
OPTIMASI RANCANGAN ASSAY KIT IRMA CA-125

P. Widayati*, A. Ariyanto*, Z. Abidin**, F. Yunita*, Sutari*

*PRR-BATAN, Kawasan PUSPIPTEK Serpong

**Sekolah Tinggi Teknologi Nuklir (STTN)

ABSTRAK

OPTIMASI RANCANGAN ASSAY KIT IRMA CA-125. Carbohydrate Antigen-125 (CA-125) adalah antibodi yang bereaksi spesifik dengan monoklonal CA-125. Antigen CA-125 dapat digunakan sebagai tumor marker dan penentuan kadarnya dapat dilakukan dengan teknik Immunoradiometric assay (IRMA). Pusat Pengembangan Radiosotop dan Radiofarmaka (P2RR-BATAN) telah membuat kit IRMA CA-125 untuk memenuhi kebutuhan dalam negeri. Telah dilakukan optimasi rancangan assay kit IRMA CA-125 buatan PRR tersebut, meliputi penetapan jumlah cacahan perunut, volume perunut, volume standar, waktu inkubasi dan suhu inkubasi yang terbaik sehingga diperoleh nilai %B/T dan % NSB yang optimum dan dapat digunakan sebagai acuan setiap kali assay. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah cacahan perunut terbaik adalah ± 100000 cpm, volume perunut terbaik adalah 50 μ L, volume standar terbaik adalah 50 μ L, waktu inkubasi terbaik adalah 16 jam dan suhu inkubasi terbaik adalah 25°C (suhu kamar). Penelitian optimasi assay kit IRMA CA-125 menyimpulkan bahwa dengan menggunakan komposisi pereaksi dan kondisi reaksi optimum dihasilkan nilai %B/T = 19,05% dan NSB = 0,53%.

Kata kunci: *Radioimmunoassay, Immunoradiometric assay, tumor marker, CA-125*

ABSTRACT

ASSAY DESIGN OPTIMIZATION OF CA-125 IRMA KIT. Monoclonal Antibody CA-125 is an antibody against the Carbohydrate Antigen (CA-125). The CA-125 antigen can be used as a tumour marker, and its concentration can be determined by the Immunoradiometric assay (IRMA) method. The center for Radioisotopes and Radiopharmaceuticals (BATAN) has prepared the CA-125 IRMA kit for domestic use. This report discuss the assay design optimization of the above mentioned CA-125 IRMA kit, covering determination of total count of tracer, tracer volume, standart volume, optimum incubation time and temperature, that will be used in daily assay. Investigation showed that the optimum total count of tracer was approx ± 100.000 cpm, optimization tracer volume was 50 μ L, optimum standard volume was 50 μ L, and the optimum incubation time and temperature were 16 hours and 25 °C respectively. It can be concluded that the optimum reagents composition and reaction conditions can produce %B/T value of 19.05% and NSB value of 0.53%.

Key words: *Radioimmunoassay, Immunoradiometric assay, tumor marker, CA-125*

PENDAHULUAN

Data dari Yayasan Kanker Indonesia[1,2] menunjukkan bahwa kanker ovarium menduduki peringkat ke enam terbanyak dari jenis kanker *gynecology*. Teknik pemeriksaan kanker leher rahim, *ovarium*, kanker *corpus*, kanker *cervik* dan kanker *endometriosis* secara langsung dapat dilakukan dengan ultrasonografi. Teknik lain yang banyak dilakukan adalah dengan *in-vitro assay*, yaitu dengan menentukan kadar tumor marker CA-125 dalam serum darah pasien yang diduga mengidap kanker ovarium[3,10]. Pengukuran kadar CA-125 yang terdapat dalam serum darah pasien dapat digunakan untuk menentukan efektifitas terapi kanker. Di dalam serum darah pasien yang normal ditemukan kadar CA-125 tidak lebih dari 35 U/mL [4].

Carbohydrate Antigen-125 (CA-125) adalah sejenis glikoprotein antigenik yang terbentuk akibat perubahan metabolisme sel. Karena sifatnya yang antigenik maka CA-125 dapat bereaksi dengan monoklonal antibody CA-125. Antigen CA-125 ini dapat menjadi *tumor marker* yang digunakan secara klinik untuk memonitor pasien yang mempunyai penyakit kanker ovarium. *Tumor marker* merupakan suatu senyawa yang terjadi akibat perubahan metabolisme dari sel yang tertransformasi yang dapat dikenali secara histologis dalam jaringan kanker (*cellular tumor marker*) atau dalam cairan tubuh (*humoral tumor marker*). Dengan demikian *tumor marker* secara kimia dapat ditentukan dengan teknik *immunoradiometric assay (IRMA)* [5].

Teknik *IRMA* merupakan salah satu teknik *imunoassay* yang menggunakan radioisotop sebagai perunut agar mudah dideteksi. Teknik ini sangat cocok digunakan dalam penentuan *tumor marker* dalam serum yang mempunyai matriks yang kompleks dan kadarnya kecil serta sangat bervariasi pada pasien normal dan pasien kanker [6]. Teknik *assay* ini didasarkan pada reaksi antara antigen (*Ag, tumor marker*) yang terdapat pada cuplikan atau standar (*tumor marker*) dengan antibodi bertanda (*Ab**) yang ditambahkan dalam jumlah berlebih membentuk kompleks antigen-antibodi (*Ab-Ag-Ab**). Dengan demikian, semakin tinggi kadar *tumor marker (Ag)* yang ada, maka kompleks antigen-antibodi yang terbentuk juga semakin tinggi sehingga akan memberikan cacahan radioaktivitas yang tinggi. Pada *IRMA* reaksi imunologi yang terjadi non kompetitif karena pereaksi (*Ab* dan *Ab**) yang digunakan selalu dalam keadaan berlebih. Teknik *IRMA* pada umumnya menggunakan antibodi monoklonal yang jauh lebih spesifik sehingga teknik *IRMA* mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan teknik *RIA* [5].

Kadar *tumor marker* secara kuantitatif dapat dihitung dari kurva kalibrasi standar hubungan antara kadar antigen dan besarnya radioaktivitas yang terikat pada media [5]. Dewasa ini telah banyak kit *IRMA CA-125* tersedia dipasaran sebagai produk impor, namun harganya relatif cukup mahal. Pusat Pengembangan

Radioisotop dan Radiofarmaka (P2RR) telah membuat kit IRMA CA-125 ini secara lokal. Sebelum digunakan secara klinis di rumah sakit, kit IRMA CA-125 tersebut perlu melewati tahap pengujian antara lain optimasi pembuatan komponen kit dan optimasi rancangan *assay* [7,8]. Optimasi pembuatan komponen kit telah dilakukan peneliti terdahulu [1].

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan prosedur *assay* yang optimal, sehingga pereaksi yang digunakan mempunyai unjuk kerja yang baik, sehingga data pengujian yang dihasilkan dapat menunjukkan kadar yang sebenarnya. Penelitian ini mencakup pembuatan larutan perunut (monoklonal antibodi CA-125 bertanda radioisotop ^{125}I), pembuatan larutan standar CA-125, pembuatan tabung bersalut monoklonal antibodi CA-125 sesuai prosedur [1] dan kemudian dilakukan optimasi rancangan *assay*.

Hipotesis penelitian ini adalah rancangan *assay* kit IRMA CA-125 dapat dioptimalkan melalui penentuan jumlah perunut Ab* (antibodi bertanda radioisotop ^{125}I), volume perunut, volume standar, waktu inkubasi dan suhu inkubasi yang optimum sehingga dapat diperoleh nilai aktivitas imunologi (%B/T) > 10% dan *nonspecific binding (NSB)* < 1%.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan adalah monoklonal anti CA-125 (Biodesign International USA), CA-125 antigen *calibrator grade* (Biodesign International USA), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan Na_2HPO_4 dari Merck, kolom PD-10 dari Pharmacia, Na^{125}I dari Nordion Canada, tabung star (NUNC Swedia), *Bovine Serum Albumin (BSA)* Sigma. Sedangkan alat yang digunakan adalah pencacah *gamma (model 600 Gammatec II The Nucleus dan model Mini Assay tipe G 20)*, Gamma Management System (GMS), berbagai ukuran pipet *Eppendorf* beserta tipnya, pH meter (*Fisher Accumet model 810*), pengaduk model *Vortex*, inkubator (*Soft Incubator SL 1 - 600*), timbangan Analitik (*Mettler AE 160*).

Penentuan komposisi dan kondisi *assay* yang optimum.

Prosedur *assay* yang digunakan sama dengan prosedur *assay* dalam pembuatan kurva kalibrasi, namun larutan standar yang digunakan 0 dan 500 mIU/mL dengan beberapa variasi. Variasi jumlah cacahan perunut adalah $\pm 50000\text{cpm}$, $\pm 100000\text{cpm}$, $\pm 150000\text{cpm}$ dan $\pm 200000\text{cpm}$. Variasi volume larutan perunut adalah 50 μL , 100 μL , 150 μL dan 200 μL dan variasi volume larutan standar CA-125 adalah 50 μL , 100 μL , 150 μL dan 200 μL . Sedangkan kondisi *assay* yang optimum yaitu variasi waktu inkubasi adalah 2 jam, 4 jam dan 16 jam dan variasi suhu inkubasi adalah 4°C, 25°C dan 37°C.

Hasil pengukuran digunakan untuk menghitung %NSB dan %B/T Dari setiap seri variasi komposisi dan kondisi dipilih %B/T tertinggi dan %NSB terendah yang selanjutnya untuk digunakan dalam seri variasi komposisi dan kondisi berikutnya.

Analisis Data

Penentuan *Non Spesific Binding* (%NSB) dan *Maximum Binding* (%B/T) dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

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

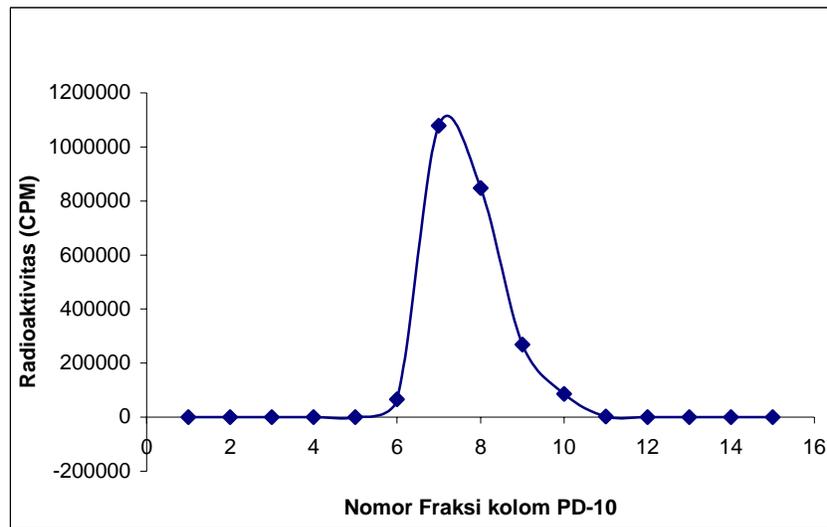
$$\text{Non Spesific Binding (\%NSB)} = \frac{\text{Cacahan NSB-BG}}{\text{Cacahan Total - BG}} \times 100\%$$

BG : cacah latar belakang

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan larutan perunut (monoklonal anti CA-125 bertanda ¹²⁵I)

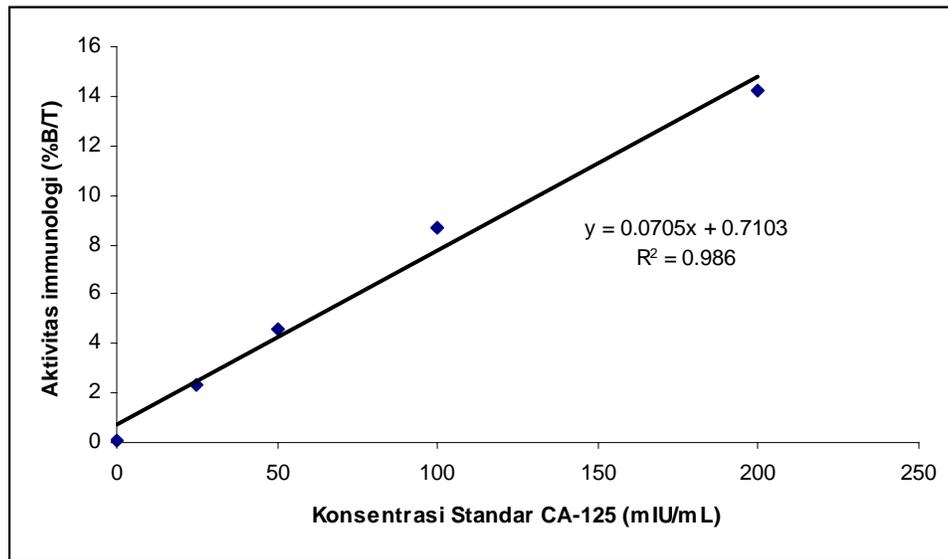
Penandaan monoklonal anti CA-125 dengan radioisotop ¹²⁵I menghasilkan rendemen penandaan sebesar 93,66%, yaitu perbandingan radioaktivitas (fraksi kolom PD-10 nomor 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 11) terhadap total cacahan seluruh fraksi (nomor 1 s/d 15). Gambar 1 uji imunologi pada fraksi ke 7 hasil penandaan menunjukkan aktivitas imunologi sebesar 21,39% (%B/T) untuk standar 500 mIU/mL. Fraksi nomor 7 selanjutnya digunakan untuk *assay*.



Gambar 1. Kromatogram fraksi hasil penandaan monoklonal anti CA-125 dengan ^{125}I (volume fraksi $\pm 500\mu\text{L}$) metode kloramine-T

Kurva kalibrasi larutan standar CA-125

Pembuatan dan pengujian larutan standar CA-125 dapat dibuat kurva kalibrasi standar hubungan konsentrasi standar CA-125 (mIU/mL) dengan %B/T (Gambar 2), yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi standar CA-125, semakin tinggi pula %B/T. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin tinggi kurva kalibrasi standar yang didapat adalah baik, karena diperoleh persamaan garis linier $Y = 0,0705X + 0,7103$ dan koefisien korelasi mendekati 1 ($R = 0,9930$) dan daerah kerja yang luas yaitu dari 0 mIU/mL sampai 200 mIU/mL.



Gambar 2. Kurva hubungan konsentrasi standar CA-125 (mIU/mL) dengan %B/T

Pengujian tabung CT

Pengujian tabung CT yang dibuat menunjukkan aktivitas imunologi untuk standar 0 mIU/mL sebesar 0,1% dan untuk larutan standar 500 mIU/mL sebesar 21,39% pada Tabel 1.

Tabel 1. Uji imunologi berbagai larutan standar CA-125

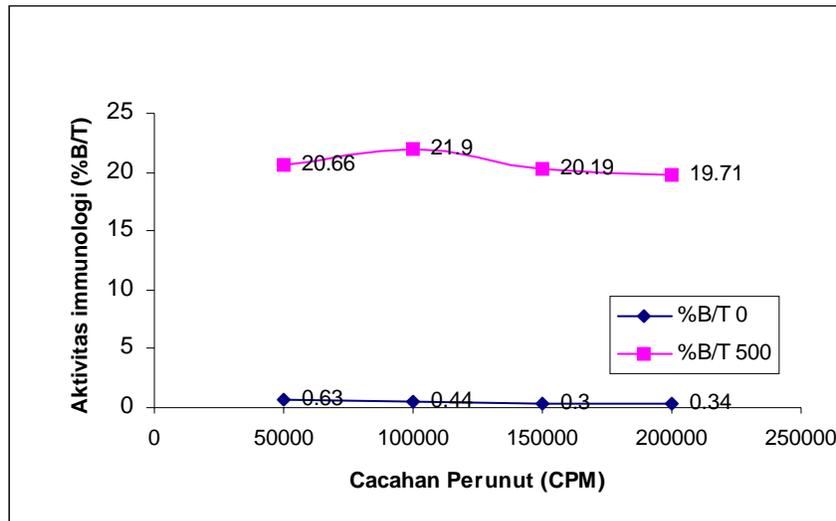
Konsentrasi standar CA-125 (mIU/mL)	Aktivitas Imunologi (%B/T)
0	0,10
25	2,30
50	4,61
100	8,71
200	14,25
500	21,39

Nilai aktivitas imunologi untuk larutan standar nol adalah nilai NSB, sedangkan untuk larutan standar 500 mIU/mL merupakan ikatan maksimum (*maximum binding*) pada sistem *assay*. Dengan demikian tabung CT yang dibuat memenuhi syarat untuk digunakan yaitu *Non Specific Binding* (%NSB) < 2 % dan aktivitas immonologi (%B/T) > 10 % [9].

Optimasi Rancangan Assay Kit IRMA CA 125

Variasi jumlah cacahan perunut

Hasil *assay* pada percobaan dengan variasi jumlah radioaktivitas cacahan perunut terhadap aktivitas imunologi dapat dilihat pada Gambar 3, yang menunjukkan ada pengaruh cacahan radioaktivitas perunut (cpm) terhadap aktivitas imunologi (%B/T). Pada cacahan radioaktivitas perunut ± 100000 cpm didapat hasil aktivitas imunologi tertinggi sebesar 21,90% untuk standar 500mIU/mL. Hal ini menunjukkan bahwa dengan cacahan radioaktivitas perunut ± 100000 cpm diperoleh pengikatan antigen-antibodi (Ab-Ag-Ab*) yang paling tinggi, sehingga merupakan cacahan radioaktivitas perunut optimum dan NSB untuk standar 0 mIU/mL adalah 0,44%. *Assay* menggunakan cacahan radioaktivitas perunut yang lain (± 50000 cpm, ± 150000 cpm dan ± 200000 cpm) tidak memberikan hasil aktivitas imunologi yang lebih tinggi. Makin besar cacahan radioaktivitas perunut, kesalahan cacahan semakin kecil.

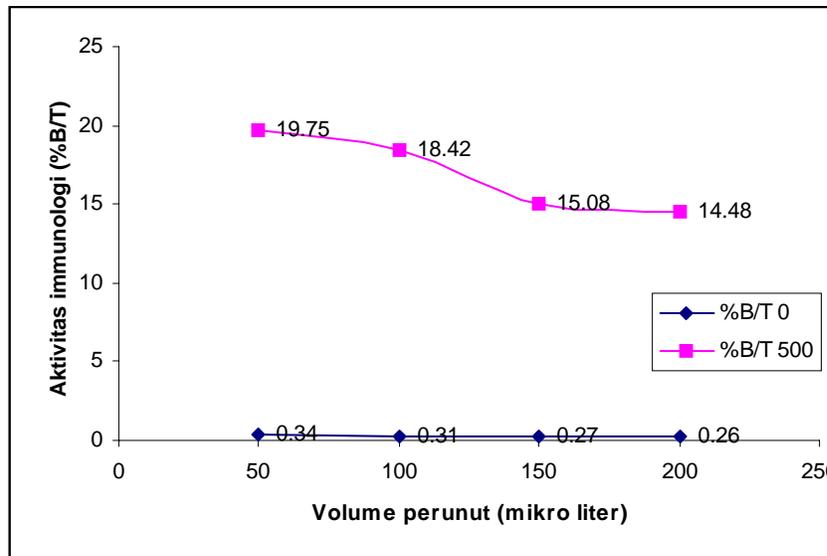


Gambar 3. Pengaruh cacahan radioaktivitas perunut terhadap aktivitas imunologi (%B/T)

Variasi volume perunut

Hasil percobaan variasi volume perunut menggunakan cacahan radioaktivitas perunut ± 100000 cpm dapat dilihat Gambar 4. Dari gambar tersebut tampak bahwa volume perunut mempengaruhi aktivitas imunologi yang dihasilkan. Semakin kecil volume perunut, maka aktivitas imunologi yang didapat semakin besar. Hal ini disebabkan aktivitas perunut yang semakin pekat, sehingga kemungkinan terjadinya ikatan antibodi bertanda (Ab*) terhadap antigen

(Ag) semakin besar. Volume perunut yang optimum adalah 50 μL , yang ditunjukkan oleh aktivitas immunologi (%B/T) paling tinggi, yaitu 19,75% untuk standar 500 mIU/mL dan %NSB yaitu 0,34% untuk standar 0 mIU/mL. Volume perunut yang lain (100 μL , 150 μL dan 200 μL) menghasilkan aktivitas immunologi yang rendah kemungkinan disebabkan oleh semakin kecil terjadinya ikatan Ab^* dengan Ag, sehingga mengakibatkan %B/T yang dihasilkan semakin kecil pula.

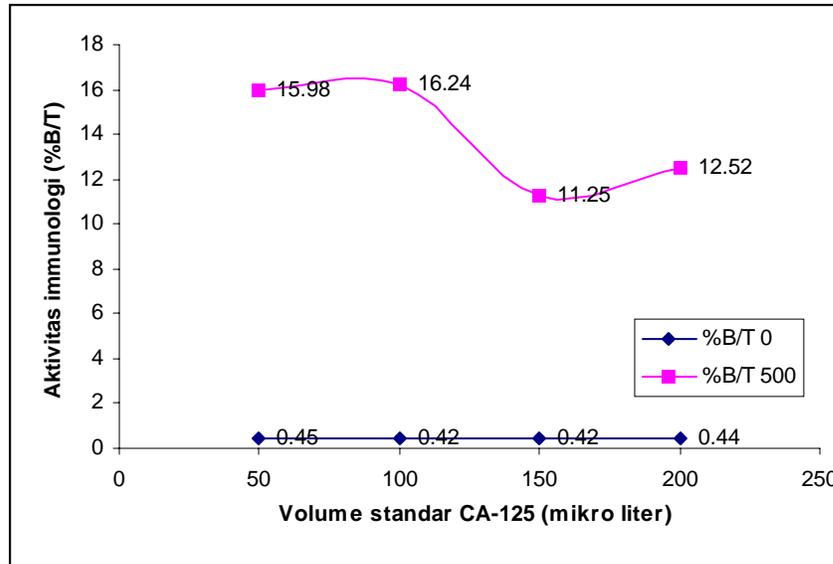


Gambar 4. Pengaruh volume perunut terhadap aktivitas immunologi (% B/T) yang dihasilkan

Variasi volume standar CA-125

Hasil *assay* pada percobaan variasi volume standar CA-125 menggunakan cacahan radioaktivitas perunut optimum ± 100000 cpm dan volume perunut optimum sebesar 50 μL didapatkan hasil aktivitas immunologi seperti pada Gambar 5. Gambar tersebut menunjukkan bahwa pemakaian larutan standar sebesar 100 μL untuk 500 mIU/mL didapatkan %B/T tertinggi (16,24%) dan untuk standar 0 mIU/mL sebesar 0,42%, sedangkan penggunaan volume standar 50 μL menghasilkan aktivitas immunologi (%B/T) sebesar 15,98 % untuk standar 500 mIU/mL dan %NSB sebesar 0,45% untuk standar 0 mIU/mL. Namun perbedaan hasil % B/T tersebut tidak begitu nyata, sehingga untuk menghemat penggunaan larutan standar, maka selanjutnya digunakan volume standar 50 μL . Penggunaan volume standar yang lain (150 μL dan 200 μL) menghasilkan aktivitas immunologi yang lebih kecil. Hal ini disebabkan karena volume standar mempengaruhi kecepatan reaksi untuk mencapai kesetimbangan. Semakin besar volume standar

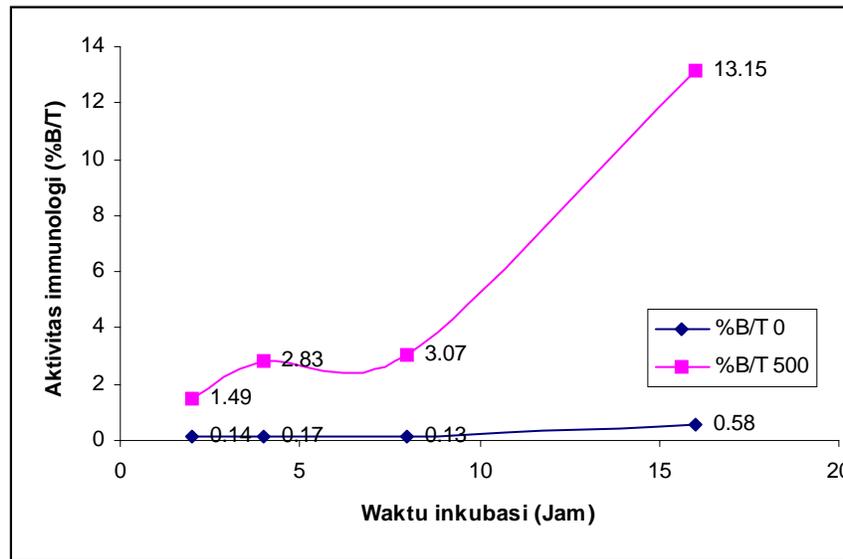
yang digunakan, maka semakin lama kesetimbangan reaksi terjadi sehingga ikatan Ab* dengan Ag semakin kecil yang pada akhirnya berdampak pada aktivitas immunology yang semakin kecil.



Gambar 5. Pengaruh volume standar terhadap aktivitas immunologi yang dihasilkan

Variasi waktu inkubasi

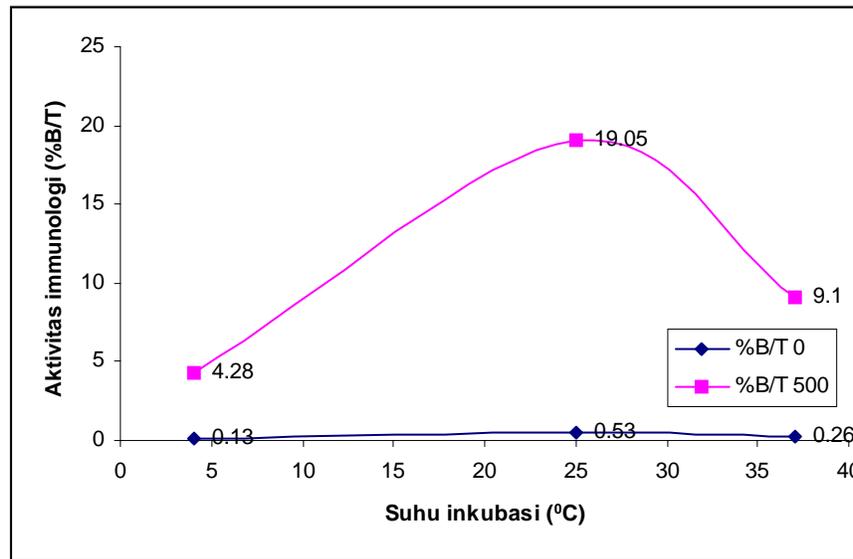
Hasil *assay* pada percobaan variasi waktu inkubasi menggunakan jumlah cacahan perunut ± 100000 cpm, volume perunut 50 μL dan volume standar CA-125 50 μL dapat dilihat pada Gambar 6. Gambar tersebut menunjukkan bahwa aktivitas immunologi tertinggi dihasilkan dengan waktu inkubasi semalam, yaitu aktivitas immunologi (% B/T) sebesar 13,15% untuk standar 500 mIU/mL dan %NSB sebesar 0,53% untuk standar 0 mIU/mL. Sedangkan waktu inkubasi yang lain (2 jam, 4 jam dan 2 step) tidak memberikan hasil aktivitas immunologi yang lebih tinggi. Waktu yang diperlukan untuk kesempurnaan suatu reaksi antigen-antibodi dipengaruhi oleh aviditas Ab, kadar antigen dan besarnya molekul antigen yang ditentukan. Semakin tinggi aviditas Ab maka semakin pendek waktu inkubasi yang diperlukan, dan semakin tinggi kadar antigen yang ditentukan (standar/ sampel) maka semakin pendek waktu inkubasi yang dibutuhkan. Urutan penambahan pereaksi *assay* tidak berpengaruh pada hasil aktivitas immunology [5].



Gambar 6. Pengaruh waktu inkubasi terhadap hasil aktivitas immunologi

Variasi waktu inkubasi

Hasil *assay* pada percobaan variasi waktu inkubasi menggunakan jumlah cacahan perunut ± 100000 cpm, volume perunut 50 μL dan volume standar CA-125 50 μL dapat dilihat pada Gambar 6. Gambar tersebut menunjukkan bahwa aktivitas immunologi tertinggi dihasilkan dengan waktu inkubasi semalam, yaitu aktivitas immunologi (% B/T) sebesar 13,15% untuk standar 500 mIU/mL dan %NSB sebesar 0,53% untuk standar 0 mIU/mL. Sedangkan waktu inkubasi yang lain (2 jam, 4 jam dan 2 step) tidak memberikan hasil aktivitas immunologi yang lebih tinggi. Waktu yang diperlukan untuk kesempurnaan suatu reaksi antigen-antibodi dipengaruhi oleh aviditas Ab, kadar antigen dan besarnya molekul antigen yang ditentukan. Semakin tinggi aviditas Ab maka semakin pendek waktu inkubasi yang diperlukan, dan semakin tinggi kadar antigen yang ditentukan (standar/ sampel) maka semakin pendek waktu inkubasi yang dibutuhkan. Urutan penambahan pereaksi *assay* tidak berpengaruh pada hasil aktivitas immunology [5].



Gambar 7. Pengaruh suhu terhadap aktivitas imunologi yang dihasilkan

Variasi suhu inkubasi

Hasil assay pada percobaan variasi suhu inkubasi menggunakan jumlah cacahan perunut ± 100000 cpm, volume perunut 50 μL , volume standar CA-125 50 μL dan waktu inkubasi semalam dapat dilihat pada Gambar 7. Gambar tersebut menunjukkan bahwa suhu inkubasi yang optimum adalah 25°C yang menghasilkan aktivitas imunologi (%B/T) tertinggi yaitu 19,05 % untuk larutan standar 500 mIU/mL, sedangkan %NSB larutan standar 0 mIU/mL memberikan aktivitas imunologi 0,53%. Inkubasi pada suhu 4 °C ternyata menghasilkan %B/T untuk larutan standar 500 mIU/mL terlalu rendah, yaitu 4,28% dan %NSB untuk larutan standar 0 mIU/mL adalah 0,13%. Hasil ini diduga karena suhu inkubasi terlalu rendah, sehingga ikatan Ab* dengan Ag belum terjadi. Inkubasi pada suhu 37 °C untuk larutan standar 500 mIU/mL menghasilkan %B/T 9,10% dan %NSB untuk larutan standar 0 mIU/mL adalah 0,26%. Hasil ini disebabkan oleh suhu inkubasi terlalu tinggi, sehingga terjadi disosiasi yang merusak zat yang dianalisis, yang mengakibatkan penurunan %B/T. Peningkatan suhu inkubasi sebenarnya diharapkan mempercepat kesetimbangan reaksi. Namun jika suhu terlalu tinggi, maka disosiasi akan lebih dominan terjadi dibandingkan asosiasi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Assay kit IRMA CA-125 optimum dapat dicapai menggunakan jumlah cacahan perunut ± 100000 cpm, volume perunut 50 μ L, volume standar CA-125 50 μ L, waktu inkubasi 16 jam dan suhu inkubasi 25 °C . Komposisi dan kondisi ini menghasilkan aktivitas imunologi sebesar 19,05% (%B/T) dan %NSB sebesar 0,53%.

Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan validasi dan uji klinis, untuk mendapatkan kit IRMA CA-125 yang mempunyai kepekaan (sensitivitas), ketelitian (presisi) dan parameter *assay* yang baik, yang pada akhirnya dapat digunakan di rumah sakit.

DAFTAR PUSTAKA

1. A. ARIYANTO, S. DARWATI, G. MONDRIDA, *at al.*. Optimalisasi Pembuatan Kit IRMA CA-125, *Jurnal Radioisotop dan Radiofarmaka*, P2RR-BATAN, Serpong, vol. 6, No 2, (2003) hal 1-10
2. DIRJEN PELAYANAN MEDIK DEPARTEMEN KESEHATAN R I.. Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi, Yayasan Kanker Indonesia, Kanker di Indonesia, Data Hispatologik (1991)
3. C. MIRALLES, M. OREA, P. ESPANA, *at al.*. Cancer Antigen 125 Associated With Multiple Benign and Malignant Pathologies. *Annalys of Surgical Oncology*, 10 (2), (2003) hal 150-154
4. Protokol *Assay* dari kit IRMA CA-125 dari CIAE (kit komersial)
5. WAYAN R S, SUKIYATI DJ., Immunoradiometricassay (IRMA) Dalam Deteksi Dan Pemantauan Kanker, *Jurnal Radioisotop Dan Radiofarmaka*, P2RR-BATAN, Serpong, vol. 3, No 1, (2000) hal 55-70.
6. E.M. DAVELAAR, VAN KAMP GJ, VERSRAETEN AND KENEMANS P. Comparation of seven immunoassays for the quantification of CA-125 antigen in serum *Clinical Chemistry* No 44:7, (1998) hal 1417 – 1422
7. DARLINA, WAYAN R.S, SUKIYATI DJ, FITRI Y., *Disain Assay Validasi Kit RIA LH*. Hasil Penelitian Pusat Produksi Radioisotop, No. 2, (1996) hal 69-82
8. J. THORELL, “Introduction The Information Problem in RIA Design”, Pergamon Press France, (1982) hal 1-8
9. Protokol IAEA
10. M. FARID AZIS,. Pencegahan dan Deteksi Dini Kanker *Ovarium*, Simposium Pencegahan Dan Deteksi Kanker, Hotel Acacia, Jakarta (2004)