

PEMERIKSAAN TIROID



Dr. Ida Ayu Putri Wirawati Sp.PK (K)

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA

DENPASAR

2017

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadapan Tuhan Yang Maha Esa atas karunia-Nya sehingga karya tulis ini dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Karya tulis ini semoga berguna di bagian Patologi Klinik di Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan RSUP Sanglah

Karya tulis ini Imunologi ini berjudul “Pemeriksaan Tiroid” Dalam Karya tulis ini ini, penulis banyak memperoleh bimbingan dan petunjuk-petunjuk, serta bantuan dan dukungan dari berbagai pihak baik dari institusi maupun luar institusi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan RSUP Sanglah. Melalui kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang membantu tersusunya tutor ini.

Semoga Karya tulis ini imunologi ini dapat memberi sumbangan ilmiah dalam masalah kesehatan dan memberi manfaat bagi berbagai pihak.

Denpasar, Desember 2017

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman sampul	i
Kata Pengantar	ii
Daftar Isi	iii
Daftar Tabel	v
Daftar Gambar	vi
Daftar Singkatan	vii
BAB I Pendahuluan	1
BAB II Faal Tiroid	3
Kelainan Tiroid	7
Hipotiroid	8
Hipertiroid	8
Pembesaran kelenjar tiroid	8
Kelainan hormon tiroid tanpa disertai gangguan klinis (eutiroid) ...	9
Pengaruh obat-obatan terhadap fungsi tiroid	9
Pemeriksaan Hormon Tiroid	10
Pengambilan sampel	13
Pemeriksaan T3	14
Prinsip pemeriksaan T3 metode ECLIA	15
Prinsip pemeriksaan T3 metode ELFA	16
Prinsip pemeriksaan T3 metode EIA	17
Pemeriksaan T4	19

Prinsip pemeriksaan T4 metode ECLIA	20
Prinsip pemeriksaan T4 metode ELFA	21
Prinsip pemeriksaan T4 metode EIA	22
Pemeriksaan TSH	25
Prinsip pemeriksaan TSH metode ECLIA	26
Prinsip pemeriksaan TSH metode ELFA	27
Prinsip pemeriksaan TSH metode EIA	28
Pemeriksaan Free T4	31
Prinsip pemeriksaan fT4 metode ECLIA	32
Prinsip pemeriksaan fT4 metode ELFA	33
Prinsip pemeriksaan fT4 metode EIA	34
Ringkasan	39
Daftar Pustaka	40

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Pengaruh fisiologis hormon tiroid	5

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Kelenjar tiroid tampak depan	3
Gambar 2. Pengaturan hormon tiroid	6
Gambar 3. Mekanisme umpan balik	7
Gambar 4. Enzim imunoasai	11
Gambar 5. Reagen strip dan SPR	12
Gambar 6. Mekanisme <i>electrochemiluminescent assay</i>	13
Gambar 7. Prinsip pemeriksaan T3	17
Gambar 8. Prinsip pemeriksaan T4	23
Gambar 9. Prinsip pemeriksaan TSH	29
Gambar 10. Prinsip pemeriksaan fT4	35

DAFTAR SINGKATAN

ECLIA	= <i>Electrochemiluminescent assay</i>
EDTA	= <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EIA	= <i>Enzyme immunoassay</i>
ELFA	= <i>Enzyme linked immunofluorescence assay</i>
ELISA	= <i>Enzyme-linked immunoassay</i>
FSH	= <i>Follicle stimulating hormon</i>
FTI	= <i>Free Thyroxine Index</i>
fT4	= <i>Free T4</i>
hCG	= <i>Human chorionic gonadotropin</i>
IRMA	= <i>Immunoradiometric assay</i>
LH	= <i>Luteinizing Hormon</i>
RIA	= <i>Radioimmunoassay</i>
T TBG	= <i>Thyroxine binding globulin</i>
BPA	= <i>Thyroxine binding pre albumin</i>
TRH	= <i>Thyroid Releasing Hormon</i>
TSH	= <i>Thyroid Stimulating Hormon</i>
TU	= <i>Thyroid Uptake</i>
T3	= <i>Triiodothyronine</i>
T4	= <i>Tiroksin</i>

BAB I

PENDAHULUAN

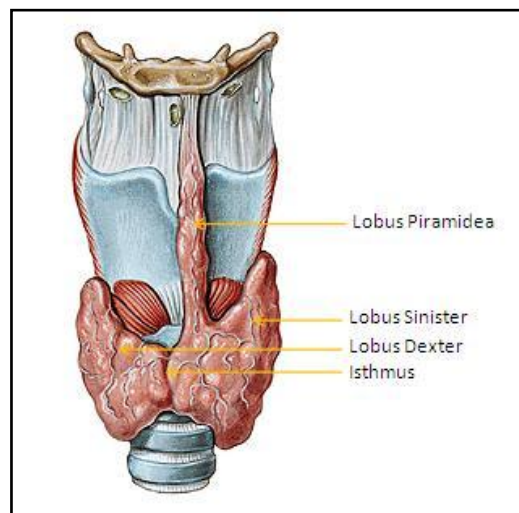
Penyakit dan kelainan kelenjar tiroid merupakan kelainan endokrin tersering kedua setelah diabetes mellitus. Kelainan tiroid memberikan pengaruh ke hampir seluruh tubuh karena hormon tiroid mempengaruhi banyak organ. Untuk mempelajari dan mendiagnosis kelainan tiroid perlu memahami sumbu Hipotalamus-Hipofisis-Tiroid, hormon- hormon yang bekerja pada sumbu tersebut, serta pengaruhnya pada organ-organ lain, serta sebaliknya, pengaruh luar terhadap sumbu tersebut (Suryaatmadja 2010).

Pemeriksaan hormon tiroid meliputi pemeriksaan T3, T4, TSH dan fT4. Pemeriksaan terhadap hormon tiroid mulai berkembang setelah diperkenalkan teknik *radioimmunoassay* (RIA) pada awal tahun 1970-an, diikuti dengan *immunoradiometric assay* (IRMA), *enzyme-linked immunoassay* (ELISA), *enzyme-linked immunofluorescence assay* (ELFA) dan *enzyme immunoassay* (EIA), serta yang terbaru *electrochemiluminescent assay* (ECLIA). Cara ECLIA menjadi metode yang paling peka dibandingkan yang terdahulu. Cara ini dikembangkan sejak akhir tahun 1980-an dan pada Kursus *Laboratory Endocrinology* di Singapore tahun 1989 sudah dinyatakan sebagai metode yang menjanjikan untuk analisis hormon. Kepekaan bergeser dari kadar $\mu\text{g/dL}$ menjadi ng/dL bahkan pg/gL . Cara ini sudah diterapkan pada otomasi (*automated analyzer*). Dengan demikian, selain makin peka, juga ketelitian dan ketepatan analisis hormon makin baik (Suryaatmadja 2010).

BAB II

FAAL TIROID

Kelenjar tiroid terletak di daerah leher depan, di depan trakea, tepat di bawah laring, berwarna merah coklat dengan 2 lobus yang dihubungkan oleh isthmus, bentuknya menyerupai kupu-kupu.



Gambar 1. Kelenjar Tiroid tampak depan
(sumber : anatomi kelenjar tiroid)

Secara embrional, semula tiroid terletak di belakang lidah yang kemudian sebelum lahir bermigrasi ke leher depan, oleh karena itu, meski jarang, ada kalanya kelenjar tiroid masih berada di belakang lidah atau bahkan sudah sampai ke belakang tulang dada/*substernum* (Choksi NY. 2003, Nicoloff JT. 1992, McPhee SJ. 2003).

Kelenjar Tiroid terdiri atas sel-sel epitel kubus rendah yang tersusun membentuk kantung-kantung kecil, folikel-folikel, yang merupakan unit

struktural, fungsional dan sekresi kelenjar tiroid. Ada 2 jenis hormon utama yang disekresi oleh kelenjar tiroid, yaitu Tiroksin (*Thyroxine = T4 = L-3,5,3',5'-tetraiodothyronin*) dan *Triiodothyronine (T3 = L-3,5,3'-triiodothyronine)*. Keduanya tersusun oleh 2 residu tirosil (*tyrosyl*) yang terikat melalui ikatan eter dan digantikan oleh 4 atau 3 residu yodium (*iodine*). Kuantitatif terbanyak adalah T4 sebagai hormon utama dan sedikit T3, tetapi T3 merupakan hormon yang aktif secara biologis dengan potensi metabolik 3 kali T4 dan T4 dianggap sebagai *precursor* atau *prohormon*, yang bila diperlukan akan dipecah di jaringan untuk membentuk T3 (Suryaatmadja 2010).

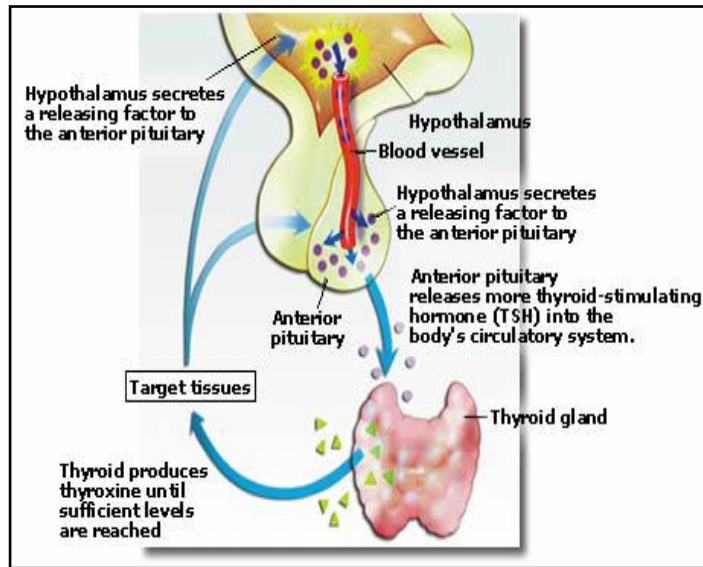
Fungsi utama T3 adalah mengatur metabolisme karbohidrat dan protein di dalam semua sel, karena itu perubahan T3 dapat mempengaruhi semua organ tubuh, terutama kardiovaskuler, saraf, imun dan reproduksi. Tiroid mengatur pertumbuhan, metabolisme, respirasi seluler, penggunaan energi total, serta berperan penting pada perkembangan dan diferensiasi jaringan.

Tabel 1. Pengaruh Fisiologis Hormon Tiroid

Jaringan Sasaran	Pengaruh	Mekanisme
Jantung	Kronotropik	Meningkatkan jumlah dan afinitas reseptor B-adrenergik
	Inotropik	Meningkatkan respon terhadap katekolamin Meningkatkan produksi alfa-miosin rantai berat
Jaringan Adiposa	Katabolik	Merangsang lipolisis
Otot	Katabolik	Meningkatkan pemecahan protein
Tulang	Perkembangan dan metabolic	Mempromosi pertumbuhan tulang normal Mempercepat pertukaran (turnover) tulang
Sistem saraf	Perkembangan	Mempromosi perkembangan otak normal
Usus	Metabolik	Meningkatkan laju serapan karbohidrat
Lipoprotein	Metabolik	Merangsang pembentukan reseptor LDL
Lain-lain	Kariogenik	Merangsang konsumsi oksigen oleh jaringan aktif metabolik Meningkatkan laju metabolic

Sumber : ABC Laboratorium Amerind Bio-Clinic, 2010

Tiroksin dilepaskan ketika otak melalui sistem hormonal - hipotalamus - mengirimkan sebuah perintah (TRH = *Thyroid Releasing Hormon*, hormon pelepas tiroid) ke kelenjar tiroid. Kelenjar tiroid, sebagai titik akhir rantai perintah ini, segera menanggapi dengan melepaskan tiroksin dan menyebarkannya ke seluruh tubuh melalui darah (Harun Yahya 2008).

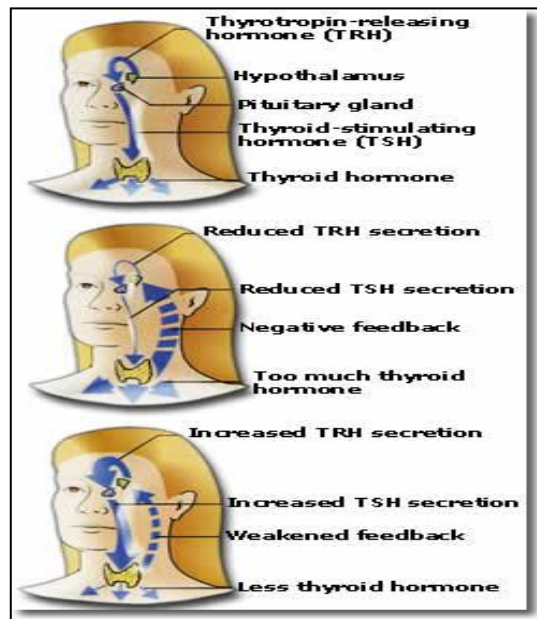


Gambar 2. Pengaturan Hormon Tiroid (Harun Yahya, 2008)

Jumlah tiroksin yang dilepaskan ditentukan oleh sebuah sistem yang terdiri dari dua mekanisme arus balik negatif. Saat jumlah tiroksin dalam darah naik di atas normal, hormon tiroksin mempengaruhi kelenjar pituitari dan terkadang langsung ke hipotalamus: kelenjar ini mengurangi kepekaan kelenjar pituitari terhadap hormon TRH. Fungsi hormon TRH adalah mengaktifkan kelenjar pituitari agar mengirimkan perintah (berbentuk hormon TSH = *Thyroid Stimulating Hormon = thyrotropin*) ke kelenjar tiroid. Perintah ini adalah titik kedua dalam rantai perintah produksi hormon tiroksin (Harun Yahya 2008).

Saat tiroksin dibutuhkan, hipotalamus mengirimkan perintah ke kelenjar pituitari (TRH). Kelenjar pituitari yang menerima perintah ini memahami bahwa kelenjar tiroid harus diaktifkan. Kelenjar pituitari segera mengirimkan perintah ke kelenjar tiroid (TSH). Sesuai dengan perintah yang diterima, kelenjar tiroid

segera menghasilkan tiroksin, dan menyebarkannya ke seluruh tubuh lewat aliran darah (Harun Yahya 2008).



Gambar 3. Mekanisme umpan balik (Harun Yahya, 2008)

KELAINAN TIROID

Pada orang dewasa dikenal ada 4 jenis kelainan/gangguan tiroid. Pertama dan kedua gangguan fungsi atau keseimbangan homeostasis berupa kekurangan hormon tiroid (hipotiroid) dan kelebihan hormon tiroid (hipertiroid). Ketiga, kelainan berupa pembesaran kelenjar tiroid dan keempat kelainan hormon tiroid tanpa disertai gangguan klinis (eutiroid). Perlu pula diperhatikan adanya pengaruh obat-obatan terhadap fungsi tiroid (Suryaatmadja 2010).

Hipotiroid

Hipotiroid dapat dibedakan antara yang klinis jelas (*overt*) dan klinis tidak jelas (subklinis). **Hipotiroid subklinis** didefinisikan sebagai keadaan dengan kadar TSH meningkat ringan dan kadar fT3 dan T4 normal disertai dengan sedikit/tanpa gejala klinis.

Hipotiroid klinis/overt atau tiroid yang kurang aktif merupakan kelainan klinis yang paling umum, didefinisikan sebagai kadar TSH tinggi dan fT4 rendah dalam serum. Penyebab utamanya adalah kadar yodium yang tidak cukup atau asupan yodium yang rendah.

Hipertiroid

Hipertiroid juga dapat dibedakan antara klinis jelas (*overt*) dan klinis tidak jelas (subklinis). Hipertiroid klinis atau tirotoksikosis ditandai dengan peningkatan kadar T3 dan T4 dan penurunan kadar TSH serum. Penyebab tersering adalah penyakit Graves yang disebabkan oleh produksi antibodi terhadap reseptor TSH yang merangsang pembentukan hormon tiroid berlebih.

Pembesaran kelenjar tiroid

Pembesaran kelenjar tiroid (*goiter*) dapat merata (*diffuse*) atau *nodular*, tunggal atau banyak (*multinodular*). *Goiter* bisaanya disebabkan oleh rangsangan berkepanjangan oleh TSH atau zat serupa TSH (*TSH-like agent*) baik pada hipotiroid maupun hipertiroid dan dapat pula pada keadaan eutiroid. Penyebab tersering adalah defisiensi yodium (Suryaatmadja 2010).

Timbulnya nodul tunggal dapat disebabkan oleh tumor, yang tersering adenoma folikularis. Karsinoma tiroid jarang, biasanya berkembang dari epitel folikular sebagai karsinoma folikularis atau papilaris.

Kelainan hormon tiroid tanpa disertai gangguan klinis (eutiroid)

Kelainan kadar hormon tiroid dapat dijumpai pada keadaan klinis normal (*eutiroid*). Penyebabnya adalah keadaan fisiologis normal atau terganggu atau oleh pengaruh obat-obatan. Keadaan sindrom eutiroid sakit (*sick euthyroid syndrome*) tersering diamati pada pasien rawat inap dengan penyakit bukan tiroid. Sebanyak 13% pasien rawat inap dengan penyakit akut mungkin menunjukkan nilai hormon tiroid tidak normal. Pada kebanyakan pasien kelainan bersifat sementara dan akan kembali normal setelah pulih dari penyakit akut. Sebagai respon akut, terjadi penurunan hormon tiroid terutama T3 karena hambatan proses deiodinasi T4 menjadi T3. Hal ini merupakan respon fisiologis untuk menurunkan penggunaan kalori dan katabolisme protein, yang menguntungkan terutama pada pasien dengan status gizi kurang baik (Suryaatmadja 2010).

Pengaruh obat-obatan terhadap fungsi tiroid

Beberapa obat dapat mempersulit penilaian status tiroid, baik pada diagnosis awal maupun pada pemantauan. Mekanisme kerjanya dapat mempengaruhi sekresi TSH, bioavailabilitas obat *levothyroxine* oral, protein pengikat hormon tiroid (TBG), dan metabolisme T3 dan T4. Contoh : *dopamine* dan *glukokortikoid* mengurangi sekresi TSH, *lithium* dan sediaan yodida menurunkan fT4, *amiodaron*

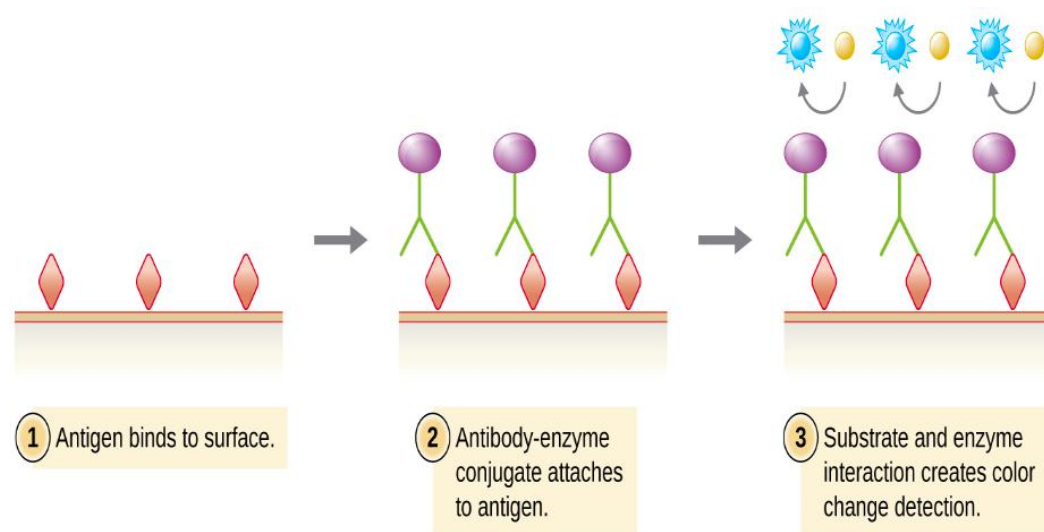
mungkin meningkatkan atau menekan fT4, *estrogen* dan *androgen* mempengaruhi TBG tapi tidak mempengaruhi fT4 atau fT3 (Suryaatmadja 2010).

PEMERIKSAAN HORMON TIROID

Pemeriksaan hormon tiroid meliputi pemeriksaan T3, T4, TSH dan fT4. Pemeriksaan terhadap hormon tiroid mulai berkembang setelah diperkenalkan teknik *radioimmunoassay* (RIA) pada awal tahun 1970-an, diikuti dengan *immunoradiometric assay* (IRMA), *enzyme-linked immunoassay* (ELISA) dan *enzyme immunoassay* (EIA), serta yang terbaru *electrochemiluminescent assay* (ECLIA). Cara ECLIA menjadi metode yang paling peka dibandingkan yang terdahulu. Cara ini dikembangkan sejak akhir tahun 1980-an dan pada Kursus *Laboratory Endocrinology* di Singapore tahun 1989 sudah dinyatakan sebagai metode yang menjanjikan untuk analisis hormon. Kepekaan bergeser dari kadar $\mu\text{g/dL}$ menjadi ng/dL bahkan pg/gL . Cara ini sudah diterapkan pada otomasi (*automated analyzer*). Dengan demikian, selain makin peka, juga ketelitian dan ketepatan analisis hormon makin baik (Suryaatmadja 2010).

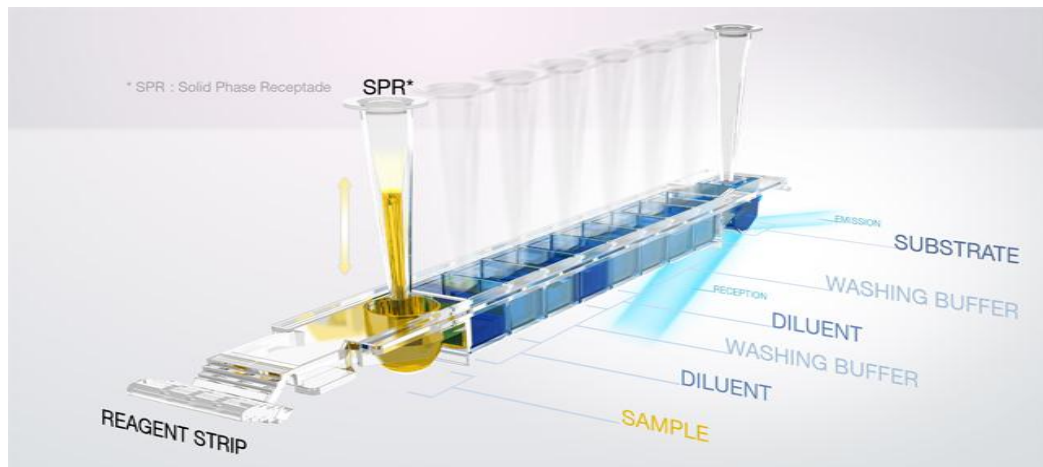
Pada tutor ini akan dibahas mengenai metode *enzyme immunoassay* (EIA), *enzyme linked immunofluorescent assay* (ELFA) dan *electrochemiluminescent assay* (ECLIA). EIA adalah tes untuk mendeteksi antigen dan antibodi dengan penambahan enzim yang dapat mengkatalisis substrat sehingga terjadi perubahan warna. Enzim berlabel yang sering digunakan adalah *horseradish peroxidase*, *alkaline phosphatase*, *Glucose-6-phosphatase dehydrogenase* dan *galaktosidase*. Pada tes EIA sebuah plate plastik dilapisi dengan antigen yang

akan bereaksi dengan antibodi pada serum pasien, kemudian diinkubasi dengan gabungan enzim-antibodi pada plate. Jika terdapat antibodi, gabungan tersebut bereaksi dengan kompleks antigen-antibodi pada plate. Aktivitas enzim diukur dengan spektrofotometer setelah penambahan substrat kromogenik spesifik yang akan menyebabkan perubahan warna.



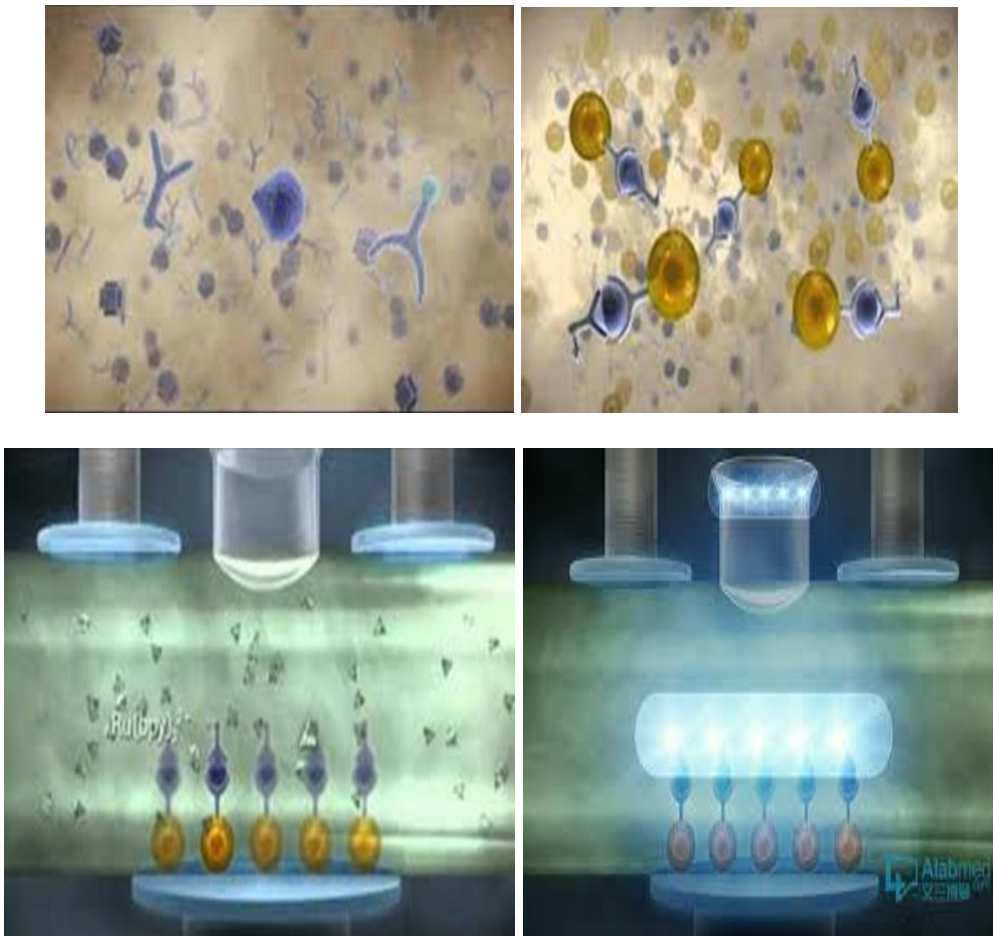
Gambar 4. Enzim immunoasai (*libretexts* 2017)

Metode ELFA, merupakan cara pemeriksaan dengan menggunakan enzim sebagai petanda dan digunakan substrat yang berfluoresensi. Metode ELFA menggunakan system reagen strip dan solid phase receptable (SPR) yang dilapisi antigen atau antibodi berfungsi sebagai pipeting. Semua langkah dilakukan otomatis oleh alat. Produk fluoresen yang biasa digunakan adalah 4- *Methyl-umbelliferone* dan akan dibaca pada panjang gelombang 450nm.



Gambar 5. Reagen strip dan SPR (*biomerieux-diagnostics*)

Pada metode ECLIA adalah melalui beberapa tahapan inkubasi dimana inkubasi pertama: sampel ditambah antibodi spesifik monoclonal biotinylassi, dan antibodi spesifik yang dilabel dengan kompleks ruthenium membentuk kompleks *sandwich*. Pada inkubasi kedua: setelah ditambahkan mikropartikel yang dilapisi streptavidin, kompleks yang terbentuk berikatan dengan fase solid melalui interaksi biotin dengan streptavidin. Campuran reaksi diaspirasi dalam *cell* pengukur dimana mikropartikel secara magnetic ditangkap pada permukaan elektroda. Substansi yang tidak berikatan dibuang melalui *Procell*. Aplikasi voltase (tegangan) pada elektroda kemudian menginduksi emisi chemiluminescent yang akan diukur oleh photomultiplier (Cobas 2016).



Gambar 6. Mekanisme *electrochemiluminescent assay* (cobas 2016)

Pengambilan sampel

Tidak perlu persiapan khusus, tidak perlu mengubah pola makan dan aktifitas fisik, hanya saja pasien diminta untuk menghentikan obat-obatan tertentu sampai tes selesai dikerjakan, Ada juga obat-obatan yang tetap diminta untuk diminum karena ingin diketahui pengaruhnya. Bisaanya diukur kadar hormon dari serum yang dipisahkan dari spesimen darah vena, namun bisa pula digunakan plasma EDTA atau heparin. Bila tidak segera diperiksa, serum sebaiknya disimpan pada

suhu 2-8°C untuk 3-5 hari, bila dibekukan akan stabil sampai \pm 30 hari. Sebaiknya serum tidak hemolisis atau lipemik (Suryaatmadja 2010).

PEMERIKSAAN T3

Hormon *Thyroxine* (T4) dan 3,5,3' *Triiodothyronine* (T3) berada dalam sirkulasi darah, sebagian besar terikat pada protein plasma *Thyroxine Binding Globuline* (TBG). Konsentrasi T3 jauh lebih kecil daripada T4, namun memiliki potensi metabolik yang lebih besar. Pengukuran T3 merupakan faktor penting untuk mendiagnosis penyakit tiroid. Pengukurannya dapat menentukan adanya varian pada kelainan hipertiroid pada pasien tirotoksik dengan peningkatan kadar T3 namun T4 nya normal. Peningkatan T3 tanpa adanya peningkatan T4 kebanyakan merupakan gejala awal dari tirotoksikosis rekuren pada pasien yang telah mendapat terapi.

Pemeriksaan T3 juga dapat digunakan untuk monitoring pasien hipertiroid yang sedang mendapatkan terapi maupun pasien yang telah berhenti menggunakan obat anti tiroid, dan sangat bermanfaat untuk membedakan pasien eutiroid dan hipertiroid.

Pada wanita, kadar T3 akan meningkat selama kehamilan, terapi estrogen, dan pemakaian kontrasepsi hormonal. Jika peningkatan T3 diikuti oleh peningkatan TBG dan T4, maka perubahan ini tidak menggambarkan adanya kelainan tiroid.

Prinsip Pemeriksaan T3 metode ECLIA

Pemeriksaan T3 metode ECLIA menggunakan prinsip kompetitif dengan waktu pemeriksaan selama 18 menit.

Prosedur pemeriksaan

- i. Inkubasi pertama: 15 µl sampel, antibodi spesifik T3 dilabel dengan kompleks ruthenium
- ii. Inkubasi kedua: setelah ditambahkan T3 berlabel biotin dan mikropartikel yang dilapisi streptavidin, kompleks yang terbentuk berikatan dengan fase solid melalui interaksi biotin dengan streptavidin.
- iii. Campuran reaksi diaspirasi dalam *cell* pengukur dimana mikropartikel secara magnetic ditangkap pada permukaan elektroda. Substansi yang tidak berikatan dibuang melalui *Procell*. Aplikasi voltase (tegangan) pada elektroda kemudian menginduksi emisi chemiluminescent yang diukur oleh photomultiplier.
- iv. Hasil ditetapkan melalui kurva kalibrasi yang merupakan instrument yang dihasilkan secara khusus oleh kalibrasi 2 titik dan master kurva dihasilkan melalui reagen barcode.

Sampel sebaiknya tidak diambil pada pasien yang mendapatkan terapi biotin dosis tinggi (> 5mg/ hari). Penggunaan amiodarone juga menyebabkan penurunan pada hasil T3.

Rentang nilai untuk T3 adalah 1.3 – 3.1 nmol/L atau 0.8-2.0 ng/mL. dengan batas deteksi terendah adalah 0.300 nmol/L atau 0.195ng/mL.

Prinsip Pemeriksaan T3 metode ELFA

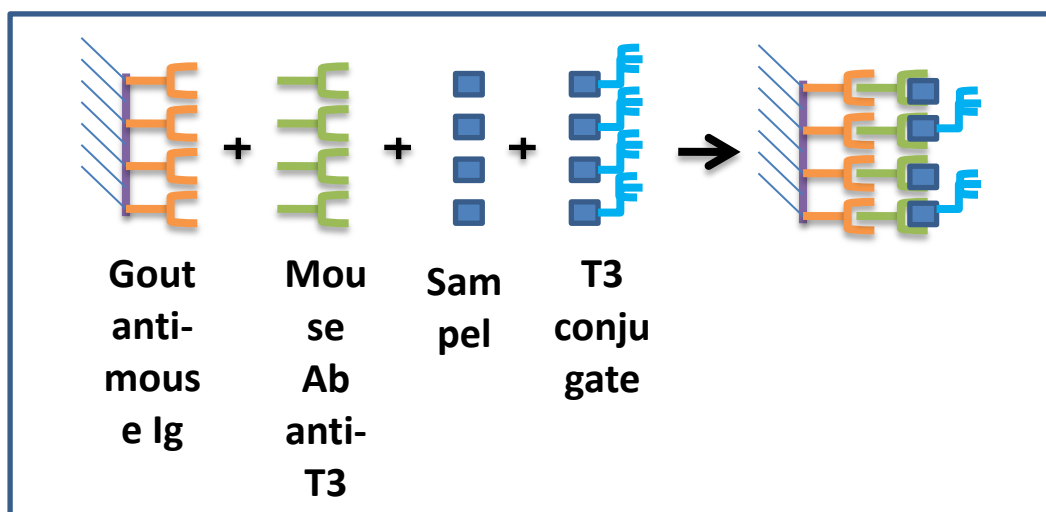
Pengujian T3 metode ELFA menggunakan prinsip kompetitif dengan waktu Pemeriksaan 40 menit. Sampel diambil dan di transfer ke dalam SPR yang mengandung antigen T3 berlabel fosfatase alkalin (*conjugate*). Kompetisi terjadi antara antigen sampel dan antigen berlabel untuk anti bodi T3 yang melapisi bagian dalam SPR. Kemudian ditambahkan substrat *4-methyl umbelliferyl fosfat*, enzim akan mengkatalisis reaksi hidrolisis substrat menjadi *4-methyl-umbelliferon* sebagai produk fluoresen dan di baca pada panjang gelombang 450 nm.

Prosedur Pemeriksaan

- i. Memindahkan reagen yang diperlukan dari lemari es ke temperatur ruangan paling tidak 30 menit.
- ii. Gunakan satu T3 dan satu strip SPR T3 untuk setiap sampel
- iii. Masukkan kalibrator, control dan sampel masing – masing sebanyak 100 µl
- iv. Masukkan SPR dan strip reagen ke dalam alat.
- v. Semua langkah pemeriksaan dilakukan secara otomatis oleh alat dalam waktu kira – kira 40 menit.
- vi. Setelah pengujian selesai, pindahkan SPR dan strip reagen dari alat.

Prinsip pemeriksaan T3 metode EIA

Antibodi kedua (*gout anti-mouse IgG*) dilekatkan pada *microwells*. Serum pasien, monoklonal antibodi anti T3 dari tikus dan *T3 conjugated* dengan *horseradish peroxidase* ditambahkan ke dalam *microwells*. Selama inkubasi, anti T3 antibodi tikus akan terikat pada pada antibodi kedua dalam wells, dan T3 dan *conjugated T3* berkompetisi untuk berikatan dengan antibodi anti T3. Setelah inkubasi 60 menit pada suhu kamar, *wells* dicuci 5 kali dengan air untuk menghilangkan konjugat T3 yang tidak terikat. Kemudian ditambahkan larutan substrat TMB dan diinkubasi selama 20 menit, sehingga timbul warna biru. Pembentukan warna biru dihentikan dengan menambahkan *stop solution* dan absorbans diukur secara spektrofotometrik pada 450 nm. Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan jumlah enzim yang ada dan berbanding terbalik dengan jumlah T3 yang tak berlabel, selanjutnya kadar T3 dalam sampel dapat dihitung berdasarkan pemeriksaan standar dengan cara yang sama.



Gambar 7. Prinsip Pemeriksaan T3

Prosedur pemeriksaan T3

1. Siapkan *microwells* sesuai jumlah sampel
2. Masukkan 50 μL standar, sampel dan kontrol pada *wells* yang sesuai
3. Tambahkan 50 μL reagen antiiodi dalam tiap *well*. Campur hingga rata selama 30 detik
4. Tambahkan 100 μL *working conjugate reagent* pada tiap *well*. Campur hingga rata selama 30 detik.
5. Inkubasi pada suhu kamar selama 60 menit.
6. Buang campuran inkubasi dengan cepat.
7. Cuci dan bilas 5 kali dengan *distilled* atau *deionized water*.
8. Hilangkan sisa air dengan *absorbent paper*.
9. Tambahkan 100 μL TMB *substrate solution* pada tiap *well*, campur selama 10 detik.
10. Inkubasi pada suhu kamar selama 20 menit
11. Hentikan reaksi dengan menambahkan 100 μL *stop solution* pada tiap *well*.
12. Campur selama 30 detik
13. OD dibaca pada 450 nm dengan *microwell reader* dalam 15 menit.

Penghitungan hasil

1. Hitung rata-rata absorbans (A_{450}) untuk tiap set standar, control dan sampel.
2. Buat kurva standar dengan meletakkan *mean* absorbans yang diperoleh untuk tiap standar terhadap konsentrasinya dalam ng/mL pada kertas gambar linear,

absorbans pada garis vertikal (sumbu y) dan konsentrasi pada garis horizontal (sumbu x)

3. Konsentrasi T3 dalam ng/mL ditentukan dengan memasukkan nilai absorbans tiap sampel ke dalam kurva standar.

Range pada individu normal berkisar 0,6-1,85 ng/mL. Pada umumnya, kadar T3 total dalam serum cenderung paralel dengan TBG. Peningkatan kadar T3 dapat terjadi pada penderita hipotiroid yang sedang mendapatkan terapi. Konsentrasi minimal yang dapat terdeteksi adalah 0,2 ng/mL.

Keterbatasan prosedur

1. Hasil yang benar dan akurat diperoleh jika prosedur pemeriksaan dilakukan dengan pemahaman penuh sesuai instruksi yang ada.
2. Prosedur pencucian sangat penting. Pencucian yang tidak benar akan menghasilkan presisi yang buruk dan pembacaan absorbans yang tinggi palsu.
3. Sampel serum yang lipemik, hemolisis atau keruh tidak dapat diperiksa.
4. Hasil yang diperoleh harus digunakan bersama dengan prosedur diagnosis yang lain dan informasi yang diperoleh klinisi.

PEMERIKSAAN T4

L-Thyroxine (T4) merupakan hormon yang disintesis dan disimpan dalam kelenjar tiroid. Proses pemecahan proteolisis *Thyroglobulin* akan melepaskan T4 ke dalam aliran darah. Lebih dari 99% T4 terikat pada 3 protein plasma secara

reversibel, yaitu : *Thyroxine binding globulin (TBG)* 70%, *thyroxine binding pre albumin (TBPA)* 20% dan albumin 10%. Sekitar 0,03% T4 yang berada dalam keadaan tidak terikat.

Penyakit yang mempengaruhi fungsi tiroid dapat menimbulkan gejala yang sangat bervariasi. Pengukuran T4 total dengan *immunoassay* merupakan metode skrining yang paling memungkinkan dan dapat dipercaya untuk mengetahui adanya gangguan tiroid pada pasien. Peningkatan kadar T4 ditemukan pada hipertiroidisme karena *Grave's disease* dan *Plummer's disease* pada akut dan subakut tiroiditis. Kadar T4 yang rendah berhubungan dengan hipotiroidisme kongenital, *myxedema*, tiroiditis kronis (*Hashimoto's disease*) dan beberapa kelainan genetik.

Prinsip pemeriksaan T4 dengan metode ECLIA

Pemeriksaan T4 metode ECLIA menggunakan prinsip kompetitif dengan waktu Pemeriksaan selama 18 menit.

Prosedur pemeriksaan

- i. inkubasi pertama: 15 ul sampel, dan antibodi spesifik T4 yang dilabel dengan kompleks ruthenium
- ii. Inkubasi kedua: setelah ditambahkan biotin dan mikropartikel yang dilapisi streptavidin, kompleks yang terbentuk berikatan dengan fase solid melalui interaksi biotin dengan streptavidin.

- iii. Campuran reaksi diaspirasi dalam *cell* pengukur dimana mikropartikel secara magnetic ditangkap pada permukaan elektroda. Substansi yang tidak berikatan dibuang melalui *Procell*. Aplikasi voltase (tegangan) pada elektroda kemudian menginduksi emisi chemiluminescent yang diukur oleh photomultiplier.
- iv. Hasil ditetapkan melalui kurva kalibrasi yang merupakan instrument yang dihasilkan secara khusus oleh kalibrasi 2 titik dan master kurva dihasilkan melalui reagen barcode.

Sampel sebaiknya tidak diambil pada pasien yang mendapatkan terapi biotin dosis tinggi ($> 5\text{mg/hari}$).

Rentang nilai untuk T4 adalah $64 - 164\text{ nmol/L}$ atau $4.8-12.7\text{ }\mu\text{g/mL}$. dengan batas deteksi terendah adalah 5.40 nmol/L atau 0.420 ng/mL .

Prinsip Pemeriksaan T4 metode ELFA

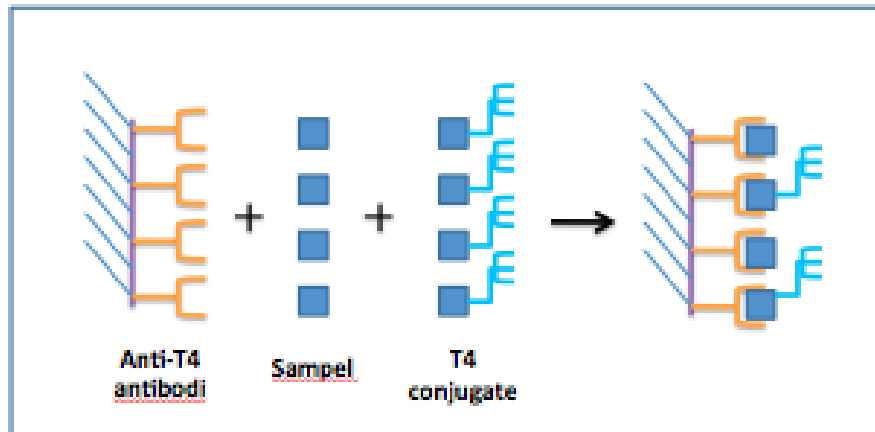
Pengujian T4 metode ELFA menggunakan prinsip kompetitif dengan waktu pemeriksaan 40 menit. Sampel diambil dan di transfer ke dalam SPR yang mengandung antigen T4 berlabel fosfatase alkalin (*conjugate*). Kompetisi terjadi antara antigen sampel dan antigen berlabel untuk antibodi T3 yang melapisi bagian dalam SPR. Kemudian ditambahkan substrat *4-methyl umbelliferyl fosfat*, enzim akan mengkatalisis reaksi hidrolisis substrat menjadi *4-methyl-umbelliferon* sebagai produk fluoresen dan di baca pada panjang gelombang 450 nm .

Prosedur Pemeriksaan

- i. Memindahkan reagen yang diperlukan dari lemari es ke temperatur ruangan paling tidak 30 menit.
- ii. Gunakan satu T4 dan satu strip SPR T4 untuk setiap sampel
- iii. Masukkan kalibrator, control dan sampel masing – masing sebanyak 200 μ l
- iv. Masukkan SPR dan strip reagen ke dalam alat.
- v. Semua langkah pemeriksaan dilakukan secara otomatis oleh alat dalam waktu kira – kira 40 menit.
- vi. Setelah pengujian selesai, pindahkan SPR dan strip reagen dari alat.

Prinsip pemeriksaan T4 EIA

Antibodi anti T4 dilekatkan pada *microtiter wells*. Serum pasien dan T4 yang telah dilabel dengan *horseradish peroxidase* ditambahkan ke dalam *microtiter wells*. Selama inkubasi, T4 dan T4 yang telah dilabel enzim akan berkompetisi untuk berikatan dengan dengan antibodi anti T4. Setelah inkubasi selama 60 menit pada suhu kamar, *wells* dicuci 5 kali dengan air untuk menghilangkan T4 berlabel enzim yang tidak terikat. Larutan substrat TMB ditambahkan dan diinkubasi selama 20 menit, sehingga terbentuk warna biru. Pembentukan warna biru dihentikan dengan menambahkan *stop solution* dan absorbans diukur secara spektrofotometrik pada 450 nm. Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan jumlah enzim yang ada dan berbanding terbalik dengan jumlah T4 yang tak berlabel, selanjutnya kadar T4 dalam sampel dapat dihitung berdasarkan pemeriksaan standar dengan cara yang sama.



Gambar 8. Prinsip pemeriksaan T4

Prosedur pemeriksaan T4

1. Siapkan *microwells* sesuai jumlah sampel
2. Masukkan 25 μL standar, sampel dan kontrol pada wells yang sesuai
3. Tambahkan 100 μL *working conjugate reagen* dalam tiap well.
4. Campur hingga rata selama 30 detik
5. Inkubasi pada suhu kamar selama 60 menit
6. Buang campuran inkubasi dengan cepat.
7. Cuci dan bilas 5 kali dengan *distilled* atau *deionized water*.
8. Hilangkan sisa air dengan *absorbent paper*.
9. Tambahkan 100 μL TMB *substrate solution* pada tiap *well*, campur selama 10 detik.
10. Inkubasi pada suhu kamar selama 20 menit
11. Hentikan reaksi dengan menambahkan 100 μL *stop solution* pada tiap *well*.
12. Campur hingga rata selama 30 detik

13. Absorbans dibaca pada 450 nm dengan *microwell reader* dalam 15 menit.

Penghitungan hasil

1. Hitung rata-rata absorbans (A450) untuk tiap set standar, kontrol dan sampel.
2. Buat kurva standar dengan meletakkan *mean* absorbans yang diperoleh untuk tiap standar terhadap konsentrasinya dalam ng/mL pada kertas gambar linear, absorbans pada garis vertikal (sumbu y) dan konsentrasi pada garis horizontal (sumbu x)
4. Konsentrasi T4 dalam ng/mL ditentukan dengan memasukkan nilai absorbans tiap sampel ke dalam kurva standar.

Kadar T4 rentang antara 5,0 - 13,0 ng/mL. Direkomendasikan agar setiap laboratorium menentukan kadarnya sendiri disesuaikan dengan keadaan geografis dan populasi yang ada. Konsentrasi minimal yang dapat terdeteksi adalah 0,4 ng/mL.

Keterbatasan prosedur

1. Hasil yang benar dan akurat diperoleh jika prosedur pemeriksaan dilakukan dengan pemahaman penuh sesuai instruksi yang ada.
2. Prosedur pencucian sangat penting. Pencucian yang tidak benar akan menghasilkan presisi yang buruk dan pembacaan absorbans yang tinggi palsu.
3. Hasil yang diperoleh harus digunakan bersama dengan prosedur diagnosis yang lain dan informasi yang diperoleh oleh klinisi.

PEMERIKSAAN TSH

Pemeriksaan kadar TSH plasma atau serum merupakan metode yang sensitif untuk mendiagnosis hipotiroidisme primer atau sekunder. TSH disekresi oleh lobus anterior kelenjar hipofisis (*pituitary*) dan mempengaruhi produksi dan pelepasan *thyroxine* dan *triiodothyronine* dari kelenjar tiroid. TSH merupakan glikoprotein dengan berat molekul ± 28.000 dalton, terdiri dari 2 subunit yang berbeda, *alpha* dan *beta*.

Konsentrasi TSH dalam darah sangat rendah, namun sangat penting untuk mengatur fungsi tiroid yang normal. Pelepasan TSH diatur oleh *TSH-releasing hormon (TRH)* yang diproduksi oleh hipotalamus. Kadar TSH dan TRH berbanding terbalik dengan kadar hormon tiroid. Jika kadar hormon tiroid dalam darah meningkat, maka hipotalamus akan mensekresi sedikit saja TRH sehingga TSH yang disekresi oleh hipofisis juga sedikit. Hal sebaliknya akan terjadi jika ada penurunan kadar hormon tiroid dalam darah. Proses ini dikenal sebagai mekanisme umpan balik (*negative feed back mechanism*) yang bertanggung jawab untuk mempertahankan kadar hormon dalam darah yang optimal.

TSH dan glikoprotein hipofisis seperti : *Luteinizing Hormon (LH)*, *follicle stimulating hormon (FSH)*, dan *human chorionic gonadotropin (hCG)*, memiliki rantai *alpha* yang identik. Rantai *beta* berbeda namun mengandung regio dengan urutan asam amino yang identik. Regio yang homolog ini dapat menyebabkan reaksi silang (*cross reaction*) dengan beberapa antisera TSH poliklonal. Penggunaan antibodi monoklonal pada pemeriksaan TSH dengan metode ELISA

akan dapat menghilangkan reaksi silang ini, sehingga mencegah terjadinya hasil tinggi palsu pada wanita menopause atau wanita hamil.

Prinsip Pemeriksaan TSH dengan metode ECLIA

Pemeriksaan TSH metode ECLIA menggunakan prinsip *sandwich* dengan waktu pemeriksaan selama 18 menit.

Prosedur pemeriksaan

- i. inkubasi pertama: 50 ul sampel, antibodi spesifik TSH monoclonal biotinylasi dan antibodi spesifik T4 yang dilabel dengan kompleks ruthenium membentuk kompleks *sandwich*.
- ii. Inkubasi kedua: setelah ditambahkan mikropartikel yang dilapisi streptavidin, kompleks yang terbentuk berikatan dengan fase solid melalui interaksi biotin dengan streptavidin.
- iii. Campuran reaksi diaspirasi dalam *cell* pengukur dimana mikropartikel secara magnetic ditangkap pada permukaan elektroda. Substansi yang tidak berikatan dibuang melalui *Procell*. Aplikasi voltase (tegangan) pada elektroda kemudian menginduksi emisi chemiluminescent yang diukur oleh photomultiplier.
- iv. Hasil ditetapkan melalui kurva kalibrasi yang merupakan instrument yang dihasilkan secara khusus oleh kalibrasi 2 titik dan master kurva dihasilkan melalui reagen barcode.

Sampel sebaiknya tidak diambil pada pasien yang mendapatkan terapi biotin dosis tinggi ($> 5\text{mg/ hari}$).

Rentang nilai untuk TSH adalah $0.270 - 4.20 \mu\text{IU/mL}$. dengan batas deteksi terendah adalah $0.005 \mu\text{IU/mL}$

Prinsip Pemeriksaan TSH metode ELFA

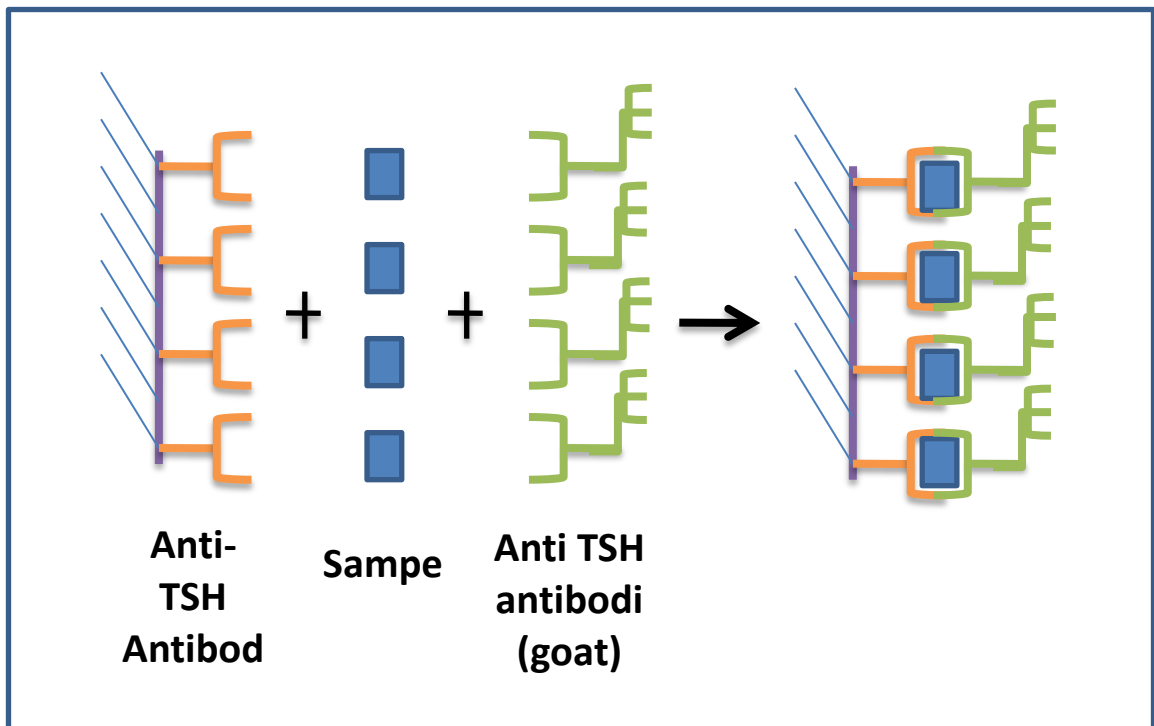
Pengujian TSH metode ELFA menggunakan prinsip *sandwich* dengan waktu Pemeriksaan 40 menit. Sampel diambil dan di transfer ke dalam SPR yang mengandung aantibodi TSH berlabel fosfatase alkalin (*conjugate*). Antigen menangkap anti antibodi yang dilapisi SPR dan membentuk kompleks *sandwich*. Komponen yang tidak terikat dieliminasi pada langkah penyucian. Kemudian ditambahkan substrat *4-methyl umbelliferyl fosfat*, enzim mengkatalisis reaksi hidrolisis substrat menjadi *4-methyl-umbelliferon* (produk fluoresen) dan di baca pada panjang gelombang 450 nm.

Prosedur Pemeriksaan

- i. Memindahkan reagen yang diperlukan dari lemari es ke temperatur ruangan paling tidak 30 menit.
- ii. Gunakan satu TSH dan satu strip SPR TSH untuk setiap sampel
- iii. Masukkan kalibrator, control dan sampel masing – masing sebanyak $200 \mu\text{l}$
- iv. Masukkan SPR dan strip reagen ke dalam alat.
- v. Semua langkah pemeriksaan dilakukan secara otomatis oleh alat dalam waktu kira – kira 40 menit.
- vi. Setelah pengujian selesai, pindahkan SPR dan strip reagen dari alat.

Prinsip pemeriksaan TSH dengan metode EIA

Pemeriksaan TSH berdasarkan prinsip ELISA menggunakan antibodi monoklonal terhadap TSH. *Mouse monoclonal anti TSH antibody* digunakan sebagai fase padat (dalam *microwells*). *Anti TSH antibody* dari *goat* digunakan dalam larutan enzim konjugat (*horseradish peroxidase*). Sampel akan bereaksi dengan 2 antibodi tersebut, sehingga molekul TSH akan diikat diantara fase padat dan *enzyme-linked antibody*. Setelah inkubasi 60 menit pada suhu ruang, *wells* dicuci dengan *diluted wash buffer* untuk menghilangkan antibodi berlabel yang tidak terikat. Ditambahkan *TMB substrate solution* dan diinkubasi selama 20 menit, sehingga terbentuk warna biru. Pembentukan warna biru dihentikan dengan menambahkan *stop solution*, sehingga warna berubah menjadi kuning. Konsentrasi TSH berbanding lurus dengan intensitas warna sampel. Absorbans diukur secara *spectrophotometric* pada 450 nm.



Gambar 9. Prinsip Pemeriksaan TSH

Prosedur pemeriksaan TSH

1. Siapkan *microwells* sesuai jumlah sampel
2. Masukkan 100 μL standar, sampel dan kontrol pada *wells* yang sesuai
3. Tambahkan 100 μL *enzyme conjugate* dalam tiap *well*.
4. Campur hingga rata selama 30 detik
5. Inkubasi pada suhu kamar (20-30°C) selama 60 menit
6. Buang campuran inkubasi dengan cepat.
7. Cuci dan bilas 5 kali dengan *wash buffer concentrate* (1x).
8. Hilangkan sisa air dengan *absorbent paper*.
9. Tambahkan 100 μL TMB *substrate solution* pada tiap *well*, campur selama 5 detik.

10. Inkubasi pada suhu kamar selama 20 menit
11. Hentikan reaksi dengan menambahkan 100 μL *stop solution* pada tiap *well*.
12. Campur hingga rata selama 30 detik
13. Absorbans dibaca pada 450 nm dengan *microwell reader* dalam 15 menit.

Penghitungan hasil

1. Hitung rata-rata absorbans (A_{450}) untuk tiap set standar, kontrol dan sampel.
2. Buat kurva standar dengan meletakkan mean absorbans yang diperoleh untuk tiap standar terhadap konsentrasinya dalam ng/mL pada kertas gambar linear, absorbans pada garis vertikal (sumbu y) dan konsentrasi pada garis horizontal (sumbu x)
3. Konsentrasi TSH dalam $\mu\text{IU/mL}$ ditentukan dengan memasukkan nilai absorbans tiap sampel ke dalam kurva standar.

Rata-rata kadar TSH dewasa normal adalah 1,6 (0,4 - 6,0) $\mu\text{IU/mL}$. Kadar yang rendah juga dapat terjadi akibat hipersekreksi T3 dan T4 pada *Grave's disease* atau tiroiditis. Diagnosis banding diperoleh dengan cara memeriksa kadar TSH dan fT4 dalam serum secara simultan. Konsentrasi minimal yang dapat terdeteksi adalah 0,2 $\mu\text{IU/mL}$.

Keterbatasan prosedur

1. Hasil yang benar dan akurat diperoleh jika prosedur pemeriksaan dilakukan dengan pemahaman penuh sesuai instruksi yang ada.

2. Prosedur pencucian sangat penting. Pencucian yang tidak benar akan menghasilkan presisi yang buruk dan pembacaan absorbans yang tinggi palsu.
3. Hasil yang diperoleh harus digunakan bersama dengan prosedur diagnosis yang lain dan informasi yang diperoleh oleh klinisi.

PEMERIKSAAN FREE T4

L-thyroxine (T4) atau *3,5,3',5'-tetraiodothyronine* merupakan hormon tiroid yang paling sering diukur untuk diagnosis fungsi tiroid. T4 mempunyai pengaruh utama terhadap sintesis protein dan konsumsi oksigen pada hampir semua jaringan, juga penting untuk pertumbuhan, perkembangan dan maturasi seksual.

T4 disintesis oleh kelenjar tiroid dan disekresikan ke dalam aliran darah. Disini, T4 akan berikatan dengan protein serum untuk transport ke dalam sel. Protein transpor yang utama adalah *Thyroxine Binding Globulin (TBG)* yang normalnya mengikat 80% T4. Protein lainnya yang juga berikatan dengan hormon tiroid adalah TBPA dan Albumin. Hanya 0,03% T4 yang bebas, disebut sebagai *Free T4 (fT4)* yang merupakan metabolit aktif, sehingga pemeriksaan kadar fT4 menjadi indikator dari status tiroid pasien.

Hipotiroidisme primer menyebabkan produksi T4 oleh kelenjar tiroid berkurang, sehingga kadar fT4 yang ada di sirkulasi juga rendah. Hipertiroidisme primer mengakibatkan produksi T4 yang berlebihan sehingga kadar fT4 meningkat.

Konsentrasi T4 total dalam serum tergantung pada kadar TBG pada sirkulasi. Kadar TBG dapat dipengaruhi oleh beberapa obat, hormon steroid, kehamilan,

dan bermacam penyakit non tiroid. Tes fungsi tiroid generasi awal, efek variasi konsentrasi TBG diatasi dengan menghitung *Free Thyroxine Index (FTI)*. FTI merupakan produk konsentrasi T4 total dan *Thyroid Uptake (TU)*, yang dapat menilai jumlah *binding site* pada TBG. Cara ini membutuhkan dua jenis pemeriksaan yang berbeda (T4 Total dan TU) namun dapat memberikan indikator yang lebih baik untuk status tiroid daripada T4 saja.

ft4 dibuat untuk mengetahui secara langsung adanya keseimbangan antara T4 dan T4 yang terikat TBG dalam serum. Metode ini dapat menggambarkan status tiroid secara umum dengan satu macam pemeriksaan.

Prinsip Pemeriksaan ft4 dengan metode ECLIA

Pemeriksaan ft4 metode ECLIA menggunakan prinsip kompetitif dengan waktu Pemeriksaan selama 18 menit.

- i. inkubasi pertama: 15 ul sampel, dan antibodi spesifik T4 yang dilabel dengan kompleks ruthenium
- ii. Inkubasi kedua: setelah ditambahkan biotin dan mikropartikel yang dilapisi streptavidin, kompleks yang terbentuk berikatan dengan fase solid melalui interaksi biotin dengan streptavidin.
- iii. Campuran reaksi diaspirasi dalam *cell* pengukur dimana mikropartikel secara magnetik ditangkap pada permukaan elektroda. Substansi yang tidak berikatan dibuang melalui *Procell*. Aplikasi voltase (tegangan) pada elektroda kemudian menginduksi emisi chemiluminescent yang diukur oleh photomultiplier.

- iv. Hasil ditetapkan melalui kurva kalibrasi yang merupakan instrument yang dihasilkan secara khusus oleh kalibrasi 2 titik dan master kurva dihasilkan melalui reagen barcode.

Sampel sebaiknya tidak diambil pada pasien yang mendapatkan terapi biotin dosis tinggi ($> 5\text{mg/hari}$).

Rentang nilai untuk fT4 adalah $12 - 22 \text{ pmol/L}$ atau $0.93 - 1.7\text{ng/dL}$, dengan batas deteksi terendah adalah 0.300 pmol/L atau 0.023ng/dL .

Prinsip Pemeriksaan fT4 metode ELFA

Pengujian fT4 metode ELFA menggunakan prinsip kompetitif dengan waktu Pemeriksaan 40 menit. Sampel diambil dan di transfer ke dalam SPR yang mengandung antigen fT4 berlabel fosfatase alkalin (*conjugate*). Kompetisi terjadi antara antigen sampel dan antigen berlabel untuk antibodi fT4 yang melapisi bagian dalam SPR. Kemudian ditambahkan substrat *4-methyl umbelliferyl fosfat*, enzim akan mengkatalisis reaksi hidrolisis substrat menjadi *4-methyl-umbelliferon* sebagai produk fluoresen dan di baca pada panjang gelombang 450 nm.

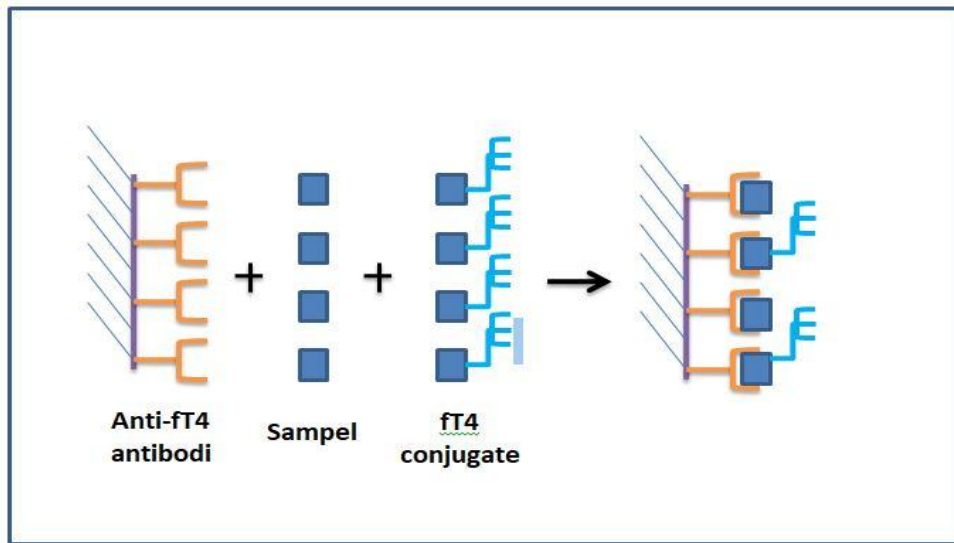
Prosedur Pemeriksaan

- i. Memindahkan reagen yang diperlukan dari lemari es ke temperatur ruangan paling tidak 30 menit.
- ii. Gunakan satu fT4 dan satu strip SPR fT4 untuk setiap sampel
- iii. Masukkan kalibrator, control dan sampel masing – masing sebanyak $100 \mu\text{l}$

- iv. Masukkan SPR dan strip reagen ke dalam alat.
- v. Semua langkah pemeriksaan dilakukan secara otomatis oleh alat dalam waktu kira – kira 40 menit.
- vi. Setelah pengujian selesai, pindahkan SPR dan strip reagen dari alat.

Prinsip pemeriksaan fT4 dengan metode EIA

Pemeriksaan fT4 menggunakan prinsip *solid phase competitive enzyme immunoassay*. Sampel serum pasien, standar dan *Thyroxine Enzyme Conjugate Working Reagent* ditambahkan pada *well* yang telah di-*coated* dengan antibodi monoklonal anti T4. fT4 yang ada pada spesimen pasien dan T4 berlabel *conjugate* akan berkompetisi untuk berikatan dengan antibodi. Setelah inkubasi selama 60 menit pada suhu kamar, *wells* dicuci untuk menghilangkan T4 *conjugate* yang tidak terikat. Larutan H₂O₂/TMB ditambahkan dan diinkubasi selama 20 menit hingga terbentuk warna biru. Pembentukan warna biru dihentikan dengan menambahkan 3N HCl dan absorbans dibaca secara spektrofotometrik pada 450 nm. Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan jumlah enzim yang ada dan berbanding terbalik dengan jumlah fT4 pada sampel, selanjutnya kadar fT4 dalam sampel dapat dihitung berdasarkan pemeriksaan standar fT4 dengan cara yang sama.



Gambar 10. Prinsip Pemeriksaan ft4

Prosedur pemeriksaan T4

1. Siapkan *microplate wells* untuk tiap standar, kontrol dan spesimen pasien untuk diperiksa secara duplikat.
2. Masukkan 50 μL standar, sampel dan kontrol pada *wells* yang sesuai
3. Tambahkan 100 μL larutan *Thyroxine enzyme conjugate* dalam tiap well.
4. Campur hingga rata selama 20-30 detik
5. Inkubasi pada suhu kamar selama 60 menit
6. Buang campuran inkubasi dengan cepat. Cuci dan bilas 5 kali dengan distilled atau deionized water. Hilangkan sisa air dengan absorbent paper.
7. Tambahkan 200 μL *working substrate solution* (reagen A:B= 1:1) pada tiap well, campur selama 10 detik.
8. Inkubasi pada suhu kamar dengan kondisi gelap selama 20 menit

9. Hentikan reaksi dengan menambahkan 50 μL *stop solution* (3N HCl) pada tiap *well*.
10. Campur hingga rata selama 30 detik
11. Absorbans dibaca pada 450 nm dengan *microwell reader* dalam 30 menit.

Penghitungan hasil

1. Hitung rata-rata absorbans (A450) untuk tiap set standar, kontrol dan sampel.
2. Buat kurva standar dengan meletakkan mean absorbans yang diperoleh untuk tiap standar terhadap konsentrasinya dalam ng/mL pada kertas gambar linear, absorbans pada garis vertikal (sumbu y) dan konsentrasi pada garis horizontal (sumbu x)
3. Konsentrasi fT4 dalam ng/mL ditentukan dengan memasukkan nilai absorbans tiap sampel ke dalam kurva standar.

Rentang kadar fT4 antara 0,8 - 2,0 ng/dL. Perubahan konsentrasi *serum binding protein* pada umumnya akan menyebabkan perubahan yang sama pada konsentrasi T4 total, sedangkan kadar fT4 yang secara fisiologis aktif tetap tidak berubah pada individu yang eutiroid. Untuk itu, pemeriksaan konsentrasi fT4 dapat memberikan penilaian yang lebih akurat untuk penilaian status tiroid daripada pemeriksaan T4 total. Peningkatan konsentrasi fT4 mengindikasikan hipertiroidisme dan konsentrasi yang rendah mengindikasikan hipotiroidisme.

Keterbatasan prosedur

1. Kadar fT4 berkorelasi dengan status tiroid, namun ada beberapa situasi yang menyebabkan interpretasi hasil fT4 menjadi sulit dan pemeriksaan fT4 tidak bisa menjadi satu-satunya dasar penentuan status tiroid, meskipun pada pemeriksaan fT4 yang paling dapat dipercaya bisa tidak benar pada variasi *serum binding protein* yang ekstrim dan faktor lainnya.
2. Kadar hormon tiroid yang normal tidak menyingkirkan penyakit tiroid dan pembesaran kelenjar tiroid *diffus* atau *nodular* dapat terlihat pada pasien eutiroid.
3. Banyak kasus selain kelainan tiroid yang memberikan kelainan konsentrasi fT4 di serum.
4. Pada pasien yang mendapatkan terapi heparin, keseimbangan antara fT4 dan T4 terikat TBG akan terpengaruh. Terapi heparin dapat meningkatkan konsentrasi *non-esterified fatty acid* yang dapat menggantikan T4 pada *serum binding protein* dan hal ini menyebabkan peningkatan nilai fT4. *Phenytoin*, *salysilate* dan beberapa obat lain juga dapat mempengaruhi ikatan antara T4 dan TBG dengan cara yang hampir sama. Yang harus diperhatikan untuk melakukan interpretasi terhadap hasil pemeriksaan fT4 pada pasien dengan terapi heparin atau obat lain adalah efek terhadap ikatan T4 dengan serum protein.
5. Konsentrasi TBG akan terganggu dengan peningkatan *estrogen*, *anabolic steroid*, *androgens*, *glukocorticoids* dan kehamilan. Penyakit yang berat,

stress pascabedah, kelainan genetik dan hepatitis, juga dapat mempengaruhi konsentrasi TBG, yang tentunya juga akan berdampak pada kadar fT4.

6. *Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia*, auto-antibodi terhadap T4 dan *analbuminemia* dapat menyebabkan peningkatan T4 total namun tidak mempengaruhi kadar fT4 kecuali pasien mendapatkan terapi T4
7. Pengobatan hipotiroidisme dengan *L-thyroxine* dapat menyebabkan kelainan korelasi antara status klinis dan fT4. Konsentrasi fT4 dapat meningkat pada kasus ini.
8. Sampel yang hemolisis berat, lipemik, atau ikterik dapat menyebabkan hasil tidak akurat. Jika memungkinkan, sebaiknya diambil spesimen baru dengan kualitas yang lebih baik.

RINGKASAN

Pemeriksaan hormon tiroid meliputi pemeriksaan T3, T4, TSH dan FT4. Pemeriksaan terhadap hormon tiroid mulai berkembang setelah diperkenalkan teknik *radioimmunoassay* (RIA) pada awal tahun 1970-an, diikuti dengan *immunoradiometric assay* (IRMA), *enzyme-linked immunoassay* (ELISA), *enzyme-linked immunofluorescence assay* (ELFA) dan *enzyme immunoassay* (EIA), serta yang terbaru *electrochemiluminescent assay* (ECLIA). Cara ECLIA menjadi metode yang paling peka dibandingkan yang terdahulu. Cara ini dikembangkan sejak akhir tahun 1980-an dan pada Kursus *Laboratory Endocrinology* di Singapore tahun 1989 sudah dinyatakan sebagai metode yang menjanjikan untuk analisis hormon. Kepekaan bergeser dari kadar $\mu\text{g/dL}$ menjadi ng/dL bahkan pg/gL . Cara ini sudah diterapkan pada otomasi (*automated analyzer*). Dengan demikian, selain makin peka, juga ketelitian dan ketepatan analisis hormon makin baik.

DAFTAR PUSTAKA

Anwar R. 2007, Fungsi dan Kelainan Kelenjar Tiroid, Sub Bagian Fertilisasi dan Endokrinologi Universitas Padjajaran, Bandung, hal 1-65

COBAS manual user. Roche Diagnostics 2016. Available at : www.roche.com

Pemeriksaan pada Penyakit Tiroid, Divisi Metabolik Endokrin Universitas Indonesia [online] Available at : <http://klinik.tiroid.com>

Sobotta 1996, Atlas Anatomi Kelenjar Tiroid

Suryaatmadja M. 2010, Tiroid : Faal dan Kelainan, ABC Laboratorium Amerind Bio-Clinic, Jakarta [online] Available at : [http://Tiroid: Faal dan Kelainan_AmerindBio-Clinic.htm](http://Tiroid:Faal_danKelainan_AmerindBio-Clinic.htm)

Suryaatmadja M. 2010, Tiroid : Pemeriksaan Laboratorium, ABC Laboratorium Amerind Bio-Clinic, Jakarta [online] Available at : [http://Tiroid: Pemeriksaan Laboratorium_AmerindBio-Clinic.htm](http://Tiroid:PemeriksaanLaboratorium_AmerindBio-Clinic.htm)

Thyrolisa Free T4 Enzyme Immunoassay for The Quantitative Determination of Free Thyroxine (fT4) concentration in Human Serum, Indec Diagnostics, Jakarta

Thyrolisa T3 Enzyme Immunoassay for The Quantitative Determination of Triiodothyronine (T3) in Human Serum, Indec Diagnostics, Jakarta

Thyrolisa T4 Enzyme Immunoassay for The Quantitative Determination of Total Thyroxine (T4) in Human Serum, Indec Diagnostics, Jakarta

Thyrolisa TSH Enzyme Immunoassay for The Quantitative Determination of Thyroid Stimulating Hormon (TSH) in Human Serum, Indec Diagnostics, Jakarta

Yahya H 2008, Hormon Tiroid, Harun Yahya International [online] Available at : http://www.harun_yahya.com/indo

