

35  
PAMERAN

01 NOV 1995

PENGARUH SHAKER PADA ELISA MAKRO DAN MIKRO  
PADA PENENTUAN IMUNOGLOBULIN G YANG SPESIFIK  
TERHADAP MIKOBACTERIUM

SELESAI



1991

Jusak Nugraha, Indro Handojo  
Lab. Patologi Klinik F.K. Unair Surabaya

0004/1994/3/1/1/1

1. TUBERCULOSIS
2. DIAGNOSIS, LABORATORY

KRU  
KK  
616.995 075  
Nug  
P

PENGARUH SHAKER PADA ELISA MAKRO DAN MIKRO  
PADA PENENTUAN IMUNOGLOBULIN G YANG SPESIFIK  
TERHADAP MIKROBAKTERIUM



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS INDONESIA  
SURABAYA

1991

Jusak Nugraha, Indro Handojo  
Lab. Patologi Klinik F.K. Unair Surabaya

PENGARUH SHAKER PADA ELISA MAKRO DAN MIKRO  
PADA PENENTUAN IMUNOGLOBULIN G YANG SPESIFIK  
TERHADAP MIKOBACTERIUM

Jusak N, Indro H.

Lab. Patologi Klinik F.K. Unair Surabaya.

PENDAHULUAN

Penentuan kadar IgG spesifik terhadap mikobakterium telah diketahui dapat membantu menegakkan diagnosa penyakit tuberkulosis (3).

Kardjito dengan cara Elisa mikro memperoleh hasil sensitifitas = 62 % dan spesifisitas = 74 % (5).

Handojo I (4) telah menemukan uji PAP ( peroksidase anti peroksidase ) untuk penentuan IgG spesifik.

Ternyata PAP merupakan sarana diagnostik yang terandal ( Sensitifitas = 98,3 % dan spesifisitas = 94,2 % ).

Chandler telah mengembangkan metoda Elisa yang lebih spesifik dan lebih cepat dengan "reflow" melalui pipa kapiler untuk penentuan B-HCG (1).

Terbukti "reflow" ini dapat meningkatkan penangkapan antigen oleh antibodi yang dilekatkan pada dinding dalam tabung kapiler.

Pada metoda Elisa, dengan memakai "shaker" selama masa inkubasi diharapkan dapat meningkatkan kemungkinan pertemuan antara antigen dan antibodi sehingga dapat meningkatkan sensitifitas dari tes Elisa terhadap Mikobakterium.

00041/1994/3/1/1/1

Sebagai bahan dipakai serum dari kelompok normal dan kelompok penderita tuberkulosis. Serum-serum ini dibagi dua yaitu yang akan diperiksa dengan Elisa ( makro dan mikro ) tanpa shaker selama inkubasi dan yang akan diperiksa memakai "shaker" selama inkubasi.

Sebagai kelompok normal dipilih perawat dan dokter yang bekerja pada BP4 Malang yang disaring melalui uji PAP. Sebagai kelompok penderita dipilih dari penderita baru yang dewasa ( usia 15 tahun ) yang datang ke BP4 dengan pemeriksaan mikroskopis dahak positif, biakan dahak positif dan pemeriksaan radiologis foto toraks.

Serum yang didapat disimpan dalam aliquot kecil - kecil pada minus 20 derajat Celcius ( beku ) sampai pelaksanaan tes.

Penentuan kadar IgG dengan Elisa mikro dilakukan dengan cara yang sama seperti Elisa mikro yang dilakukan oleh Handojo I dkk dan Kardjito dkk (5) dari cara Nassau dan Grange (3).

Elisa makro dilakukan seperti Elisa mikro dengan beberapa modifikasi yaitu dipakai tabung polistiren sebagai pengganti "microtiter plate" dan volume reagens yang dipakai sebanyak 3 kali dari yang dipakai Elisa mikro.

Cara pemeriksaan Elisa mikro ( Nassau dan Grange ) :

- a. 0,2 ml antigen kedalam "microtiter plate".
- b. Inkubasi dalam kotak lembab selama semalam pada suhu 4 C.
- c. Dilakukan pencucian 3 kali dengan dapar PBS-tween dan dikeringkan.
- d. 0,2 ml serum penderita ditipiskan 1 : 500 dengan dapar PBS-tween, dimasukkan masing-masing ke sumur.

- e. "Mikrotiter plate" dimasukkan dalam kotak lembab sambil dilakukan pengocokan dengan "shaker" dengan kecepatan 100 putaran per menit. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS-tween tiga kali seperti ad c.
- f. Masukkan 0,2 ml konjugat yang dilapisi oleh HRPO ke dalam sumur.
- g. Inkubasi selama semalam kemudian dilakukan pencucian seperti ad. c.
- h. Tambahkan substrat ABTS sebanyak 0,2 ml ke dalam sumur dan inkubasi selama 1 jam.
- i. Tambahkan larutan NaF 50 ul ke dalam sumur untuk menghentikan reaksi. Warna dibaca pada panjang gelombang 410 nm dengan "Microtiter plate reader" dan Double beam spectrophotometer.

#### HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian pada Elisa mikro adalah sebagai berikut:

	N	Non Shaker		Shaker		pair t
		Mean	SD	Mean	SD	
Normal	36	0,068	0,025	0,030	0,179	* -9,91
Patologis	42	0,299	0,206	0,244	0,195	* -6,09
Total	78	0,193	0,191	0,146	0,179	* -9,01

\* = p 0,001

Tampak adanya perbedaan nilai absorben tanpa "shaker" dengan yang memakai "shaker" ; baik pada kelompok orang normal maupun penderita.

Hasil pada Elisa makro adalah sebagai berikut :

	N	Non Shaker		Shaker		pair t
		Mean	SD	Mean	SD	
Normal	37	0,306	0,138	0,244	0,134	* -3,556
Patologis	39	1,402	0,405	1,445	0,427	* 1,592
Total	76	0,868	0,629	0,860	0,682	** -0.456

\* =  $p < 0,001$

\*\* =  $p < 0,100$

Dari data di atas tampak bahwa pada kelompok normal terdapat perbedaan yang bermakna pada nilai absorben rata-rata. Sedangkan pada kelompok patologis maupun total tidak didapatkan perbedaan yang bermakna.

Bila diambil mean  $\pm 2$  SD pada kelompok normal sebagai nilai cut-off, maka didapatkan nilai cut off untuk Elisa mikro tanpa "shaker" = 0,1174 sedangkan pada Elisa mikro dengan "shaker" = 0,0695. Untuk Elisa makro tanpa "shaker" didapatkan nilai cut-off = 0,583 dan dengan "Shaker" = 0,513. Dengan patokan ini untuk menentukan abnormalitas tes, maka pada kelompok patologis didapatkan sensitifitas Elisa mikro tanpa "shaker" =  $33/42 \times 100\% = 78,59\%$  dan sensitifitas Elisa mikro dengan shaker =  $36/42 \times 100\% = 85,71\%$ . Sensitifitas Elisa makro tanpa "shaker" =  $38/39 \times 100\% = 97,435\%$  dan sensitifitas Elisa makro dengan "shaker" =  $38/39 \times 100\% = 97,435\%$ .

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS  
SURABAYA



## PEMBAHASAN

Pada Elisa fase padat kecepatan penukaran antara fase cair dan fase padat sangat menurun ketika kadar analit menurun setelah kontak dan ditangkap oleh fase padat. Kecepatan penangkapan ini dibatasi oleh laju difusi analit di dalam tabung. Valkers dan Barton (6) berusaha meningkatkan sensitifitas dengan memekatkan analit dengan penangkapan antibodi yang dilekatkan pada membran nilon. Usaha lain yang dilakukan oleh Chen (2) yaitu dengan memberikan rangsangan ultrasonik selama inkubasi untuk mempercepat pengikatan pada fase padat.

Chandler (1) memakai modifikasi dengan "reflow" melalui tabung kapiler. Keuntungan memakai "shaker" yaitu prosesnya sederhana dan tidak memerlukan alat yang canggih. Selain meningkatkan pertemuan antigen-antibodi kocokan ini dapat melepaskan perlekatan yang tidak spesifik pada dinding tabung sehingga diharapkan dapat meningkatkan sensitifitas tes.

Dari hasil penelitian ini ternyata pengaruh "shaker" lebih nyata pada Elisa mikro. Mungkin hal ini disebabkan pada Elisa mikro volume sampel dan reagensnya masih terlalu sedikit untuk menghasilkan tes yang sensitifitasnya tinggi. Telah diketahui bahwa besarnya volume sampel berpengaruh pada sensitifitas tes.

Pada Elisa makro diperkirakan volume sampel dan reagensnya telah cukup memadai untuk memperoleh hasil tes yang optimal karena jumlah antibodi yang dapat ditangkap tampaknya lebih banyak.

Sayangnya pada penelitian ini belum sempat dicari lama dan kecepatan "shaker" yang paling optimal. Melihat adanya penurunan absorben pada tes dengan "shaker" maka kemungkinan ada sejumlah ikatan antigen antibodi spesifik yang ikut terlepas.

Mungkin dengan penggunaan "shaker" yang "intermittent" dan pada waktu yang tidak terlalu lama dapat memperbaiki memperoleh sensitifitas dan spesifisitas yang paling optimal.

Bila prosedur "shaker" yang optimal sudah ditemukan, ini dapat dijadikan pemeriksaan standar dan diinformasikan pada laboratorium-laboratorium yang melakukan tes Elisa ini agar diperoleh tes yang lebih sensitif dan lebih spesifik.

#### KESIMPULAN

Terdapat perbedaan absorben yang bermakna dengan digunakannya "shaker" selama masa inkubasi. Penurunan ini tampak lebih nyata pada Elisa mikro, diperkirakan "shaker" ini mengurangi terjadinya perlekatan antibodi langsung pada dinding tabung, sehingga yang terjadi hanyalah ikatan yang spesifik saja. Pada Elisa makro pengaruh "shaker" ini kurang begitu nyata, mungkin volume reagens dan sampelnya sudah cukup optimal untuk menghasilkan detektibilitas yang tinggi.

Perlu penelitian lebih lanjut tentang kecepatan dan lamanya "shaker" yang paling optimal dan dilakukan pula penelitian pada kelompok-kelompok penderita penyakit bukan tuberkulosis untuk menentukan spesifisitas kliniknya.

## RINGKASAN

Untuk menilai pengaruh "shaker" pada Elisa fase padat, telah dilakukan uji laboratorium terhadap 78 serum terdiri dari 36 serum normal dan 42 serum patologis untuk Elisa mikro dan 76 serum terdiri dari 37 serum normal dan 39 serum patologis untuk Elisa makro.

Serum normal diambil dari perawat sehat di BP4 Malang. Serum patologis diambil dari penderita tuberkulosis paru. Konfirmasi diagnosa dilakukan dengan pemeriksaan dahak, biakan dahak, uji PAP dan pemeriksaan radiografis yang positif.

Pengaruh shaker tampak pada Elisa mikro berupa penurunan absorben, sedangkan pada Elisa makro tidak ada perbedaan absorben yang bermakna. Penurunan absorben pada Elisa mikro berakibat menurunnya nilai "cut off" sehingga diperoleh sensitifitas tes yang lebih tinggi. Sayangnya pada penelitian ini belum dicari kondisi "shaker" yang paling optimal. Kami yakin bahwa penggunaan "shaker" pada Elisa mikro dapat memperbaiki sensitifitas dan spesifisitas tes.

## SUMMARY

To determine the influence of shaker to macro and micro Elisa we tested 78 sera consisted of 36 normal and 42 abnormal sera for micro Elisa and 76 sera consisted of 37 normal and 39 abnormal sera for macro Elisa.

Normal sera were obtained from healthy nurse working at BP4 Malang and abnormal sera were collected from patients suffering from pulmonary tuberculosis. Diagnose was confirmed by positive bacteriologic examination of sputum, culture of sputum, PAP test and chest radiography.

The effect of shaker as decreased absorbance was prominent on micro Elisa, while there was no effect shown on macro Elisa.

The decreased absorbance on micro Elisa resulted in decreasing cut off value so we got higher sensitifity by using shaker.

It is necessary to further continue this investigation by search an optimum shaker condition.

We believe that use of shaker can make micro Elisa test more sensitive and spesific.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Chandler HM, Fuller SA, Nakagawa CH et al. An accelerated enzyme immunoassay for human choriogonadotropin in urine, involving reflow of specimen through capillary tubes. Clin Chem 1987 ; 33 : 498 - 501.
2. Chen R, Weng L. Ultrasound-accelerated immunoassay, as exemplified by enzyme immunoassay of choriogonadotropin. Clin Chem 1984 ; 30 : 1446-1451.
3. Grange JM. The immunology of tuberculosis. Naskah lengkap Simposium Alergi dan Imunologi. Surabaya, September 1981. pp 5-18.
4. Handojo I. Uji peroksidase antiperoksidase (PAP) pada penyakit tuberculosis paru (Disertasi) Surabaya : Universitas Airlangga Surabaya, 1988.
5. Kardjito T, Handojo I, Grange JM, Mauch H. Elisa sebagai alat pengukur antibodi terhadap antigen miko - bakterium pada tuberculosis paru. Surabaya 1982.
6. Valkirs GE, Barton R. Immunoconcentration a new format for solid-phase immunoassays. Clin Chem 1985 ; 31 : 1427 - 1431.



## ABSTRACT

To determine the influence of shaker to macro and micro Elisa we tested 78 sera consisted of 36 normal and 42 abnormal sera for micro Elisa and 76 sera consisted of 37 normal and 39 abnormal sera for macro Elisa.

Normal sera were obtained from healthy nurse working at BP4 Malang and abnormal sera were collected from patients suffering from pulmonary tuberculosis. Diagnose was confirmed by positive bacteriologic examination of sputum, culture of sputum, PAP test and chest radiography.

The effect of shaker as decreased absorbance was prominent on micro Elisa, while there was no effect shown on macro Elisa.

The decreased absorbance on micro Elisa resulted in decreasing cut off value so we got higher sensitivity by using shaker.

It is necessary to further continue this investigation by search an optimum shaker condition.

We believe that use of shaker can make micro Elisa test more sensitive and specific.

## ABSTRAK

Untuk menilai pengaruh "shaker" pada Elisa fase padat, telah dilakukan uji laboratorium terhadap 78 serum terdiri dari 36 serum normal dan 42 serum patologis untuk Elisa mikro dan 76 serum terdiri dari 37 serum normal dan 39 serum patologis untuk Elisa makro.

Serum normal diambil dari perawat sehat di BP4 Malang. Serum patologis diambil dari penderita tuberkulosis paru.

Konfirmasi diagnosa dilakukan dengan pemeriksaan dahak, biakan dahak, uji PAP dan pemeriksaan radiografis yang positif.

Pengaruh shaker tampak pada Elisa mikro berupa penurunan absorben, sedangkan pada Elisa makro tidak ada perbedaan absorben yang bermakna. Penurunan absorben pada Elisa mikro berakibat menurunnya nilai "cut off" sehingga diperoleh sensitifitas tes yang lebih tinggi. Sayangnya pada penelitian ini belum dicari kondisi "shaker" yang paling optimal.

Kami yakin bahwa penggunaan "shaker" pada Elisa mikro dapat memperbaiki sensitifitas dan spesifisitas tes.

KK  
616.995075 Pengaruh Shaker Elisa Makro dan Mikro Kku  
pada penentuan Imunoglobulin G yang  
Nug Spesifik terhadap ~~Mikro~~ bakterium.  
P

Nugraha, Jusak.

No. MHS	NAMA PEMINJAM	Tgl. Kembali

**PAMERAN**

01 NOV 1995

EGKO HAYHO MABIPORATION





