

OPTIMALISASI PEMBUATAN KIT IRMA CA-125

**Agus Ariyanto, Siti Darwati, Gina Mondrida, Fitri Yunita, Puji Widayati,
Sri Setiyowati, Sulaiman, V. Yulianti, Triningsih,**

Pusat Pengembangan Radioisotop dan Radiofarmaka, BATAN, Serpong

ABSTRAK

OPTIMALISASI PEMBUATAN KIT IRMA CA-125. Telah dilakukan penelitian optimalisasi pembuatan kit IRMA CA-125 yang meliputi pembuatan perunut monoklonal anti CA-125 bertanda ^{125}I dan pembuatan "coated tube". Pada pembuatan perunut digunakan 2 macam oksidator yang divariasikan jumlahnya, yaitu kloramin-T dan N-bromosuksinimid. Optimalisasi pembuatan "coated tube" dilakukan dengan memvariasikan volume larutan "coating", pengaruh pencucian, pengaruh penambahan BSA, pengaruh bufer pelarut dan uji pemasangan monoklonal anti CA-125. Hasil percobaan menunjukkan bahwa oksidator kloramin-T dapat digunakan untuk pembuatan perunut monoklonal anti CA-125 dengan rendemen cukup tinggi yaitu 96,5% dan kemurnian radiokimia 93,2%. Jumlah oksidator yang optimal adalah 10 μg . Pembuatan "coated tube" untuk monoklonal anti CA-125 dengan menggunakan volume larutan "coating" yang bervariasi antara 300 μL sampai dengan 600 μL tidak menunjukkan perbedaan nyata pada nilai %NSB dan %B/T. Proses pencucian "coated tube" juga tidak memberikan perbedaan nyata pada nilai %NSB dan %B/T, tetapi pemblokkan "coated tube" menggunakan BSA 0,1 % memberikan pengaruh nyata pada %B/T walaupun tidak berpengaruh terhadap nilai %NSB. Penggunaan bufer bikarbonat untuk pembuatan "coated tube" memberikan hasil yang lebih baik dari pada bufer fosfat. Untuk pemasangan monoklonal anti CA-125 diketahui bahwa pasangan monoklonal anti CA-125 M37203M sebagai perunut dan monoklonal anti CA-125 M86924M sebagai "coating solution" memberikan hasil yang optimal..

Kata kunci : Kit IRMA, Monoklonal anti CA-125, Perunut

ABSTRACT

OPTIMALIZATION FOR PREPARATION OF CA-125 IRMA-KIT. Optimalization on the preparation of CA-125 IRMA-kit has been studied involving preparation of ^{125}I -labeled monoclonal anti CA-125 as a tracer and preparation of coated tubes. Chloramine-T and N-bromosuccinimide were used as oxidators by varying them in their quantity. Optimalization on preparation of coated tube was carried out by variation in volume of coating solution, effect of washing, addition of BSA 0.1%, buffer and pairing test for the monoclonal anti CA-125. The use of chloramine-T as oxidator for ^{125}I -labeling of monoclonal anti CA-15 was found to give labeling-yield of about 96.5% and radiochemical purity of 93.2%. Optimum amount of the oxidizing agent was found to be 10 μg . There were not any significant differences in utilization of coating solution volume ranging at 300 to 600 μL for preparing monoclonal

anti CA-125 coated tube. The non specific binding (NSB) and the %B/T values were found to be unaffected by washing step, while a blocking of coated tube using of BSA 0.1% decreased the %B/T value. Utilization of bicarbonate buffer for the preparation of coated tube was found to be more satisfactory than that of phosphate buffer. It was shown that the monoclonal anti CA-125 M37203M used for tracer being paired with monoclonal anti CA-125 M86924M used for coating solution gave an optimal result based on the values of %NSB and %B/T.

Key words : IRMA-Kit, Monoclonal anti CA-125, Tracer

PENDAHULUAN

Cancer Antigen 125 (CA-125) adalah sejenis glikoprotein yang bersifat antigenic sehingga dapat bereaksi dengan monoklonal antigen. CA-125 ini merupakan "tumor marker" yang dapat digunakan secara klinik untuk memonitor pasien yang mempunyai penyakit kanker ovarium [1]. Pada kondisi normal CA-125 dapat ditemukan di dalam cairan amnion sebagai derivat jaringan epitel "fetal coelemic". Antigen ini ditemukan pula pada jaringan wanita dewasa seperti jaringan epitel "tuba fallopien", endometrium, endocervix pleura, dan rongga perut [2].

Peningkatan level atau konsentrasi CA-125 di dalam darah sangat berhubungan dengan adanya perkembangan kanker pada pasien. Proses "gynecological" seperti inflamasi pada pelvic, endometriosis dan menstruasi juga memberikan peningkatan adanya CA-125 [2]. Kandungan CA-125 di dalam serum darah pasien yang normal adalah lebih rendah dari 35 U/mL.

Di Amerika kanker ovarium merupakan penyebab kematian yang nomor 5 dan merupakan penyebab kematian paling tinggi pada kanker-kanker "gynecologic". Di Indonesia berdasarkan data dari Yayasan Kanker Indonesia tahun 1991 dinyatakan bahwa kanker ovarium ini menduduki peringkat ke 6 terbanyak [4].

Selain untuk pemeriksaan kanker ovarium, CA-125 dapat juga digunakan untuk pemeriksaan kanker-kanker sbb :

- kanker leher rahim
- kanker corpus
- kanker cervik
- kanker endometrium.

Teknik pemeriksaan CA-125 umumnya dilakukan dengan ultra-sonografi secara langsung atau melalui teknik "in-vitro assay" dengan menentukan kadar atau levelnya pada serum darah pasien [5]. Dewasa ini telah banyak pereaksi atau kit yang beredar dipasaran baik yang non radioaktif maupun yang radioaktif untuk pemeriksaan serum secara in-vitro.

Sebagian besar pereaksi tersebut merupakan produk import yang harganya cukup mahal, sehingga pemeriksaan/pendeteksian dini kanker tersebut sulit untuk dilaksanakan bagi pasien berpenghasilan rendah.

Dalam makalah ini dilaporkan optimalisasi pembuatan kit IRMA CA-15 dalam upaya pereaksi dapat dibuat di dalam negeri agar terjangkau oleh masyarakat luas.

BAHAN DAN TATA KERJA

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Monoklonal anti-CA-125 (Biosdesign International USA), Human CA-125 antigen calibrator grade (Biosdesign International) USA, Bovine serum albumin (Sigma), normal mouse serum (CIAE, China), Kit IRMA CA-125 (CIAE China), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dari E Merck, Kolom PD-10 dari Pharmacia. Na^{125}I didapat dari Nordion Canada dan P2RR Batan, NaHCO_3 dari Sigma, Tabung dasar bintang dari NUNC.

Peralatan yang digunakan adalah : Pencacah Gamma (Nucleus), Centrifuge (CS-15 Beckman), inkubator (Eyela) , berbagai macam ukuran pipet eppendorf, vortex.

Tata Kerja

Penandaan Monoklonal anti CA-125 dengan ^{125}I menggunakan metode kloramin-T

Ke dalam tabung dimasukkan 10 μL larutan monoklonal anti-CA 125 (10 μg larutan monoklonal anti CA-125 dalam 10 μL larutan bufer fosfat salin 0,025 M pH 7,4) dan ditambahkan 20 μL bufer fosfat 0,2 M pH 7,4, dan 450 μCi larutan Na^{125}I , kemudian ditambahkan kloramin-T sesuai dengan variasi 5, 10 , 20 μg . Selanjutnya campuran dikocok selama 2 menit menggunakan vorteks, lalu ditambahkan 10 μL larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ dalam 1 mL bufer fosfat salin 0,25 M pH 7,4). Selanjutnya ditambahkan 50 μL larutan KI 50%. Campuran reaksi dibiarkan selama 2 menit. Hasil penandaan dimurnikan dengan menggunakan kolom PD-10 yang telah dikondisikan dengan bufer fosfat 0,01 M pH 7,4 dan dijenuhkan dengan 1 mL larutan BSA 10%. Kolom PD-10 kemudian dielusi dengan bufer fosfat 0,01 M pH 7,4.

Sebanyak 500 μL eluat ditampung per fraksi dengan tabung reaksi. Eluat dalam tabung kemudian dicacah dengan pencacah gamma.

Rendemen, kemurnian radiokimia dan aktivitas spesifik ditentukan dengan menggunakan rumus berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Na}^{125}\text{I} \text{ dalam fraksi antibodi}}{\text{Total radioaktif yang digunakan}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Kemurnian Radiokimia} = \frac{\text{Na}^{125}\text{I} \text{ fraksi antibodi}}{\text{Radioaktivitas dalam produk}} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{Hasil rendemen} \times \text{Total radioaktivitas yang digunakan}}{\text{Massa dari antibodi yang digunakan}}$$

Penandaan Monoklonal anti CA-125 dengan ^{125}I menggunakan metode N-Bromosuksinimid.

Ke dalam tabung dimasukkan 10 μL anti-CA 125 (lihat Takerja 1) lalu ditambahkan 20 μL larutan bufer fosfat 0,2 M pH 7,4 dan 450 μCi larutan Na^{125}I , kemudian ditambahkan 10 μL larutan N-Bromosuksinimid dengan variasi kandungan N-Bromosuksinimid 5, 10, 20 μg . Campuran divortek selama 120 detik, lalu ke dalam larutan campuran ditambahkan 200 μL larutan bufer fosfat salin 0,01 M pH 7,4. Kemudian ditambahkan 50 μL larutan KI 50%. Campuran reaksi dibiarkan selama 2 menit. Hasil penandaan dimurnikan dengan memasukkan campuran reaksi ke dalam kolom PD-10 yang telah dikondisikan dengan larutan bufer fosfat 0,01 M pH 7,4 dan dijenuhkan dengan 1 mL larutan BSA 10%. Kolom kemudian dielusi dengan larutan bufer fosfat 0,01 M pH 7,4. Sebanyak 500 μL eluat ditampung per fraksi dalam tabung reaksi. Eluat dalam tabung dicacah dengan pencacah gamma. Rendemen, kemurnian radiokimia dan aktifitas spesifik ditentukan seperti disebutkan pada Tata kerja 1 di atas.

Pembuatan “coated tube”

Optimalisasi pembuatan “coated tube” dilakukan dengan variasi volume larutan “coating” yang telah ditentukan titeranya (300, 400, 500, 600 μL). Larutan “coating” dimasukkan ke dalam tabung dan diinkubasikan semalam pada temperatur 4°C . Pada tahap pencucian dilakukan pencucian dengan aqua demin. Tabung hasil pencucian dengan aqua demin sebagian diblok dengan larutan BSA (0,1% BSA dalam 0,05 M bufer fosfat salin pH 7,4) dan sebagian lain tanpa diblok. Kemudian tabung-tabung tersebut diinkubasikan semalam pada temperatur 4°C . Tabung kemudian dicuci dengan 300 μL larutan 0,05 M bufer fosfat salin pH 7,4 sebanyak 2 kali. Pengaruh jumlah volume larutan “coating”, pencucian dan penambahan larutan BSA 1% diuji secara statistik menggunakan uji t. Pengaruh larutan bufer terhadap larutan “coating” juga diamati dengan menggunakan 2 macam bufer, yaitu bufer fosfat 0,002 M pH 7,4 dan bufer bikarbonat 0,01 M pH 8,5.

Pembuatan standar CA-125.

Konsentrasi larutan standar CA-125 yang disiapkan adalah 0, 25, 50, 100, 200 dan 500 mIU/mL. Pembuatan larutan standar CA-125 menggunakan Human CA-125 calibrator grade (Biodesign USA) yang dilarutkan dengan Bovine Serum Albumin 1% dalam larutan 0,05 M bufer fosfat salin pH 7,4 dengan perbandingan volume seperti dinyatakan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan volume pada pembuatan larutan standar CA-125.

No	Konsentrasi larutan standar CA-125 (mIU/mL)	Volume Larutan induk Human CA-125 (μL)	Volume Larutan BSA 1% (μL)
1	500	2500	2500
2	250	1000	3000
3	100	800	7200
4	50	400	7600
5	25	80	7920
6	0	0	8000

HASIL DAN PEMBAHASAN

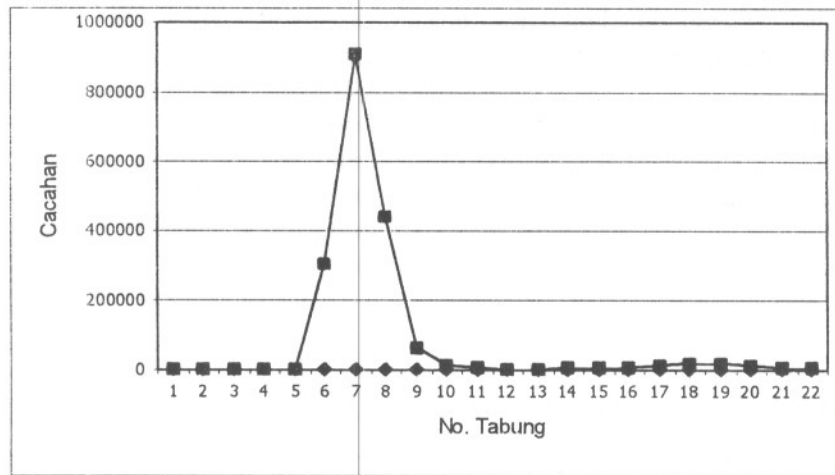
Dari hasil penandaan diketahui bahwa jumlah oksidator berpengaruh terhadap hasil rendemen penandaan (Tabel 2 dan Tabel 3). Penggunaan 10 µg oksidator kloramin-T mampu meningkatkan hasil rendemen penandaan cukup tinggi, yaitu sampai 96.5 % (lihat Gambar 1). Oksidator N-bromosuksinimid memberikan rendemen penandaan yang lebih rendah dari pada oksidator kloramin-T seperti ditunjukkan pada Tabel 2 dan Tabel 3. Penggunaan 5 µg oksidator N-bromosuksinimid memberikan persentase hasil rendemen yang maksimum (35,9 %), tetapi lebih rendah jika dibandingkan dengan oksidator kloramin-T. Hal ini disebabkan karena kloramin-T merupakan oksidator kuat sehingga dapat mengoksidasi $^{125}\text{I}^-$ menjadi $^{125}\text{I}^+$ secara optimal.

Tabel 2. Penggunaan oksidator kloramin-T untuk penandaan monoklonal Anti CA-125.

No	Jumlah oksidator (µg)	Rendemen (%)	Kemurnian radiokimia (%)
1.	5	60,0	93,6
2.	10	96,5	93,2
3.	20	88,8	97,2

Tabel 3. Pengaruh jumlah oksidator N-bromosuksinimid untuk penandaan monoklonal anti CA-125

No	Jumlah oksidator (µg)	Rendemen (%)	Kemurnian radiokimia (%)
1.	5	35,9	94,2
2.	10	3,4	90,0
3.	20	1,2	80,4



Gambar 1. Fraksi hasil penandaan monoklonal anti CA-125 dengan ^{125}I .
(Rendemen penandaan dihitung dengan membandingkan cacahan fraksi hasil penandaan terhadap total cacahan seluruh fraksi).

Tabel 4 menunjukkan bahwa nilai %NSB dan %B/T tidak berbeda nyata dengan perlakuan pencucian terhadap “coated tube” meskipun volume larutan “coating” bervariasi antara 300 μL sampai 600 μL . Dari uji t didapatkan nilai t dari perhitungan yaitu 0,5 untuk %NSB dan 0,17 untuk %B/T lebih kecil dari t di tabel ($t_{0,05} = 2,45$, $t_{0,01} = 3,71$). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa jumlah volume larutan “coating” dan pencucian dalam proses pembuatan “coated tube” tidak berpengaruh terhadap nilai %NSB maupun %B/T.

Tabel 4. Pengaruh jumlah volume larutan “coating” yang digunakan dan pencucian pada pembuatan “coated tube” monoklonal anti CA-125.

Volume Larutan “Coating” (μL)	Dengan pencucian		Tanpa pencucian	
	%NSB	%B/T	%NSB	%B/T
300	0,28	10,01	0,25	9,92
400	0,28	9,80	0,27	9,75
500	0,34	9,56	0,40	9,63
600	0,28	9,62	0,34	9,65

Tabel 5 memperlihatkan bahwa penambahan larutan BSA 1% tidak berpengaruh secara nyata terhadap nilai %NSB, ditunjukkan secara uji t bahwa nilai t terhitung (1,447) lebih rendah dari $t_{0,05} = 2,45$ atau $t_{0,01} = 3,71$. Sedangkan untuk %B/T ternyata berpengaruh, terlihat bahwa % B/T pada penambahan larutan BSA 1% lebih rendah (rata-rata 9,75 %) dibandingkan dengan tanpa penambahan BSA 1% (rata-rata 12,80 %). Hal ini terjadi karena proses pencucian sebelum penambahan BSA 1% kemungkinan ada monoklonal anti CA-125 yang terbawa sehingga menurunkan nilai %B/T. Secara uji t juga didapat dibuktikan bahwa harga t terhitung (16,8) lebih tinggi dari pada harga $t_{0,05} = 2,45$ atau $t_{0,01} = 3,71$

Tabel 5. Pengaruh penambahan larutan 1 % (BSA) terhadap %NSB dan % B/T

Volume (μ L)	BSA 1 %		Tanpa BSA 1%	
	% NSB	% B/T	% NSB	% B/T
300	0,28	10,01	0,30	13,01
400	0,28	9,80	0,44	12,52
500	0,34	9,56	0,26	12,53
600	0,28	9,62	0,35	13,12

Dari Tabel 6 dapat ditunjukkan bahwa penggunaan 2 macam larutan bufer, yaitu bufer fosfat 0,002 M dan bufer bikarbonat 0,01 M tidak mempengaruhi secara nyata nilai %NSB yang dihasilkan. Tetapi untuk nilai %B/T, ternyata bufer bikarbonat memberikan nilai % BT yang lebih tinggi (16,93%) dari pada bufer fosfat (10,29 %). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa penggunaan bufer bikarbonat lebih baik dari pada bufer fosfat.

Tabel 6. Pengaruh jenis bufer yang digunakan sebagai pelarut monoklonal anti CA-125 untuk "coated tube".

Jenis larutan bufer	%NSB	%B/T
Bufer fosfat 0,002 M	0,17	10,29
Bufer bikarbonat 0,01 M	0,15	16,93

Penggunaan monoklonal antibodi untuk pereaksi kit IRMA memerlukan penelusuran jenis monoklonal yang mempunyai “binding site” yang cocok satu sama lain sehingga dapat memberikan nilai % NSB yang rendah dan nilai % B/T yang tinggi. Pada penelitian ini digunakan hanya 2 jenis monoklonal anti CA-125 masing-masing M37203M dan M86924M yang diperoleh dari Biodesign International Co. Tabel 7 memperlihatkan bahwa pasangan monoklonal M37203M sebagai perunut dan monoklonal M86924M sebagai “coated tube” merupakan pasangan yang paling sesuai karena dapat memberikan nilai %NSB yang paling rendah (0,21 %) dan nilai %B/T yang paling tinggi (26,11 %).

Tabel 7. Pengaruh pasangan monoklonal anti CA-125 terhadap nilai %NSB dan %B/T.

Pasangan monoklonal antibodi		%NSB	%B/T
Perunut	“Coated tube”		
M37203M	M86924M	0,21	26,11
M37203M	M37203M	0,32	21,89
M86924M	M37203M	0,62	16,16

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa oksidator kloramin-T dalam jumlah optimum sebesar 10 µg dapat digunakan sebagai oksidator untuk menandai monoklonal anti CA-125 menggunakan ¹²⁵I dengan rendemen penandaan mencapai 96,5% dan kemurnian radiokimia hasil penandaan sebesar 93,2 %. Penggunaan larutan “coating” dengan rentang volume 300 µL sampai 600 µL tidak memberikan perbedaan secara nyata. Perlakuan pencucian pada proses pembuatan “coated tube” tidak perlu dilakukan, begitu juga tahapan “blocking” dengan penambahan BSA 1%. Pasangan monoklonal anti CA-125 M37203M dan M86924M memberikan hasil optimal bila M37203M digunakan sebagai perunut dan M86924M sebagai “coated tube”. Untuk pelarut monoklonal pada proses “coating”, bufer bikarbonat 0,01 M lebih baik dari pada bufer fosfat 0,002 M.

DAFTAR PUSTAKA

1. A. SCHARL, G. CROMBACH, M. VIERCHEM, A. BOLTE, "The Use of CA-125 as a Tumor Marker for Adenocarcinomas of endocervix, endometrium and fallopian Tube", **Tumor Diagnostic and Theraphie**, **10** (1989) 17 – 20.
2. M.D. VIJAY NATH, "Ovarium Tumor Markers: Cancer Antigen 125: PersonalMD.com, Medical Contributor, 24 October 2000.
3. S.H. LANDIS, T. MURRAY, S. BOLDEN, et al, "Cancer Statistics. 1999", **Cancer Journal for Clinicians**, **49[1]** (1999) 8 - 31,.
4. DIRJEN. PELAYANAN MEDIK DEPARTEMEN KESEHATAN R.I. , BADAN REGISTRASI KANKER IKATAN AHLI PATOLOGI INDONESIA, YAYASAN KANKER INDONESIA, "Kanker di Indonesia Tahun 1991", Data Histopatologik (1991).
5. R. DAHER, "Cancer Antigen 125 (CA 125) in Serum By Microparticle Enzym Immunoassay (MEIA)", **Laboratory Medicine** **25[3]** (1994) 146 –147.