

# Teknik Immunodiagnostik dalam Masyarakat

## I. Prinsip-prinsip dasar teknik immunodiagnostik

Iwan H. Utama, I Nym. Suarsana

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jimbaran-Bali

### RINGKASAN

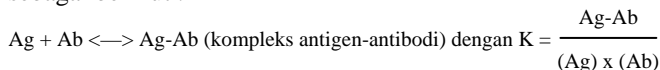
Teknik immunodiagnostik berdasarkan reaksi antigen dan antibodi banyak digunakan dalam bidang pertanian, kesehatan dan pengawasan lingkungan. Dalam tulisan ini dibahas prinsip-prinsip dasar teknik immunodiagnostik, terutama aspek kimiawinya. Selain itu juga dibahas faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil reaksi tersebut.

### PENDAHULUAN

Salah satu teknik yang banyak digunakan dalam bidang kesehatan serta pengawasan mutu bahan pangan dan hasil olahannya ialah teknik immunodiagnostik. Teknik immunodiagnostik cukup luas dan bervariasi, semuanya berdasarkan reaksi sistim kekebalan dalam tubuh manusia yang diaplikasikan secara *in vitro*<sup>(1)</sup>. *Immunoassay* merupakan salah satu teknik immunodiagnostik paling banyak digunakan. Teknik ini berdasarkan reaksi kimia antara dua jenis analit (antigen dan antibodi) yang dapat memberi hasil bervariasi bergantung indikatornya. Sebagai indikator biasanya digunakan bahan radioaktif – biasanya yodium 125 (*radioimmunoassay*/RIA), sistim enzim-substrat tertentu seperti peroksidase-kloronaftol, fosfatase-bromo-kloro-indolinfosfat, zat golongan fuorokrom atau fluoresen dan lain-lain<sup>(3)</sup>.

### Reaksi antigen dan antibodi *in vitro*

Reaksi antigen (Ag) dan antibodi (Ab) dapat dinyatakan sebagai berikut :



Berdasarkan prinsip ini, sistim reaksi dapat dikategorikan menjadi reaksi dengan antibodi berlebih (tipe 1):  $Ag+Ab \rightleftharpoons Ag-Ab+Ab$  berlebih; dan reaksi dengan antigen berlebih (tipe 2), yaitu:  $Ag + Ab \rightleftharpoons Ag - Ab + Ag$  berlebih<sup>(2)</sup>. Reaksi tipe 1 kurang dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi kinetika reaksi seperti jarum dan urea, selain itu lebih sensitif jika dibandingkan dengan reaksi tipe 2. Reaksi tipe 2 dipengaruhi oleh pelabelan antigen; karena umumnya antigen terdapat dalam jumlah sedikit dalam bahan yang diuji, maka tipe 2 kurang populer jika dibanding dengan tipe 1<sup>(4)</sup>.

Selain prinsip reaksi kimianya, sistim *immunoassay* juga dapat dilakukan (difomat) dalam dua sistim, yaitu sistim

heterogen yang memerlukan pemisahan dan sistim homogen yang tidak memerlukan pemisahan reaktan pasta reaksi. Pada sistim heterogen, sifat label sebelum dan sesudah reaksi tetap sama, jadi perlu pemisahan komponen reaktan yang berlebih dengan kompleks Ag-Ab yang terbentuk, sebab kuantitas kompleks ini yang akan dihitung. Pada sistim homogen, sifat label sebelum dan sesudah reaksi sangat berbeda, jadi tidak perlu lagi pemisahan komponen reaktan secara fisis<sup>(5)</sup>.

Berdasarkan mekanisme reaksinya, sistim *immunoassay* dapat dikategorikan menjadi *assay* kompetitif dan non kompetitif, sistim terakhir ini prinsip dasarnya sama dengan prinsip peran substrat-inhibitor dalam reaksi enzimatis<sup>(6)</sup>. Gabungan dari sistim di atas menghasilkan produk-produk immunodiagnostik komersial dengan enam model reaksi dasar<sup>(7)</sup>.

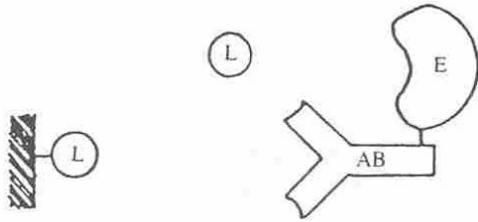
Keenam model tersebut ialah :

1) *Assay kompetitif dengan antigen terlabel (Gambar 1)* bertujuan mendeteksi antigen dengan konsentrasi antibodi yang terbatas dan menggunakan antigen serupa yang dilabel sebagai kompetitornya. Nilai yang diukur biasanya kompleks Ag-Ab. Karena sifatnya kompetitif maka antibodi yang sudah mengikat antigen alami tidak mampu lagi mengikat antigen terlabel. Dengan menggunakan antibodi yang spesifitasnya tinggi, *assay* ini dapat mendeteksi  $210^{-15}$  Mol. antigen dalam contoh bahan.



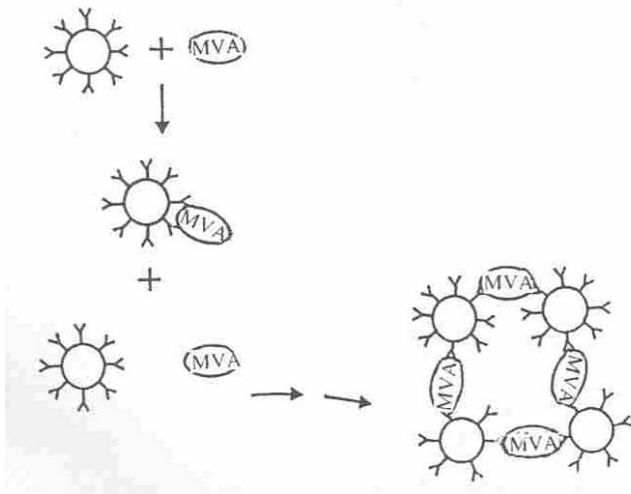
**Gambar 1.** Reaksi model 1: Suatu assay kompetitif dengan antigen (E-L) terlabel enzim dan antigen tidak terlabel (L) berkompetisi untuk mendapat tempat di molekul antibodi yang terbatas dan terikat (immobilized) pada suatu fasa padat.

2) *Assay kompetitif menggunakan antibodi berlabel (Gambar 2)* dengan tujuan sama seperti *point 1* di atas. *Assay* ini biasanya digunakan jika sifat antigen dapat mempengaruhi label yang digunakan.



**Gambar 2.** Reaksi model 2: Assay kompetitif dengan antibodi terlabel enzim (E-AB). Antigen (L) terikat pada suatu fasa padat dan antigen dari contoh berkompetisi untuk mendapat tempat pada molekul antibodi terlabel enzim yang terbatas.

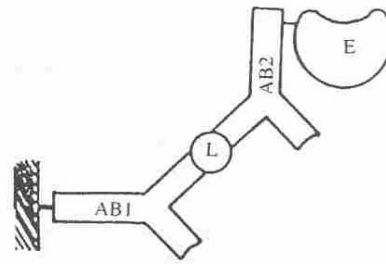
3) *Assay kompleks Ag-Ab (Gambar 3)* bertujuan mendeteksi antigen atau antibodi; cara ini paling banyak digunakan di bidang diagnostik atau biomedis. Secara teknis relatif sederhana dan murah. Prosedur seperti reaksi aglutinasi, imunodifusi ganda dan presipitasi berazaskan model ini. Biasanya dalam model ini tidak menggunakan label dan kepekaannya terbatas, meskipun demikian reaksi imunodifusi dapat mendeteksi 0,005 µg protein/ml suspensi<sup>(8)</sup>.



**Gambar 3.** Reaksi model 3: Assay kompleks antigen-antibodi. Antibodi (Y) yang diikatkan pada suatu partikel akan beragregasi jika bereaksi dengan suatu antigen homolog yang multivalen (MVA).

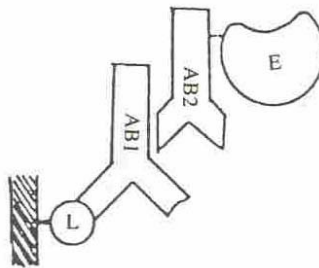
4). *Sandwich assay (Gambar 4)* merupakan metode yang lebih modern dan luas penggunaannya. Prinsipnya hampir sama dengan model 3, tapi antigen yang digunakan biasanya dapat berikatan dengan dua atau lebih antibodi yang berbeda spesifitasnya. Salah satu reaktan (biasanya antibodi) terikat (*immobilized*) pada matrix tertentu seperti polistirene<sup>(9)</sup> dan pada antibodi lainnya diberi label. *Sandwich assay* inipun

bermacam-macam prinsipnya<sup>(9)</sup>. *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)* termasuk dalam model ini. Model ini lebih peka dari model 1, dapat mendeteksi  $10^{-18}$  Mol. antigen dalam bahan yang diuji.



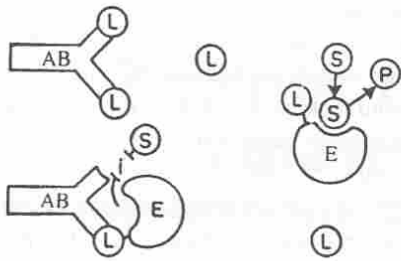
**Gambar 4.** Reaksi model 4: Imunoassay "sandwich" dimana suatu antigen multivalen (L) pertama-tama diikatkan pada suatu antibodi poliklonal (AB-1) yang telah diimmobilisasi. Antigen tersebut kemudian dideteksi dengan antibodi ke dua (AB-2) yang telah diberi label enzim.

4) *Assay non kompetitif (Gambar 5)* dengan tujuan mendeteksi antibodi dalam serum (berbeda dengan model sebelumnya). Antigen yang digunakan biasanya berlebih dan terikat pada matrix tertentu, serum yang akan dideteksi jenis antibodinya (antibodi primer) direaksikan dengan antigen tersebut. Reaksi ini memerlukan suatu anti-antibodi (antibodi sekunder) terhadap antibodi yang akan dideteksi tadi. Antibodi sekunder inilah yang biasanya dilabel dan dapat bereaksi dengan bagian Fc dari molekul antibodi primer, sehingga kandungan antibodi dalam serum dapat ditentukan.



**Gambar 5.** Reaksi model 5: Assay nonkompetitif berdasarkan ikatan antibodi-antibodi. Antigen diikatkan pada suatu fasa padat, dan antibodi homolog (AB-1) akan berikatan dengannya. Antiantibodi (AB-2) terhadap AB-1 yang telah terlabel enzim akan berikatan dengan AB-1 dan jumlahnya dapat ditentukan secara kuantitatif.

6). *Assay bebas pemisahan pada reaksi (sistim homogen) (Gambar 6)* dengan tujuan sama seperti model 1, 2, dan 3, tapi pembacaan hasil reaksi ditentukan oleh sifat label yang memang berbeda sebelum dan sesudah reaksi; oleh sebab itu sistim ini tidak memerlukan pemisahan pasca reaksi.



**Gambar 6. Reaksi model 6: Immunoassay bebas pemisahan.** Aktivitas enzim yang terikat pada antigen (E-L) akan dihambat, dengan kata lain konversi substrat (S) menjadi produk (P) akan dicegah jika antigen tersebut berikatan dengan antibodi.

Teknik ini banyak digunakan dalam laboratorium klinik dan forensik seperti kasus penyalahgunaan obat. *Assay* ini biasanya kurang peka jika dibandingkan dengan yang sistem homogen.

**Tabel 1** memperlihatkan contoh-contoh teknik *immunoassay* dengan beberapa enzim atau senyawa tertentu sebagai indikatornya. Dari **Tabel 1** dapat dilihat penentuan kuantitatif teknik ini tetap memerlukan prinsip-prinsip analitik modern.

**Tabel 1. Contoh teknik immunoassay dengan bermacam-macam indikator dan teknik pengukurannya<sup>(6)</sup>**

Macam-macam label	Prinsip analitik/cara pengukurannya
<b>Immunoassay enzim heterogen :</b>	
1. Peroksidase	1. Fotometri, luminometri
2. Alkalin fosfatase	2. Fotometri, fluorimetri
<b>Immunoassay enzim homogen :</b>	
1. Lysozyme	1. Turbidimetri
2. $\beta$ -D Galaktosidase	2. Fotometri, turbidimetri
3. Glukosa 6 fosfat dehidrogenase	3. Fotometri, fluorimetri
<b>Fluorescent :</b>	
1. Senyawa turunan kourmarin	1. Fluorimetri
2. Rhodamin	2. Fluorimetri
<b>Ligand :</b>	
1. Senyawa avidin-biotin dan turunannya	1. Sistem enzim terbiotinilasi, luminometri csteravidin-akridinium, avidin enzim fotometri dan lain-lain.
<b>Luminesen :</b>	
1. Ester akrindinium	1. Luminometri
2. Senyawa turunan isoluminol	2. Luminometri
<b>Partikel :</b>	
1. Latex	1. Nefelometri, turbidimetri, visual
2. Bakteri terwarnai	2. Visual
3. Eritrosit (uji hambat hemaglutinasi)	3. Visual
<b>Radioisotop :</b>	
1. $Co^{57}$ , $I^{125}$ , $H^3$	1. Perhitungan sintilasi padat
<b>Vesikel :</b>	
1. Liposom	1. Pejeratan zat warna, fotometri enzim
<b>Metal koloid :</b>	
1. Perak, emas dan senyawa-senyawanya	1. Emisi absorpsi, spektroskopi fluoresen, absorpsi atom, nefelometri
2. Barium sulfat	
<b>Spin :</b>	
1. Radikal nitroxida	1. Spektroskopi resonansi spin elektron

Teknik imunodifusi ganda merupakan teknik yang luas penggunaannya baik di bidang kesehatan maupun bidang teknologi pangan, misalnya menguji keberadaan daging babi

atau ekstraknya dalam suatu produk makanan. Dengan membuat antisera spesifik terhadap daging babi (antisera biasanya dibuat pada kelinci), dapat dilacak keberadaan daging babi dan ekstraknya dalam suatu produk makanan tertentu untuk menjamin kehalalannya. Prinsip teknik ini dengan mendifusikan suatu ekstrak antigen terlarut (biasanya protein daging) dan antibodinya (berupa serum) dalam suatu matrix agar atau gel padat dengan arah 2 dimensi dan berhadapan<sup>(10)</sup>. Jika antibodi tersebut sesuai dengan antigennya, maka terjadi reaksi yang menimbulkan garis endapan putih, hal ini berarti contoh produk positif mengandung ekstrak daging babi yang diuji. Teknik imunodifusi memerlukan komposisi agar atau gel, konsentrasi dan jenis garam dalam perbandingan tertentu untuk jenis bahan yang diuji, untuk ini perlu penelitian pendahuluan untuk menentukan komposisi tersebut. Dalam perkembangannya, antibodi monoklonal menambah aset dalam spesifisitas dan sensitivitas teknik imunodiagnostik<sup>(11)</sup>.

Reaksi antigen dan antibodi merupakan reaksi yang sangat peka terhadap pengaruh lingkungan seperti pH, suhu, konsentrasi garam, konsentrasi antigen-antibodi itu sendiri, dan lain-lain<sup>(12)</sup>. Faktor seperti kepekaan dan spesifisitas yang tinggi, kemudahan teknis, ekonomis, dan *biohazard* yang rendah tetap menjadi prioritas utama dalam pengembangan teknik imunodiagnostik yang perjalanannya begitu cepat.

## KESIMPULAN

Teknik imunodiagnostik yang beragam memerlukan pengetahuan dasar imunologi atau imunokimia yang memadai dalam pemilihan untuk aplikasinya, tampaknya teknik imunodifusi masih tetap banyak dipakai karena sederhana, hasilnya cukup cepat diketahui dan ekonomis.

## KEPUSTAKAAN

- Coates ARM. Immunocytochemistry of microorganisms. In Immunocytochemistry 2<sup>nd</sup>. Ed. By JM. Polack and S. Van Noorden (Eds). John Wright and Sons Ltd. Bristol, England 1986 : 650-63.
- Harlow ED, Lane D. Antibodies; a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, USA. 1988 :554-612.
- Roitt IM. Essential immunology 7<sup>th</sup>. ed. Blackwell Scient Publ, London. 1991: 85-103.
- Gow IF, Williams BC. Immunoassays for antigens. Curr. Op. Immunol. 1989; 1: 940-47.
- Deshpande SS. Immunodiagnosics in agricultural, food, and environ mental quality control. Food Technol. 1994; 6: 136-41.
- Stryer L. Biochemistry. WH. Freeman-San Francisco. USA. 1988: 192-9.
- Goshling JPA. A decade of development in immunoassay methodology. Clin. Chem. 1990; 36: 1408-27.
- Silverstein AM, Thorbecke GJ, Kramer KL, Lukes KJ. Fetal response to antigenic stimulus III.  $\gamma$ -Globulin production in normal and stimulated fetal lams. J. Immunol. 1963: 91: 384-95.
- Burgess GW. Basic principles of ELISA and variation in configuration. In Burgess, G.W. (Ed.) ELISA technology in diagnosis and research. Graduate School of Tropical Veterinary Science James Cook University of North Queensland, Townsville Australia. 1988 : 27-36.
- Crowle AJ. Immunodiffusion 2<sup>nd</sup>. Ed. Academic Press, London, 1973; 247-302.
- Lane D, Koprowsky H. Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies. Nature 1982; 296: 34-8.
- Johnstone A. Immunological techniques. Curr. Op. Immunol. 1989; I: 927-28.