

DISERTASI

DITERBITKAN UNTUK  
UJIAN TERBUKA

KORELASI ANTARA  
BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI  
DENGAN  
TANGGAP KEBAL HUMORAL LOKAL  
PADA PIELONEFRITIS ASENDENS :  
SUATU STUDI EKSPERIMENTAL  
PADA TIKUS



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

NOOR RACHMAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
1989

**MILIK**  
**PERPUSTAKAAN**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**SURABAYA**

KORELASI ANTARA  
BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI  
DENGAN  
TANGGAP KEBAL HUMORAL LOKAL  
PADA PIELONEFRITIS ASENDENS :  
SUATU STUDI EKSPERIMENTAL  
PADA TIKUS

DESERTASI

untuk  
memperoleh gelar Doktor  
dalam ilmu kedokteran pada  
Universitas Airlangga  
dibawah pimpinan Rektor  
Universitas Airlangga

Profesor dr H. R. Soedarso Djojonegoro  
untuk dipertahankan dihadapan  
Rapat Terbuka Senat

oleh  
Noor Rachman  
lahir di Jember pada 20-12-1933

Dibawah bimbingan :

Promotor : Profesor dr Soewignjo Adipoetro

Ko-promotor : Profesor dr I Wayan Giri

Diuji pada tanggal 19 Agustus 1989

PANITIA PENGUJI DISERTASI:

Ketua : Profesor dr. Soeharto Setokoesoemo

Anggauta : 1. Profesor dr. Soewignjo Adipoetro

2. Profesor dr. I. Wayan Giri

3. Profesor dr. Subowo, M.Sc., Ph.D.

4. Profesor dr. Rachmat Santoso

5. Profesor Dr. dr. Askandar Tjokroprawiro

6. Dr. dr. Putu Gede Konthen

Ditetapkan dengan

SURAT KEPUTUSAN

REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA

No.6630/PT03.H/I/1989

Dipersembahkan kepada :  
ayah (almarhum) dan ibu tercinta,  
ayah mertua dan ibu mertua (almarhumah),  
istri tercinta,  
anak-anak , menantu, serta cucu-cucu tersayang,  
saudara-saudaraku,  
Guru-guruku,  
almamater serta para sejawat Mikrobiologi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah S.W.T. yang telah melimpahkan segala taufik dan hidayah-Nya kepada saya sekeluarga, sehingga saya dapat mengikuti Program Pendidikan Pasca Sarjana, melaksanakan penelitian, dan menyelesaikan disertasi ini.

Dengan selesainya disertasi ini, perkenankanlah saya dengan tulus hati menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Prof. dr. Soewignjo Adipoetro, Guru Besar dalam bidang Ilmu Mikrobiologi Fakultas kedokteran Universitas Airlangga sebagai promotor saya dan selaku Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang dengan kesungguhan dan ketulusan hati telah memberikan dorongan kepada saya untuk mengikuti Program Pendidikan Pasca Sarjana strata 3. Beliau juga telah membimbing saya mulai dari pembuatan disain penelitian, pembuatan protokol sampai dengan pengumpulan data. Untuk itu semua patut kiranya saya sampaikan penghargaan yang setinggi-tingginya, dan saya panjatkan do'a semoga Allah s.w,t. membalas budi baik beliau.

Prof. dr. I Wayan Giri, Guru Besar dalam mata pelajaran

Ilmu Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga sebagai Kopromotor yang telah dengan segala kesabarannya serta ketulusan hatinya telah ikut membimbing saya sampai dengan penyelesaian disertasi ini.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada:

Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan melalui Tim Manajemen Program Doktor (TMPD) Universitas Airlangga yang telah menyediakan dana penelitian dan lain-lainnya.

Mantan Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. dr. Marsetio Donosepoetro dan Rektor Universitas Airlangga Prof. dr.H. R. Soedarso Djojonegoro atas kesempatan serta fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Program Pendidikan Pasca Sarjana Strata 3.

Mantan Dekan Fakultas Pasca Sarjana Universitas Airlangga Prof. drg. R. Hartono FADI serta dekan Fakultas Pasca Sarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Sutarjadi dan mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dr. H. S. M. Soeatmadji serta Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. dr I G.N.Gde Ranuh atas kesempatan serta fasilitas yang telah diberikan kepada saya untuk melaksanakan program pendidikan ini sampai selesai.

Direktur Rumah Sakit Dr. Sutomo Surabaya, dr Karijadi Wirjoatmodjo atas izin dan fasilitas yang diberikan



kepada saya untuk untuk melakukan penelitian dalam Kompleks Rumah Sakit Dr. Sutomo di Surabaya.

Prof. dr. R. Hoepoediono Soewondo MPH.(almarhum) yang sejak permulaan membantu saya dalam mengoreksi permasalahan, desain dan metodologi penelitian, semoga arwahnya mendapat tempat disisi Allah s.w.t sesuai dengan amal baktinya, amin.

Kepala Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. dr. Rachmat Santoso yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas untuk mempelajari ilmu Patologi.

dr. Soegeng Soekamto MS. PhD. staf PF/Laboratorium Patologi RSUD Dr. Sutomo atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk pembuatan sediaan patologi dan sediaan untuk pemeriksaan imuno-fluoresensi.

Prof. dr. Ny. Sri Utari Purnomo, Guru Besar dalam Ilmu Biokimia, atas bantuannya dalam perolehan hewan coba.

Dr. Ida Ørskov dan Dr. Frits Ørskov dari Collaborative Centre for Reference and Research on Escherichia (WHO), Statens Seruminstitut, DK-2300 Copenhagen S Denmark yang telah berkenan mengirimkan kepada saya kuman Escherichia coli O6:K13:H1 dengan cuma-cuma.

dr. Biroum Noerjasin MSc almarhum, Mantan Kepala Bagian Mikrobiologi dan Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas jasanya dalam memberikan dasar-dasar Imunologi serta memberikan rangsangan untuk mempelajari ilmu ini lebih mendalam, dan saya panjatkan do'a semoga Allah S.W.T. membalas budi baik beliau dan menerima disisi-Nya sesuai dengan amal baktinya.

Prof.dr. G.P. Pijma (almarhum), Mantan Kepala Bagian Mikrobiologi dan Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas jasa-jasa beliau dalam memberikan dasar-dasar Mikrobiologi, dan saya panjatkan do'a semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas budi baik beliau dan menerima arwah beliau disisi-Nya.

Prof. Ruth A Boak M.D. dan Prof. McVickar M.D. Mantan Visiting Profesor dari Department of Infectious Diseases and Immunology UCLA Medical School USA yang telah banyak jasanya dalam memberikan dasar-dasar penelitian dalam bidang Mikrobiologi.

Dra. Ny. Parlinah Moedjono M.A. bersama stafnya yang telah memberikan fasilitas serta bantuannya dalam perolehan kepustakaan untuk disertasi saya.

Semua teman sejawat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas pengertian serta toleransinya yang telah diberikan kepada saya selama mengadakan penelitian sampai selesainya diser-

tasi saya.

Saudara Eko Analis dari UPF/Laboratorium Patologi RSUD Dr. Sutomo Surabaya atas bantuannya dalam pembuatan sediaan-sediaan untuk pemeriksaan histopatologi dan pemeriksaan imunofluoresensi.

Semua tenaga para medik dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah banyak membantu saya dalam penyiapan media serta pembuatan reagensia dan perawatan hewan coba selama saya melakukan penelitian.

Para guru saya dari tingkat pendidikan dasar sampai pendidikan tinggi atas jerih payah beliau-beliau dalam memberikan bekal ilmu kepada saya, serta semua pihak yang telah memberikan bantuannya selama ini akan tetapi belum tertulis dalam ucapan terima kasih ini.

Pada kesempatan yang bahagia ini, saya ingin juga menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Ibu dan mendiang ayah saya yang telah mengasuh saya sejak dilahirkan, membesarkan serta memberikan kesempatan dan selalu mendorong untuk mencapai pendidikan yang setinggi-tingginya, memberikan contoh dan menganjurkan dalam ketekunan bekerja, kejujuran, mawas diri, hidup rukun dan saling tolong menolong, dan pengabdian

kepada negara dan sesama ummat tanpa pamrih dan pandang bulu, serta hormat pada sesama dan kepada guru serta orang tua dan yang tidak boleh dilupakan selalu beriman dan bertakwa kepada Allah S.W.T. Atas jasa dan petuah-petuahannya yang sangat berharga saya sekeluarga sangat menghargainya dan akan selalu mengingatnya.

Bapak mertua dan mendiang ibu mertua yang selalu mendorong serta ikut mendo'akan semoga disertai saya dapat segera terwujud.

Akhirnya ucapan terima kasih dan rasa haru serta bangga saya ucapkan kepada istri saya tercinta yang dengan penuh pengertian, serta dorongannya, dan terutama bantuannya baik berupa moril dan terutama materiil yang tidak ternilai besarnya, sehingga saya dapat menyelesaikan disertai saya. Pada kesempatan ini saya mohon maaf yang sebesar-besarnya kepada istri saya atas kelalaian saya sebagai suami selama kesibukan saya dalam menyelesaikan disertai ini.

Ucapan terima kasih serta permohonan maaf juga saya sampaikan juga kepada orang tua, mertua dan ketiga anak saya serta menantu-menantu saya, dan saudara-saudara saya atas pengertiannya sewaktu saya melalaikan tugas sebagai anak, menantu, ayah, mertua dan saudara selama kesibukan saya dalam menyelesaikan disertai saya.

Semoga Allah S.W.T. selalu melimpahkan rahmat serta karunia-Nya atas budi baik mereka semua. Amin, amin, amin.

## DAFTAR ISI

Ucapan terima kasih . . . . .	x
Kata pengantar . . . . .	xxxv.
PENDAHULUAN . . . . .	1
BAB I. TINJAUAN KEPUSTAKAAN . . . . .	3
1. Terminologi . . . . .	7
1.1. Infeksi saluran kemih . . . . .	7
1.2. Pielonefritis . . . . .	7
1.3. Infeksi ascendens dan infeksi descendens . . . . .	14
1.4. Bakteriuri . . . . .	15
2. Epidemiologi . . . . .	18
3. Bakteri berlapis antibodi . . . . .	32
4. Pielonefritis ascendens eksperimental . . . . .	36
4.1. Anatomi ginjal . . . . .	36
4.2. Patogenesis . . . . .	44
4.3. Tanggap kebel humoral lokal dalam ginjal . . . . .	53
BAB II. PERMASALAHAN, TUJUAN PENELITIAN DAN HIPOTESA . . . . .	57
1. Permasalahan . . . . .	57
1.1. Permasalahan umum . . . . .	57
1.2. Permasalahan khusus . . . . .	60
2. Tujuan penelitian . . . . .	63
3. Hipotesis . . . . .	64

BAB III. POSEDUR PENELITIAN

I. Penelitian pendahuluan . . . . .	65
1. Diteksi sel pembentuk antibodi spesifik . . . . .	66
1.1. Persiapan . . . . .	66
1.2. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin . . . . .	71
1.3. Pewarnaan imunofluoresensi . . . . .	71
2. BACT-EIFA VISUAL . . . . .	78
2.1. Persiapan . . . . .	78
2.2. Teknik Bact-EIFA . . . . .	83
2.3. Teknik Bact-ELISA . . . . .	86
II. Penelitian utama. . . . .	93
1. Percobaan Pembuatan bakteri berlapis antibodi secara artifisial . . . . .	94
1.1. Persiapan . . . . .	95
1.2. Melapisi bakteri dengan antibodi spesifik . . . . .	95
1.3. Mendeteksi bakteri berlapis antibodi. . . . .	96
1.4. Faktor-faktor yang mempengaruhi pembentukan bakteri berlapis antibodi . . . . .	98
2. Pielonefritis ascendens eksperimental .	100
2.1. Persiapan . . . . .	100
2.2. Menentukan titer antibodi spesifik dalam serum dan air kemih . . . . .	103
2.3. Pemeriksaan bakteri berlapis antibodi dalam air kemih . . . . .	106
2.4. Mendeteksi sel pembentuk antibodi	

	dalam jaringan ginjal. . . . .	108
	III. Analisis statistik . . . . .	.109
BAB IV.	HASIL PENELITIAN . . . . .	.112
BAB V.	PEMBAHASAN . . . . .	.182
BAB VI.	KESIMPULAN . . . . .	.220
BAB VII.	MANFAAT DARI HASIL PENELITIAN . . . . .	.226
BAB VIII.	RINGKASAN . . . . .	.227
	SUMMARY . . . . .	231
BAB IX.	KEPUSTAKAAN . . . . .	.235
LAMPIRAN	. . . . .	.264
KURIKULUM VITE	. . . . .	300



DAFTAR TABEL

	Halaman:
Tabel 1: Sepuluh penyebab utama gagal ginjal yang membutuhkan tindakan cangkok ginjal . . . . .	5
Tabel 2: Sebaran penyakit ginjal yang memerlukan transplantasi . . . . .	6
Tabel 3: Timbulnya ISK simtomatik pada wanita hamil dari kelomok-kelompok dengan bakteriuri simto-matik dan bakteriuri asimtomatik. . . .	27
Tabel 4: Hasil pengamatan imunofluoresensi dari sel pembentuk antibodi spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan normal . . .	114
Tabel 4A: Perbandingan antara hasil pengamatan imuno-fluoresensi sel yang mengandung Ig intrasi-toplasma dengan gumpalan bakteri dan tanpa gumpalan bakteri pada permukaan sel antara kelompok jaringan normal dan jaringan radang..	114
Tabel 4B: Perbandingan antara hasil pengamatan imuno-fluoresensi sel yang mengandung Ig intrasi-toplasma tanpa gumpalan bakteri pada permukaan sel antara kelompok jaringan normal dengan kelompok jaringan radang . . . . .	115
Tabel 4C: Perbandingan antara hasil pengamatan imuno-fluoresensi sel yang mengandung Ig intrasi-toplasma dengan gumpalan bakteri pada permukaan sel antara kelompok jaringan normal dengan kelompok jaringan radang . . . . .	115
Tabel 5: Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pem-	

bentuk antibodi spesifik dari sediaan yang  
dibuat dari otot beradang . . . . . 116

Tabel 6: Hasil pengamatan imunofluoresensi sel  
pembentuk antibodi spesifik dari sediaan  
yang dibuat dari otot beradang yang men-  
dapat perlakuan pra-inkubasi dengan kuman  
homolog . . . . . 118

Tabel 7: Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pem-  
bentuk antibodi spesifik dari sediaan yang  
dibuat dari otot beradang yang mendapat  
perlakuan pra-inkubasi dengan kuman  
heterolog. . . . . 119

Tabel 8: Tabel untuk perhitungan U-test.  
Hasil perbandingan sel pembentuk antibodi  
yang memberikan fluoresensi hijau dengan  
dan tanpa fluoresensi merah darikelompok  
kelola dengan dan tanpa pra-inkubasi de-  
ngan kuman homolog . . . . . 120

Tabel 9: Tabel untuk perhitungan U-test.  
Hasil perbandingan sel pembentuk antibodi  
yang memberikan fluoresensi hijau dan  
merah dari kelompok kelola dengan dan  
tanpa pra-inkubasi dengan kuman homolog . . .122

Tabel 10: Tabel untuk perhitungan U-test.  
Hasil perbandingan sel pembentuk antibodi  
yang memberikan fluoresensi hijau tanpa  
merah dari kelompok kelola dengan dan  
tanpa pra-inkubasi dengan kuman homolog . . .123

Tabel 11: Tabel untuk perhitungan U-test.

	Hasil perbandingan sel pembentuk antibodi yang memberikan fluoresensi hijau dan merah dari kelompok kelola dengan dan tanpa pra-inkubasi dengan kuman heterolog. . . .124
Tabel 12:	Tabel untuk perhitungan U-test. Hasil perbandingan sel pembentuk antibodi yang memberikan fluoresensi hijau tanpa merah dari kelompok kelola dengan dan tanpa pra-inkubasi dengan kuman heterolog. . . .125
Tabel 13:	Hasil checkerboard titration untuk menentukan pengenceran optimum dari serum imun tikus dan FITC labeled rabbit anti rat antiserum dengan uji Bact-EIFA VISUAL . . . . . 126
Tabel 14	Hasil uji ELISA dari 10 spesimen serum tikus normal (dilakukan in duplo) spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 . . . . . 127
Tabel 15:	Hubungan antara pengenceran serum, nilai absorbens Bact-ELISA dan derajat fluoresensi Bact-EIFA VISUAL dari serum imun tikus 128
Tabel 16:	Hasil uji Bact-EIFA VISUAL pada 48 pengulangan . . . . . 129
Tabel 17:	Hasil uji Bact-EIFA VISUAL dari serum baku dalam 24 pengulangan . . . . . 131
Tabel 18:	Hasil uji replitabilitas serumbaku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda Bact-EIFA VISUAL Serum Baku I (4+) . . . . . 132
Tabel 19:	Hasil uji replitabilitas serumbaku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda

	Bact-EIFA VISUAL	
	Serum Baku I (4+) . . . . .	132
Tabel 20:	Hasil uji replitabilitas serumbaku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda Bact-EIFA VISUAL	
	Serum Baku II (3+) . . . . .	134
Tabel 21:	Hasil uji replitabilitas serumbaku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda Bact-EIFA VISUAL	
	Serum Baku -II (3+) . . . . .	135
Tabel 22:	Hasil uji replitabilitas serumbaku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda Bact-EIFA VISUAL	
	Serum Baku III (2+) . . . . .	136
Tabel 23:	Hasil uji replitabilitas serumbaku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda Bact-EIFA VISUAL	
	Serum Baku III (2+) . . . . .	137
Tabel 24:	Hasil uji replitabilitas serumbaku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda Bact-EIFA VISUAL	
	Serum Baku IV (1+) . . . . .	138
Tabel 25:	Hasil uji replitabilitas serumbaku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda Bact-EIFA VISUAL	
	Serum Baku IV (1+) . . . . .	139
Tabel 26:	Perbandingan antara nilai absorbens ELISA dan derajat fluoresensi EIFA VISUAL pada	

pengenceran anti serum antara  $10^{-1}$  -  $10^{-3}$   
 pada pembentukan BBA artifisial . . . . . 141

Tabel 27: Perbandingan hasil deteksi BBA dengan  
 menggunakan metoda ELISA, EIFA VISUAL  
 dan IF. . . . . 142

Tabel 28: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 ELISA dan EIFA VISUAL.  
 Konsentrasi kuman  $10^3$  CFU / ml. . . . . 143

Tabel 29: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 ELISA dan IF.  
 Konsentrasi kuman  $10^3$  CFU / ml. . . . . 143

Tabel 30: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 EIFA VISUAL dan IF.  
 Konsentrasi kuman  $10^3$  CFU / ml. . . . . 144

Tabel 31: Rekapitulasi hasil uji McNemar pada  
 konsentrasi kuman  $10^3$  CFU / ml. . . . . 144

Tabel 32: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 ELISA dan EIFA VISUAL.  
 Konsentrasi kuman  $10^4$  CFU / ml. . . . . 146

Tabel 33: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 EIFA VISUAL dan IF.  
 Konsentrasi kuman  $10^4$  CFU / ml. . . . . 146

Tabel 34: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 ELISA dan IF.  
 Konsentrasi kuman  $10^4$  CFU / ml. . . . . 147

Tabel 35: Rekapitulasi hasil uji McNemar pada  
 konsentrasi kuman  $10^4$  CFU / ml. . . . . 147

Tabel 36: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan

ELISA dan EIFA VISUAL.  
 Konsentrasi kuman  $10^5$  CFU / ml. . . . . 148

Tabel 37: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 EIFA VISUAL dan IF.  
 Konsentrasi kuman  $10^5$  CFU / ml. . . . . 148

Tabel 38: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 ELISA dan IF.  
 Konsentrasi kuman  $10^5$  CFU / ml. . . . . 149

Tabel 39: Rekapitulasi hasil uji McNemar pada  
 konsentrasi kuman  $10^5$  CFU / ml. . . . . 149

Tabel 40: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 ELISA dan EIFA VISUAL.  
 Konsentrasi kuman  $10^6$  CFU / ml. . . . . 150

Tabel 41: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 EIFA VISUAL dan IF.  
 Konsentrasi kuman  $10^6$  CFU / ml. . . . . 150

Tabel 42: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 ELISA dan IF.  
 Konsentrasi kuman  $10^6$  CFU / ml. . . . . 151

Tabel 43: Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan  
 ELISA dan EIFA VISUAL.  
 Konsentrasi kuman  $10^7 - 10^8$  CFU / ml. . . . . 151

Tabel 44: Rekapitulasi hasil uji McNemar pada  
 konsentrasi kuman  $10^6$  CFU / ml. . . . . 152

Tabel 45: Hasil uji deteksi BBA dan BHK air kemih  
 tikus dari kelompok kelola . . . . . 154

Tabel 46: Hasil penentuan titer antibodi spesifik  
 dalam air kemih dan dalam serum dari tikus

yang telah mendapat inokulasi E. coli  
 O6:K13:H1 secara intrauretral dengan uji  
 Bact-EIFA VISUAL . . . . . 155

Tabel 47: Hasil pengamatan imunofluoresensi sel  
 pembentuk antibodi spesifik terhadap  
 E. coli O6:K13:H1 dari kelompok kontrol . . . 157

Tabel 48: Rekapitulasi hasil pengamatan imunofluo-  
 resensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap  
 E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal  
 14 hari pasca inokulasi dengan suspensi  
 kuman. Ginjal kiri . . . . . 158

Tabel 49 Rekapitulasi hasil pengamatan imunofluo-  
 resensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap  
 E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal  
 14 hari pasca inokulasi dengan suspensi  
 kuman. Ginjal kanan . . . . . 158

Tabel 50: Hasil pengamatan imunofluoresensi sel  
 pembentuk antibodi spesifik terhadap  
 E. coli O6:K13:H1 dari kelompok kelola . . . 159

Tabel 51: Rekapitulasi hasil pengamatan imunofluo-  
 resensi sel pemb. Ab. spes. terhadap  
 E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal  
 14 hari pasca inokulasi dengan suspensi  
 kuman (sampel yang sediaannya yang mem-  
 berikan hasil deteksi sel pembentuk anti-  
 bodi spesifik dikeluarkan dari tabel)  
 Ginjal kanan . . . . . .160

Tabel 52: Rekapitulasi hasil pengamatan imunofluo-

resensi sel pemb. Ab. spes. terhadap  
 E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal  
 14 hari pasca inokulasi dengan suspensi  
 kuman (sampel yang sediaannya yang mem-  
 berikan hasil deteksi sel pembentuk anti-  
 bodi spesifik dikeluarkan dari tabel)  
 Ginjal kanan . . . . . 160

Tabel 53: Perbandingan hasil pengamatan imunofluo-  
 resensi dari sel pembentuk antibodi pada kelompok  
 kontrol dan kelompok kelola . . . . . 161

Tabel 54: Tabulasi analisa korelasi rank Spearman.  
 Analisa korelasi antara BBA dengan SPS . . . 163

Tabel 55: Tabulasi analisa korelasi rank Spearman.  
 Analisa korelasi antara BBA dengan Ab-ak. . . 164

Tabel 56: Tabulasi analisa korelasi rank Spearman.  
 Analisa korelasi antara BBA dengan Ab-s . . . 165

Tabel 57: Tabulasi analisa korelasi rank Spearman.  
 Analisa korelasi antara BBA dengan BHK . . . 166

Tabel 58: Tabulasi analisa korelasi rank Spearman.  
 Analisa korelasi antara SPS dengan Ab-ak . . 167

Tabel 59: Tabulasi analisa korelasi rank Spearman.  
 Analisa korelasi antara SPS dengan Ab-ak . . 168

Tabel 60: Tabulasi analisa korelasi rank Spearman.  
 Analisa korelasi antara SPS dengan BHK . . . 169

Tabel 61. Tabulasi analisa korelasi rank Spearman.  
 Analisa korelasi antara Ab-ak dengan Ab-s . . 170

Tabel 62: Tabulasi analisa korelasi rank Spearman.  
 Analisa korelasi antara Ab-ak dengan BHK . . 171

Tabel 63: Tabulasi analisa korelasi rank Spearman.



	Analisa korelasi antara Ab-s dengan BHK . . .	172
Tabel 64:	Hasil analisa korelasi rank menurut Spearman antara uji deteksi BBA, uji deteksi SPS, titer Ab-ak, titer Ab-s dan BHK. . . . .	173
Tabel 65:	Perbandingan antara hasil deteksi SPS, BBA, Ab-s, Ab-ak dan BHK antara kelompok kontrol dan kelompok kelola . . . . .	175

## DAFTAR GAMBAR

Halaman:

Gambar 1:	Hubungan antara faktor-faktor predisposisi dengan infeksi saluran kemih. . . . .	13
Gambar 2:	Dinamika infeksi saluran kemih yang menuju ke pielonefritis khronika . . . . .	17
Gambar 3:	Dinamika dari epidemiologi infeksi saluran kemih pada kelompok anak sekolah. . . . .	22
Gambar 4:	Prevalensi bakteriuri bermakna diantara biarawati berkulit hitam dan berkulit putih dengan wanita pekerja sebagai kontrol.	23
Gambar 5:	Kiri: Susunan umum ginjal Kanan: Lokalisasi segmen-segmen nefron korteks, medula dan tubulus kolikogens . . . . .	38
Gambar 6:	Potongan melintang pada daerah korteks dan medula renalis . . . . .	40
Gambar 7:	Protokol penelitian . . . . .	66a
Gambar 8:	Bagan cara melakukan konjugasi bakteri dengan rhodamin . . . . .	68
Gambar 9:	Bagan cara pewarnaan dengan ERhod . . . . .	73a
Gambar 10:	Bagan cara uji spesifisitas dengan metoda bloking . . . . .	75
Gambar 11:	Bagan cara pewarnaan dengan labeled antiglobulin . . . . .	77
Gambar 12:	Bagan cara melapisi mikroplat dengan bakteri. . . . .	81
Gambar 13:	Bagan tehnik Bact-ELISA dan Bact-EIFA . . . . .	84
Gambar 13a:	Bagan kotak cahaya . . . . .	86

Gambar 14 : Bagan cara melakukan checherboard titration . . . . . 88

Gambar 15 : Bagan cara mendeteksi BBA dengan ELISA dan EIFA VISUAL . . . . . 99

Gambar 16: Protokol pemeriksaan pielonefritis asendens eksperimental . . . . . 102

Gambar 17A: Diagram sebar yang menunjukkan hubungan antara bakteri berlapis antibodi (EIFA VISUAL) dengan sel pembentuk antibodi spesifil dalam ginjal . . . . . 176

Gambar 17B: Diagram sebar yang menunjukkan hubungan antara bakteri berlapis antibodi (EIFA VISUAL) dengan titer antibodi spesifik dalam air kemih . . . . . 176

Gambar 18A: Diagram sebar yang menunjukkan hubungan antara bakteri berlapis antibodi (EIFA VISUAL) dengan titer antibodi spesifik dalam serum . . . . . 177

Gambar 18B: Diagram sebar yang menunjukkan hubungan antara bakteri berlapis antibodi (EIFA VISUAL) dengan biak hitung kuman dalam air kemih . . . . . 177

Gambar 19A: Diagram sebar yang menunjukkan hubungan antara sel pembentuk antibodi spesifik dengan titer antibodi spesifik dalam air kemih . . . . . 178

Gambar 19B: Diagram sebar yang menunjukkan hubungan antara titer antibodi spesifik dalam air kemih dengan titer antibodi spesifik

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Pembuatan sediaan untuk pewarnaan hematoxilin-eosin dan imunofluoresnsi . . . 265

Lampiran 2-4: Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk antibodi spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan normal . . . . . 269 - 271

Lampiran 5-6: Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk antibodi spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan radang . . . . . 272 - 273

Lampiran 7-9: Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk antibodi spesifik , setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman homolog (tanpa label rhodamin) . . . . . 274 - 276

Lampiran 10-11: Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk antibodi spesifik , setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman heterolog (tanpa label rhodamin) . . . . . 277 - 278

Lampiran 12: Hasil percobaan menguji reproduksibilitas dari uji EIFA VISUAL . . . . . 279

Lampiran 13: Rekapitulasi uji Bact-EIFA dari 48 pengulangan (replicate) untuk uji reproduksibilitas . . . . . 280 - 281

Lampiran 14-17: Tabulasi analisa statistik dengan uji McNemar dari serum imun tikus dalam 48 pengulangan pada pengen-

	dalam serum . . . . .	178
Gambar 20A:	Diagram sebar yang menunjukkan hubungan antara sel pembentuk antibodi spesifik dengan biak hitung kuman dalam air kemih . . . . .	179
Gambar 20B:	Diagram sebar yang menunjukkan hubungan antara titer antibodi spesifik dalam air kemih dengan titer antibodi spesifik dalam serum . . . . .	179
Gambar 21A:	Diagram sebar yang menunjukkan hubungan antara titer antibodi spesifik dalam air kemih dengan biak hitung kuman dalam air kemih . . . . .	180
Gambar 21B:	Diagram sebar yang menunjukkan hubungan antara titer antibodi spesifik dalam serum dengan biak hitung kuman dalam air kemih . . . . .	180
Gambar 22:	Mikrofoto dari sel pembentuk antibodi spesifik (fluoresensi merah) . . . . .	181
Gambar 23:	Mikrofoto dari bakteri berlapis antibodi (fluoresensi hijau) . . . . .	181

	ceran 1:256 sampai 1:16384 . . . .	282 - 285
Lampiran 17-21:	Perbandingan antara nilai absor- bens pada uji ELISA dengan titer akhir (end point titration) dengan uji EIFA VISUAL untuk mendeteksi BBA (BBA artifisial) . . . . .	285 - 289
Lampiran 22-29:	Hasil pengamatan imunofluoresen- si sel pembentuk antibodi spesi- fik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 pasca inokulasi intraureteral dengan suspensi kuman E. coli O6:K13:H1	290 - 297
Lampiran 29-31:	Hasil pengamatan imunofluoresen- si sel pembentuk antibodi spesi- fik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 pasca inokulasi intraureteral dengan medium steril . . . . .	297 - 299

**DAFTAR SINGKATAN**

Ab-ak	:	antibodi spesifik dalam air kemih
Ab-s	:	1. antibodi spesifik dalam serum 2. specific antibody in serum
Ab-u	:	specific antibody in urine
ACB	:	Antibody-coated bacteria
BBA	:	bakteri berlapis antibodi
BHK	:	biak hitung kuman dalam air kemih
EIFA	:	enzyme-linked immuno fluorescent assay
ELISA	:	enzyme-linked immonosorbent assay
IF	:	imunoflouresensi
ISK	:	infeksi saluran kemih
SPS	:	1. sel pembentuk antibodi spesifik 2. specific antibody producing cells
UBC	:	urine bacterial count

## KATA PENGANTAR

Baik dinegara sedang berkembang maupun negara yang sudah maju, infeksi saluran kemih masih menunjukkan kekerapan yang cukup tinggi, dan kalau tidak mendapatkan pengobatan yang sempurna dapat terjun kekeadaan terminal dari penyakit ini yang selalu disertai dengan gagal ginjal.

Indonesia termasuk dalam kelompok negara sedang berkembang juga tidak bebas dari penyakit infeksi tersebut diatas. Permintaan pemeriksaan mikrobiologik dilabaratorium-laboratorium klinik hingga sekarang masih didominasi oleh permintaan pemeriksaan mikrobiologik dari air kemih untuk mengetahui adanya infeksi saluran kemih dan sekaligus permintaan untuk mengetahui pengobatan yang paling adekuat. Khusus untuk infeksi saluran kemih, untuk menentukan pengobatan yang paling adekuat, diperlulakan juga penentuan lokalisasi dari infeksi saluran kemih tersebut.

Mengingat sarana dan prasarana untuk menentukan lokalisasi dari infeksi saluran kemih hanya dimiliki oleh rumah sakit rumah sakit yang cukup besar, maka untuk menanggulangi hal ini diperlukan suatu metoda yang dapat diterapkan dirumah sakit rumah sakit didaerah, dimana sarana dan prasarananya sangat terbatas.



## PENDAHULUAN



Bakteriuri bermakna, merupakan suatu penemuan laboratorium yang abnormal, sebab saluran kemih dalam keadaan normal selalu steril. Dalam keadaan demikian, kita harus waspada terhadap kemungkinan adanya infeksi saluran kemih (ISK), sebab apabila terdapat infeksi pada salah satu bagian dari saluran kemih, sebenarnya seluruh saluran kemih, termasuk ginjal berada dalam bahaya. Meskipun ISK bukan penyebab utama dari gagal ginjal, oleh karena gagal ginjal yang disebabkan oleh ISK sebenarnya dapat dihindarkan dengan diagnosa dini diikuti dengan pengobatan yang adekuat. Oleh karena itu metoda diagnostik yang cepat, sederhana akan tetapi dapat dipertanggung jawabkan untuk menentukan adanya ISK serta menentukan lokalisasi infeksi sangat dibutuhkan. Selain komplikasi berupa gagal ginjal, ISK (terutama pielonefritis) pada wanita hamil dapat menyebabkan kelambatan pertumbuhan in utero (intra uterine growth retardation) atau kelahiran prematur, maka metoda diagnosis seperti disebutkan diatas sangat diperlukan, oleh karena metoda diagnosis "invasive" tidak mungkin dilakukan pada mereka, meskipun sarana dan prasarannya memungkinkan. Pielonefritis dan ISK pada umumnya sering pula merupakan penyulit pada penderita diabetes mellitus, dan apabila tidak mendapat penanganan yang baik, lebih mudah akan terjun kedalam keadaan terminal dari penya-

kit ginjal dengan segala konsekuensinya.

Oleh karena bakteriuri bermakna yang dalam air kemihnya juga diketemukan adanya bakteri berlapis antibodi (BBA) menunjukkan adanya korelasi yang cukup kuat dengan pielonefritis, maka oleh Thomas dkk dan kemudian ditunjang oleh Jones dkk diperkenalkan uji BBA dengan menggunakan metoda imunifluoresensi, akan tetapi kerana pengamatannya harus dilakukan dengan mikroskop fluoresensi yang harganya cukup mahal, metoda ini sulit ditrapkan dilaboratorium-laboratorium yang peralatannya terbatas. Pada penelitian ini selain dibuktikannya adanya korelasi antara adanya BBA dalam air kemih dengan imunitas humoral lokal pada pielonefritis ascendens eksperimental dengan menentukan adanya sel pembentuk antibodi speifik, juga dikembangkan penentuan adanya BBA dalam air kemih dengan menggunakan Enzyme Immuno Fluorescence Assay (EIFA) yaitu suatu modifikasi dari ELISA yang menggunakan substrat fluorogenik sebagai pengganti dari subtrat khromogenik, dan pembacaannya dilakukan secara visual.

## BAB I. TINJAUAN KEPUSTAKAAN

Gagal ginjal yang dapat menyebabkan kematian dari penderita sebagian besar merupakan komplikasi dari glomerulonefritis khronika atau penyakit vaskuler dari ginjal. Keadaan-keadaan tersebut merupakan kelompok yang membutuhkan dilakukannya tindakan cangkok ginjal.

Menurut Kunin (1979), di Amerika Serikat berdasarkan perkiraan dari National Institute of Health Artificial Kidney-Uremic Program, apabila penderita-penderita gagal ginjal tersebut di atas tidak mendapatkan pengobatan yang sempurna, stadium terminal dari penyakit ginjal tersebut akan menelan korban sebanyak 53.000 orang tiap tahunnya. Dari jumlah tersebut 8.000 (15 %) kematian merupakan komplikasi dari pielonefritis. Di Eropa dalam tahun 1978 diperkirakan terdapat 22.000 orang penderita gagal ginjal yang memerlukan pengobatan dialisis.

Menurut Andi (1989) di Indonesia dalam tahun ini terdapat 3.800 orang penderita yang membutuhkan perawatan dialisis, sedangkan alat untuk ini hanya tersedia 200 buah yang hanya mampu untuk melayani sebanyak 1.800 penderita tiap tahunnya.

Sebagai perbandingan, misalnya di Jepang pada tahun

1985 terdapat 15.000 mesin dialisis untuk melayani 66.310 penderita.

Meskipun pielonefritis dan infeksi saluran kemih (ISK) lainnya bukan merupakan penyebab gagal ginjal yang utama, akan tetapi infeksi ini dapat mengakibatkan kelainan ginjal yang berarti, terutama pada golongan wanita muda. Pada wanita hamil ISK perlu mendapat perhatian khusus karena juga merupakan komplikasi dari kehamilan.

Apabila gagal ginjal ini didasari oleh adanya kelainan struktur anatomik saluran kemih atau adanya gangguan neurologik dari saluran kemih, sering dapat mengakibatkan kematian dari penderita. Menurut Kunin (1979) pielonefritis menempati urutan kedua sebagai penyebab gagal ginjal yang membutuhkan tindakan cangkok ginjal (lihat tabel 1.).

Adanya kelainan anatomik dari ginjal dan saluran kemih merupakan faktor penting yang dapat menunjang terjangkitnya ISK. Selain dari pada itu, sebagai akibat dilakukannya tindakan instrumentasi pada saluran kemih, terutama pada pemasangan "indwelling catheter" pada saluran kemih dapat menunjang terjangkitnya infeksi nosokomial oleh kuman-kuman gram negatif, malahan dapat terjadi septisemia.

Peristiwa-peristiwa tersebut diatas membutuhkan perhatian yang serius, bukan hanya karena besarnya biaya-biaya yang dibutuhkan untuk perawatannya apabila sampai terjadi gagal ginjal, akan tetapi yang lebih penting adalah bahwa keadaan tersebut diatas sebenarnya dapat

dihindarkan.

Metoda-metoda untuk diagnosis cepat dari ISK telah banyak dilakukan penelitian, misalnya untuk skrening (Lewis et al., 1976; Perry et al., 1982; Hoff et al., 1985; Pfaller et al., 1985; Males et al., 1986; Murray et al., 1987), yang berdasarkan cara biakan (Claridge, 1987; Gunther et al., 1981; Pezzlo et al., 1982) dan yang didasarkan pada lain-lain cara seperti uji nitrit, uji lekosit esterase dll (Cohem et al., 1976; Barlett et al., 1984; Lipsky et al., 1987; Longoria et al., 1987; Pezzlo et al., 1987; 1988).

Tabel 1.  
Sepuluh penyebab utama gagal ginjal yang membutuhkan tindakan cangkok ginjal.

Penyakit:	Juml. kasus:	% Jumlah:
Glomerulonefritis	8.913	56,0
Pielonefritis	2.123	13,1
Penyakit ginjal lain unclass	932	5,9
Peny. ginjal polikistik	860	5,4
Nefrosklerosis	788	4,9
Dua atau lebih peny. ginjal	511	3,2
Peny. ginjal kongenital	224	1,4
Nefritis (karena obat)	201	1,3
Glomerulonefritis diabetikum	198	1,2
Familial nephropathia	187	1,2
Lain-lain	984	6,4
Jumlah	15.921	100,0

Dikutip dari Kunin, Detection, prevention, and managemant of urinary tract infections. Hal. 2,ed. 3, 1979.

Diagnosis cepat yang diikuti dengan tindakan pengobatan dan tindakan operatip yang efektif yang telah banyak mengalami kemajuan, dapat mengurangi kebutuhan

pemakaian kateter, dengan sendirinya akan dapat menekan kemungkinan terjangkitnya ISK, sedangkan glomerulonefritis dan penyakit vaskuler dari ginjal hingga sekarang masih merupakan problem.

Menurut Briggs et al., (1976), pielonefritis dan nefritis interstitial menduduki urutan kedua setelah glomerulonefritis dengan persentasi yang lebih tinggi dari pada yang dikemukakan oleh Kunin (1979) yang pada akhirnya memerlukan dilakukannya tindakan transplantasi ginjal (tabel 2.)

Untuk memudahkan pembahasan yang lebih mendalam akan diuraikan terlebih dahulu beberapa istilah serta penjelasan singkatnya.

Tabel 2. Sebaran penyakit ginjal yang memerlukan transplantasi

Jenis penyakit:	% total:
Glomerulonefritis	30,7
Pielonefritis/nefritis interstitial	21,2
Penyakit multisistem	10,8
Penyakit kiste ginjal	9,2
Penyakit vaskuler ginjal	7,6
Nefropatia obat	3,5
Herediter	2,5
Lain-lain penyakit ginjal	3,4
Etiologi tak diketahui	11,1
	100,0

Dikutip dari Briggs, J.D. The recipient of a renal transplant. In *Kidney transplantation*, ed. P.J. Morris, hal. 60.

## 1. TERMINOLOGI

Menurut Kunin (1979), peradangan dari saluran kemih dapat dibagi sebagai berikut:

### 1.1. Infeksi saluran kemih:

Infeksi saluran kemih merupakan bentuk klinik yang menyatakan adanya infeksi yang meliputi saluran kemih mulai dari uretra sampai daerah korteks renalis. Infeksi dapat terjangkit pada bagian-bagian tertentu, misalnya pada ginjal (pielonefritis), kandung kemih (sistitis), prostat (prostatitis), uretra (uretritis), dan lain-lainnya.

Apabila suatu bagian dari saluran kemih mengalami infeksi (saluran kemih dalam keadaan normal steril), maka seluruh saluran kemih berada dalam bahaya.

### 1.2. Pielonefritis:

Pielonefritis adalah suatu proses inflamasi yang meliputi ginjal dan jaringan sekitarnya (pelvis renalis). Biasanya yang dimaksud dengan pielonefritis adalah pielonefritis yang disebabkan oleh bakteri selain *Mycobacterium tuberculosis* (renal tuberculosis). Selain bakteri, jamur dan virus dapat pula menyebabkan pielonefritis. Pielonefritis bakterial menyatakan bahwa ginjal mengalami infeksi akibat invasi oleh bakteri atau merupakan suatu

lesi sebagai akibat infeksi pada masa yang lalu.

#### 1.2.1. Pielonefritis akuta:

Pielonefritis akuta adalah suatu sindroma yang terdiri dari panas badan meningkat, nyeri didaerah pinggang, dan kadang-kadang disertai dengan adanya gejala-gejala konstitusional lainnya seperti leukositosis, adanya torak leukosit dan bakteri dalam air kemih, disertai dengan adanya atau tanpa adanya gejala-gejala dari sistitis seperti rasa anyang-anyangan, sering kencing dll. Kelainan-kelainan tersebut diatas secara histologik akan ditandai dengan didapatkannya banyak sekali leukosit polimorf dalam jaringan interstisial dari ginjal, kadang-kadang sampai menyerupai suatu abses, disertai dengan didapatkannya leukosit dalam lumen tubuli. Abses ini dapat berbentuk abses multipel, dan ini menunjukkan bahwa terjadinya abses tersebut secara hematogen, atau hanya berbentuk abses tunggal mulai dari papil sampai ke korteks renalis (berbentuk taji) dan ini menunjukkan terjadinya secara ascendens.

#### 1.2.2. Pielonefritis khronika:

Pielonefritis khronika adalah suatu keadaan berupa:

- (i) suatu infeksi berkepanjangan yang disertai dengan berkembang biaknya bakteri (chronic active)
- (ii) sisa-sisa lesi akibat adanya infeksi pada



waktu yang lalu sedangkan pada waktu ini tidak terdapat lagi pertumbuhan bakteri (chronic inactive).

Kedua bentuk klinik tersebut diatas ditandai dengan tidak adanya gejala-gejala konstitusional dan tidak adanya sel-sel inflamasi dan bakteri dalam air kemih. Istilah khronik disini memberikan kesan suatu proses yang berlangsung secara berkesinambungan yang akhirnya dapat menimbulkan kerusakan total dari ginjal apabila proses ini tidak dihentikan. Akan tetapi pada kenyataannya, kebanyakan penderita ISK, meskipun mereka menderita infeksi ini berulang-ulang, tidak selalu akan mencapai stadium terminal dari penyakit ginjal. Karena itu cara mendefenisikan istilah-istilah diatas dengan jelas merupakan hal yang sangat penting, termasuk juga faktor-faktor resikonya (risk factors). Kiemelstil et al., (1961) dan Heptinstall et al., (1973) telah berhasil menetapkan kriteria yang tepat untuk menentukan diagnosis pielonefritis khronika secara histopatologik.

Kesulitan lain untuk menentukan diagnosis pielonefritis khronika dihadapi oleh kelompok ahli radiologi; dalam membuat interpretasi mengenai kelainan-kelainan patologik yang mereka temukan bila dilakukan pielografi intravenus, berupa kaliks menumpul dan pembentukan jaringan parut setempat (local renal scar).

Menurut Hodson et al., (1965) jaringan parut

setempat ini dapat disebabkan oleh refluks vesikoureter.

Dengan diketemukannya cara-cara non-invasi untuk menentukan lokalisasi anatomik ISK bagian atas dan ISK bagian bawah, pendapat-pendapat yang kontroversial tersebut diatas mulai berkurang. Yang menjadi pusat perhatian sekarang ini adalah kemungkinan adanya faktor-faktor non-supuratif pada pielonefritis khronika yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada ginjal tanpa adanya partisipasi dari bakteri yang masih hidup.

Hingga sekarang para peneliti belum berhasil mengadakan evaluasi dari peranan komponen non-supuratif tersebut diatas.

Antigen bakterial dapat tinggal dalam ginjal untuk beberapa waktu lamanya setelah semua bakteri penyebabnya berhasil dibasmi, akan tetapi hingga sekarang belum berhasil dibuktikan apakah antigen ini dapat menyebabkan kerusakan lebih lanjut dari ginjal yang bersangkutan (Cotran et al., 1963; Aoki et al., 1969; Heptinstall et al., 1973). Karena itu para ahli hingga sekarang masih berpendapat bahwa ada dua bentuk pielonefritis khronika, seperti telah disebutkan diatas.

Kemungkinan adanya bentuk pielonefritis khronik imunologik (termasuk adanya komponen non-supuratif) hingga sekarang belum dapat dibuktikan, dan masih dibutuhkan penelitian-penelitian lebih lanjut.

Pakar-pakar patologi juga mengalami kesulitan untuk membedakan pielonefritis bakterial dari lain-lain proses inflamasi ginjal.

Seperti telah diuraikan diatas, bahwa infeksi ginjal dan ISK pada umumnya, pada manusia biasanya terjangkit secara asendens dan sering kali menunjukkan adanya asosiasi dengan adanya batu, obstruksi, atau kelainan-kelainan neurologi dari sistim pengeluaran air kemih.

Kelainan-kelainan ginjal yang disebabkan oleh proses-proses tersebut diatas yang secara kebetulan diketemukan pada waktu dilakukan otopsi atau bila dilakukan nefrektomi, adalah:

- dilatasi dan inflamasi dari pelvis renalis
- inflamasi dari papilla renalis, yang biasanya meluas sampai kemedulla dan korteks renalis, biasanya berbentuk taji
- peradangan interstisial akuta yang ditandai dengan adanya lekosit polimorf, yang kemudian diganti dengan sel-sel mononuklear, dan akhirnya jaringan ditempat tersebut akan diganti oleh jaringan fibrosis. Bagian ini dari ginjal nantinya akan mengalami atropi dan akan menyebabkan distorsi dari ginjal dan pembentukan jaringan parut pada korteks.

-kadang-kadang disertai oleh abses perinefrik.

Pada pemeriksaan secara histopatologik didapatkan adanya kelainan-kelainan sebagai berikut:

- pada bagian yang mengalami infeksi mula-mula ditemukan sel-sel radang akut didaerah interstisium yang kemudian digantikan oleh sel-sel radang khronik, dan daerah tersebut akhirnya akan mengalami fibrosis.

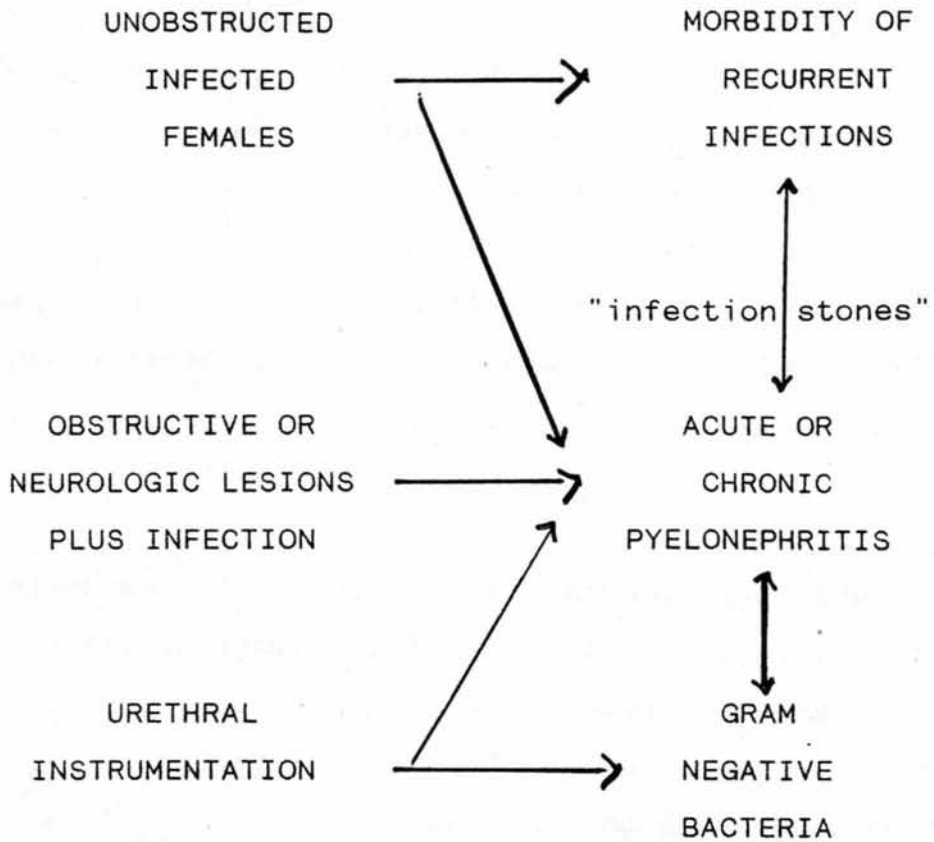
-pada infeksi khronik yang telah berlangsung lama dapat menyebabkan terjadinya obstruksi lokal dari tubuli yang kemudian akan mengalami dilatasi dan intraluminal terdapat zat yang menyerupai protein, selain dari pada itu juga didapatkan torak. Daerah ini memberikan gambaran histologik dari kelenjar tiroid (thyroid-like area).

-pada bagian lain dari ginjal dapat dilihat adanya proses peradangan interstisial khronik yang disertai dengan adanya torak radang.

Kebanyakan dari proses inflamasi ini hanya terbatas pada kaliks dan forniks saja, sedangkan glomeruli pada permulaan peradangan ini masih bebas. Pada keadaan yang lebih lanjut, glomeruli akan mengkerut dan mengalami hialinisasi.

Stadium ini memberikan gambaran yang khas dan disebut fibrosis periglomerular. Menurut Kiemelstil et al., (1961) pada otopsi ginjal yang dilakukan pada penderita-penderita yang meninggal karena lain penyakit, hanya 2 % yang menunjukkan tanda-tanda pielonefritis.





Gambar 1. Hubungan antara faktor-faktor predisposisi dengan infeksi saluran kemih. Dikutip dari Kunin, Detection, prevention, and management of urinary tract infections, hal. 6, ed. 3, 1979

Aoki et al., (1969) berhasil mendeteksi sisa-sisa antigen bakterial dalam ginjal penderita-penderita pielonefritis khronika dengan menggunakan uji imunofluoresensi.

Sanford et al.,(1962), Cotran et al., (1963), dan Schwartz et al., (1969), juga telah berhasil

mengidentifikasi adanya antigen bakterial dalam ginjal hewan coba dan manusia. Antigen tersebut akan menghilang dari ginjal setelah 10 minggu. Hal inilah yang menyebabkan hasil deteksi adanya infeksi atau sisa-sisa infeksi pada ginjal sering kali memberikan hasil negatif. Biopsi ginjal biasanya juga sering kali memberikan hasil yang mengecewakan, sebab meskipun pada pemeriksaan histopatologik memberikan gambaran yang khas, akan tetapi bila dibiakkan hasilnya steril.

### 1.3. Infeksi ascendens dan infeksi descendens (hematogen):

Sebagian besar ISK pada manusia merupakan infeksi ascendens setelah kuman memasuki meatus uretra. Cara ini merupakan rute infeksi yang biasanya terjadi terutama pada wanita, dan juga sebagai akibat pemasangan kateter baik pada wanita maupun pada pria.

Ada tiga kemungkinan cara kuman mencapai ginjal secara ascendens:

- a. berdasarkan gerakan dari Brown
- b. melalui saluran limfe
- c. berdasarkan refluks vesikoureter.

Infeksi ascendens biasanya dimulai dengan pielitis, dan kemudian meluas ke daerah papilla, medulla, dan korteks renalis, dan lesi ini biasanya berbentuk taji. Tanda yang khas dari pielonefritis ascendens bukan berdasarkan pada gambaran mikroskopik, akan tetapi berdasarkan pada distribusi segmental dari

lesinya.

Selain secara ascendens, dapat pula berlangsung melalui peredaran darah (hematogen). Infeksi ini biasanya dimulai dengan pembentukan abses kecil di daerah korteks renalis, dan dapat meluas ke jaringan sekitarnya (abses perirenalis), atau menyebar keseluruh bagian medulla dan papilla renalis. Pada pielonefritis descendens, gambaran lesinya sangat berbeda, yaitu berbentuk bulat kecil, multipel dan tersebar merata diseluruh ginjal.

#### 1.4. Bakteriuria:

Dengan bakteriuri dimaksud adanya bakteri dalam air kemih. Bakteri ini dapat berada dalam air kemih sebagai kontaminan waktu dilakukan penampungan air kemih, berasal dari jaringan periuretral, dari ureter, kontaminasi oleh tinja dan vagina, atau mikroorganisme yang memang berkembang biak dalam air kemih.

Bakteriuri dapat dibagi berdasarkan :

##### 1.4.1. Jumlah kuman dalam air kemih:

###### a. Bakteriuri bermakna (significant bacteriuria):

Pada bakteriuri bermakna, air kemih mengandung kuman  $10^5$  CFU per ml atau lebih, apabila penampungan air kemih dilakukan secara "clean voided method".

###### b. Bakteriuri tak bermakna (non significant bacteriuria):

Pada bakteriuri tak bermakna, jumlah kuman dalam

air kemih kurang dari  $10^5$  CFU per ml apabila air kemih ditampung secara "clean voided method".

Batas  $10^5$  CFU per ml didasarkan pada hasil penelitian dari Kass et al., (1960) yang menyatakan bahwa apabila air kemih ditampung secara "clean voided method", 95 % dari kasus-kasus pielonefritis yang diagnosis~~nya~~nya didasarkan pada gejala-gejala klinik, air kemihnya mengandung kuman  $10^5$  per ml atau lebih, sedangkan bila kuman tersebut berasal dari kontaminasi, pada waktu dilakukan penampungan, meskipun dilakukan secara "clean voided method" kandungan kumannya kurang dari  $10^5$  CFU per ml.

Spesimen yang paling baik untuk biak hitung adalah air kemih pertama setelah tersimpan semalam dalam kandung kemih (air kemih pertama setelah bangun pagi).

#### 1.4.2. Asal air kemih yang mengandung kuman:

##### 1.4.2.1. Bakteriuri ginjal (kidney bacteriuria):

apabila bakteri berasal dari ginjal,

##### 1.4.2.2. Bakteriuri kandung kemih (bladder bacteriuria):

apa bila bakteri berasal dari kandung kemih.

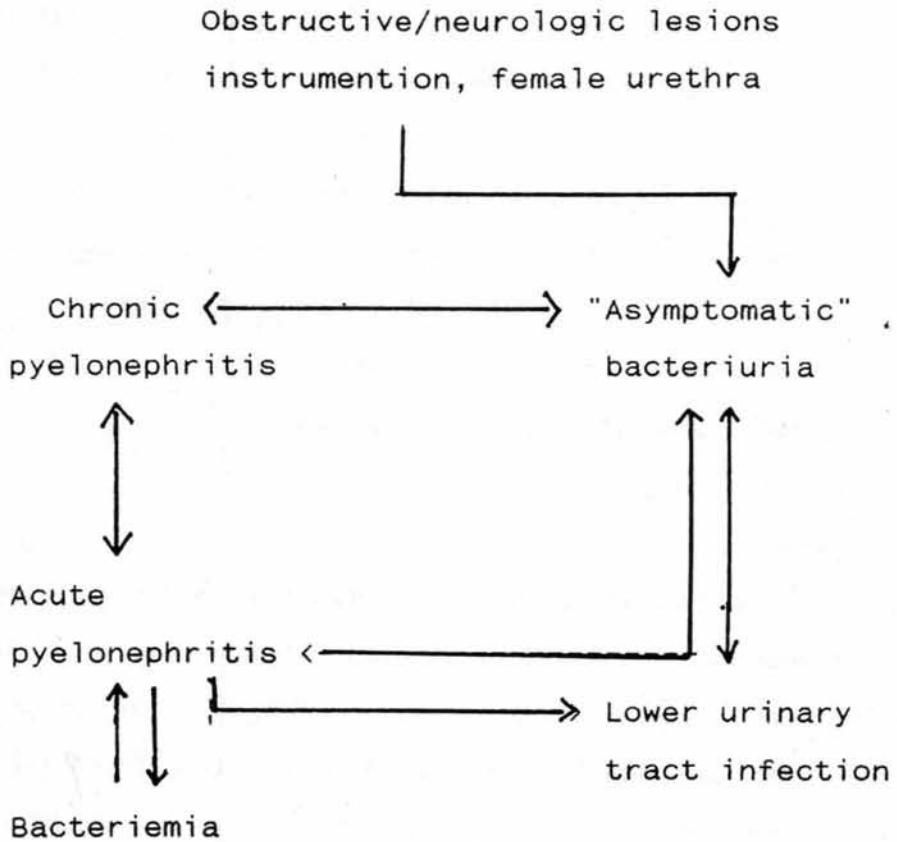
#### 1.4.3. Gejala klinik:

##### 1.4.3.1. Bakteriuri simtomatik

##### 1.4.3.2. Bakteriuri asimtomatik

Pembagian ini didasarkan pada ada tidaknya gejala-gejala klinik yang menyertainya.





Gambar 2. Dinamika ISK yang menuju ke pielonefritis khronika. Dikutip dari Kunin, Detection, prevention, and management of urunary tract infections. Hal. 5, ed.3, 1979

Adanya bakteriuri merupakan penemuan laboratorium yang abnormal, dan hal ini merupakan pertanda kemungkinan adanya ISK, sebab saluran kemih dalam

keadaan normal adalah steril.

Bakteriuri sering kali tidak disertai dengan gejala-gejala klinik (bakteriuri asimtomatik), akan tetapi gejala-gejala ISK sering menyertai baik ISK bagian atas (ginjal, pelvis, ureter) maupun ISK bagian bawah (kandung kemih, uretra), dan disebut sebagai bakteriuri simtomatik. Hubungan antara bakteriuri dan lain-lain manifestasi ISK dengan infeksi ginjal khronis secara bagan dapat dilihat pada gambar 2.

## 2. EPIDEMIOLOGI

Sebenarnya setiap individu mempunyai kepekaan yang sama untuk mendapat ISK; prevalensi infeksi berbeda-beda menurut umur, kelamin dan adanya faktor-faktor predisposisi. Banyak penelitian-penelitian yang telah dilakukan pada pelbagai golongan umur, misalnya pada kelompok umur bayi (Randolf and Greenfield, 1964; Abbot, 1972; Edelman et al., 1973, Davis et al., 1974), kelompok umur prasekolah (Saxena 1974, Kunin and deGroot, 1975; Kunnin et al., 1976; Bootman et al., 1977; Silverberg et al., 1976; Svanborg-Eden et al., 1979), kelompok umur sekolah (Kunin et al., 1962; Kunin et al., 1966; 1970; Etzwiller et al., 1965; Asscher et al., 1973; Brereton et al., 1976; Cohem et al., 1976; Janson et al., 1977; Davison et al., 1983), kelompok wanita hamil (Williams et al., 1968, Asscher et al., 1969; Gruneberg et al., 1970; Abrason et al., 1971; Bawono dkk., 1973, Eddy Sukandar dkk., 1982), kelompok wanita dewasa tidak

hamil (Swapp et al., 1966; Kunin et al., 1968; Fowler et al., 1978; Gillepsi et al., 1978; Pfau et al., 1981, Wood et al., 1981), umur dewasa pria (Schwartz et al., 1969; Lipski et al., 1987; Weinstein et al., 1981) dan kelompok umur tua (Kiemelstiel et al., 1961; Sckwatz et al., 1969; Farland et al. 1977; Forland et al., 1978).

Menurut hasil penelitian mereka, ISK dapat terjangkit pada penderita-penderita mulai dari bayi umur beberapa hari sampai umur lanjut.

Insidens ISK menunjukkan puncak pada umur-umur tertentu dan juga menunjukkan adanya hubungan dengan kelamin. Pada umumnya, ISK lebih sering terjangkit pada wanita, kecuali pada dua kelompok umur, yaitu pada kelompok umur bayi dan kelompok umur yang sering membutuhkan penggunaan kateter.

Pada kelompok bayi, ISK lebih sering terjangkit pada bayi laki-laki dari pada bayi perempuan.

Abbott (1972) dengan menggunakan pungsi kandung kemih (bladder puncture) pada neonatus mendapatkan hasil positif 14 bayi dari 1400 bayi yang diperiksanya (1 %) dan dari ini 11 kasus (78,6 %) adalah bayi laki-laki, sedangkan tiga kasus (21,4 %) adalah bayi perempuan. Delapan dari empat belas kasus tersebut (57,1 %) menunjukkan adanya refluks vesiko-ureter.

Davis et al., (1974) pada penelitiannya terhadap 191 bayi dari kelompok umur tiga bulan mendapatkan hanya seorang bayi menderita bakteriuri (0,5 %), sedangkan Edelman et al., (1973) mendapatkan prevalensi sebesar

0,7 % pada kelompok umur bayi aterm, dan 2,9 % pada kelompok prematur. Randolph et al., (1964; 1975) melaporkan prevalensi sebesar 3,6 % pada neonatus (lebih besar dari hasil peneliti-peneliti lainnya), peneliti ini menggunakan "strap-on bag device" untuk menampung air kemih, sedangkan peneliti-peneliti lainnya menggunakan pungsi suprapubik, sebab menurut mereka penggunaan "strap-on bag device" akan memberikan hasil yang tidak reliabel apabila digunakan untuk menentukan prevalensi, dan cara ini hanya dapat digunakan untuk uji saring (screening).

Davies et al., (1974) mengemukakan bahwa air kemih yang dikeluarkan melalui uretra selalu tercemar pada kelompok umur tahun pertama. Dari hasil pemeriksaan sebanyak 513 orang anak dibawah umur 12 tahun, 165 (33 %) memerlukan dilakukannya pemeriksaan ulang untuk kedua kalinya, 78 (15 %) memerlukan dilakukan periksa ulang ketiga kalinya, dan 32 (6,4% ) memerlukan dilakukan pengambilan spesimen dengan cara pungsi suprapubik untuk konfermasi bakteriuri. Kunin et al., (1976) melakukan pemeriksaan pada 1.573 orang anak perempuan dari kelompok umur tiga sampai lima tahun dengan menggunakan "nitrit dip strip" untuk uji saring. Uji saring ini dilakukan dirumah oleh ibu masing-masing dan dilakukan tiga kali pada pagi hari yang berturutan. Prevalensi dari kelompok ini adalah 1,1 % . Dengan menggunakan uji nitrit ini untuk uji saring, ternyata bahwa 15 % lolos dari deteksi karena bakteriuri disebabkan oleh kuman yang tidak mereduksi nitrat menjadi nitrit, misalnya

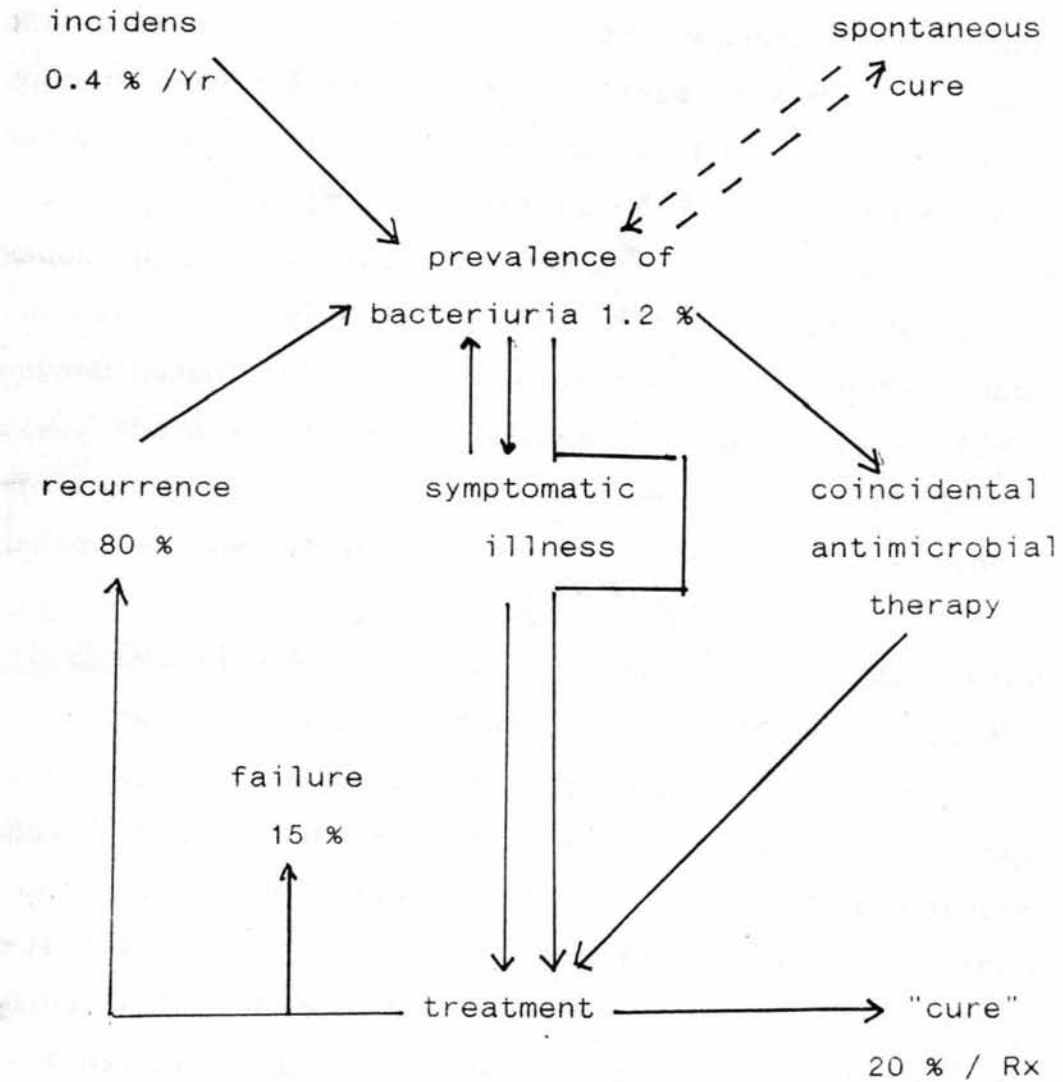
kokkus Gram positif.

Penelitian-penelitian yang dilakukan oleh Davis et al., (1974) mendapatkan angka prevalensi 0,8 %, Saxena et al., (1974) mendapatkan angka prevalensi 0,7 %, sedangkan Boothmann et al., (1974) tidak mendapatkan kasus positif sama sekali. Ketiga peneliti yang disebut terakhir ini menggunakan metoda biak hitung untuk menentukan ada tidaknya bakteriuri. Uji nitrit merupakan metoda yang cukup mudah untuk menentukan kasus-kasus bakteriuri, dan tingginya hasil yang dicapai dengan menggunakan metoda ini bila dibandingkan dengan hasil yang menggunakan metoda lain pada kelompok usia yang sama, sangat mendukung penggunaan metoda ini misalnya untuk digunakan dirumah penderita dan merupakan salah satu metoda uji saring yang baik.

Males et al., (1986) dengan menggunakan metoda uji nitrit mendapatkan hasil yang tidak banyak berbeda.

Pada kelompok anak sekolah didapatkan angka prevalensi yang lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok neonatus dan kelompok balita. Prevalensi bakteriuri pada anak perempuan (1,2 %) jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan prevalensi pada anak laki-laki (0,04 %) atau bila dinyatakan dengan perbandingan adalah 30 : 1. Data-data tersebut diatas menunjukkan bahwa saluran kemih anak perempuan mempunyai kerentanan yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan kerentanan saluran kemih anak laki-laki. Penemuan ini juga menunjang pendapat bahwa ISK kelompok umur ini berlangsung secara asendens ( Asscher et al., 1969; 1973; Bailey et al.,

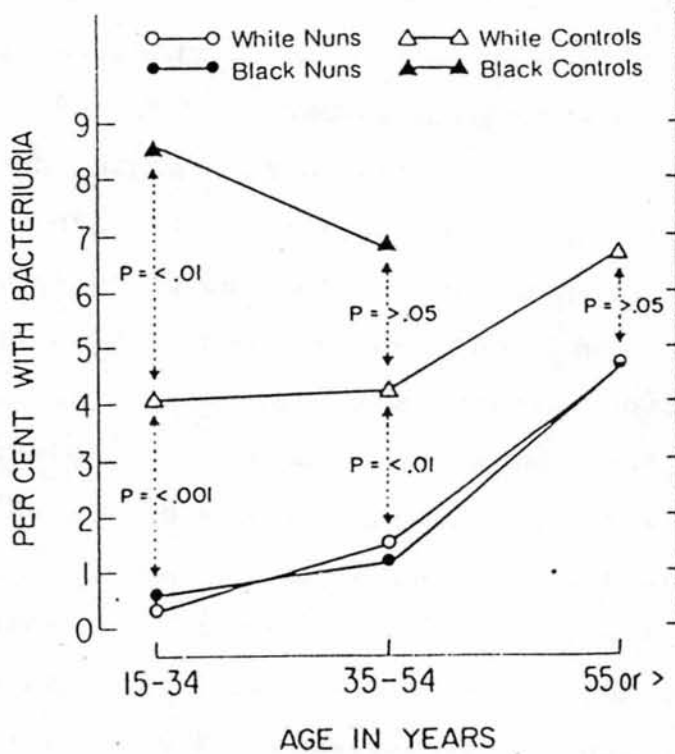
1973; Fairley et al., 1971; Janson et al., 1977; Kunin et al., 1968; 1970).



Gambar 3. Dinamika dari epidemiologi infeksi saluran kemih pada kelompok anak sekolah . Dikutip dari Kunin, Detection, prevention, and management of urinary tract infections, Hal. 41, ed.3, 1978



Sebagian besar kuman-kuman penyebab ISK adalah kuman Gram negatif dan kuman anaerob, yang juga dapat kita temukan dalam feses.



Gambar 4. Prevalensi bakteriuri bermakna diantara biarawati berkulit hitam dan berkulit putih dibandingkan dengan wanita pekerja sebagai kontrol. Dikutip dari Kunun, Detection, prevention, and management of urinary tract infections. Hal 93 , ed.3 1979

Hal ini mendukung pendapat bahwa kuman-kuman penyebab ISK asendens berasal dari usus besar. Menurut para peneliti tersebut diatas, sebenarnya prevalensinya penelitian mereka hanya dilakukan satu kali pemeriksaan. Mereka memperkirakan bahwa 5 - 6 % dari anak-anak perempuan pernah mendapat satu episode bakteriuri sejak masuk sekolah dasar sampai lulus sekolah menengah.

Dinamika dari bakteriuri secara epidemiologis dapat disimpulkan seperti pada gambar 3. Insidens bakteriuri pada wanita cenderung meningkat dengan bertambahnya umur dan meningkatnya kegiatan seksualnya. Hal ini dibuktikan dengan studi komparatif antara kelompok biarawati (nuns) dan kelompok wanita yang belum kawin dengan kelompok wanita yang sudah kawin (Lihat gambar 4.). Prevalensi bakteriuri pada kelompok biarawati muda hanya 0,5 % (lebih kecil dari prevalensi anak perempuan usia sekolah), dan tidak akan mencapai 1 % sampai kelompok biarawati tersebut mencapai umur antara 35 - 44 tahun Kunin, (1969). Selain dari pada itu tidak terdapat perbedaan prevalensi antara biarawati kulit putih dan biarawati kulit hitam, hal ini menunjukkan bahwa pada tingkat sosio-ekonomi yang sama, suku bangsa (race) tidak ikut menentukan kemungkinan terjangkitnya ISK. Wanita-wanita yang belum kawin menunjukkan prevalensi bakteriuri yang lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok wanita yang telah kawin, dan akan meningkat sesuai dengan jumlah kehamilannya. Derajat prevalensi tidak menggambarkan resiko untuk mendapatkan



infeksi. Epidemiologi dari perjalanan ISK pada kelompok perempuan muda dewasa sama kompleksnya dengan pada kelompok anak perempuan usia sekolah. Sebagai contoh dapat dikemukakan disini misalnya suatu kelompok wanita usia muda mempunyai prevalensi bakteriuri antara 2 - 4 % pada suatu waktu. Akan tetapi berdasarkan wawancara bisa didapatkan angka 25 - 35 % pada kelompok umur antara 20 - 40 tahun. Angka prevalensi sebesar ini sering didapatkan oleh peneliti-peneliti apabila hanya didasarkan pada hasil wawancara dengan perawat-perawat, ibu-ibu rumah tangga, termasuk anak gadisnya. Menurut estimasi peneliti, 50 % dari mereka hanya merupakan sindroma uretra dan bukan infeksi yang sebenarnya. Pendapat ini juga didukung oleh O'Grandy et al., (1970). Menurut observasi peneliti, sering terjadi penyembuhan spontan baik dari kelompok dengan ISK simtomatik maupun dari kelompok ISK asimtomatik. Kass et al., (1960) berdasarkan penelitiannya di Yamaica dan Wales, berkesimpulan bahwa setiap tahunnya terdapat kira-kira 55 % "turned over", sedangkan derajat bakteriuri selalu konstan. Turned over ini disebabkan karena pada suatu waktu didapatkan kasus-kasus baru, dan pada waktu yang sama terdapat kasus-kasus bakteriuri yang hasil pemeriksaannya air kemihnya steril, sekalipun tanpa diberikan pengobatan. Ascher et al., (1969) melaporkan berdasarkan hasil penelitiannya bahwa 40 % dari wanita yang menderita bakteriuri akan sembuh secara spontan. Laporan-laporan tersebut diatas bukan hanya mempunyai

Tabel 3. Timbulnya ISK simtomatik pada wanita hamil dari kelompok-kelompok dengan bakteriuri simtomatik dan bakteri asimtomatik.

Bakteriuri tak diobati			Bakteriuri diobati			Non-bakteriuri		
Juml.	Simtomatik		Juml.	Simtomatik		Juml.Symtomatik		
No.	No.	%	No.	No	%	No.	No.	%
95	18	18,9	84	-	0	0	-	- -
17	3	17,6	-	-	0	573	9	1,6
115	35	30,4	-	-	-	-	-	-
97	49	60,2	-	-	-	64	1	1,6
41	8	19,5	96	3	4,3	1028	21	2,0
110	25	22,7	-	-	-	105	1	1,0
179	46	25,7	-	-	-	179	0	0
88	12	13,6	-	-	-	7..29	8	1,1
47	19	40,4	55	1	1,8	4000	48	1,1
52	19	36,5	57	3	5,3	1916	9	0,5
32	8	25,0	-	-	-	44	6	13,6
5	2	40,0	-	-	-	124	8	6,5

Semua pengamatan tersebut diatas mendukung 2 hipotesa:

(i) ISK simtomatik lebih sering terjangkau pada wanita dengan bakteriuri

(ii) Pengobatan pada penderita bakteriuri dapat menekan kekerapan ISK simtomatik menjadi 10 - 20 % .

Dikutip dari Kunin, Detection, prevention and management of urinary tract infections. Hal 45, ed.3, 1978

arti penting bila ditinjau dari sudut epidemiologi dan dinamika dari ISK, akan tetapi juga sangat penting artinya bila dilakukan uji coba dengan obat baru.

Tingginya kekerapan ISK dalam hubungannya dengan aktivitas seksual pada wanita muda begitu terkenal bagi para klinisi, sehingga mereka sering menyebutnya sebagai "honeymoon cystitis".

Salah satu faktor penting yang menyebabkan kekerapan ISK pada wanita lebih tinggi dari pada pria adalah karena uretra wanita lebih pendek bila dibandingkan dengan uretra pria. Mekanisme masuknya kuman kedalam kandung seni hingga sekarang belum diketahui dengan pasti. Menurut O'Grandy et al., (1970) salah satu kemungkinannya adalah: pada waktu kencing terjadi suatu aliran menggulung (turbulent flow) atau refluks pada akhir proses kencing, sehingga bakteri yang terdapat di uretra dapat ikut masuk ke kandung kemih. Bersanggama, seperti hasil penelitian dari Williams et al., (1968) merupakan salah satu cara yang juga penting yang memungkinkan masuknya kuman kedalam kandung kemih. Peristiwa ini sebenarnya dapat dihindarkan dengan cara menganjurkan segera kencing setelah melakukan sanggama, memberikan pengobatan secara profilaksis dengan antimikroba sebelum melakukan sanggama. Tindakan yang terakhir ini sebenarnya merupakan tindakan spekulatif, sebab belum diketahui kuman yang mungkin akan menjadi penyebabnya. Sebenarnya adanya hubungan kausal antara bersanggama dengan ISK hingga sekarang belum berhasil dibuktikan dengan pasti. Adanya kemungkinan bahwa

wanita tersebut sebelum menjadi pengantin sudah menderita ISK rekurens, dan terjadi "outbreak" tepat pada waktu sedang berbulan madu. Menurut Kunin et al., (1969), pada wanita yang hidup membujang kekerapan ISK lebih rendah bila dibandingkan dengan wanita yang telah berkeluarga untuk golongan umur yang sama.

Meskipun demikian, prevalensi bakteriuri pada biarawati muda masih lebih tinggi dari prevalensi bakteriuri pada pria muda.

Kekerapan ISK akan meningkat dengan meningkatnya kekerapan kehamilan (Bryant et al., 1964; Abrason et al., 1971). Peristiwa ini tidak ada hubungannya dengan kekerapan bersenggama. Menurut mereka, kekerapan bakteriuri akan meningkat 10 % setiap sepuluh tahun pertambahan umur. Untuk mendapatkan gambaran yang lebih jelas mengenai korelasi antara kekerapan bersenggama dengan kekerapan bakteriuri dapat dilakukan penelitian pada pasangan suami istri yang karena tugasnya terpaksa berpisah untuk beberapa waktu lamanya dan pada suatu waktu mereka akan berkumpul kembali. Penelitian ini dapat dilakukan dengan biak hitung kuman air kemih pra dan pasca sanggama, untuk mengetahui lebih pasti pengaruh sanggama pada patogenesis bakteriuri.

Perbedaan yang menyolok dapat diketemukan antara kekerapan bakteriuri simtomatik dan bakteriuri asimtomatik selama kehamilan (Little et al., 1965; 1966; Gower et al., 1968; Norden et al., 1970; Gruneberg et al., 1969; Abrason et al., 1971; Bawono dkk., 1973; Gilstrap III et al., 1981; Leveno et al., 1981; Eddy

Sukandar dkk., 1982).

Bakteriuri bermakna, khususnya pielonefritis biasanya terjangkit pada semester ke tiga (lihat tabel 3). Asosiasi antara kehamilan dan bakteriuri merupakan contoh yang nyata adanya hubungan antara bakteriuri asimtomatik dengan penyakit yang memberikan gejala-gejala klinik.

Hubungan antara bakteriuri dengan kelahiran prematur telah lama menjadi bahan perdebatan (Kunin et al., 1960; Bryant et al., 1964; Little et al., 1965; 1966; Whallay et al., 1967; Grunenbergs et al., 1969; 1970; Leveno et al., 1981). Pada penelitian dari Leveno et al., (1981) terbukti bahwa kelahiran prematur lebih tinggi pada kelompok bakteriuri yang tidak diobati dan dalam air kemihnya mengandung bakteri berlapis antibodi (antibody-coated bacteria). Pada penelitian ini didapatkan pula bahwa wanita yang menderita ISK rekurens yang sulit diobati ternyata memiliki faktor resiko tertinggi.

Infeksi saluran kemih jarang diketemukan pada pria di bawah umur 50 tahun tanpa mendapat tindakan instrumentasi pada uretranya sebelumnya, misalnya pemasangan kateter, meskipun terdapat obstruksi karena hipertrofi prostat atau lain-lain penyakit yang membutuhkan dilakukannya tindakan instrumentasi pada uretranya, merupakan penyebab utama terjangkitnya ISK pada pria. Kadang-kadang dapat pula terjangkit infeksi rekurens pada kelompok ini, dan peristiwa ini biasanya disebabkan oleh adanya infeksi lokal pada prostat dan kuman penyebabnya

biasanya adalah kuman-kuman penghuni usus besar (Lubis dkk., 1982; Loo et al., 1984; Lipsky et al., 1987).

Selain dari pada itu infeksi dapat terus berlangsung bila dalam kandung kemih terdapat "residual volume" dan apalagi bila prostat juga ikut terinfeksi, kuman-kuman akan terus dikeluarkan ke air kemih.

Pada kelompok pria umur 70 tahun keatas prevalensi bakteriuri dapat mencapai 3,5 % dan akan meningkat menjadi 15 % pada penderita-penderita rawat tinggal dirumah sakit. Seperti telah diuraikan diatas, berdasarkan penelitian dari Kunin et al., (1962) pada kelompok anak laki-laki setelah masa neonatus kekerapan bakteriuri rendah sekali, yaitu 0,004 %. Suatu hal yang menarik pada kelompok umur ini adalah bahwa kekerapan hasil isolasi *Proteus* sp lebih tinggi dari pada *Escherichia coli* (pada kelompok gadis *Escherichia coli* adalah penyebab utama), seperti yang telah dilaporkan oleh Asscher et al., (1973) dan Bailey et al., (1973). Hal ini kemungkinan besar ada hubungannya dengan seringnya berhasil diisolasinya kuman *Proteus* dari daerah prepusium, jadi kemungkinan besar daerah ini merupakan reservoir bagi kuman-kuman tersebut. Hingga sekarang data-data mengenai korelasi antara sirkumsisi dengan ISK pada anak laki-laki belum ada.

Seperti kita ketahui, beberapa macam penyakit seperti diabetes mellitus, erat sekali hubungannya dengan terjangkitnya bakteriuri simtomatik, termasuk juga pielonefritis (Forland et al., 1977).

Studi epidemiologik dari bakteriuri menunjukkan bahwa

pada kelompok umur anak sekolah tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok diabetik dan kelompok nondiabetik (Etzwiller et al., 1965). Akan tetapi pada kelompok umur dewasa, kelompok diabetik menunjukkan kekerapan yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok nondiabetik. Hal ini mungkin disebabkan karena pada kelompok diabetik dewasa lebih sering membutuhkan tindakan instrumentasi pada saluran kemihnya, lebih-lebih lagi karena jaringan-jaringan penderita diabetes mellitus lebih mudah mengalami invasi dengan bakteri.

Pada penderita diabetes mellitus, sekali terjadi kolonisasi, kecenderungan untuk terjangkitnya infeksi lebih besar. Kesulitan pengobatan infeksi pada penderita-penderita diabetes mellitus akan meningkatkan prevalensi bakteriuri pada kelompok penderita diabetes mellitus. Menurut Forland et al., (1977) kekerapan diketemukannya bakteri berlapis antibodi dalam air kemih orang dewasa penderita diabetes mellitus yang mengidap bakteriuri adalah lebih besar. Menurut peneliti ini, adanya bakteri berlapis antibodi dalam air kemih menunjukkan bahwa telah terjadi invasi dari jaringan ginjal oleh bakteri. Pada permulaan infeksi kekerapan ini mencapai 43 % positif, dan setelah tujuh minggu persentase ini akan meningkat menjadi 79 %. Kebanyakan dari mereka menunjukkan adanya antibodi spesifik dalam serumnya dengan titer yang cukup tinggi terhadap kuman penyebab infeksi tersebut. Raffel et al., (1981) pada penelitiannya dengan menggunakan hewan coba telah membuktikan bahwa

pieloneferitis lebih mudah terjangkit pada binatang dengan diabetes dari pada binatang nondiabetik.

### 3. BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI (ANTIBODY-COATED BACTERIA)

Thomas et al., dalam tahun 1974 dan kemudian didukung oleh Jones et al., (1974; 1977) mendukung penemuan bakteri yang diliputi oleh antibodi dalam endapan air kemih dengan menggunakan pewarnaan imuno fluoresensi dan dinamakan bakteri berlapis antibodi (BBA). Adanya BBA ini ternyata mempunyai korelasi yang kuat dengan bakteriuri ginjal (renal bakteriuria) yang telah diujinya dengan membandingkannya dengan hasil uji bilas kandung kemih (bladder washout technique). Thomas et al., dalam penelitiannya yang diadakan dalam tahun 1975 pada wanita hamil dengan pielonefritis mendapatkan hasil uji deteksi BBA positif pada 34 dari 35 kasus (97 %), sedangkan 19 dari 20 kasus (95 %) uji deteksi BBA negatif pada penderita sistitis. Pemeriksaan antibodi spesifik pada serum penderita mendukung kesimpulan mereka bahwa adanya BBA dalam air kemih mempunyai korelasi yang kuat dengan adanya infeksi ginjal. Uji deteksi BBA ini lebih sensitip dari pada uji penentuan kadar antibodi serum untuk membedakan antara pielonefritis dengan sistitis. Pada penelitian mereka, didapatkan pula keadaan dimana uji deteksi BBA positif sedangkan uji antibodi serum menunjukkan titer yang rendah, kemungkinan besar hal ini terjadi oleh karena pada pielonefritis terdapat pembentukan antibodi lokal dalam ginjal. Pendapat ini telah dibuktikan oleh



Everett et al., (1965), Fairley et al., (1967; 1971), Forsum et al., (1978), Guertler et al., (1977), Harris et al. (1976; 1978), Kaijser et al., (1973; 1978; 1983), Smith et al., (1973; 1974; 1976; 1977), Riedash et al., (1977), Ringelman et al., (1977), dan Lehmann et al., (1981) pada hewan coba. Jones et al., (1974; 1977) berpendapat bahwa uji BBA banyak membantu dalam menentukan lokalisasi dari ISK, dimana cara pemeriksaan langsung seperti uji bilas kandung kemih atau kateterisasi ureter tidak mungkin dilakukan, baik karena sarana dan prasarananya tidak mungkin dilakukan, atau karena keadaan penderitanya tidak memungkinkan metoda ini diterapkan, misalnya pada wanita hamil dan penderita anak-anak. Pendapat yang sama juga telah dikemukakan oleh Thomas et al. (1974; 1975).

Smith et al., (1973; 1974; 1976; 1977) yang mengadakan penelitian mengenai pembentukan BBA pada pielonefritis eksperimental, telah membuktikan bahwa BBA terbentuk dalam ginjal yang menderita infeksi. Mereka telah berhasil pula menentukan waktu pembentukan BBA (timing) dalam ginjal yang sedang mengalami infeksi. Menurut penelitian dari Smith et al. (1973) pada pielonefritis hematogen BBA belum muncul dalam air kemih sebelum hari ke-8 pasca infeksi, meskipun pada waktu itu antibodi spesifik dalam serum sudah positif. Antibodi ini juga negatif dalam ginjal dan dalam air kemih pada waktu itu. Bakteri berlapis antibodi baru muncul dalam air kemih pada hari ke-11, sedangkan dalam air kemihnya antibodi bebas masih negatif, dan baru setelah melewati

hari ke-11 antibodi dari kelas IgG terhadap antigen O menjadi positif. Dalam penelitian ini juga telah dibuktikan bahwa antibodi yang membentuk BBA adalah spesifik terhadap antigen O, dan tidak terhadap antigen K. Hal ini sesuai dengan penemuan mereka bahwa meskipun antibodi terhadap antigen K terdapat dalam serumnya, antibodi ini belum pernah diketemukan dalam air kemih. Menurut peneliti ini IgG tidak pernah diketemukan dalam air kemih binatang normal dan juga tidak pada binatang yang telah mendapat vaksinasi secara aktif, akan tetapi dapat diketemukan dalam air kemih binatang yang menderita pielonefritis. Antibodi dari kelas IgG yang terdapat dalam air kemih binatang yang menderita pielonefritis mempunyai sifat-sifat yang unik, diantaranya memiliki kecepatan gerak elektroforesis yang lebih besar dari yang dimiliki IgG yang berasal dari serum binatang yang sama, sedangkan sifat-sifat lainnya tidak berbeda. Berat molekulnya tidak menunjukkan perbedaan dengan berat molekul dari IgG serum. Baik berat molekul maupun kecepatan gerak elektroforesisnya tidak sama dengan fragmen Fab ataupun F(ab)<sub>2</sub>' yang berasal dari IgG serum. Jadi IgG yang berupa antibodi lokal ini mempunyai sifat-sifat:

- spesifisitasnya sama dengan spesifisitas antibodi IgG yang berasal dari serum,
- kecepatan gerak elektroforesisnya lebih besar dari pada IgG serum,
- mampu menembus epitel ginjal sedangkan IgG yang berasal dari serum tidak dapat.

Jadi pembentukan BBA pada pielonefritis berjalan sejajar dengan munculnya tanggapan kebal humoral lokal dalam ginjal. Munculnya BBA dalam air kemih dua atau tiga hari lebih lambat, setelah antibodi spesifik dari kelas IgG dan IgM meningkat dengan nyata dalam serum.

Untuk membuktikan bahwa tanggapan kebal lokal dan tanggapan kebal umum merupakan peristiwa yang berlainan, Smith et al., (1974) mengadakan percobaan untuk menjangkitkan pielonefritis hematogen pada kelinci. Hasil dari percobaan ini menunjukkan bahwa antibodi lokal dalam air kemih baru dapat dibuktikan mulai hari ke-11. Sebaliknya antibodi spesifik dalam serum sudah dapat dideteksi mulai hari ke-6. Jadi adanya antibodi spesifik dalam serum tidak bersamaan dengan adanya antibodi spesifik dalam air kemih. Dari percobaan ini dapat pula ditarik kesimpulan bahwa antibodi yang terdapat dalam air kemih bukan berasal dari serum.

Jadi penemuan ini juga membuktikan bahwa antibodi dari serum yang terbentuk pada permulaan infeksi tidak dapat mencapai air kemih. Dari fakta-fakta tersebut diatas dapat ditarik kesimpulan bahwa munculnya BBA bersamaan dengan pembentukan antibodi lokal dalam ginjal.

Jadi secara singkat pembentukan BBA dapat dijelaskan sebagai berikut: kuman-kuman yang mengadakan invasi ke jaringan ginjal atau prostat akan menyebabkan proses inflamasi yang akan diikuti dengan pembentukan antibodi lokal, dan antibodi ini akan melapisi kuman dan membentuk BBA baik dalam ginjal.

Kebenaran pembentukan BBA dalam jaringan ginjal hingga sekarang belum dapat dibuktikan dengan cara mendeteksi langsung dalam jaringan.

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa uji BBA ini merupakan metoda yang cukup peka, dan dapat mendeteksi adanya BBA meskipun antibodi bebas belum dapat dideteksi dalam air kemih.

Menurut Riedhas et al., (1977) BBA dapat pula diketemukan dalam ejakulat yang berasal dari prostat. Menurut peneliti tersebut mungkin sekali metoda deteksi BBA ini dapat pula dipergunakan untuk menunjang diagnosis prostatitis.

#### 4. PIELONEFRITIS ASENDENS EKSPERIMENTAL

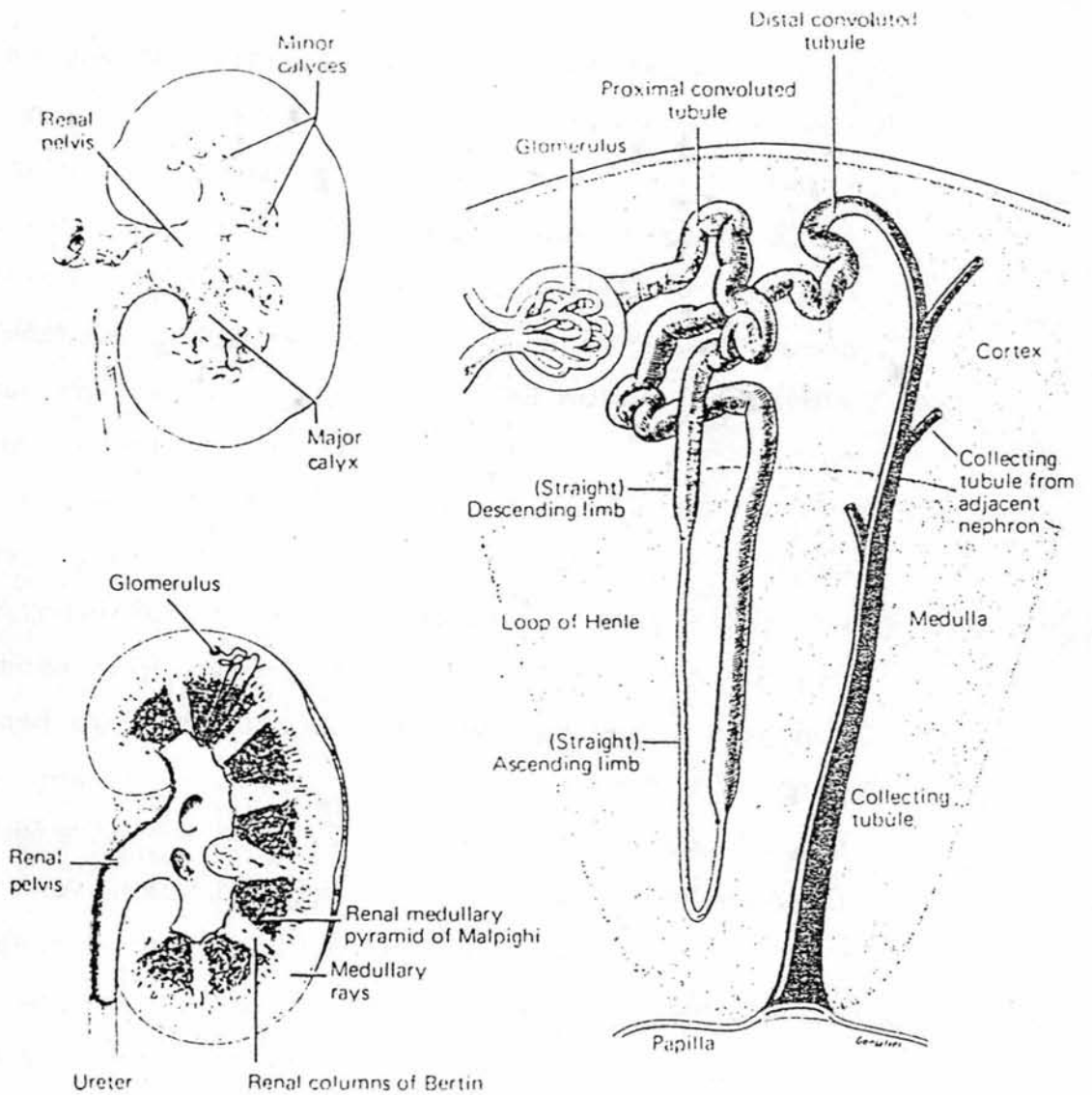
Sebelum mulai menguraikan pielonefritis ascendens eksperimental, akan diuraikan terlebih dahulu beberapa hal yang penting mengenai anatomi ginjal tikus, sebab hal ini sangat mempengaruhi patogenesis pielonefritis.

##### 4.1. Anatomi ginjal:

Ginjal berbentuk sepewrti biji buncis, dengan satu sisi berbentuk konkaf dengan indentasi besar yang disebut hilus, suatu daerah dimana saraf-saraf, pembuluh-pembuluh darah dan pembuluh-pembuluh limfe masuk ke dan keluar dari ginjal, dan pada sisi yang berlawanan bebentuk konveks. Pada ginjal manusia, kaliks-kaliks akan bermuara ke pelvis yang merupakan bagian proksimal dari ureter yang melebar. Ginjal diliputi oleh kapsul ginjal yang ter-

diri dari jaringan penyambung padat, sedangkan jaringan ginjalnya sendiri terdiri dari korteks (bagian luar) dan medulla (bagian dalam). Medulla renalis terdiri dari bentukan-bentukan menyerupai kerucut dan disebut piramid medulla dari Malpighi dengan dasarnya terletak pada korteks, sedang sisinya pada kolum Bertini ginjal, sedangkan puncak dari kerucut menonjol kekaliks dan disebut papil ginjal. Permukaan tiap papil ditembus oleh 10 - 12 buah lubang yang disebut area kribosa yang merupakan muara dari masing-masing duktus koligens. Pada ginjal tikus kollektif tubulus mengalir kepalila tunggal. Lumen pelvis pada tempat masuknya papil membentuk forniks yang menyerupai teluk yang sempit dan masuk kebagian parenkhim ginjal, biasanya berdekatan dengan arteri renalis dan vena renalis. Forniks-forniks tersebut merupakan cabang-cabang dari pelvis (fingerlike extension of the pelvis), dan forniks ini tampaknya tidak mempunyai fungsi, sebab bukan merupakan tempat bermuaranya collecting tubulus (Anderson 1961).

Dari dasar piramid medulla, terdapat 400-500 tubulus-tubulus yang panjang dan tersusun paralel dan dinamakan "medullary rays" dan menembus kekorteks. Tiap medullary ray terdiri dari duktus koligens yang lurus dan dikelilingi oleh banyak bagian tubulus nefron yang berjalan sejajar dan merupakan unit filtrasi ginjal.



Gambar 5.

Kiri: Susunan umum ginjal

Kanan: Lokalisasi segmen nefron korteks, medulla dan tubulus koligens.

Dikutip dari Histologi Dasar, L.C.Junqueria, J.Carneiro (alih bahasa oleh A.Dharma) hal. 392.

Korteks menduduki daerah antara piramid Malpighi (kolum dari Bertin) dan antara dasar piramid dan kapsul ginjal. Pada potongan ginjal segar, pada

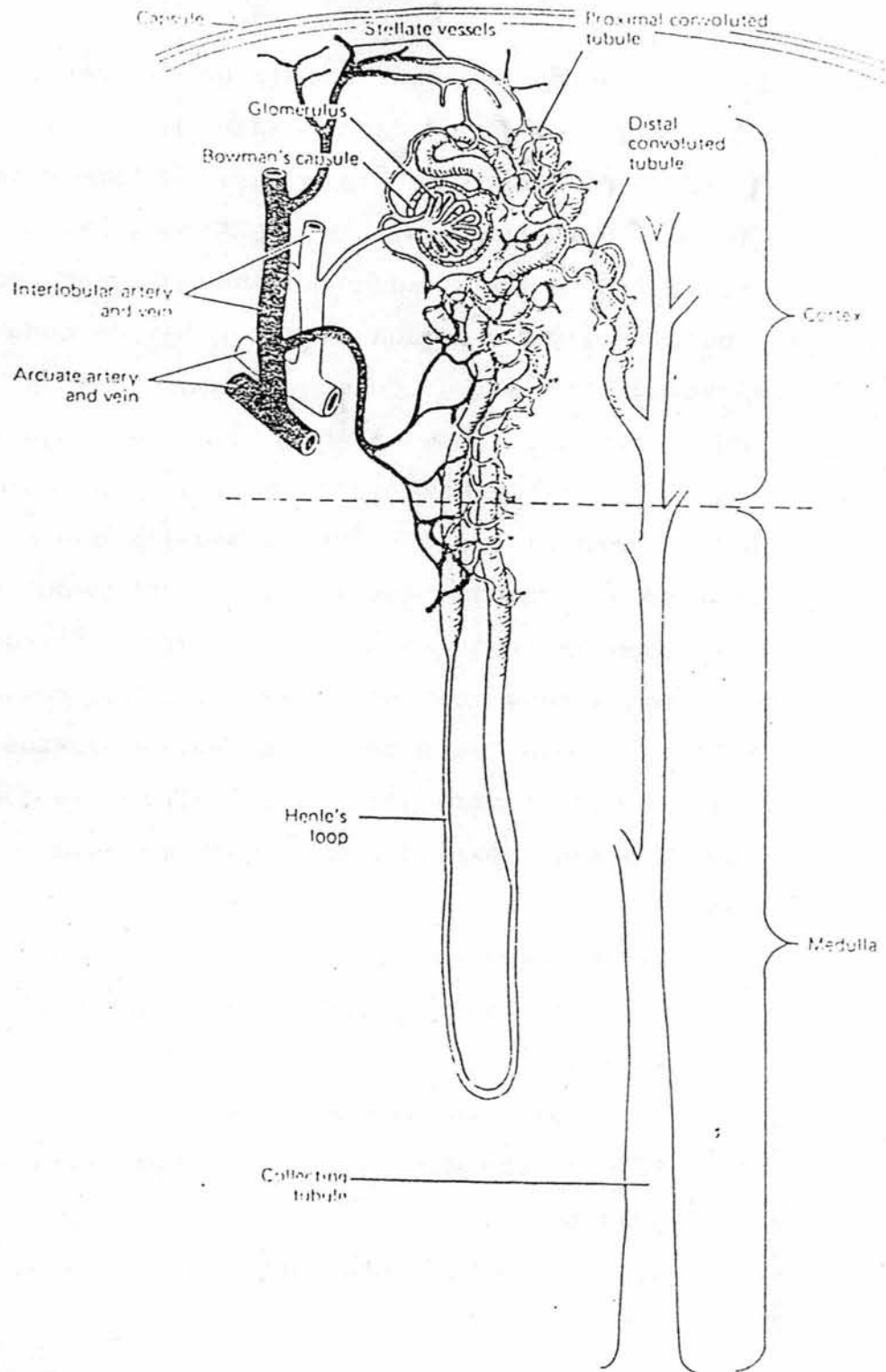
daerah korteks tampak adanya bercak-bercak merah kecil yang disebut badan-badan Malpighi (renal corpuscles) yang terdiri dari kelompok askuler khusus. Penyusun bagian korteks yang paling penting adalah nefron, sedangkan pada bagian medulla, tubulus koligens. Kedua struktur ini berbeda dalam morfologi, fisiologi, dan asal embrionalnya.

Pada beberapa spesies binatang termasuk tikus, ginjalnya berbentuk multilobulus, masing-masing lobus terdiri dari piramid medulla dan korteks. Jadi lobulus ginjal terdiri dari satu medullary ray, dan jaringan korteks yang mengelilingannya, dan mengandung duktus koligens dan semua unit filtrasi ginjal yang bermuara ke dalam duktus ini. Ginjal terdiri dari unit-unit filtrasi yang berjumlah banyak sekali, pada ginjal manusia

#### 4.1.1. Nefron:

Tiap nefron terdiri dari:

1. Korpuskel ginjal (renal corpuscle) dari Malpighi,
2. Tubulus kontortus proksimalis,
3. Lengkung dari Henle, bagian tipis dan bagian tebal,
4. Tubulus kontortus proksimalis.



Gambar 6.  
Potongan melintang pada daerah korteks dan medulla renalis.  
Dikutip dari Histologi Dasar, L.C.Junquera, J.Carneiro (alih  
bahasa oleh A.Dharma) hal. 394.



#### 4.1.1.1. Korpuskel ginjal:

Korpuskel ginjal terdiri dari berkas-berkas kapiler yang disebut glomerulus dan dikelilingi kapsul epitel berdinding ganda yang dinamakan kapsul dari Bowman. Lembaran dalam dari kapsul yang meliputi kapiler-kapiler glomerulus dinamakan lapisan viseral kapsula Bowman, sedangkan lembaran luar dinamakan lapisan parietal kapsula Bowman. Antara kedua lembaran kapsula Bowman ini terdapat ruang kapsuler, yang menampung cairan yang telah difiltrasi melalui dinding kapiler dan lapisan viseral. Setiap korpuskel ginjal memiliki kutub vaskuler pada tempat arteriol aferen masuk dan arteriol eferen meninggalkan korpuskel ginjal dan kutub urinarius pada tempat tubulus kontortus proksimalis dimulai. Setelah memasuki badan ginjal arteriol aferen biasanya bercabang 2 sampai 5 cabang utama dan masing-masing bercabang lagi menjadi jala-jala kapiler.

#### 4.1.1.2. Tubulus kontortus proksimalis:

Struktur ini merupakan segmen pertama dari nefron, berkelok-kelok yang dimulai dari kutub urinarius dari badan ginjal yang dilanjutkan menjadi segmen desendens yang lurus dan menembus medulla dan kemudian menjadi lengkung dari Henle. Lengkung dari Henle ini lebih panjang dan lebih lebar dari pada tubulus kontortus distal yang membentuk bagian akhir dari nefron. Tubulus kontortus proksimalis

yang terdapat pada bagian korteks, dibatasi oleh epitel kubus selapis. Sel-sel ini memiliki sitoplasma yang sangat asidofilik oleh karena banyak mengandung mitokhondria. Permukaan sel yang menghadap kelumen tubulus memiliki banyak mikrofili yang panjangnya sekitar 1 um dan disebut "brush border". Permukaan luar dari brush border diliputi oleh sel selubung yang diduga membantu absorpsi beberapa zat, diantaranya peptida dan glukosa yang keluar dari darah selama filtrasi.

#### 4.1.1.3. Lengkung Henle:

Korpuskel ginjal yang sebagian besar terletak dekat medulla, disebut glomeruli jukstamedulla, mempunyai lengkung Henle yang panjang yang menembus lebih jauh kemedulla dari pada korpuskel ginjal yang dekat kapsul yang lengkung Henle-nya tidak menembus jauh kemedulla.

Masing-masing lengkung Henle membentuk huruf U dan mempunyai segmen tipis diikuti oleh segmen tebal. Lengkung Henle yang panjang, selalu terjadi pada bagian yang tipis, sedangkan lengkung Henle yang pendek terjadi pada segmen yang tebal. Sebagian besar dari segmen tipis berjalan turun dan sebagian besar segmen tebal berjalan keatas.

Bagian tipis dari lengkung Henle, yang merupakan lanjutan dari tubulus kontortus proksimalis menyerupai kapiler, sehingga keduanya sukar dibedakan, dan hanya dapat dibedakan berdasarkan isi

lumennya, bentuk inti, dan lebar lumennya.

#### 4.1.1.4. Tubulus kontortus distalis:

Tubulus kontortus distalis merupakan lanjutan dari lengkung Henle, sedangkan struktur histologinya tetap dipertahankan, akan tetapi tubulus ini berkelok-kelok dan merupakan bagian akhir dari nefron. Tubulus ini dibatasi oleh epitel kukus selapis.

Perbedaan antara tubulus kontortus proksimalis dan distalis adalah: meskipun keduanya terdapat dalam korteks dan dilapisi oleh epitel kubis, akan tetapi tidak memiliki brush border, mitochondrianya lebih sedikit (dalam mikroskop kurang asidofil), sel-sel epitel tubulus lebih tipis dan lebih kecil, sehingga lumennya tampak lebih besar, dan intinya tampak lebih banyak. Sel-sel tubulus ini mempunyai tonjolan-tonjolan lateral dan membrana basalis seperti pada bagian distal. Pada sel-sel epitel seperti juga halnya pada tubulus kontortus proksimalis, tidak tampak adanya batas-batas sel. Pada tempat-tempat yang dekat dengan arterioli, sel-selnya mengalami perubahan menjadi sel silindris, inti sel menjadi satu dan disebut makula densa, fungsinya belum diketahui.

#### 4.1.1.5. Tubulus koligens dan duktus papillaris Bellini:

Air kemih mengalir dari tubuli kontortus distalis ke tubulus koligens, dan dari beberapa tubulus

koligens mengalir ke duktus Bellini. Tubulus koligens merupakan unsur utama dari medulla. Tubulus koligens yang kecil (diameter 40 um) dibatasi oleh epitel kubis, dan pada bagian yang mendekati papilla sel-selnya berubah menjadi lebih tinggi sampai akhirnya berbentuk silindris. Diameter dari duktus koligens yang dekat papilla mencapai 200 um. Sel-sel duktus koligens berwarna lebih muda dan menampakkan adanya halo disekitar intinya.

#### 4.2. PATOGENESIS:

Menurut beberapa peneliti, diantaranya Anderson et al., (1961), Contran et al., (1963), Fierer et al., (1971), Kaijser et al., (1978; 1983), Kass et al., (1960), Larsson et al., (1980), dan Matsby-Baltzer et al., (1982), pielonefritis ascendens dapat dijangkitkan pada tikus putih yang diberi minum terbatas sehari sebelumnya dan dilakukan inokulasi sebanyak 1 ml suspensi kuman *Escherichia coli* O111:B4 secara transuretral. Dengan cara memberikan perlakuan kombinasi berupa tindakan merusak forniks renalis dan penyuntikan intravenus dengan suspensi *Escherichia coli* dapat dihasilkan infeksi yang sama. Ginjal yang mengalami kerusakan pada forniksnya sebagai akibat adanya refluks vesikoureter menunjukkan kepekaan yang lebih tinggi terhadap infeksi secara hematogen dari pada ginjal yang menunjukkan adanya obstruksi, sedangkan sebaran infeksinya tergantung pada lokalisasi kuman diforniks yang mengalami

kerusakan tersebut dan tidak tergantung pada rute infeksi. Induksi pielonefritis ascendens oleh *Escherichia coli* pada tikus perlu didasari oleh adanya robekan pada bagian epitel dari pelvis. Hubungan antara refluks vesikoureter dan volume suspensi kuman yang mengalami refluks telah dibuktikan merupakan fungsi dari kelenturan (elastisitas) dari kandung kemih. Kelenturan kandung kemih ini akan menurun apabila hewan coba diberi minum terbatas untuk beberapa waktu lamanya. Apabila tikus tidak diberi minum pada malam hari sebelum percobaan dilakukan, kandung kemihnya akan mengecil (contracted) dan tidak dapat mengembang lagi. Refluks vesiko-ureter sudah akan terjadi bila dilakukan inokulasi sebanyak 0,2 ml suspensi kuman melalui uretra. Dengan inokulasi sebanyak 1 ml, pelvis akan mengalami dilatasi dan kemudian kedua pelvis akan pecah. Sedangkan pada tikus yang mendapat minum tidak terbatas kandung kemihnya akan mengembang dan aliran balik baru akan terjadi bila diberi inokulasi melalui uretra sebanyak 0,5 ml. Jadi dengan memberi pembatasan minum pada tikus malam sebelum percobaan dilakukan, insidens pielonefritis dan bakteriemi akan meningkat. Robeknya pelvis renalis penting sekali untuk menjangkitkan pielonefritis ascendens yang disebabkan oleh *Escherichia coli* pada tikus. Apabila digunakan *Klebsiella sp* atau *Proteus sp* (Anderson et al., 1961; 1962; Cotran et al., 1963) insidens pielonefritisnya akan lebih besar.

Anderson et al., (1961; 1962) dan Brooks et al., (1974)

yang mempelajari patogenesis dari pielonefritis pada tikus melaporkan adanya perubahan-perubahan yang terjadi pada ginjal setelah mendapat inokulasi transuretral.

Ada dua tipe dari pielonefritis yang timbul, dan ini tergantung pada macam kuman yang dipergunakan untuk inokulasi.

### Tipe I..

Apabila inokulasi dilakukan dengan kuman-kuman yang bukan Klebsiella, misalnya *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* dan lain-lain, perubahan-perubahan yang terjadi adalah sebagai berikut:

#### - Minggu ke-1:

Dalam waktu 72 jam pertama terjadi penimbunan sel-sel leukosit polimorf didaerah forniks anterior, posterior dan superior. Dari daerah forniks superior peradangan akan meluas kedaerah medulla dan papilla renalis (akan tetapi tidak pernah mencapai ujung papilla). Selain dari itu terdapat pula hidronefrosis ringan. Dalam minggu pertama ini terdapat abses kortikal dan dapat meluas ke medulla. Dalam keadaan infeksi berat, dapat terbentuk suatu daerah dengan ischemi yang berbentuk taji mulai dari medulla sampai kekorteks. Pada pemeriksaan secara mikroskopis, terdapat sel-sel infiltrat berupa leukosit polimorf dan

adanya torak lekosit dalam tubulus (tubular white blood cells).

-Minggu ke-2 :

Terdapat penggantian sel-sel inflamasi dari sel-sel polimorf oleh sel-sel limfosit dan sel-sel plasma. Pada hari ke-8 bakteri masih dapat diisolasi dari ginjal, akan tetapi menunjukkan adanya penurunan derajat infeksi 3,4 menjadi 1,7.

-Minggu ke-3 :

Pada permulaan minggu ke-3 sel-sel radang didominasi oleh sel-sel limfosit, disamping itu juga terdapat banyak sel-sel plasma dan sel-sel monosit yang menyerupai makrofag. Dengan meningkatnya jumlah sel-sel limfosit, kemungkinan untuk berhasilnya mengisolasi kuman makin menurun.

-Minggu ke-4 :

Tanda-tanda peradangan menghilang, ginjal mengkerut sebagai akibat terbentuknya jaringan parut dalam ginjal.

Tipe-2:

Apabila untuk inokulasi digunakan kuman dari strain *Klebsiella* sp , perubahan-perubahan patologis yang terjadi adalah sebagai berikut:

Perubahan histopatologis yang terjadi dapat digolongkan pada pielonefritis khronik aktip. Pielitis merupakan kelainan yang pertama-tama diketemukan, dan disertai dengan bakteriuri dan hasil biakan ginjal positif. Tidak terdapat kelainan-kelainan patologi baik makroskopis maupun mikroskopis yang diketemukan selain dari kelainan-kelainan pada pelvis atau jaringan subepitelial pada pelvis yang berupa adanya sel-sel infiltrat mononuklear yang terdapat dibawah epitelium pelvis perietale.

Hageberg et al., (1983) dengan menggunakan mencit sebagai hewan coba untuk digunakan sebagai model dari ISK tanpa obstruksi. Percobaan ini dilakukan untuk mempelajari patogenesis ISK Escherichia coli strain HU734 (strain pielonefritogenik) dan strain 414 (isolat dari tinja). Pada percobaan ini, pengamatan terutama ditujukan terhadap stadium dini dari infeksi. Persentase biakan ginjal positif akan meningkat apabila konsentrasi inokulum ditingkatkan. Konsentrasi kuman  $10^4$  CFU per ml sebanyak 0,05 ml transuretral akan menghasilkan biakan ginjal positif paling tinggi tanpa adanya bakteriemi yang dapat dideteksi. Hasil biakan ginjal positif didapatkan lebih tinggi pada kelompok yang inokulumnya menggunakan strain HU734.

Menurut beberapa peneliti lainnya, diantaranya Anderson et al., (1961), Cotran et al., (1963),



Brooks et al., (1974), Silverblatt et al., (1974), Nishi et al., (1978), Larsson et al., (1980), dan Montgomeri et al., (1980), untuk mendapatkan analogi dengan ISK seperti yang terjadi pada manusia harus dilakukan dengan cara infeksi asendens dan bukan secara hematogen.

Keaneka-ragaman hasil isolasi kembali kuman-kuman yang digunakan untuk infeksi eksperimental dari ginjal hewan coba ditentukan oleh derajat refluks vesiko-ureter dan bukan ditentukan oleh karena terdapat perbedaan dalam kemampuan tinggal (persistence) dari masing-masing kuman yang dipergunakan. Infeksi eksperimental ini dapat memberikan gejala-gejala yang menyerupai gejala-gejala ISK pada manusia, misalnya leukosuri dan hematuria.

Pembangkitan tanggap kebal dalam jaringan-jaringan yang mengalami infeksi ditandai dengan adanya penumpukan sel-sel inflamasi dalam jaringan ginjal. Eliminasi bakteri dari daerah peradangan dapat berlangsung karena ekskresi dan fagositosis. Bakteri-bakteri yang tidak dapat dijangkau oleh sel-sel fagosit, misalnya yang menempel pada permukaan mukosa akan tetap berada dalam ginjal.

Bagaimanakah peranan imunitas pada pielonefritis asendens eksperimental ?

Menurut Sanford et al., (1962) imunitas mempunyai peranan dalam patogenesis dari pielonefritis hematogen yang disebabkan oleh *Escherichia coli*,

*Klebsiella pneumonia* dan *Proteus mirabilis*. Baik imunisasi aktif maupun imunisasi pasip keduanya dapat menekan infeksi setelah mendapat challenge dengan kuman homolog secara hematogen. Kekebalan tersebut yang akan menyebabkan hewan coba menjadi resisten merupakan akibat dipercepatnya eliminasi bakteri dari sirkulasi, dan hal ini akan mengakibatkan menurunnya inokulum yang sampai ke ginjal. Kalau kekebalan ini hanya merupakan akibat meningkatnya klirens vaskuler, kekebalan ini tidak akan dapat menanggulangi infeksi yang terjadi secara ascendens, yang merupakan cara infeksi utama dalam patogenesis pielonefritis. Pada penelitian yang dilakukan oleh Hunter et al., (1964) dilaporkan bahwa baik imunisasi aktif maupun imunisasi pasip keduanya dapat mencegah terjangkitnya pielonefritis ascendens setelah mendapat challenge dengan kuman dari strain yang homolog. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa meningkatnya klirens vaskuler bukan satu-satunya mekanisme untuk mengeluarkan kuman dari tubuh.

Menurut penelitian dari Brooks et al., (1974), pada tikus yang telah mendapat imunisasi tidak pernah ditemukan Ab spesifik dalam air kemih sedangkan dalam serum terdapat peningkatan kadar antibodi spesifik pasca imunisasi, peristiwa ini menunjukkan bahwa dalam ginjal belum terdapat tanggapan humoral lokal. Apabila dilakukan

challenge secara ascendens pada hewan coba ini, tentunya pada permulaan infeksi belum terdapat tanggap kebal humoral lokal dalam ginjal. Pada 72 jam pertama pasca inokulasi terdapat penurunan yang jelas dari kadar antibodi serum (circulating antibody) sedangkan dalam kelompok kontrol yang tidak mendapat challenge penurunan ini tidak tampak. Kemungkinan besar peristiwa ini disebabkan karena antibodi dalam serum yang mengadakan sirkulasi ke ginjal diabsorpsi oleh bakteri-bakteri yang terdapat dalam ginjal pada permulaan dari infeksi tersebut. Jadi antibodi yang terdapat dalam serum juga dapat memberikan perlindungan pada ginjal pada permulaan infeksi dengan cara meningkatkan proses fagositosis (opsonisasi). Jaringan ginjal memiliki sifat anti komplementer (terutama daerah papilla dan sebagian medula) sehingga komplemen tidak dapat berpartisipasi dalam menanggulangi infeksi.

Menurut Anderson et al., (1961; 1962), pielitis merupakan tahap awal dalam patogenesis pielonefritis ascendens pada tikus. Fierer et al., (1971) berdasarkan hasil percobaannya menyatakan bahwa refluks vesikoureter dapat menyebabkan trauma pada forniks renalis yang kemudian akan diikuti dengan masuknya kuman-kuman secara retrograd. Seperti telah diuraikan diatas bahwa dengan membatasi pemberian minum semalam sebelum dilakukan percobaan, refluks sudah akan terjadi pada inokulum sebesar

0,2 ml.

Dengan meningkatkan jumlah inokulumnya, kemungkinan terjadinya refluks ini juga meningkat dan kekerapan terjangkitnya pielonefritis juga akan meningkat. Dengan melakukan inokulasi berulang (multiple inoculations) melalui uretra, pertahanan terhadap pielonefritis akan meningkat, dan peristiwa ini juga akan meningkatkan pembersihan bakteri melalui sistim retikulo endotelial (RES). Imunitas dapat mencegah terjangkitnya pielonefritis dengan cara menekan kemungkinan timbulnya pielitis. Menurut Anderson et al., (1961) dan Sommer et al., (1961) terjangkitnya pielonefritis pada tikus erat sekali hubungannya dengan kekerapan terjadinya refluks vesikoureter. Pada manusia normal adanya refluks vesikoureter ini telah dapat dibuktikan secara radiologis dengan tehnik "voiding cystouretrogram" yaitu dengan menyuntikkan bahan kontras ke kandung kemih kemudian mempersilahkan penderita untuk kencing. Pada orang normal bahan kontras tersebut hanya dapat diketemukan pada uretra, sedangkan bila terjadi refluks vesikoureter maka bahan tersebut dapat mencapai ureter. Refluks diketemukan pada bayi dan anak-anak dengan ISK dengan kekerapan 40 sampai 60% (Robbins et al., 1975). Pada bayi refluks ini merupakan kelainan kongenital, yaitu pada bagian distal dari ureter yang masuk ke dinding kandung kemih. Pada orang dewasa refluks ini dapat terjadi bila ter-

dapat tumor kandung kemih, hipertrofi prostat, divertikel, penderita paraplegi dll.

Menurut Hutch et al., (1963) refluks vesikoureter dapat terjadi pada manusia tanpa diketahuinya oleh karena adanya pembendungan dari saluran kemih; peneliti menekankan pentingnya refluks vesikoureter ini pada patogenesis dari pielonefritis pada manusia.

Pielonefritis ascendens oleh *Escherichia coli* pada tikus perlu didasari oleh adanya robekan pada bagian epitel dari pelvis, dan peristiwa ini akan. Seperti telah diuraikan diatas bahwa insidens refluks vesikoureter dan volume suspensi kuman yang mengalami refluks telah dibuktikan merupakan fungsi dari kelenturan dinding kandung kemih.

#### 4.2. TANGGAP KEBAL HUMORAL LOKAL DALAM GINJAL:

Menurut Smith et al., (1973; 1974; 1976) pada pielonefritis ascendens eksperimental dapat dibuktikan adanya tanggapan kebal humoral lokal dalam ginjal. Adanya pembentukan antibodi lokal ini dapat dibuktikan dengan menggunakan metoda pemeriksaan :

- teknik presipitasi dengan amonium sulfat
- ELISA
- RIA

dari antibodi intrarenal dan antibodi dalam air kemih. Menurut Smith et al., (1977) BBA dapat diketemukan dalam air kemih baru pada hari ke-8 post inokulasi, sedangkan kadar antibodi spesifik dalam serum sudah lebih dahulu

meningkat kadarnya. Peneliti tersebut juga telah berhasil membuktikan bahwa antibodi yang bertanggung jawab dalam pembentukan BBA mempunyai beberapa sifat yang dapat digunakan untuk deteksi adanya pembentukan antibodi lokal. Sifat-sifat yang dapat dipergunakan untuk membedakan antara antibodi yang dihasilkan sebagai akibat tanggap kebal lokal dengan antibodi umum adalah:

- waktu pembentukan BBA
- perbedaan kecepatan gerak elektroforesis

Menurut Braun (et al. (1982), Goodman et al., (1982), Kishimoto et al., (1982) dan Roitt (1985) sel-sel limfosit-B nantinya akan mengalami proliferasi dan diferensiasi dan mejadi sel plasma yang bertanggung jawab dalam sintesa imunoglobulin yang bersifat sebagai antibodi yang spesifik.

Menurut teori seleksi klonal dari Burnet (Roitt, 1977; 1987) pada permukaan dari sel-sel limfosit-B terdapat reseptor-reseptor imunoglobulin. Setiap sel-B yang belum pernah kontak dengan antigen mempunyai reseptor imunoglobulin pada permukaan selnya yang spesifik terhadap determinan group (DG) dari antigen tertentu, yang telah ditentukan secara genetik. Jadi menurut teori ini, maka apabila satu sel-B mendapat rangsangan misalnya dengan *Escherichia coli*, maka salah satu dari DG kuman tersebut akan mengadakan reaksi dengan reseptor imunoglobulin yang spesifik, dan sel yang bersangkutan akan mengadakan proliferasi dan akan membentuk satu klon dari sel-B yang spesifik terhadap *Escherichia coli*.

Sel-sel dari klon tersebut selanjutnya akan mengadakan diferensiasi menjadi sel pembentuk antibodi (antibody producing cells) yang akan membentuk antibodi spesifik terhadap DG dari antigen yang terdapat pada bakteri tersebut dan sebagian kecil menjadi sel memori.

Berdasarkan teori dari Burnett ini kemudian dikembangkan teori baru dari Mitchison yang merupakan pene-gasan dari teori seleksi klonal, dan disebut sebagai "accurate sample theory". Jadi menurut teori yang terakhir ini satu sel hanya dapat mengekspresikan satu jenis reseptor spesifik, atau lebih terinci lagi dapat dikatakan bahwa satu sel hanya mengekspresikan satu alotip dan satu isotip. Menurut teori ini satu sel hanya dapat membentuk satu jenis antibodi yang spesifik terhadap satu DG dari suatu antigen dan masing-masing antibodi tersebut terdfiri dari hanya satu klas imuno-globulin. Apabila sel-sel B dari satu klon mendapat rangsangan dengan imunogen yang sama untuk kedua kalinya, maka sel-sel tersebut (sel B yang telah pernah berkenalan dengan antigen yang sama sebelumnya) akan mengadakan diferensiasi dan proliferasi menjadi sel-sel pembentuk antibodi (sebagian besar) dan sel memori (sebagian kecil).

Menurut Fujiwara et al., (1968) imunoglobulin intra-seluler dapat dideteksi dengan menggunakan metoda imuno-fluoresensi langsung, dengan menggunakan FITC-labeled anti immunoglobulin, yang pada pengamatan dengan mikroskop fluoresensi akan tampak adanya fluoresensi hijau pada bagian sitoplasma dari sel-sel pembentuk antibodi.

Reitamo et al., (1979) dengan menggunakan metoda imunoperoksidasi membuktikan bahwa imunoglobulin intraseluler telah dibentuk mulai stadium plasmablast.

Menurut Roitt (1977) imunoglobulin spesifik intraseluler dapat dideteksi dengan uji imunofluoresensi jenis "sandwich technique", pada dasarnya uji ini merupakan uji imunofluoresensi berlapis ganda (double layered method).

Prinsip dari uji ini adalah sebagai berikut: misalnya kita ingin mengetahui adanya sel-sel pembentuk antibodi yang memproduksi antibodi terhadap polisakarida dari pneumokokus, sediaan yang telah dibuat, misalnya usapan sumsum tulang sternum, setelah difiksasi dengan alkohol dilakukan inkubasi dengan larutan antigen polisakarida dari pneumokokus, setelah masa inkubasi dicuci, kemudian direaksikan dengan antibodi spesifik terhadap polisakarida pneumokokus, setelah masa inkubasi lalu dicuci dan direaksikan lagi dengan FITC-labeled antigobulin. Setelah diinkubasikan kemudian dicuci dengan buffer, lalu diperiksa dengan mikroskop fluoresensi. Apabila terdapat imunoglobulin yang spesifik terhadap polisakarida pneumokokus sel-sel tersebut akan menunjukkan adanya fluoresensi. Jadi dengan metoda yang sama tentunya dapat juga dideteksi adanya sel-sel pembentuk antibodi spesifik yang menghasilkan antibodi lokal dalam ginjal.



## BAB II

# PERMASALAHAN, TUJUAN PENELITIAN DAN HIPOTESIS

### 1. PERMASALAHAN

#### 1.1. PERMASALAHAN UMUM.

Bakteriuri merupakan penemuan laboratorium yang abnormal. dan merupakan suatu peringatan bagi dokter yang merawatnya tentang kemungkinan adanya infeksi saluran kemih. Bakteriuri ini kadang-kadang berlangsung tanpa gejala-gejala.

Menurut Kunin (1960), Bryant et al., (1964), Little et al., (1965; 1966), Whalley et al., (1967), Harris et al., (1976) dan Leveno et al., (1981), bakteriuri sering kali kita temukan pada wanita hamil, dan hal ini perlu sekali untuk mendapatkan perhatian oleh karena dapat terjun menjadi pielonefritis akuta, dan dapat pula menyebabkan penghambatan pertumbuhan in utero dan dapat menyebabkan kelahiran prematur. Dari penelitian

mereka dapat pula ditarik kesimpulan bahwa kelahiran prematur lebih sering diketemukan pada kelompok bakteriuri yang tidak diobati, dan yang paling sering adalah pada kelompok yang BBA-nya positif. Selain dari pada itu didapatkan pula bahwa kelompok bakteriuri yang sukar diobati (sering terjangkit bakteriuri rekurens) mempunyai resiko tertinggi untuk kelahiran prematur.

Menurut Abranson et al., (1961), Fairley et al., (1967; 1971), Bailey et al., (1973), Bawono dkk., (1973), dan Davidson et al., (1983), sering diketemukan adanya bakteriuri simtomatik pada wanita hamil, dan bila terjangkit pielonefritis, biasanya terjadi pada semester ketiga. Pada kelompok ini penentuan lokalisasi anatomik dari ISK tersebut sulit untuk dilakukan dengan cara invasive.

Bakteriuri sering pula dijumpai pada penderita-penderita diabetes mellitus dan merupakan penyulit yang cukup berarti seperti yang dikemukakan oleh Forland et al., (1977) dan didukung dengan percobaan dari oleh Raffel (1981) pada hewan coba, lebih-lebih lagi karena pielonefritis pada penderita-penderita diabetes lebih sering membutuhkan dilakukannya instrumentasi pada saluran kemihnya. Penggunaan kateter sebagai salah satu cara instrumentasi dari saluran kemih, yang sering dilakukan pada umur diatas 50 tahun, misalnya karena hipertrofi prostat, akan meningkatkan kekerapan dari ISK apabila tindakan instrumentasi ini dilakukan pada penderita diabetes mellitus.

Bakteriuri pada anak-anak dan terutama pada bayi menun-

juukkan kekerapan yang cukup tinggi, seperti telah dikemukakan oleh Randolph et al., (1964; 1975), Abbot (1972), Edelman et al., (1973), Davies et al., (1974), Silverblatt et al., (1974), dan Kunin et al., (1976).

Untuk menentukan pengobatan dan menentukan prognosa yang tepat disamping dilakukan pemeriksaan bakteriologi rutin yang meliputi identifikasi, biak hitung dan uji kepekaan terhadap antibiotika perlu sekali ditentukan lokalisasi anatomik dari ISK tersebut.

Seringkali dijumpai kesulitan-kesulitan dalam menentukan lokalisasi dari ISK dengan menggunakan metoda invasive seperti kateterisasi ureter, metoda bilas kandung kemih (bladder washout technique), biopsi ginjal dan lain lainnya misalnya dirumah sakit rumah sakit daerah dimana prasarana dan sarana tidak memungkinkan tindakan ini dilakukan, dan kesulitan ini akan bertambah lagi bila yang kita hadapi penderita-penderita bayi dan wanita hamil.

Pada tahun 1974 Thomas et al., (1974) mengemukakan suatu metoda diagnostik yang tergolong non-invasive, mudah dilakukannya dan dapat dipercaya dan penemuan ini didukung oleh Jones et al., (1974).

Pemeriksaan ini didasarkan pada adanya bakteri berlapis antibodi (BBA) dalam air kemih yang dapat dipertunjukkan dengan menggunakan metoda imunofluoresensi. Penemuan ini kemudian mendapat dukungan peneliti-peneliti lainnya, seperti Everettt et al., (1975), Forsum et al., (1978), Guertler et al., (1977), Harris et

al., (1976; 1978), Riedash et al., (1977;1978), dan Smith et al., 1976; 1977).

## 1.2. PERMASALAHAN KHUSUS

1.2.1. Berdasarkan hasil penelitian dari Thomas et al., (1974), BBA hanya dapat dideteksi dalam air kemih penderita-penderita pielonefritis (dan prostatitis pada pria), sedangkan dalam air kemih penderita-penderita sistitis tidak pernah diketemukan.

Dalam air kemih penderita-penderita sistitis juga tidak pernah berhasil dideteksi adanya antibodi spesifik dari klas IgG (antibodi bebas), sedangkan dalam air kemih penderita-penderita pielonefritis antibodi tersebut dapat ditemukan. Jadi pembentukan BBA rupanya ada hubungannya dengan kadar antibodi spesifik dalam air kemih.

Apakah tidak mungkin BBA dapat pula terbentuk dalam air kemih apabila dalam air kemih tersebut terdapat kuman dan antibodi lokal yang spesifik ?

Apakah terdapat korelasi antara berhasilnya dideteksi BBA dalam air kemih dengan kadar antibodi spesifik dari klas IgG ?

1.2.2. Menurut hasil penelitian dari Thomas et al., (1974) tidak semua penderita-penderita ISK yang hasil diteksi BBA-nya positif menunjukkan meningkatnya

titer antibodi spesifik dari kelas IgG dalam serumnya (29 % titer antibodi dalam serumnya rendah). Berdasarkan hasil penelitian dari Smith et al., (1977), berhasilnya diketemukannya BBA dalam air kemih hewan coba dengan pielonefritis eksperimental ascendens tidak selalu berjalan paralel dengan tingginya titer antibodi spesifik dalam serum (IgG).

Dengan ungkapan lain dapat dinyatakan sebagai berikut: Tidak terdapat korelasi antara hasil deteksi BBA dalam air kemih yang positif dengan kadar antibodi spesifik (IgG) dalam serum.

Menurut peneliti yang sama, antara hasil uji deteksi BBA dalam serum dengan kadar antibodi spesifik (IgG) dalam air kemih menunjukkan adanya korelasi yang positif.

Smith et al., (1974) berhasil membuktikan bahwa antara IgG dari serum dengan IgG dari air kemih terdapat perbedaan dalam kecepatan gerak elektroforesis (IgG air kemih lebih cepat dari IgG serum).

Brooks et al., (1974) menyatakan berdasarkan hasil penelitiannya, bahwa hewan coba yang telah mendapat imunisasi baik dengan cara aktif maupun pasif, titer antibodi spesifik dalam serumnya meningkat, sedangkan dalam air kemihnya tidak pernah dapat dideteksi adanya antibodi dengan spesifitas yang sama.

Jadi antibodi dari serum tidak pernah dapat menca-

pai air kemih, meskipun darah yang mengandung antibodi bersirkulasi dalam ginjal.

1.2.3. Menurut Anderson et al., (1961; 1962), Brooks et al., (1974) dan Smith et al., (1974; 1976; 1977) pada pielonefritis ascendens eksperimental pada akhir minggu ke-2 dan permulaan minggu ke-3 pada pemeriksaan secara histopatologik sel-sel radang didominasi oleh sel-sel limfosit dan sel-sel pembentuk antibodi. Peristiwa ini menunjukkan bahwa pada waktu itu mulai terbentuk antibodi lokal yang bertanggung jawab terhadap pembentukan BBA dan adanya antibodi spesifik (IgG) dalam air kemih (Smith et al., 1977).

Berdasarkan percobaan dari Brooks et al., (1974) yang melakukan imunisasi aktif pada hewan coba telah membuktikan bahwa tanpa adanya infeksi pada ginjal tidak pernah diketemukan adanya antibodi dari kelas IgG dalam air kemih. Peneliti yang sama juga membuktikan bahwa dalam darah yang telah beredar melalui ginjal hewan coba yang imun dan telah mendapat challenge dengan kuman yang sama secara transuretral, dalam waktu 72 jam pertama terdapat penurunan yang nyata dari kandungan antibodi spesifik dalam darah, sedangkan pada kelompok kontrol yang tidak mendapat challenge peristiwa ini tidak terjadi. Peristiwa ini menunjukkan bahwa antibodi spesifik dalam serum telah diikat oleh kuman yang terdapat dalam ginjal pada permulaan

infeksi. Apabila pada waktu itu dilakukan pemeriksaan dari air kemihnya untuk mendeteksi adanya BBA dan antibodi spesifik, hasilnya akan negatif. Jadi adanya antibodi spesifik (IgG) dalam serum tidak akan menyebabkan terjadinya pembentukan BBA.

Jadi pembentukan BBA hanya dapat berlangsung apabila telah terdapat pembentukan antibodi lokal yang menunjukkan bahwa dalam jaringan ginjal telah terjangkit tanggap kebal humoral lokal. Adanya BBA dalam air kemih tentunya menunjukkan adanya korelasi dengan didapatkannya sel-sel pembentuk antibodi yang spesifik didalam jaringan ginjal yang mengalami infeksi.

## 2. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari:

- 2.1. Adanya korelasi antara pembentukan BBA dengan tanggap kebal humoral lokal berupa adanya sel-sel pembentuk antibodi spesifik, dan pembentukan antibodi lokal pada ginjal dari hewan coba yang menderita pielonefritis ascendens eksperimental sebagai dasar untuk mendukung metoda diagnostik untuk menentukan lokalisasi anatomik ISK yang didasarkan pada diketemukannya BBA dalam air kemih.
- 2.2. Membuktikan bahwa BBA yang terbentuk *in vitro* dapat dideteksi apa bila terdapat antibodi spesifik dalam

kadar tertentu dan bakteri homolog dalam konsentrasi yang cukup, untuk dipergunakan sebagai pembuktian bahwa BBA dapat pula terbentuk dalam air kemih dan dapat dideteksi apabila terdapat kuman dan antibodi spesifik yang cukup.

- 2.3. Mengintrodusir metoda EIFA VISUAL sebagai metoda alternatif dari ELISA apabila tidak memiliki ELISA READER dan penggunaan bakteri yang telah dilabel dengan rhodamin untuk uji IF direk untuk mendeteksi sel-sel pembentuk antibodi spesifik.

### 3. HIPOTESIS

Hipotesis yang dikemukakan pada penelitian ini adalah:

- 3.1. Pada pembentukan bakteri berlapis antibodi secara artifisial, menunjukkan adanya hubungan antara hasil deteksi bakteri berlapis antibodi dengan jumlah kuman dan kadar antibodi spesifik yang terdapat dalam sistim tersebut.
- 3.2. Terdapat korelasi yang positif antara hasil deteksi bakteri berlapis antibodi dalam air kemih dengan titer antibodi spesifik dalam air kemih, akan tetapi tidak dengan titer antibodi spesifik dalam serum.
- 3.3. Terdapat korelasi positif antara adanya sel pembentuk antibodi spesifik dalam ginjal dengan hasil deteksi bakteri berlapis antibodi dalam air kemih.



## BAB III. PROSEDUR PENELITIAN

### BAHAN DAN CARA

#### A. BAHAN:

Tikus: tikus putih (Albino rats) Strain Witstar yang berasal dari Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UNAIR.

Bakteri: *Escherichia coli* O6:K13:H1 berasal dari Centre for Reference and Reseach on *Escherichia* (WHO), Statens Serum Institut, DK-2300 Copenhagen S Denmark, atas bantuan Dr Ida Ørskov dan Dr Frits Ørskov.

#### I. PENELITIAN PENDAHULUAN:

Pada penelitian pendahuluan ini dilakukan dua macam percobaan:

1. untuk mendetek adanya sel plasma spesifik terhadap *Escherichia coli* O6:K13:H1 untuk membuktikan secara langsung (in situ) adanya respons imun humoral lokal pada tempat peradangan,
2. pengetrapan metoda Enzyme-Immunofluorescence Assay (EIFA) dan Bact-EIFA (Bact-EIFA).

## 1. DETEKSI SEL PEMBENTUK ANTIBODI DENGAN IMUNOFLUORESENSI

### 1.1. Persiapan:

#### 1.1.1. Suspensi Kuman:

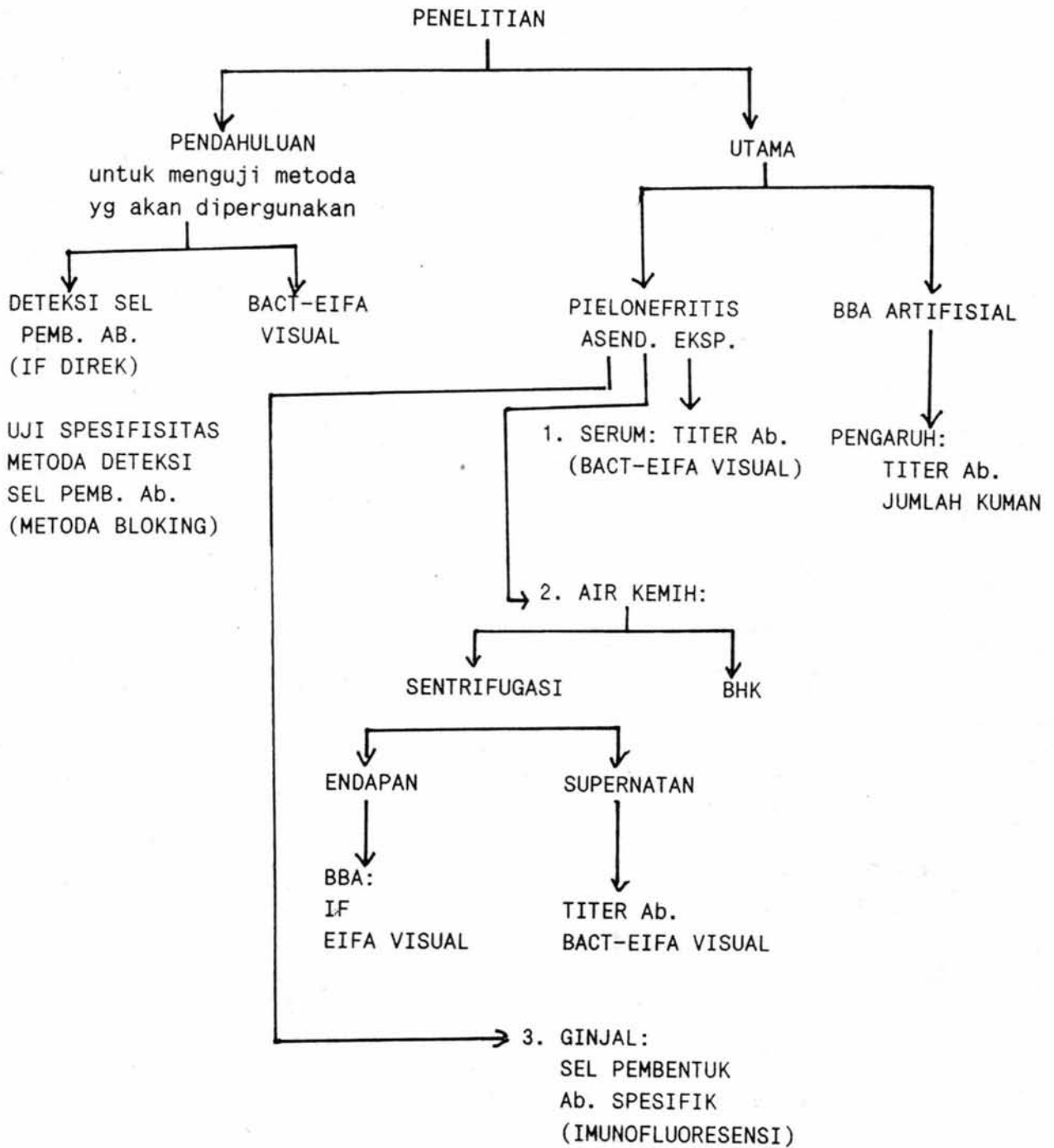
- 1.1.1.1. *Escherichia coli* O6:K13:H1 dibiakkan dengan cara streaking pada lempeng CLED dan dieramkan pada suhu 37°C semalam (18 jam) koloni yang khas ditanam pada trypticase soy broth (TSB) dan dieramkan pada suhu 37°C semalam.
- 1.1.1.2. Cuci dengan 0,1 M PBS (phosphate buffered saline) dengan pH 7,4 dengan cara pemusingan pada 1.500 X g sebanyak dua kali, masing-masing selama 10 menit, kemudian dibuat suspensi kembali dalam 1 ml PBS dan disimpan pada suhu - 20°C sampai waktunya akan dipergunakan.

#### Catatan:

0,1 M PBS pH 7,4:

1. Buat larutan stok 0,2 M dari :
  - a.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  27,8 g dalam 1000 ml aqua dest
  - b.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  53,65 g atau  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71,70 g dalam 1000 ml aqua dest

PROTOKOL PENELITIAN



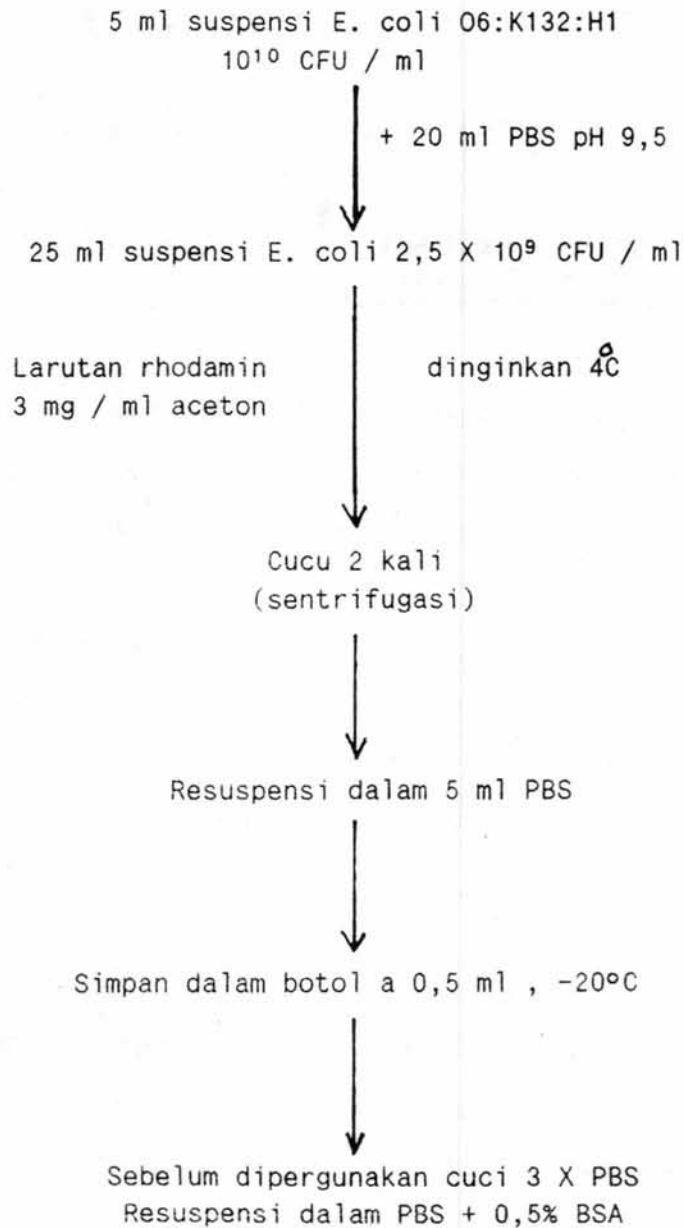
Gambar 7. Protokol penelitian.

2. Campur : 95 ml larutan a  
405 ml larutan b  
8,5 g NaCl  
aqua dest ad 1000 ml

1.1.2. Konjugasi dengan Rhodamin:(lihat gambar 8)

- 1.1.2.1. Buat suspensi *Escherichia coli* O6:K13:H1 dalam PBS yang mengandung kuman  $10^{10}$  CFU per ml.
- 1.1.2.2. 5 ml suspensi kuman pada (a) diencerkan dengan carbonate buffered saline dengan pH 9,5 sampai menjadi 25 ml, sambil didinginkan dengan es.
- 1.1.2.3. Buat larutan Rhodamin B Isothiocyanate (Sigma Chemical Co. USA) yang mengandung 3 mg Rhodamin tiap ml aceton. Rhodamin yang tidak larut dipisahkan dengan cara pemusingan pada  $7.500 \times g$  selama 20 menit.
- 1.1.2.3. Larutan Rhodamin sebanyak 2,5 ml diteteskan pelan-pelan pada suspensi kuman sambil diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer, selama proses ini suspensi kuman terus didinginkan dalam es. Prosedur ini dikerjakan dalam waktu 15 menit, sedangkan pH dari suspensi kuman diusahakan tetap dipertahankan pada pH 9,5 dengan menggunakan larutan NaOH

KONJUGASI BAKTERI DENGAN RHODAMIN



Gambar 8. Bagan cara melakukan conjugasi bakteri dengan rhodamin.

1.1.2.4. Rhodamin bebas dipisahkan dari campuran ini dengan cara pencucian dengan PBS sebanyak dua kali. Suspensi kuman yang telah dilabel dengan Rhodamin (ERhod) dimasukkan dalam kemasan a 0,5 ml dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}$  C sampai waktunya dipergunakan. Sebelum dipergunakan suspensi ERhod dicuci dengan PBS tiga kali kemudian dibuat suspensi dalam PBS yang mengandung 0,5 % Bovine Serum Albumin (BSA, Difco, Fraction V) dan diaduk dengan menggunakan Vortex mixture selama 5 menit.

*Escherichia coli* yang telah dilabel dengan rhodamin ini (ERhod) juga dipergunakan untuk pewarnaan imunofluoresensi pada penelitian utama.

Catatan:

Carbonate buffered saline pH 9,5 terdiri dari campuran:

1. 58 ml larutan 10,6 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dalam 100 ml aqua dest
2. 100 ml larutan 4,2 g  $\text{NaHCO}_3$  dalam 50 ml aqua dest
3. 158 ml larutan 8,5 g  $\text{NaCl}$  dalam 500 ml aqua dest
4. Campuran dicek pH-nya , kalau perlu ditambah ditambah  $\text{NaOH}$  atau  $\text{HCL}$

### 1.1.3. Jaringan Radang :

Untuk mendapatkan jaringan radang guna melaksanakan percobaan pendahuluan ini dipergunakan tikus putih jantan dan mendapat perlakuan sebagai berikut:

- 1.1.3.1. Satu ekor tikus putih jantan berat 190 g dibius dengan menggunakan eter.
- 1.1.3.2. Tikus putih dalam keadaan terbius disuntik secara subkutan dengan 3 ml suspensi *Escherichia coli* O6:K13:H1 yang mengandung kuman  $10^{10}$  CFU per ml dan telah dimatikan dengan cara pembekuan dan pencairan (freezing and thawing) .
- 1.1.3.3. Pada hari ke-11 dilakukan penyuntikan ulang secara intraperitoneal dengan suspensi kuman yang sama sebanyak 3 ml.
- 1.1.3.4. Pada hari ke-26 dilakukan penyuntikan yang ke-tiga dengan suspensi kuman yang sama tetapi ditambah beberapa tetes tinta china steril dan disuntikkan intramuskuler (penambahan tinta china untuk memudahkan menentukan lokalisasi tempat penyuntikan). Penyuntikan dilakukan pada otot pangkal paha bagian lateral kiri.

1.1.3.5. Autopsi dilakukan pada hari ke-30, dan jaringan yang diduga mengalami inflamasi difiksasi dengan formalin buffer (phosphate buffered formalin). Untuk kontrol diambil jaringan otot pangkal paha dari tikus normal.

1.1.4. Pembuatan Blok Parafin

Lihat lampiran.

1.1.5. Pemotongan blok parafin:

Lihat lampiran.

1.2. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Lihat lampiran.1.

1.3. Pewarnaan imunifluoresensi:(lihat gambar 9)

1.3.1. Pemrosesan gelas objek (Rowse-Eagle 1981)

1.3.1.1. Gelas objek dibersihkan dengan alkohol dan aceton, kemudian dikeringkan diudara.

1.3.1.2. Gelas objek dilapisi dengan larutan gelatin dan chromium potasium sulfat dengan cara mencelupkan beberapa kali kemudian dikeringkan dengan meletakkannya secara tegak.



Catatan

Cairan perekat untuk sediaan yang akan dilakukan pewarnaan IF dibuat dengan melarutkan 5 gram gelatin dalam 800 ml aqua dest panas, dan kemudian ditambah 0,5 gram Chromic potasium sulfat. Campuran ini kemudian disaring.

1.3.2. Pencernakan dengan tripsin (Huang 1975, 1976, Swoveland 1979, Rowse-Eagle 1981, Chandler 1983)

1.3.2.1. Untuk keperluan ini disediakan 10 sediaan, masing-masing terdiri dari dua sayatan.

1.3.2.2. Deparafinisasi: celup dalam xilol 3 X 2 menit

1.3.2.3. Rehidrasi: Alkohol 95 % : 2 X 1 menit

Alkohol 85 % : 2 x 1 menit

Cuci dengan PBS 10 menit

1.3.2.4. Pencernakan dalam larutan tripsin:

- Larutan tripsin dikeluarkan dari lemari es dan dipanaskan dalam penangkas air 60° C sampai mencapai suhu kamar (25° C) dan pH diatur menjadi 7,6 dengan menambahkan larutan natrium bicarbonat.

- Celupkan sediaan dalam larutan tripsin 0,25% dalam Hanks Balanced Salt Solution selama 60 menit dalam suhu kamar.

- Cuci dengan PBS selama 5 menit.

Cara membuat larutan trypsin:

a. Buat larutan Hanks BSS:

Larutkan 9,8 g bubuk Hanks (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd Tokyo) dalam 1000 ml aqua bidest, ditambah Sodium bicarbonate 0,2 - 0,35 g untuk mencapai pH 7,3 - 7,4 pada 37°C

b. Larutkan 1 mg trypsin dalam 100 ml larutan Hanks BSS

c. Simpan dalam suhu - 20°C sampai waktunya dipergunakan

1.3.3. Inkubasi dengan ERhod.:

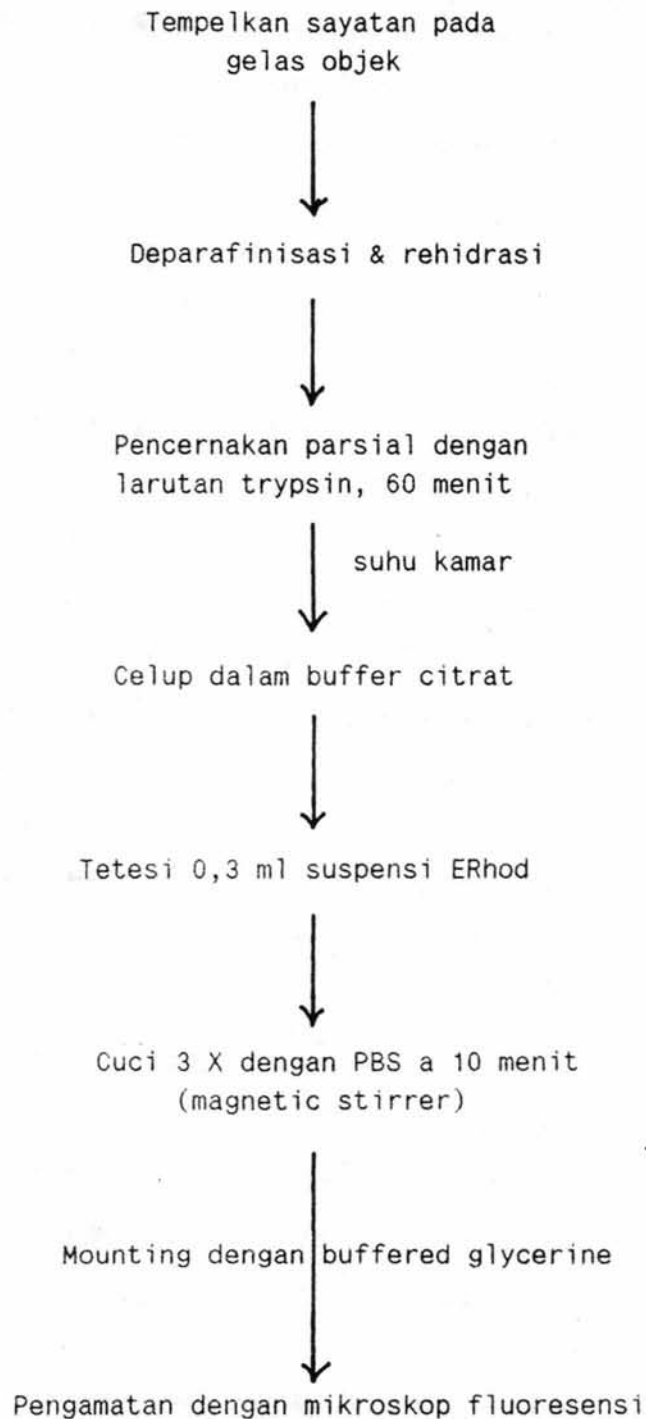
1.3.3.1. Dari 15 sediaan, masing-masing terdiri dari dua sayatan, lima sediaan langsung dicat dengan ERhod, 10 sediaan sisanya untuk studi kompetisi. dan kemudian baru dengan ERhod. Untuk kontrol dibuat 5 sediaan dari jaringan normal.

1.3.3.2. Sediaan dicuci dengan buffer citrat sebentar, kemudian dicuci dengan PBS 3 X 10 menit.

1.3.3.3. Tetesi 0,3 ml suspensi ERhod (mengandung  $10^{10}$  CFU per ml) selama 5 menit.

1.3.3.4. Cuci dengan PBS dalam Coplin jar sambil diaduk dengan magnetic stirrer selama 10 menit.

PEWARNAAN DENGAN BAKTERI BERLABEL RHODAMIN



Gambar 9. Bagan cara pewarnaan dengan ERhod.

Catatan:

Cara membuat buffer citrat:

22,20 g Natrium citrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

22.52 g Citric acid ( $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )

Aqua dest q.s 1000 ml

Campuran dilakukan sterilisasi dengan filtrasi.

1.3.4. Uji spesifisitas (metoda bloking) :(lihat gambar 10)

1.3.4.1. Dari 10 sediaan, 5 diinkubasi terlebih dahulu dengan suspensi *Escherichia coli* O6:K13H (tanpa dilabel dengan rhodamin) dan 5 sediaan dengan *Escherichia coli* heterolog.

1.3.4.2. Sediaan dicuci dengan buffer citrat sebentar, kemudian dicuci dengan PBS 3 X 10 menit.

1.3.4.3. Sediaan ditetesi 0.3 ml suspensi *Escherichia coli* O6:K13:H1 dan di eramkan 5 menit pada suhu kamar

1.3.4.4. Cuci dengan PBS 10 menit sambil diaduk dengan magnetic stirrer.

1.3.4.5. Sediaan ditetesi dengan 0,3 ml ERhod, dan dieramkan selama 5 menit dalam suhu kamar.

UJI SPESIFISITAS (METODA BLOKING)

Sediaan setelah dicelup dalam buffer citrat



Tetesi 0,3 ml suspensi E. coli  
homolog/heterolog tanpa label rhodamin



suhu kamar 5 menit

Tetesi 0,3 ml suspensi ERhod



suhu kamar 5 menit

Cuci 3 X a 10 menit dengan PBS  
(magnetic stirrer)



Mounting dengan buffered glycerin

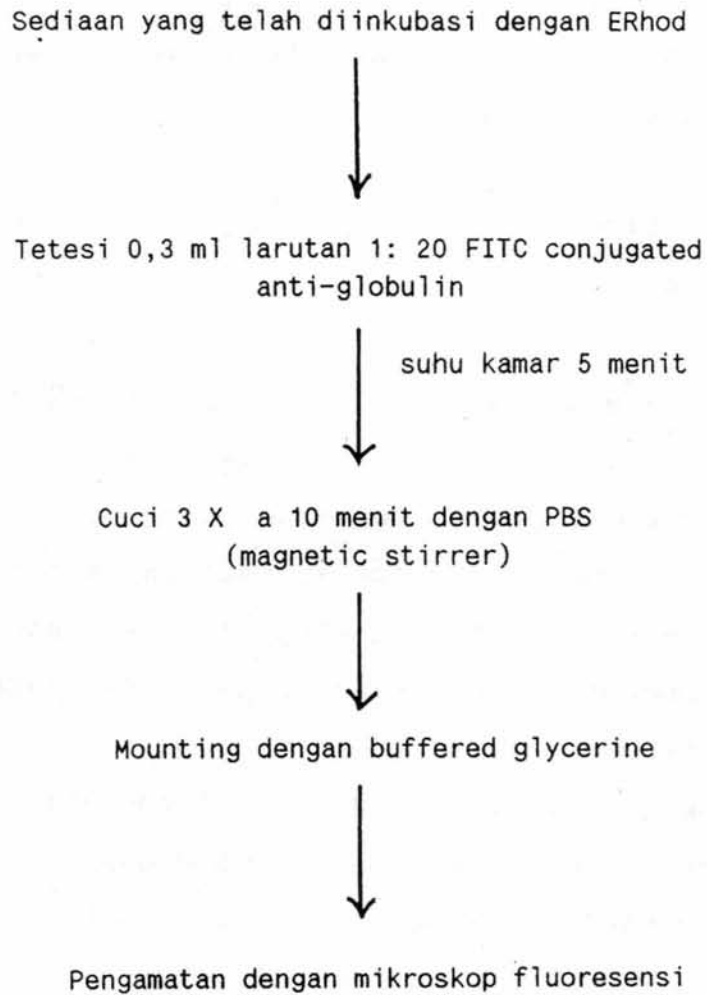


Pengamatan dengan mikroskop fluoresensi

Gambar 10. Bagan cara uji spesifisitas dengan metoda bloking

- 1.3.4.6. Cuci dengan PBS 10 menit sambil diaduk dengan magnetic stirrer.
- 1.3.5. Pewarnaan dengan Anti-imunoglobulin:(lihat gambar 11 bagan 3)
- 1.3.5.1. Sediaan yang telah diproses pada 2.2.3. dan 2.2.4. ditetesi 0,3 ml antiserum terhadap tikus berlabel FITC yang telah diencerkan 1:20 (berdasarkan hasil percobaan pendahuluan untuk menentukan pengenceran optimum) dengan borate buffered saline dengan pH 8,2 dan dieramkan selama 5 menit dalam suhu kamar.
- 1.3.5.2. Cuci dengan PBS 3 X 10 menit , kemudian dilakukan pengamatan dengan mikroskop fluoresensi setelah ditetesi 1 tetes buffered glycerin dan ditutup dengan gelas penutup.
- 1.3.6. Pemeriksaan dengan mikroskop fluoesnsi:  
Sediaan diperiksa dengan menggunakan mikroskop fluoresensi buatan American Optical tipe  
Tiap sediaan dilakukan pengamatan pada 10 lapang pandang dengan menggunakan objectip 40 X (6,36 X 10<sup>5</sup> um), hasil penghitungan dinyatakan dalam:  
Jumlah sel yang mengandung gumpalan bakteri atau sel yang mengadung imuoglobulin tiap 10 lapang pandang dalam satu sayatan  $\pm$  deviasi standar.

PEWARNAAN DENGAN ANTI-GLOBULIN



Gambar 11. Bagan cara pewarnaan dengan lasbeled antiglobulin

### 1.3.7. Pewarnaan ulang dengan Gram:

Pewarnaan ulang ini dilakukan dengan pewarnaan Gram dengan tujuan untuk membuktikan bahwa pada permukaan dari sel memang terdapat gumpalan bakteri gram negatif.

## 2. BACT-EIFA VISUAL ( Visual Bacteria-Enzyme Immuno fluorescent Assay):

EIFA adalah suatu modifikasi dari ELISA (Elder 1982, Forghani 1980, Stamm 1981, Yolken 1982); perbedaan utama antara keduanya terletak pada substrat yang dipergunakan untuk mendeteksi adanya aktifitas dari enzim. Pada ELISA substrat yang digunakan adalah substrat khromogenik, sedangkan pada EIFA dipergunakan substrat fluorogenik.

Untuk menguji kepekaan dan kekhasan (speceficity) dari uji Bact-EIFA dilakukan uji perbandingan antara Bact-EIFA dengan Bact-ELISA menurut Elder (1982).

### 2.1. Persiapan: (Elder 1982, Engvall 1972, Stamm 1981)

#### 2.1.1. Membuat antiserum spesifik terhadap Escherichia coli O6:K13:H1

2.1.1.1. Suspensi *Escherichia coli* O6:K13:H1 yang mengandung kuman  $10^{10}$  per ml dimatikan dengan cara freezing and thawing beberapa kali sampai seluruh



kuman mati (dicek dengan biakan). Suspensi disimpan dalam suhu  $-20^{\circ}$  C sampai waktunya akan digunakan.

- 2.1.1.2. Lima ekor tikus jantan berat  $\pm$  200 gram masing-masing disuntik secara intraperitoneal dengan 3 ml suspensi kuman yang telah dimatikan (a)
- 2.1.1.3. Suntikan yang sama diulang dua kali lagi dengan selang waktu 1 minggu.
- 2.1.1.4. Pada akhir minggu keempat atau awal minggu kelima diambil darahnya melalui ekor dan dilakukan uji aglutinasi, kalau positif dilakukan pungsi jantung sebanyak mungkin, kemudian serum dipisahkan secara steril. Serum dari kelima ekor tikus dicampur menjadi satu dan digunakan sebagai serum kontrol positif. Serum tersebut ditempatkan dalam vial a 0,5 ml dan disimpan dalam suhu  $-20^{\circ}$  C sampai waktunya dipergunakan. Kalau hasil uji aglutinasi negatif dilakukan imunisasi sekali lagi.

Catatan:

Antiserum ini juga dipergunakan pada percobaan utama.

2.1.2. Suspensi Bakteri:

2.1.2.1. Biakkan *Escherichia coli* O6:K13:H1 pada lempeng CLED, eramkan pada 37° C semalam

2.1.2.2. Pindahkan pada TSB dan eramkan pada 37° C semalam

2.1.2.3. Cuci dengan PBS (0,05 M pH 7,4) 3 kali

2.1.2.4. Buat suspensi kuman dalam Carbonate buffer (0,05 M dan pH 9,6) sehingga mengandung kuman  $3,6 \times 10^8$  CFU per ml atau  $5,5 \times 10^7$  CFU per 150  $\mu$ l.

CATATAN:

Buffer Karbonat (Coating buffer) pH 9,6 :

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
NaN <sub>3</sub>	0,2 g
Aqua dest ad	1000 ml

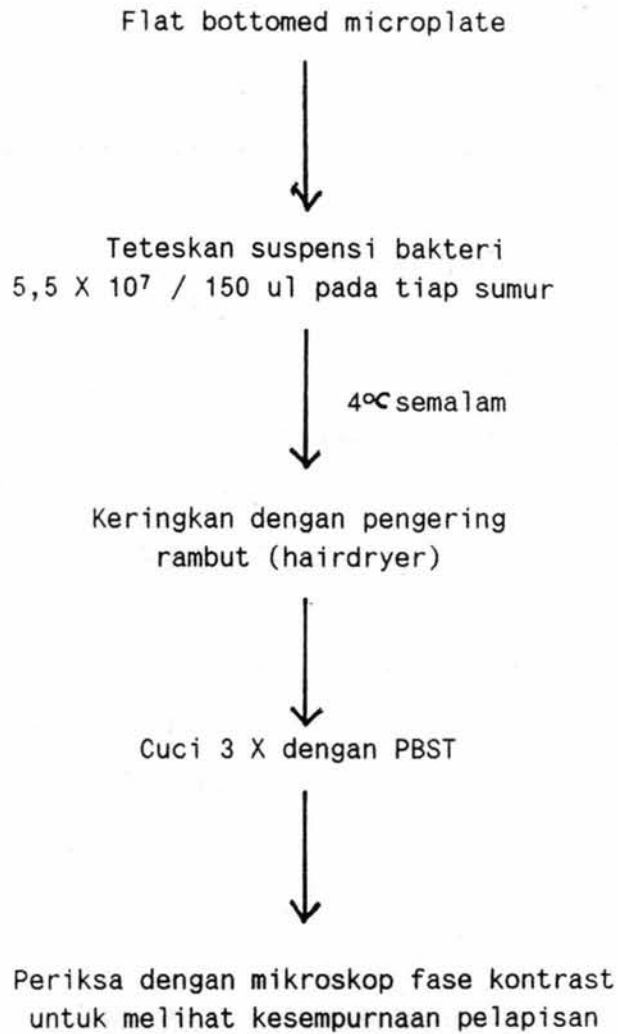
Dapat disimpan dalam suhu kamar selama 2 minggu

2.1.2.4. Menyiapkan Lempeng untuk EIFA:(lihat gambar 12)

+

2.1.2.4.1. Tiap sumur microtitration plate dari jenis sumur datar (Flat bottomed microtitration plate) dari

MELAPISI MICROPLATE DENGAN BAKTERI



Gambar 12. Bagan cara melapisi mikroplat dengan bakteri.

polisterin diisi 150 ul supensi kuman yang mengandung  $5.5 \times 10^7$  per ml dan dieramkan pada  $4^{\circ}$  C semalam.

2.1.2.4.2. Keringkan dengan pengering rambut (hair dryer) dan cuci 3 X dengan PBST (0,05 M PBS ditambah 0.05 Tween 20).

Catatan:

Suspensi sebesar  $5,5 \times 10^7$  CFU per 150 ul didasarkan pada percobaan pendahuluan untuk melapisi microtiter plate dengan menggunakan suspensi dengan kandungan kuman  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  bagan 19 dan  $10^9$  CFU tiap 150 ul-nya dan setelah dikeringkan diperiksa dengan menggunakan mikroskop fase kontras mengenai kepadatan dari lapisan bakteri pada permukaan plate tersebut (plate dipasang terbalik pada mikroskop). Dari hasil pengamatan ini didapatkan bahwa lapisan rata terjadi pada pelapisan yang menggunakan suspensi kuman  $10^7$  dan  $10^8$  per 150 ul-nya (rata-rata yang didapatkan adalah  $5,5 \times 10^7$  CFU per 150 ul-nya).

PBST:

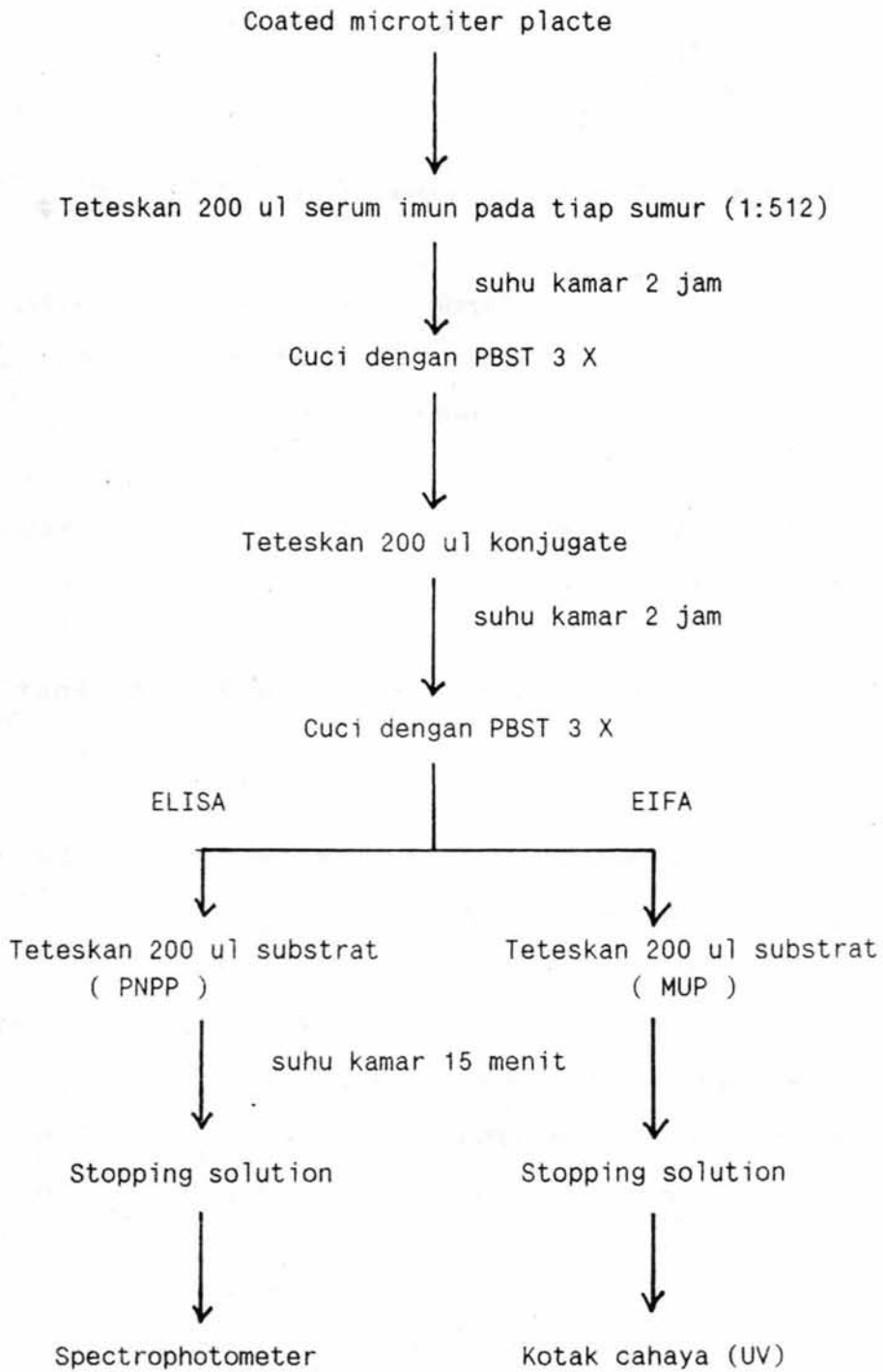
NaCl	8,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O	2,9 g

KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
NaN <sub>3</sub>	0,2 g
Aqua dest	1000 ml

2.2. Tekhnik Bact-EIFA VISUAL:(lihat gambar 13)

- 2.2.1. Teteskan 200 ul serum imun tikus yang telah diencerkan dengan PBST kedalam sumur-sumur yang telah dilapisi (coated) dengan E. coli O6:K13:H1
- 2.2.2. Eramkan pada suhu kamar selama 2 jam, kemudian cuci dengan PBST 3 kali.
- 2.2.3. Teteskan alkali phosphatase conjugated anti rat antiserum yang telah diencerkan 1:1600
- 2.2.4. Eramkan pada suhu kamar selama 3 jam, kemudian cuci dengan PBST 3 kali
- 2.2.5. Teteskan 200 ul larutan substrat yang mengandung 0,025 mg 4-methyl umbelliferyl phophate (MUP) tiap ml 10% bufer diethanolamine dengan pH 9,6 yang mengandung 0,001 M MgCl (Sigma Chemical Co. Md. USA)

TEKNIK BACT-ELISA / BACT-EIFA VISUAL



Gambar 13. Bagan teknik Bact-ELISA dan Bact-EIFA.

2.2.6. Eramkan pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian tambahkan 50 ul stopping solution berupa larutan 1M K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dengan pH 10,4

2.2.7. Baca dengan menggunakan kotak cahaya dengan sinar U-V gelombang panjang yang telah diberi filter hitam.

Hasil pembacaan dinyatakan sebagai:

4+ : fluoresensi berwarna biru cerah (bright blue fluorescence)

3+ : kecerahan fluoresensi berkurang

2+ : kecerahan fluoresensi rendah

1+ : warna hitam dengan fluoresensi minimum

Non-reactive: seluruh microplate berwarna hitam

2.2.8. Hasil pembacaan dinyatakan dalam titer, yaitu pengenceran tertinggi yang masih memberikan derajat fluoresensi 2+

2.2.9. Sebagai kontrol digunakan:

(i) bufer diethanolamine + bakteri

(ii) PBST tanpa serum

(iii) Tanpa conjugate

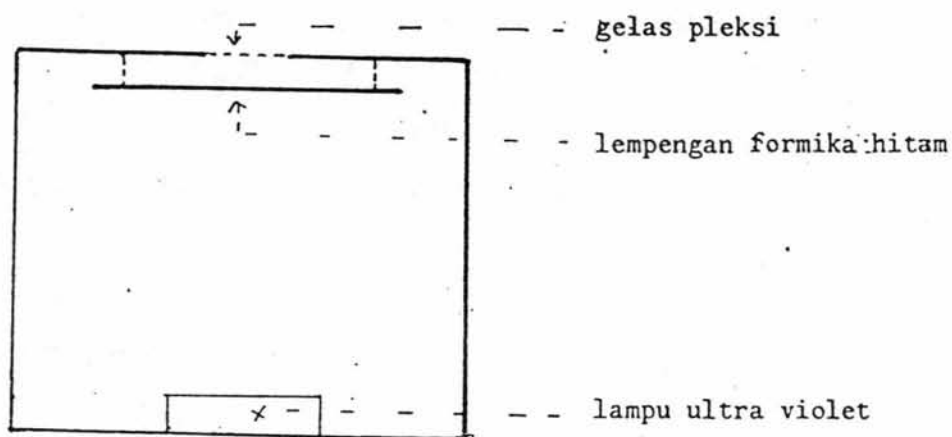
(iv) serum tikus baku (1 - 4)

Catatan:

Pengenceran optimum dari conjugate berdasarkan hasil "checkerboard titration".

Kotak cahaya

Kotak cahaya dibuat dari multipleks dengan ukuran: 30 cm X 30 cm X 25 cm.



Gb.13a. Tampak samping kotak cahaya.

2.3. Tekhnik Bact-ELISA: (lihat gambar 13)

Uji ini dilakukan bersama-sama dengan uji Bact-EIFA VISUAL agar hasilnya dapat dibandingkan.

- 2.3.1. Teteskan 200 ul serum imun tikus yang telah diencerkan 512 kali pada sumur-sumur dari microplate yang telah disiapkan terlebih dahulu



- 2.3.2. Eramkan pada suhu kamar selama 2 jam, kemudian cuci dengan PBST 3 kali
- 2.3.3. Teteskan 200 ul alkali phosphatase conjugated anti rat antiserum yang telah diencerkan 1:1600
- 2.3.4. Eramkan selama 3 jam pada suhu kamar selama 3 jam, kemudian dicuci dengan PBST 3 kali
- 2.3.5. Teteskan 200 ul substrat yang mengandung 1 mg PNPP tiap ml 10% bufer diethanolamin yang mengandung 0,001 M  $\text{NiCl}_2$
- 2.3.6. Eramkan pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian tambahkan 50 ml stopping solution berupa larutan 3N NaOH
- 2.3.7. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan spectrophotometer untuk menentukan nilai absorbensinya.

#### 2.4. Checkerboard titration:(lihat gambar 14)

Untuk menentukan pengenceran optimum dari serum dan serum conjugate yang akan dipergunakan untuk uji-uji selanjutnya dilakukan titrasi sebagai berikut:

- 2.4.1. Sediakan microplate yang telah dilapisi dengan E. coli 06:K13:H1

CHECKERBOARD TITRATION

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Microplate yang telah dilapisi bakteri  
Sumur 1 - 8 diisi 200 ul serum imun dengan  
pengenceran 2 X dari 1/128 - 1/16384

suhu kamar 3 jam      Suhu kamar 3 jam, cuci 3X PBST

Teteskan konjugat pada sumur-sumur dari baris:  
A (1 - 8) : pengenceran 1/100 (pengenceran 2 X)

H (1 - 8) :                      "                      1/25600

suhu kamar 2 jam, cuci 3 X PBST

Teteskan 150 ul substrat pada masing-masing sumur  
(A - H: 1 - 8)

suhu kamar 15 menit      cuci 3 X PBST

Teteskan stopping solution  
Baca dengan spektrofotometer

Gambar 14. Bagan cara melakukan checkerboard titration.

- 2.4.2. Sumur-sumur dari kolom 1 - 8 diisi dengan 200 ul serum imun dengan pengenceran sebagai berikut: 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096, 1:8192 dan 1:16384.  
Untuk kontrol sumur-sumur dari kolom 9 diisi dengan serum imun dengan pengenceran 1:128.
- 2.4.3. Eramkan pada suhu kamar selama 2 jam, kemudian cuci 3 kali dengan PBST
- 2.4.4. Sumur-sumur dari baris A - H diisi dengan larutan alkali phosphatase conjugated anti rat antiserum masing-masing sebanyak 200 ul kecuali dari kolom 9 dengan pengenceran 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800 dan 1:26500
- 2.4.5. Eramkan pada suhu kamar selama 3 jam, kemudian dicuci dengan PBST 3 kali  
bagan 26
- 2.4.6. Teteskan 200 ul substrat MUP pada masing-masing sumur dan eramkan pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian teteskan 50 ml stopping solution dan lakukan pembacaan dengan kotak cahaya.

2.5. Uji reproduibilitas dari Bact-EIFA VISUAL:

Untuk melakukan uji reproduibilitas dari metoda ini dilakukan uji Bact-EIFA VISUAL sebanyak 48 pengulangan (replicate):

- 2.5.1. Siapkan 4 mikroplate yang telah dilapisi dengan E. coli O6:K13:H1
- 2.5.2. Sumur-sumur baris A sampai G diisi dengan 200 ul serum imundengan pengenceran 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096, 1:8129 dan 1:16384, sedangkan baris H diisi dengan PBST 200 ul masing-masing sumur
- 2.5.3. Eramkan selama 2 jam pada suhu kamar, kemudian dicuci dengan PBST 3 kali
- 2.5.4. Teteskan 200 ul alkali phosphatase conjugated anti rat antiserum yang telah diencerkan 1:1600 pada masing-masing sumur
- 2.5.5. Eramkan selama 3 jam pada suhu kamar, kemudian dicuci dengan PBST 3 kali
- 2.5.6. Teteskan 200 ul substrat MUP pada masing-masing sumur

2.5.7. Eramkan selama 15 menit, kemudian tambahkan 50 ml stopping solution, kemudian dibaca dengan kotak cahaya

2.6. Serum baku:

Untuk memudahkan pembacaan hasil EIFA VISUAL selalu dikut sertakan serum baku pada setiap uji EIFA VISUAL sebagai kontrol. Untuk kebutuhan ini dibuat 4 macam pengenceran serum imun tikus, yaitu: 1:1024, 1:2048, 1:4096 dan 1:8192, masing-masing sebagai serum baku 4+, 3+, 2+ dan 1+. Serum-serum tersebut disimpan dalam kemasan 0,5 ml dan disimpan pada suhu -20° C.

Untuk meyakinkan serum baku tersebut dilakukan uji Bact-EIFA VISUAL sebanyak 24 pengulangan:

2.6.1. Siapkan satu microplate yang telah dilapisi dengan E. coli O6:K13:H1

2.6.2. Teteskan 200 ul pada masing-masing sumur dari kolom A dan B serum dengan pengenceran 1:1024 (serum baku 1.), dari kolom C dan D serum dengan pengenceran 1:2048 (serum baku 2.), dari kolom E dan F serum pengenceran 1:4096 (serum baku 3.) dan dari kolom G dan H serum pengenceran 1:8192 (serum baku 4.)

- 2.6.3. Eramkan pada suhu kamar selama 2 jam, kemudian cuci dengan PBST 3 kali
- 2.6.4. Teteskan 200 ul alkali phosphatase conjugated anti rat antiserum pada yang telah diencerkan 1:1600 pada masing-masing sumur
- 2.6.5. Eramkan pada suhu kamar selama 3 jam, kemudian cuci dengan PBST 3 kali
- 2.6.6. Teteskan 200 ul substrat pada masing-masing sumur, eramkan pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian tambahkan 50 ul stopping solution
- 2.6.7. Baca dengan kotak cahaya.

2.7. Perbandingan antara Bact-ELISA dengan Bact-EIFA VISUAL:

- 2.7.1. Siapkan dua microplate yang telah dilapisi dengan E. coli O6:K13:H1
- 2.7.2. Isi masing-masing sumur dari kolom 1 dan 2 baris A sampai H dari kedua microplate dengan serum imun yang telah diencerkan 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096, 1:8192 dan 1:16384 masing-masing sebanyak 200 ul, sedangkan dari kolom 3 baris A sampai D masing-masing diisi dengan serum baku 1 -

4, dan baris D dengan PBST.

- 2.7.3. Setelah dieramkan 2 jam pada suhu kamar cuci dengan PBST 3 kali
- 2.7.4. Teteskan 200 ul alkali phosphatase conjugated anti rat antiserum yang telah diencerkan 1:1600 pada sumur-sumur dari baris A sampai H dari kolom 1, 2, dan 3
- 2.7.5. Eramkan pada suhu kamar selama 3 jam, kemudian dicuci dengan PBST 3 kali
- 2.7.6. Pada sumur-sumur microplate I ditambahkan 200 ul substrat PNPP sedangkan pada microplate II ditambahkan 200 ml substrat MUP
- 2.7.7. Eramkan selama 15 menit pada suhu kamar, tambahkan pada masing-masing 50 ml stopping solution
- 2.7.8. Baca plate I dengan spectrophotometer, sedangkan plate II dengan kotak cahaya

## II. PENELITIAN UTAMA.

Penelitian utama ini meliputi :

1. Pembuatan bakteri berlapis antibodi secara artifisial

2. Menjangkitkan pielonefritis ascendens eksperimental pada tikus, kemudian dilakukan pemeriksaan-pemeriksaan:

(i) penentuan titer antibodi dalam serum dan air kemih

(ii) pemeriksaan adanya bakteri berlapis antibodi dalam air kemih dengan EIFA VISUAL

(iii) Deteksi sel plasma spesifik dalam sedimen dari ginjal.

1. Percobaan pembuatan bakteri berlapis antibodi artifisial:

Percobaan ini dilakukan untuk mempelajari kemungkinan terbentuknya bakteri berlapis antibodi (BBA) dalam air kemih yang merupakan reaksi antara kuman-kuman yang terdapat dalam air kemih dengan antibodi spesifik yang juga terdapat dalam air kemih tersebut dan berasal dari ginjal yang mengalami infeksi.

Pada percobaan ini dilakukan uji ELISA, EIFA VISUAL dan uji imunifluoresensi (IF) secara paralel.

Untuk keperluan ini dilakukan pembentukan BBA artifisial (*in vitro*) dengan cara merekasikan antibodi spesifik dengan bakteri homolog dan kemudian dilakukan pemeriksaan ELISA, EIFA VISUAL dan IF.



1.1. Persiapan:

1.1.1. Antiserum terhadap Escherichia coli O6:K13:H1:

Untuk keperluan ini dipergunakan serum imun tikus terhadap E. coli O6:K13:H1 yang telah disiapkan pada penelitian pendahuluan.

1.1.2. Suspensi kuman:

1.1.2.1. Biakkan E. coli O6:K13:H1 pada TSB dan ermekan pada 37° C selama 18 jam

1.1.2.2. Buat suspensi kuman dalam PBS dengan pH 7,4 yang mengandung Tween 20 0,05% (PBST)

1.2. Melapisi bakteri dengan antibodi spesifik:

(membuat BBA artifisial)

Pada percobaan ini dipergunakan suspensi kuman yang mengandung  $10^5$  CFU per ml

1.2.1. Membuat suspensi kuman dalam PBST yang mengandung kuman  $10^5$  tiap ml

1.2.2. Membuat pengenceran serum imun 1:500 (berdasarkan hasil percobaan pendahuluan untuk mendapatkan hasil fluoresensi yang uniform.

1.2.3. Serum imun sebanyak 0,1 ml diteteskan pada 1 ml

suspensi kuman

1.2.4. Eramkan pada 37° C selama 30 menit

1.3. Mendeteksi bakteri berlapis antibodi artifisial:(lihat gambar 15)

1.3.1. Uji imunofluoresensi:

1.3.1.1. Buat sediaan dari suspensi BBA yang telah dicuci

1.3.1.2. Teteskan pada sediaan satu tetes FITC conjugated anti rat antiserum yang telah diencerkan 20 kalidengan borate buffered saline

1.3.1.3. Eramkan dalam ruang gelap pada suhu kamar sedlama 30 menit, kemudian dibilas dengan 0,02 M PBS

1.3.1.4. Celup dalam PBS selama 15 menit, keringkan, kemudian diperiksa dengan mikroskop fluoresensi

1.3.1.5. Spesimen yang menunjukkan adanya 6 kuman atau lebih dalam 100 lapang pandang dinyatakan positif

1.3.2. Uji EIFA VISUAL:

+

1.3.2.1. Suspensi BBA sebanyak 0,3 ml dicuci 3 kali dengan PBST, kemudian disuspensikan kembali dengan 0,3 ml

PBST

- 1.3.2.2. Buat pengenceran dua kali lipat dari suspensi BBA: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 dan 1:32
- 1.3.2.3. Tambahkan 0.3 ml alkali phosphatase conjugated anti rat antiserum yang telah diencerkan 1:2000 pada masing-masing tabung
- 1.3.2.4. Eramkan pada suhu kamar selama 3 jam, kemudian dicuci 3 kali dengan PBST
- 1.3.2.5. Tambahkan 0,3 ml substrat MUP pada masing-masing tabung
- 1.3.2.6. Eramkan pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian tambahkan 0,1 ml stopping solution pada masing-masing tabung
- 1.3.2.7. Lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 100 X g selama 10 menit, kemudian pindahkan 200 ul supernatan ke microtiter plate dan dibaca dengan kotak cahaya
- 1.3.2.8. Hasil pembacaan dinyatakan dalam titer, yaitu pengenceran suspensi BBA tertinggi yang masih memberikan fluoresensi 2+

1.3.3. Uji ELISA:

Tahapan 1.3.3.1. sampai dengan 1.3.3.4. sama dengan pada EIFA VISUAL

1.3.3.5. Tambahkan 0,3 ml substrat PNPP pada masing-masing tabung

1.3.3.6. Eramkan pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian tambahkan 0,1 ml stopping solution pada masing-masing tabung

1.3.3.7. Lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1000 X g selama 10 menit, supernatan dipindahkan pada micro-cuvet dan periksa dengan spectrophotometer

1.3.3.8. Hasil pembacaan dinyatakan dalam titer, yaitu pengenceran tertinggi yang masih memberikan nilai absorbens sama dengan hasil checkerboard titration.

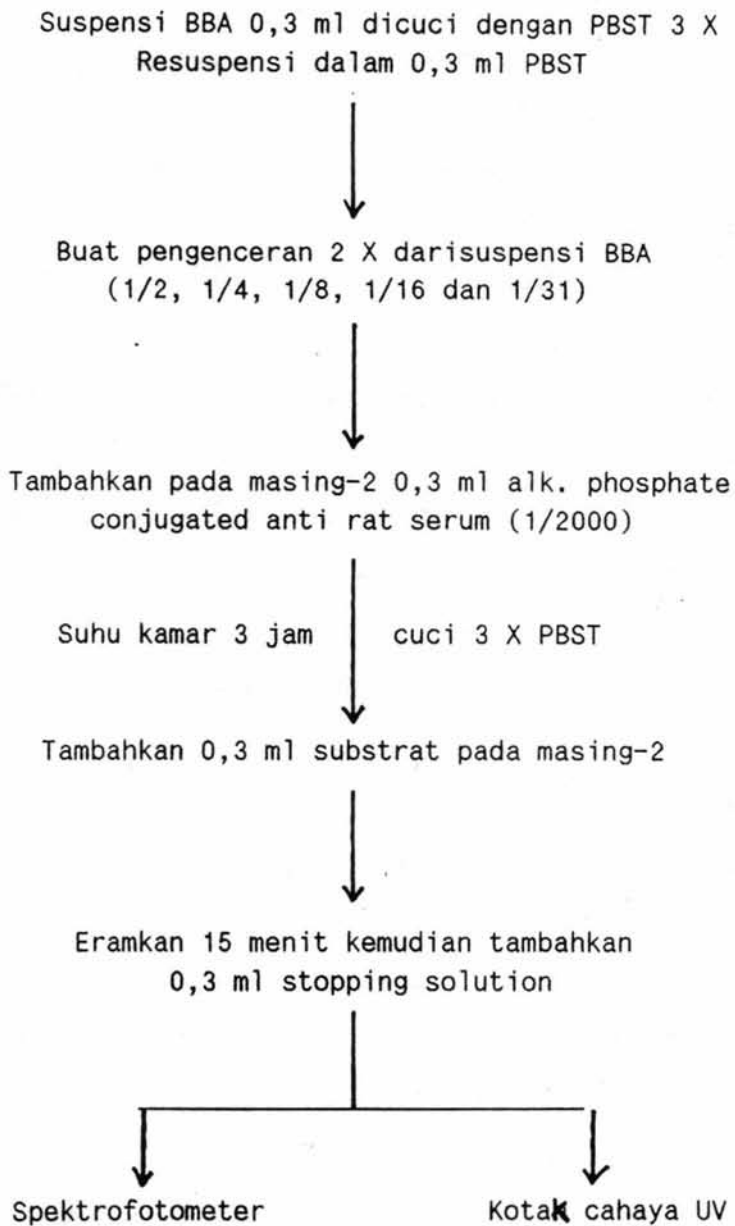
1.4. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pembentukan BBA:

Untuk mempelajari pengaruh dari konsentrasi bakteri dan kadar antibodi terhadap pembentukan BBA in vitro dilakukan percobaan-percobaan sebagai berikut:

1.4.1. Pengaruh konsentrasi kuman:

Buat pengenceran 10 kali secara seri dari suspensi

CARA MENDETEKSI BBA DENGAN ELISA & EIFA VISUAL



Gambar 15. Bagan cara mendeteksi BBA dengan ELISA dan EIFA VISUAL

BBA mulai konsentrasi kuman  $10^8$  CFU per ml sampai  $10^2$  dengan PBST, kemudian dilakukan uji IF (lihat 1.3.1.), uji EIFA VISUAL (lihat 1.3.2.) dan uji ELISA (1.3.3.) seperti diatas, dengan menggunakan kontrol kuman tanpa dilapisi antibodi.

1.4.2. Pengaruh kadar antibodi:

Serum imun tikus diencerkan 10 kali mulai  $10^{-1}$  sampai  $10^{-3}$  dengan PBST, kemudian dilakukan pelapisan dari E. coli O6:K13:H1 dan dilakukan uji IF, EIFA VISUAL dan ELISA seperti diatas.

2. Pielonefritis ascendens eksperimental:

2.1. Persiapan:

2.1.1. Membuat suspensi kuman:

2.1.1.1. Lakukan streaking E. coli O6:K13:H1 pada lempeng CLED untuk mendapatkan koloni terpisah, eramkan pada  $37^{\circ}\text{C}$  semalam

2.1.1.2. Dari koloni yang khas pada lempeng CLED dilakukan inokulasi pada dua buah agar miring nutrient dan satu agar tegak (stab) nutrient, eramkan pada  $37^{\circ}\text{C}$  semalam

2.1.1.3. Lakukan inokulasi dari agar miring pada 6 buah

tabung trypticase soy broth (TSB) dan eramkan pada 37°C (biakan pada agar tegak disimpan untu keperluan berikutnya)

2.1.1.4. Biakan pada TSB dicuci 2 kali dengan PBS dengan cara sentrifugasi ( $100\text{g} \times \text{g}$  selama 10 menit), kemudian dibuat suspensi kembali dalam PBS dengan kepekatan  $10^8$  CFU tiap ml. Suspensi kuman ini dilakukan untuk inokulasi pada tikus

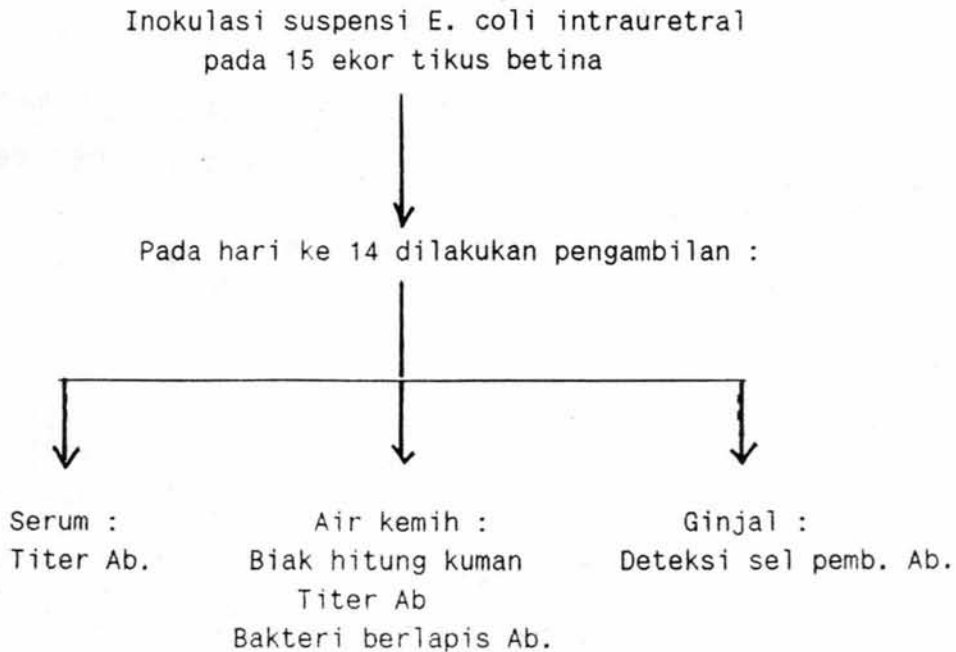
2.1.2. Inokulasi melalui uretra pada tikus:

Kelompok perlakuan terdiri dari 15 ekor tikus betina dari strain Witstar dengan berat lebih kurang 180 g, sedangkan kelompok kontrol terdiri dari 10 ekor dengan berat badan lebih kurang sama. Kedua kelompok tersebut dipelihara dengan kandang terpisah dan mendapat makanan berupa pellet dengan minum secukupnya.

2.1.2.1. Tikus yang sehari sebelum mendapat perlakuan sejak jam 14.00 tidak diberi minum dilakukan pembiusan dengan ether

2.1.2.2. Suspensi kuman sebanyak 0,5 ml yang mengandung kuman  $10^8$  CFU tiap ml-nya disuntikkan kedalam kandung kemih tikus melalui uretranya dengan menguna

PIELONEFRITIS ASENDENS EKSPERIMENTAL



Catatan:

Titer Ab. : BACT-EIFA VISUAL

Biak hitung kuman : BIAK HITUNG TETES

Deteksi bakteri berlapis antibodi : IF, ELISA, EIFA VISUAL

Deteksi sel pembentuk antibodi : IF DIREK

Gambar 16. Protokol pemeriksaan pielonefritis asendens eksperimental.



kan kateter berukuran 0,5 mm (OD) yang dibuat dari bungkus kabel kecil (steril) dan disambungkan pada ujung jarum suntukan tuberkulin disposibel.

Penyuntikan dilakukan dalam waktu 30 - 60 detik, kemudian dikembalikan kekandangannya semula dan mendapat makan binum seperti biasanya. Tikus dari kelompok kontrol mendapat inokulasi dengan PBS steril dengan jumlah dan cara yang sama.

2.2. Menentukan titer antibodi spesifik dalam serum dan air kemih tikus dengan metoda Bact-EIFA VISUAL:

Untuk menentukan titer antibodi dalam serum dan dalam air kemih tikus dilakukan uji Bact-EIFA VISUAL.

2.2.1. Persiapan:

Melapisi microplate dengan E. coli O6:K13:H1 dilakukan seperti pada percobaan pendahuluan (lihat percobaan pendahuluan 2.1.2.4.).

2.2.2. Metoda Bact-EIFA VISUAL untuk menentukan titer antibodi dalam serum:

2.2.2.1. Teteskan 200 ul air kemih tanpa diencerkan kedalam sumur-sumur yang telah dilapisi (coated) dengan E. coli O6:K13:H1

2.2.2.2. Eramkan pada suhu kamar selama 2 jam, kemudian

cuci dengan PBST 3 kali.

- 2.2.2.3. Teteskan alkali phosphatase conjugated anti rat antiserum yang telah diencerkan 1:1600
- 2.2.2.4. Eramkan pada suhu kamar selama 3 jam, kemudian cuci dengan PBST 3 kali
- 2.2.2.5. Teteskan 200 ul larutan substrat yang mengandung 0,025 mg 4-methyl umbelliferyl phophate (MUP) tiap ml 10% bufer diethanolamine dengan pH 9,6 yang mengandung 0,001 M MgCl (Sigma Chemical Co. Md. USA)
- 2.2.2.6. Eramkan pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian tambahkan 50 ul stopping solution berupa larutan 1M K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dengan pH 10,4
- 2.2.2.7. Baca dengan menggunakan kotak cahaya
- 2.2.2.8. Hasil pembacaan dinyatakan dalam titer, yaitu pengeceran tertinggi yang masih memberikan derajat fluoresensi 2+
- 2.2.2.9. Sebagai kontrol digunakan:
  - (i) bufer diethanolamine + bakteri
  - (ii) PBST tanpa tanpa air kemih
  - (iii) Tanpa conjugate

(iv) serum tikus baku (1 - 4)

2.2.3. Metoda Bact-EIFA VISUAL untuk serum:

- 2.2.3.1. Teteskan 200 ul serum tikus yang telah diencerkan 100 kali dengan PBST kedalam sumur-sumur yang telah dilapisi (coated) dengan E. coli O6:K13:H1
- 2.2.3.2. Eramkan pada suhu kamar selama 2 jam, kemudian cuci dengan PBST 3 kali.
- 2.2.3.3. Teteskan alkali phosphatase conjugated anti rat antiserum yang telah diencerkan 1:1600
- 2.2.3.4. Eramkan pada suhu kamar selama 3 jam, kemudian cuci dengan PBST 3 kali
- 2.2.3.5. Teteskan 200 ul larutan substrat yang mengandung 0,025 mg 4-methyl umbelliferyl phophate (MUP) tiap ml 10% bufer diethanolamine dengan pH 9,6 yang mengandung 0,001 M MgCl (Sigma Chemical Co. Md. USA)
- 2.2.3.6. Eramkan pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian tambahkan 50 ul stopping solution berupa larutan 1M K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dengan pH 10,4
- 2.2.3.7. Baca dengan menggunakan kotak cahaya

2.2.3.9. Sebagai kontrol digunakan:

- (i) bufer diethanolamine + bakteri
- (ii) PBST tanpa serum
- (iii) Tanpa conjugate
- (iv) serum tikus baku (1 - 4)

2.3. Pemeriksaan bakteri berlapis antibodi dalam air kemih:

2.3.1. Uji imunofluoresensi:

2.3.1.1. Air kemih tikus disentrifugir dengan kecepatan 10000 X 5 selama 20 menit, supernatan dibuang dan dari sedimen dibuat sediaan

2.3.1.2. Teteskan pada sediaan satu tetes FITC conjugated anti rat antiserum yang telah diencerkan 20 kali dengan borate buffered saline

2.3.1.3. Framkan dalam ruang gelap pada suhu kamar sedlama 30 menit, kemudian dibilas dengan 0,02 M PBS

2.3.1.4. Celup dalam PBS selama 15 menit, keringkan, dan dilakukan mounting dengan buffered glyserin, kemudian diperiksa dengan mikroskop fluoresensi

2.3.1.5. Spesimen yang menunjukkan adanya 2 kuman atau lebih tiap 200 lapang pandang dengan objektip 40

kali (high dry objective) tanpa memperhitungkan intensitas fluoresensinya. BBA dinyatakan negatif apabila dilakukan pengamatan 4 menit (lebih kurang 200 lapang pandang) tidak tampak adanya fluoresensi.

2.3.2. Uji EIFA VISUAL:

- 2.3.2.1. Air kemih sebanyak 0,5 ml disentrifusi dan dicuci 3 kali dengan PBST, kemudian dibuat suspensi kembali dengan 0,3 ml PBST
- 2.3.2.2. Buat pengenceran dua kali lipat dari suspensi BBA: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 dan 1:32
- 2.3.2.3. Tambahkan 0.3 ml alkali phosphatase conjugated anti rat antiserum yang telah diencerkan 1:2000 pada masing-masing tabung
- 2.3.2.4. Eramkan pada suhu kamar selama 3 jam, kemudian dicuci 3 kali dengan PBST
- 2.3.2.5. Tanbahkan 0,3 ml substrat MUP pada masing-masing tabung
- 2.3.2.6. Eramkan pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian tambahkan 0,1 ml stopping solution pada masing-masing tabung

2.3.2.7. Lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 100 X g selama 10 menit, kemudian pindahkan 200 ul supernatan ke microtiter plate dan dibaca dengan kotak cahaya

2.3.2.8. Hasil pembacaan dinyatakan dalam titer, yaitu pengenceran suspensi BBA tertinggi yang masih memberikan fluoresensi 2+

2.4. Mendeteksi sel pembentuk antibodi dalam jaringan ginjal

2.4.1. Membuat sediaan untuk pewarnaan imunofluoresensi:

2.4.1.1. Lakukan otopsi dari tikus 14 hari pasca inokulasi dengan tikus dalam keadaan narkose eter setelah diambil air kemih dan darahnya. Kedua ginjal dari kelompok kelola dan ginjal kiri dari kelompok kontrol dimasukkan dalam buffered formalin dan dikirim ke UPF/Laboratorium Patologi R.S.Dr Sutomo untuk pembuatan sediaan (lihat percobaan pendahuluan)

2.4.1. Pewarnaan imunifluoresensi:

2.4.1.1. Sediaan dicuci dengan bufer citrat sebentar, kemudian dicuci dengan PBS 3 X 10 menit

- 2.4.1.2. Tetesi 0,3 ml suspensi ERhod (mengandung  $10^{10}$  CFU per ml) dan eramkan pada suhu kamar selama 5 menit.
- 2.4.1.4. Cuci dengan PBS dalam Coplin jar sambil diaduk dengan magnetic stirrer selama 10 menit.
- 2.4.1.5. Pemeriksaan dengan mikroskop fluoresnsi:  
Sediaan diperiksa dengan menggunakan mikroskop fluoresensi buatan American Optical tipe Tiap sediaan dilakukan pengamatan pada 10 lapang pandang dengan menggunakan objectip 40 X ( $6,36 \times 10^5$  um), hasil penghitungan dinyatakan dalam:

Jumlah sel yang mengandung gumpalan bakteri atau sel yang mengadung imuoglobulin tiap 10 lapang pandang dalam satu sayatan  $\pm$  deviasi standar.

### III. ANALISA STATISTIK

Uji statistik yang dipergunakan pada analisis dari hasil percobaan-percobaan adalah:

#### 1. Penelitian pendahuluan:

##### 1.1. Uji U dari Mann-Whitney:

Uji ini dipergunakan untuk:

- 1.1.1. Membandingkan jumlah sel pembentuk antibodi

spesifik yang mengandung Ig intrasitoplasma dari sediaan yang berasal dari kelompok kelola antara yang mendapat perlakuan pra-inkubasi dengan kelompok yang tidak mendapat pra-inkubasi dengan kuman *Escherichia coli* homolog atau *Escherichia coli* heterolog.

- 1.1.2. Membandingkan jumlah sel pembentuk antibodi spesifik yang mengandung Ig intrasitoplasma dan gumpalan bakteri berlabel rhodamin (yang memberikan fluoresensi merah) pada permukaan sel yang berasal dari kelompok kelola antara yang mendapat perlakuan pra-inkubasi dengan yang tidak mendapat perlakuan pra-inkubasi kuman *Escherichia coli* homolog atau *Escherichia coli* heterolog.

1.2. Uji McNemar:

Uji ini dipergunakan untuk :

- 1.2.1. Membandingkan hasil uji reipitabilitas dari uji BACT-EIFA VISUAL.
- 1.2.2. Membandingkan hasil uji BACT-EIFA VISUAL dari serum baku.



## 2. Penelitian utama:

### 2.1. Uji McNemar:

Uji ini dipergunakan untuk menganalisis perbandingan antara hasil deteksi BBA artifisial (dibuat in vitro) dengan menggunakan uji IF, uji ELISA dan uji EIFA VISUAL.

### 2.2. Uji korelasi rank menurut Spearman

Uji ini dipergunakan untuk menganalisa adanya korelasi antara BBA dalam air kemih, titer antibodi spesifik air kemih, titer antibodi spesifik serum, sel pembentuk antibodi spesifik dalam jaringan ginjal dan hasil biak hitung kuman air kemih.

## BAB IV. HASIL PENELITIAN

### I. PENELITIAN PENDAHULUAN

#### 1. Deteksi sel pembentuk antibodi spesifik dengan imunofluoresensi:

Penelitian ini ditujukan untuk menilai kemungkinan penggunaan dari uji imunofluoresensi direk (direct immunofluorescent assay) untuk mendeteksi adanya sel pembentuk antibodi spesifik sebagai indikator terjangkitnya respons imun humoral pada daerah tersebut (respons imun humoral lokal).

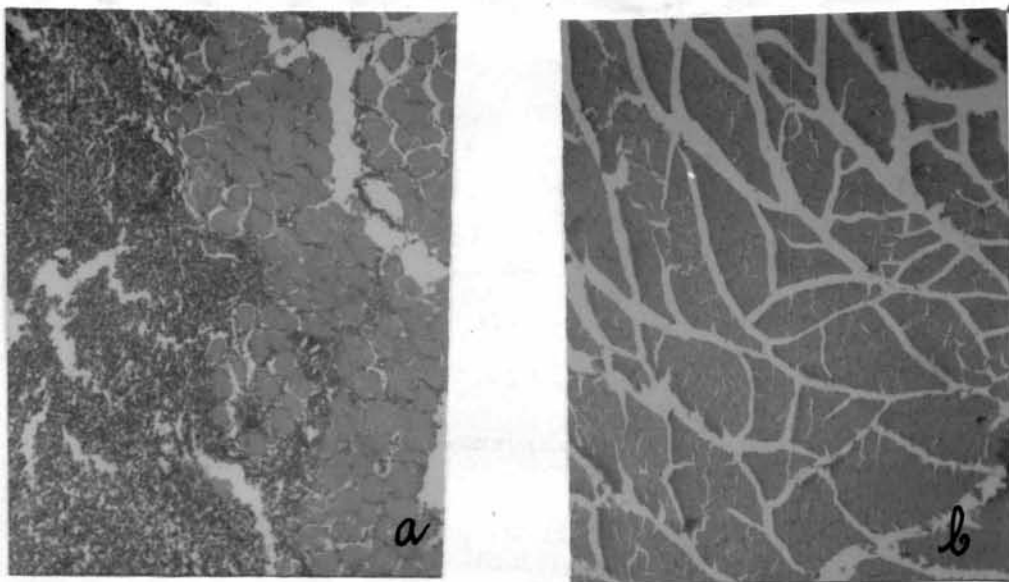
Untuk kebutuhan ini dijangkitkan suatu peradangan pada pangkal paha tikus sebelah kanan dengan cara menyuntikkan beberapa kali suspensi kuman yang telah dimatikan, dan pada penyuntikan terakhir ditambahkan sedikit tinta cina.

Pada tempat suntikan tersebut akan didapatkan jaringan beradang yang secara makroskopis tampak adanya tanda-tanda peradangan, diantaranya pembengkakan, tampak adanya hiperemi dan lain-lainnya, disamping itu pada tempat tersebut juga berwarna kehitaman.

##### 1.1. Pemeriksaan sediaan hematoksilin - eosin :

Pada pemeriksaan secara mikroskopik, dengan pewarnaan hematoksilin eosin (H-E) tampak adanya sel-sel radang

seperti lekosit, limfosit, monosit, dan lain-lain seperti sel plasma. Serabut-serabut otot tidak mengalami kerusakan dan hanya menyebabkan terjadinya pemisahan satu dari lainnya.



Gambar 17. Mikrofoto dari jaringan otot beradang (a) dan jaringan otot normal (b) dengan pewarnaan hematoksilin-eosin.

## 1.2. Pemeriksaan sediaan imunofluoresensi :

### 1.2.1. Hasil pengamatan imunofluoresensi dari sediaan yang dibuat dari jaringan otot normal:

Hasil pengamatan ini dapat dilihat pada tabel 4.

Dari 10 sediaan yang diperiksa terdapat rata-rata 0,8 sel tiap 10 lapang pandang yang mengandung imunoglobulin dalam sitoplasmanya (fluoresensi hijau). Semua sel tersebut tidak ada satu sel pun yang mengandung gumpalan bakteri pada pemukaannya (fluoresensi hijau dan merah).

Tabel 4. Hasil pengamatan imunofluoresensi dari sel pembentuk antibodi spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan otot normal.

No.sediaan:	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
1A	1	1	0
1B	1	0	0
2A	1	0	0
2B	1	2	0
3A	1	1	0
3B	1	1	0
4A	2	0	0
4B	1	1	0
5A	0	2	0
5B	1	0	0
Jumlah:	10	8	0
Median:	1	1	0
Modus:	1	1	0
Mean :	1,10	0,80	
S D :	0,3162278	0	0

Keterangan:

Ig dalam sel: imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab.  
Gumpal.bakt.: gumpalan bakteri yang memberikan fluoresensi merah pada permukaan dari sel pembentuk Ab.

Tabel 4A. Perbandingan antara hasil pengamatan imunofluoresensi sel yang mengandung Ig intrasi-toplasma dengan gumpalan bakteri dan tanpa gumpalan bakteri pada permukaan sel antara kelompok jaringan normal dan jaringan radang.

No.sediaan:	Normal:		Radang:	
	score:	rank:	score:	randang:
1A	1	6.5	27	14.5
1B	0	2.5	27	14.5
2A	0	2.5	28	18.5
2B	2	10	27	14.5
3A	1	6.5	28	18.5
3B	1	6.5	27	14.5
4A	0	2.5	27	14.5
4B	1	6.5	27	14.5
5A	2	10	29	20
5B	0	2.5	26	11
		R1 = 56	R2 = 155	

$$U = 10 \times 10 + 1/2(10(10+1)) - 155 = 0$$

$$P < 0.001$$

Tabel 4B. Perbandingan antara hasil pengamatan imuno-fluoresensi sel yang mengandung Ig intrasi-plasma tanpa gumpalan bakteri pada permukaan sel antara kelompok jaringan normal dengan kelompok jaringan radang.

No.sediaan:	Normal:		Radang:	
	score:	rank:	score:	rank:
1A	1	6.5	6	20
1B	0	2.5	4	13.5
2A	0	2.5	4	13.5
2B	2	9.5	4	13.5
3A	1	6.5	5	17.5
3B	1	6.5	5	17.5
AA	0	2.5	3	11
4B	1	6.5	5	17.5
5A	2	9.5	5	17.5
5B	0	2.5	4	13.5
		R1 = 55		R2 = 155

$$U = 10 \times 10 + 1/2 ( 10 ( 10 + 1 ) ) - 155 = 0$$

$$p < 0.001$$

Tabel 4C. Perbandingan antara hasil pengamatan imuno-fluoresensi sel yang mengandung Ig intrasi-plasma dengan gumpalan bakteri pada permukaan sel antara kelompok jaringan normal dengan kelompok jaringan radang.

No.sediaan:	Normal:		Radang:	
	score:	rank:	score:	rank:
1A	0	5.5	21	11
1B	0	5.5	23	16
2A	0	5.5	24	19
2B	0	5.5	23	16
3A	0	5.5	23	16
3B	0	5.5	22	13
AA	0	5.5	24	19
4B	0	5.5	22	13
5A	0	5.5	24	19
5B	0	5.5	22	13
		R1 = 55		R2 = 155

$$U = 10 \times 10 + 1/2 ( 10 ( 10 + 1 ) ) - 155 = 0$$

$$p < 0.001$$

1.2.2. Hasil pengamatan sediaan imunofluoresensi dari sediaan yang dibuat dari jaringan otot beradang :

Hasil pengamatan ini dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk antibodi spesifik dari sediaan yang dibuat dari otot beradang.

No. sediaan:	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
6A	1	6	21
6B	1	4	23
7A	1	4	24
7B	1	4	23
8A	1	5	23
8B	1	5	22
9A	2	3	24
9B	0	5	22
10A	1	5	24
10B	1	4	22
Median:	1	4,5	23
Modus:	1	4	22 - 23
Mean:	1.0	4,5	22.8
S D :	0,4714045	0,849837	1.0327956
Sel yang mengandung Ig intra-sitoplasma:			
	Median:	27	
	Modus:	27	
	Mean :	27,4	
	S D :	0,6992059	

Keterangan:

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang memberikan fluoresensi merah yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab.

Dalam tiap 10 lapang pandang (dengan menggunakan objektip 40 kali), didapatkan:

- sel pembentuk antibodi yang dalam sitoplasmanya mengandung Ig. : 27 (Median) dengan Mean 27,4, pada sediaan tampak sebagai bulatan-bulatan yang memberikan

fluoresensi hijau (apple green).

- dari sel-sel tersebut diatas, 83,21 % (22,8 dari 27,4) pada permukaan selnya tampak gumpalan bakteri yang memberikan fluoresensi merah, dan pada pewarnaan ulang dengan pewarnaan Gram terdapat bakteri Gram negatif pada permukaan dari sel tersebut

- sisanya, 16,79 % (4,6 dari 27,4) tidak menunjukkan adanya gumpalan bakteri yang memberikan fluoresensi merah pada permukaannya, dan pada pewarnaan ulang dengan pewarnaan Gram, ternyata bahwa pada permukaan dari selnya tidak terdapat bakteri.

1.2.3. Uji spesifisitas dengan cara bloking:

Uji spesifisitas ini dengan pengamatan sediaan imunofluoresensi dari sediaan yang dibuat dari jaringan otot beradang dan mendapat perlakuan pra-inkubasi dengan kuman homolog dan kuman heterolog tanpa label rhodamim.

Hasil pengamatan ini dapat dilihat pada tabel 6 dan 7.

Dari tabel 6 dapat disimpulkan sebagai berikut:

- Tiap 10 lapang pandang terdapat jumlah sel yang dalam sitoplasmanya mengandung Ig (dengan dan tanpa adanya gumpalan bakteri pada permukaannya) dengan mean 26,7 (median 26,5). Kalau dibandingkan dengan hasil pengamatan

tanpa perlakuan pra-inkubasi dengan kuman homolog (lihat tabel 5) secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna, dengan  $P > 0,05$  (dengan uji-U dari Mann-Whitney (tabel 8)).

Tabel 6. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel plasma spesifik dari sediaan yang dibuat dari otot beradang yang mendapat perlakuan pra-inkubasi dengan kuman homolog.

No. sediaan:	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
11A	1	21	4
11B	0	21	5
12A	1	22	4
12B	0	23	4
13A	0	25	3
13B	1	22	4
14A	0	25	3
14B	1	22	4
15A	1	23	4
15B	0	24	4
Median:	0.5	22.5	4
Modus:	1	22	4
Mean:	0,5	21.8	3.9
S D :	0,5270463	1.22927219	0.5676462
Sel yang mengandung Ig intrasitoplasma:			
	Mean :	26.7	
	S D :	1.0593499	

Keterangan:

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk antibodi  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang memberikan fluoresensi merah yang terdapat pada permukaan sel.

- Jumlah sel yang dalam sitoplasmanya mengandung Ig dan pada permukaannya terdapat gumpalan bakteri yang memberikan fluoresensi merah pada percobaan ini dibandingkan dengan pada percobaan tanpa perlakuan pra-inkubasi de-



ngan kuman homolog tanpa label rhodamin terdapat penurunan sebesar 67,50 %, penurunan ini secara statistik menunjukkan perubahan yang bermakna, dengan  $P < 0,001$  dengan uji U- Mann-Withney (tabel 9). Pada pewarnaan ulang dengan Gram ternyata tidak terdapat perbedaan dalam kepadatan bakteri pada permukaan dari sel.

Tabel 7. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel plasma spesifik dari sediaan yang dibuat dari otot beradang yang mendapat perlakuan pra-inkubasi dengan kuman heterolog.

No. sediaan:	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
16A	0	5	22
16B	1	4	24
17A	1	4	22
17B	1	4	23
18A	0	3	24
18B	1	3	23
19A	1	3	23
19B	1	4	24
20A	0	3	23
20B	1	4	23
Median:	1	4	23
Modus:	1	4	23
Mean:	0,7	4.25	23.1
S D :	0,4830459	0,6749486	0.9574271
Sel yang mengandung Ig intra-sitoplasma:			
	Median:	27	
	Modus:	26	
	Mean :	26.8	
	S D :	0,6324555	

Keterangan:

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk antibodi  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang memberikan fluoresensi merah yang terdapat pada permukaan sel.

- Jumlah sel yang memberikan fluoresensi hijau pada

sitoplasmanya dan tidak memberikan fluoresensi merah, jumlahnya meningkat dengan nyata (naik 384,44%), peningkatan ini sangat bermakna secara statistik ( $P <$

Tabel 8

Tabel untuk perhitungan U-test.  
 Hasil perbandingan sel plasma yang memberikan fluoresensi hijau dengan dan tanpa fluoresensi merah dari kelompok kelola dengan dan tanpa pra inkubasi dengan kuman homolog

No:	N-score:	Rank:	No:	P-score:	Rank:
1	27	10.5	1	25	1
2	27	10.5	2	26	4
3	28	17	3	26	4
4	27	10.5	4	27	10.5
5	28	17	5	28	17
6	27	10.5	6	26	4
7	27	10.5	7	28	17
8	27	10.5	8	26	4
9	29	20	9	27	10.5
10	26	4	10	28	17
-----				P	-----
n1=10		R1= 121	n2=10		R2 = 89

Ho : Tidak terdapat perbedaan antara mendapat dan tidak mendapat pra-inkubasi.

$$U = n1 \times n2 + 1/2(n1(n1+1)) - R1$$

$$10 \times 10 + 1/2(10 \times 11) - 121$$

$$= 155 - 121 = 34$$

$$U = 34 \text{ (U hitung)} \quad P > 0.05$$

U tabel = 19 (pada alfa = 0.01, uji satu sisi)

Karena U hitung > U tabel, Ho diterima.

Kesimpulan: hasil pengamatan dengan dan tanpa mendapat pra-inkubasi tidak terdapat perbedaan bermakna.

0,001, dengan uji U-Mann-Whitney, lihat tabel 10).

Pada pewarnaan ulang dengan pewarnaan Gram tidak terdapat peningkatan ataupun penurunan dari jumlah bakteri pada permukaan sel pembentuk antibodi.

1.2.4. Hasil pengamatan sediaan imunofluoresensi dari sediaan yang dibuat dari jaringan otot beradang dan mendapat perlakuan pra-inkubasi dengan kuman heterolog tanpa label rhodamim:

Hasil dari pengamatan ini dapat dilihat pada tabel 7.

- Jumlah sel yang mengandung Ig dalam sitoplasmanya tidak menunjukkan perbedaan dengan hasil pengamatan dari percobaan tanpa pra-inkubasi dan bila diuji dengan uji U dari Mann-Whitney artinya secara statistik tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan  $P > 0,05$  (lihat tabel 11 dan 12).

Jumlah sel pembentuk antibodi spesifik yang pada permukaan selnya terdapat kuman yang memberikan fluoresensi merah dan jumlah sel tanpa adanya kuman tersebut, masing-masing akan memberikan hasil yang tidak bermakna dengan uji statistik yang sama ( $P > 0,05$ ) bila dibandingkan dengan hasil pengamatan pada percobaan tanpa pra-inkubasi dengan kuman.

Tabel 9.

Tabel untuk perhitungan U-test.

Hasil perbandingan sel pemb. Ab. yang memberikan fluoresensi hijau dan merah dari kelompok kelo-  
la antara sediaan yang mendapat perlakuan pra-  
inkubasi dengan kuman homolog dan tanpa pra-  
inkubasi.

No:	N-score:	Rank:	No:	P-score:	Rank:
1	21	11	1	3	1.5
2	22	13	2	3	1.5
3	22	13	3	4	6
4	22	13	4	4	6
5	23	16	5	4	6
6	23	16	6	4	6
7	23	16	7	4	6
8	24	19	8	4	6
9	24	19	9	4	6
10	24	19	10	5	10
n1=10		R1=155	n2=10		R2=55

Ho : tidak terdapat perbedaan antara sebelum  
dan sesudah mendapat pra-inkubasi.

$$\begin{aligned}
 U &= n_1 \times n_2 + \frac{1}{2}(n_1(n_1+1)) - R_1 \\
 &= 10 \times 10 + \frac{1}{2}(10 \times 11) - 155 \\
 &= 100 + 55 - 155
 \end{aligned}$$

$$U = 0 \text{ (U hitung)} \quad P < 0.001$$

U tabel = 19 (pada alfa = 0.01, uji satu sisi)

Karena U hitung < U tabel, Ho ditolak.

Kesimpulan: hasil pengamatan sebelum dan sesudah  
mendapat pra-inkubasi terdapat perbedaan bermakna.

Tabel 10.

Tabel untuk perhitungan U-test.

Hasil perbandingan sel pemb. Ab. yang memberikan fluoresensi hijau tanpa merah dari kelompok kelo- la antara sediaan yang mendapat perlakuan pra- inkubasi dengan kuman homolog dan tanpa pra- inkubasi.

No:	N-score:	Rank:	No:	P-score:	Rank:
1	3	1	1	21	11.5
2	4	3.5	2	21	11.5
3	4	3.5	3	22	14
4	4	3.5	4	22	14
5	4	3.5	5	22	14
6	5	7.5	6	23	16.5
7	5	7.5	7	23	16.5
8	5	7.5	8	24	18
9	5	7.5	9	25	19.5
10	6	9	10	25	19.5
n1=10		R1=46.5	n2=10		R2=155

Ho : Tidak terdapat perbedaan antara mendapat dan tidak mendapat pra-inkubasi.

$$\begin{aligned}
 U &= n_1 \times n_1 + 1/2(n_2(n_2+1)) - R_2 \\
 &= 10 \times 10 + 1/2 (10 \times 11) - 155 \\
 &= 100 + 55 - 155
 \end{aligned}$$

$$U = 0 \text{ ( U hitung) } \quad P < 0.001$$

$$U \text{ tabel} = 19 \text{ (pada alfa} = 0.01, \text{ uji satu sisi)}$$

Karena U hitung < U tabel, Ho ditolak.

Kesimpulan: hasil pengamatan dengan dan tanpa mendapat pra-inkubasi terdapat perbedaan bermakna

Tabel 11.

Tabel untuk perhitungan U-test.  
 Hasil perbandingan sel pemb. Ab. yang memberikan fluoresensi hijau dan merah dari kelompok kelo-  
 la antara sediaan yang mendapat perlakuan pra-  
 inkubasi dengan kuman heterolog dan tanpa pra-  
 inkubasi.

No:	N-score:	Rank:	No:	P-score:	Rank:
1	21	1	1	22	4
2	22	4	2	22	4
3	22	4	3	23	9.125
4	22	4	4	23	9.125
5	23	9.125	5	23	9.125
6	23	9.125	6	23	9.125
7	23	9.125	7	23	9.125
8	24	17.5	8	24	17.5
9	24	17.5	9	24	17.5
10	24	17.5	10	24	17.5
n1=10		R1=92.875	n2=10		R2=106.125

Ho : Tidak terdapat perbedaan antara mendapat dan tidak mendapat pra-inkubasi.

$$\begin{aligned}
 U &= n_1 \times n_2 + \frac{1}{2}(n_2(n_2+1)) - R_2 \\
 &= 10 \times 10 + \frac{1}{2}(10 \times 11) - 106.125 \\
 &= 100 + 55 - 106.126
 \end{aligned}$$

$$U = 48.875 \text{ (U hitung)} \quad P > 0.10$$

U tabel = 19 (pada alfa = 0.01, uji satu sisi)

Karena U hitung > U tabel, Ho diterima.

Kesimpulan: hasil pengamatan dengan dan tanpa mendapat pra-inkubasi tidak terdapat perbedaan bermakna.

Tabel 12.

Tabel untuk perhitungan U-test.  
 Hasil perbandingan sel pemb. Ab. yang memberikan fluoresensi hijau tanpa merah dari kelompok kela antara sediaan yang mendapat perlakuan pra-inkubasi dengan kuman heterolog dan tanpa pra-inkubasi.

No:	N-score:	Rank:	No:	P-score:	Rank:
1	3	3	1	3	3
2	4	10	2	3	3
3	4	10	3	3	3
4	4	10	4	3	3
5	4	10	5	4	10
6	5	17	6	4	10
7	5	17	7	4	10
8	5	17	8	4	10
9	5	17	9	4	10
10	6	20	10	5	17
n1=10		R1=131	n2=10		R2=79

Ho : Tidak terdapat perbedaan antara mendapat dan tidak mendapat pra-inkubasi.

$$\begin{aligned}
 U &= n_1 \times n_2 + \frac{1}{2}(n_1(n_1+1)) - R_1 \\
 &= 10 \times 10 + \frac{1}{2}(10 \times 11) - 131 \\
 &= 100 + 55 - 131
 \end{aligned}$$

$$U = 24 \text{ (U hitung)} \quad P = 0.05$$

U tabel = 19 (pada alfa = 0.01, uji satu sisi)

Karena U hitung = U tabel, Ho. diterima.

Kesimpulan: hasil pengamatan dengan dan tanpa mendapat pra-inkubasi tidak terdapat perbedaan bermakna.

## 2. BACT-EIFA VISUAL (Bacterial Enzyme Immuno Fluorescence Assay):

### 2.1. Checkerboard Titration:

Titration ini dilakukan untuk menentukan pengenceran optimum dari serum imun tikus dan antiserum terhadap tikus yang berlabel fluorochrom.

Tabel 13. Hasil checkerboard titration untuk menentukan pengenceran optimum dari serum imun tikus dan FITC labeled rabbit anti rat antiserum dengan uji BACT-EIFA VISUAL.

Antiserum dilution:	Immune serum dilution:							
	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384
1:100	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	-
1:200	4+	4+	4+	4+	4+	2+	1+	-
1:400	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	-
1:800	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	-
1:1600	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	-
1:3200	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	-
1:6400	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	-
1:12800	3+	3+	3+	2+	2+	1+	-	-
1:25600	2+	2+	2+	2+	1+	1+	-	-
Hanya serum	-	-	-	-	-	-	-	-
Hanya antiserum:	-	-	-	-	-	-	-	-

Hasil dari pada checkerboard titration ini dapat dilihat pada tabel 13.

Kesimpulan dari checkerboard titration adalah:

- (i) Pengenceran rabbit anti rat antiserum conjugate untuk percobaan-percobaan selanjutnya 1:1600
- (ii) Pengenceran serum imun tikus untuk percobaan-percobaan selanjutnya adalah 1:512



2.2. Menentukan "cutoff value" dari serum tikus normal:

Untuk menentukan "cutoff value" ini dilakukan uji Bact-ELISA dari serum 10 ekor tikus sebelum mendapat perlakuan (treatment). Hasil dari percobaan ini dapat dilihat dalam tabel 14.

Tabel 14. Hasil uji ELISA dari 10 spesimen serum tikus normal (dilakukan in duplo) spesifik terhadap E. coli 06:K13:H1.

Spesimen: Absorbens:		Spesimen: Absorbens:	
1A.	0.0075	1B.	0.0056
2A.	0.0085	2B.	0.0102
3A.	0.009	3B.	0.0097
4A.	0.0085	4B.	0.0089
5A.	0.0079	5B.	0.0083
6A.	0.0105	6B.	0.0089
7A.	0.0101	7B.	0.0099
8A.	0.0071	8B.	0.0101
9A.	0.0111	9B.	0.0109
10A.	0.0073	10B.	0.0079
MEAN		:	0.008895
DEVIASI STANDAR		:	0.0014318
CUTOFF VALUE (MEAN + 2 SD)		:	0.0117586 (0.0118)

Pada percobaan ini didapatkan :

Mean : 0,008895  
 Deviasi standar : 0,001432  
 Cut-off value : 0,0117586 (0,0118)  
 (Mean + 2 SD)

Jadi pada percobaan-percobaan selanjutnya uji-ELISA dinyatakan positif apabila nilai absorbensnya => 0,0118.

### 2.3. Perbandingan antara Bact-ELISA (spectrophotometer) dengan Bact-EIFA Visual:

Untuk dapat membandingkan hasil dari Bact-ELISA yang pembacaannya dilakukan dengan spectrophotometer dengan Bact-EIFA Visual, dilakukan percobaan dengan menggunakan serum imun tikus yang dihubungkan dengan tingginya pengenceran dari serum tersebut. Percobaan ini dilakukan dengan menggunakan pengenceran dua kali lipat mulai dari 1:128 sampai dengan 1:16384.

Tabel 15. Hubungan antara pengenceran serum, Nilai absorbens Bact-ELISA dan derajat fluoresensi Bact-EIFA Visual dari serum imun tikus.

Pengenceran:	Nilai absorbmen Bact-ELISA:	Derajat fluoresensi Bact-EIFA Visual:
1:128	0,5234 - 0,7346	4+
1:256	0,2235 - 0,4238	4+
1:512	0,1792 - 0,1995	4+
1:1024	0,1372 - 0,1449	4+
1:2048	0,0601 - 0,0709	3+
1:4096	0,0121 - 0,0265	2+
1:8192	0,0082 - 0,0115	1+
1:16384	< 0,0082	-

Tabel 16. Hasil uji Bact-EIFA Visual pada 48 pengulangan

Pengenceran:	Derajat Fl.	No. pos.plate				Jumlah pos.	CV** %
		I	II	III	IV		
1:256	4+	12	12	12	12	48	0
	3+	0	0	0	0	0	
	2+	0	0	0	0	0	
	1+	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	
1:522	4+	11	12	12	11	46	5,10
	3+	1	0	0	1	2	
	2+	0	0	0	0	0	
	1+	0	0	0	0	0	
	-	0	0	0	0	0	
1:1024	4+	10	11	10	10	41	9,25
	3+	2	1	2	2	7	
	2+	0	0	0	0	0	
	1+	0	0	0	0	0	
	-	0	0	0	0	0	
1:2048	4+	0	0	0	0	0	13,29
	3+	10	11	9	10	40	
	2+	2	1	3	2	8	
	1+	0	0	0	0	0	
	-	0	0	0	0	0	
1:4096	4+	0	0	0	0	0	24,66
	3+	2	2	1	2	7	
	2+	10	9	9	8	36	
	1+	0	1	2	2	2	
	-	0	0	0	0	0	
1:8192	4+	0	0	0	0	0	60,68*
	3+	0	0	0	0	0	
	2+	0	1	1	2	4	
	1+	9	9	8	8	34	
	-	3	2	3	2	10	
1:16384	4+	0	0	0	0	0	225,97*
	3+	0	0	0	0	0	
	2+	0	0	0	0	0	
	1+	1	2	2	3	8	
	-	11	10	10	9	40	

\*Catatan:

Pada pengenceran 1:8192, variasi koefisien sebesar 60,68% sebenarnya tidak akan menjadi hambatan sebab sebenarnya hasil dari pengulangan ini sebenarnya adalah sebagai berikut:

- reaksi positif (2+) : 4
- reaksi negatif (1+ dan 0): 44

Jadi variasi koefisiennya sebenarnya adalah: 25,78%.

Pada pengenceran 1:16384 hasil reaksinya sebenarnya semuanya negatif (1+ : 8 dan 0 : 40).

\*\* CV : variasi koefisien

Hasil dari percobaan ini dapat dilihat pada tabel 15 yang menyatakan hubungan antara pengenceran, nilai absorbens dari Bact-ELISA dan derajat fluoresens dari Bact-EIFA Visual.

Dari percobaan ini dapat ditarik kesimpulan bahwa hasil Bact-EIFA Visual yang menunjukkan derajat fluoresensi 1+ dinyatakan sebagai negatif, sedangkan Bact-EIFA Visual yang memberikan derajat fluoresensi => 2+ dinyatakan positif.

#### 2.4. Uji repeatabilitas dari Bact-EIFA Visual:

Untuk menguji repeatabilitas dari uji Bact-EIFA Visual dilakukan uji Bact-EIFA Visual dari serum imun tikus pada pengenceran 1:256 sampai 1:16384 (pengenceran lipat dua) sebanyak 48 pengulangan.

Hasil dari percobaan ini menunjukkan variasi koefisien (coefficient of variation) dapat dilihat pada tabel 15 kolom terakhir.

Dari percobaan ini dapat ditetapkan pengenceran-pengenceran yang dapat dipergunakan sebagai serum baku, yaitu:

Serum baku I (4+)	: 1/1024
Serum baku II (3+)	: 1/2048
Serum baku III (2+)	: 1/4098
Serum baku IV (1+)	: 1/8192

Tabel 17. Hasil uji Bact-EIFA Visual dari serum baku dalam 24 pengulangan.

	1024		2048		4096		8192	
	A	B	C	D	E	F	G	H
1.	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	1+
2.	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	0
3.	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	1+
4.	4+	4+	3+	4+	2+	2+	1+	1+
5.	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	1+
6.	4+	3+	3+	3+	2+	2+	0	1+
7.	3+	4+	2+	3+	2+	1+	1+	1+
8.	4+	3+	3+	3+	1+	2+	1+	1+
9.	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	1+
10.	4+	4+	3+	2+	1+	2+	1+	1+
11.	3+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	1+
12.	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0
Hasil uji McNemar: $P < 0,01$		$P < 0,01$		$P < 0,01$		$P < 0,01$		
Variasi koefisien: 9,93%		14,00%		20,76%		38,61%		

### 2.5. Serum baku:

Untuk keperluan ini dilakukan uji Bact-EIFA Visual, dengan menggunakan empat macam pengenceran: 1:1024, 1:2048, 1:4096, dan 1:8192 (lihat tabel. 17). Percobaan ini dilakukan dalam 24 replicate.

Hasil dari uji Bact-EIFA Visual ini dapat dilihat pada tabel 16.

Dari hasil analisa statistik dengan uji McNemar didapatkan hasil sebagai berikut:

(i) Serum baku I (pengenceran 1:1024):

- Antara kelompok A dan B dengan uji McNemar didapatkan  $0,80 < P < 0,90$ , artinya bahwa antara kedua kelompok ini tidak terdapat perbedaan bermakna pada  $\alpha = 0,01$  dan  $0,05$  (lihat tabel 18).

Tabel 18. Hasil uji replitabilitas serum baku spesifik terhadap E. coli O6:K13:h1 dengan metoda BACT-EIFA VISUAL.

Serum baku I. (4+)

	A:	B:	Frekuensi:
I.	+	+	8
II.	+	-	2
III.	-	+	2
IV.	-	-	0

Ho: antara kelompok A dan B tidak terdapat perbedaan.

Uji McNemar:

		B		Juml.
		-	+	
A.	-	0	2	2
	+	2	8	10
		2	10	12

$$X^2 = ((2 - 2) - 1)^2 / 4 = 0.25$$

$$P = 0.64$$

$$X^2 \text{ tabel } (0.01, df=1) = 6.64$$

Karena  $X^2$  hitung lebih kecil dari  $X^2$  tabel, Ho diterima.

Kesimpulan adalah: kedua kelompok tidak berbeda secara bermakna.

Tabel 19. . Hasil uji replitabilitas serum baku serum tikus dengan metoda Bact-EIFA VISUAL.

Serum baku I (4+)

Gol.:	4+	Non - 4+	Frekuensi:
I.	+	+	0
II.	+	-	20
III.	-	+	4
IV.	-	-	0

Ho. : antara kelompok 4+ dan non-4+ tidak terdapat perbedaan bermakna.

Uji Mc.Nemar:

	4+		Juml.
	-	+	
Non-4+	0	20	20
	4	0	4
	4	20	24

$$X^2 = ((20 - 4) - 1)^2 / 24 = 9,375$$

$$X^2 \text{ hitung} = 9,375$$

$$P = 0.007$$

$$X^2 \text{ tabel} = 3,84 \text{ (pada alfa} = 0,05)$$

Karena  $X^2 \text{ hitung} > X^2 \text{ tabel}$ , Ho ditolak.

Kesimpulan: kedua kelompok berbeda secara bermakna dengan  $P < 0,05$

Tabel 20. Hasil uji replitabilitas serum baku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda BACT-EIFA VISUAL.

Serum baku II. (3+)

	C:	D:	Frekuensi:
I.	+	+	9
II.	+	-	2
III.	-	+	1
IV.	-	-	0

Ho : antara kelompok C dan D tidak terdapat perbedaan.

Uji McNemar :

		D		Juml.
		-	+	
C	-	0	1	1
	+	2	9	11
		2	10	12

$$X^2 = ((2 - 1) - 1)^2 / 3 = 0$$

$$P > 0.99$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 (0.01, df= 1)$$

Karena  $X^2$  hitung <  $X^2$  tabel, Ho diterima.

Kesimpulan: kedua kelompok tidak berbeda bermakna.



Tabel 21. Hasil uji reipitabilitas serum baku serum tikus dengan metoda Bact-EIFA VISUAL.

Serum baku II (3+)

Col.:	3+	Non - 3+	Frekuensi:
I.	+	+	0
II.	+	-	20
III.	-	+	4
IV.	-	-	0

Ho. : antara kelompok 3+ dan non-3+ tidak terdapat perbedaan bermakna.

Uji Mc.Nemar:

	3+		Juml.
	-	+	
Non-3+	-	0	20
	+	4	0
	4	20	24

$$X^2 = ((20 - 4) - 1)^2 / 24 = 9,375$$

$$P = 0.007$$

$$X^2 \text{ hitung} = 9,375$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 \text{ (pada alfa } 0.01, \text{ df= } 1)$$

Karena  $X^2 \text{ hitung} > X^2 \text{ tabel}$ , Ho ditolak.

Kesimpulan: kedua kelompok berbeda secara bermakna

Tabel 22. Hasil uji replitabilitas serum baku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda BACT-EIFA VISUAL.

Serum baku III. (2+)

	E:	F:	Frekuensi:
I.	+	+	9
II.	+	-	1
III.	-	+	2
IV.	-	-	0

Ho : antara kelompok E dan F tidak terdapat perbedaan.

Uji McNemar :

		F		Juml.
		-	+	
E	-	0	2	2
	+	1	9	10
		1	11	12

$$X^2 = ((2 - 1) - 1)^2 / 3 = 0$$

$$P > 0.99$$

$$X^2 = 6.64 (0.01, df = 1)$$

Karena  $X^2$  hitung <  $X^2$  tabel, Ho diterima.

Kesimpulan: antara keduanya tidak terdapat perbedaan bermakna.

Tabel 23. Hasil uji replitabilitas serum baku serum tikus dengan metoda Bact-EIFA VISUAL.

Serum baku III (2+)

Gol.:	2+	Non - 2+	Frekuensi:
I.	+	+	0
II.	+	-	20
III.	-	+	4
IV.	-	-	0

Ho. : antara kelompok 2+ dan non-2+ tidak terdapat perbedaan bermakna.

Uji Mc.Nemar:

	2+		Juml.
	-	+	
Non-2+	-	0	20
	+	4	4
	4	20	24

$$X^2 = ((20 - 4) - 1)^2 / 24 = 9,375$$

$$P = 0.007$$

$$X^2 \text{ hitung} = 9,375$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6,64 \text{ (pada alfa} = 0.01)$$

Karena  $X^2 \text{ hitung} > X^2 \text{ tabel}$ , Ho ditolak.

Kesimpulan: kedua kelompok berbeda secara bermakna dengan  $P < 0,05$

Tabel 24. Hasil uji replitabilitas serum baku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda BACT-EIFA VISUAL.

Serum baku IV (1+ = negatip)

	G:	H:	Frekuensi:
I.	+	+	9
II.	+	-	2
III.	-	+	1
IV.	-	-	0

Ho : antara kelompok G dan H tidak terdapat perbedaan.

Uji McNemar :

		H		Juml.
		-	+	
G	-	0	1	1
	+	2	9	11
		2	10	12

$$X^2 = ((2 - 1) - 1)^2 / 3 = 0$$

$$P > 0.99$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 \text{ (pada alfa} = 0.01)$$

Karena  $X^2 \text{ hitung} < X^2 \text{ tabel}$ , Ho diterima

Kesimpulan: antara keduanya tidak terdapat perbedaan bermakna.

Tabel 25. Hasil uji replitabilitas serum baku spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda BACT-EIFA VISUAL.

Serum baku IV (1+ = negatip)

	1+	non 1+	Frekuensi:
I.	+	+	0
II.	+	-	21
III.	-	+	3
IV.	-	-	0

Ho : antara kelompok 1+ dan non 1+ tidak terdapat perbedaan.

Uji McNemar :

		non 1+		Juml.
		-	+	
1+	-	0	3	3
	+	21	0	21
		21	3	24

$$X^2 = ((21 - 3) - 1)^2 / 24 = 12.04$$

$$P < 0.001$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 \text{ (pada alfa} = 0.01)$$

Karena  $X^2$  hitung  $>$   $X^2$  tabel, Ho ditolak

Kesimpulan: antara keduanya terdapat perbedaan yang bermakna

- Kalau yang dibandingkan adalah antara kelompok yang memberikan hasil 4+ dan non-4+ dengan uji McNemar,  $0,001 < P < 0,01$ , artinya diantara kedua kelompok ini terdapat perbedaan yang bermakna baik pada  $\alpha = 0,01$  atau  $0,05$  (lihat tabel 19).

(ii) Serum baku II (pengenceran 1:2048):

- Antara kelompok C dan D didapat kan hasil yang sama seperti pada serum baku I (lihat tabel 20).

- Kalau yang dibandingkan adalah antara kelompok yang memberikan hasil 3+ dan non-3+ dengan uji McNemar didapatkan hasil yang sama dengan pada serum baku I (lihat tabel 21).

(iii) Serum baku III (pengenceran 1:4096):

- Antara kelompok E dan F didapat kan hasil yang sama seperti pada serum baku I (lihat tabel 22).

- Kalau yang dibandingkan adalah antara kelompok yang memberikan hasil 2+ dan non-2+ dengan uji McNemar didapatkan hasil yang sama dengan pada serum baku I (lihat tabel 23).

(IV) Serum baku IV (pengenceran 1:8192):

- Antara kelompok G dan H didapat kan hasil yang sama seperti pada serum baku I (lihat tabel 24).

- Kalau yang dibandingkan adalah antara kelompok yang memberikan hasil 1+ dan non-1+ dengan uji McNemar didapatkan  $P < 0,001$ , artinya bahwa diantara kedua kelompok terdapat perbedaan bermakna (lihat tabel 25).

## II. PENELITIAN UTAMA :

### 1. PERCOBAAN PEMBUATAN BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI IN VITRO (ARTIFISIAL):

Tujuan dari percobaan ini adalah untuk membuktikan bahwa BBA selain dapat terbentuk dalam jaringan ginjal yang mengalami peradangan, juga dapat terbentuk dalam air kemih yang mengandung antibodi dan bakteri.

Pada percobaan dipelajari pula pengaruh-pengaruh dari kadar antibodi dan konsentrasi kuman terhadap hasil deteksi BBA tersebut.

#### 1.1. Pengaruh pengenceran serum imun:

Untuk mengetahui hubungan antara kadar antibodi dan hasil deteksi BBA, dilakukan percobaan menginkubasi kuman dalam serum imun tikus pada pengenceran 10, 100 dan 1000 kali, kemudian dilakukan uji EIFA Visual.

Hasil dari percobaan ini dapat dilihat pada tabel 26.

Tabel 26.

Perbandingan antara nilai absorbens ELISA dan derajat fluoresensi EIFA Visual pada pengenceran antara  $10^{-1}$  -  $10^{-3}$  pada pembentukan BBA artifisial.

Pengenceran serum:	ELISA (nilai absorbens)	EIFA Visual (derajat Fl.)
$10^{-1}$	0,4986 - 0,5562	4+
$10^{-2}$	0,4096 - 0,4721	4+
$10^{-3}$	0,0081 - 0,0094	1+

Dari hasil percobaan ini dapat ditarik kesimpulan bahwa pembuatan BBA secara artifisial harus dipergunakan serum imun tikus dengan pengenceran  $10^{-2}$ .

Tabel 27. Perbandingan hasil deteksi BBA dengan menggunakan metoda ELISA, EIFA VISUAL DAN IF.

Konsentrasi bakteri:	ELISA		EIFA		IF	
	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
$10^{-3}$	7(35)	13(65)	8(40)	12(60)	17(85)	3(15)
$10^{-4}$	11(55)	9(45)	12(60)	8(40)	18(90)	2(10)
-----						
Jumlah pos. pd kons. < $10^{-5}$	18(45)		20(50)		35(87,5)	
-----						
$10^{-5}$	20(100)	0(0)	20(100)	0(0)	19(95)	1(5)
$10^{-6}$	20(100)	0(0)	20(100)	0(0)	20(100)	0(0)
$10^{-7}$	20(100)	0(0)	20(100)	0(0)	20(100)	0(0)
$10^{-8}$	20(100)	0(0)	20(100)	0(0)	20(100)	0(0)
-----						
Jumlah pos. pd kons. > $10^{-5}$	80(100)		80(100)		77(96,25)	
-----						

Catatan: nilai dalam kurung adalah %  
 ELISA pos: nilai absorbens > 0,0118  
 EIFA pos : derajat fluoresensi => 2+



Tabel 28. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan ELISA dan EIFA VISUAL.

Konsentrasi kuman 10<sup>3</sup> CFU / ml

	ELISA:	EIFA VISUAL	Frekuensi:
I	+	+	7
II	+	-	0
III	-	+	0
IV	-	-	17

Ho : antara ELISA dan EIFA tidak terdapat perbedaan dalam kepekaannya.

Uji McNemar:

		EIFA		Juml.
		-	+	
ELISA	-	13	0	13
	+	0	7	7
		13	7	20

$$X^2 = ((0 - 0) - 1)^2 / 0 = 0$$

$$P > 0.99$$

Tabel 29. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan ELISA dan I F.

Konsentrasi kuman 10<sup>3</sup> CFU / ml

	ELISA:	I F	Frekuensi:
I	+	+	7
II	+	-	0
III	-	+	8
IV	-	-	5

Ho : Antara uji ELISA dan uji IF tidak terdapat perbedaan.

Uji McNemar:

		I F		Juml.
		-	+	
ELISA	-	5	8	13
	+	0	7	7
		5	15	20

$$X^2 = ((8 - 0) - 1)^2 = 6.125$$

$$P = 0.014$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 \text{ (pada } \alpha = 0.01)$$

Karena  $X^2_{hitung} < X^2_{tabel}$ , Ho diterima.

Kesimpulan: metoda IF dan uji ELISA mempunyai kepekaan yang tidak berbeda pada konsentrasi kuman 13<sup>3</sup> CFU / ml.

Tabel 30. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan EIFA VISUAL dan I F.

Konsentrasi kuman  $10^3$  CFU / ml

	EIFA:	I F	Frekuensi:
I	+	+	7
II	+	-	0
III	-	+	8
IV	-	-	5

Ho : antara uji EIFA VISUAL dan uji IF tidak terdapat perbedaan.

Uji McNemar:

		I F		Juml.
		-	+	
EIFA	-	5	8	13
	+	0	7	7
		5	15	20

$$X^2 = ((8 - 0) - 1)^2 / 8 = 6.12$$

$$P = 0.014$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 \text{ (pada } \alpha = 0.01)$$

Karena  $X^2$  hitung <  $X^2$  tabel, Ho diterima.

Kesimpulan: uji IF dan uji EIFA VISUAL mempunyai kepekaan yang sama pada konsentrasi kuman  $10^3$  CFU / ml.

Tabel 31. Rekapitulasi hasil uji McNemar pada konsentrasi kuman  $10^3$  CFU / ml.

	EIFA	IF
ELISA	$P > 0,99$	$0,01 < P < 0,02$
EIFA		$0,01 < P < 0,02$

## 1.2. Pengaruh konsentrasi kuman:

Dengan meningkatkan konsentrasi kuman dari  $10^3$  sampai  $10^8$  CFU per ml, terdapat peningkatan nilai absorbens ELISA dan peningkatan derajat fluoresensi EIFA Visual. Hasil dari peningkatan konsentrasi kuman pada pembentukan BBA secara artifisial dapat dilihat pada tabel 27.

1.2.1. Pada tabel 28 - 31 dapat dilihat perbandingan hasil uji kepekaan antara metoda uji IF, ELISA dan EIFA VISUAL untuk mendeteksi BBA artifisial pada konsentrasi kuman  $10^3$ . Antara uji ELISA dan EIFA VISUAL tidak terdapat perbedaan dalam hal kepekaannya dengan  $P > 0,99$  baik pada  $\alpha = 0,01$  maupun pada  $\alpha = 0,05$  (uji McNemar).

1.2.2. Pada tabel 32-35 dapat dilihat hasil perbandingan hasil uji IF, ELISA dan EIFA VISUAL dalam hal kepekaannya untuk mendeteksi BBA artifisial pada konsentrasi kuman  $10^4$ .

Pada konsentrasi ini, hasil uji McNemar pada perbandingan kepekaan antara uji ELISA dan EIFA VISUAL didapatkan  $P$  antara 0,30 dan 0,50 dan hal ini menunjukkan bahwa antara keduanya tidak terdapat perbedaan dalam kepekaannya untuk mendeteksi BBA artifisial, ( $P > 0,01$  dan 0,05). Demikian pula halnya dengan hasil uji IF bila dibandingkan dengan ELISA / EIFA VISUAL.

Tabel 32. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan EIFA VISUAL dan ELISA.

Konsentrasi kuman  $10^4$  CFU / ml

	ELISA:	EIFA:	Frekuensi:
I	+	+	10
II	+	-	0
III	-	+	2
IV	-	-	8

$H_0$  : antara uji ELISA dan uji EIFA tidak terdapat perbedaan dalam kepekaannya.

Uji McNemar:

ELISA	EIFA		Juml.
	-	+	
-	8	2	10
+	0	10	10
	8	12	20

$$X^2 = (2 - 0) - 1)^2 / 2 = 0.5$$

$$P = 0.49$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 \text{ (pada alfa} = 0.01)$$

Karena  $X^2$  hitung <  $X^2$  tabel,  $H_0$  diterima.

Kesimpulan: pada konsentrasi kuman  $10^4$  CFU / ml tidak terdapat perbedaan bermakna antara kedua jenis uji laboratorium.

Tabel 33. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan EIFA VISUAL dan I F.

Konsentrasi kuman  $10^4$  CFU / ml

	EIFA:	I F:	Frekuensi:
I	+	+	10
II	+	-	2
III	-	+	6
IV	-	-	2

Uji McNemar:

EIFA	IF		Juml.
	-	+	
-	2	6	8
+	2	10	12
	4	16	20

$$X^2 = ((6 - 2) - 1)^2 / 8 = 1.125$$

$$P = 0.27$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 \text{ (pada alfa} = 0.01)$$

Karena  $X^2$  hitung <  $X^2$  tabel,  $H_0$  diterima.

Kesimpulan: pada konsentrasi kuman  $10^4$  CFU/ml keduanya mempunyai kepekaan yang sama.

Tabel 34. Hasil uji deteksi BBA artifissial dengan ELISA dan I F.

Konsentrasi kuman  $10^4$  CFU / ml

	ELISA:	I F:	Frekuensi:
I	+	+	9
II	+	-	1
III	-	+	7
IV	-	-	3

Uji McNemar:

	IF		Juml.
	-	+	
ELISA -	3	7	10
ELISA +	1	9	10
	4	16	20

$$X^2 = ((7 - 1) - 1)^2 / 8 = 3.1255$$

$$P = 0.082$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 \text{ (pada alfa} = 0.01)$$

Karena  $X^2$  hitung <  $X^2$  tabel,  $H_0$  diterima.

Kesimpulan: keduanya mempunyai kepekaan yang tidak berbeda secara bermakna.

Tabel 35. Rekapitulasi hasil uji McNemar pada konsentrasi kuman  $10^4$  CFU / ml.

	EIFA	IF
ELISA	$0.30 < P < 0,50$	$0,05 < P < 0,10$
EIFA		$0,20 < P < 0,30$

Tabel 36. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan ELISA dan EIFA VISUAL.

Konsentrasi kuman  $10^5$  CFU / ml

	ELISA:	EIFA:	Frekuensi:
I	+	+	20
II	+	-	0
III	-	+	0
IV	-	-	0

Uji McNemar:

	EIFA		Juml.
	-	+	
ELISA -	0	0	0
ELISA +	0	20	20
	0	20	20

$X^2 = 0$

$P > 0.99$

Keduanya mempunyai kepekaan yang sama

Tabel 37. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan EIFA VISUAL dan I F.

Konsentrasi kuman  $10^5$  CFU / ml

	EIFA:	I F:	Frekuensi:
I	+	+	15
II	+	-	5
III	-	+	0
IV	-	-	0

Uji McNemar:

	IF		Juml.
	-	+	
EIFA -	0	0	0
EIFA +	5	15	20
	5	15	20

$X^2 = ((5 - 0) - 1)^2 = 3.2$

$P = 0.079$

$X^2$  tabel = 6.64 (pada alfa = 0.01)

Karena  $X^2$  hitung <  $X^2$  tabel,  $H_0$  diterima.

Kesimpulan: kedua metoda mempunyai kepekaan yang tidak berbeda secara bermakna.

Tabel 38. Hasil uji deteksi BBA artifissial dengan ELISA dan I F.

Konsentrasi kuman  $10^5$  CFU / ml

	ELISA:	I F:	Frekuensi:
I	+	+	15
II	+	-	5
III	-	+	0
IV	-	-	0

Uji McNemar:

		IF		Juml.
		-	+	
ELISA	-	0	0	0
	+	5	15	20
		5	15	20

$$X^2 = ((5 - 0) - 1)^2 / 5 = 3.2$$

$$P = 0.079$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 \text{ (pada alfa} = 0.01)$$

Karena  $X^2$  hitung <  $X^2$  tabel,  $H_0$  diterima.

Kesimpulan: keduanya mempunyai kepekaan yang tidak berbeda secara bermakna.

Tabel 39. Rekapitulasi hasil uji McNemar pada konsentrasi kuman  $10^5$  CFU / ml.

	EIFA	IF
ELISA	$P > 0,99$	$0,05 < P < 0,10$
EIFA		$0,05 < P < 0,10$

Tabel 40. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan ELISA dan EIFA VISUAL.

Konsentrasi kuman  $10^6$  CFU / ml

	ELISA:	EIFA:	Frekuensi:
I	+	+	20
II	+	-	0
III	-	+	0
IV	-	-	0

Uji McNemar:

		EIFA		Juml.
		-	+	
ELISA	-	0	0	0
	+	0	20	20
		0	20	20

$X^2 = 0$

$P > 0.99$

Keduanya mempunyai kepekaan yang sama.

Tabel 41. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan EIFA VISUAL dan I F.

Konsentrasi kuman  $10^6$  CFU / ml.

	EIFA:	I F:	Frekuensi:
I	+	+	19
II	+	-	1
III	-	+	0
IV	-	-	0

$H_0$  : Antara uji EIFA VISUAL dan IF tidak terdapat perbedaan dalam kepekaannya.

Uji McNemar:

		IF		Juml.
		-	+	
EIFA	-	0	0	0
	+	1	19	20
		1	19	20

$X^2 = ((1 - 0) - 1)^2 = 0$

$P > 0.99$

$X^2$  tabel = 6.64 (pada alfa = 0.01)

Karena  $X^2$  hitung  $<$   $X^2$  tabel,  $H_0$ . diterima.

Kesimpulan: antara kedua metoda tidak terdapat perbedaan bermakna.



Tabel 42. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan ELISA dan I F.

Konsentrasi kuman  $10^6$  CFU / ml.

	ELISA:	I F:	Frekuensi:
I	+	+	19
II	+	-	1
III	-	+	0
IV	-	-	0

Ho : Antara uji ELISA dan IF tidak terdapat perbedaan dalam kepekaannya.

Uji McNemar:

	IF		Juml.
	-	+	
ELISA -	0	0	0
ELISA +	1	19	20
	1	19	20

$$X^2 = ((1 - 0) - 1)^2 = 0$$

$$P > 0.99$$

$$X^2 \text{ tabel} = 6.64 \text{ (pada alfa} = 0.01)$$

Karena  $X^2$  hitung  $< X^2$  tabel, Ho. diterima.

Kesimpulan: antara kedua metoda tidak terdapat perbedaan bermakna.

Tabel 43. Hasil uji deteksi BBA artifisial dengan ELISA dan EIFA VISUAL.

Konsentrasi kuman  $10^7 - 10^8$  CFU / ml.

	ELISA:	EIFA:	Frekuensi:
I	+	+	20
II	+	-	0
III	-	+	0
IV	-	-	0

Ho : Antara uji EIFA VISUAL dan IF tidak terdapat perbedaan dalam kepekaannya.

Uji McNemar:

	EIFA		Juml.
	-	+	
ELISA -	0	0	0
ELISA +	0	20	20
	0	20	20

Pada konsentrasi kuman  $10^7$  dan  $10^8$  CFU / ml antara ELISA dengan EIFA VISUAL, ELISA dengan IF dan EIFA VISUAL dengan IF tidak terdapat perbedaan dalam kepekaannya. ( $P > 0.99$ )

Catatan:

----- Pada konsentrasi kuman  $10^7$  dan  $10^8$  CFU / ml semua memberikan hasil uji yang sama (dari 20 sampel) semua positif.

Kesimpulan:

pada konsentrasi kuman  $\Rightarrow 10^7$  CFU /ml uji-uji ELISA, EIFA VISUAL mempunyai kepekaan yang tidak berbeda.

1.2.3. Pada konsentrasi kuman  $10^5$  -  $10^8$  hasil perbandingan uji IF, ELISA dan EIFA VISUAL untuk mendeteksi BBA artifisial dapat dilihat pada tabel 36 - 44. Pada konsentrasi kuman tersebut ketiga metoda mempunyai kepekaan yang secara statistik tidak berbeda, baik pada alfa = 0,05 maupun pada alfa = 0,01.

Tabel 44. Rekapitulasi hasil uji McNemar pada konsentrasi kuman  $10^6$  CFU / ml.

	EIFA	IF
ELISA	P > 0,99	P > 0,99
EIFA		P > 0,99

## 2. PIELONEFRITIS ASENDENS EKSPERIMENTAL:

Percobaan ini terdiri dari :

- Kelompok kontrol : terdiri dari 10 ekor tikus betina yang mendapat inokulasi intra uretral dengan 0.5 ml BPS steril
- Kelompok kelola : terdiri dari 15 ekor tikus betina yang mendapat inokulasi dengan 0.5 ml suspensi E. coli

O6:K13:H1 dalam PBS yang mengandung kuman  $10^8$  CFU per ml.

Pemeriksaan-pemeriksaan dibawah ini dilakukan pada hari ke 14 pasca inokulasi.

2.1. Pemeriksaan bakteri berlapis antibodi:

Hasil pemeriksaan BBA pada air kemih tikus yang dilakukan dengan uji IF dan EIFA Visual dapat dilihat pada tabel 45.

Spesimen nomor 2GP, 7GP, 11GP, dan 13GP baik dengan uji IF maupun dengan uji EIFA VISUAL hasil deteksi BBA dari air kemih semuanya memberikan hasil negatip.

2.2. Biak hitung kuman dari air kemih:

Biak hitung kuman dengan menggunakan biak tetes (droplet plating method) dengan menggunakan media CLED memberikan hasil seperti pada tabel 45.

Pada tabel ini dapat dilihat bahwa spesimen-spesimen yang hasil deteksi BBA air kemihnya negatip (nomor 2GP, 7GP, 11GP dan 13GP) hasil biak hitung air kemihnya negatip atau kurang dari  $10^3$  CFU tiap ml-nya.

Pemeriksaan air kemih dari tikus kelompok kontrol semuanya memberikan hasil yang negatip.

Tabel 45. Hasil uji deteksi BBA dan BHK air kemih tikus dari kelompok kelola.

No.spseimen:	BBA-IF	BBA-EIFA VISUAL	BHK
1GP	+	4+	10 <sup>6</sup>
2GP	-	1+	10 <sup>5</sup>
3GP	+	4+	10 <sup>6</sup>
4GP	+	4+	10 <sup>5</sup>
5GP	+	2+	10 <sup>4</sup>
6GP	+	3+	10 <sup>5</sup>
7GP	-	-	-
8GP	+	4+	10 <sup>5</sup>
9GP	+	4+	10 <sup>6</sup>
10GP	+	4+	10 <sup>5</sup>
11GP	-	-	10 <sup>3</sup>
12GP	+	3+	10 <sup>5</sup>
13GP	-	-	-
14GP	+	4+	10 <sup>5</sup>
15GP	+	2+	10 <sup>4</sup>

Catatan: Uji EIFA VISUAL positif => 2+

2.3. Penentuan titer antibodi (IgG) dari serum dan air kemih:

Hasil pemeriksaan kandungan antibodi (IgG) dari air kemih dan serum dapat dilihat pada tabel 46.

Tabel 46. Hasil penentuan titer antibodi spesifik dalam air kemih dan dalam serum dari tikus yang telah mendapat inokulasi E. coli O6:K13:H1 secara intrauretral dengan uji BACT-EIFA VISUAL.

No.spes.:	Titer Ab-air kemih:	Titer Ab-serum:
1GP	512	3072
2GP	0	3072
3GP	384	128
4GP	384	1280
5GP	128	2048
6GP	256	3072
7GP	0	1280
8GP	384	4096
9GP	384	3072
10GP	384	128
11GP	1	6
12GP	384	1280
13GP	0	8
14GP	256	2048
15GP	128	3072

Dari kelompok kontrol titer antibodinya dalam serum dan air kemih negatif atau kalau ada rendah sekali titer-nya ( titer antibodinya antara 0,5 - 1,0). Pada kelompok kelola, titer antibodi dari air kemih 4 spesimen antara 0-1, yaitu spesimen-spesimen nomor 2GP, 7GP, 11GP dan 13GP, sedangkan 11 spesimen menunjukkan titer antara 128 - 512. Keempat spesimen ini hasil uji deteksi BBA nya juga negatif, sedangkan hasil BHK air kemihnya  $\leq 10^3$ .

Titer antibodi dalam serumnya, 2 spesimen dengan titer 6 dan 8 (spesimen nomor 11GP dan 13GP), 2 dengan titer 128 (spesimen nomor 3GP dan 10GP), sedang sisanya (11 spesimen menunjukkan titer antara 1280 - 4096.

#### 2.1. Deteksi sel pembentuk antibodi spesifik:

Hasil pemeriksaan sediaan ginjal dari kelompok kontrol dapat dilihat dalam tabel 47 dan kelompok kelola dapat dilihat pada tabel 48, 49 dan 50.

Dari kelompok kelola, dari 15 spesimen yang diperiksa, terdapat 4 spesimen (26,67 %) yang tidak menunjukkan adanya sel pembentuk antibodi spesifik (sel-sel yang pada permukaannya menunjukkan adanya fluoresensi merah sedangkan sisanya (11 spesimen atau 73,33 %) menunjukkan adanya sel pembentuk antibodi yang ditandai dengan adanya fluoresensi merah (sel pembentuk antibodi spesifik) yang berjumlah  $\geq 12$  per 10 lapang pandang pada salah satu ginjalnya, atau pada kedua ginjalnya. Kelompok yang tidak menunjukkan adanya sel pembentuk antibodi ternyata semuanya juga menunjukkan hasil deteksi

BBA negatip.

Tabel 47. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk antibodi spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dari kelompok kontrol.

=====			
Sediaan:	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
16GP	2	1	0
17GP	0	1	0
18GP	0	1	0
19GP	1	0	0
20GP	1	2	0
21GP	0	2	0
22GP	2	1	0
23GP	1	1	0
24GP	1	0	0
25GP	2	1	0
-----			
Mean:	1	1	0
SD:	0.8165	0.6667	0
=====			

Hasil uji deteksi BBA pada 11 ekor (73,33 %) dari kelompok kelola adalah positif dan dinyatakan sebagai menderita ISK bagian atas, sedangkan berdasarkan biak hitung kuman 9 ekor (60 %) menunjukkan adanya bakteri => 10<sup>5</sup> CFU tiap ml-nya.

Tabel.48. Rekapitulasi hasil pengamatan imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H11 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi dengan suspensi kuman

Ginjal kiri:

No.	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
1GPKi	2	4	15
2GPKi	0	1	0
3GPKi	1	7	14
4GPKi	1	6	15
5GPKi	1	3	16
6GPKi	1	4	15
7GPKi	1	1	0
8GPKi	0	3	15
9GPKi	0	6	16
10GPKi	2	4	17
11GPKi	1	1	0
12GPKi	2	5	13
13GPKi	2	2	0
14GPKi	1	6	16
15GPKi	1	6	16
Mean:	1.0909	4.909	15.2727
S D:	0.6667	1.4142	1.6011
Sel pembentuk antibodi spesifik: (Ig dalam sel +; Gumpal.bakt. +)	Mean: 20.1818	SD : 1.6011	

Tabel 49. Rekapitulasi hasil pengamatan imunofluoresensi sel pemb. Ab. spsesifik terhadap E. coli O6:K13:H11 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi dengan suspensi kuman

Ginjal kanan:

No.	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
1GPKa	1	6	14
2GPKa	0	1	0
3GPKa	1	7	17
4GPKa	0	5	16
5GPKa	1	5	4
6GPKa	0	5	14
7GPKa	1	1	0
8GPKa	0	9	17
9GPKa	1	7	14
10GPKa	1	5	15
11GPKa	1	1	0
12GPKa	1	5	16
13GPKa	2	2	0
14GPKa	1	5	17
15GPKi	1	7	11
Mean:	0.7272	4.7333	14.0909
SD:	0.483	1.4142	4.0125
Sel pembentuk antibodi spesifik: (Ig dalam sel +; Gumpal.bakt. +)	Mean: 20.0909	SD : 4.3001	



Tabel 50. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk antibodi spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dari kelompok kelola.

=====

Sediaan:	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
1GP	1.5	5	14.5
2GP	1	1	0
3GP	1	7	15.5
4GP	0.5	5.5	15.5
5GP	1	4	10
6GP	0.5	4.5	14.5
7GP	1	1	0
8GP	0	6	16
9GP	0.5	6.5	15
10GP	1.5	4.5	16
11GP	0.5	0.5	0
12GP	1.5	5	14.5
13GP	1.5	1.5	0
14GP	1	5.5	16.5
15GP	1	6.5	13.5
MEAN:	0.9090	5.455	14.68
SD :	0.701	0.961	1.779

=====

Tabel 51. Rekapitulasi hasil pengamatan imunofluoresensi sel pemb. Ab. spes. terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari post inokulasi dengan suspensi kuman (sampel yang sediaannya memberikan hasil deteksi sel pembentuk antibodi spesifik negatif dikeluarkan dari tabel).

Ginjal kiri:

No. sediaan:	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
1GPKi	2	4	15
3GPKi	1	7	14
4GPKi	1	6	15
5GPKi	1	3	16
6GPKi	1	4	15
8GPKi	0	3	15
9GPKi	0	6	16
10GPKi	2	4	17
12GPKi	2	5	13
14GPKi	1	6	16
15GPKi	1	6	16
Mean:	1.0909	4.909	15.2727
S D:	0.6667	1.4142	1.1595

Sel pembentuk antibodi spesifik:

(Ig dalam sel +; Gumpal.bakt. +)

Mean: 20.1818  
SD : 1.6011

Tabel 52. Rekapitulasi hasil pengamatan imunofluoresensi sel pemb. Ab. spes. terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari post inokulasi dengan suspensi kuman (sampel yang pada sediaannya memberikan hasil sel plasma Ig + =< tidak diperhitungkan)

Ginjal kanan:

No. sediaan:	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
1GPKa	1	6	14
3GPKa	1	7	17
4GPKa	0	5	16
5GPKa	1	5	4
6GPKa	0	5	14
8GPKa	0	9	17
9GPKa	1	7	14
10GPKa	1	5	15
12GPKa	1	5	16
14GPKa	1	5	17
15GPKi	1	7	11
Mean:	0.7272	6	14.0909
SD:	0.483	1.4142	4.0125

Sel pembentuk antibodi spesifik:

(Ig dalam sel +; Gumpal.bakt. +)

Mean: 20.0909  
SD : 4.3001

Spesimen no. 5 dan 15 hasil biak hitungnya adalah  $10^4$  CFU per ml, sedangkan hasil uji BBA dengan IF memberikan hasil positif, dengan uji EIFA Visual, spesimen no. 5 dan no. 15 juga memberikan hasil positif.

Jumlah sel pembentuk antibodispesifik yang dalam sitoplasmanya mengandung Ig dan pada permukaannya terdapat gumpalan bakteri yang dibuat dari sediaan ginjal kiri :  $11,4 \pm 6,7273$ .

Tabel 53. Perbandingan hasil pengamatan imunofluoresensi dari sel plasma pada kelompok kontrol dan kelompok kelola.

Sel plasma:	Kontrol: Mean±SD	Kelola Mean±SD	Hasil uji McNemar alfa=0,05. Ho:
1. Ig dlm sel - Gump. bakt. +	1±0,817	0,99±0,701	Diterima P > 0,05
2. Ig dlm sel + Gump. bakt. -	1±0,667	4,50±0,112	Diterima P > 0,05
3. Ig dlm sel + Gump. bakt. +	0,3±0,483	14,68±1,779	Ditolak P < 0,05
4. Ig dlm sel + Gump. bakt. + & Gump. bakt -	1,3±0,984	19,18±2,552	Ditolak P < 0,05

Kalau spesimen yang pada pengamatan dengan mikroskop fluoresensi tidak menunjukkan adanya sel pembentuk antibodi spesifik yang mengandung Ig intrasitoplasma dikeluarkan dari perhitungan, sebab menurut percobaan pendahuluan kelompok ini dinyatakan sebagai tidak menunjukkan adanya peradangan. Menurut tabel 50 dan 51 ginjal kiri dan ginjal kanan masing-masing mempunyai mean  $15,2727 \pm 1,1037$  dan  $14,0909 \pm 3,8067$ .

Pada tabel 51 dapat dilihat jumlah sel pembentuk antibodi rata-rata yang mengandung Ig intraseluler dan pada permukaannya terdapat gumpalan bakteri:  $14,68 \pm 1,779$  tiap 10 lapang pandang. Jumlah sel pembentuk antibodi dengan Ig intrasitoplasma dengan atau tanpa adanya bumpulan kuman pada permukaan selnya pada klompok kelola :  $19,1818 \pm 2,5521$  tiap 10 lapang pandang.

Perbandingan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 53.

#### 2.5. Perbandingan antara kelima pemeriksaan-pemeriksaan uji deteksi BBA, uji deteksi SPS, titer Ab-ak, titer Ab-s dan BHK:

Untuk dapatnya metoda-metoda tersebut diatas dipergunakan untuk menentukan ada tidaknya infeksi pada ginjal dilakukan analisis korelasi rank dari Spearman antara kelima macam uji pemeriksaan tersebut diatas, yaitu: deteksi sel pembentuk antibodi spesifik (SPS), bakteri berlapis antibodi (BBA), penentuan titer antibodi dalam air kemih (Ab-ak) dan serum (Ab-s) dan biak hitung kuman dalam air kemih (BHK).

Berdasarkan hasil uji BBA (IF) air kemih pasca inokulasi intrauretral dapat dibagi menjadi 2 golongan, yaitu BBA positif 11 sampel sedangkan BBA negatif 4 sampel.

2.5.1. Analisis uji korelasi rank dari Spearman antara uji deteksi BBA dengan uji deteksi SPS :

Dalam tabel 54 dapat dilihat hasil analisis korelasi Spearman antara uji deteksi BBA dengan uji deteksi SPS dengan  $P = 0,0021$ .

Tabel 54. Tabulasi analisa Korelasi Rank Spearman.  
Analisa Korelasi antara BBA dengan SPS.

Spesimen:	BBA		SPS		di	di <sup>2</sup>
	score:	rank:	score:	rank:		
1GP	4	8	14.5	4	4	16
3GP	4	8	15.5	7.5	0.5	0.25
4GP	4	8	15.5	7.5	0.5	0.25
5GP	2	1.5	10	1	0.5	0.25
6GP	3	3.5	14.5	4	-0.5	0.25
8GP	4	8	16	9.5	-1.5	2.25
9GP	4	8	15	6	2	4
10GP	4	8	16	9.5	-1.5	2.25
12GP	3	3.5	14.5	4	-0.5	0.25
14GP	4	8	16.5	11	-3	9
15GP	2	1.5	13.5	2	-0.5	0.25
					Sdi <sup>2</sup> :	35

$$SX^2 = 88.36$$

$$SY^2 = 99.82$$

$$Sdi^2 = 35$$

$$rs = 0.8156$$

$$rs^2 = 0.6652$$

$$t = 4.2287$$

$$P = 0.0021$$

Tabel 55. Tabulasi analisa Korelasi Rank Spearman.  
Analisa Korelasi antara BBA dengan Ab-ak

Spesimen:	BBA		Ab-ak		di	di <sup>2</sup>
	score:	rank:	score:	rank:		
1GP	4	8	512	11	-3	9
3GP	4	8	384	7.5	0.5	0.25
4GP	4	8	384	7.5	0.5	0.25
5GP	2	1.5	128	1.5	0	0
6GP	3	3.5	256	3.5	0	0
8GP	4	8	384	7.5	0.5	0.25
9GP	4	8	384	7.5	0.5	0.25
10GP	4	8	384	7.5	0.5	0.25
12GP	3	3.5	384	7.5	-4	16
14GP	4	8	256	3.5	4.5	20.25
15GP	2	1.5	128	1.5	0	0
						Sdi <sup>2</sup> : 46.5

$$SX^2 = 88.36$$

$$SY^2 = 99.82$$

$$Sdi^2 = 46.5$$

$$rs = 0.7543$$

$$rs^2 = 0.5690$$

$$t = 2.6001$$

$$P = 0.016$$

Catatan: Ab-ak = titer Ab dalam air kemih.

Jadi hasil analisis tersebut menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara keduanya, baik pada derajat alfa 0,05 maupun pada 0,01.

2.5.2. Analisis uji korelasi rank dari Spearman antara uji deteksi BBA dengan titer Ab-ak.:

Dalam tabel 55 dipaparkan hasil analisis korelasi rang dari Spearman antara uji deteksi BBA dengan hasil penentuan titer antibodi spesifik dalam air kemih dengan  $P = 0,016$ . Jadi antara keduanya menunjukkan adanya korelasi pada derajat kemaknaan 0,05 tetapi tidak pada 0,01.

Tabel 56. Tabulasi analisa Korelasi Rank Spearman.  
Analisa Korelasi antara BBA dengan Ab-s.

Spesimen:	BBA		Ab-s		di	di <sup>2</sup>
	score:	rank:	score:	rank:		
1GP	4	8	3072	8.5	-0.5	0.25
3GP	4	8	128	1.5	6.5	42.25
4GP	4	8	1280	3.5	4.5	20.25
5GP	2	1.5	2048	5.5	4	16
6GP	3	3.5	3072	8.5	-5	25
8GP	4	8	4096	11	-3	9
9GP	4	8	3072	8.5	-0.5	0.25
10GP	4	8	128	1.5	6.5	42.25
12GP	3	3.5	1280	3.5	0	0
14GP	4	8	2048	5.5	2.5	6.25
15GP	2	1.5	3072	8.5	-7	49

Sdi<sup>2</sup>:210.5

SX<sup>2</sup> = 88.36

rs = -0.04573

SY<sup>2</sup> = 113

rs<sup>2</sup> = 0.00209

Sdi<sup>2</sup> = 210.5

t = 0.1373

P > 0.10

Catatan: Ab-s = titer Ab dalam serum.

2.5.3. Analisis uji korelasi rank dari Spearman antara uji deteksi BBA dengan titer Ab-s.:

Dalam tabel 56 dipaparkan hasil analisis korelasi dari Spearman antara hasil uji deteksi BBA dengan titer antibodi spesifik dari serum dengan  $P > 0.10$ . Jadi antara keduanya tidak menunjukkan adanya korelasi.

tabel 57. Tabulasi analisa Korelasi Rank Spearman.  
Analisa Korelasi antara BBA dengan BHK.

Spesimen:	BBA		BHK		di	di <sup>2</sup>
	score:	rank:	score:	rank:		
1GP	4	8	10 <sup>6</sup>	10	-2	4
3GP	4	8	10 <sup>6</sup>	10	-2	4
4GP	4	8	10 <sup>5</sup>	5.5	3	9
5GP	2	1.5	10 <sup>4</sup>	1.5	0	0
6GP	3	3.5	10 <sup>5</sup>	5.5	-2	4
8GP	4	8	10 <sup>5</sup>	5.5	-2.5	6.25
9GP	4	8	10 <sup>6</sup>	10	-2	4
10GP	4	8	10 <sup>5</sup>	5.5	2.5	6.25
12GP	3	3.5	10 <sup>5</sup>	5.5	-2	4
14GP	4	8	10 <sup>5</sup>	5.5	2.5	6.25
15GP	2	1.5	10 <sup>4</sup>	1.5	0	0

-----  
Sdi<sup>2</sup>:45.75

SX <sup>2</sup> = 88.36	rs = 0.7558
SY <sup>2</sup> = 98.19	rs <sup>2</sup> = 0.5712
Sdi <sup>2</sup> = 45.75	t = 3.4627
	P = 0.0043

-----  
Catatan: BHK = Biak Hitung Kuman

2.5.4. Analisis uji korelasi rank dari Spearman antara uji deteksi BBA dengan hasil BHK.:

Hasil analisis korelasi rank antara uji deteksi BBA dengan hasil biak hitung kuman dalam air kemih menunjukkan adanya korelasi yang kuat dengan P = 0,0043, hal ini menunjukkan adanya korelasi kuat baik pada derajat kemaknaan 0,01 maupun pada 0,05 (tabel 57).



Tabel 58. Tabulasi analisa Korelasi Rank Spearman.  
 Analisa Korelasi antara SPS dengan Ab-ak.

Spesimen:	SPS		Ab-ak		di	di <sup>2</sup>
	score:	rank:	score:	rank:		
1GP	14.5	4	512	11	-7	49
3GP	15.5	7.5	384	7.5	0	0
4GP	15.5	7.5	384	7.5	0	0
5GP	10	1	128	1.5	-0.5	0.25
6GP	14.5	4	256	3.5	0.5	0.25
8GP	16	9.5	384	7.5	2	4
9GP	15	6	384	7.5	-0.5	0.25
10GP	16	9.5	384	7.5	2	4
12GP	14.5	4	384	7.5	-3.5	12.25
14GP	16.5	11	256	3.5	7.5	56.25
15GP	13.5	2	128	1.5	0.5	0.25

-----  
 Sdi<sup>2</sup>:126.5

SX <sup>2</sup> = 116.73	rs = 0.4711
SY <sup>2</sup> = 99.82	rs <sup>2</sup> = 0.2219
Sdi <sup>2</sup> = 126.5	t = 1.879
	P = 0.003

-----

2.5.5. Analisis uji korelasi rank dari Spearman antara uji deteksi SPS dengan titer Ab-ak.:

analisis korelasi dari Spearman antara hasil uji deteksi sel pembentuk antibodi spesifik dengan titer antibodi spesifik dari air kemih (tabel 58) menunjukkan adanya korelasi baik pada derajat kemaknaan 0,05 maupun pada 0,01 (P = 0,003)

Tabel 59. Tabulasi analisa Korelasi Rank Spearman.  
Analisa Korelasi antara SPS dengan Ab-s.

Spesimen:	SPS		Ab-s		di	di <sup>2</sup>
	score:	rank:	score:	rank:		
1GP	14.5	4	3072	8.5	-4.5	20.25
3GP	15.5	7.5	128	1.5	6	36
4GP	15.5	7.5	1280	3.5	4	16
5GP	10	1	2048	5.5	-4.5	20.25
6GP	14.5	4	3072	8.5	-4.5	20.25
8GP	16	9.5	4096	11	1.5	2.25
9GP	15	6	3072	8.5	-2.5	6.25
10GP	16	9.5	128	1.5	8	64
12GP	14.5	4	1280	3.5	0.5	0.25
14GP	16.5	11	2048	5.5	5.5	30.25
15GP	13.5	2	3072	8.5	6.5	42.25

$$SX^2 = 116.73$$

$$Y^2 = 113$$

$$Sdi^2 = 258$$

$$rs = 0.09676$$

$$rs^2 = 0.00936$$

$$t = 0.2916$$

$$P > 0.10$$

$$Sdi^2: 258$$

2.5.6. Analisis uji korelasi rank dari Spearman antara uji deteksi SPS dengan titer Ab-s.:

Dari hasil analisis koerelasi dari Spearman antara hasil uji deteksi sel pembentuk antibodi spesifik dengan titer antibodi spesifik dalam serum menunjukkan bahwa keduanya tidak menunjukkan adanya korelasi dengan  $P > 0,10$ . Hasil ini dapat dilihat pada tabel 59.

2.5.7. Analisis uji korelasi rank dari Spearman antara uji deteksi SPS dengan hasil BHK.:

Hasil analisis korelasi rank antara hasil uji sel pembentuk antibodi spesifik dengan hasil biak hitung kuman dalam air kemih seperti yang dipaparkan dalam tabel 60, menunjukkan bahwa diantara keduanya tidak menunjukkan adanya hubungan dengan  $P > 0,10$ .

Tabel 60. Tabulasi analisa Korelasi Rank Spearman.  
Analisa Korelasi antara SPS dengan BHK.

Spesimen:	SPS		BHK		di	di <sup>2</sup>
	score:	rank:	score:	rank:		
1GP	14.5	4	10 <sup>6</sup>	10	-6	36
3GP	15.5	7.5	10 <sup>6</sup>	10	-2.5	6.25
4GP	15.5	7.5	10 <sup>5</sup>	5.5	2	4
5GP	10	1	10 <sup>4</sup>	1.5	-0.5	0.25
6GP	14.5	4	10 <sup>5</sup>	5.5	-1.5	2.25
8GP	13	0.5	10 <sup>5</sup>	5.5	4	16
9GP	15	6	10 <sup>6</sup>	10	-6	36
10GP	16	9.5	10 <sup>5</sup>	5.5	4	16
12GP	14.5	4	10 <sup>5</sup>	5.5	-1.5	2.25
14GP	16.5	11	10 <sup>5</sup>	5.5	5.5	30.25
15GP	13.5	2	10 <sup>4</sup>	1.5	0.5	0.25

sdi<sup>2</sup>:149.5

SX<sup>2</sup> = 116.73  
SY<sup>2</sup> = 98.19  
sdi<sup>2</sup> = 149.5

rs = 0.3055  
rs<sup>2</sup> = 0.09333  
t = 0.9625  
P > 0.10

2.5.8. Analisis uji korelasi rank dari Spearman antara titer Ab-ak dengan titer Ab-s.:

Antara titer antibodi spesifik dalam air kemih dengan titer antibodi spesifik dalam serum berdasarkan analisis korelasi dari Spearman tidak menunjukkan adanya korelasi dengan  $P > 0,10$  (lihat tabel 61).

Tabel 61. Tabulasi analisa Korelasi Rank Spearman.  
Analisa Korelasi antara Ab-ak dengan Ab-s.

Spesimen:	Ab-ak		Ab-s		di	di <sup>2</sup>
	score:	rank:	score:	rank:		
1GP	512	11	3072	8.5	2.5	6.25
3GP	384	7.5	128	1.5	6	36
4GP	384	7.5	1280	3.5	4	16
5GP	128	1.5	2048	5.5	-4	16
6GP	256	3.5	3072	8.5	-5	25
8GP	384	7.5	4096	11	-3.5	12.25
9GP	384	7.5	3072	8.5	-1	1
10GP	384	7.5	128	1.5	6	36
12GP	384	7.5	1280	3.5	4	16
14GP	256	3.5	2048	5.5	-2	4
15GP	128	1.5	3072	8.5	-7	49

Sdi<sup>2</sup>: 217.5

SX<sup>2</sup> = 99.82  
SY<sup>2</sup> = 113  
Sdi<sup>2</sup> = 217.5

rs = 0.0220  
rs<sup>2</sup> = 0.0004854  
t = 0.06611  
P > 0.10

Catatan: Ab-s = titer Ab dalam serum.

2.5.9. Analisis uji korelasi rank dari Spearman antara titer Ab-ak dengan hasil BHK.:

Pada analisis korelasi Spearman antara hasil titer antibodi spesifik dengan hasil biak hitung kuman dalam air kemih menunjukkan bahwa diantara keduanya terdapat korelasi yang sangat bermakna dengan  $P < 0,0005$  (tabel 62).

Tabel 62. Tabulasi analisa Korelasi Rank Spearman.  
Analisa Korelasi antara Ab-ak dengan BHK.

Spesimen:	Ab-ak		BHK		di	di <sup>2</sup>
	score:	rank:	score:	rank:		
1GP	512	11	10 <sup>6</sup>	10	-1	1
3GP	384	7.5	10 <sup>6</sup>	10	-2.5	6.25
4GP	384	7.5	10 <sup>5</sup>	5.5	2	4
5GP	128	1.5	10 <sup>4</sup>	1.5	0	0
6GP	256	3.5	10 <sup>5</sup>	5.5	-2	4
8GP	384	7.5	10 <sup>5</sup>	5.5	2	4
9GP	384	7.5	10 <sup>6</sup>	10	2.5	6.25
10GP	384	7.5	10 <sup>5</sup>	5.5	2	4
12GP	384	7.5	10 <sup>5</sup>	5.5	2	4
14GP	256	3.5	10 <sup>5</sup>	5.5	-2	4
15GP	128	1.5	10 <sup>4</sup>	1.5	0	0

Sdi<sup>2</sup>: 37.5

SX<sup>2</sup> = 99.82

rs = 0.8106

SY<sup>2</sup> = 98.19

rs<sup>2</sup> = 0.6571

Sdi<sup>2</sup> = 37.5

t = 5.5878

P < 0.0005

2.5.10. Analisis uji korelasi rank dari Spearman antara titer Ab-s dengan hasil BHK.:

Pada analisis korelasi Spearman antara hasil titer antibodi spesifik dalam serum dengan hasil biak hitung kuman dalam air kemih menunjukkan bahwa diantara keduanya tidak terdapat korelasi yang sangat bermakna dengan  $P > 0,10$  (tabel 63).

tabel 63. Tabulasi analisa Korelasi Rank Spearman.  
Analisa Korelasi antara Ab-s dengan BHK.

Spesimen:	Ab-s		BHK		di	di <sup>2</sup>
	score:	rank:	score:	rank:		
1GP	3072	8.5	10 <sup>6</sup>	10	-1.5	2.25
3GP	128	1.5	10 <sup>6</sup>	10	-8.5	72.25
4GP	1280	3.5	10 <sup>5</sup>	5.5	-2	4
5GP	2048	5.5	10 <sup>4</sup>	1.5	4	16
6GP	3072	8.5	10 <sup>5</sup>	5.5	2.5	6.25
8GP	4096	11	10 <sup>5</sup>	5.5	5.5	30.25
9GP	3072	8.5	10 <sup>6</sup>	10	1.5	2.25
10GP	128	1.5	10 <sup>5</sup>	5.5	4	16
12GP	1280	3.5	10 <sup>5</sup>	5.5	-2	4
14GP	2048	5.5	10 <sup>5</sup>	5.5	0	0
15GP	3072	8.5	10 <sup>4</sup>	1.5	7	49

sdi<sup>2</sup>:202.25

SX<sup>2</sup> = 113  
SY<sup>2</sup> = 98.19  
Sdi<sup>2</sup> = 202.25

rs = 0.04244  
rs<sup>2</sup> = 0.0.180  
t = 0.3826  
P > 0.10

**Tabel 64. Hasil analisis korelasi rank menurut Spearman antara uji deteksi BBA, uji deteksi SPS, titer Ab-ak, titer Ab-s dan BHK.**

	SPS:	Ab-ak:	Ab-s:	BKH:
BBA:	rs = 0.8156 rs <sup>2</sup> =0.6652 t = 4.2287 P = 0.0021	rs = 0.7543 rs <sup>2</sup> =0.5690 t = 2.6001 P = 0.016	rs = -0.0457 rs <sup>2</sup> =0.00209 t = -0.1373 P > 0.10	rs = 0.7558 rs <sup>2</sup> =0.5712 t = 3.4627 P = 0.0043
SPS:		rs = 0.5991 rs <sup>2</sup> =0.3589 t = 2.2447 P = 0.03	rs = 0.09676 rs <sup>2</sup> =0.00936 t = 0.2916 P > 0.10	rs = 0.3055 rs <sup>2</sup> =0.0220 t = 0.06611 P > 0.10
Ab-ak:			rs = 0.0220 rs <sup>2</sup> =0.000484 t = 0.06611 P > 0.10	rs = 0.8106 rs <sup>2</sup> =0.6571 t = 5.5878 P < 0.0005
Ab-s:				rs = 0.04244 rs <sup>2</sup> =0.00180 t = 0.3826 P > 0.10

=====  
**BBA** : hasil deteksi bakteri berlapis antibodi  
**SPS** : hasil deteksi sel pembentuk antibodi spsifik  
**Ab-ak**: titer antibodi spesifik air kemih  
**Ab-s** : titer antibodi spesifik serum  
**BHK** : hasil biak hitung kuman air kemih

Pada tabel 64 dapat dilihat korelasi antara kelima macampemeriksaan yang dianalisis dengan korelasi dari Spearman.

Kesimpulan dari analisis korelasi rank dari Spearman pada derajat kemaknaan 0,01 adalah sebagai berikut:

- A. Pasangan dengan  $P < 0,01$  (terdapat korelasi bermakna):
- (i) BBA - SPS :  $P = 0,0021$
  - (ii) BBA - BHK :  $P = 0,0043$
  - (iii) Ab-ak - BHK :  $P < 0,0005$
- B. Pasangan dengan  $P > 0,01$  (tidak terdapat korelasi bermakna):
- (i) BBA - Ab-ak :  $P = 0,016$
  - (ii) BBA - Ab-s :  $P > 0,10$
  - (iii) SPS - Ab-ak :  $P = 0,03$
  - (iv) SPS - Ab-s :  $P > 0,10$
  - (v) SPS - BHK :  $P > 0,10$
  - (vi) Ab-ak - Ab-s :  $P > 0,10$
  - (vii) Ab-s - BHK :  $P > 0,10$

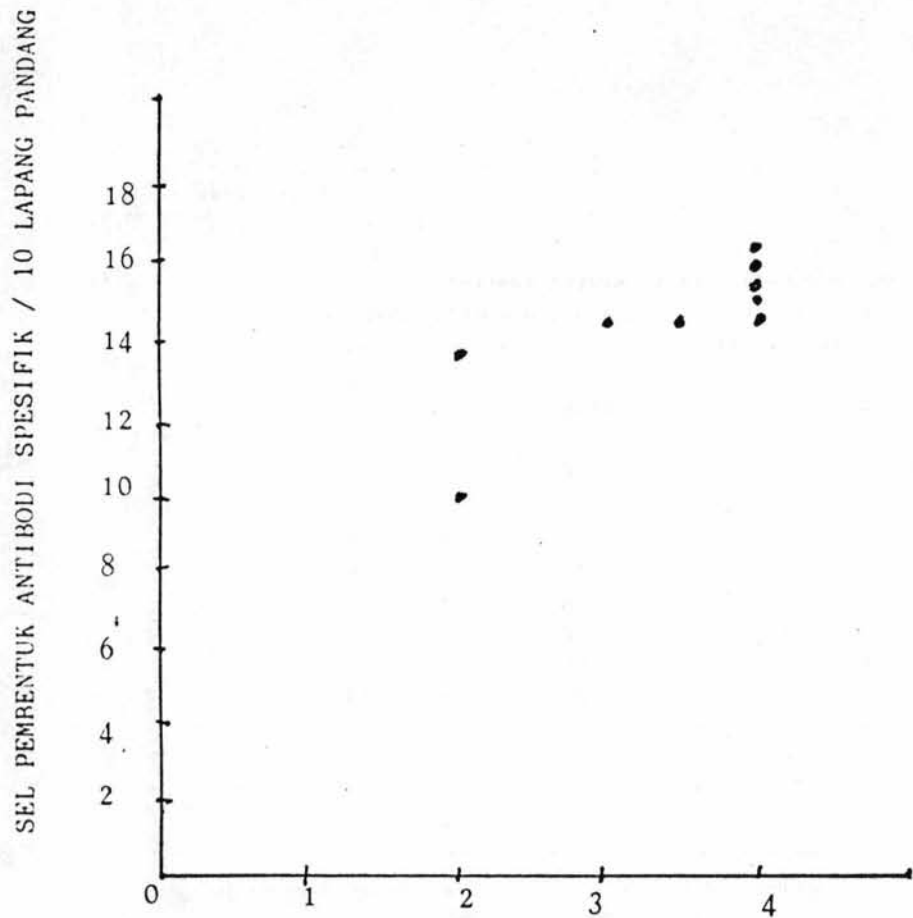
Pada tabel 65 dipaparkan perbandingan dari hasil-hasil pemeriksaan dari kelompok kontrol (10 spesimen) dan kelompok kelola (15 spesimen).



Tabel 65. Perbandingan antara hasil deteksi SPS, BBA, Ab-s, Ab-ak dan BHK dari kelompok kelola dan kelompok kontrol.

No. spes.:	SPS		BBA				Ab-ak		Ab-s		BHK	
	Kontr.	Kelola	Kontr.	Kelola		Kontr.	Kelola	Kontr.	Kelola	Kontr.	Kelola	
			IF:	EIFA:	IF:	EIFA:						
1.	0	14,5	-	-	+	4+	0	521	0	3072	-	10 <sup>6</sup>
2.	0	0	-	-	-	1+	0	0	0	3072	-	10 <sup>5</sup>
3.	0	15,5	-	-	+	4+	0	384	0	128	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>
4.	0	15,5	-	-	+	4+	0	384	1	1280	-	10 <sup>5</sup>
5.	0	10	-	-	+	2+	0	128	0	2048	-	10 <sup>4</sup>
6.	0	14,5	-	-	+	3+	0,5	256	0	3072	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>
7.	0	0	-	-	-	-	0	0	1	1280	-	-
8.	0	16	-	-	+	4+	0	384	1	4096	-	10 <sup>5</sup>
9.	0	15	-	-	+	4+	0	384	0,5	3072	-	10 <sup>6</sup>
10.	0	16	-	-	+	4+	1	384	0	128	-	10 <sup>5</sup>
11.		0			-	-		1		6		10 <sup>3</sup>
12.		14,5			+	3+		384		1280		10 <sup>5</sup>
13.		0			-	-		0		8		-
14.		16,5			+	4+		256		2048		10 <sup>5</sup>
15.		13,5			+	2+		128		3072		10 <sup>4</sup>

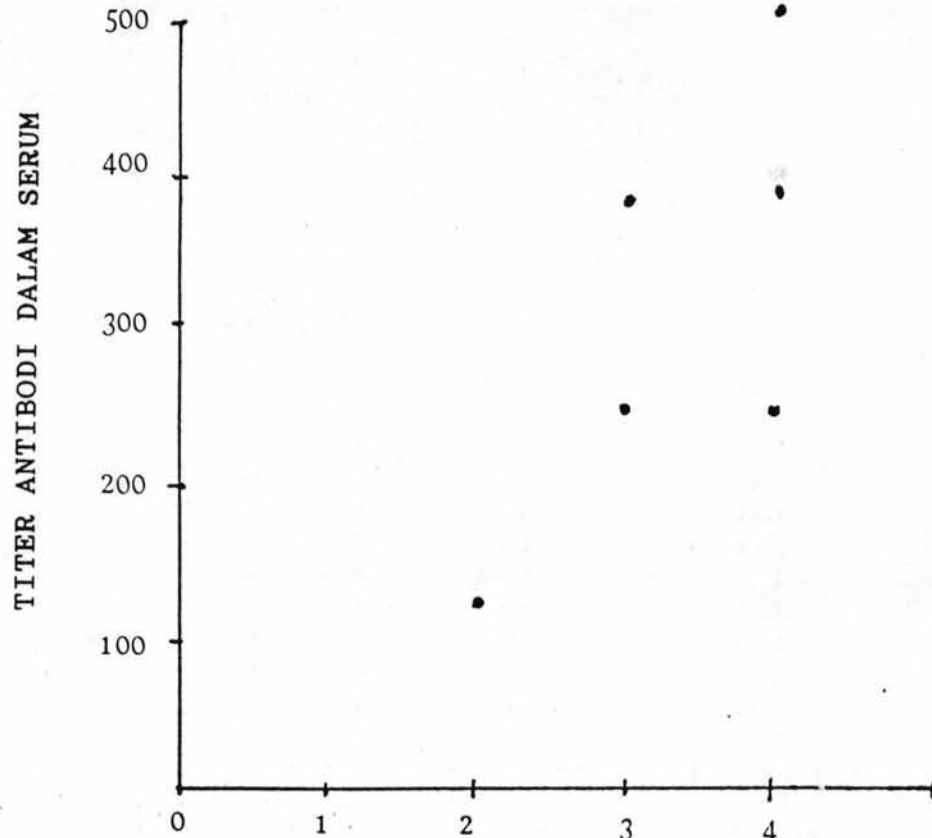
Catatan: Spesimen kontrol 1-10 : spesimen 16GP - 25 GP  
 Spesimen kelola 1-15 : spesimen 1GP - 15GP



Gambar 17A.

DERAJAT FLUORESENSI

DIAGRAM SEBAR YANG MENUNJUKKAN HUBUNGAN ANTARA BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI (EIFA VISUAL) DENGAN SEL PEMBENTUK ANTIBODI SPESIFIK DALAM GINJAL.

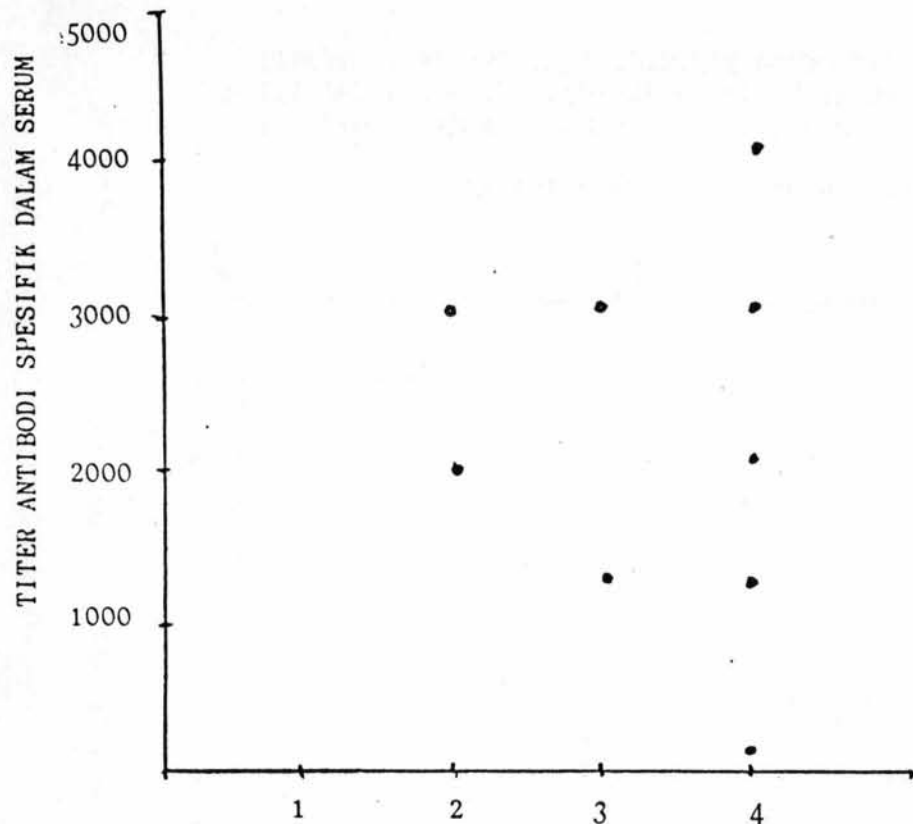


Gambar 17B.

DERAJAT FLUORESENSI

DIAGRAM SEBAR YANG MENUNJUKKAN HUBUNGAN ANTARA BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI (EIFA VISUAL) DENGAN TITER ANTIBODI SPESIFIK DALAM AIR KEMIH.

177

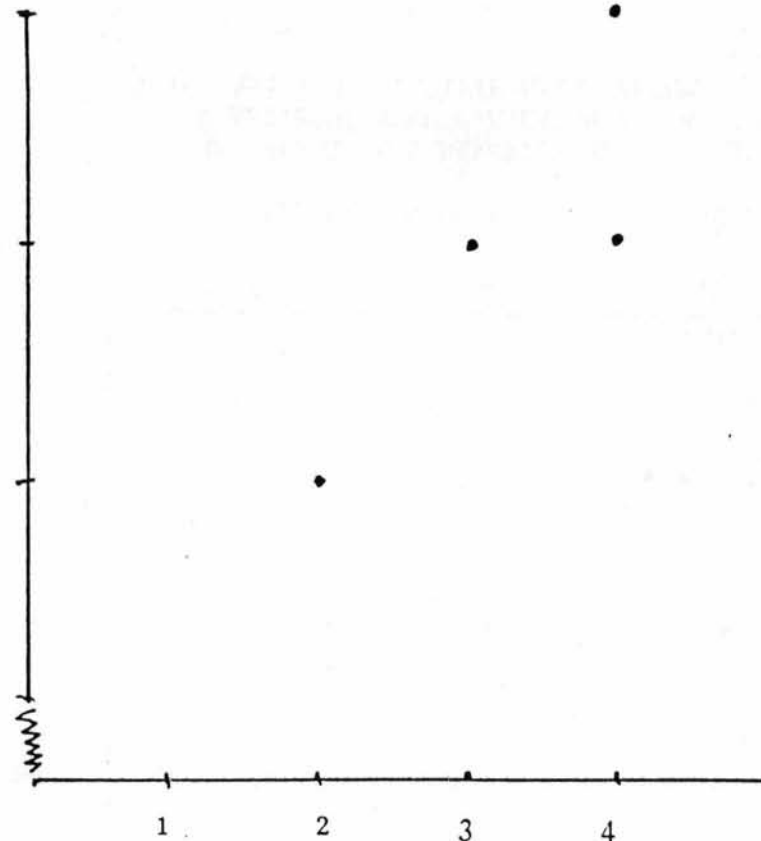


Gambar 18A.

DERAJAT FLUORESENSI

DIAGRAM SEBAR YANG MENUNJUKKAN HUBUNGAN ANTARA BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI (EIFA VISUAL) DENGAN TITER ANTIBODI SPESIFIK DALAM SERUM.

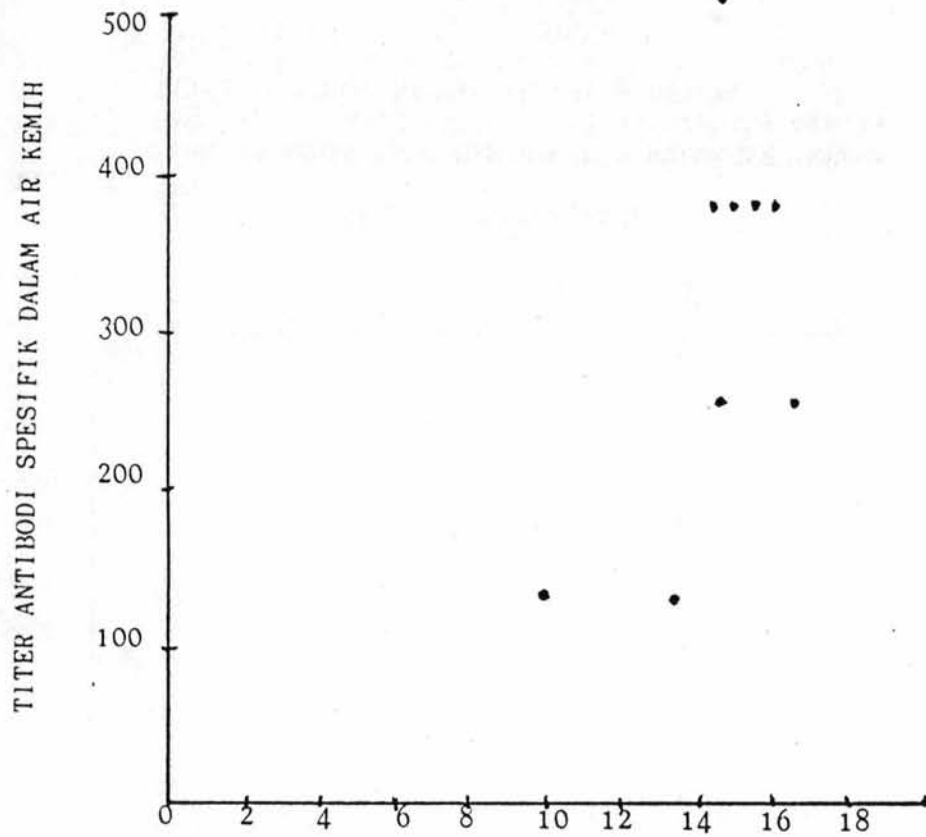
BIAK HITUNG KUMAN DALAM AIR KEMIH



Gambar 18B.

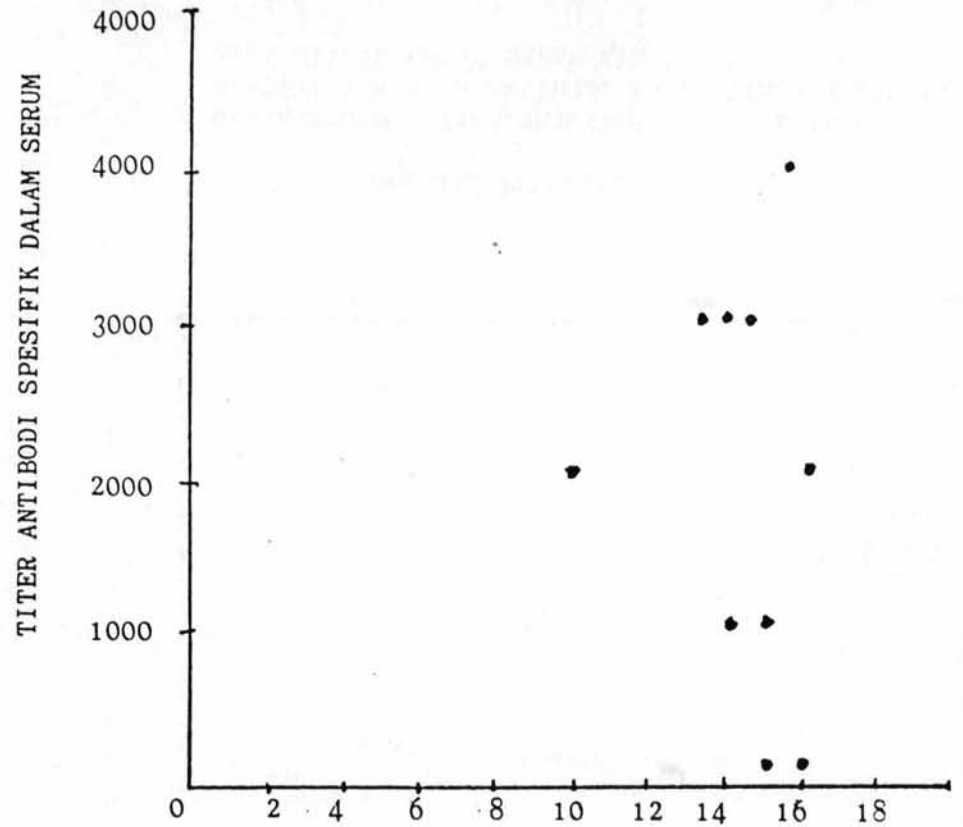
DERAJAT FLUORESENSI

DIAGRAM SEBAR YANG MENUNJUKKAN HUBUNGAN ANTARA BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI (EIFA VISUAL) DENGAN BIAK HITUNG KUMAN DALAM AIR KEMIH.



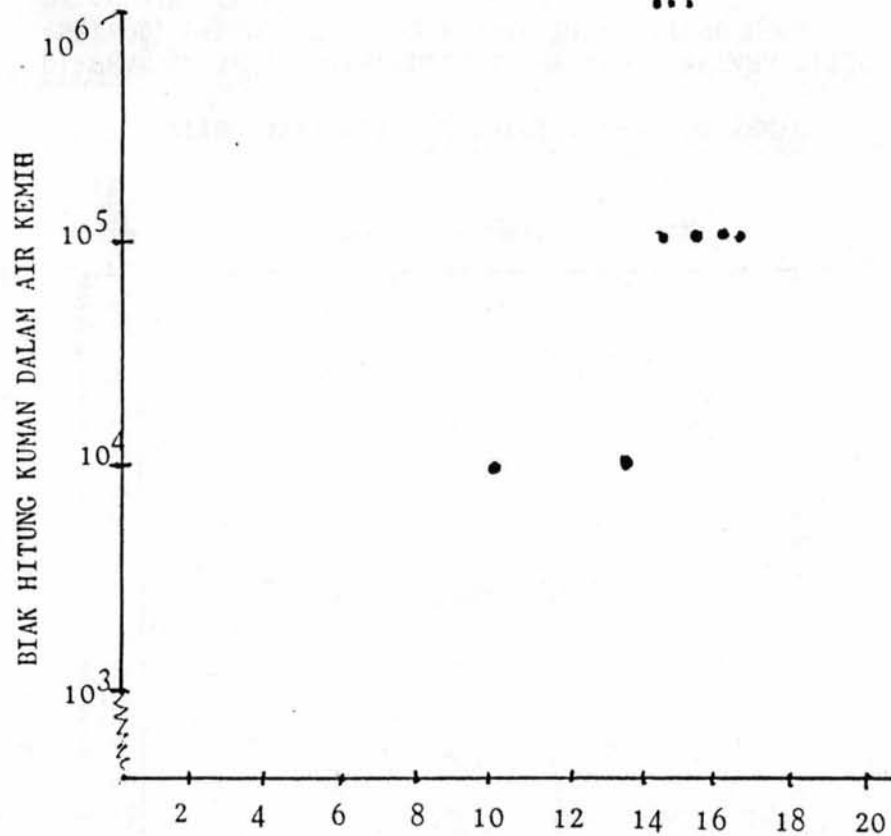
Gambar 19A. SEL PEMBENTUK AB. / 10 LAPANG PANDANG

DIAGRAM SEBAR YANG MENUNJUKKAN HUBUNGAN ANTARA SEL PEMBENTUK ANTIBODI SPESIFIK DALAM GINJAL DENGAN TITER ANTIBODI SPESIFIK DALAM AIR KEMIH.



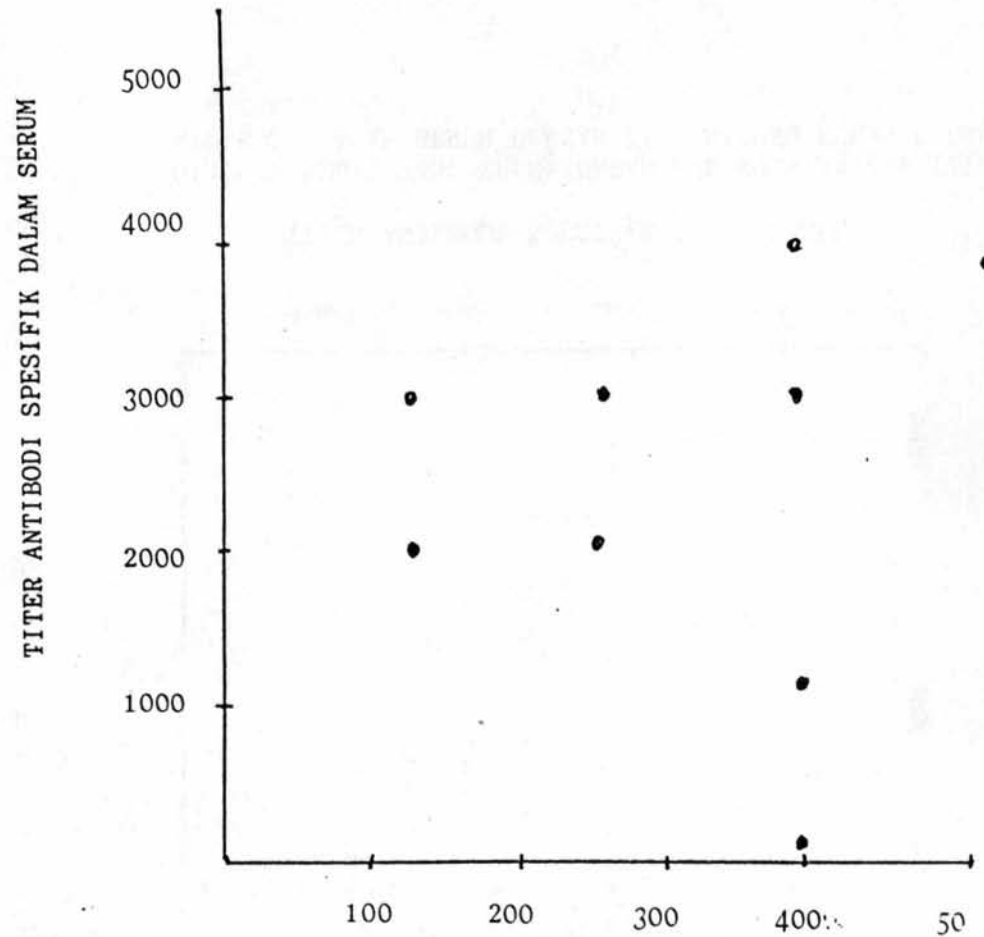
Gambar 19B. SEL PEMBENTUK AB. / 10 LAPANG PANDANG

DIAGRAM SEBAR YANG MENUNJUKKAN HUBUNGAN ANTARA TITER ANTIBODI SPESIFIK DALAM AIR KEMIH DENGAN TITER ANTIBODI SPESIFIK DALAM SERUM.



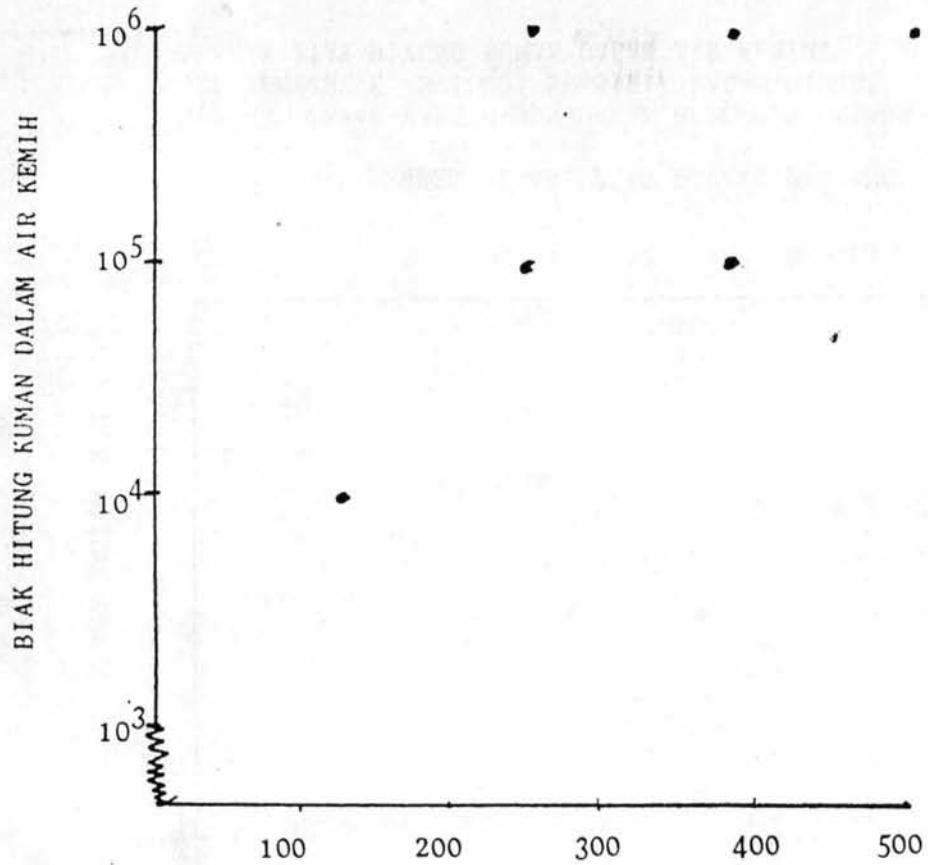
Gambar 20A. SEL PEMBENTUK AB. / 10 LAPANG PANDANG

DIAGRAM SEBAR YANG MENUNJUKKAN HUBUNGAN ANTARA SEL PEMBENTUK ANTIBODI SPESIFIK DALAM GINJAL DENGAN BIAK HITUNG KUMAN DALAM AIR KEMIH.



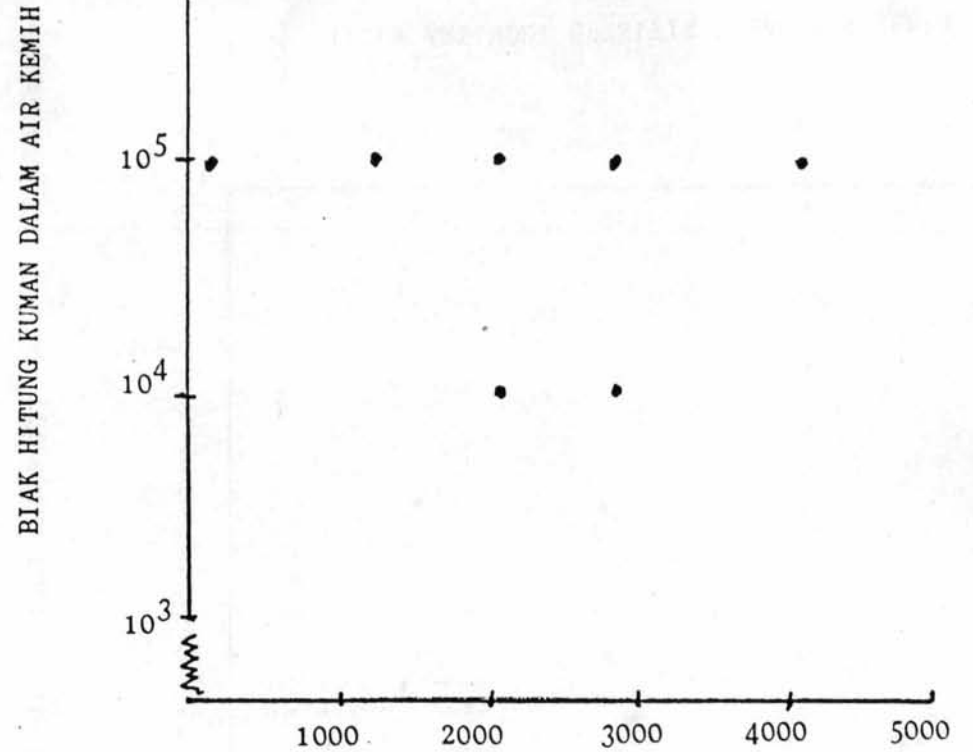
Gambar 20B. TITER ANTIBODI SPESIFIK DALAM AIR KEMIH

DIAGRAM SEBAR YANG MENUNJUKKAN HUBUNGAN ANTARA TITER ANTIBODI SPESIFIK DALAM AIR KEMIH DENGAN TITER ANTIBODI SPESIFIK DALAM SERUM.



Gambar 21A. TITER ANTIBODI SPESIFIKI DALAM AIR KEMIH

DIAGRAM SEBAR YANG MENUNJUKKAN HUBUNGAN ANTARA TITER ANTIBODI DALAM AIR KEMIH DENGAN BIAK HITUNG KUMAN DALAM AIR KEMIH.



Gambar 21B. TITER ANTIBODI SPESIFIK DALAM SERUM

DIAGRAM SEBAR YANG MENUNJUKKAN HUBUNGAN ANTARA TITER ANTIBODI DALAM SERUM DENGAN BIAK HITUNG KUMAN DALAM AIR KEMIH.



Gambar 22. Mikrofoto dari sel pembentuk antibodi spesifik (fluoresensi merah)



Gambar 23. Mikrofoto bakteri berlapis antibodi (fluoresensi hijau)

## BAB V.

### PEMBAHASAN

Hingga sekarang sebagian besar penelitian-penelitian dalam ilmu kedokteran, terutama ilmu kedokteran klinik ditujukan untuk menemukan suatu uji laboratorium baru atau penyempurnaan metoda yang lama dengan tujuan untuk meningkatkan nilai dari uji laboratorium tersebut. Kalau pengembangan ini ditinjau dari sudut kepentingan penderita dan masyarakat pada umumnya, maka uji laboratorium tersebut harus memenuhi:

1. Keterandalan:

Dipandang dari nilai diagnostik dan nilai evaluasi tindak lanjut, uji laboratorium tersebut harus memenuhi persyaratan yang meliputi:

- 1.1. Spesifisitas
- 1.2. Sensitifitas
- 1.3. Reprodusibilitas
- 1.4. Efisiensi



2. Kepraktisan:

Uji laboratorium tersebut harus memenuhi persyaratan  
— menghai:

- 2.1. Reagensia: harus terdapat kontinuitas dalam penyediaan dan kestabilan reagensia yang bersangkutan
- 2.2. Pelaksanaan: mudah dan cepat
- 2.3. Peralatan: tidak membutuhkan peralatan canggih
- 2.4. Biaya: murah
- 2.5. Spesimen: mudah penganbilannya (tidak diperlukan tindakan invasif)

Harapan dari peneliti adalah agar percobaan-percobaan dibawah ini dapat memenuhi persyaratan-persyaratan tersebut diatas, setidaknya sebagian, agar nantinya dapat diterapkan dilaboratorium-laboratorium klinik baik dipusat maupun didaerah, setelah dilakukan uji coba terlebih dahulu diklinik dengan menggunakan spesimen yang berasal dari penderita, oleh karena pada penelitian ini dipergunakan hewan coba tikus putih dari strain Witstar.

## I. PERCOBAAN PENDAHULUAN

Pada percobaan pendahuluan ini dilakukan pengujian beberapa metoda pemeriksaan yang nantinya akan dipergunakan pada percobaan utama.

### 1. DETEKSI SEL PEMBENTUK ANTIBODI SPESIFIK

Pada pemeriksaan sediaan jaringan beradang dengan menggunakan pewarnaan hematoksilin-eosin (H-E), hanya dapat

digunakan untuk menunjukkan bahwa pada daerah tersebut terdapat peradangan, yaitu dengan diketemukannya adanya sel-sel radang disamping adanya sel pembentuk antibodi. Dengan metoda pewarnaan H-E ini (lihat gambar 17) tidak dapat ditentukan apakah sel-sel pembentuk antibodi yang terdapat pada jaringan beradang tersebut spesifik atau tidak terhadap bakteri yang dipergunakan untuk menjangkitkan peradangan.

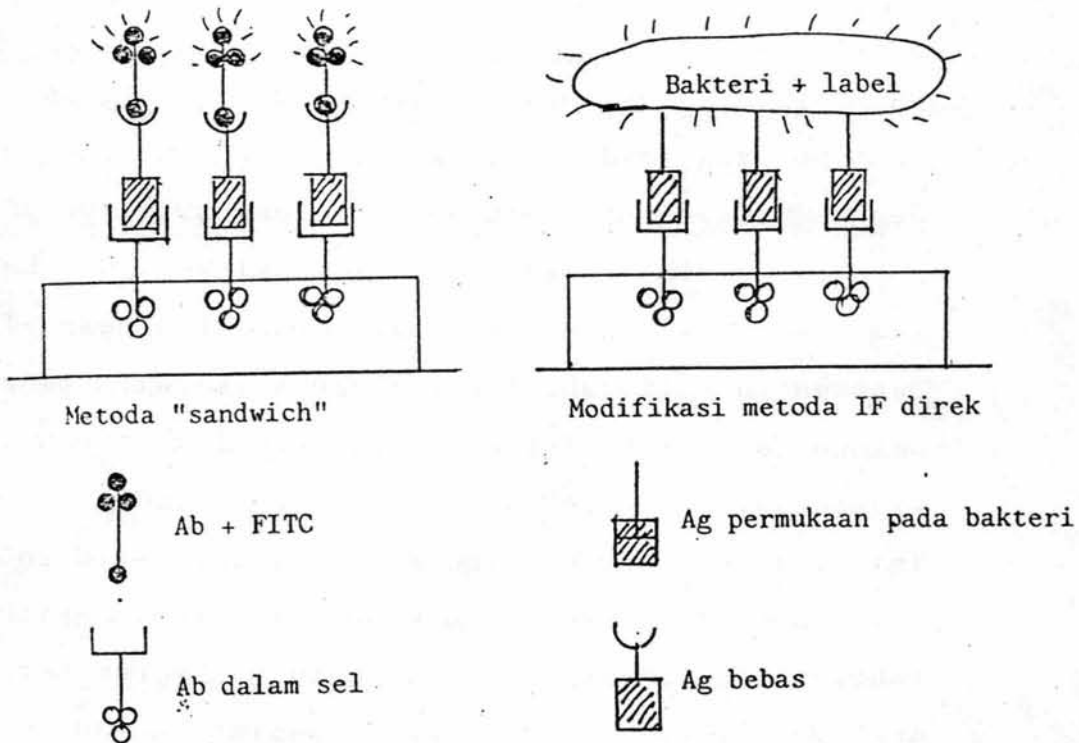
Untuk dapat membuktikan bahwa sel-sel pembentuk antibodi yang terdapat dalam daerah peradangan tersebut adalah sel-sel pembentuk antibodi yang spesifik dapat ditempuh dengan:

1. membuktikan bahwa dalam jaringan beradang terdapat sintesis antibodi dengan cara menggerus jaringan dan kemudian dibuat suspensi dan dari cairan supernatant dilakukan uji serologi untuk membuktikan adanya antibodi spesifik.

2. cara yang kedua adalah membuktikan adanya sel pembentuk antibodi dalam jaringan beradang tersebut yang mengandung antibodi dalam sitoplasmanya, hal ini dapat dilakukan dengan menginkubasikan sediaan yang dibuat dari jaringan beradang dengan FITC conjugated anti rat antiglobulin serum dan kemudian memeriksanya dengan mikroskop fluoresensi. Dengan metoda ini yang dapat dibuktikan hanya adanya antibodi (imunoglobulin) dalam sitoplasma sel, sedangkan spesifisitasnya belum dapat

ditentukan.

Untuk membuktikan bahwa sel pembentuk antibodi yang mengandung antibodi dalam sitoplasma selnya adalah spesifik terhadap kuman yang dipergunakan untuk menjangkitkan peradangan tersebut diatas, dapat dilakukan dengan pewarnaan imunifluoresensi yaitu metoda imunofluoresensi "sandwich" (Roitt 1977).



Gambar 18. Perbedaan antara metoda IF "sandwich" dengan metoda IF direk dengan menggunakan bakteri yang dilabel untuk menentukan adanya antibodi spesifik dalam sel.

Pada dasarnya metoda ini merupakan uji imuno-fluoresensi berlapis ganda (double layered method). Prinsip dari metoda ini adalah sebagai berikut: misalnya kita ingin mengetahui adanya tanggap kebal terhadap polisakarida dari pneumokokus, sediaan yang telah difiksasi, misalnya dari sediaan usap sumsum sternum diinkubasikan dengan antigen polisakarida pneumokokus, kemudian diinkubasikan lagi dengan antiserum spesifik terhadap polisakarida pneumokokus yang telah dilabel dengan FITC.

Lain metoda lagi adalah setelah diinkubasikan dengan polisakarida pneumokokus dilakukan inkubasi dengan antiserum terhadap polisakarida pneumokokus yang dibuat pada kelinci misalnya, dan baru kemudian dilakukan inkubasi terakhir dengan FITC conjugated anti rabbit antiglobulin serum. Dengan metoda sandwich ini antibodi spesifik intrasitoplasma dapat dideteksi, akan tetapi pada metoda ini dipergunakan dua macam antiserum, satu antiserum spesifik terhadap bakteri yang menjangkitkan tanggap kebal tersebut, dan satu antiserum terhadap imunoglobulin (Ig) dari spesies hewan coba yang dipergunakan dan dilabel dengan FITC dan antigen murni.

Pada percobaan yang dilakukan oleh peneliti dipergunakan metoda imunofluoresensi direk dan sebagai detektor dipergunakan sel bakteri homolog yang telah dilabel dengan rhodamin, dan konjugasi ini

mudah dilakukan tanpa harus menentukan kadar dari protein bahan yang akan dilabel dengan fluoro-khrom (ERhod).

Pada suatu percobaan tersendiri dilakukan uji aglutinasi untuk menentukan apakah setelah bakteri dikonjugasi dengan rhodamin masih mempunyai sifat-sifat keantigenannya semula. Dari percobaan ini terbukti bahwa antiserum spesifik masih dapat menyebabkan aglutinasi dari bakteri yang telah dilabel dengan rhodamin.

Pemilihan rhodamin dan bukan FITC untuk melabel E. coli pada percobaan ini didasarkan pada:

- mudah larut dalam aceton yang sekaligus dapat bekerja sebagai bahan untuk fiksasi kuman,
- mudah untuk melakukan pelabelan,
- fluoresensinya relatif lebih tahan lama,
- jarang dipergunakan untuk melabel antisera yang siap pakai yang bisa didapatkan dipasaran.

Reitamo et al. (1979) telah membuktikan bahwa Ig intraseluler telah dapat dibuktikan keberadaannya sejak stadium plasmablast, yaitu stadium diferensiasi yang lebih muda dari sel plasma.

Kalau dalam plasmablast Ig berbentuk gumpalan-gumpalan dan tidak memenuhi sel, maka pada sel plasma Ig terdapat pada seluruh sitoplasmanya, sedangkan inti selnya akan terdesak kesalah satu pol dari sel, hal inilah yang menyebabkan inti sel dari sel plasma memberi kesan letak yang eksen-

tris.

Untuk membuat sediaan yang akan diproses secara imunologik peneliti tidak menggunakan cryostat, akan tetapi menggunakan sediaan yang dibuat dari sayatan jaringan yang telah difiksasi dengan formalin buffer, kemudian dibuat blok parafin, dan setelah dilakukan pemotongan ditempelkan pada gelas objek yang bersih dan telah dilapisi terlebih dahulu dengan suatu larutan yang terdiri dari gelatin dan chromic potassium sulfate (Rowse-Eagle et al., 1981). Menurut peneliti tersebut campuran ini akan bekerja sebagai zat perekat yang dapat menghindarkan terkelupasnya sayatan jaringan setelah diproses dengan trypsin, sedangkan zat tersebut sendiri tidak menyebabkan autofluoresensi. Sebelum dilakukan pewarnaan imunofluoresensi, sediaan diproses dengan trypsin dengan tujuan untuk mencernakan sebagian (partial digestion) dari jaringan yang dibuat sediaan. Dengan melakukan pencernaan sebagian ini hasil pewarnaan imunofluoresensi akan menjadi lebih jelas, oleh karena terjadi penekanan fluoresensi non spesifik dari jaringan sekitarnya yang sering dijumpai apabila menggunakan sediaan yang dibuat dari jaringan yang diproses dengan menggunakan metoda untuk pembuatan sediaan histopatologi (Huang, 1975; 1976; Chabalon et al., 1976; Swoveland and Johnson, 1979; Rowse-Eagle, 1981; Chandler and Gorelkin, 1983). Keuntungan lain dari penggunaan metoda ini dan

bukan diproses dengan cryostat adalah bentuk sel yang terdapat dalam sediaan yang diperiksa tidak mengalami perubahan, dan apa bila diperlukan untuk dilakukan pewarnaan ulang misalnya dengan H-E kalau yang ingin memeriksa susunan selulernya, atau dengan pewarnaan Gram atau lain-lain pewarnaan bakteriologik dengan maksud untuk mendapatkan informasi yang lebih lengkap, tidak mendapat kesulitan untuk mengenali kembali bentukan-bentukan yang terdapat dalam sediaan tersebut.

Keuntungan lain dari pada penggunaan jaringan yang difiksasi dan di-inbed dalam parafin, blok ini dapat disimpan bertahun-tahun, dan kalau pada waktu yang akan datang diperlukan penelitian ulang atau untuk penelitian lain bahan ini masih dapat dipergunakan lagi.

Pada penelitian ini peneliti melakukan pewarnaan ulang dengan metoda pewarnaan Gram dengan tujuan untuk membuktikan bahwa gumpalan-gumpalan yang memberikan fluoresensi merah memang benar bakteri gram negatif yang terdapat pada permukaan dari sel pembentuk antibodi. Pada penelitian ini terbukti bahwa gumpalan yang memberikan fluoresensi merah yang tampaknya seakan-akan terdapat diatas sel yang mengandung Ig (fluoresensi hijau) memang terdiri dari bakteri gram negatif (*Escherichia coli*) yang terikat pada permukaan dari sel pembentuk antibodi. Pada pemeriksaan dengan mikroskop fluoresensi dapat dibuktikan bahwa benda-benda yang

memberikan fluoresensi merah dan fluoresensi hijau tidak terletak pada bidang yang sama, yaitu dengan cara mengganti filter dari mikroskop fluoresensi sehingga secara bergantian akan tampak bahwa fluoresensi merah dan hijau tidak terletak pada bidang optik yang sama, dan ini menunjukkan bahwa kedua benda yang memberikan fluoresensi yang berlainan tersebut tidak terletak pada bidang yang sama. Dengan menggunakan metoda ini peneliti dapat menunjukkan adanya sel pembentuk antibodi spesifik dalam jaringan-jaringan dan peristiwa ini merupakan petunjuk bahwa didaerah yang bersangkutan terdapat pembentukan antibodi lokal. Untuk menghilangkan Ig yang mungkin terdapat diluar sel, Ig ini mungkin merupakan imunoglobulin lokal dan mungkin juga berasal dari darah, sebelum dilakukan pewarnaan imunofluoresensi dicelup terlebih dahulu beberapa waktu kedalam buffer citrat dengan maksud untuk merusak Ig yang terdapat diluar sel. Metoda ini dapat dipergunakan untuk membuktikan secara langsung adanya tanggap kebal humoral lokal, yaitu dengan menemukan sel-sel pembentuk antibodi spesifik pada tempat tersebut. Dari percobaan ini juga terbukti bahwa pada tempat-tempat dimana terjadi peradangan akan ikut dijangkitkan tanggap kebal lokal, dalam hal ini tanggap kebal humoral lokal.

Pada percobaan pendahuluan ini untuk mendapatkan jari-



ngan beradang peneliti melakukan penyuntikan pada pangkal paha tikus dengan suspensi kuman *Escherichia coli* O6:K13:H1 yang telah dimatikan dengan cara pembekuan dan pencairan (freezing and thawing) beberapa kali sampai seluruh kuman mati (dicek dengan cara biakan). Dari jaringan beradang ini dibuat sediaan untuk pemeriksaan histopatologis dan pemeriksaan imunofluoresensi, dan sebagai kontrol digunakan sediaan yang dibuat dari jaringan normal. Pada pemeriksaan histopatologis dari jaringan normal tidak terdapat penumpukan sel-sel radang, sedangkan serabut-serabut sel ototnya tidak terpisah-pisah (lihat gambar 17a). Kalau sediaan dari jaringan yang beradang yang kita periksa, terdapat penumpukan sel-sel radang pada tempat penyuntikan disertai dengan pemisahan serabut-serabut jaringan otot (lihat Gb.17 ).

Pada pemeriksaan imunofluoresensi dari sediaan jaringan normal tidak terdapat sel-sel yang mengandung imunoglobulin dalam selnya (fluoresensi hijau). Hasil pemeriksaan ini dapat dilihat pada tabel 4. Pada pemeriksaan imunofluoresensi dari sediaan yang dibuat dari jaringan beradang dapat dilihat pada tabel 5, yang tiap 10 lapang pandang yang diperiksa terdapat  $27,4 \pm 0,6992$  sel yang mengandung Ig intrasitoplasma (fluoresensi hijau), 83,21 % dari jumlah ini pada permukaannya terdapat gumpalan bakteri (fluoresensi merah) dan ini diperkuat pembuktiannya dengan melakukan pewarnaan ulang menurut Gram.

Sisanya, 16,79 % yang tidak memberikan fluoresensi

merah dan pada pewarnaan ulang dengan cara Gram memang tidak mengandung gumpalan kuman pada permukaannya. Kelompok sel ini mungkin merupakan sel pembentuk antibodi yang mempunyai spesifisitas lain dari pada sel-sel yang memberikan fluoresensi hijau dan fluoresensi merah (spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1).

Kalau hasil pengamatan imunofluoresensi jaringan normal dibandingkan hasil imunofluoresensi dari jaringan beradang (lihat tabel 4 dan 5) terdapat perbedaan yang bermakna dari jumlah sel yang dalam sitoplasmanya mengandung Ig (fluoresensi hijau) dan pada permukaannya terdapat gumpalan bakteri (fluoresensi merah). Peristiwa ini dapat dijelaskan sebagai berikut: dalam jaringan normal meskipun mungkin terdapat sel pembentuk antibodi yang mengandung Ig dalam sitoplasmanya (antiserum yang dipergunakan adalah antiserum yang spesifik terhadap Ig tikus), akan tetapi Ig yang terdapat dalam sel tersebut bukan antibodi yang dapat bereaksi secara spesifik dengan E.coli O6:K13:H1, sehingga pada permukaan dari sel pembentuk antibodi tersebut tidak terdapat gumpalan sel bakteri (ERhod) yang dapat memberikan fluoresensi merah. Kalau jumlah sel pembentuk antibodi tiap 10 lapang pandang tersebut diatas dibandingkan antara kelompok kontrol (jaringan normal) dan kelompok perlakuan atau kelola (jaringan beradang), dengan uji U dari Mann-Whitney menunjukkan  $P < 0,001$ , hal ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna baik pada derajat kemaknaan 0.05 maupun pada 0,01 (lihat tabel 4A).

Pada tabel yang sama dipaparkan juga adanya sel pembed-

tuk antibodi yang tidak mengandung Ig intrasitoplasma, akan tetapi terdapat bakteri yang memberikan fluoresensi pada permukaannya, peristiwa ini dapat terjadi karena adanya ikatan nonspesifik, sebab kedua kelompok tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $P > 0.05$  dengan uji U dari Mann-Whitney).

Kalau yang dibandingkan adalah sel yang mengandung Ig intrasitoplasma akan tetapi tidak mengandung gumpalan bakteri pada permukaannya atau sel yang mengandung Ig intrasitoplasma disertai dengan gumpalan bakteri pada permukaannya, antara kelompok kontrol dengan kelompok kelola, hasil uji U dari Mann-Whitney menunjukkan  $P < 0,001$ , artinya bahwa antara kedua kelompok tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna, baik pada derajat kemaknaan 0,05 maupun pada 0,01 (tabel 4B dan 4C).

Untuk menguji spesifisitas dari metoda pemeriksaan ini, pada dilakukan percobaan pendahuluan ini dilakukan pra-inkubasi dengan bakteri *E. coli* O6:K13:H1 (homolog) dan *E. coli* heterolog.

Kalau kita tinjau susunan antigen dari *E. coli*, ternyata bahwa *Escherichia coli* memiliki tiga grup antigen utama, dan satu Enterobacteriaceae Common Antigen (ECA). Ketiga grup antigen utama terdiri dari antigen O (terdapat 150 jenis antigen O), paling sedikit 50 macam antigen H atau antigen flagela dan jumlah yang sama antigen K atau antigen kapsuler. Ketiga macam antigen ini yang menentukan serotip dari *E. coli* (Kunin, 1979). Antibodi yang terbentuk dalam sel pembentuk an-

antibodi ini terutama ditujukan terhadap antigen somatik O.

Antigen O merupakan antigen yang potent, karenanya pada percobaan-percobaan baik imunisasi aktif maupun infeksi eksperimental dengan *E. coli*, antibodi terhadap antigen O yang terbentuk dengan kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan antibodi anti-K (Thomas et al., 1975). Kalau dipandang dari sudut protektivitasnya, maka antibodi anti-K mempunyai daya proteksi yang lebih besar dari pada antibodi anti-O (Kaijser et al., 1983).

Reaksi antara antibodi intrasitoplasma dengan *E. coli* merupakan reaksi antara antibodi dengan antigen somatik-O yang terdapat pada permukaan dari sel bakteri.

Metoda untuk mendeteksi sel pembentuk antibodi spesifik merupakan uji imunologik yang spesifik. Dengan melakukan pra-inkubasi dari jaringan sebelum dilakukan inkubasi dengan ERhod ( tujuannya adalah melakukan blocking), dapat dipelajari spesifitas dari uji imunofluoresensi ini. Pada tabel 6 dipaparkan hasil percobaan blocking, dengan melakukan pra-inkubasi dengan bakteri homolog (tanpa label rhodamin). Hasil percobaan dengan memberikan perlakuan berupa pra-inkubasi dengan kuman homolog dibandingkan dengan hasil tanpa perlakuan ini (lihat tabel 4 dan 5), maka jumlah sel yang mengandung Ig intraseluler (baik yang menunjukkan adanya gumpalan bakteri maupun yang tidak menunjukkan tidak, menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna dengan uji U dari Mann-Whitney seperti dipaparkan dalam tabel 8 ( $P > 0,05$ ).

Akan tetapi kalau yang kita bandingkan jumlah sel yang memiliki Ig intraseluler dan mengandung gumpalan kuman pada permukaannya terdapat perbedaan yang bermakna dengan  $P < 0,001$  dengan uji U dari Mann-Whitney (tabel 9).

Peristiwa ini membuktikan bahwa reaksi antara sel pembentuk antibodi spesifik dengan ERhod merupakan reaksi spesifik, sama halnya dengan reaksi antara sel pembentuk antibodi dengan E. coli homolog. Ikatan antara antibodi yang terdapat dalam sel dengan bakteri E. coli O6:K13:H1 sebenarnya merupakan reaksi antara antibodi dengan antigen yang terdapat pada permukaan dari sel bakteri. Reaksi ini seperti halnya reaksi antara antigen dengan antibodi pada umumnya merupakan reaksi keseimbangan, apabila antigennya ditambah, sebagian dari antibodi yang telah terikat dengan antigen akan mengalami disosiasi dan mengadakan ikatan dengan anti-



gen yang baru. Oleh karena ikatan antara antibodi yang terdapat dalam sel pembentuk antibodi yang terikat pada bakteri sebenarnya merupakan ikatan antara sejumlah molekul antibodi dengan sejumlah antigen yang terdapat pada permukaan dari bakteri, sehingga ikatan antara sel pembentuk antibodi melalui antibodi yang terdapat dalam sel dengan antigen-antigen yang terdapat pada permukaan sel bakteri tidak dapat terlepas seluruhnya bila terdapat tambahan sel bakteri, hingga apabila sel pembed-

tuk antibodi sudah terikat dengan bakteri tanpa label, sulit untuk dapat melepaskan ikatan ini dan untuk kemudian terikat kembali pada sel bakteri yang berlabel rhodamin, meskipun reaksi antara sel pembentuk antibodi dengan E coli merupakan reaksi keseimbangan.

Apabila dilakukan pra-inkubasi dengan kuman E. coli heterolog, ikatan antara sel pembentuk antibodi spesifik dengan bakteri ini tidak berlangsung, sehingga kalau jumlah sel pembentuk antibodi yang memberikan fluoresensi hijau dan fluoresensi merah dari kelompok perlakuan seperti yang dipaparkan pada tabel 11, pada analisis dengan uji U dari Mann-Whitney memberikan hasil  $P > 0,10$ , hal ini menunjukkan bahwa antara keduanya tidak terdapat perbedaan berwarna. Pada tabel 12 yang membandingkan sel memberikan fluoresensi hijau tanpa fluoresensi merah menunjukkan  $P = 0,05$ , jadi antara keduanya tidak terdapat perbedaan bermakna baik pada derajat kemaknaan 0,05 maupun 0,01.

Jadi bila dilakukan pra-inkubasi dengan kuman E. coli heterolog tidak terjadi bloking.

Hal ini merupakan bukti bahwa reaksi sel pembentuk antibodi dengan ERhod merupakan reaksi spesifik.

Kesimpulan yang dapat ditarik dari percobaan uji spesifitas ini adalah bahwa sel pembentuk antibodi yang terdapat pada jaringan beradang merupakan sel pembentuk antibodi yang spesifik dan ditujukan terhadap bakteri yang menjangkitkan peradangan.

Jadi metoda ini dapat dipergunakan untuk mendeteksi

adanya tanggap kebal lokal.

## 2. BACT-EIFA VISUAL

Seperti telah diuraikan dalam bab prosedur penelitian, EIFA merupakan suatu modifikasi dari ELISA (Engvall and Perlman, 1972; Forghani et al. 1980; Edler et al., 1982; Yolken and Leister, 1982) dan perbedaan utama dengan ELISA adalah dalam hal pemakaian substratnya. Pada uji ELISA sebagai enzim yang sering dipergunakan adalah alkali phosphatase, sedangkan p-nitrophenyl phosphate (PNPP) sebagai substratnya dan pembacaan hasilnya dilakukan dengan menggunakan spectrophotometer, sedangkan pada EIFA dengan menggunakan enzim yang sama akan tetapi sebagai substratnya dipergunakan 4-methylumbelliferyl phosphate (MUP) dan pembacaan produk akhir berupa bahan yang memberikan fluoresensi dilakukan pembacaan dengan menggunakan fluorometer.

EIFA merupakan metoda immunoassay yang sangat peka, oleh karena konsentrasi produk fluoresensi yang sangat rendah sudah dapat dideteksi oleh fluorometer. Kurang populernya metoda EIFA, terutama bagi kalangan laboratorium klinik, disebabkan karena mahalnya harga fluorometer. Menurut Yolken & Leister (1982), kepekaan untuk mendeteksi antigen dengan EIFA pada inkubasi 10 menit mencapai 10 pg antigen tiap mlnya, sedangkan dengan ELISA dengan masa inkubasi yang sama kepekaannya 640 pg per mlnya. Kepekaan dari uji ELISA ini dapat ditingkatkan menjadi 10 pg per mlnya apabila waktu inkubasinya ditingkatkan menjadi 240 menit. Jadi keuntun-

gan dari penggunaan substrat fluoresen ini adalah dapat mendeteksi dalam konsentrasi yang rendah dan dalam waktu yang pendek.

Forghani dkk. (1980) telah berhasil mengembangkan metoda EIFA VISUAL yang pembacaannya dilakukan dengan menggunakan kotak cahaya (light box) yang menggunakan sinar UV sebagai sumber cahaya (sinar UV dengan gelombang panjang antara 310 - 340 nm, maksimum 350 nm). Dianjurkan menggunakan self filtering black light blue fluorescence tube.

Menurut peneliti diatas, yang membandingkan uji EIFA dengan uji ELISA mengemukakan bahwa:

- (i) substrat fluorogenik memberikan titer akhir yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan titer akhir dengan menggunakan substrat khromogenik
- (ii) hasil pembacaan visual dari EIFA memberikan titer 2 tingkat pengenceran lebih rendah (pengenceran dua kali lipat) bila dibandingkan dengan hasil bacaan dengan menggunakan fluorometer
- (iii) dengan cara pembacaan visual, serum-serum yang pada pengenceran rendah yang memberikan derajat fluoresensi yang sama, pada pengenceran tinggi belum tentu derajat fluoresnsinya sama.
- (iv) tidak dianjurkan pembacaan dengan cara visual dari hasil ELISA karena sulit membedakan perbedaan warna antara rekasi yang kuat dengan reaksi yang lebih lemah.

Untuk menentukan batas negatip dari pada BACT-EIFA



VISUAL ini dilakukan percobaan dengan membandingkan hasil antara BACT-ELISA yang pembacaannya dilakukan dengan menggunakan spectrophotometer dengan pembacaan BACT-ELISA secara visual (lihat tabel 15). Seperti telah disebutkan diatas, Forghani dkk. (1980) tidak menganjurkan untuk melakukan pembacaan dari hasil ELISA dengan menggunakan kotak cahaya, kalau yang diharapkan adalah untuk menentukan titer dari antibodi yang terkandung didalamnya. Pembacaan ELISA secara visual hanya dapat dilakukan untuk menentukan hasil pemeriksaan secara kualitatif (positip atau negatip). Dari percobaan ini didapatkan hasil bahwa derajat fluoresensi 1+ terletak dibawah nilai cutoff value (0,0118) sedangkan 2+ berada diatas cutoff value, sehingga peneliti menarik kesimpulan bahwa EIFA VISUAL dinyatakan positip apabila derajat fluoresensinya => 2+.

Jadi kalau uji EIFA VISUAL ini dipergunakan untuk menentukan titer dari suatu serum, maka dinyatakan sebagai berikut:

Titer dari suatu anti serum dengan uji EIFA VISUAL adalah kebalikan dari pengenceran tertinggi yang masih memberikan derajat fluoresensi 2+ .

Keuntungan penggunaan BACT-ELISA dan BACT-EIFA dibandingkan dengan uji ELISA dan EIFA adalah bahwa pada kedua uji yang disebut pertama dipergunakan sel bakteri utuh sebagai antigen, sedangkan pada kedua uji terakhir dipergunakan antigen murni yang ditempelkan pada fase

padatnya. Seperti telah kita ketahui bahwa prosedur untuk memurnikan antigen adalah cukup rumit, membutuhkan waktu lama dan mahal beayanya, lagi pula tidak semua laboratoriuun klinik dapat melakukannya, sedangkan apabila dipergunakan sel bakteri utuh sebagai pengganti antigen, persiapannya adalah sederhana sekali, cukup dengan melakukan pencucian dari bakteri.

Menurut Elder dkk (1982), keuntungan-keuntungan dari penggunaan sel bakteri utuh untuk uji ELISA adalah:

- mudah cara melakukan coating dari solid phase untuk mendapatkan lapisan yang rata, sehingga hasil pembacaannya akan memberikan reproduibilitas yang tinggi antara hasil satu sumur dengan hasil sumur lainnya
- hasil dari pada coating mudah diperiksa dengan mikroskop fase kontras dan tampak merupakan suatu lapisan sel (monolayer).
- dianjurkan untuk menggunakan microplate yang terbuat dari polystyrene karena kuman-kuman baik yang bersifat gram positif maupun gram negatif mempunyai daya adherens yang lebih kuat dari pada yang terbuat dari polyvinyl
- BACT-ELISA mempunyai prospek baik untuk dipergunakan dilaboratorium-laboratorium klinik karena mudahnya prosedur pelapisan mikroplate, dan juga

untuk pemakaian pada penelitian-penelitian karena mempunyai kepekaan yang cukup tinggi

- BACT-ELISA ini dapat dipergunakan untuk typing dari antigen somatik, antigen kapsuler maupun antigen flageler

Karena faktor-faktor tersebut diatas, peneliti menggunakan metoda BACT-EIFA VISUAL yang merupakan gabungan dari BACT-ELISA dan EIFA VISUAL. Selain dari pada itu karena pada pielonefritis yang disebabkan oleh E. coli yang terbentuk terutama terhadap antigen somatik O.

Untuk menentukan reproduibilitas dari uji BACT-EIFA VISUAL, pada percobaan pendahuluan ini dilakukan dalam 48 pengulangan (4 X 12 pengulangan). Hasil dari pada percobaan ini dipaparkan dalam tabel 16. Kalau kita perhatikan tabel 16 ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

Pengenceran:      Reprodusibilitas:      Variasi koefisien:

1:256 - 1:1024	85,43 % (4+)	0 - 9,25 %
1:2048	83,33 % (3+)	13,29 %
1:4096	75,00 % (2+)	24,66 %
1:8192	70,83 % (1+)	60,84 %
1:16384	83,33 % (0)	100 %

Pada penenceran 1: 8192, variasi koefisien sebesar 60,84 %

sebenarnya disebabkan karena hasil pengulangan pada pengenceran ini adalah:

reaksi positif (2+) : 4

reaksi negatif (1+ dan 0) : 44

Jadi berdasarkan ini variasi koefisiennya sebenarnya hanya 25,78 %.

Pada pengenceran 1:16384, sebenarnya semuanya memberikan reaksi negatif ( 1+ : 8 dan 0 : 40 ), jadi sebenarnya variasi koefisiennya adalah 0 %.

Kalau kita lihat secara keseluruhan, reproduibilitas dari uji ini sampai dengan derajat fluoresensi 2+ (derajat fluoresensi paling rendah yang masih dinyatakan positif) sebesar => 75,00 % , menurut peneliti reproduibilitas ini cukup tinggi untuk suatu pemeriksaan yang pembacaannya dilakukan dengan mata biasa.

## II. PENELITIAN UTAMA

### 1. Bakteri berlapis antibodi artifisial:

Tujuan utama dari percobaan ini adalah untuk mempelajari adanya kemungkinan bahwa pembentukan BBA selain berlangsung dalam jaringan ginjal yang mengalami peradangan dapat juga terbentuk dalam air kemih. Disamping itu juga dipelajari faktor-faktor yang mungkin mempengaruhi berhasilnya mendeteksi pembentukan BBA dalam air kemih. Untuk keperluan ini dilakukan suatu percobaan dengan menggunakan model pembuatan BBA dalam -laboratorium dengan menginkubasikan suspensi bakteri dalam la-

rutan antibodi spesifik.

Menurut Thomas et al. (1974, 1975) dan Jones et al. (1974, 1977) yang mengadakan penelitian adanya BBA dalam air kemih penderita, dan percobaan dari Smith and Hand (1973), Smith et al. (1973, 1974, 1977), Smith and Kaijser (1976) pada hewan coba, menyatakan bahwa pembentukan BBA terjadi dalam jaringan ginjal yang mengalami peradangan.

Yang menjadi pertanyaan adalah: Mengapa BBA ini terbentuk pada pielonefritis dan prostatitis, sedangkan pada sistitis tidak ?

Stamm et al. (1981) berdasarkan percobaannya dengan menggunakan metoda ELISA telah membantah pendapat dari peneliti-peneliti terdahulu, dan menyatakan bahwa pembentukan BBA dapat pula terjadi dalam air kemih. Karena adanya perbedaan pendapat tersebut diatas, peneliti mengadakan percobaan pembuatan BBA in vitro (BBA artifisial) dan mempelajari pengaruh faktor-faktor jumlah kuman dan kadar antibodi yang terdapat pada sistim tersebut.

Hasil dari percobaan ini dipaparkan dalam tabel 26 sampai 44.

Konsentrasi dari antibodi dalam larutan yang bersangkutan terbukti mempunyai pengaruh terhadap jumlah BBA yang terbentuk sedangkan jumlah BBA yang terdapat dalam cairan yang diperiksa menentukan apakah hasil deteksi positif ataukah negatif. Pada pemeriksaan dengan EIFA VISUAL pengenceran serum  $10^3$  kali memberikan derajat fluoresensi 1+, sedangkan batas positif teren-

dah seperti telah diuraikan pada penelitian pendahuluan adalah 2+ (tabel 26). Dengan pemeriksaan ELISA, pada pengenceran 1000 kali memberikan nilai absorbens antara 0,0081 - 0,0092 dan nilai absorbens ini masih dibawah cutoff value dari nilai absorbens serum normal (lihat tabel 14). Dari percobaan ini dapat ditarik kesimpulan bahwa untuk percobaan pembuatan BBA secara artifisial harus dipergunakan pengenceran paling tinggi 100 kali. Pada percobaan untuk mempelajari pengaruh dari konsentrasi kuman pada hasil uji deteksi BBA dilakukan percobaan pembuatan BBA in vitro dengan suspensi kuman mulai  $10^3$  sampai  $10^8$  CFU per ml. Hasil dari pada percobaan ini dapat dilihat pada tabel 27. Pada suspensi yang mengandung kuman  $< 10^5$  CFU per ml dengan uji ELISA 45% memberikan hasil positif, dengan EIFA 50% sedangkan dengan IF 87,5% positif. Stamm et al. (1981) dengan ELISA mendapatkan hasil kurang dari 50% , sedangkan dengan uji IF mendapatkan hasil 85% positif. Pada konsentrasi kuman  $\Rightarrow 10^5$  hasil uji deteksi BBA dengan menggunakan metoda ELISA dan EIFA VISUAL memberikan hasil positif 100 %, sedangkan dengan uji IF hasilnya 96,25 % positif. Jadi hasil yang didapat oleh peneliti tidak berbeda dengan hasil percobaan Stamm et al. (1981).

Pada analisis secara statistik didapatkan hasil sebagai berikut (tabel 27 - 43):

Pada konsentrasi kuman  $10^3$  antara ELISA dan EIFA tidak terdapat perbedaan dalam kepekaannya dengan  $P > 0,99$ , sedangkan antara ELISA / EIFA dengan IF didapatkan P

antara 0,014, jadi pada derajat kemaknaan 0,05 uji IF lebih peka secara bermakna, akan tetapi tidak pada alfa = 0,01.

Konsentrasi bakteri:	pemeriksaan yang dibandingkan:	uji McNemar:
10 <sup>3</sup>	ELISA - EIFA	P > 0,99
	ELISA - IF	P: 0,014
	EIFA - IF	P: 0,014
10 <sup>4</sup>	ELISA - EIFA	P: 0,40
	ELISA - IF	P: 0,082
	EIFA - IF	P: 0,27
10 <sup>5</sup>	ELISA - EIFA	P > 0,99
	ELISA - IF	P: 0,079
	EIFA - IF	P: 0,079
10 <sup>6</sup> - 10 <sup>8</sup> :	ELISA - EIFA	P > 0,99
	ELISA - IF	P > 0,99
	EIFA - IF	P > 0,99

Pada konsentrasi => 10<sup>4</sup> diantara ketiganya secara statistik tidak terdapat perbedaan secara bermakna dalam kepekannya baik pada derajat kepekaan 0,01 maupun 0,05. Seperti telah diuraikan pada tinjauan kepustakaan, pada ISK didapatkan hasil biak hitung > 10<sup>5</sup> malahan sering didapatkan biak hitung sekitar 10<sup>8</sup> sampai 10<sup>10</sup> per ml air kemih (Kunin, 1979). Kurang pekanya uji EIFA VISUAL pada konsentrasi kuman < 10<sup>3</sup> CFU per ml tidak perlu

menyebabkan penolakan pemakaian ELISA dan EIFA VISUAL untuk spesimen-spesimen klinik.

Pada konsentrasi kuman  $\Rightarrow 10^4$  CFU per ml antara uji ELISA, EIFA dan IF tidak terdapat perbedaan pada alfa = 0,05 dan 0,01 (uji McNemar).

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa pada konsentrasi kuman  $< 10^4$  uji IF secara umum memang mempunyai kepekaan yang lebih tinggi dibandingkan dengan uji ELISA dan EIFA VISUAL, hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut: pada uji ELISA dan uji EIFA dibutuhkan konsentrasi enzim minimum untuk dapat mengadakan hidrolisa dari substrat, dan analoginya tentunya dibutuhkan jumlah BBA minimum tertentu untuk mencapai ini, sedangkan pada uji IF jumlah BBA yang sedikitpun sudah dapat dideteksi. ELISA merupakan uji kuantitatif sedangkan EIFA VISUAL merupakan uji semi kuantitatif, dan uji IF merupakan uji kualitatif. Adanya hubungan antara uji ELISA dan uji EIFA VISUAL dengan pengenceran antiserum dapat menyebabkan terjadinya hasil negatif semu yang disebabkan karena jumlah antibodi yang kurang sehingga menyebabkan tidak cukup dihasilkan BBA yang dapat menghidrolisa substrat sehingga dapat dideteksi baik pada ELISA maupun pada EIFA VISUAL. Konsentrasi bakteri juga mempunyai korelasi dengan nilai absorbens dan derajat fluoresensi. Jumlah bakteri yang rendah juga akan menyebabkan terjadi negatif palsu, sebab BBA yang terbentuk tidak tersedia cukup untuk menghidrolisa substansi yang ada pada sistem tersebut.

Menurut Stamm et al. (1981) uji IF dapat menyebabkan



positip palsu apabila terdapat kuman *S. aureus* dan sebagian dari *Klebsiella* sp dapat menyebabkan hasil positip palsu.

Hasil positip palsu yang disebabkan oleh *S. aureus* tanpa adanya antiserum terhadap *E. coli* homolog, disebabkan karena terjadinya ikatan antara protein A dari *S. aureus* dengan IgG (melalui fragmen Fc) yang terdapat dalam antiserum. Seperti kita ketahui antiserum yang dipergunakan adalah dari fraksi IgG. Positip palsu yang disebabkan oleh sebagian dari *Klebsiella* sp hingga sekarang belum dapat dijelaskan. Peneliti sendiri menemukan hal yang sama (data tidak dipublikasi) pada percobaan mendeteksi BBA dari air kemih wanita hamil. Menurut Stamm et al. (1981) strain *Klebsiella* yang dapat menyebabkan positip palsu dengan uji IF, tidak menyebabkan hasil positip palsu dengan uji ELISA. Peristiwa ini belum dapat dijelaskan oleh peneliti tersebut.

Ratner et al. (1981) berdasarkan hasil penelitiannya mengemukakan bahwa konsentrasi antibodi dalam air kemih ikut menentukan dapat tidaknya BBA dideteksi dalam air kemih. Pada penelitian ini meskipun terdapat antibodi dan jumlah kuman yang tinggi ( $< 10^5$ ) dalam air kemihnya akan tetapi BBA tidak cukup terbentuk karena kadar antibodi tersebut belum memenuhi syarat untuk terbentuknya cukup BBA hingga dapat dideteksi, seperti halnya pada sistitis.

Dari percobaan ini telah berhasil diuji kebenaran dari hipotesis yang pertama.

## 2. PIELONEFRITIS ASENDENS EKSPERIMENTAL

Pada hari ke-14 pasca inokulasi dilakukan pengambilan air kemih dan darah untuk pemeriksaan-pemeriksaan:

- air kemih: penentuan titer antibodi, BBA dan biak hitung kuman
- serum : penentuan kadar antibodi

Setelah dilakukan pengambilan darah melalui pungsi jantung sampai hewan coba mati, dilakukan otopsi untuk mengambil ginjal dari tikus tersebut. Dari kelompok kontrol diambil ginjal kiri, sedangkan dari kelompok perlakuan diambil kedua ginjalnya.

Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan ginjal secara histopatologik, oleh karena peneliti berpendapat bahwa telah banyak sekali dilakukan penelitian-penelitian oleh peneliti terdahulu, seperti yang telah dilakukan oleh Smith and Hand (1973), Smith et al. (1973, 1974, 1977), Smith and Kaijser (1976) pada hewan coba, menyatakan bahwa pembentukan BBA terjadi dalam jaringan ginjal yang mengalami peradangan.

Berdasarkan hasil penelitian peneliti-peneliti tersebut pada penelitian ini peneliti mengambil patokan bahwa hasil deteksi BBA yang positif dengan menggunakan uji IF dari sedimen air kemih hewan coba tersebut untuk menentukan diagnosis pielonefritis.

## 2.1. Pemeriksaan bakteri berlapis antibodi dalam air kemih:

Pemeriksaan bakteri berlapis antibodi:

Hasil pemeriksaan BBA dapat dilihat pada tabel 45. Dari tabel tersebut dapat kita tarik kesimpulan bahwa antara uji IF dan uji EIFA VISUAL untuk mendeteksi adanya BBA dalam air kemih menunjukkan tidak adanya perbedaan. Pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa hasil uji deteksi dengan IF yang negatif, dengan uji EIFA VISUAL hasilnya juga negatif ( $= < 1+$ ).

Seperti telah diuraikan diatas pada pembahasan mengenai pembuatan BBA in vitro yang menunjukkan bahwa pada konsentrasi kuman  $< 10^5$  CFU per ml EIFA VISUAL menunjukkan kepekaan 50% sedangkan ELISA 45%. Akan tetapi pada konsentrasi ini secara statistik (McNemar) antara ketiganya tidak terdapat perbedaan bermakna (kecuali pada konsentrasi kuman  $10^3$ ). Pada konsentrasi kuman  $= 10^5$  CFU per ml, uji EIFA Visual menunjukkan hasil 100%, sedangkan uji IF hanya mencapai 96,25%. Mengingat bahwa pada ISK umumnya biak hitung kuman  $> 10^7$  CFU per ml, sehingga meskipun pada konsentrasi kuman yang rendah ( $< 10^5$  CFU per ml kepekaan EIFA VISUAL turun sampai 50% tidak akan menyebabkan terjadinya false negatif.

Untuk pengetrapannya dalam laboratorium klinik perlu dilakukan percobaan / penilaian kembali dengan menggunakan spesimen-spesimen yang berasal dari penderita. Akan tetapi pada percobaan ini sudah dapat dibuktikan bahwa metoda EIFA VISUAL dapat dipergunakan untuk mendeteksi adanya BBA dalam air kemih binatang yang tersangka menderita pielonefritis (hasil uji deteksi IF

positip), dan dengan metoda ini tidak dibutuhkan mikroskop fluoresensi yang harganya cukup mahal, sedangkan pada uji EIFA VISUAL hanya dibutuhkan kotak cahaya yang dapat kita buat sendiri dan sebagai sumber cahaya dipergunakan sinar UV gelombang panjang yang tidak berbahaya. Forghani et al. (1980) dan Yolken and Leister (1982) pada penelitiannya berhasil menarik kesimpulan bahwa uji EIFA mempunyai kepekaan yang lebih tinggi dari pada uji ELISA, terutama dengan masa pengeringan yang pendek (10 menit). Menurut peneliti tersebut, pada masa inkubasi tersebut kepekaan untuk mendeteksi antigen dari uji EIFA 10 pg, sedangkan dengan uji ELISA 640 pg. Kalau kita perhatikan tabel 27, pada suspensi yang mengandung kuman  $< 10^5$  CFU per ml dengan uji ELISA 45% memberikan hasil positip, dengan EIFA 50% sedangkan dengan IF 87,5% positip. Pada konsentrasi kuman  $=> 10^5$  hasil uji deteksi BBA dengan menggunakan metoda ELISA dan EIFA VISUAL memberikan hasil positip 100 %, sedangkan dengan uji IF hasilnya 96,25 % positip. Jadi hasil yang didapat oleh peneliti tidak berbeda dengan hasil percobaan Stamm et al. (1981).

Menurut Thomas et al. (1974, 1975) Jones et al. (1974, 1975), yang kemudian penemuan ini diperkuat oleh Everett et al. (1975), Fairley et al. (1967; 1971) Geurtler et al. (1977) Harris et al. (1976; 1978), Kaijser et al. (1978; 1983), dan Smith et al. (1974; 1976; 1977) berdasarkan percobaan-percobaannya dengan menggunakan hewan coba berpendapat bahwa adanya BBA dalam air kemih dapat digunakan untuk menentukan

lokalisasi ISK.

Menurut Smith et al. (1974; 1976; 1977) berdasarkan percobaannya dengan menggunakan hewan coba berpendapat bahwa dalam jaringan ginjal yang mengalami infeksi selain terjadi pembentukan antibodi lokal, dan pembentukan BBA dalam ginjal, adanya antibodi spesifik dalam konsentrasi yang cukup dalam air kemih hewan coba tersebut tidak dapat menyebabkan terbentuknya BBA. Menurut peneliti sendiri, pembentukan BBA dapat terjadi dalam air kemih dan dapat dideteksi apabila kadar antibodi dan kandungan bakteri dalam air kemihnya cukup (berdasarkan percobaan pembentukan BBA artificial).

## 2.2. Penentuan titer antibodi dalam serum dan air kemih:

Penentuan titer antibodi spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dilakukan dengan menggunakan uji BACT-EIFA VISUAL. Pada tabel 46 dipaparkan hasil dari pada uji tersebut. Dari kelompok kontrol didapatkan titer antibodi spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam serum dan dalam air kemih titernya negatif atau lemah sekali (titer antibodinya antara 0 - 1,0). Pada kelompok perlakuan, titer antibodi spesifik dalam air kemih pada 4 spesimen antara 0 - 1, sedangkan pada 11 spesimen lainnya titer antibodinya antara 128 - 512. Titer antibodi dalam serum pada 2 spesimen 6 dan 8, 2 spesimen dengan titer 128, sedangkan 11 spesimen lainnya titernya antara 1280 - 4096.

Menurut Smith et al. (1973) IgG tidak pernah diketemukan dalam air kemih tikus normal dan juga tidak dalam

air kemih binatang yang telah mendapat vaksinasi dengan bakteri yang telah dimatikan, akan tetapi dapat diketemukan dalam air kemih tikus yang menderita pielonefritis. Selain itu menurut peneliti yang sama antibodi dari klas IgG yang terdapat dalam air kemih binatang yang menderita pielonefritis mempunyai kecepatan gerak elektroforesis yang lebih besar dari pada antibodi serum dari klas Ig yang sama. Sifat-sifat lainnya seperti berat molekul tidak berbeda, afinitas terhadap antigen juga tidak berbeda.

### 2.3. Biak hitung kuman dalam air kemih:

Hasil dari biak hitung kuman dapat dilihat pada tabel 45. Pada tabel ini dapat dilihat bahwa spesimen-spesimen nomor 7GP dan 13GP hasil BHK-nya negatip, sedangkan spesimen nomor 2GP dan 11GP  $10^3$  CFU tiap ml, sedangkan pemeriksaan dari air kemih kelompok kontrolnya semua negatip, hal ini disebabkan karena pengambilan air kemih pada hewan coba tersebut dilakukan dengan menggunakan kateter.

### 2.4. Deteksi sel pembentuk antibodi spesifik:

Hasil pengamatan dengan mikroskop fluoresensi dari sediaan yang berasal dari ginjal kelompok kontrol dan kelompok kelola dapat dilihat pada tabel 47 dan 50. Dari kelompok kelola terdapat 4 spesimen dari 15 (26,67%) spesimen menunjukkan jumlah sel pembentuk antibodi spesifik (yang memberikan fluoresensi hijau dan

fluoresensi merah) negatif, sedangkan sisanya yaitu 11 (73,33%) spesimen menunjukkan adanya sel pembentuk antibodi spesifik sebanyak  $\Rightarrow$  12 tiap 10 lapang pandang pada salah satu atau kedua ginjalnya. Kalau spesimen yang memberikan hasil pengamatan 0 sel pembentuk antibodi spesifik tiap 10 lapang pandang dikeluarkan dari perhitungan (keempatnya memberikan hasil negatif dengan uji BBA-IF sedangkan BHK  $\leq 10^3$  tiap ml), seperti dapat dilihat pada tabel 48, ginjal kiri mempunyai rata-rata (mean)  $15,2727 \pm 1,1037$  dan ginjal kanan  $14,0909 \pm 3,806$  sedangkan pada tabel 49 jumlah sel pembentuk antibodi rata-ratanya adalah  $14,68 \pm 1,799$  tiap 10 lapang pandang. Pada tabel 53 dapat dilihat perbandingan hasil pengamatan imunofluoresensi dari sediaan dari kelompok kontrol dan dari ginjal dari kelompok kelola. Apakah sel pembentuk antibodi yang mengandung Ig dalam sitoplasmanya semuanya merupakan sel pembentuk antibodi spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dengan metoda yang digunakan ini tidak dapat dibuktikan. Sel-sel pembentuk antibodi yang dalam sitoplasmanya mengandung Ig dan yang pada permukaannya terdapat gumpalan bakteri merupakan sel pembentuk antibodi spesifik terhadap E. coli homolog, sebab apabila sediaan setelah dilakukan pengamatan dengan mikroskop fluoresensi kemudian dilakukan pewarnaan ulang dengan metoda Gram menunjukkan bahwa pada permukaan sel pembentuk antibodi yang menunjukkan adanya fluoresensi merah pada permukaan selnya terdapat kuman-kuman gram negatif, sedangkan pada sel-sel pembentuk antibodi yang hanya mengandung Ig dalam sito-

plasmanya dan tidak menunjukkan adanya fluoresensi merah, setelah dilakukan pewarnaan ulang dengan metoda gram tidak menunjukkan adanya kuman kuman gram negatif pada permukaannya, jadi sel-sel ini tidak spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1.

#### 2.5. Perbandingan hasil pemeriksaan dengan kelima metoda:

Kalau kita perhatikan tabel 89L dalam lampiran dapat kita lihat hasil dari masing-masing pemeriksaan dari spesimen yang berasal dari ke 15 ekor tikus dari kelompok kelola. Kalau kita perhatikan tabel-tabel 45- 63 dapat ditarik kesimpulan bahwa hasil pemeriksaan titer antibodi dalam serum tampaknya tidak ada hubungan dengan hasil pemeriksaan lainnya, atau dengan lain perkataan dapat dinyatakan sebagai: tampaknya tidak ada hubungannya dengan ada tidak infeksi dalam ginjal. Hal ini terbukti setelah dilakukan uji korelasi dari Spearman. Hasil uji korelasi ini dapat dilihat pada tabel 64.

2.5.1. Dari tabel 54 dan 64 dapat dilihat hasil analisa korelasi rank antara hasil deteksi bakteri ber-lapis antibodi dengan hasil deteksi sel pembentuk antibodi yang sangat bermakna dengan P antara 0,0005 sampai 0,005. Jadi hubungan ini sangat bermakna baik pada derajat kemaknaan 0,05 maupun pada 0,01. Dari hasil analisa ini telah teruji kebenaran dari hipotesis ketiga.



2.5.2. Dari tabel 55 dapat ditarik kesimpulan bahwa antara uji bakteri berlapis antibodi dan titer Ab air kemih terdapat korelasi dengan  $P = 0,016$  jadi hubungan ini bermakna pada derajat kemaknaan  $0,05$  akan tetapi tidak pada  $0,01$ .

2.5.3. Hasil analisis korelasi dari Spearman antara bakteri berlapis antibodi dengan titer antibodi spesifik dalam serum adalah  $P > 0,10$ . Jadi antara keduanya tidak terdapat korelasi baik pada  $\alpha = 0,01$  maupun  $0,05$  (lihat tabel 56 dan 64).

Berdasarkan hasil analisa pada 2.5.2. dan 2.5.3. hipotesis kedua telah berhasil diuji kebenarannya.

2.5.4. Analisis Korelasi antara uji deteksi sel pembentuk antibodi spesifik dengan titer antibodi dalam serum dapat dilihat pada tabel 59, dengan  $P > 0,10$  jadi hubungannya tidak bermakna.

2.5.5. Analisis korelasi rank antara hasil deteksi sel pembentuk antibodi dengan biak hitung kuman dalam air kemih menghasilkan  $P > 0,10$ , menunjukkan bahwa korelasinya tidak bermakna.

2.5.6. Dari tabel 64 dapat pula ditarik kesimpulan bahwa antara hasil uji antibodi dalam serum menunjukkan tidak adanya korelasi dengan hasil uji lainnya

(semua metoda pemeriksaan) dengan  $P > 0,10$ .

2.5.7. Antara hasil uji titer antibodi dalam air kemih menunjukkan adanya korelasi bermakna pada alfa = 0,05 akan tetapi tidak pada alfa = 0,01 dengan uji bakteri berlapis antibodi, sedangkan dengan hasil uji biak hitung kuman menunjukkan adanya korelasi yang kuat dengan  $P < 0,0005$ .

2.5.8. Antara hasil uji bakteri berlapis antibodi dan hasil uji biak hitung kuman terdapat korelasi yang kuat dengan  $P = 0,0043$ . (lihat tabel 57).

Dari hasil analisis uji korelasi ini dapat ditarik kesimpulan bahwa untuk mendeteksi adanya infeksi ginjal dapat dilakukan pemeriksaan-pemeriksaan: deteksi sel pembentuk antibodi spesifik dalam ginjal (hanya dapat dikerjakan pada hewan coba), uji deteksi bakteri berlapis antibodi dari air kemih atau menentukan titer antibodi spesifik dalam air kemih bersama dengan biak hitung kuman dalam air kemihnya.

Ketiga macam pemeriksaan tersebut mempunyai dasar yang sama, yaitu adanya pembangkitan tanggap kebal humoral lokal dalam ginjal.

Miller & North (1971) yang mempelajari kinetika seluler dari tanggap kebal humoral pada pielonefritis eksperimental, berpendapat bahwa apabila terjadi bakteriemi pada waktu dilakukan inokulasi secara langsung keginjal, dapat juga dibangkitkan tanggap kebal umum, bukan

hanya lokal dalam ginjal dan ini dapat juga terjadi pada inokulasi melalui uretra apabila terjadi hubungan pielo-venus, akan tetapi ini tidak selalu terjadi apabila inokulasi intrauretral dilakukan dengan hati-hati. Terjadinya hubungan pielo-venus ini diakibatkan karena pecahnya cabang-capang dari pielum sebagai akibat besarnya refluks yang terjadi, misalnya pada waktu melakukan inokulasi melalui uretra diberikan inokulum terlalu besar dengan tekanan yang tinggi. Peristiwa ini dapat menjelaskan mengapa kadang-kadang terdapat paralelisme antara titer antibodi dalam air kemih, adanya BBA dalam air kemih, dan sel pembentuk antibodi dalam ginjal dengan titer antibodi dalam serum. Menurut peneliti yang sama terdapat kesepadanan antara bertambahnya sel-sel pembentuk antibodi dalam ginjal dengan meningkatnya kadar antibodi dalam air kemih.

Smith et al. (1977) pada penelitiannya dengan menggunakan kelinci sebagai hewan coba mengemukakan bahwa antara adanya BBA dalam air kemih berjalan sejajar dengan adanya infeksi dalam ginjal, dan juga berjalan sejajar dengan bangkitnya tanggap kebal dalam ginjal. Meningkatnya titer antibodi dalam serum diketemukan beberapa hari lebih dini dari pada diketemukannya BBA dalam air kemih, sedangkan adanya antibodi dalam air kemih diketemukan 4 hari setelah berhasil dideteksi adanya BBA dalam air kemih. Dari hasil penelitiannya disimpulkan bahwa diketemukannya BBA dalam air kemih mempunyai korelasi dengan adanya pembentukan antibodi

lokal dalam ginjal, dan tidak mempunyai korelasi dengan antibodi dalam serum.

Menurut Smith & Hand (1973) dalam keadaan tidak ada infeksi, IgG tidak pernah diketemukan dalam air kemih, sedangkan IgA-sc dapat diketemukan dalam air kemih binatang normal. Menurut mereka, IgG dari serum tidak dapat menembus epitel ginjal, sedangkan IgG lokal yang mempunyai kecepatan gerak elektroforesis lebih cepat dari pada IgG serum dapat menembus epitel ginjal dan dapat dideteksi dalam air kemih.

Smith et al. (1973) mengemukakan bahwa pada infeksi dari kandung kemih hanya terdapat pembentukan antibodi dari kelas IgA-sc dan tidak pernah diketemukan antibodi dari kelas IgG. Pendapat ini disangkal oleh Ratner et al. (1981) yang berdasarkan hasil penelitiannya menyatakan bahwa pada sistitis terjangkit juga tanggap kebal lokal yang ditandai dengan adanya sel-sel limfosit dalam jaringan kandung kemih. Menurut peneliti yang sama antibodi yang bertanggung jawab terhadap pembentukan BBA adalah IgG dan spesifik terhadap antigen O (Smith et al., 1973; 1977; Smith, 1977; Smith and Kaijser, 1976) Jadi berdasarkan hasil penelitian dari peneliti dan hasil penelitian peneliti-peneliti terdahulu dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi antara BBA dalam air kemih, kadar antibodi dalam air kemih dan adanya sel pembentuk antibodi spesifik dalam ginjal yang kesemuanya ini merupakan manifestasi dari adanya tanggap kebal humoral lokal dalam ginjal.

Selain dari pada itu pada penelitian ini dapat pula

ditarik kesimpulan bahwa penentuan BBA baik dengan metoda IF maupun dengan metoda EIFA VISUAL dan penentuan titer antibodi dalam air kemih dengan metoda BACT-EIFA VISUAL dapat digunakan sebagai cara diagnostik "non-ivasive" untuk menentukan lokalisasi infeksi saluran kemih. Satu-satunya infeksi sekitar saluran kemih yang perlu disingkirkan adalah infeksi dari prostat, sedangkan metoda untuk mendiagnosa ini tidak sulit dilakukan.

## BAB VI . KESIMPULAN

Dari hasil percobaan-percobaan dan analisa statistik yang dilakukan pada penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

### 1. PENELITIAN PENDAHULUAN:

- 1.1. Metoda imunofluoresensi direk dengan menggunakan bakteri berlabel rhodamin dapat dipergunakan untuk mendeteksi sel pembentuk antibodi spesifik dalam jaringan radang.
- 1.2 Uji deteksi sel pembentuk antibodi merupakan uji laboratorium yang spesifik dan dapat dipergunakan untuk menentukan adanya tanggap kebal humoral lokal.
- 1.3. Dari hasil uji spesifisitas dengan cara melakukan pra-inkubasi dengan kuman homolog tanpa label rhodamin didapatkan hasil sebagai berikut:
  - (i) perbandingan antara jumlah sel pembentuk antibodi spesifik yang mengandung Ig intrasitoplasma dengan gumpalan bakteri yang memberikan fluoresensi merah

pada permukaannya dari kelompok tanpa pra-inkubasi dan dengan pra-inkubasi terdapat penurunan sebesar 67,50% ( $P < 0,001$  dengan uji U dari Mann-Withney).

- (ii) perbandingan antara jumlah sel pembentuk antibodi dengan Ig intrasitoplasma tanpa gumpalan kuman yang memberikan fluoresnsi pada permukaannya dari kelompok tanpa pra-inkubasi dan dengan pra-inkubasi terdapat peningkatan sebesar 384,44% ( $P < 0,001$  dengan uji U dari Mann-Withney).

1.4. Dari hasil uji spesifisitas dengan cara melakukan pra-inkubasi dengan kuman heterolog tanpa label rhodamin didapatkan hasil sebagai berikut:

- (i) perbandingan antara jumlah sel pembentuk antibodi yang mengandung Ig intrasitoplasma dengan gumpalan bakteri yang memberikan fluoresensi merah pada permukaannya dari kelompok tanpa pra-inkubasi dan dengan pra-inkubasi hanya terdapat pebedaan sebesar 1,30% ( $P > 0,10$  dengan uji U dari Mann-Withney)
- (ii) perbandingan antara jumlah sel pembentuk antibodi dengan Ig intrasitoplasma tanpa gumpalan kuman yang memberikan fluoresnsi pada permukaannya dari kelompok tanpa pra-inkubasi dan dengan pra-inkubasi terdapat perbedaan sebesar 0,95% ( $P = 0,05$  dengan uji U dari Mann-Withney).

1.5. Uji BACT-EIFA VISUAL dapat dipergunakan untuk menentukan titer antibodi spesifik dalam serum maupun dalam

air kemih.

- 1.6. Hasil uji BACT-EIFA VISUAL menunjukkan reipitabilitas yang tinggi dengan variasi koefisien sebesar 9,25%.
- 1.7. Hasil uji serum baku positip yang dilakukan pada 4 macam pengenceran ( 1:1024, 1:2048, 1:4096 dan 1:8192) memberikan hasil sebagai berikut:  
variasi koefisien pada keempat pengenceran antara 9,63% - 38,60% dan pada uji statistik dengan McNemar memberikan  $P < 0,01$ . Jadi pada pengenceran-pengenceran tersebut diatas bahwa pada masing-masing pengencerak hasil uji reipitabilitasnya menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan hasil pada 24 pemngulangan dengan  $P < 0,01$  dengan uji McNemar.

## 2. PENELITIAN UTAMA:

- 2.1. BBA yang terbentuk apabila bakteri berada dalam suatu larutan yang mengandung antibodi spesifik dengan kadar tertentu (BBA artifisial) dapat dideteksi apabila keduanya berada dalam jumlah tertentu.  
(Kebenaran hipotesa ke 1 telah teruji)
- 2.2. Uji IF untuk menguji BBA yang dibuat in vitro akan memberikan hasil deteksi positip diatas 85% apabila:
- titer antibodi spesifik  $> 10^2$
  - konsentrasi bakteri  $\Rightarrow 10^3$  CFU per ml.
- 2.3. Uji ELISA dan EIFA VISUAL untuk mendeteksi BBA yang



dibuat in vitro akan memberikan hasil positif diatas 85% apabila:

- a. titer antibodi  $> 10^2$
- b. konsentrasi bakteri  $\Rightarrow 10^5$  CFU per ml.

2.4. Keuntungan dari uji IF dibandingkan dengan uji ELISA atau uji EIFA VISUAL untuk mendeteksi adanya BBA adalah bahwa uji IF dapat mendetek dalam keadaan dimana jumlah BBA rendah.

2.5. Keuntungan dari uji EIFA VISUAL untuk mendeteksi adanya BBA adalah bahwa uji ini tidak membutuhkan alat yang mahal untuk observasinya. Meskipun uji EIFA VISUAL mempunyai kepekaan yang lebih rendah dari uji IF pada konsentrasi kuman yang lebih rendah dari  $10^5$  CFU per ml, penggunaan uji EIFA VISUAL masih dapat dipertanggung jawabkan karena pada penderita-penderita ISK pada umumnya memberikan hasil BHK yang lebih tinggi dari  $10^5$  CFU per ml.

2.6. Pengamatan hasil EIFA VISUAL untuk mendeteksi adanya BBA jauh lebih cepat dari pada observasi hasil IF dengan mikroskop fluoresensi.

2.7. Hasil uji korelasi dari kelima macam pemeriksaan yaitu SPS (sel pembentuk antibodi spesifik), BBA (bakteri berlapis antibodi), Ab-s (titer antibodi dalam serum), Ab-ak (titer antibodi dalam air kemih), dan hasil BHK (biak hitung kuman) dari kelompok kelola dengan hasil

deteksi BBA dengan IF positif adalah:

I. Uji korelasi antara:

- BBA dengan SPS
- BBA dengan BHK
- Ab-ak dengan BHK

pada analisis statistik dengan uji rank dari Spearman menghasilkan  $P < 0,005$ , artinya bahwa uji-uji korelasi tersebut menunjukkan adanya korelasi positif yang kuat.

II. Uji korelasi antara:

- BBA dengan Ab-ak
- SPS dengan Ab-ak

Pada analisis statistik dengan uji korelasi rank dari Spearman menghasilkan  $P$  antara  $0,025 - 0,05$  ( $P < 0,05$ ). Jadi kelompok ini menunjukkan adanya korelasi yang kurang kuat bila dibandingkan dengan kelompok I.

III. Uji korelasi antara:

- BBA dengan Ab-s
- SPS dengan BHK
- SPS dengan Ab-s
- Ab-s dengan BHK
- Ab-ak dengan Ab-s

Pada analisis statistik dengan uji korelasi rank dari Spearman menghasilkan  $P > 0,10$  artinya, bahwa hasil uji korelasi tersebut tidak menunjuk-

kan adanya korelasi yang sangat lemah.

Dari hasil analisis ini dapat dinyatakan bahwa hipotesis ke 2 dan 3 dapat diterima.

2.9. Terbukti pada penelitian-penelitian bahwa terdapat korelasi yang positif antara BBA dalam air kemih dengan Ab-ak dan SPS, yang merupakan manifestasi dari adanya respons imun humoral lokal.

## BAB VII

### MANFAAT DARI HASIL PENELITIAN

Manfaat dari hasil penelitian-penelitian ini adalah :

1. Umum:

Dari hasil-hasil penelitian ini uji-uji Bact-EIFA VISUAL, diharapkan dapat digunakan dilaboratorium-laboratorium klinik terutama unuk daerah-daerah dimana sarana dan prasarananya terbatas.

2. Khusus:

Metoda pemeriksaan EIFA VISUAL untuk mendeteksi adanya BBA yang dipergunakan untuk menentukan lokalisasi dari infeksi saluran kemih diharapkan dapat diterapkan dilaboratorium-laboratorium klinik terutama yang tidak memiliki mikroskop fluoresensi yang harganya cukup mahal setelah dilakukan uji coba pada penderita-penderit.

## BAB VIII

### RINGKASAN

#### RINGKASAN

Telah dikembangkan uji laboratorium eksperimental untuk menentukan adanya korelasi antara diketemukannya bakteri berlapis antibodi dalam air kemih dengan timbulnya tanggap kebal humoral lokal dalam ginjal, dalam hal ini ditandai oleh adanya sel plasma spesifik dalam jaringan ginjal yang mengalami peradangan dan adanya antibodi spesifik dalam air kemih.

Dibawah ini akan diuraikan dengan singkat metoda-metoda yang dipergunakan pada penelitian ini.

#### 1. Penelitian pendahuluan:

##### 1.1. Uji Deteksi Sel Pembentuk Antibodi Spesifik:

Dalam jaringan yang mengalami peradangan, dengan uji IF direk dapat diketemukan:

- Sel pembentuk antibodi spesifik yang mengandung Ig intrasitoplasma sebanyak rata-rata  $27,4 \pm 0,6992$  (dalam jaringan kontrol hanya terdapat 0,80) sel tiap 10 lapang pandang.
- Sel plasma yang mengandung Ig intrasitoplasma dan pada permukaannya terdapat gumpalan bakteri yang memberikan fluoresensi sebanyak rata-rata  $22,8 \pm 1,0328$  (

dalam jaringan kontrol tidak terdapat) tiap 10 lapang pandang.

- Dari hasil uji spesifisitas dengan cara memberikan perlakuan pra-inkubasi dengan kuman homolog dan kuman heterolog tanpa dilabel terlebih dahulu dapat ditarik kesimpulan bahwa uji ini merupakan uji laboratorium yang spesifik.

## 1.2 Uji EIFA VISUAL:

Metoda ini digunakan untuk menentukan titer antibodi dan menunjukkan reipitabilitas yang cukup baik dengan koefisien variasi maksimum 25,78%.

## 2. Penelitian Utama:

### 2.1. Pembentukan Bakteri Berlapis Antibodi in vitro:

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

2.1.1. Bakteri berlapis antibodi dapat terbentuk in vitro jika terdapat antibodi spesifik dan kuman yang cukup.

2.1.2. Uji EIFA VISUAL dapat dipergunakan untuk menentukan adanya pembentukan bakteri berlapis antibodi.

### 2.2. Pielonefritis asendens eksperimental:

Dari 15 ekor tikus yang mendapat inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1, 11 ekor memberikan hasil deteksi BBA dengan uji IF positif sedangkan sisanya 4 ekor hasil deteksi BBA negatif.

Uji laboratorium yang dilakukan pada percobaan ini adalah:

- Deteksi SPS dari jaringan ginjal,
- Deteksi adanya BBA dalam air kemih,
- Penentuan titer antibodi dalam air kemih,
- Penentuan titer antibodi dalam serum, dan
- Biak hitung kuman dari air kemih.

2.2.1. Hasil uji korelasi dari kelima macam pemeriksaan yaitu SPS (sel pembentuk antibodi spesifik), BBA (bakteri berlapis antibodi), Ab-s (titer antibodi dalam serum), Ab-ak (titer antibodi dalam air kemih), dan hasil BHK (biak hitung kuman) dari kelompok kelola dengan hasil deteksi BBA dengan IF positif adalah:

I. Uji korelasi antara:

- BBA dengan SPS
- BBA dengan BHK
- Ab-ak dengan BHK

pada analisa statistik dengan uji rank dari Spearman menghasilkan  $P < 0,005$ , artinya bahwa uji-uji korelasi tersebut menunjukkan adanya korelasi positif yang kuat.

II. Uji korelasi antara:

- BBA dengan Ab-ak
- SPS dengan Ab-ak

Pada analisa statistik dengan uji korelasi rank dari Spearman menghasilkan  $P$  antara  $0,025 - 0,05$  (

$P < 0,05$ ). Jadi kelompok ini menunjukkan adanya korelasi yang kurang kuat bila dibandingkan dengan kelompok I.

III. Uji korelasi antara:

- BBA dengan Ab-s
- SPS dengan BHK
- SPS dengan Ab-s
- Ab-s dengan BHK
- Ab-ak dengan Ab-s

Pada analisa statistik dengan uji korelasi rank dari Spearman menghasilkan  $P > 0,10$  artinya, bahwa hasil uji korelasi tersebut tidak menunjukkan adanya korelasi yang sangat lemah.

2.2.3. Dari hasil-hasil penelitian tersebut diatas telah berhasil diuji kebenaran dari ketiga hipotesa yang diajukan.



## SUMMARY

To assess the correlation between antibody coated bacteria (ABC) found in the urine and the development of local humoral immune response in the kidney, an experimental laboratory test was designed. A specific antibody producing cell was found in inflamed kidney tissue and the presence of specific antibody in the urine represents as marker. A short description of the methods used in this study were described.

### 1. Preliminary study:

#### 1.1. Detection of specific antibody producing cells:

Direct immunofluorescence test applied to inflamed tissue could visualize :

a. specific antibody producing cells containing intracytoplasmic immunoglobuline (apple green fluorescence) amounting in the average of  $27.4 \pm 0.6992$  every 10 microscopic field with high dry objective (the amount in the control tissue is 0.80).

b. specific antibody producing cells which contain both

intracytoplasmic immunoglobuline and bacterial clumps on the surface of these cells (red fluorescence) with the average of  $22.8 \pm 1.0328$  cells everay 10 microscopic fields with high dry objective (none were seen in control tissue).

c. Specificity test using preincubation treatment with unlabeled homologous bacteria or heterologous bacteria

1.2. VISUAL EIFA (Visual Enzyme Immunofluorescence Assay) test:

This method is used to measure the titer of specific antibody.

Repitability test of this technique : coefficient of variation of this test is 25,78% at 48 replicates.

2. Principle study:

2.1. Formation of antibody coated bacteria in vitro:

Conclusions based on this experiment were as follows:

2.1.1. Antibody coated bacteria (ACB) could be prepared in vitro if specific antibody and bacteria were supplied in sufficient quantity

2.1.2. VISUAL EIFA test could be used to detect the formation of antibody coated bacteria

## 2.2. Experimental ascending pyelonephritis:

Intraurethral inoculation with a suspension of *Escherichia coli* O6:K13:H1 to 15 female rats resulted in 11 rats giving a positive ACB detection test and 4 rats a negative ACB detection test (IF technique).

Laboratory tests performed in this study were:

- Detection of specific antibody producing cells
- Detection of antibody coated bacteria in urine
- Determination of specific antibody titer in urine
- Determination of specific antibody titer in serum
- Determination of bacterial count of urine

Based on the results of Rank Correlation analysis according to Spearman, between the results detection of antibody coated bacteria (ACB), detection of specific antibody producing cells (SPS), determination of antibody titer of urine (Ab-u), determination of antibody titer of serum (Ab-s) and urine bacterial count (UBC), the following conclusions could be made:

2.2.1. Rank correlation tests between ACB and SPS, ACB and UBC, and Ab-u and UBC were highly significant. ( $P < 0,0005$ )

2.2.2. Rank correlation tests between ACB and Ab-u ( $P=0,016$ ) and between SPS and Ab-u ( $P=0,03$ ) were highly significant at  $\alpha = 0,05$ .

2.2.3. Rank correlation test between ACB and Ab-s, SPS

and UBC, SPS and Ab-s, Ab-s and UBC and Ab-u and Ab-s were non significant ( $P > 0,10$ )

2.2.4. From the above statistical analysis, the second and third hypotheses were accepted.

**BAB IX**  
**DAFTAR PUSTAKA**

Abbot, G.D. 1972. Neonatal bacteriuria: A prospective study in 1,460 infants. *Brit.Med.J.* 1, 267-269.

Abranson, J.H., T.C.Sacks, and D.Flug. 1971. Bacteriuria and hemoglobin levels in pregnancy. *JAMA* 215, 1631-1637,

Allen, D.E. and J.P.Dowling. 1981. *Technics for nephropathy.* CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.

Anderson, B.R. and G.G.Jackson. 1961. Pyelitis, an important factor in pathogenesis of retrograde pyelonephritis. *J.Exp.Med.* 114, 375-385.

Anderson, B.R., and G.G.Jackson. 1962. Persistence pyelitis and pyelonephritis from retrograde urinary tract infection with aulin in antigen-coated tubes. *J.Immunol.* 109, 129-135.

Andi, K. 1989. *Nephrology in Indsonesia: State of the Nation.* *Asian Medical News*, 11, 3.

Aoki, S., S.Imamora, and M.Aoki. 1969. "A bacterial" and bacterial pyelonephritis: Immunofluorescent localization of bacterial antigen. *N.Engl.J.Med.* 281, 1375-1382.

Amitage, P. 1983. Statistical methods in medical research. Blackwell Scientific Publications Oxford.

Asscher, A.W., M.Sussman, and A.P.Roberts. 1969. The clinical significance of asymptomatic bacteriuria in non-pregnant woman. J.Infect.Dis. 120, 17-21.

Asscher, A.W., M.S.F.McLachman, and R.V.Jones. 1973. Screening for asymptomatic urinary tract infection of schoolgirls. Lancet 2, 1-4.

Bailey, R.R., P.E.Gower, and A.P.Roberts. 1973. Urinary tract infection in non-pregnant woman. Lancet 2, 275-277.

Bailey, R.R. 1973. Significance of coagulase-negative Staphylococcus in urine. J.Infect.Dis. 127, 179-182.

Barlett, R.C. and R.S.Galen. 1983. Predictive value of urine culture. Am.J.Clin.Pathol. 79, 756-757.

Barlett, R.C., D.O.'Niel, and J.C.McLaughlin. 1984. Detection of bacteriuria by leukocyte esterase, nitrit, and Automicrobic system. Am.J.Clin.Pathol. 82, 683-687.

Baeck, O., S.Linden, and S.Ahlstedt. 1977. Adverse reaction to nitrofurantoin in relation to cellular and humoral immune response. Clin.Exp.Immunol. 28, 400-406.

Bawono, B.Affandi, dan Yunizaf. 1973. Bakteriuri dalam kehamilan. Naskah Lengkap Pogi II, hal. 603-607.

Beenson, B.P. and D.Rowle. 1959. The anti-complementary effect of kidney tissue. Its association with amonia production. J.Exp.Med. 110, 685-697.

Bourtos, P., M.Moutada, and A.R.Ronald. 1977. Urinary tract infection localization. Am.J.Obstet.Gynecol. 112, 379-381.

Bootman, R., M.Laidlaw, and I.G.D.Richards. 1974. Prevalence of urinary tract infection in children of preschool age . Arch.Dis.Child. 49, 917-922.

Box, G.P.E., W.G.Hunter, and J.S.Hunter, 1978. Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis, and model building. John Wiley & Sons.

Braude, R. 1973. Proteinuria and antibody-coated bacteria in urine, letter to editor. N.Engl.J.Med. 297, 617-618.

Braun, J. 1982. Receptor - cytoskeleton interaction in the lymphocyte. In J.R.Inglis (ed), B Lymphocytes today. Elsevier Biomedical. p 80-84.

Brereton, R.J. 1976. Urinary tract infections in boys. Lancet 2, 1302.

Brooks, S.J.D., J.M.Lyons, and A.I.Braude. 1974. Immunization against retrograde pyelonephritis. *Am.J.Pathol.* 74, 345-354.

Bryant, R.E., R.E.Windom, and J.P.Vineyard Jr. 1964. Symptomatic bacteriuria in pregnancy and its association with prematurity. *J.Lab.Clin.Med.* 63, 224-231.

Buckly, R.M., M.McGuckin, and R.R.MacGregor. 1978. Urine bacterial count after sexual intercourse. *N.Engl.J.Med.* 63, 224-231.

Burrell, R.G. and C.C.Mascoli. 1966. *Experimental immunology*. sec. ed. Burgess Publication Company, Minneapolis, p. 24-25.

Chabanon, G., C.L.Hartley, and R.M.Richmond. 1976. Adhesion to human cell line by *Escheria coli* strain isolated during urinary tract infections. *J.Clin.Microbiol.* 10, 561-566.

Chandler, V.W. and L.Gorelkin. 1983. Immunofluorescent staining of Adenovirus in fixed tissue pretreated with trypsin. *J.Clin.Microbiol.* 17, 371-373.

Chisholm, G.D., O.R.Rivero, and Calnan. 1967. The renal pelvis in ureteral obstruction. *Br.J.Surg.* 54, 1023-1026.

Clark, H., A.R.Ronald, and M.Turck. 1971. Serum antibody



response in renal versus bladder bacteriuria. *J.Infect.Dis.* 123, 539-543.

Claridge, J.E., M.T.Pezzlo, and K.L.Vosti. 1987. *Cumitech 2A, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed. A.L.Weissfield. ASM Washington D.C.*

Cohem, M. 1976. The first urinary tract infection in male children. *Am.J.Dis.Child* 130, 810-813.

Corriere, J.N.Jr. and J.J.Murphy. Vesico-ureteral reflux and the intrarenal lymphatic system of the rat. *Invest.Urol.* 4, 556-569.

Cotran, R.S., E.Vivaldi, D.P.Zangwill, and E.H.Kass. 1963. Retrograde *Proteus* pyelonephritis in rats. Bacteriologic, pathologic, and fluorescent antibody study. *Am.J.Pathol.* 43, 1-21.

Cotran, R.S. 1963. Retrograde *Proteus* pyelonephritis in rats. *J.Exp.Med.* 177, 813-829.

Cotran, R.S., L.D.Thrupp, S.N.Haji, D.F.Zangwill, E.Vivaldi, and E.H.Kass. 1963. Retrograde *Escherichia coli* pyelonephritis in rat: a bacteriological, pathological and fluorescent antibody study. *J.Lab.Clin.Med.* 61, 987-1004.

Davis, J.M., G.L.Gibson, and J.M.Littlewood. 1974.

Prevalence of bacteriuria in infants and preschool children. Lancet, 2, 7-9.

Davison, J.M., M.S.Sprott, and J.B.Selkom. 1983. The effect of covert bacteriuria in schoolgirls on renal function at 18 years and during pregnancy. Lancet, 2, 305-306.

Dontas, A.S., Papanayiotou and N. Papanocolou. 1966. Bacteriuria in old age. Lancet, 2, 305-306.

Dossugi, S. 1985. Program-program aplikasi dalam BASIC. Pusat Pengembangan Manajemen akultas Ekonomi Universitas Gajah Mada & Andi Offset Yogyakarta.

Eddy Sukandar. 1982. Penyakit ginjal pada kekamilan. Cermin Kedokteran, 28, 41-45.

Edelmann, C.M., J.E.Ogwo Jr., and P.B.ine. 1973. The prevalence of bacteriuria in full-term and premature newborn infants. J.Pediat. 82, 125-132.

Elder, B., D.K.Boraker, and P.M.Fives-Taylor. 1982. Whole bacterial cell Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Streptococcus sanguis fimbrial antigens. J.Clin.Microbiol. 16, 141-144.

Engvall, E. and P.Perlman. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by

enzyme-linked anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J.Immunol. 109, 129-135.

Etzwiller, D.D. 1965. Incidence of urinary tract infections among juvenile diabetes. JAMA 191, 61-85.

Everett, E.D., T.C.Eickhoff, and J.M.Ehret. 1975. Immunofluorescence of yeast in urine. J.Clin.Microbiol. 2, 142-143.

Fairley, K.F., A.G.Bond, and R.B.Brown. 1967. Simple test to determine the site of urinary tract infection. Lancet 2, 7513-7514.

Fairley, K.F., N.E.Carson, R.C.Gutch, P.Leighton, A.D.Grounds, E.C.Laird, P.H.G.McCallum, R.L.Sleeman, and R.M.O'Keefe. 1971. Site of infection in acute urinary tract infection in general practice. Lancet 2, 615-618.

Farland, M., V.L.Thomas, and A.Shelokov. 1977. Urinary tract infection in patient with diabetes mellitus. JAMA 238, 1924-1926.

Farr, R.S. 1958. A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I\* BSA and antibody. J.Infect.Dis. 103, 239-262.

Fierer, J., L.Tarner, and A.I.Braude. 1971. Bacteriemia in

the pathogenesis of retrograde E. coli pyelonephritis in rat. *Am.J.Pathol.* 64, 433-454.

Forghani, B., J. Dennis, and N.J. Schmidt. 1980. Visual reading of Enzyme Immunofluorescence Assays for human Cytomegalovirus antibodies. *J.Clin.Microbiol.* 12, 704-708.

Forland, M., V.L.Thomas, and A.Selokov. 1977. Urinary tract infections in patients with diabetes mellitus. Studies on antibody coating bacteria. Abstract. *J.Am.Med.Assoc.* 238, 1924-1926.

Forsum, U., A.Fritjofsson, and L. Frodin. 1978. A clinical evaluation of a test for antibody-coated bacteria in the urin. Abstract. *Scand.J.Urol.Nephrol.* 12, 5-48.

Fowler, J.E. and T.A.Stamy. 1978. Studies of introital colonization in women with recurrent urinary tract infections. *J.Urol.* 120, 315-318.

Fujiwara, S. 1969. Studies on antibody production to horse ferritin in mice. 1. Origin of the antibody-producing cells, *Japan J. Exp.Med.*, 39, 461-470.

Garibaldi, R.A., J.P.Burke, M.L.Dickman, and C.B.Smith. 1974. Factors predisposing to bacteriuria during indwelling urethral catheterization. *N.Engl.J.Med.* 291, 215-219.

Gillepsi, W.A., M.A.Sellin, P.Gill, M.Stephens, L.A.Tuckwell, and L.Hilton. 1978. Urinary tract infections in young women, with special reference to *Staphylococcus saprophiticus*. *J.Clin.Pathol.* 31, 384-350.

Gilstrap III, L.C., F.G.Cunningham, and P.J.Whalley. 1981. Acute pielonephritis in pregnancy. An anteroceptive study. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 57, 409-413.

Goodman, M.G. and W.O.Weigle. 1982. Role of polyclonal B-cell activation in self / non-self discrimination, p. 63-69. In J.R.Inglis (ed.), *B Lymphocytes today*. Elsevier Biomedical,

Gower, P.E., B.Haswell, and M.E.Sidaway. 1968. Follow up of 164 patients with bacteriuria of pregnancy. *Lancet* 1, 990-994,

Guertler, B.A. 1977. Antibody-coated bacteria and localization of urinary tract infection (Germ). *ANTIKORPERBESETZTE BAKTERIEN UND LOKALISATION DES HARNWEGINFECTES*. Abstract. *Schweiz.Med.Wochenschr.* 107, 1537-1541.

Gruneberg, R.N., D.A.Leigh, and W.Brumfitt. 1969. Relationship of bacteriuria of pregnancy to acute pielonephritis, prematurity, and fetal mortality. *Lancet* 1, 1-3.

Gruneberg, R.N. 1970. Recurrent urinary tract infection in general practice. *J.Clin.Pathol.* 23, 259-261.

Gunther, K.L. and J.A.Washington II. 1981. Evaluation of the B-D urine culture kit. *J.Clin.Microbiol.* 14, 628-630.

Gutman, S.I., and R.R.Solomon. 1987. The clinical significans of dip-stick negative, culture-positive urines in a veterans population. *Am.J.Clin.Pathol.* 88, 204-209.

Hagberg, L., I.Engberg, R.Freter, J.Lam, S.Olling, and Svanberg-Eden. 1983. Ascending unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origen. *Infect.Immun.* 40, 273-283.

Harris, R.E., V.L.Thomas, and A.Shelokov. 1976. Asymptomatic bacteriuria in pregnancy: Antibody-coated bacteria, renal function, and intrauterine growth retardation. *Am.J.Obstet & gynecol.* 126, 20-25.

Harris, R.E., V.L.Thomas, J.M.Underwood, and F.Gaudot. 1978. A comparison of two indirect methods for localazing the site of urinary tract infection: Beta glucoronidase levels and the presence of antibody-coated bacteria. *Am.J.Obstet. Gynecol.* 22, 142-145.

Hanson, L.A., A.Fasth, and U.Jodal. 1976. Auto-antibodies to Tamm-Horsfall protein, a tool for diagnosing the level of urinary tract infections. *Lancet* 1, 226-228.

Heptinstall, R.H. 1973. More on bacterial antigen in kidney. N.Engl.J.Med. 289, 861-862.

Heney, N.M., P.J.O'Morchoe, and C.C.O'Morchoe. 1971. The renal lymphatic system during obstructed urinary flow. J.Urol. 106, 455-562.

Hodson, C.J. and S.Wilson. 1965. Natural history of chronic pyelonephritic scarring. Br.J.Med. 2, 191-194.

Hoff, R.G., D.E.Newman, and J.L.Staneck. 1985. Bacteriuria screening by use of acridin orange-stained smears. J.Clin.Microbiol. 21, 513-516.

Hokama, Y., R.M.Nakamura, 1982. Immunology and immunopathology, Little, Brown and Company, Boston, pp 101-133.

Huang, S.N. 1975. Immunohistochemical demonstration of Hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. Lab.Infest. 33, 88-94.

Huang, S.N., H.Minassian, and J.D.More. 1976. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. Lab.Invest. 35, 383-390.

Hunter, B.W., L.L.Akins, and J.P.Sanford. 1964. The role of immunity in the pathogenesis of experimental retrograde pyelonephritis. J.Exp.Med. 119, 869-879.

Hutch, J.A., E.R.Miller, and F.Hinman Jr. 1963. Vesico-ureteral reflux role in pyelonephritis. *Am.J.Med.* 34, 338-345.

Janson, K.L., and J.A.Roberts. 1977. Non-invasive localization of urinary tract infection. *J.Urol.* 137, 624-627.

Janson,L.G. and U.Lindberg. 1977. Asymptomatic bacteriuria in schoolgirls. VI. The correlation between urinary and faecal *Escherichia coli*. Relation to duration to the bacteriuria and sampling technics. *Acta Pediat.Scand.* 66, 349-354.

Jenkins, R.D., J.P.Fenn, and J.M.Matsen. 1986. Review of urine microscopy for bacteriuria. *J.Am.Med.Assoc.* 255, 3397-3404.

Jerusik, R.J., S.Kadis, W.L.Chapman Jr., and R.E.Wooley. 1977. Experimental rat model for *Corynebacterium renale* induced pyelonephritis. *Infect.Immun.* 18, 828-832.

Jodal, U., and L.A.Hanson. 1976. Sequential determination of C-reactive protein in acute childhood pyelonephritis. *Acta Pediatr.Scand.* 65. 319-322.

Jones, S.R., J.W.Smith, and J.P.Sanford. 1974. Localization of urinary tract infections bu detection of antibody-coated



bacteria in urine sediment. *N.Engl.J.Med.* 290, 591-593.

Jones, S.R., and J.Johnson. 1977. Further evaluation of the test for detection of antibody-coated bacteria in urine sediment. *J.Clin.Microbiol.* 5, 510-513.

Junqueira, L.C., J. Carneiro dan A. Dharma. 1980. *Histologi dasar (Basic histology).*, CV. EGC, Penerbit Buku Kedokteran, hal 393-407.

Kaijser, B., P.Larsson, and S.Olling. 1973. Experimental hematogenous pyelonephritis due to *Escherichia coli* in rabbits: The antibody response and its protective capacity. *J.Infect.Dis.* 128, 41-48.

Kaijser, B. 1973. Immunology of *Escherichia coli*: K antigen and its relation to urinary tract infection. *J.Infect.Dis.* 127, 670-676.

Kaijser, B., P.Larsson, S.Olling, and R.Schneersons. 1983. Protection against acute, ascending pyelonephritis caused by *Escherichia coli* in rats, using isolated capsular antigen conjugated to bovine serum albumin. *Infect.Immun.* 39, 142-146.

Kaijser, B., P.Larsson, and S.Olling. 1978. Protection against ascending *Escherichia coli* pyelonephritis in rats and its significans to local immunity. *Infect.Immun.* 39,

142-146.

Kass, E.H. 1960. Bacteriuria and the pathogenesis of pyelonephritis. *Lab.Invest.* 9, 110-116.

Kaye, D. 1968. Antibacterial activity of human urine. *J.Clin. Invest.* 47, 2374-2390.

Kiemelstiel, P., O.J.Kiem, and J.A.Beres. 1961. Chronic pyelonephritis. *Am.J.Med.* 30, 589-607.

Kishimoto, T. 1982. Human neoplastic B-cells - monoclonal models of B-cells differentiation. In J.R.Inglis (ed.) *B-Lymphocytes today*. Elsevier. pp.137-140.

Komaroff, A.L., and G.Friedland. 1980. The dysuria-pyuria syndrome. *N.Eng.J.Med.* 303, 452-453.

Kunin, C.M., I.Southall, and A.J.Paquin. 1960. Epidemiology of urinary tract infections. *N.Eng.J.Med.* 263, 817-823.

Kunin, C.M., E.Zacha, and A.J.Paquin. 1962. Detection of urinary tract infection in school children.I. Prevalence of bacteriuria and associated urologic findings.*N.Engl.J.Med.* 266, 1287-1296.

Kunin, C.M. 1968. Emergence of bacteriuria, proteinuria and symptomatic urinary tract infections among population of

school girls followed for seven years. *J.Pediat.* 41, 968-976.

Kunin, C.M., and R.C.McCormack. 1968. A epidemiologic study of bacteriuria and blood pressure among nuns and working women. *N.Engl.J.Med.* 278, 635-642.

Kunin, C.M. 1970. A ten-year study of bacteriuria in school girls: Final report of bacteriologic, urologic, and epidemiologic findings. *J.Infect.Dis.* 122, 382-393.

Kunin, C.M., and J.E. deGroot. 1975. Self screening for significant bacteriuria: Evaluation of dip-strip nitrite - culture combination. *JAMA* 231, 1349-1353.

Kunin, C.M., J.E.de Groot, and D.Uehling. 1976. Detection of urinary tract infections in three to five year old girls by mothers using nitrite strip. *J.Pediat.* 57, 829-835.

Kunin, C.M. 1979. Detection, prevention, and management of urinary tract infections. 3th. ed. Lea & Febinger, Philadelphia.

Kurdydyk, L.M., K.Kelly, G.K.M.Harding, P.Mirwaldt, L.Tompson, F.J.Buckwold, and A.R.Ronald. 1980. Role of cervico vaginal antibody in the pathogenesis of recurrent urinary tract infection in women. *Infect.Immun.* 29, 76-82.

Landes, R.R. 1980. Longterm, low dose cinacoxin therapy for the prevention of recurrent urinary tract infections. *J.Urol.* 123, 47-50.

Larsson, P., B.Kaijser, I.Mattsby-Batzer, and S.Olling. 1980. An experimental model for ascending acute pyelonephritis caused by *Escherichia coli* and *Proteus* in rats. *J.Clin.Pathol.* 33, 408-412.

Latham, R.H., E.S.Wong, A.Larson, M.Coyle, and W.E.Stamm. 1985. Laboratory diagnosis of urinary tract infection in ambulatory women. *J.Am.Med.Assoc.* 254, 3333-3335.

Lehmann, J.D., J.W.Smith, T.E.Miller, A.Barnett, and J.P.Sanford. 1968. Local immune response in experimental pyelonephritis. *J.Clin.Invest.* 47, 2541-2550.

Leveno, K.J., R.E.Harris, L.C.Gilstap, P.J.Whalley, F.G.Cunningham, R.S.Kappus, and B.Nobles. 1981. Bladder versus renal bacteriuria during pregnancy: Recurrence after treatment. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 139, 403-406.

Lewis, J.F., and J. Alexander. 1976. Microscopy of urine stained smears to determine the need for quantitative culture. *J.Clin.Microbiol.* 4, 372-374.

Lipsky, B.A., R.C.Ireton, S.D.Fihn, R.Hackett, and R.E.Beger. 1987. Diagnosis of bacteriuria in men: Specimen

collection and culture interpretation. *J.Infect.Dis.* 155, 847-854.

Lipsky, B.A., J.J.Plorde, F.C.Tenover, and F.P.Brancato. 1987. Comparison of Automicrobic system, Acridine-stained smears, and Gram-stained smears in detecting bacteriuria. *J.Clin.Microbiol.* 22, 176-181.

Little, P.J. 1966. The incidence of urinary tract infection in 5000 pregnant women. *Lancet* 2, 925-926.

Little, P.J. 1985. Prevention of pyelonephritis in pregnancy. *Lancet* 1, 567-569.

Longoria, C.C., and C.A.Gonzales. 1987. Filtra-Check-UTI, a rapid disposable system for detection of bacteriuria. *J.Clin.Microbiol.* 25, 926-928.

Loo, S.Y., A.G.Scottolini, S.Luangphmeth, A.L.Adam, L.D.Jacobs, and A.J.Marini. 1984. Urine screening strategy employing dip-stick analysis and selective culture: an evaluation. *Am.J.Clin.Pathol.* 81, 634-642.

Lubis, H.R., M.Pinem, dan M.Silalahi. 1982. Infeksi saluran kemih pasca kateterisasi. *Cermin Kedokteran*, 28, 64-69.

Lubis, S., R.Sjah, E.D.Utaman, Yushar, dan H.R.Lubis. 1982. Mikroorganisme penyebab infeksi saluran kemih (ISK) di

Sumatra Utara. Cemin KEdokteran 28, 62-63.

MacDonald, R.A., H.Levitin, G.K.Mallory, and E.H.Kass. 1957. Relation between pyelonephritis and bacterialcount in urine. N.Engl.J.Med. 256, 915-922.

Males, B.M., W.R.Bartholomew, and D.Amsterdam. 1986. Leukocyte esterase -nitrit and bioluminescence assay as urine screens. J.Clin.Microbiol. 22, 531-534.

Marrie, T.J., K.M.Harding, and R.A.Ronald. 1978. Anaerobic and aerobic urthral flora in healthy females. J.Clin. Microbiol. 8, 67-72.

Marrie, T.J., C.Kwan, M.A.Noble, A.West, and L.Duffield. 1982. Staphylococcus saprophiticus as a cause of urinary tract infections. J.Clin.Microbiol. 16, 327-341.

Matsby-Baltzer, I., L.A.Hanson, B.Kaijser, P.Lasson, S.Olling, Svanborg-Eden. 1982. Experimental Escherichia coli ascending pyelonephritis in rats: Changes in bacterial properties and immune response to surface antigens. Infect.Immun. 35, 639-646.

Miller, T.E., S.Burnham, and J.D.K.North. 1976. Immunological enhancement in the pathogenesis of pyelonephritis. Clin.Exp.Immunol. 24, 336-345.

Miller, T.E. and D.North. 1971. The cellular kinetics of the immune response in pyelonephritis. *J.Clin.Med.* 78, 891-904.

Moller, G. 1982. B-lymphocyte activation. In J.R.Inglis (ed.), *B Lymphocyte to day.* Elsevier Biomedical p.59-62.

Montgomerie, J.Z., W.J.Tuddenham, E.B.Howard, and J.W.Morrow. 1980. Pseudomonas urinary tracts infection in mice. *Infect.Immun.* 29, 267-270.

Murray, P.R., R.B.Smith, and T.C.McKinney. 1987. Clinical inevaluation of three urine screening tests. *J.Clin. Microbiol.* 25, 467-470.

Mustafa, M.A., and J.H.M.Pinkerton. 1968. Significant bacteriuria after major gynaecological surgery. *Lancet* 1, 839-841.

Naumann, G., W.Nimmich, and E.Budde. 1978. Detection of antibody-coated bacteria in urine.(Germ). DIE DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG DES NACHWEISES ANTIKORPER BELADENER BAKTERIEN IN URIN. Abstract. *Gesamte Hyg. Ihre Grenzgeb.* 24, 450-452.

Nishi, T., and K.Tsuchia. 1978. Experimental urinary tract infectio with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect.Immun.* 22, 508-515.

Noe, H.N. and L.D.Tonkin. 1982. Renal candidiasis in neonatus. *J.Urol.* 127, 517-519.

Norden, C.W., P.S.Levi, and E.H.Kass. 1970. Predictive effect of urinary concentrating ability and hemagglutinating antibody titer upon response to antimicrobial therapy in bacteriuria of pregnancy. *J.Infect.Dis.* 121, 517-519.

O'Grandy, F.W., B.Richards, and M.A.McSherry. 1970. Introi-tal Enterobacteria, urinary ifection, and the urethral syndrome. *Lancet.* 2, 1208-1210.

Park, C.H., D.L.Hixon, C.C.McClintock, C.B.Ferguson, C.C.Lawless, C.C.Rishem, and C.B.Cook. 1984. Rapid detection of significans bacteriuria by concomitent use of Lumac system and Gram's stain. *Am.J.Clin.Pathol.* 82, 593-596.

Peernbooms. P.G., A.Marian, J.J.Verwy, and D.M.McLaren. 1982. Urinary virulence of *Proteus mirabilis* in two experimental mouse models. *Infect.Immun.* 36, 1249-1259.

Perry, J.L., J.S.Matthews, and D.E.Weesner. 1982. Evaluation of leukocyte esterase activity as a rapid screening technique for bacteriuria. *J.Clin.Microbiol.* 15, 852-854.

Pervical, A., W.Brumfitt, and J.DeLouvois. 1964. Serum antibody level as indication of clinically inapparent pyelonephritis. *Lancet* 2, 1027-1033.



Pezzlo, M.T., M.A.Wetkowski, E.M.Peterson, and M.L.de la Maza. 1985. Detection of bacteriuria and pyuria within two minutes. *J.Clin.Microbiol.* 2, :578-581.

Pezzlo, M., G.L.Tan, E.M.Peterson, and L.M.de la Mazza. 1982. Screening of urine cultures by three automated systems. *J.Clin.Microbiol.* 15, 468-474.

Pezzlo, M. 1988. Detection of urinary tract infections by rapid methods. *Clin.Microbiol.Rev.* 1, 268-280.

Pfaller, M.A., B.Ringenberg, and F.P.Koontz. 1985. Use of rapid screening tests in processing urine specimens by conventional cultures and AutoMicrobic system. *J.Clin.Microbiol.* 21, 783-787.

Pfau, A. and T.Sacks. 1981. The bacterial flora of vaginal vestibule, urethra, and vagina in premenopausal women with recurrent urinary tract infections. *J.Urol.* 126, 630-634.

Rachman, Noor. 1986. Metoda biakan tetes pada media CLED untuk menentukan jumlah kuman dalam air kemih. Dibacakan dalam temu ilmiah Perhimpunan Parasitologi dan Mikrobiologi Kedokteran Indonesia di Yogyakarta.

Raffel, L.,P.Pitsakis, S.P.Levison. 1981. Experimental *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus*

faecalis pyelonephritis in diabetic rats. *Infect.Immun.* 34, 773-779.

Randolph, F.M., and M.Greenfield. 1964. The incidence of asymptomatic bacteriuria and pyuria in infancy. *Infect.Immun.* 65, 57-66.

Randolph, C.M., K.E.Morris, and E.B.Gould. 1975. The first urinary tract infection in female infant. *J.Paediat.* 86, 342-348.

Ratner, J.J., V.L.Thomas, B.A.Sanford, and M.Forland. 1981. Bacteria specific antibody in the urine of patients with acute pyelonephritis and cystitis. *J.Infect.Dis.* 143, 404-411.

Reitamo, S., A. Ranki, Y.T. Konttinen, and P. Hayry. 1979. Immunoperoxidase identification of intracellular immunoglobulins from cell smears. *Am.J.Clin.Pathol.* 73, 248-249.

Rene, P. and F.J.Silverblatt. 1982. Serological response to *Escherichia coli* in pyelonephritis. *Infect.Immun.* 37, 749-754.

Rene,P., M.Dinolfo, and F.J.Silverblatt. 1982. Serum and urogenital antibody responses to *Escherichia coli* pili in cystitis. *Infect.Immun.* 38, 542-547.

Riedash, G., E.Ritz, and Mohring. 1977. Antibody-coated bacteria in the ejaculate: A possible test for prostatitis. *J.Urol.* 118, 787-788.

Riedash, G., E.Ritz, K.Dreikorn, and and K.Andrssy. 1978. Antibody coating bacteria in transplanted patients. Abstract. *Nephron.* 20, 275-272.

Ringelman, R., H.Opara, and E.Matouschek. 1977. Reservoir for bacteria of urinary tract infections in urologic patients. *Immuun.Infekt.* 5, 58-61.

Robbins, D.G., K.B.Rogers, R.H.R.White, and M.S.Osman. 1975. Urine microscopy as an aid to detection of bacteriuria. *Lancet* i, 476-478.

Roitt, I. 1977. *Essential immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 128-132.

Roitt, I., J.Brostoff, and D.Male. 1985. *Immunology*. Gower Medical Publ. p 8.1-9.11.

Rowse-Eagle, ., H.D.Watson, and G.H.Tignor. 1981. Improved method for trypsin digestion of protoplast sections before immunofluorescence staining. *J.Clin.Microbiol.* 13, 996-997.

Rows, D.S., K.Hug, I.Torni, and B.Pernis. 1973. Im-

munoglobulin D as a lymphocyte receptor. J.Exp.Med. 138, 965-

Sanford, J.P., B.W.Hunter, and L.L.Souda. 1962. The role of immunity in the pathogenesis of experimental hematogenous pyelonephritis. J.Exp.Med. 115, 383-384.

Saxena, S.R., A.Collins, and B.M.Lawrence. 1874. Bacteriuria in perschool children. Lancet 2, 415-518.

Schiegel, J.V., J.Cuellar, and R.M.O'Dell. 1861. Bactericidal effect of urea. J.Urol. 86, 819-822.

Schwartz, H., H.K.A.Schirmer, and B.Post. 1969. Correlation of Escherichia coli occurring simultaneously in the urine and stool of patient with clinically significant bacteriuria: Serotyping with group-specific O antisera. J.Urol. 101, 379-382.

Schwartz, H., H.K.A.Schirmer, and B.Ehlers. 1969. Urinary tract infection: Correlation between organism obtained simultaneously from urine and faeces of patient with bacteriuria and pyuria. J.Urol. 101, 765-767.

Schmidt-Nielsen, B. 1969. The renal excretion of ...  
containing

Proceedings of the symposium of the Gesellschaft für Nephrologie, Switzerland. Heidelberg, Springer-Verlag. p 26-

Silverberg, D.S., F.L.Jackson, and L.E.Bryan. 1976. Antibody-coated bacteria in the urine of preschool and school aged girls with asymptomatic bacteriuria. Abstract. Canad.Med.Ass.J. 115, 1091-1093.

Silverblatt, F.J. 1974. Host-parasite interaction in the rat renal pelvis. A possible role for pili in the pathogenesis of pyelonephritis. J.Exp.Med. 140, 1696-1711.

Smith, J. and B.Kaijser. 1976. The local immune response to Escherichia coli O and K antigens in experimental pyelonephritis. J.Clin.Invest. 58, 276-281.

Smith, J., J.Holmgren, S.Ahlstadt, and L.A.Hanson. 1974. Local antibody production in experimental pyelonephritis: Amount, avidity, and immunoglobulin class. Infect.Immun. 10, 411-415.

Smith, J. S.R.Jones, and B.Kaijser. 1977. Significance of antibody-coated bacteria in urine sediment in experimental pyelonephritis. J.Infect.Dis. 135, 577-581.

Smith, J.W. and W.L.Hand. 1973. Immunoglobulin content and antibody activity in urine in experimental urinary tract infection. J.Immunol. 108, 861-866.

Smith, J.W., W.L.Hand, and J.P.Sanford. 1973. Local synthesis of secretory IgA in experimental pyelonephritis. *J.Immunol.* 108, 867-876.

Smith, J.W. 1977. Local immune response to lipoprotein of outer membrane of *Escherichia coli* in experimental pyelonephritis. *Infect.Immun.* 17, 366-370.

Sommer, J.L. 1961. Experimental pyelonephritis in rat with observation on uretral reflux. *J.Urol.* 86, 375-381.

Stamm, W.E., B.E.Cutter, and G.A.Grotes-Reuvecamp. 1981. Enzyme immunoassay for detection of antibody-coated bacteria. *J.Clin.Microbiol.* 13, 42-45.

Stuart, K.L., G.T.M.Cummins, and W.A.Chin. 1965. Bacteriuria, prematurity, and the hypertensive disorders of pregnancy. *Br.J.Med.* 1, 554-556.

Suhartono Taat Putra. 1985. *Tekhnik Laboratorium Patologi I.* Fakultas Non Gelar Kesehatan Universitas Airlangga.

Supranto, J. 1981. *Staistik jilid I & II.* Erlangga, Yogyakarta.

Sutrisno Hadi. 1982. *Statistik I & II.* Yayasan Penerbitan Fakultas Psikologi Universitas Gajh Mada.

Sutrisno Hadi. 1984. Metodologi Research Jilid 3. Yayasan Penerbitan Fakultas Psikologi Universitas Gajah Mada.

Svanborg-Eden, C., dan U.Jodal. 1979. Attachment of *Escherichia coli* to urinary sediment epithelial cells from urinary tract infection-prone and healthy children. *Infect.Immun.* 26, 837-840.

Swapp, G.H. 1966. Vesico-ureteral reflux and asymptomatic bacteriuria in the puerperium. *Lancet* 2, 466-467.

Swamy, A.P. R.V.M.Cestero, and C.A.Linke. 1980. Anaerobic urinary tract infection owing to *Bacteroides fragilis* in a chronic hemodialysis patient. *J.Urol.* 123, 298-300.

Swoveland, P.T., and K.P.Johnson. 1979. Enhancement of fluorescent antibody staining of viral antigens in formalin-fixed tissues by trypsin digestion. *J.Infect.dis.* 140, 758-764.

Thomas, V.L., A.Shelokov, and M.Forland. 1974. Antibody-coated bacteria in the urine and the site of urinary tract infection. *N.Engl.J.Med.* 290, 588-590.

Thomas, V.L., R.E.Harris, L.C.Gilstrap III., and A.Shelokov. 1975. Antibody-coated bacteria in the urine of obstetrical patients with acute pielonephritis. *J. Infect. Dis.* 131,

S57-61.

Turck, M., K.W.Anderson, and R.G.Petersdorf. 1966. Relaps and reinfection in chronic bacteriuria. N.Engl.J.Med. 275, 70-75.

Turck, M., A.R.Ronald, and R.G.Petersdorf. 1968. Relaps and reinfection in chronic bacteriuria. II. The correlation between site of infection and pattern of recurrence in chronic bacteriuria. N.Engl.J.Med. 278, 422-427.

Turck, M., A.R.Ronald, and R.G.Petersdorf. 1968. The correlation between site of infection and pattern of occurrence in chronic bacteriuria. N.Engl.J.Med. 278, 427-434.

Wallmark, J., I.Arremerk, and B.Telander. 1978. Staphylococcus saprophyticus: A frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. J.Infect.Dis. 38, 791-797.

Whalley, P. 1967. Bacteriuria in pregnancy. Am.J.Obstet. Gynecol. 97, 723-738.

Wienstein, S.H., G.Gross Jr., A.M.Luger, R.J.Tully, and V.Thakur. 1981. Acute pyelonephritis in 48 year old man. J.Urol. 126, 772-776.

Williams, G.L., D.K.L.Davies, and K.T.Evens. 1968. Vesico-



ureteric reflux in patients with bacteriuria in pregnancy. Lancet 2, 1202-1205.

Wood, E.G. and H.C. Dillon. 1981. A prospective study of group B Streptococcal bacteriuria in pregnancy. Am.J. Obstet.Gyneacol. 140, 515-520.

Yolken, R.H. and P.J. Stopa. 1979. Enzyme-linked fluorescence assay: ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. J.Clin.Microbiol. 10, 317-321.

Yolken, R.H. and F.J. Leister. 1982. Comparison of fluorescent and colorigenic substrates for enzyme immunoassays. J.Clin.Microbiol. 15, 757-760.

**LAMPIRAN**

LAMPIRAN 1

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PEWARNAAN HEMATOKSILIN-EOSIN DAN IMUNOFLUORESENSI

Pembuatan sediaan ini dilakukan menurut Allen, 1981 dan Suhartono, 1985.

1. Pembuatan Blok Parafin:

Sebelum dilakukan embedding ini jaringan harus difiksasi minimum 2 jam. Untuk embedding ini dipergunakan Histosek (Merck) dan dilakukan pemrosesan dengan urutan sebagai berikut:

- 1.1. Alkohol 95 %     2 X 10 menit
- 1.2. Xilol             2 X 20 menit
- 1.3. Histosek I       10 menit (in vacuo)
- 1.4. Histosek I       20 menit (in vacuo)
- 1.5. Embedded dalam wax segar

2. Pemotongan blok parafin:

- 2.1. Alat yang dipergunakan adalah Mikrotom putar buatan AO.
- 2.2. Blok parafin dilekatkan pada pemegang jaringan dengan cara menghangatkan pemegang jaringan dan permukaan blok yang akan ditempelkan pada pemegang jaringan dan kemudian didinginkan kembali.
- 2.3. Dilakukan trimming dari permukaan blok parafin
- 2.4. Siapkan penangkas air untuk jaringan (tissue water-bath).
- 2.5. Siapkan gelas objek, untuk sediaan dengan pewarnaan

hematoksilin eosin (H-E) gelas objek dilapisi dengan putih telur terlebih dahulu, sedangkan untuk pewarnaan imunofluoresensi (IF) gelas objek dilapisi dengan larutan yang mengandung gelatin (lihat 2.2.1.)

- 2.6. Setelah permukaan blok parafin rata, dilakukan pemotongan jaringan dengan ketebalan 4 mikron.
- 2.7. Sayatan diapungkan dipermukaan air dalam penangkas air, dengan menggunakan kuas kecil lipatan-lipatan pada sayatan dikembangkan, kemudian ditempelkan pada permukaan gelas objek yang telah disiapkan terlebih dahulu.

### 3. Zat warna Hematoksilin-Eosin menurut Harris:

Untuk melakukan pengecatan jaringan dengan H-E menurut Harris, disediakan zat warna sebagai berikut:

#### 3.1. Larutan Hematoksilin:

Kristal hematosilin	5 gram
Alkohol 95 %	50 ml
Amonium / Potasium alum	100 gram
Asam merkuri merah	2,5 gram
Aqua dest ad	1000 ml

Cara pembuatannya:

- a. Larutkan kristal hematoksilin dalam 95 % alkohol
- b. Larutkan Kalium Alum atau amonium alum dalam aqua dest yang dipanaskan
- c. Kedua larutan tersebut diatas dicampur dan dipanaskan secepatnya dengan menggunakan penangkas air yang

mendidih.

d. Setelah diangkat dari penangkas air, larutan asam merkuri ditambahkan perlahan-lahan, kemudian dipanaskan lagi sampai larutan berwarna ungu gelap.

e. Larutan didinginkan, kemudian ditambahkan 2 - 4 ml asam asetat glasial setiap 100 ml larutan.

### 3.2. Larutan Eosin stok (untuk persediaan):

Eosin Y	1 gram
Aqua dest	20 ml
Alkool 95 %	80 ml

Cara membuatnya:

Larutkan eosin Y dalam aqua dest, kemudian ditambahkan alkohol kelarutan tersebut sampai menjadi campuran yang homogen.

### 3.3. Larutan kerja Eosin:

Eosin stok 1 bagian ditambah 3 bagian alkohol 80 %, kemudian dicampur sampai homogen. Sebelum dipergunakan tambahkan 0,5 ml asam asetat glasial setiap 100 ml nya.

### 3.4. Larutan asam alkohol:

Alkohol 70 %	1000 ml
Asan chlorida jenuh	10 ml

Keduanya dicampur sampai homogen.

### 3.5. Larutan amonium dalam air:

Amonium hidroksida	2-4 ml
Aqua dest	1000 ml

Keduanya dicampur sampai homogen.



Tabel 1L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan normal.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
Sediaan No. 1A			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	1	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	1	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	1	0
Sediaan No. 1B			
1.	1	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	0	0
-----			

Keterangan :  
 Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau)  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 2L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan normal.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
Sediaan No. 2A			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	1	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	0	0
Sediaan No. 2B			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	1	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	1	0
8.	1	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	2	0
-----			

Keterangan :  
 Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau).  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Korelasi Antara Bakteri ...

Noor Rachman

Tabel 3L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan normal.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 3A			
1.	0	0	0
2.	0	1	0
3.	1	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
Jumlah:	1	1	0
Sediaan No. 2B			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	1	0	0
5.	0	1	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
Jumlah:	1	1	0

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab (fluoresensi hijau).

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 4L Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. terhadap E. coli O6K13:H1 dalam jaringan normal.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 4A			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	1	0	0
7.	1	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
Jumlah:	2	0	0
Sediaan No. 4B			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	1	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	1	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
Jumlah:	1	1	0

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau).

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.



Tabel 5L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan normal.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
<b>Sediaan No. 5A</b>			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	1	0	0
10.	0	1	0
<b>Jumlah:</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Sediaan No. 5B</b>			
1.	0	0	0
2.	1	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
<b>Jumlah:</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Keterangan :**

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau).

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 6L. Rekapitulasi hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan normal.

Nomor	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
1A.	1	1	0
1B.	1	0	0
2A.	1	0	0
2B.	1	2	0
3A.	1	1	0
3B.	1	1	0
4A.	2	0	0
4B.	1	1	0
5A.	1	2	0
5B.	1	0	0
<b>MEAN :</b>	<b>1.1</b>	<b>0.8</b>	<b>0</b>
<b>S.D. :</b>	<b>0.3162278</b>	<b>0.7888106</b>	<b>0</b>
<b>MEDIAN:</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>MODUS:</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

Tabel 7L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan radang.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 7A			
1.	0	0	3
2.	0	1	2
3.	0	0	2
4.	0	0	3
5.	0	0	3
6.	0	1	2
7.	1	0	3
8.	0	1	2
9.	0	1	1
10.	0	0	3
Jumlah:	1	4	24
Sediaan No. 7B			
1.	0	0	3
2.	0	1	2
3.	0	0	3
4.	0	0	3
5.	0	1	2
6.	0	1	2
7.	0	0	2
8.	0	1	1
9.	0	0	3
10.	1	0	2
Jumlah:	1	4	23

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau)

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 8L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan radang.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 8A			
1.	0	0	3
2.	0	1	2
3.	1	0	3
4.	0	1	2
5.	0	0	2
6.	0	1	2
7.	0	0	3
8.	0	1	2
9.	0	0	2
10.	0	1	2
Jumlah:	1	5	23
Sediaan No. 8B			
1.	0	0	3
2.	0	1	2
3.	0	1	1
4.	1	0	3
5.	0	0	2
6.	0	1	2
7.	0	1	3
8.	0	1	1
9.	0	0	2
10.	0	0	3
Jumlah:	1	5	22

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau)

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 9L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel plasma spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan beradang

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
<b>Sediaan No. 9A</b>			
1.	0	0	3
2.	0	1	2
3.	0	0	3
4.	1	0	3
5.	0	0	2
6.	0	1	1
7.	0	0	3
8.	0	0	2
9.	0	0	3
10.	0	1	2
<b>Jumlah:</b>	1	3	24
<b>Sediaan No. 9B</b>			
1.	0	1	2
2.	0	1	2
3.	0	0	2
4.	0	0	2
5.	0	1	2
6.	0	0	3
7.	0	0	2
8.	0	0	3
9.	0	1	2
10.	0	1	2
<b>Jumlah:</b>	0	5	22

**Keterangan :**

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau).

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 10L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan radang.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
<b>Sediaan No. 10A</b>			
1.	0	0	2
2.	0	1	2
3.	0	0	3
4.	0	0	3
5.	1	1	2
6.	0	1	2
7.	0	0	3
8.	0	0	3
9.	0	1	2
10.	0	1	2
<b>Jumlah:</b>	1	5	24
<b>Sediaan No. 10B</b>			
1.	0	0	3
2.	0	0	2
3.	1	1	2
4.	0	0	3
5.	0	1	1
6.	0	0	3
7.	0	0	3
8.	0	1	2
9.	0	1	1
10.	0	0	2
<b>Jumlah:</b>	1	4	22

**Keterangan :**

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau).

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 11L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. spesifik, setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman homolog (tanpa label rhodamin).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
=====			
Sediaan No. 11A.			
1.	0	2	1
2.	0	3	0
3.	0	1	1
4.	0	3	0
5.	1	2	0
6.	0	2	1
7.	0	3	0
8.	0	2	1
9.	0	3	0
10.	0	2	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	23	4
Sediaan No. 11B.			
1.	0	2	1
2.	0	1	1
3.	0	3	0
4.	0	1	1
5.	0	2	1
6.	0	3	0
7.	0	1	1
8.	0	3	0
9.	0	2	1
10.	0	3	0
	-----	-----	-----
	0	21	6
=====			

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau)  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 12L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. spesifik, setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman homolog (tanpa label rhodamin).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
=====			
Sediaan No. 12A.			
1.	0	3	0
2.	1	3	0
3.	0	3	0
4.	0	2	0
5.	0	2	1
6.	0	3	0
7.	0	2	1
8.	0	2	1
9.	0	3	0
10.	0	1	1
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	24	4
Sediaan No. 12B.			
1.	0	3	0
2.	0	2	0
3.	0	3	0
4.	0	2	0
5.	0	2	1
6.	0	3	0
7.	0	1	1
8.	0	2	1
9.	0	3	0
10.	0	2	1
	-----	-----	-----
	0	23	4
=====			

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau).  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

274

Tabel 13L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. spesifik, setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman homolog (tanpa label rhodamin).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
Sediaan No. 13A.			
1.	0	2	1
2.	0	3	0
3.	0	2	1
4.	0	3	0
5.	0	3	0
6.	0	3	0
7.	0	2	1
8.	0	1	1
9.	0	2	0
10.	0	3	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	0	24	4
Sediaan No. 13B.			
1.	0	3	0
2.	0	3	1
3.	0	2	0
4.	0	2	0
5.	0	2	1
6.	0	2	0
7.	0	3	1
8.	0	2	1
9.	0	2	0
10.	0	3	0
	-----	-----	-----
	0	24	4
=====			

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau).

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 14L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. spesifik, setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman homolog (tanpa label rhodamin).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
Sediaan No. 14A.			
1.	0	2	1
2.	0	3	0
3.	0	3	1
4.	0	1	0
5.	0	2	0
6.	0	3	0
7.	0	1	1
8.	0	3	1
9.	0	3	0
10.	0	3	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	0	24	4
Sediaan No. 14B.			
1.	0	1	1
2.	0	3	0
3.	0	3	0
4.	1	2	1
5.	0	2	1
6.	0	3	0
7.	0	1	0
8.	0	2	1
9.	0	3	0
10.	0	3	0
	-----	-----	-----
	1	23	4
=====			

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau).

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 15L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. spesifik, setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman homolog (tanpa label rhodamin).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 15A.			
1.	0	3	0
2.	0	1	1
3.	0	3	0
4.	1	2	1
5.	0	1	1
6.	0	3	0
7.	0	2	1
8.	0	3	0
9.	0	3	0
10.	0	2	0
Jumlah:	1	23	4
Sediaan No. 15B.			
1.	0	3	0
2.	0	2	1
3.	0	3	0
4.	0	1	1
5.	0	2	1
6.	0	3	0
7.	0	3	0
8.	0	3	0
9.	0	2	0
10.	0	2	1
	0	24	4

**Keterangan :**

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pembentuk Ab. (fluoresensi hijau).

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pembentuk Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 16L. Rekapitulasi hasil pengamatan imunofluoresensi sel pembentuk Ab. spes. setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman homolog (tanpa label rhodamin).

Nomor	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
11A.	1	21	4
11B.	0	21	5
12A.	1	22	4
12B.	0	23	4
13A.	0	25	3
13B.	1	22	4
14A.	0	25	3
14B.	1	22	4
15A.	1	23	4
15B.	0	24	4
MEDIAN:	0.5	22.5	4
MODUS:	1	22	4
MEAN:	0.5	22.8	3.9
S.D.:	0.5270463	1.4757296	0.5676462
Sel pemb. Ab. dengan Ig intrasplasma:			
MEDIAN:	26.5	MEAN:	27.2
MODUS:	26	S.D.:	0.6324555

Tabel 17L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik, setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman heterolog (tanpa label rhodamin).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
----------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------

Sediaan No. 16A.

1.	0	0	2
2.	0	1	2
3.	0	0	3
4.	0	1	2
5.	1	1	4
6.	0	0	3
7.	0	1	2
8.	0	0	1
9.	0	1	3
10.	0	1	2

Jumlah: 1 6 24

Sediaan No. 16B.

1.	0	0	3
2.	0	0	3
3.	0	0	2
4.	0	1	2
5.	0	1	1
6.	0	1	2
7.	1	0	3
8.	0	1	2
9.	0	0	3
10.	0	0	3

1 4 24

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab. (fluoresensi hijau).

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 18L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik, setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman heterolog (tanpa label rhodamin).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
----------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------

Sediaan No. 17A.

1.	0	1	2
2.	0	0	3
3.	1	0	3
4.	0	1	2
5.	0	0	3
6.	0	1	2
7.	0	0	3
8.	0	1	3
9.	0	1	2
10.	0	0	2

Jumlah: 1 5 25

Sediaan No. 17B.

1.	1	0	2
2.	0	1	3
3.	0	1	1
4.	0	0	2
5.	0	0	2
6.	0	1	2
7.	0	0	3
8.	0	0	3
9.	0	0	3
10.	0	1	3

1 4 24

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab. (fluoresensi hijau).

Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 19L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik, setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman heterolog (tanpa label rhodamin).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
Sediaan No. 18A.			
1.	0	0	3
2.	0	0	2
3.	0	1	3
4.	0	0	3
5.	0	1	3
6.	0	1	2
7.	0	0	3
8.	1	0	3
9.	0	1	1
10.	0	0	2
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	4	25
Sediaan No. 18B.			
1.	0	1	2
2.	0	0	3
3.	0	0	3
4.	0	1	2
5.	1	0	3
6.	0	0	3
7.	0	1	2
8.	0	0	2
9.	0	0	3
10.	0	0	3
	-----	-----	-----
	1	3	26

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab. (fluoresensi hijau).  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab. dan memberikan fluoresensi merah.

Tabel 20L. Hasil pengamatan imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik, setelah dilakukan pra-inkubasi dengan kuman heterolog (tanpa label rhodamin).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
Sediaan No. 19A.			
1.	0	0	3
2.	0	0	3
3.	0	1	2
4.	0	0	3
5.	0	0	3
6.	0	1	2
7.	0	0	3
8.	0	0	3
9.	0	0	2
10.	0	1	2
	-----	-----	-----
Jumlah:	0	3	26
Sediaan No. 19B.			
1.	0	0	3
2.	0	1	2
3.	0	0	3
4.	0	1	3
5.	0	0	3
6.	0	0	3
7.	0	0	2
8.	1	1	2
9.	0	1	2
10.	0	0	2
	-----	-----	-----
	1	4	25

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab. (fluoresensi hijau).  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab. dan memberikan fluoresensi merah.



Tabel 21L. Percobaan untuk menguji reproduibilitas dari uji EIFA VISUAL

Pengenceran serum :	No. sumur:											
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10	11.	12
-----												
Microplate 1.												
A. 1/256	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
B. 1/512	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
C. 1/1024	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+
D. 1/2048	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+
E. 1/4096	2+	2+	2+	2+	2+	2+	3+	2+	2+	2+	3+	2+
F. 1/8192	1+	1+	1+	1+	-	-	1+	1+	1+	1+	-	1+
G. 1/16384	-	-	-	-	-	-	-	1+	-	-	-	1+
H. Kontrol:	-	-	-	-	-	-	-	-	4+	3+	2+	1+
-----												
Microplate 2.												
A. 1/256	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
B. 1/512	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
C. 1/1024	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+
D. 1/2048	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+
E. 1/4086	2+	2+	1+	2+	2+	2+	3+	2+	2+	2+	3+	2+
F. 1/8192	1+	1+	1+	1+	2+	-	1+	1+	1+	1+	-	1+
G. 1/16384	-	-	-	-	1+	-	-	-	-	-	-	1+
H. Kontrol:	-	-	-	-	-	-	-	-	4+	3+	2+	1+

Keterangan kontrol:

- I. 1 - 4 tanpa serum
- II. 5 - 8 tanpa antiserum conl. 5 - 8
- III. 9-12 serum baku positif: 1, 2, 3 dan 4

Tabel 22L. Percobaan untuk menguji reproduibilitas dari uji EIFA VISUAL

Pengenceran serum :	No. sumur:											
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10	11.	12
-----												
Microplate 3.												
A. 1/256	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
B. 1/512	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
C. 1/1024	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	3+
D. 1/2048	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	3+
E. 1/4096	2+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	2+	3+	2+
F. 1/8192	1+	-	1+	1+	2+	-	1+	1+	1+	1+	-	1+
G. 1/16384	-	-	-	1+	-	-	-	-	-	1+	-	1+
H. Kontrol:	-	-	-	-	-	-	-	-	4+	3+	2+	1+
-----												
Microplate 4.												
A. 1/256	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
B. 1/512	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
C. 1/1024	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	3+
D. 1/2048	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	3+
E. 1/4086	2+	2+	1+	2+	3+	2+	2+	2+	1+	2+	3+	2+
F. 1/8192	1+	-	1+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
G. 1/16384	-	-	-	-	1+	-	-	-	-	1+	-	1+
H. Kontrol:	-	-	-	-	-	-	-	-	4+	3+	2+	1+

Keterangan kontrol:

- I. 1 - 4 tanpa serum
- II. 5 - 8 tanpa antiserum conl. 5 - 8
- III. 9-12 serum standard (high, medium, low titer)

## LAMPIRAN 13

Tabel 23L. Rekapitulasi uji Bact-EIFA dari 48 pengulangan (replicate) untuk uji reprodusibilitas.

Pengece- ran serum	Derajat fluoresen.	No. microplate:				Jumlah:
		I.	II.	III.	IV.	
1/256	4+	12	12	12	12	48
	3+	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0
1/512	4+	11	12	12	11	46
	3+	1	0	0	1	2
	2+	0	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0
1/1024	4+	10	11	10	10	41
	3+	2	1	2	2	7
	2+	0	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0
1/2048	4+	0	0	0	0	0
	3+	10	11	9	10	40
	2+	2	1	3	2	8
	1+	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0
1/4096	4+	0	0	0	0	0
	3+	2	2	1	2	7
	2+	10	9	9	8	36
	1+	0	1	2	2	5
	-	0	0	0	0	0
1/8192	4+	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0
	2+	0	1	1	2	4
	1+	9	9	8	8	34
	-	3	2	3	2	10
1/16384	4+	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0
	1+	1	2	2	3	8
	-	11	10	10	9	40

## Kesimpulan:

1. Pada pengenceran 1/256 derajat fluoresensi 4+:48/48= 100,00%
2. Pada pengenceran 1/512 derajat fluoresensi 4+:46/48= 95,83%

	3+: 2/48=	4,17%
3. Pada pengenceran 1/1024 derajat fluoresensi	4+: 41/48=	85,42%
	3+: 7/48=	14,58%
4. Pada pengenceran 1/2048 derajat fluoresensi	4+: 0	
	3+: 40/48=	83,33%
	2+: 8/48=	16,67%
5. Pada pengenceran 1/4096 derajat fluoresensi	4+: 0	
	3+: 7/48=	14,58%
	2+: 36/48=	75,00%
	1+: 5/48=	10,42%
6. Pada pengenceran 1/8192 derajat fluoresensi	4+: 0	
	3+: 0	
	2+: 4/48=	8,33%
	1+: 34/48=	70,83%
	- : 10/48=	20,84%
7. Pada pengenceran 1/16384 derajat fluoresensi	4+: 0	
	3+: 0	
	2+: 0	
	1+: 8/48=	16,67%
	- : 48/48=	83,33%

=====

Hasil uji Koefisien variasi dan Mc.Nemar:

Pengenceran:	Derajat Fl.:	Koef. variasi:	McNemar:
1:256	4+ (100%)	0%	P < 0.05
1:512	4+ (95.83%)	4.8780	P < 0.05
1:1024	4+ (85.42%)	5.0204%	P < 0.05
1:2048	3+ (83.33%)	6.7924%	P < 0.05
1:4096	2+ (75%)	8.1650%	P < 0.05
1:8192	1+ (70.83%)	10.1650%	P < 0.05

ANALISA STATISTIK DENGAN UJI McNEMAR DARI  
SERUM IMUN TUKUS DALAM 48 PENGULANGAN PADA  
PENGECERAN 1:256 SAMPAI 1:16.384

Ho : tidak terdapat perbedaan frekuensi antara  
kedua kelompok.

Tabel 28L.. Pengenceran 1:4096

	2+	Bukan 2+	Frek.
I.	+	+	0
II.	+	-	36
III.	-	+	12
IV.	-	-	0

Uji McNemar:

		Bukan 2+		Juml.	
		-	+		
2+	-	0	12	12	$\chi^2 = 11.0283$
	+	36	0	36	
		36	0	48	

Tabel 29L. . Pengenceran 1:8.192

	1+	Bukan 1+	Frek.
I.	+	+	0
II.	+	-	34
III.	-	+	14
IV.	-	-	0

Uji McNemar:

		Bukan 1+		Juml.	
		-	+		
1+	-	0	14	14	$\chi^2 = 7.5028$
	+	34	0	34	
		34	14	48	

LAMPIRAN 15

ANALISA STATISTIK DENGAN UJI McNEMAR DARI  
SERUM IMUN TUKUS DALAM 48 PENGULANGAN PADA  
PENGECERAN 1:256 SAMPAI 1:16.384

Ho : tidak terdapat perbedaan frekuensi antara  
kedua kelompok.

Tabel 26L.. Pengenceran 1:1024

	4+	3+	Frek.	
I.	+	-	0	
II.	+	-	41	
III.	-	+	7	
IV.	-	-	0	

Uji McNemar:

	3+		Juml.	
	-	+		
4+	0	7	7	$X^2 = 22.6875$
	41	0	41	
	48	0	48	

Tabel 27L.. Pengenceran 1:2048

	3+	2+	Frek.	
I.	+	+	0	
II.	+	-	40	
III.	-	+	8	
IV.	-	-	0	

Uji McNemar:

	2+		Juml.	
	-	+		
3+	0	8	8	$X^2 = 20.0208$
	40	0	40	
	40	8	48	

LAMPIRAN 16

ANALISA STATISTIK DENGAN UJI McNEMAR DARI  
SERUM IMUN TUKUS DALAM 48 PENGULANGAN PADA  
PENGECERAN 1:256 SAMPAI 1:16.384

Ho : tidak terdapat perbedaan frekuensi antara  
kedua kelompok.

Tabel 24L. Pengenceran 1:256

	4+	3+	Frek.
I.	+	-	0
II.	II.	+	48
III.	III.	-	0
IV.	IV.	-	0

Uji McNemar:

		3+		
		-	+	Juml.
4+	-	0	0	0
	+	48	0	48
		48	0	48

$X^2 = 46.0208$

Tabel 25L. Pengenceran 1:512

	4+	3+	Frek.
I.	+	+	0
II.	+	-	46
III.	-	+	2
IV.	-	-	0

Uji McNemar:

		3+		
		-	+	Juml.
4+	-	0	2	2
	+	46	0	46
		46	2	48

$X^2 = 38.5208$

ANALISA STATISTIK DENGAN UJI McNEMAR DARI  
SERUM IMUN TUKUS DALAM 48 PENGULANGAN PADA  
PENGECERAN 1:256 SAMPAI 1:16.384

Ho : tidak terdapat perbedaan frekuensi antara  
kedua kelompok.

Tabel 30L.. Pengenceran 1:16.384

	1+	NR	Frek.
I.	+	+	0
II.	+	-	8
III.	-	+	40
IV.	-	-	0

Uji McNemar:

	NR		Juml.
	-	+	
1+	0	40	40
	8	0	8
	8	40	48

$X^2 = 20.0208$

Kesimpulan analisa McNemar:

$X^2$  tabel pada  $\alpha=0.01$  adalah : 6.64  
Karena  $X^2$  hitung semua > 6.64, Ho diterima  
Masing-masing pasangan tidak menunjukkan  
adanya perbedaan bermakna.

Tabel 31. BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI ARTIFISIAL.  
PERBANDINGAN ANTARA NILAI ABSORBENS PADA UJI ELISA  
DENGAN TITER AKHIR (END POINT TITER) DENGAN UJI  
EIFA VISUAL UNTUK MENDETEKSI BBA.\*

=====  
Pengenceran anti E. coli antiserum : 10<sup>-1</sup>  
=====

Nomor:	ELISA:	EIFA	Nomor:	ELISA:	EIFA:
1.	0.4986	4+	11.	0.5339	4+
2.	0.4999	4+	12.	0.5401	4+
3.	0.5209	4+	13.	0.5379	4+
4.	0.5315	4+	14.	0.5431	4+
5.	0.5297	4+	15.	0.5531	4+
6.	0.5281	4+	16.	0.5521	4+
7.	0.5213	4+	17.	0.5561	4+
8.	0.5139	4+	18.	0.5562	4+
9.	0.4991	4+	19.	0.5481	4+
10.	0.5167	4+	20.	0.5431	4+

-----

Mean	:	0.53117
Deviasi standar	:	0.0187225
Nilai tertinggi	:	0.5562
Nilai terendah	:	0.4986

=====

\* Batas positif EIFA visual : derajat fluorensensi => 2+

**Tabel 33L. BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI ARTIFISIAL.  
PERBANDINGAN ANTARA NILAI ABSORBENS PADA UJI ELISA  
DENGAN TITER AKHIR (END POINT TITER) DENGAN UJI  
EIFA VISUAL UNTUK MENDETEKSI BBA.\***

=====

Pengenceran anti E. coli antiserum : 10<sup>-3</sup>

-----

Nomor:	ELISA:	EIFA	Nomor:	ELISA:	EIFA:
1.	0.0091	1+	11.	0.0092	1+
2.	0.0089	1+	12.	0.0091	1+
3.	0.0085	1+	13.	0.0094	1+
4.	0.0089	1+	14.	0.0093	1+
5.	0.0086	1+	15.	0.0081	1+
6.	0.0092	1+	16.	0.0084	1+
7.	0.0091	1+	17.	0.0094	1+
8.	0.0086	1+	18.	0.0094	1+
9.	0.0089	1+	19.	0.0081	1+
10.	0.0087	1+	20.	0.0092	1+

-----

Mean : 0.008905

Deviasi standar : 0.000411

Nilai tertinggi : 0.0094

Nilai terendah : 0.0081

=====

\* Batas positif EIFA visual : derajat fluorensensi => 2+

**Tabel 32L. BAKTERI BERLAPIS ANTIBODI ARTIFISIAL.  
PERBANDINGAN ANTARA NILAI ABSORBENS PADA UJI ELISA  
DENGAN TITER AKHIR (END POINT TITER) DENGAN UJI  
EIFA VISUAL UNTUK MENDETEKSI BBA.\***

=====

Pengenceran anti E. coli antiserum : 10<sup>-2</sup>

-----

Nomor:	ELISA:	EIFA	Nomor:	ELISA:	EIFA:
1.	0.4361	4+	11.	0.4131	4+
2.	0.4231	4+	12.	0.4131	4+
3.	0.4331	4+	13.	0.4379	4+
4.	0.4721	4+	14.	0.4501	4+
5.	0.4261	4+	15.	0.4599	4+
6.	0.4099	4+	16.	0.4531	4+
7.	0.4096	4+	17.	0.4491	4+
8.	0.4191	4+	18.	0.4631	4+
9.	0.4701	4+	19.	0.4681	4+
10.	0.4477	4+	20.	0.4181	4+

-----

Mean : 0.438625

Deviasi standar : 0.0214886

Nilai tertinggi : 0.4721

Nilai terendah : 0.4096

=====

\* Batas positif EIFA visual : derajat fluorensensi => 2+



Tabel 34L. Bakteri berlapis antibodi artifisial.  
Perbandingan antara nilai absorbens ELISA, derajat fluoresensi EIFA Visual dan hasil IF pada uji deteksi BBA.

=====

Suspensi kuman 10<sup>3</sup>

-----

Nomor:	ELISA:	EIFA	IF	No	ELISA:	EIFA:	IF
1.	0.0089	1+	+	1	0.0082	1+	+
2.	0.0123	2+	+	1	0.0121	2+	+
3.	0.0133	2+	+	1	0.0127	2+	+
4.	0.0091	1+	-	1	0.0105	1+	-
5.	0.0087	1+	+	1	0.0097	1+	+
6.	0.0127	2+	+	1	0.0082	1+	+
7.	0.0129	2+	+	1	0.0079	-	-
8.	0.0109	1+	-	1	0.0112	1+	+
9.	0.0058	-	-	1	0.0131	2+	+
10.	0.0099	1+	+	2	0.0109	1+	+

-----

KESIMPULAN:	ELISA	EIFA	IF
POSITIP:	7	8	15
NEGATIP:	13	12	5

=====

\* Batas positip EIFA visual : derajat fruooresensi => 2+

Tabel 35L. Bakteri berlapis antibodi artifisial.  
Perbandingan antara nilai absorbens ELISA, derajat fluoresensi EIFA Visual dan hasil IF pada uji deteksi BBA.

=====

Suspensi kuman 10<sup>4</sup>

-----

Nomor:	ELISA:	EIFA	IF	No	ELISA:	EIFA:	IF:
1.	0.0115	2+	+	11.	0.0131	2+	+
2.	0.0095	1+	+	12.	0.0113	2+	-
3.	0.0120	2+	+	13.	0.0114	1+	+
4.	0.0107	1+	-	14.	0.0105	1+	+
5.	0.0089	1+	+	15.	0.0139	2+	+
6.	0.0087	1+	+	16.	0.0135	2+	+
7.	0.0121	2+	-	17.	0.0091	1+	-
8.	0.0119	2+	+	18.	0.0133	2+	+
9.	0.0141	2+	+	19.	0.0111	1+	+
10.	0.0119	2+	+	20.	0.0120	2+	+

-----

Kesimpulan:	ELISA	EIFA	IF
Positip:	11	12	16
Negatip:	9	8	4

=====

\* Batas positip EIFA visual : derajat fruooresensi => 2+  
Batas positip ELISA : nilai absorbens => 0.0127 Noor Rachman

**Tabel 37L. Bakteri berlapis antibodi artifisial.**  
Perbandingan antara nilai absorbens ELISA, derajat fluoresensi EIFA Visual dan hasil IF pada uji deteksi BBA.

=====

Suspensi kuman 10<sup>6</sup>

-----

Nomor:	ELISA:	EIFA:	IF:	Nomor:	ELISA:	EIFA:	IF:
1.	0.0636	3+	+	11.	0.0691	3+	+
2.	0.0675	3+	+	12.	0.0621	3+	+
3.	0.0676	3+	+	13.	0.0601	3+	+
4.	0.0707	3+	+	14.	0.0651	3+	+
5.	0.0709	3+	+	15.	0.0681	3+	+
6.	0.0701	3+	+	16.	0.0703	3+	+
7.	0.0695	3+	+	17.	0.0702	3+	+
8.	0.0699	3+	+	18.	0.0603	3+	+
9.	0.0642	3+	-	19.	0.0641	3+	+
10.	0.0698	3+	+	20.	0.0709	3+	+

-----

Kesimpulan:

	ELISA	EIFA	IF
Positip:	20	20	20
Negatip:	0	0	0

=====

\* Batas positip EIFA visual : derajat fluoresensi => 2+  
Batas positip ELISA : nilai absorbens => 0.0117

**Tabel 36L. Bakteri berlapis antibodi artifisial.**  
Perbandingan antara nilai absorbens ELISA, derajat fluoresensi EIFA Visual dan hasil IF pada uji deteksi BBA.

=====

Suspensi kuman 10<sup>5</sup>

-----

Nomor:	ELISA:	EIFA:	IF:	No:	ELISA:	EIFA:	IF:
1.	0.0223	2+	+	11.	0.0263	2+	+
2.	0.0224	2+	-	12.	0.0253	2+	+
3.	0.0243	2+	+	13.	0.0249	2+	+
4.	0.0234	2+	-	14.	0.0261	2+	+
5.	0.0221	2+	-	15.	0.0231	2+	+
6.	0.0225	2+	-	16.	0.0221	2+	+
7.	0.0238	2+	+	17.	0.0221	2+	-
8.	0.0249	2+	+	18.	0.0223	2+	+
9.	0.0253	2+	+	19.	0.0235	2+	+
10.	0.0265	2+	+	20.	0.0265	2+	+

-----

Kesimpulan:

	ELISA	EIFA	IF
Positip:	20	20	15
Negatip:	0	0	5

=====

\* Batas positip EIFA visual : derajat fluoresensi => 2+  
Batas positip ELISA : nilai absorbens => 0.0117

Tabel 38L. Bakteri berlapis antibodi artifisial.  
Perbandingan antara nilai absorbens ELISA,  
derajat fluoresensi EIFA VISUAL dan hasil  
IF pada uji deteksi BBA.

=====

Suspensi kuman 10<sup>7</sup>

-----

Nomor:	ELISA:	EIFA:	IF:	Nomor:	ELISA:	EIFA:	IF:
1.	0.1555	4+	+	11.	0.1574	4+	+
2.	0.1605	4+	+	12.	0.1472	4+	+
3.	0.1551	4+	+	13.	0.1475	4+	+
4.	0.1558	4+	+	14.	0.1491	4+	+
5.	0.1559	4+	+	15.	0.1601	4+	+
6.	0.1553	4+	+	16.	0.1613	4+	+
7.	0.1569	4+	+	17.	0.1649	4+	+
8.	0.11591	4+	+	18.	0.1649	4+	+
9.	0.1495	4+	+	19.	0.1601	4+	+
10.	0.1485	4+	+	20.	0.1589	4+	+

-----

Kesimpulan:

	ELISA	EIFA	IF
Positip:	20	20	20
Negatip:	0	0	0

=====

\* Batas positip EIFA visual : derajat fruoeresensi => 2+  
Batas positip ELISA : nilai absorbens => 0.0117

Tabel 39L. Bakteri berlapis antibodi artifisial.  
Perbandingan antara nilai absorbens ELISA,  
derajat fluoresensi EIFA VISUAL dan hasil  
IF pada uji deteksi BBA.

=====

Suspensi kuman 10<sup>8</sup>

-----

Nomor:	ELISA:	EIFA:	IF:	Nomor:	ELISA:	EIFA:	IF:
1.	0.1805	4+	+	11.	0.1955	4+	+
2.	0.1813	4+	+	12.	0.1961	4+	+
3.	0.1979	4+	+	13.	0.1975	4+	+
4.	0.1983	4+	+	14.	0.2028	4+	+
5.	0.1875	4+	+	15.	0.2001	4+	+
6.	0.1845	4+	+	16.	0.2001	4+	+
7.	0.1901	4+	+	17.	0.2025	4+	+
8.	0.1905	4+	+	18.	0.2028	4+	+
9.	0.1991	4+	+	19.	0.1985	4+	+
10.	0.1915	4+	+	20.	0.1991	4+	+

-----

Kesimpulan:

	ELISA	EIFA	IF
Positip:	20	20	20
Negatip:	0	0	0

=====

\* Batas positip EIFA visual : derajat fruoeresensi => 2+  
Batas positip ELISA : nilai absorbens => 0.0117

Tabel 40L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
Sediaan No. 1GPKa.			
1.	0	1	1
2.	0	1	1
3.	0	0	2
4.	0	1	2
5.	0	1	1
6.	1	0	2
7.	0	0	1
8.	0	0	2
9.	0	1	1
10.	0	1	1
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	6	14
Sediaan No. 1GPKi.			
1.	0	1	2
2.	1	1	1
3.	0	1	0
4.	0	0	2
5.	0	1	2
6.	1	1	1
7.	0	1	0
8.	0	0	1
9.	0	0	3
10.	0	0	3
	-----	-----	-----
Jumlah:	2	6	15
=====			

Keterangan :  
 Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 41L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
Sediaan No. 2GPKa.			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	1
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	1
9.	0	1	0
10.	0	0	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	0	1	2
Sediaan No. 2GPKi.			
1.	1	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	1	1
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	1
9.	0	0	0
10.	0	0	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	1	2
=====			

Keterangan :  
 Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 42L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 3GPKa.			
1.	0	1	1
2.	0	1	1
3.	0	0	3
4.	1	1	2
5.	0	1	2
6.	0	1	1
7.	0	1	1
8.	0	1	1
9.	0	0	3
10.	0	0	2
Jumlah:	1	7	17
Sediaan No. 3GPK1.			
1.	0	0	3
2.	0	1	1
3.	0	1	0
4.	1	0	1
5.	0	1	2
6.	0	1	1
7.	0	0	2
8.	0	1	1
9.	0	1	1
10.	0	1	2
Jumlah:	1	7	14

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 43L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 4GPKa.			
1.	0	0	3
2.	0	1	1
3.	0	1	1
4.	0	0	1
5.	0	1	1
6.	0	0	1
7.	0	1	2
8.	0	1	1
9.	0	0	2
10.	0	0	3
Jumlah:	0	5	16
Sediaan No. 4GPK1.			
1.	0	0	3
2.	0	1	1
3.	0	1	0
4.	1	0	2
5.	0	1	1
6.	0	1	2
7.	0	0	1
8.	0	0	2
9.	0	1	1
10.	0	1	2
Jumlah:	1	6	15

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 44L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
----------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

Sediaan No. 5GPKa.

1.	1	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	1	1
5.	0	0	0
6.	0	1	0
7.	0	1	1
8.	0	1	0
9.	0	1	0
10.	0	0	0

Jumlah: 1 5 2

Sediaan No. 5GPKi.

1.	0	0	1
2.	0	1	0
3.	0	0	1
4.	1	0	3
5.	0	1	1
6.	0	1	1
7.	0	1	2
8.	0	1	2
9.	0	0	3
10.	0	0	2

Jumlah: 1 5 16

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 45L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
----------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

Sediaan No. 6GPKa.

1.	0	1	0
2.	0	1	0
3.	0	1	0
4.	0	0	1
5.	0	1	0
6.	0	0	0
7.	0	0	1
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	1	0

Jumlah: 0 5 2

Sediaan NO. 6GPKi.

1.	0	1	0
2.	0	0	3
3.	0	1	1
4.	0	0	2
5.	0	1	2
6.	1	1	1
7.	0	0	2
8.	0	2	1
9.	0	0	2
10.	0	1	1

Jumlah: 1 7 15

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 46L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
----------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

Sediaan No. 7GPKa.

1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	1	0	1
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0

Jumlah: 1 0 1

Sediaan No. 7GPK1.

1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	1	0
8.	1	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0

Jumlah: 1 1 0

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 47L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
----------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

Sediaan No. 8GPKa.

1.	0	0	2
2.	0	2	2
3.	0	0	1
4.	0	0	3
5.	0	1	1
6.	0	2	1
7.	0	1	2
8.	0	1	1
9.	0	1	2
10.	0	1	2

Jumlah: 0 9 17

Sediaan No. 8GPK1.

1.	0	0	3
2.	0	1	1
3.	0	1	0
4.	0	0	2
5.	0	1	1
6.	0	0	3
7.	0	1	1
8.	0	0	2
9.	0	1	1
10.	0	0	1

Jumlah: 0 5 15

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 48L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
----------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

Sediaan No. 9GPKa.

1.	0	1	0
2.	0	1	1
3.	0	0	1
4.	1	0	2
5.	0	1	2
6.	0	1	1
7.	0	1	1
8.	0	1	2
9.	0	0	3
10.	0	1	1

Jumlah: 1 7 14

Sediaan No. 9GPKi.

1.	0	1	1
2.	0	0	2
3.	0	1	1
4.	0	0	2
5.	0	0	2
6.	0	1	1
7.	0	0	3
8.	0	1	1
9.	0	1	3
10.	0	1	0

Jumlah: 0 6 16

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 49L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
----------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

Sediaan No. 10GPKa.

1.	0	1	0
2.	0	1	2
3.	0	0	3
4.	1	1	1
5.	0	0	1
6.	0	0	2
7.	0	0	2
8.	0	1	1
9.	0	1	1
10.	0	0	2

Jumlah: 1 5 15

Sediaan No. 10GPKi.

1.	0	1	1
2.	0	0	3
3.	0	1	1
4.	1	0	2
5.	0	0	2
6.	0	1	1
7.	0	0	1
8.	1	0	2
9.	0	0	3
10.	0	1	1

Jumlah: 2 4 17

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.



Tabel 50L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:HH1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 11GPKa.			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	1	0	1
5.	0	0	1
6.	0	0	0
7.	0	1	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
Jumlah:	1	1	2
Sediaan No 11GPK1.			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	1
9.	0	0	0
10.	0	0	0
Jumlah:	0	0	1

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 51L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 12GPKa.			
1.	0	1	2
2.	0	0	1
3.	0	1	0
4.	1	0	2
5.	0	1	1
6.	0	1	2
7.	0	0	2
8.	0	1	1
9.	0	0	2
10.	0	0	3
Jumlah:	1	5	16
Sediaan No. 12GPK1.			
1.	0	1	1
2.	0	1	2
3.	1	0	0
4.	0	1	1
5.	0	0	2
6.	0	0	1
7.	1	1	1
8.	0	0	2
9.	0	1	1
10.	0	0	2
Jumlah:	2	5	13

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 52L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
Sediaan No. 13GPKa.			
1.	0	0	0
2.	1	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	1	1
7.	1	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	1	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	2	2	1
Sediaan No. 13GPKi.			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	1	1	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	1	0	0
10.	0	0	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	2	1	0
=====			

Keterangan :  
 Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 53L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
-----			
Sediaan No. 14GPKa.			
1.	1	0	2
2.	0	0	2
3.	0	1	1
4.	0	1	2
5.	0	0	2
6.	0	1	2
7.	0	0	1
8.	0	1	2
9.	0	1	1
10.	0	0	2
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	5	17
Sediaan No. 14GPKi.			
1.	0	1	1
2.	0	0	2
3.	0	1	2
4.	0	0	1
5.	1	1	1
6.	0	1	2
7.	0	1	1
8.	0	0	2
9.	0	0	2
10.	0	1	2
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	6	16
=====			

Keterangan :  
 Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 54L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan suspensi E. coli O6:K13:H1.

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
=====			
Sediaan No. 15GPKa.			
1.	1	1	1
2.	0	1	1
3.	0	1	1
4.	0	0	2
5.	0	2	0
6.	0	0	2
7.	0	1	1
8.	0	0	1
9.	0	0	2
10.	0	1	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	7	11
Sediaan No. 15GPKi.			
1.	0	1	2
2.	0	0	2
3.	0	1	1
4.	0	0	2
5.	0	1	1
6.	0	1	1
7.	0	0	2
8.	0	1	2
9.	0	1	1
10.	1	0	2
	-----	-----	-----
Jumlah:	1	6	16
=====			

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 55L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan medium steril (kontrol)

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
=====			
Sediaan No. 16GKi.			
1.	0	0	0
2.	1	0	0
3.	0	1	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	1	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	2	1	0
Sediaan No. 17GKi.			
1	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	1	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
	-----	-----	-----
Jumlah:	0	1	0
=====			

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 56L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan medium steril (kontrol).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 18GKi.			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	1	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
Jumlah:	0	1	0
Sediaan No. 19GKi.			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	1	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
Jumlah:	1	0	0

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 57L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan medium steril (kontrol).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 20GPKi.			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	1	2	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
Jumlah:	1	2	0
Sediaan No. 21GPKi.			
1.	0	0	0
2.	0	1	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	1	0
Jumlah:	0	2	0

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 58L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan medium steril (kontrol).

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 22GPK1.			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	1	1	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	1	0	0
Jumlah:	2	1	0
Sediaan No. 23GPK1.			
1	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	1	0
Jumlah:	1	1	0

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

Tabel 59L. Hasil Pengamatan Imunofluoresensi sel pemb. Ab. spesifik terhadap E. coli O6:K13:H1 dalam jaringan ginjal 14 hari pasca inokulasi intrauretral dengan medium steril (kontrol)

Lapang pandang	Ig dalam sel - Gumpal.bakt. +	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. -	Ig dalam sel + Gumpal.bakt. +
Sediaan No. 24GPK1.			
1.	0	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	1	0	0
Jumlah:	1	0	0
Sediaan No. 25GPK1.			
1	1	0	0
2.	0	0	0
3.	0	0	0
4.	0	1	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	0	0	0
Jumlah:	2	1	0

Keterangan :

Ig dalam sel : imunoglobulin dalam sitoplasma sel pemb. Ab.  
 Gumpal.bakt. : gumpalan bakteri yang terdapat pada permukaan sel pemb. Ab.

KURIKULUM VITE

Nama : Noor Rachman  
Tempat dan tanggal lahir : Jember, 20 - 12 - 1933  
Agama : Islam  
Status perkawinan : Kawin  
Pangkat / golongan : Pembina Utama Muda / IVc  
NIP : 130162010  
Jabatan : Lektor Kepala pada Laboratorium  
Mikrobiologi Fakultas kedokteran  
UNAIR  
Alamat : Jl. Darmawangasa Dalam Selatan 10  
Surabaya.  
Alamat Kantor : Jl. Darmahusada 47 Surabaya.

RIWAYAT PENDIDIKAN

- Pendidikan Dasar :  
Sekolah dasar 1938 - 1945  
Sekolah Menengah Pertama 1945 - 1950  
Sekolah Menengah Atas 1950 -1953
  
- Pendidikan Sarjana :  
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga 1953 -  
1961

- Pendidikan Pasca Sarjana / Tambahan:

Training dalam bidang Mikrobiologi di UCLA Los Angeles, USA. 1962 - 1963

Brevet Mikrobiologi 1970

Training dalam Mikroskopi Fluoresensi di NAMRU Jakarta 1970

Training dalam Advanced Serology di Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan, 1982

Tanda Keahlian: Ahli Mikrobiologi Klinik 1988

RIWAYAT PEKERJAAN

1 - 2 - 1959 : mulai bekerja di Fakultas Kedokteran UNAIR sebagai Pegawai bulanan dengan pangkat Asisten Ahli (gol. F/I) di Bagian Ilmu Kuman-kuman dan Kesehatan.

1 - 2 - 1960 : Pegawai bulanan (Asisten Ahli) gol. F/II di Bagian Ilmu Kuman-kuman dan Kesehatan.

1 - 2 - 1961 : Pegawai Negeri dengan pangkat Asisten Ahli (gol. F/II) di Bagian Ilmu Kuman-kuman dan Kesehatan.

1 - 2 - 1964 : Asisten Ahli Tk. I (gol. F/III) di Bagian Ilmu Kuman-kuman dan Kesehatan.

1 - 7 - 1964 : Lektor Muda (gol. F/III) dalam mata pelajaran Ilmu Kuman-kuman dan Kesehatan.

1 - 12 - 1967 : Lektor (gol. F/IV) dalam mata pelajaran Ilmu Kuman-kuman dan Kesehatan.

1 - 1 - 1968 : Pembina / Lektor (gol. IV/a) dalam mata pelajaran Ilmu Kuman-kuman dan Kesehatan.

- 1 - 4 - 1973 : Pembina Tk. I / Lektor Kepala (gol. IV/b) dalam mata pelajaran Mikrobiologi.
- 1 - 4 - 1977 : Pembina Utama Muda / Lektor Kepala (gol. IV/c) dalam mata pelajaran Mikrobiologi.
- 1979 - 1980 : Dosen luar biasa dalam mikrobiologi pada Pendidikan Ahli Laboratorium Kesehatan.
- 1981 sampai sekarang: Staf pengajar pada Pendidikan Pasca Sarjana Bidang Studi Ilmu Kedokteran Dasar
- 1982 - 1984 : Ketua Program Mikrobiologi pada Fakultas Pasca Sarjana UNAIR

#### TANDA KEHORMATAN

- 4 - 4 - 1987 Tanda Kehormatan Satyalencana Karya Sapta Tingkat II.

#### KEANGGUTAAN PROFESI

- Ikatan Dokter Indonesia (IDI)
- American Society for Microbiology (ASM)
- Perhimpunan Pemberantasan Penyakit Parasit Indonesia (P4I)
- Perhimpunan Alergi dan Imunologi Indonesia (PERALMUNI)
- Persatuan Ahli Mikrobiologi Klinik Indonesia (PAMKI)
- Perhimpunan Parasitologi dan Mikrobiologi Kedokteran Indonesia (PPMKI)

#### KARYA ILMIAH

##### I. Sebagai penulis Utama:

##### A. Tingkat Nasional:

1. Peranan komplemen dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi.



Dimuat dalam buku prosiding Simposium Alergi - Imunologi di Surabaya 5 September 1981.

2. Soluble immune complex dan penyakit-penyakit pada manusia.

Dimuat dalam buku prosiding Simposium Autoimunitas dan penyakit autoimun di klinik di Surabaya 23 Oktober 1982.

3. Penentuan kadar zat anti terhadap antigen O dan H dari *Salmonella typhi* dalam serum dengan menggunakan cara diffusion in agar thin layer immunoassay (DIG-TIA).

Dimuat dalam buku laporan Lembaga Penelitian Universitas Airlangga 1982/1983.

4. Metoda biakan tetes pada media CLED untuk menentukan jumlah kuman dalam air kemih.

Dibacakan dalam Temu Ilmiah Perkimpunan Parasitologi dan Mikrobiologi Kedokteran Indonesia di Yogyakarta 1986.

## II. Sebagai penulis pembantu:

### A. Tingkat nasional:

1. Aspek imunologi dari kesehatan mulut dan gigi.

Dimuat dalam buku laporan Lembaga Penelitian Universitas Airlangga 1981/1982.

2. Penentuan kadar imunoglobulin dan analisa gambaran

imunoelektroforesis dari sera penderita diare menahun di Bagian Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Dr. Sutomo / Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Dimuat dalam buku laporan Lembaga Penelitian Universitas Airlangga 1982/1983.

3. Perbandingan hasil pemeriksaan serologic test for syphilis, VDRL test dengan microhaemagglutination Treponema pallidum test (MHA-TP test) dari sera wanita tuna susila didaerah lokasi Kotamadya Surabaya.

Dimuat dalam buku laporan Lembaga Penelitian Universitas Airlangga 1982/1983.

4. Penggunaan fotogram untuk pembacaan hasil uji kepekaan antibiotika.

Dikemukakan pada Pertemuan Ilmiah Perhimpunan Akhli Mikrobiologi Klinik Indonesia (PAMKI) di Surabaya, 1988.

B. Tingkat internasional:

1. Surveillance of Japanese Encephalitis Virus in Hyogo Prefecture, Japan by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Preliminary Report)

Dimuat dalam ICMR Annals vol. 3. 1983