

PANZERAN

**UJI IMUNOPEROKSIDASE TAK LANGSUNG
DALAM DIAGNOSIS PENYAKIT
TUBERKULOSIS PARU**



Oleh :

Indro Handojo* , Melania Adimasta , R. A. Handojo*****

* Bagian Patologi Klinik F.K. Unair / RS Dr. Sutomo Surabaya

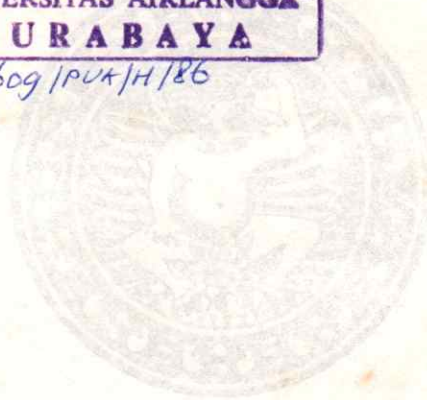
** Fakultas Farmasi Unair, Surabaya

*** BP 4 Malang.

UJI IMUNOPEROKSIDASE TAK LANGSUNG
DALAM DIAGNOSIS PENYAKIT
TUBERKULOSIS PARU

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1609/PUK/H/86



UJI IMUNOPEROKSIDASE TAK LANGSUNG DALAM
DIAGNOSIS PENYAKIT TUBERKULOSIS PARU

Indro Handoyo[✉], Melania Adimasta[✉] dan R.A. Handoyo[✉]

PENDAHULUAN

Tidak dapat diragukan lagi bahwa penyakit tuberkulosis paru di Indonesia, sampai dewasa ini, masih merupakan masalah kesehatan masyarakat, yang ditandai oleh adanya angka penularan yang tinggi pada golongan umur 14 tahun (7, 22) dan belum adanya kecenderungan penurunan yang cukup berarti dari angka penularan per tahun (7, 9).

Permasalahan tersebut diatas diwarnai pula oleh adanya angka sakit tuberkulosis paru yang tinggi, baik didaerah perkotaan maupun didaerah pedusunan (22).

Usaha pemberantasan/penanggulangan penyakit TB paru terdiri dari unsur pencegahan melalui imunisasi dengan BCG dan unsur pengobatan terhadap kasus-kasus yang ditemukan sakit berhubung adanya keluhan-keluhan yang khas TB paru dan didasarkan pada penemuan basil tahan asam pada pemeriksaan dahak (7, 9).

Dengan demikian maka penemuan kasus (case finding) merupakan unsur yang penting dari keberhasilan pelaksanaan program pengobatan TB paru yang perlu ditunjang dengan pengadaan sarana yang mudah, murah dan memastikan; dengan lain kata pengadaan sarana diagnosis yang tepat-guna dan berdaya-guna.

Sarana-sarana diagnosis yang sampai dewasa ini dipakai dalam pemberantasan, masing-masing masih mempunyai keterbatasannya sendiri, baik dari segi sensitifitasnya (bakteriologis),

✉ Bagian Patologi Klinik F.K. Unair/RS Dr. Soetomo, Surabaya

✉ Fakultas Farmasi Unair, Surabaya

✉ BP 4 Malang.

spesifisitasnya (radiografis), presisinya (bakteriologis dan radiografis) maupun segi kepraktisannya (radiografis dan perbenihan dahak).

Sedangkan uji tuberkulin lebih memastikan fakta penularan daripada fakta morbiditas (3, 18, 20).

Keterbatasan-keterbatasan sarana diagnosis tersebut di atas mendorong usaha penemuan sarana diagnosis baru yang dititik beratkan pada pemeriksaan imunologis.

Banyak usaha telah dilakukan untuk menemukan suatu uji serologik yang baik, namun sebegitu jauh belum ada yang memuaskan (4, 5, 6, 10, 11, 12, 14).

Uji imunofluorescence (13) dan uji RIA (2) walaupun amat sensitif, tetapi tidak praktis untuk dipakai di lapangan (10, 17). Sedangkan uji ELISA (10, 11) walaupun lebih praktis namun sensitifitas (62%) dan spesifisitasnya (74,3%) masih belum memadai.

Disamping itu masih diperlukan alat " micro-ELISA reader " yang hanya dimiliki oleh rumah sakit yang besar saja (10).

Berpijak pada dasar ini. maka sejak tahun 1983, di Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran UNAIR / R.S. Dr. Soetomo , telah dikembangkan suatu uji serologik yang baru untuk diagnosis TB paru yaitu uji imunoperoksidase tak langsung (indirect immunoperoxidase test) yang dapat dilaksanakan sampai jenjang PUSKESMAS.

Tujuan dari penelitian ini ialah untuk menilai kemampuan dari uji imunoperoksidase tak langsung dalam menegakkan diagnosis penyakit TB paru yang aktif.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian laboratorik ini dikerjakan terhadap serum yang berasal dari 46 penderita TB paru, yang sepanjang anamnesis yang cermat, belum pernah mendapatkan pengobatan anti-TB (virgin - cases) dan dari 90 orang bukan TB (40 orang sehat dengan tes Mantoux positif, 30 penderita penyakit paru lain bukan TB, 1 penderita lepra type L, 5 ibu hamil dan 8 penderita rheumatoid - arthritis, 3 penderita tumor paru, 2 penderita lymphadenitis dan 1 "contact person").

Diagnosis TB paru dalam penelitian ini ditegakkan atas dasar hasil pemeriksaan-pemeriksaan :

1. Bakteriologi pada dahak, yang menunjukkan adanya hasil tahan asam pada sediaan langsung dan / basil TB pada perbenihan.
2. Radiografi, yang menunjukkan adanya kelainan yang relevan untuk TB.

Pentahapan

Tahap I

Dalam tahap I ini diperiksa serum dari 40 orang sehat dewasa yang terdiri dari 23 orang perawat dari BP 4 (Balai Pemberantasan Penyakit Paru) Malang dan 17 orang mahasiswa Fakultas Kedokteran UNAIR Surabaya, untuk mencari batas atas nilai normal pada orang bukan TB.

Batas atas nilai normal ditentukan dari pengenceran serum yang tertinggi yang masih memberi hasil yang positif.

Untuk keperluan penelitian tahap selanjutnya, dipakai derajat pengenceran serum, satu tahap (dua kali = two-fold dilution)

diatas batas atas nilai normal uji imunoprosidase tak langsung tersebut.

Tahap II -

Dalam tahap ini diperiksa serum dari 46 penderita TB paru dan 50 penderita bukan TB yang terdiri dari 30 penderita paru dengan keluhan yang mirip TB, 1 penderita lepra type L, 5 ibu hamil, 8 penderita rheumatoid arthritis, 3 penderita tumor paru, 2 penderita lymphadenitis & 1 "contact person".

Pada semua serum tersebut dilakukan uji imunoprosidase tak langsung dengan menggunakan 3,3 - Diaminobenzidin (DAB) sebagai bahan kromogen dan cat methylen biru untuk pengecatan kontras (counter staining).

Sebagai antigen dipakai M. tuberculosis var. bovis BCG (Glaxo) yang dihancurkan secara ultrasonik dan dipisahkan dari fragmen dindingnya dengan ultracentrifuge dan diambil supernatannya (8).

Antigen yang diproses dengan cara ini, kemudian didialisa selama terhadap larutan dapar acetat dan selanjutnya dipolimerisasi kan menurut cara Avrameas dan Ternynck (1).

Sebagai perekat antigen dipakai suspensi 5% yolk sac dalam larutan dapar fosfat dan sebagai fiksatif dipakai acetone.

Sebagai kenyalat dipakai ikatan goat antihuman Ig G - HRP.

Tiap seri pemeriksaan harus disertai dengan kontrol, baik kontrol positif (pool sera dari penderita-penderita TB paru dengan hasil pemeriksaan bakteriologi, radiografi dan tes Mantoux yang positif), kontrol negatif (poolsera dari bayi sehat dengan

tes Mantoux negatif) dan kontrol substitusi (non immune - negative control serum dari Ortho diagnostics).

Dalam hal ini, serum kontrol positif harus memberikan hasil yang positif, serum kontrol negatif dan serum kontrol substitusi harus memberikan hasil yang negatif. Bila pada suatu seri pemeriksaan terdapat penyimpangan dari yang tersebut diatas, maka seri pemeriksaan tersebut harus diulang.

Pembacaan dilakukan dengan mikroskop cahaya biasa . Uji - imunoperoksidase tak langsung dikatakan positif bila antigen berwarna coklat cerah pada latar belakang yang biru.

--

H A S I L

Dari hasil pemeriksaan yang dilakukan terhadap 40 serum orang dewasa sehat dengan uji tuberkulin yang positif, didapatkan bahwa batas atas nilai normol uji imunoperoksidase tak langsung ialah 1 : 640.

Atas dasar ini, maka semua serum penderita TB paru, penderita penyakit lain dan ibu hamil non TB diperiksa pada pengenceran 1 : 1.280.

Dari 46 serum penderita TB paru, 43 sera (93 %) menunjukkan hasil yang positif, sedangkan 45 dari 50 sera (90 %) penderita bukan TB menunjukkan hasil yang negatif.

Ke 5 sera penderita bukan TB yang memberikan hasil yang positif berasal dari penderita-penderita sebagai berikut :

- 1 penderita rheumatoid arthritis (positif amat lemah),
- 1 penderita bronchitis (positif lemah),
- 1 penderita asthma-bronchiale (positif amat lemah),
- 1 penderita chronic obstructive pulmonary disease (positif lemah),
- dan 1 penderita coryza (positif amat lemah).

PEMBAHASAN

Aseptibilitas dari suatu uji serologik ditentukan oleh beberapa faktor sebagai berikut (10, 17) :

1. Sensitifitas

Dari hasil penelitian ini, ternyata uji imunoperoksidase, merupakan uji serologik untuk TB paru yang amat sensitif (93%). Sensitifitasnya dapat dikatakan setara dengan uji RIA (91,5%)

2. Akurasi

Akurasi dari suatu uji laboratorik amat tergantung dari spesifitasnya. Seperti dikemukakan dari hasil penelitian ini , maka spesifitas dari uji serologik ini pada TB paru adalah cukup tinggi (90%).

Dibandingkan dengan uji RIA (2) spesifisitasnya tidak mengecewakan (spesifisitas uji RIA 81,1%). Dibandingkan dengan uji ELISA, yang memakai antigen yang sama (10), uji imunoprosidase ini memiliki spesifitas yang jauh lebih tinggi . Bahkan pada penderita Lepra (satu-satunya dalam penelitian ini) uji serologik ini memberikan hasil yang negatif sedangkan dengan serum yang sama uji ELISA memberikan hasil yang positif. Pada 3 penderita dengan tumor paru, uji serologik inipun memberikan hasil yang negatif. Demikian pula pada semua ibu hamil (2 positif dengan uji ELISA) dan 7 diantara 8 penderita rheumatoid arthritis (3 memberikan hasil positif dengan uji ELISA). Pada 6 penderita TB paru yang telah sembuh setelah pengobatan anti-TB selama 6 bulan, semuanya memberikan hasil uji IPO yang negatif.

3. Presisi

Oleh karena uji imunoperoksidase ini merupakan uji serologik yang semikuantitatif, maka presisi dari uji serologik ini tidak dapat dihitung secara statistik. Namun dengan dipakainya 3 macam kontrol dalam setiap seri pemeriksaan telah menjamin presisi yang baik dari uji imunoperoksidase ini.

4. Kepraktisan

Pelaksanaan dari uji serologik ini cukup sederhana ; tidak - membutuhkan keahlian yang terlalu tinggi. Waktu pemeriksaannya pun tidak lama ; kira-kira sekitar 2 jam.

Juga tidak diperlukan peralatan yang khusus, cukup dengan mikroskop cahaya biasa yang dimiliki oleh setiap PUSKESMAS. Bahkan suatu inkubator tidak juga dibutuhkan. Inkubasi dapat dilaksanakan di suhu ruang. Satu-satunya alat tambahan yang masih dibutuhkan ialah almari es, yang juga dimiliki oleh sebagian besar dari PUSKESMAS.

Serum penderita yang dibutuhkan amat sedikit yaitu tidak lebih dari 20 μ l/tes.

Harga dari uji serologik ini diperkirakan tidak lebih dari - Rp. 400,- per tes; masih dalam jangkauan rakyat jelata.

Bila ditinjau secara umum, uji ELISA sebenarnya setara dengan uji imunoperoksidase tak langsung. Perbedaan yang menyolok dari hasil kedua uji serologik ini walaupun memakai antigen yang bersumber sama dan dikerjakan oleh petugas yang sama pula, mungkin terletak pada polimerisasi dan dialisa dari antigen tersebut sebelum dipakai untuk uji imunoperoksidase.

Dialisa sendiri sudah merupakan pemurnian dari antigen, ditambah lagi dengan dengan polimerisasi yang disamping merupakan pemurnian, juga meningkatkan daya imuno-absorbant dari antigen tersebut.

Menurut Avrameas (1), dengan cara polimerisasi, daya imuno - absorbent dari suatu antigen dapat meningkat sampai 10 kalinya. Antigen semacam ini, stabil selama 8 bulan pada 4°C (1).

Spesifisitas dari uji imunoperoksidase ini mungkin masih dapat ditingkatkan lagi, apabila antigen yang dipakai adalah M. tuberculosis var. human (H37Rv) yang diisolasi dari penderita TB paru di Indonesia.

Pengalaman kami dengan uji serologik Widal pada demam tifoid - menunjukkan bahwa dengan menggunakan antigen yang berasal dari S. typhi yang diisolasi dari penderita demam tifoid di ruangan menular, didapatkan hasil yang jauh lebih sensitif dan spesifik (bermakna) daripada bila dipakai antigen yang dibuat dari S. typhi strain import atau strain lokal yang sudah lama (sejak sebelum perang dunia ke 2).

Usaha penelitian kearah ini sedang dilakukan di Bagian kami.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Avrameas, S. and Ternynck, T. Biologically Active Water - insoluble Protein Polymers. I. Their Use for Isolation of Antigens and Antibodies. The Journal of Biological Chemistry. 242. 1651, 1967.
2. Bardana, E.J. Jr. et al. Universal Occurrence of Antibodies to Tubercle Bacilli in Sera from Non-tuberculous and Tuberculous individuals. Clinical and Experimental Immunology. 13. 65, 1973.
3. Danusantoso, H. Patogenesis Tuberkulosis (Paru) dan Hubungannya dengan Usaha Pemberantasan. Medika. 9. 173, 1979.
4. Daniel, T.M. & Baum, G.L. The Immunoglobulin Response to Tuberculosis. Molecular Characterization of Hemagglutinating Antibody to Tuberculopolysaccharide in Sera from Patients with Tuberculosis. American Review of Respiratory Disease . 98. 677, 1963.
5. Freedman, S.O. et al. Circulating Ig G (7 S) Hemagglutinins in Pulmonary Tuberculosis. American Review of Respiratory Disease. 94. 896, 1966.
6. Froman, S. et al. Gel Double Diffusion Testing for Tuberculosis. The American Journal of Clinical Pathology. 42. 340, 1964.
7. Gunardi A.S. Pemberantasan Penyakit TB Paru di Indonesia. M.K.I. 34. 61, 1984.

8. Grange, J.M. A Study of The Humoral Immune Response in Tuberculosis. A Thesis submitted for the degree of Master of Science in Immunology. Chelsea College, University of London, 1981.
9. Handojo, R.A. Review Hasil-Hasil Penelitian Mengenai Tuberculosis Paru. Laporan kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Dep. Kes. R.I. Balai Pemberantasan Penyakit Paru-paru (BP4) Malang, 1978.
10. Handojo, I. Penentuan Kadar Antibodi Terhadap Basil TB dengan Cara ELISA mikro. Naskah lengkap KONAS IAPI ke VIII. Ujung - Pandang, Mei , 1984.
11. Kardjito, T., Handojo, I. & Grange , J.M. Diagnosis of Active Tuberculosis by Immunological Methods. 1. The effect of Tuberculin Reactivity and Previous BCG Vaccination on the Antibody Level Determined by ELISA. Tubercle. 63.269, 1982.
12. Kent, D.C. Immunologic Studies in Tuberculosis : Utilizing Agar Gel Double-Diffusion Precipitin System. The American Journal of Medical Sciences. 252. 212, 1966.
13. Mahfouz, et al. An Immunofluorescence Test for Detection of Antibodies to Mycobacterium tuberculosis. Tubercle. 61. 1, 1980.
14. Nassau, E. and Merrick, A.J. The Fluorescent Antibody Test in Human Tuberculosis: A Pilot Study. Tubercle. 51.430,1970.
15. Parlett, R.C. & Youmans, G.P. An Evaluation of The Specificity and Sensitivity of a Double Diffusion Test for Tuberculosis. A Doubleblind study. American Review of Respiratory Disease. 80. 153, 1959.