkan polemik pro dan kontra. dan perbandingan antara RIA dengan IRMA agar dapat dinilai secara objektif.

SUMBER ERROR ASSAY IN VITRO

Setiap modifikasi dalam *immunoassay* bertujuan untuk menyederhanakan perlakuan dan mempercepat mendapatkan hasil, dan peningkatan kualitas hasil penteraan yang bersumber pada peningkatan sensitivitas, spesifisitas, simplisitas dan perluasan aplikasi. Prinsip dasar semua *immunoassay in vitro* adalah sama, yaitu reaksi imunologik antara dua jenis substansi, binder (*antibody*) dan ligand (*antigen*), untuk mentera jenis-jenis substansi lain, yaitu analit (*antigen* atau *antibodi*). Sifat kimiawi analit biasanya identik dengan *ligand*, tetapi pada *assay* lain mungkin juga identik dengan *binder* atau mungkin juga ketiga jenis substansi dalam *assay* ini identik. Produk akhir atau hasil dari *assay* ialah kuantitas analit tertera.

Setiap analisis kuantitatif selalu berkaitan dengan faktor kesalahan atau *error* dan ketepatan hasil penteraan hanya dapat diterima apabila faktor *error* yang menyertainya telah diketahui dan dikendalikan (7).

Error dalam statistika dibedakan atas dua tipe, yaitu error sistematis dan error acak. Error sistematis (*bias*) ialah apabila

sumber error memberikan hasil cenderung menuju ke satu arah besaran, naik atau turun ; contoh : dalam prosedur analisis penteraan T3, akan terjadi pula respon terhadap T4, sehingga pada hasil penteraan T3 sebenarnya mengandung T4, atau sebaliknya. Error acak ialah apabila sumber error memberikan hasil turun-naik atau tidak stabil; contoh : error pemipetan reagen, disebabkan oleh pipet yang tidak pernah dikalibrasi atau error dari pelaksanaannya (human error).

Sumber Error Acak

Dalam tera *in vitro* terdapat banyak sumber error, seperti dari sistem pencacahan, pemipetan, manipulasi bahan kimia, interaksi antigen-antibodi (imunologik), waktu inkubasi, suhu lingkungan, dan sebagainya. Sumber-sumber error acak dikelompokkan menjadi dua kelompok error yaitu error-statistika pencacahan (deteksi : radioisotop atau enzim) dan error-statistika non-pencacahan atau *experimental errors*.

1. Error statistika pencacahan

Sistem deteksi radioisotop digunakan alat pencacah nuklir (gamma atau beta counter) dan sistem deteksi enzimatik digunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang tertentu. Statistika pencacahan berkaitan dengan jumlah cacah yang terkumpul (n) per satuan waktu (cacah per menit = cpm) dengan *coefisien variasi* (cv) yang diperoleh dengan rumus : $CV \text{ atau } S = \frac{100}{\sqrt{n}}\%$, misalnya

apabila $n = 15076$ (bukan rata-rata), maka $CV = 0,8\%$.

Variasi koefisien (cv) dari rata-rata pencacahan merupakan total CV termasuk pula error statistika non-pencacahandengan (simbol R), sehingga kumpulan error pada sejumlah populasi data (*replicates*) digambarkan dengan rumus : $(CV \text{ total})^2 = R^2 + S^2$ atau

$$R^2 = (CV \text{ total})^2 - S^2$$

2. Error reaksi imunologik

Seperti diketahui bahwa pada reaksi *immunoassay* terjadi proses pengikatan (*binding*) antara antibodi dengan antigen selama inkubasi sampai mencapai keseimbangan (*equilibrium*) konstan yang disebut afinitas, sedang kekekalan ikatan antibodi dengan antigen disebut aviditas.

Afinitas bertubungan dengan lamanya inkubasi dan suhu lingkungan. Lamanya inkubasi yang tidak tepat (*optimal*) dan suhu lingkungan yang berubah-ubah merupakan sumber error statistika non-pencacahan. Faktor afinitas dan aviditas merupakan sensitivitas dari *immunoassay*, sedangkan faktor aviditas merupakan spesifisitas dari antibodi yang dipengaruhi oleh kemurnian antigen, dan protein-protein identik dengan antigen dalam sampel . Reaksi ikatan antibodi dengan protein-protein identik antigen merupakan error sistematis, dan reaksi ikatan bahan separasi (D.A., PEG) dengan antigen bertanda dikenal sebagai ikatan non-spesifik (NSB). Semua peristiwa imunologik yang diuraikan di

atas merupakan sumber error acak, kelompok error statistika non-pencacahan.

3. Error kompetisi antigen bertanda

Antigen bertanda (radioisotop atau enzim) secara kimiawi dan imunologik adalah "sama" dengan antigen standar dan antigen dalam sampel yang akan ditera. Proses penandaan (*labelling*) protein antigen dengan radioisotop (yodium-125) dan enzim pada dasarnya akan terjadi inkorporasi atom-atom yodium-125 atau enzim kedalam molekul antigen. Peristiwa ini akan mengakibatkan perubahan berat molekul protein antigen, menjadi lebih berat dari antigen semula. Hal ini kemungkinan akan mempengaruhi sifat imunologiknya (efek kimiawi), juga akan terjadi perubahan muatan listrik protein antigen (efek elektrostatik) (3).

Reaksi yang terjadi pada RIA atau EIA adalah reaksi kompetisi antara antigen bertanda dengan antigen sejenis yang tidak bertanda untuk berikatan dengan antibodi (*limited reagen*). Pada peristiwa ini dipertanyakan, benarkah sama sifat imunologik ke dua antigen tersebut, bandingkan dengan IRMA. Efek kimiawi dan elektrostatik pada antigen bertanda yang mungkin mempengaruhi reaksi kompetisi adalah merupakan error statistika non-pencacahan.

4. Error reaksi enzimatis

Pada EIA atau ELISA, reaksi yang terjadi terdiri atas dua tahap, yaitu reaksi imunologik dan reaksi enzimatis sehingga mungkin akan menimbulkan dua sumber error (8,9).

Error reaksi enzimatis berkaitan dengan perubahan warna pada produk yang dihasilkan. Perubahan warna ini akan dibaca lewat spektrofotometer dengan panjang gelombang tertentu. Pada pembacaan mungkin terjadi error karena perubahan warna belum optimal atau inkubasi yang terlalu lama (perlakuan harus cepat). Serum merupakan cairan biologik yang sangat kompleks, mengandung banyak substansi aktif yang dapat mengganggu reaksi enzimatis, seperti substrat atau kofaktor termasuk pH, bahan pengawet, kofaktor enzim dan substrat enzim. Bahan-bahan pengganggu ini dapat menimbulkan error statistika non-pencacahan pada produk penteraan.

STUDI KOMPARATIF

1. Prosedur perlakuan

Pembandingan ini berdasarkan perlakuan sesuai dengan petunjuk protokol, seperti pipetasi reagen, inkubasi, reaksi yang terjadi, kecepatan kerja, dan pengaruh lingkungan. Dengan membandingkan hal-hal tersebut di atas, maka akan diperoleh jumlah sumber error yang mungkin mempengaruhi ketelitian hasil.

Model yang akan diperbandingkan dalam studi komparatif ini, yaitu tera total T_3 - RIA, CAC (DFC, 1988) dengan T_3 - ELISA, CAC (Boehringer, 1982) seperti tampak pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan perlakuan

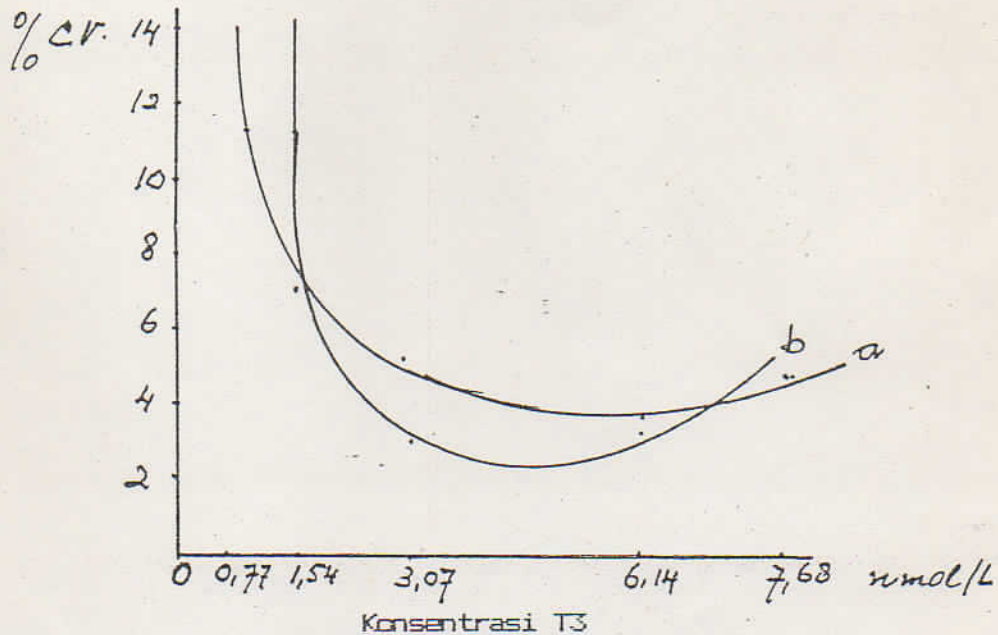
| Nb. | Perlakuan | Protokol T_3 -RIA, CAC | Protokol T_3 -ELISA, CAC |
|----------------------------|---|--------------------------|----------------------------|
| 1. | Pemipetan Std./Sampel | ya | ya |
| 2. | Pemipetan bufer : ^{125}I - T_3 atau T_3 -Enzim | ya | ya |
| 3. | Inkubasi 1 | ya | ya |
| 4. | Reaksi imunologik | ya | ya |
| 5. | Isi tube dituang atau aspirat, cuci | ya | ya |
| 6. | Pemipetan bufer - subatrat ABTS (sensitif sinar matahari) | X | ya |
| 7. | Inkubasi 2 | X | ya |
| 8. | Pencacahan : Radio - isotop/Enzim (perubahan warna) | ya | ya |
| 9. | Ketat waktu | X | ya |
| Total | | ya = 6 | ya = 9 |
| Perbandingan suber error = | | 6 | : 9 |

Jumlah "ya" menunjukkan banyaknya perlakuan yang dapat mendatangkan error sehingga akan mempengaruhi terhadap produk atau

hasil tera. Dalam perbandingan prosedur perlakuan ternyata pada EIA atau ELISA kemungkinan kontribusi error-acak lebih besar dibandingkan dengan RIA.

2. Perbandingan imprecision profile

Untuk membandingkan *imprecision profile* (i.p) RIA dengan EIA digunakan data hasil penelitian GELLERICH dan HAINDL (10), seperti tampak pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva imprecision profile RIA dan EIA

a = Imprecision profile T3-ELISA

b = Imprecision profile T3-RIA

Imprecision profile menunjukkan gambaran error-acak nilai tera sampel yang bersumber dari error stitistika pencacahan dan

error eksperimental pada sejumlah sampel. Dengan membandingkan ke dua imprecision profile maka keunggulan-keunggulan ke dua metode *immunoassay* (radioisotop dan enzim) dapat dinilai.

Pada rentang konsentrasi T3 antara 1,0 - 8,0 nmol/l diperoleh CV tera ELISA = 3,6-10,2% dan CV tera RIA = 3,0-12,7% pada rentang konsentrasi antara 0,9-7,5 nmol/l. Pendeteksian konsentrasi minimum (lebih kecil dari 1 nmol/l) T3-Elisa dan T3-RIA diperoleh CV lebih besar dari 10%, sedang pendeteksian konsentrasi maksimum (lebih besar dari 9 nmol/l) diperoleh CV lebih besar dari 12%. Nilai yang dapat diterima apabila CV lebih kecil dari 10%, yaitu terdapat pada rentang konsentrasi T3 antara 1 - 8 nmol/l.

3. Perbandingan RIA dengan IRMA

Perbandingan ditujukan pada prosedur perlakuan yang kemungkinan menjadi sumber error, dan sistem reaksi imunologik. Banyaknya pemipetan reagen kemungkinan menjadi salah-satu sumber error yang mempengaruhi hasil tera, sedang sistem reaksi imunologik menentukan sensitivitas penteraan.

3.1 Pemipetan reagen

Protokol di bawah ini menunjukkan banyaknya pemipetan selama perlakuan RIA dan IRMA.

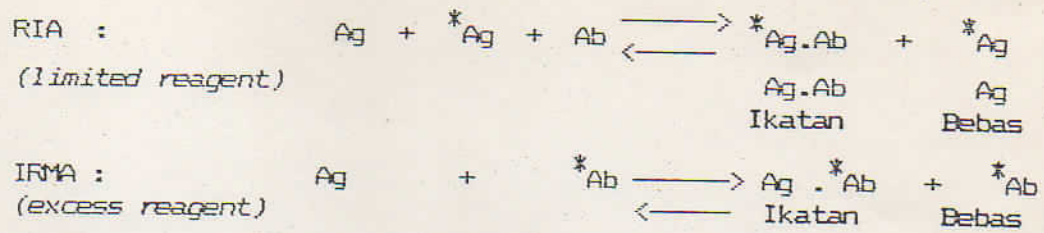
Tabel 2. Perbandingan pemipetan

| Nb. | Perlakuan | RIA | IRMA |
|--------------------------|---|----------|--------|
| 1. | Pemipetan Std./Sampel | ya | ya |
| 2. | Pemipetan : $^{125}\text{I-Ag}$ atau $^{125}\text{I-Ab}$ | ya | ya |
| 3. | Inkubasi | x | ya |
| 4. | Pemipetan antisera | ya | x |
| 5. | Inkubasi | ya | x |
| 6. | Pemipetan reagen separasi | ya | ya |
| Total | | : ya = 5 | ya = 4 |
| Perbandingan pemipetan = | | 5 | : 4 |

Jumlah pemipetan tampak hanya selisih 1, RIA=5 dan IRMA =4; sedang pada RIA/CAC, jumlah pemipetan adalah sama. Jadi kontribusi error pemipetan pada RIA dan IRMA dianggap tidak berbeda.

3.2 Sistem reaksi imunologik

Sistem reaksi RIA dan IRMA tampak sangat berbeda; sistem reaksi RIA adalah reaksi kompetisi, yaitu kompetisi antara antigen normal (Ag) dengan antigen bertanda radioisotop ($^*\text{Ag}$) untuk berikatan dengan antibodi (Ab) spesifiknya; sedang sistem reaksi IRMA adalah non-kompetisi, antigen normal dengan bebas mencari pasangannya antibodi bertanda radioisotop ($^*\text{Ab}$). Ke dua reaksi tersebut dapat digambarkan seperti di bawah ini.



Gambar 2. Bagan reaksi imunologik

Teknik IRMA ditinjau dari prosedur perlakuan lebih mudah dari teknik RIA dan sebagai metode tera *in vitro*, IRMA juga adalah lebih teliti dan lebih sensitif. Berdasarkan kemampuan deteksi, IRMA mempunyai dosis deteksi minimum lebih kecil dari RIA sehingga sangat berguna untuk tera hormon serum pasien dalam keadaan *hipo* (hypothyroidism). Untuk peningkatan spesifisitas telah dapat dibuat antibodi monoklonal.

KESIMPULAN

Berdasarkan prosedur perlakuan (pemipetan, inkubasi, reaksi enzimatik), teknik EIA atau ELISA tampak mempunyai sumber error lebih banyak dari teknik RIA atau IRMA. Berdasarkan perbandingan *imprecision profile* hasil penelitian studi kooperatif OELLERICH dan HAINDL (1980) ternyata metode EIA atau ELISA masih berpadanan dengan metode RIA. Hal ini menunjukkan metode EIA dan RIA dapat digunakan di laboratorium klinik saling menunjang, kelemahan EIA diatasi oleh RIA dan sebaliknya.

Teknik IRMA sangat unggul pada penteraan substansi cairan tubuh dengan konsentrasi rendah (lebih kecil dari satu), dan akan

lebih sensitif bila digunakan antibodi monoklonal (monospesifik), sedang RIA biasanya menggunakan antibodi poliklonal.

SARAN - SARAN

Laboratorium yang telah menggunakan metode RIA atau IRMA secara rutin hendaknya tidak mengubah pemakaian metode yang telah dikuainya dengan metode lain yang dianggap lebih unggul dan aman. Tindakan perubahan pemakaian metode sejenis sebenarnya hanya merupakan pemborosan dana dan daya.

Pada kegiatan penelitian, sayogyanya digunakan metode RIA atau IRMA karena akan menghemat waktu, kemudahan-kemudahan dalam perlakuan, dalam satu jalan perlakuan dapat ditera sejumlah besar sampel, dan pencacahan dengan alat pencacah radionuklida (gamma counter) sangat sensitif dan tidak terpengaruh oleh cahaya.

DAFTAR PUSTAKA

1. EDWARDOR, R., Immunoassay (An Introduction), William Heinemann Medical Books, London (1985).
2. RODGERS, R.P.C., Quality control and data analysis in binder-ligand assay, vol. 1, Scietific Newsletters, Inc., Anaheim, California (1981).
3. THORELL, J.I., and LARSON, J.M., Radioimmunoassay and related techniques (methodology and clinical application), Mosby Company, Saint Louis (1978).
4. DIAGNOSTIC PRODUCT CORPORATION, Total T3 Coat-A-Count, California, USA (1988).
5. DIAGNOSTIC PRODUCT CORPORATION, IRMA - Count TSH with monoclonal anti-TSH antibodies, California, USA (1989).
6. SERONO DIAGNOSTIC S.A., TSH maiac lone - IRMA, Switzerland (1989).
7. DUDLEY, R.A., Programs for data processing in radioimmunoassay using the HR-41CV Programmable Calculator, IAEA-TECDOC.252, IAEA, Vienna (1981).
8. IMMUNODIAGNOSTIC BOEHRINGER MANNHEIM, Enzymun - Test T3, Boehringer Mannheim GmbH, Germany (1982).
9. MORREN, G.E., Enzym Immunoassays, Tijdschrift van de Belgische van Laboratoriumtechnologen revue de L'Association Belge des Technologues de Laboratoire, vol. 5 - Nr.4 , Belgium (1978).

10. DELLERICH, M., HAINDL, H., and ISBERNER, I., Determination of Triiodothyronine in Serum by Enzyme and Radioimmunoassay, A comparative study, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., vol. 19, (1981) 447-451.