

PREPARASI PEREAKSI KIT IMMUNORADIOMETRICASSAY FREE PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN UNTUK DETEKSI KANKER PROSTAT

PREPARATION KIT REAGAN OF IMMUNORADIOMETRICASSAY FREE PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN KIT REAGEN FOR PROSTATE CANCER DETECTION

Puji Widayati^{*}, Gina Mondrida, Sri Setiyowati, Agus Ariyanto, V. Yulianti Susilo, Wening Lestari

Pusat Radiosotop dan Radiofarmaka-BATAN,
Kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan, Banten Indonesia
Email: pujiw@batan.go.id

Diterima: 19 Agustus 2013, Direvisi: 8 Agustus 2013, Disetujui: 20 September 2013

ABSTRAK

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. Peningkatan kadar PSA dapat disebabkan oleh kanker prostat atau pembesaran prostat jinak (*Benign Prostatic Hyperplasia*, BPH). PSA dalam darah ditemukan dalam keadaan bebas (*free PSA*) dan sebagian besar diikat oleh protein (*complexed-PSA*, *c-PSA*). Pengukuran kadar PSA yang terdapat dalam darah dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya dengan metode *immunoradiometricassay* (IRMA) ataupun metode ELISA. Metode IRMA merupakan salah satu teknik *immunoassay* yang menggunakan radionuklida ^{125}I sebagai peruntuk, sehingga cuplikan dalam jumlah kecil dapat dideteksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan pereaksi kit PSA yang meliputi peruntuk PSA bertanda ^{125}I , *coated tube* PSA dan standar PSA yang memenuhi persyaratan kit sehingga selanjutnya dapat dilakukan optimasi *design assay*, yang pada akhirnya pereaksi kit PSA dapat digunakan untuk deteksi dini kanker prostat. Telah dilakukan penandaan MAb PSA menggunakan ^{125}I dengan waktu reaksi selama 90 detik, jumlah MAb PSA yang digunakan adalah 75

μgram dan aktivitas Na^{125}I sebesar 1000 μCi , penyiapan *coated Tube* PSA dengan larutan dapar Na_2CO_3 0,05M, pH:9,6 dengan volume 250 μL , standar PSA dengan dapar fosfat 0,025 M pH 7,4 mengandung BSA 5% dan 0,1 % NaN_3 , dan menghasilkan NSB dan B/T masing-masing sebesar 1,25% dan 14,12% yang memenuhi persyaratan kit.

Kata kunci : Kanker prostat, PSA, IRMA, NSB, Ikatan maksimum

ABSTRACT

Prostate Specific Antigen (PSA) is a glycoprotein with a molecular weight of approximately 34,000 daltons serine protease secreted exclusively by prostatic epithelial cells that lining acini and prostate gland. Increased of PSA levels can be caused by prostate cancer or benign prostate enlargement (*benign prostatic hyperplasia*, BPH). PSA in the blood was found in the free condition (*free PSA*) and most of the bound protein (*complexed-PSA*, *c-PSA*). Measuring levels of PSA was found in the blood can be done by several methods such as by immunoradiometricassay (IRMA) methods or ELISA methods. IRMA method is one of immunoassay techniques using radionuclides of ^{125}I as a tracer, so the sample in small

quantity can be detected. The purpose of this study was obtained PSA reagent kit that includes ^{125}I labeled PSA as a tracer, PSA coated tube and PSA standard that requirements of the kit, then it can be optimized assay design, that eventually PSA reagent kit can be used for early detection of prostate cancer. It has been done labeling of Mab PSA using ^{125}I with reaction time was 90 seconds, amount of PSA MAb was 75 μgram and the activity of Na^{125}I was 1000 μCi . Preparation of PSA coated tube using 0.05 M Na_2CO_3 solution, at pH: 9.6 with volume was 250 mL, standard PSA with 0.025 M phosphate buffer at pH 7.4 containing 5% BSA and 0.1% Na_3N , and resulting at 1,25% and 14,12% respectively of NSB and B/T that requirement of the kit.

Keywords : Prostate cancer, PSA, IRMA, NSB, Maximum Binding

PENDAHULUAN

Kanker prostat merupakan kejadian kanker yang terjadi pada pria dan penyebab kematian kedua di Amerika Serikat dan ketiga di dunia. Kanker prostat adalah suatu tumor yang terdiri dari sel-sel kelenjar prostat⁽¹⁾. Tumor biasanya tumbuh perlahan dan tetap terbatas pada kelenjar selama bertahun-tahun, pada tahap ini keberadaan tumor hanya sedikit menimbulkan gejala atau bahkan tidak ada gejala-gejala atau kelainan pada pemeriksaan fisik. Ketika tumor berlanjut dapat menyebar keluar dari prostat ke dalam jaringan-jaringan sekelilingnya (penyebaran lokal). Lebih dari itu, kanker dapat menyebar (bermetastasis) ke seluruh bagian tubuh, seperti tulang, paru-paru, dan hati⁽²⁾. Pada tahap awal kanker prostat tidak

memiliki tanda dan gejala. Pada tahap lanjut tanda dan gejala kanker prostat antara lain : bermasalah ketika buang air kecil, berkurangnya kuantitas urin, urin yang mengandung darah, darah pada air mani, Bengkak pada kaki, ketidaknyamanan pada area pinggul dan nyeri tulang⁽²⁾. Pencegahan kanker prostat dapat dilakukan dengan deteksi dini agar penyakit yang lebih parah dapat dihindari. *Prostate Specific Antigen* (PSA) dapat dipengaruhi oleh perubahan kelenjar prostat, misalnya *Digital Rectal Examination* (DRE). Setiap pria berusia di atas 50 tahun dianjurkan melakukan pemeriksaan PSA total dan DRE setiap setahun sekali, tetapi apabila ada keluarga yang menderita kanker prostat, skrining dianjurkan sejak usia 40 tahun⁽³⁾.

Prostate Specific Antigen adalah glikoprotein dengan berat molekul \pm 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⁽⁴⁾. 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^(2,3,6,7).

Pengukuran kadar PSA dalam darah dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya metode *immunoradiometricassay* (IRMA) ataupun metode ELISA. Metode IRMA merupakan salah satu teknik *immunoassay* yang menggunakan radionuklida ¹²⁵I sebagai peruntut sehingga cuplikan dalam jumlah kecil dapat dideteksi. Teknik ini sangat cocok digunakan untuk penentuan *tumor marker* dalam serum yang mempunyai matriks yang kompleks 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⁽⁵⁾.

Kanker prostat paling banyak diderita oleh penduduk Amerika Serikat, sedangkan di Eropa lebih sedikit dari Amerika Serikat, tetapi lebih banyak di Asia Selatan dan Timur. Kanker prostat paling sering berkembang pada pria yang berumur lebih dari 50 tahun. Untuk angka kejadian di Indonesia sering pada pria berusia diatas 40 tahun dan kejadiannya terus meningkat hingga mencapai puncaknya pada usia 80 tahun⁽⁹⁾.

Penyebab spesifik dari kanker prostat belum pasti diketahui. Seorang pria yang beresiko terkena kanker prostat berhubungan dengan usia, genetik, ras, pola makan, gaya hidup, paparan logam Cadmium⁽²⁾ dan obat-obatan serta tingkat stres yang tinggi. Faktor risiko utama adalah usia. Kanker prostat sedikit terjadi pada pria berumur kurang dari 45 tahun, tetapi bisa bertambah kemungkinannya dengan penambahan umur, umur rata-rata didiagnosis adalah 70 tahun⁽²⁾. Pria yang didiagnosa kanker prostat lebih dari 65% berusia 65 tahun ke atas dan 90% kematian yang diakibatkan oleh kanker prostat berusia diatas 65 tahun⁽⁹⁾.

Pengaruh genetik terhadap perkembangan kanker prostat dapat dilihat dari adanya peningkatan kejadian kanker prostat pada ras tertentu, pria kembar identik dan pria dengan

gen tertentu. Penelitian di Amerika menunjukkan bahwa kanker prostat lebih sering menyerang pria kulit hitam daripada kulit putih atau pria Spanyol dan lebih mematikan jika menyerang pria kulit hitam. Pria yang mempunyai kakak atau ayah dengan kanker prostat mempunyai kemungkinan dua kali lipat menderita kanker prostat. Penelitian di Skandinavia pada pria kembar menyatakan bahwa 40% risiko kanker prostat dapat dijelaskan dengan faktor bawaan. Namun, bukan hanya gen tunggal yang menyebabkan kanker prostat, banyak gen-gen berbeda yang berpengaruh. Dua gen (BRCA1 dan BRCA2) yang merupakan faktor risiko penting untuk kanker ovarium dan kanker payudara pada wanita juga berperan untuk kanker prostat⁽¹⁰⁾.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan pereaksi kit PSA yang meliputi perunut PSA bertanda ^{125}I , *coated tube* PSA dan standar PSA yang memenuhi persyaratan kit, dapat dilakukan optimasi *design assay* dan pada akhirnya pereaksi kit PSA dapat digunakan untuk deteksi dini kanker prostat melalui penentuan kadar PSA dalam darah.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Untuk pembuatan perunut bahan yang digunakan adalah monoklonal antibodi PSA jenis M86806M dan untuk pembuatan *coated tube* (CT) PSA digunakan monoklonal anti

PSA jenis M66280M, sedangkan untuk pembuatan standar PSA digunakan *calibrator grade* jenis A01238H, Na^{125}I , chloramine-T, dapar Tris 0,05 M pH 7,8; dapar Na_2CO_3 0,05M pH 9,6; dapar NaHCO_3 0,05M pH 8,0; dapar fosfat 0,1M pH 7,4 dan dapar karbonat bikarbonat 0,05M pH 9,6; *Bovine Serum Albumine (BSA)* dan bahan kimia lainnya.

Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pencacah *gamma* (*Gamma Management System*, GMS), Gamma Mini Assay, mikro pipet, alat pengaduk (*multimix* dan *vortek*) dan alat elektroforesa serta alat shaker.

Metoda

Optimasi pembuatan perunut PSA

Penandaan PSA dengan menggunakan MAb jenis M86806M dilakukan dengan memvariasikan waktu reaksi, jumlah MAb dan jumlah Na^{125}I yang digunakan. Sejumlah 25 μg /8,5 μL larutan MAb PSA didalam tabung iodinasi ditambahkan 5 μL dapar fosfat 0,25 M pH 7,4 dan 2 μL Na^{125}I (aktivitas \pm 250 μCi), kemudian ditambahkan 5 μL *Chloramine-T* (0,5 mg dalam 1 mL dapar fosfat 0,25 M pH 7,4). Selanjutnya campuran diaduk selama satu menit dengan menggunakan alat vortex. Kemudian ditambahkan 10 μL larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0,5 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ dalam 1 mL dapar fosfat 0,25 M pH 7,4) dan 100 μL campuran KI dalam BSA (10

mg KI dan 3 mg BSA yang dilarutkan dalam dapar fosfat 0,25 M pH 7,4). Selanjutnya campuran diaduk menggunakan alat vortex selama satu menit. Hasil penandaan dimurnikan dengan menggunakan kolom sephadex G-25 superfine yang telah dikondisikan dengan dapar fosfat 0,05 M pH 7,4 dan dijenuhkan dengan 1 mL larutan BSA 5%. Produk monoklonal anti PSA bertanda ^{125}I (selanjutnya disebut perunut) dielusi dari kolom sephadex G-25 superfine dengan larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,4 dan fraksi eluat ditampung per fraksi dalam tabung reaksi

masing-masing sebanyak 500 μL eluat per fraksi sehingga diperoleh 25 fraksi. Tiap fraksi eluat diukur aktivitasnya dengan alat pencacah Gamma Mini Assay. Fraksi dengan aktivitas terbesar diuji kemurnian radiokimianya menggunakan fasa diam kertas Whatman 1 dan fasa gerak dapar barbital 0,05 M PH 8,6 dengan sistem elektroforesa selama 1 jam, 300 volt, 500 mA. Untuk menghitung rendemen penandaan menggunakan persamaan 1, sedangkan untuk menghitung kemurnian radiokimia menggunakan persamaan 2.

$$\text{Rendemen Pemurnian} = \frac{\text{A}}{\text{B}} \times 100 \quad \dots \quad (1)$$

Keterangan:

A : Radioaktivitas ^{125}I dalam fraksi antibodi

B: Radioaktif awal yang digunakan

$$\text{Kemurnian Radiokimia} = \frac{\text{C}}{\text{D}} \times 100\% \quad \dots \quad (2)$$

Keterangan:

C: Radioaktivitas bercak ^{125}I pada KLT

D: Radioaktivitas dalam bercak produk pada KLT

Optimasi pembuatan tabung bersalut (coated tube) monoklonal antibodi PSA

Pembuatan *coated tube* dilakukan dengan memvariasikan larutan *coating* yang digunakan (dapar Tris 0,05M pH 7,8, dapar Na_2CO_3 0,05M pH 9,6, dapar NaHCO_3 0,05M pH 8,0, dapar Karbonat bikarbonat 0,05M pH 7,4 dan dapar fosfat 0,1M pH 7,4) dan volume

coating(100, 150, 200, 250 dan 500 μL). MAb PSA jenis M66280M. Sebanyak 250 μL larutan *coating* dimasukkan ke dalam tabung dan diinkubasikan satu malam pada temperatur kamar (25°C). Pada tahap pencucian dilakukan dengan dapar masing-masing yang mengandung Tween 20 0,05% sebanyak 500 μL . Tabung hasil pencucian di *blocking* dengan

dapar masing-masing yang mengandung BSA 8% dan 0,05% NaN₃ sebanyak 500 µL lalu diinkubasikan satu malam pada temperatur kamar (25°C). Kemudian tabung dicuci dengan masing-masing dapar yang mengandung Tween 20 0,05% sebanyak 500 µL satu kali, selanjutnya dikeringkan selama 8 jam.

Pembuatan larutan standar PSA

Konsentrasi larutan standar PSA yang disiapkan adalah 0, 8, 16, 40, 80 dan 100 ng/mL. Pembuatan larutan standar PSA menggunakan Human PSA *calibrator grade* (Biodesign, USA) sebanyak 18 µL yang dilarutkan dengan 20000 µL dapar fosfat 0,025 M pH 7,4 dan mengandung BSA 5% dan 0,1% NaN₃ sebagai larutan induk dengan perbandingan volume seperti pada **Tabel 1**.

Pengujian Penentuan PSA I-¹²⁵

Dua belas tabung reaksi polistiren bersalut antibodi PSA (*coted tube*, CT) diberi nomor urut (1,2 3, dan seterusnya). Sebanyak 50 µL larutan standar PSA 0, 8, 16, 40, 80 dan 100 ng/mL ditambahkan ke masing-masing tabung CT secara berurutan selanjutnya ditambahkan 100 µL larutan perunut PSA-I-¹²⁵ dengan aktivitas ≈ 100.000 cpm, kemudian dihomogenkan dengan alat *vortex* lalu diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruangan. Cairan dibuang dan tabung CT dicuci dengan 500 µL dapar pencuci sebanyak satu kali, kemudian didekantasi dan dikeringkan. Radioaktivitas yang tertinggal di dalam tabung diukur dengan alat pencacah *Gamma Management System* (GMS) selama satu menit.

Tabel 1. Perbandingan volume pada pembuatan larutan standar PSA.

No.	Konsentrasi larutan standar PSA (ng/mL)	Volume larutan induk Human PSA (µL)	Volume larutan dapar fosfat 0,025 M pH 7,4 yang mengandung BSA 5% dan NaN ₃ 0,1% (µL)
1	0	10000	0
2	8	80	9920
3	16	160	9840
4	40	400	9600
5	80	800	9200
6	100	1000	10000

Dalam perhitungan *Non Spesific Binding* (%NSB) digunakan persamaan 3 sedangkan perhitungan *Maximum Binding* (%MB) ditentukan dengan rumus 4., sebagai berikut :

$$\% \text{ Non Spesific Binding (NSB)} = \frac{(E-BG)}{(G-BG)} \times 100 \quad \dots \quad (3)$$

Keterangan:

E: Cacahan NSB

G: Cacahan Total

BG: Background

$$\% \text{ Maximum Binding} (B/T) = \frac{(H-BG)}{(I-BG)} \times 100 \quad \dots \dots \dots \quad (4)$$

Keterangan:

H: Cacahan fasa terikat

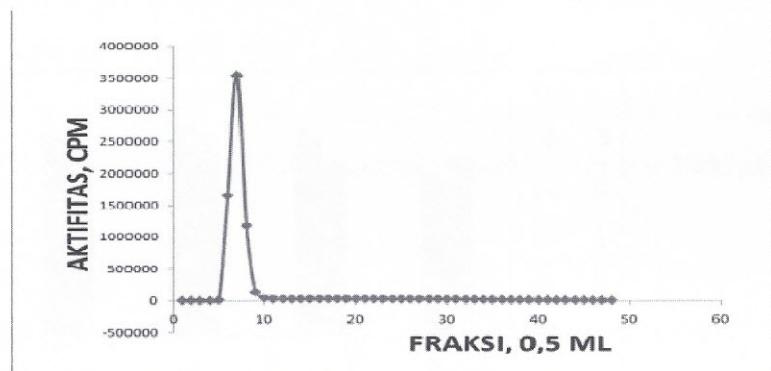
I: Cacahan total

HASIL DAN PEMBAHASAN

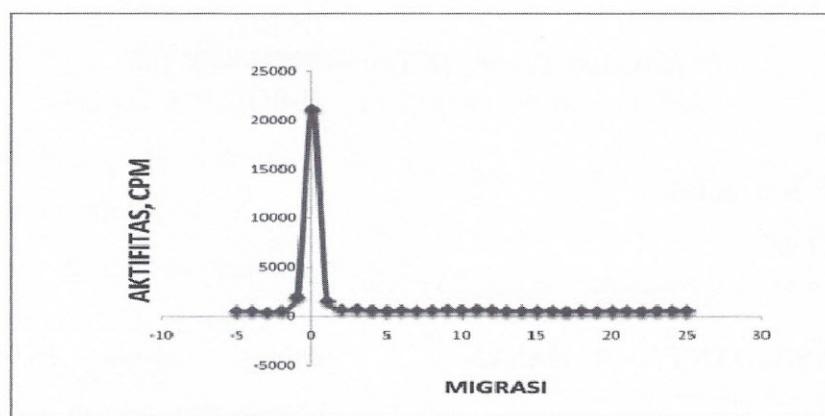
Optimasi pembuatan perunut PSA-¹²⁵I

Optimasi pembuatan perunut PSA-¹²⁵I dilakukan dengan memvariasikan lama waktu reaksi, jumlah MAb PSA dan aktivitas Na¹²⁵I yang digunakan. Dengan variasi waktu antara 30 sampai 120 detik pada reaksi MAb PSA dengan Na¹²⁵I diperoleh waktu reaksi optimum pada 90 detik yang memberikan rendemen pemurnian tertinggi sebesar 82,95% (Gambar 1) dan kemurnian radiokimia perunut PSA

tertinggi sebesar 86,90% (Gambar 2) dibandingkan dengan waktu reaksi 30, 60 dan 120 detik. Dengan waktu reaksi selama 30 detik diperoleh rendemen pemurnian sebesar 74,58% dan kemurnian radiokimia sebesar 68,17% selanjutnya untuk lama waktu reaksi 60 detik diperoleh rendemen pemurnian sebesar 73,22% dan kemurnian radiokimia sebesar 86,87% serta untuk lama waktu reaksi 120 detik diperoleh rendemen pemurnian sebesar 83,15% dan kemurnian radiokimia sebesar 82,40% seperti pada Gambar 3.



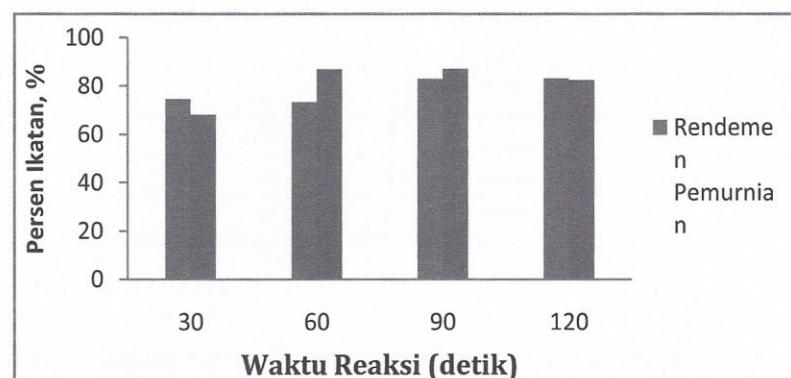
Gambar 1. Radiokromatogram hasil penandaan MAb PSA M86806M dengan Na¹²⁵I menggunakan kolom sephadex G-50 superfine dengan pengelusi dapar fosfat 0,05M pH 7,4 yang memberikan rendemen pemurnian sebesar 82,95%.



Gambar 2. Radiokromatogram PSA-¹²⁵I dengan menggunakan fasa diam kertas whatman 1 dan fasa gerak dapar barbital 0,05M pH 8,6 dengan sistem elektroforesa selama 1 jam, 300 volt, kemurnian 86,90%

Pada Gambar 3 menunjukkan bahwa dengan lama waktu reaksi antara MAb PSA dengan Na¹²⁵I 30 dan 60 detik memberikan hasil rendemen pemurnian yang tidak berbeda tetapi hasil kemurnian radiokimia terlihat adanya perbedaan yang nyata sedangkan dengan lama waktu reaksi 90 detik diperoleh rendemen dan kemurnian radiokimia tertinggi.

Hal ini disebabkan ikatan MAb PSA dengan ¹²⁵I yang terbentuk sudah optimum sehingga dengan penambahan waktu reaksi yang dilakukan tidak mempengaruhi rendemen pemurnian yang diperoleh. Oleh karena itu selanjutnya dalam pembuatan perunut PSA ini digunakan waktu reaksi selama 90 detik.



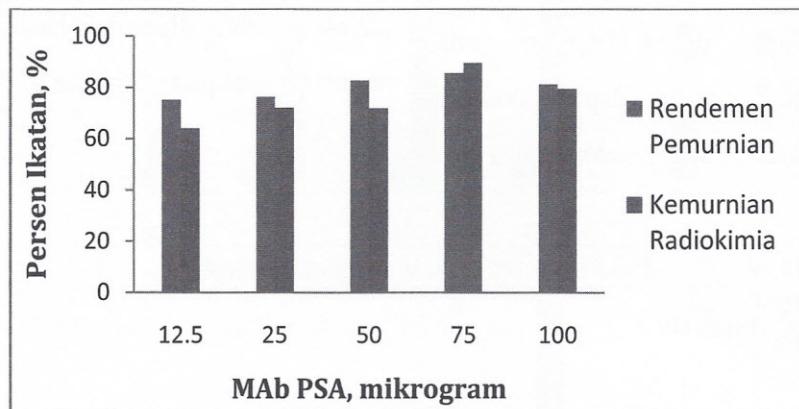
Gambar 3. Pengaruh lama waktu reaksi antara MAb PSA dengan Na¹²⁵I terhadap rendemen pemurnian dan kemurnian radiokimia perunut PSA

Pada variasi jumlah MAb PSA yang digunakan antara 12,5, 25, 50, 75 dan 100 μ gram diperoleh jumlah MAb PSA yang optimum terjadi pada 75 μ gram dengan rendemen pemurnian sebesar 85,6% dan

kemurnian radiokimia perunut PSA yang dihasilkan sebesar 89,57%, sedangkan pada penggunaan MAb PSA 12,5, 25, 50 dan 100 μ gram berturut-turut memberikan rendemen pemurnian 75,19%, 76,25%, 82,69% dan

82,20% serta kemurnian radiokimia sebesar 64,04%, 72,01%, 71,85% dan 79,45% (Gambar 4), sehingga untuk selanjutnya dalam

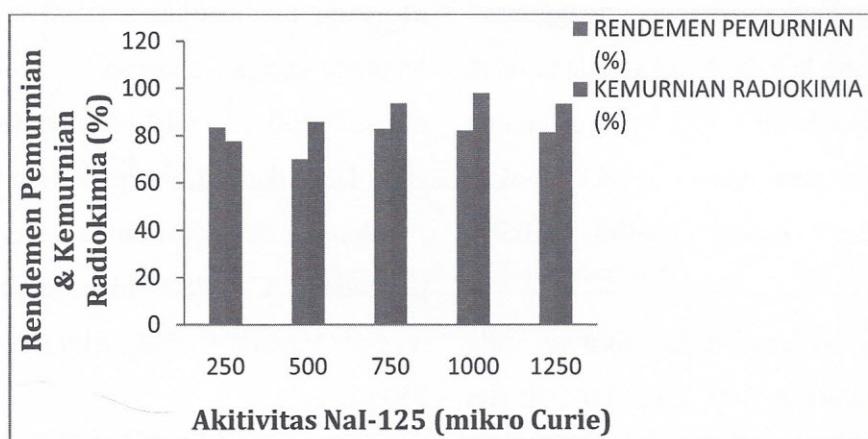
pembuatan perunut PSA akan digunakan jumlah MAb PSA sebanyak 75 μ gram.



Gambar 4. Pengaruh MAb PSA yang digunakan terhadap rendemen pemurnian dan kemurnian radiokimia perunut PSA yang dihasilkan.

Pada variasi aktivitas Na^{125}I yang digunakan yaitu antara 250, 500, 750, 1000 dan 1250 μCi diperoleh aktivitas Na^{125}I yang optimum adalah pada 1000 μCi . Pada aktivitas sebesar 1000 μCi tersebut dapat memberikan rendemen pemurnian sebesar 83,26% dan kemurnian radiokimia perunut PSA yang dihasilkan sebesar 98% sedangkan penggunaan

aktivitas Na^{125}I 250, 500, 750 dan 1000 μCi berturut-turut memberikan rendemen pemurnian sebesar 83,31%, 70,13%, 82,94% dan 81,38% serta kemurnian radiokimia sebesar 77,70%, 85,79%, 93,69% dan 93,49% seperti pada Gambar 5. Dengan demikian untuk selanjutnya dalam pembuatan perunut PSA ini digunakan aktivitas sebesar 1000 μCi .

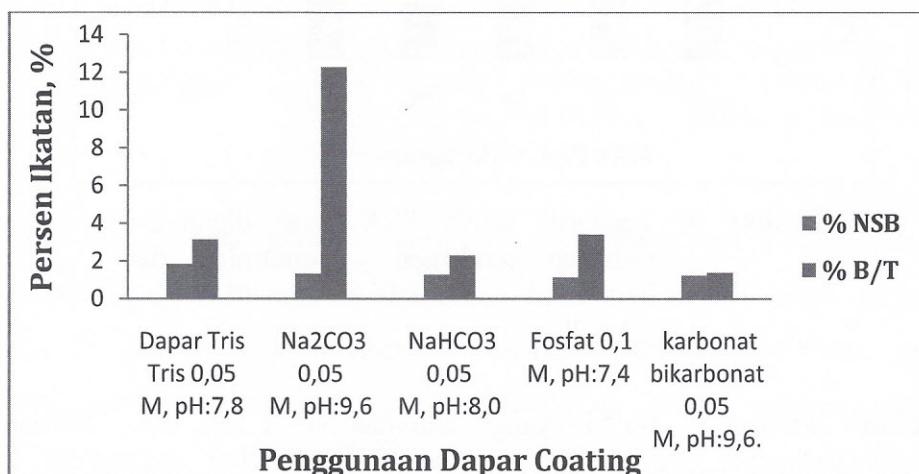


Gambar 5. Pengaruh Aktivitas Na^{125}I yang digunakan terhadap rendemen pemurnian dan kemurnian radiokimia perunut PSA yang dihasilkan.

Optimasi pembuatan *coated tube* (CT) PSA

Optimasi pembuatan *coated tube* (CT) PSA dilakukan dengan memvariasikan dapar *coating* dan volume dapar *coating* yang digunakan. Untuk variasi dapar *coating* digunakan lima macam dapar *coating* yaitu Tris

0,05M, pH:7,8, Na₂CO₃ 0,05M, pH:9,6, NaHCO₃ 0,05M, pH:8,0, Fosfat 0,1M, pH:7,4 dan karbonat bikarbonat 0,05M, pH:9,6. Dengan variasi tersebut diperoleh hasil uji immunologi seperti terlihat pada Gambar 6.



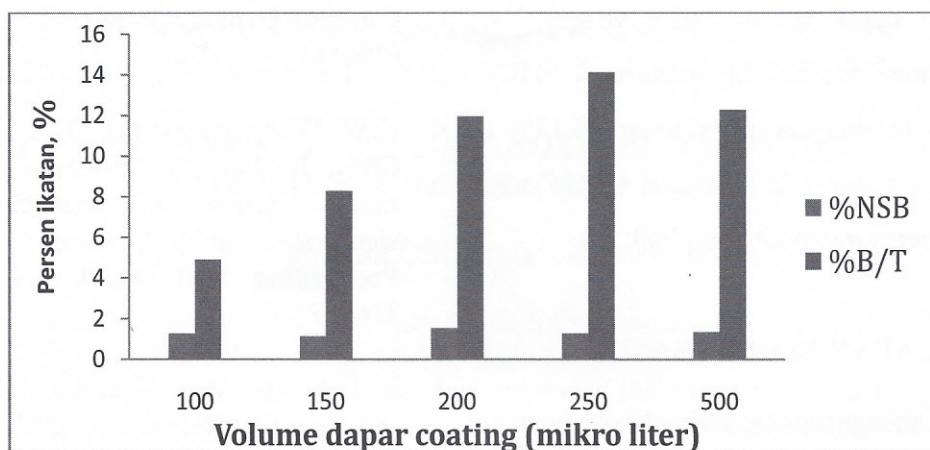
Gambar 6. Pengaruh penggunaan dapar *coating* terhadap %NSB dan %B/T

Pada Gambar 6 dapat dilihat bahwa penggunaan dapar Na₂CO₃ 0,05M dengan pH: 9,6 untuk *coating* memberikan hasil ikatan antigen antibodi yang maksimum (%B/T) yaitu 12,27% dibandingkan dengan penggunaan dapar *coating* yang lain. Sedangkan ikatan tidak spesifik (%NSB) sebesar 1,33% sehingga untuk selanjutnya dalam pembuatan CT PSA ini akan digunakan dapar *coating* Na₂CO₃ 0,05M, dengan pH:9,6.

Pada variasi volume dapar *coating* yang digunakan yaitu antara 100, 150, 200, 250 dan 500 μL, memberikan hasil %NSB yang tidak

begitu berbeda tetapi hasil %B/T terlihat nyata perbedaanya, tetapi semakin besar peggunaan volume *coating* % B/T yang diperoleh semakin besar dan diperoleh kondisi optimum pada 250 μL yang memberikan %B/T sebesar 14,12, sehingga dengan penambahan volume *coating* menjadi 500 μL tidak menambah %B/T nya yaitu 12,27 dapat dilihat pada Gambar 7.

Dengan demikian untuk selanjutnya dalam pembuatan CT PSA akan digunakan dapar *coating* Na₂CO₃ 0,05M, pH:9,6 dengan volume 250 μL.



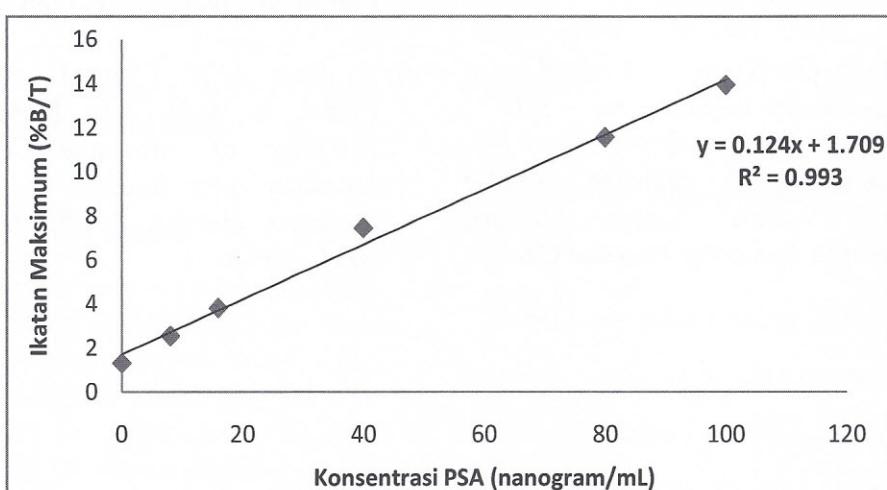
Gambar 7. Pengaruh volume *coating* terhadap % NSB dan %B/T

Pembuatan larutan standar PSA

Dalam pembuatan larutan standar PSA ini dilakukan dengan cara mengencerkan baku PSA (A0128H) dengan menggunakan dapar fosfat 0,025 M pH 7,4 yang mengandung *Bovine Serum Albumine* (BSA) sebesar 5% dengan konsentrasi 0, 8,16,40,60 dan 100 ng/mL. Dengan kondisi PSA sebagai standar diperoleh kurva kalibrasi standar yang ditunjukkan pada

Gambar 7.

Pada Gambar 7 dapat dilihat hubungan konsentrasi standar PSA (ng/mL) dengan ikatan maksimum (%B/T) dengan tingkat kepercayaan tinggi yang ditunjukkan oleh nilai R^2 0,9938 dengan persamaan garis regresi $Y = 0,1247X + 1,7099$. Dengan demikian standar PSA yang dibuat dapat digunakan untuk penentuan kadar PSA.



Gambar 7. Kurva kalibrasi standar PSA

KESIMPULAN

Telah dibuat pereaksi kit IRMA PSA peruntun PSA dengan kondisi optimum pembuatan pada : lama waktu reaksi 90 detik,

menggunakan MAb PSA sebanyak 75 μ gram dan aktivitas $Na^{125}I$ sebesar 1000 μ Ci; CT PSA dengan dapar *coating* Na_2CO_3 0,05 M pH 9,6 dengan volume 250 μ L dan larutan standar

PSA dalam dapar fosfat 0,025 M pH 7,4. Dengan kondisi tersebut diperoleh hasil %B/T dan %NSB masing-masing sebesar 14,12% (syarat > 10%) dan 1,25% (syarat < 2%) yang memenuhi persyaratan kit yang baik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada staf bidang Radioisotop dalam penyediaan Radioisotop Na¹²⁵I, staf bidang Radiofarmaka dan tim Komisi Pembina Tenaga Peneliti (KPTP) di instansi PRR yang memberi masukan sehingga penelitian berjalan sesuai yang direncanakan.

DAFTAR PUSTAKA

1. C. Pfister, J.P. Basuyau. (2005) *Current usefulness of free/total PSA ratio in the diagnosis of prostate cancer at an early stage*. *World J Urol*. 23: 236–242. DOI 10.1007/s00345-005-0506-4
2. W. A. Schulz, (2005) *Molecular Biology of Human Cancer*, Springer, pp 383 – 386
3. K. Okihara, R. J. Babaian. (2001) *Complexed Prostate Spesific Antigen Improvement in Detecting Prostate Cancer*.
4. K.W. Watt, P.J.M. Lee, T. Timkulu, W.P. Chan, R. Loor, (1986) *Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases*, *Proceeding Natl. Acad. Sci. USA*, pp. 3166–3170.
5. Rediatning W, Sukiyati Dj, (2000) *Immunoraiometricassay (IRMA) Dalam Deteksi dan pemantauan Kanker*, *J. Radioisotop dan Radiofarmaka*. 3. 55 – 70
6. Development of kit for radioimmunometric assays for tumor markers Final report of a coordinated research project, 1997-2001, IAEA-TECDOC-1307, August, 2002
7. A.F. Moghadam, P. Stieber. (1991) *Sensible use of tumour markers*, Edition Roche, Basel, Switzerland, pp 44-45
8. N. Schmeller, (2005) *Clinical value of PSA*, 1st edition, Bremen: UNI-MED, pp 14-22
9. K.O.H. William, M. Hurwitz, A. V D'Amico, J. P. Richie, P. W. Kantoff, *Neoplasms of the Prostate*, Holland-Frei Cancer Medicine. 5th edition
10. P. Zhou, M.H. Chen, D. McLeod, P.R. Carroll, J. Moul, A.V. D'Amico, (2005) *Predictor of Prostate Cancer-Spesific Mortality after Radical Prostatectomy of Radiation Therapy*, *J. Clin. Oncol*, 23 (28) 6992 – 6998