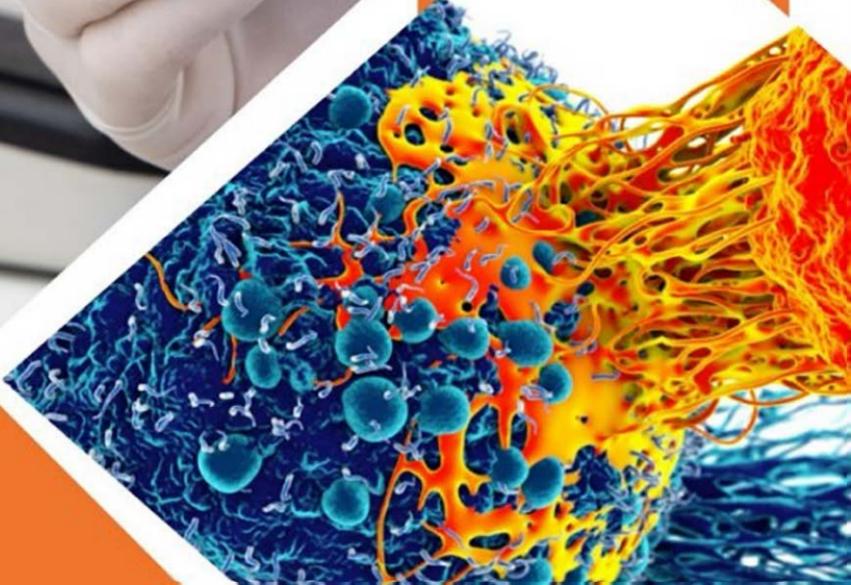




PUJI ASTUTI & SARI EKA PRATIWI

IMMUNOASSAY



IMMUNOASSAY



Buku ini tidak diperjualbelikan.

UU No 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta

Fungsi dan Sifat Hak Cipta Pasal 4

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

Pembatasan Pelindungan Pasal 26

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i. Penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii. penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii. penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv. penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

Sanksi Pelanggaran Pasal 113

1. Setiap orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000,00 (seratus juta rupiah).
2. Setiap orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).



IMMUNOASSAY

PUJI ASTUTI & SARI EKA PRATIWI



YAYASAN PENDIDIKAN
CENDEKIA MUSLIM

Buku ini tidak diperjualbelikan.

IMMUNOASSAY

**Puji Astuti
Sari Eka Pratiwi**

Editor:
Jenni Tria Ananda

Desainer:
Nur Aziza

Sumber Gambar Kover:
www.canva.com

Penata Letak:
Jenni Tria Ananda

Proofreader:
Tim YPCM

Ukuran:
xiv, 152 hlm, 15,5 x 23 cm

ISBN:
978-623-8667-00-0

Cetakan pertama:
Juni 2024

Hak cipta dilindungi undang-undang
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

**Anggota IKAPI: 027/Anggota Luar Biasa/SBA/21
YAYASAN PENDIDIKAN CENDEKIA MUSLIM**

Jorong Pale, Nagari Pematang Panjang, Kecamatan Sijunjung,
Kabupaten Sijunjung, Provinsi Sumatra Barat – Indonesia 27554
HP/WA: 0853-6336-7395

Website: www.cendekiamuslim.com
E-mail: cendekiamuslimpress@gmail.com
Marketplace: <http://store.cendekiamuslim.or.id/>

Buku ini tidak diperjualbelikan.

DAFTAR ISI

| | |
|--|-----|
| Prakata ----- | vii |
| Daftar Singkatan ----- | xi |
| BAB I Pendahuluan ----- | 1 |
| | |
| BAB II Pengantar Imunologi ----- | 5 |
| A. Sel-Sel pada Sistem Imun ----- | 6 |
| B. Organ Sistem Imun ----- | 16 |
| C. Respons Imun Bawaan (<i>Innate</i>) ----- | 23 |
| D. Respons Imun Adaptif ----- | 27 |
| | |
| BAB III Limfosit B dan Produksi Antibodi----- | 33 |
| A. Imunoglobulin dan Strukturnya ----- | 33 |
| B. Tipe Atau Jenis Imunoglobulin ----- | 35 |
| C. Reseptor Sel B ----- | 41 |
| D. Perkembangan dan Fungsi Sel Limfosit B----- | 43 |
| E. Aktivasi Sel B ----- | 44 |
| F. Fungsi dan Prinsip Kerja Antibodi ----- | 46 |
| | |
| BAB IV Prinsip Interaksi Antigen-Antibodi----- | 49 |
| A. Antigen dan Imunogen----- | 50 |
| B. Patogen----- | 54 |
| 1. Virus----- | 55 |

Buku ini tidak diperjualbelikan.

| | |
|--|-----|
| 2. Bakteri----- | 60 |
| 3. Parasit ----- | 70 |
| C. Pemanfaatan Interaksi Antigen-Antibodi pada <i>Immunoassay</i> ----- | 77 |
| BAB V Pemeriksaan Imunologi dengan Sampel Jaringan ----- | 87 |
| A. Imunohistokimia ----- | 88 |
| B. Imunofluoresensi ----- | 97 |
| BAB VI Pemeriksaan Imunologi pada Perhitungan Sel ----- | 105 |
| A. Immunofluoresensi pada Sel ----- | 105 |
| B. <i>Flow Cytometry</i> ----- | 110 |
| BAB VII Pemeriksaan Imunologi pada Sampel Cairan Tubuh----- | 117 |
| A. Presipitasi ----- | 117 |
| B. Aglutinasi ----- | 119 |
| C. <i>Radioimmunoassay</i> (Ria) ----- | 121 |
| D. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Elisa) --- | 124 |
| E. <i>Chemiluminescence</i> ----- | 127 |
| F. <i>Western Blotting</i> ----- | 128 |
| G. Immunopresipitasi ----- | 129 |
| Penutup ----- | 131 |
| Referensi----- | 133 |

Buku ini tidak diperjualbelikan.

| | |
|------------------------|-----|
| Glosarium ----- | 143 |
| Index ----- | 147 |
| Biografi Penulis ----- | 151 |

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

PRAKATA

Dalam era modern ini, ilmu pengetahuan dan teknologi terus berkembang dengan pesat, membawa perubahan signifikan dalam berbagai bidang, termasuk kedokteran dan biologi molekular. Salah satu perkembangan yang menonjol adalah teknik *immunoassay*, yang telah menjadi alat penting dalam penelitian dan diagnosis medis. Buku ini hadir untuk memberikan wawasan mendalam tentang dasar-dasar imunologi dan aplikasi praktis dari teknik *immunoassay*.

Buku ini dimulai dengan pengantar imunologi termasuk pembahasan terkait limfosit B dan produksi antibodi yang dirancang untuk memberikan landasan yang kuat bagi pembaca dalam memahami konsep-konsep dasar yang akan digunakan dalam bab-bab selanjutnya terutama terkait bagaimana *immunoassay* bekerja. Bagian selanjutnya pada buku ini membahas prinsip interaksi antigen-antibodi, serta berbagai teknik pemeriksaan imunologi pada sampel jaringan, sel, dan cairan tubuh.

Kami berharap buku ini dapat menjadi referensi yang bermanfaat bagi mahasiswa, peneliti, dan praktisi di bidang kedokteran dan biologi molekular. Dengan pemahaman yang baik tentang prinsip dan aplikasi teknik *immunoassay*, diharapkan pembaca dapat mengembangkan dan mengaplikasikan

pengetahuan ini untuk kemajuan ilmu pengetahuan dan peningkatan kesehatan masyarakat.

Akhir kata, kami ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam penyusunan buku ini. Semoga buku ini dapat memberikan manfaat dan inspirasi bagi para pembaca dalam mengeksplorasi lebih jauh dunia imunologi dan teknik *immunoassay*.

Mei, 2024

Penulis

Buku ini tidak diperjualbelikan.

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|----------|--|
| APC | : <i>Antigen Presenting Cells</i> |
| BCG | : <i>Bacillus Calmette-Guerin</i> |
| BCR | : <i>B cell receptor</i> |
| BCR | : <i>B-cell antigen receptor complex</i> |
| BPH | : <i>Benign Prostate Hyperplasia</i> |
| CD4 | : <i>Cluster of differentiation No. 4</i> |
| CD8 | : <i>Cluster of differentiation No. 8</i> |
| COVID-19 | : <i>Coronavirus disease</i> |
| CRISPR | : <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> |
| CS | : <i>circumsporozoit</i> |
| DC | : <i>Dendritic Cell</i> |
| DNA | : <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| ELISA | : <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| ER | : <i>Estrogen Hormone</i> |
| FC | : <i>Flow Cytometry</i> |
| FFPE | : <i>Formalin fixed paraffin embedded</i> |
| FSC | : <i>Forward Scatter</i> |
| GFP | : <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| HAMA | : <i>human anti mouse antibody</i> |
| HER2 | : <i>human epidermal growth factor 2</i> |
| HER2 | : <i>human growth factor receptor 2</i> |

Buku ini tidak diperjualbelikan.

| | |
|-------|---|
| HEV | : <i>high endothelial venules</i> |
| HGPIN | : <i>High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia</i> |
| HIER | : <i>Heat induced epitope retrieval</i> |
| HLA | : <i>Human Leucocytes Antigen</i> |
| HPV | : <i>Human Papilloma Virus</i> |
| HRP | : <i>horseradish peroxidase</i> |
| HRP2 | : <i>Histidine Rich Protein 2</i> |
| HSC | : <i>Hematopoietic stem cells</i> |
| IF | : <i>Immunofluoresensi</i> |
| IHK | : <i>Imunohistokimia</i> |
| ITAM | : <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| KGB | : Kelenjar Getah Bening |
| LPS | : Lipopolisakarida |
| MALT | : <i>mucosa associated lymphoid tissue</i> |
| MHC | : <i>major histocompatibility complex</i> |
| NBF | : <i>neutral buffered formalin</i> |
| PAF | : <i>platelet activating factor</i> |
| PAMP | : <i>pathogen associated molecular patterns</i> |
| PCR | : <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PfEMP | : <i>P. falciparum</i> eritrosit membran protein |
| pIgR | : <i>polymeric immunoglobulin receptor</i> |
| PMN | : <i>polimormonuklear</i> |
| PR | : <i>Progesterone Hormone</i> |
| PRAD | : <i>Prostate Adenocarcinoma</i> |

| | |
|----------|--|
| PRR | : <i>pattern recognition receptors</i> |
| RIA | : <i>Radioimmunoassay</i> |
| RNA | : <i>Ribonucleic acid</i> |
| SDS | : <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SDS-PAGE | : SDS-polyacrylamide |
| SSC | : <i>Side Scatter</i> |
| TCR | : <i>T-cell receptor</i> |
| TCR | : <i>T-cell antigen receptors</i> |
| TFH | : <i>T follicular helper</i> |
| TLR | : <i>toll-like receptors</i> |
| TLS | : <i>Tertiary Lymphoid Structure</i> |
| TNF-a | : <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> |

Buku ini tidak diperjualbelikan.

BAB I

PENDAHULUAN

Perkembangan teknik *immunoassay* di awali dengan investigasi antigenisitas suatu molekul berukuran kecil yang dilakukan oleh Landsteiner pada tahun 1917. Landsteiner menemukan bahwa spesifisitas dari suatu molekul karier dapat berubah apabila protein tersebut berikatan dengan suatu molekul lain, dimana molekul baru tersebut awalnya tidak memiliki sifat imunogenitas tertentu. Temuan ini selanjutnya berkembang dengan ditemukannya sifat spesifisitas dari antisera tertentu. Sementara itu, *assay* pertama yang dikembangkan dengan menggunakan prinsip *immunoassay* adalah *assay* yang dikembangkan oleh Berson dan Yallow pada tahun 1959, dengan memanfaatkan ligand yang terkonjugasi dengan radiolabel untuk mendeteksi sampel target (1).

Immunoassay merupakan metode bioanalitik yang digunakan untuk menghitung sejumlah analit berdasarkan reaksi yang terjadi antara antigen (analit) dengan antibodi. Prinsip kerja dari *immunoassay* ini adalah dengan memanfaatkan reaksi yang terbentuk antara suatu analit atau antibodi berlabel yang jumlahnya diketahui dengan sampel (berupa antigen ataupun antibodi) yang tidak diketahui jumlahnya. Kompleks imun yang terbentuk antara ikatan antigen-antibodi (Ag-Ab) ini terjadi

karena adanya reaksi yang sangat spesifik antara keduanya. Kompleks imun yang terbentuk selanjutnya akan dipisahkan dari antigen ataupun antibodi yang tidak terikat sehingga hanya kompleks imun saja yang tersisa di dalam *assay*. Kompleks imun selanjutnya dapat dianalisis dan diukur jumlahnya secara kualitatif maupun kuantitatif dengan berbagai metode seperti radiasi, fluoresen, maupun dengan menggunakan enzim (2).

Sistem deteksi pada *immunoassay* bergantung pada suatu *marker* / penanda yang telah diberi label (label dapat berupa radioisotope ataupun enzim) yang nantinya akan berikatan dengan reagen immunologi pada sampel seperti antigen atau antibodi. Penggunaan label ini akan menghasilkan persentase keberhasilan yang tinggi dengan hasil deteksi yang sangat sensitif serta dapat diterapkan pada berbagai target sampel (analit) pada berbagai sampel biologis (2).

Metode pemeriksaan berbasis *immunoassay* ini banyak digunakan di berbagai bidang kehidupan seperti untuk mendeteksi berbagai jenis penyakit, memonitor terapi dengan obat tertentu, uji farmakokinetik klinis, penemuan berbagai jenis obat maupun untuk berbagai kebutuhan di industri farmasi (3). Analisis yang dilakukan dengan memanfaatkan teknik *immunoassay* ini umumnya menggunakan sampel dengan konsentrasi yang sangat kecil maupun melibatkan berbagai molekul dengan berat jenis yang sangat kecil. Pada dunia kesehatan, sering kali teknik ini digunakan untuk mendeteksi ada

tidaknya suatu penyakit maupun digunakan untuk mendeteksi prognosis suatu penyakit (4).

Pemanfaatan *immunoassay* juga banyak digunakan pada berbagai penelitian di bidang biologi molekular. Sebagai contoh, *immunoassay* dapat digunakan sebagai *marker* untuk mendeteksi *neutrophil* yang mengalami kematian sel akibat pembentukan *Neutrophil Extracellular Nets* (NETs), *marker* untuk visualisasi mitokondria otot, maupun penyortiran sel tertentu yang ditargetkan (5–7).

Perkembangan teknologi di dunia riset dan teknologi diikuti dengan perkembangan teknik pemeriksaan berbasis *immunoassay*. Meskipun teknologi yang digunakan terus berubah, namun prinsip kerja dari teknik pemeriksaan berbasis *immunoassay* pada prinsipnya akan tetap sama. Oleh sebab itu, pada buku ini akan dibahas berbagai prinsip kerja dari teknik pemeriksaan *immunoassay*. Selain itu, akan dibahas pula prinsip dasar dari imunologi dan interaksi antigen-antibodi yang menjadi dasar pemeriksaan *immunoassay*. Bab II akan mengantar pembaca pada dasar-dasar imunologi, termasuk sel-sel dan organ-organ sistem imun serta respons imun bawaan dan adaptif. Bab III akan membahas limfosit B dan produksi antibodi, termasuk struktur dan jenis imunoglobulin, reseptor sel B, serta fungsi dan aktivasi sel B. Bab IV akan menguraikan prinsip interaksi antigen-antibodi dan pemanfaatannya pada *immunoassay*. Bab V hingga VII akan membahas teknik-teknik pemeriksaan imunologi pada berbagai jenis sampel, dari jaringan hingga cairan tubuh,

dengan fokus pada metode spesifik seperti imunohistokimia, *flow cytometry*, dan ELISA.

Dengan memahami prinsip-prinsip dasar dan aplikasi praktis yang dijelaskan dalam buku ini, diharapkan pembaca dapat mengaplikasikan teknik *immunoassay* secara efektif dalam berbagai konteks penelitian dan klinis, serta terus mengikuti perkembangan teknologi dalam bidang ini.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

BAB II

PENGANTAR IMUNOLOGI

Sistem imunitas merupakan suatu sistem pertahanan untuk melindungi tubuh terhadap berbagai antigen baik yang berasal dari luar tubuh maupun dari dalam tubuh. Sistem ini terdiri dari selular, organ, maupun non-selular seperti sitokin dan kemokin dalam menjalankan fungsinya. Dengan memahami sistem imunitas secara normal, maka dapat dipahami pula berbagai reaksi patologis yang diakibatkannya. Selain itu, dasar imunologi ini dapat dimanfaatkan sebagai penanda suatu kelainan maupun penyakit serta keberhasilan terapi, serta dimanfaatkan sebagai terapi target pada berbagai penyakit.

Perkembangan keilmuan terkait imunologi telah berkembang sangat pesat dalam beberapa tahun terakhir. Sistem imun memang merupakan sistem yang kompleks, tapi telah dikembangkan sedemikian rupa untuk dapat diaplikasikan di bidang klinis. Perkembangan ilmu imunologi ini juga dipengaruhi salah satunya oleh perkembangan antibodi monoklonal yang dapat membedakan dan mengidentifikasi subpopulasi sel dan analisis fungsional dari sel-sel imun. Selain itu, perkembangan teknologi terbarukan dan cukup canggih saat ini, juga berperan penting dalam perkembangan imunologi sebagai keilmuan, dalam hal ini mencakup analisis sel tunggal,

teknologi *imaging*, omics (termasuk sekuensing DNA-RNA, proteomik, dan metabolomik, serta kecerdasan artifisial dan *machine learning*), model hewan coba dengan desain baru (dengan transgenik konvensional/ metode *knock-out* dan *knock-in/ CRISPR-Cas9*), yang semuanya dapat meningkatkan pengetahuan kita mengenai fungsi sistem imun (8). Sehingga, dengan mempelajari ilmu dasar seperti imunologi, akan sangat membantu dalam aplikasi di bidang klinis dan perkembangan keilmuan. Pada BAB ini, akan dibahas mengenai pengantar sistem imun yaitu respons imun serta sel maupun organ, serta molekul yang terlibat, sebelum melanjutkan pada aplikasi imunologi terutama pada pemeriksaan penunjang berbagai penyakit.

A. Sel-sel pada Sistem Imun

Pertahanan tubuh terhadap infeksi melibatkan berbagai sel imun, terutama yang kita kenal sebagai leukosit atau sel darah putih, serta sel-sel jaringan yang berasal dari leukosit. Sel-sel ini bekerja dengan cara fagositosis yaitu “menelan” dan destruksi antigen, atau dengan membentuk antibodi dan limfosit yang tersensitisasi (selular) yang menyebabkan antigen menjadi tidak aktif atau dihancurkan (9,10).

Leukosit merupakan unit sistem pertahanan tubuh yang bersifat mobil, dan dibentuk sebagian besar di sumsum tulang (granulosit dan monosit, serta limfosit) dan di jaringan limfa (maturasi limfosit dan sel plasma). Setelah dibentuk

dan mengalami maturasi, maka sel-sel ini akan beredar di dalam darah menuju ke berbagai bagian tubuh. Terdapat enam macam leukosit yang sering dijumpai di peredaran darah, yaitu neutrofil polimorfonuklear, eosinofil polimorfonuklear, basofil polimorfonuklear, monosit, limfosit, dan kadang sel plasma. Ketiga sel polimorfonuklear disebut juga dengan sel granulosit, karena memiliki granul pada sitoplasmanyanya. Sementara sebutan polimorfonuklear dikaitkan dengan banyaknya inti sel pada sel-sel tersebut. Granulosit dan monosit bekerja melindungi tubuh dengan cara “menelan” atau “memakan” antigen melalui sistem fagositosis. Sementara limfosit dan sel plasma bekerja pada mekanisme respons imun adaptif humorai dan selular (9,10).

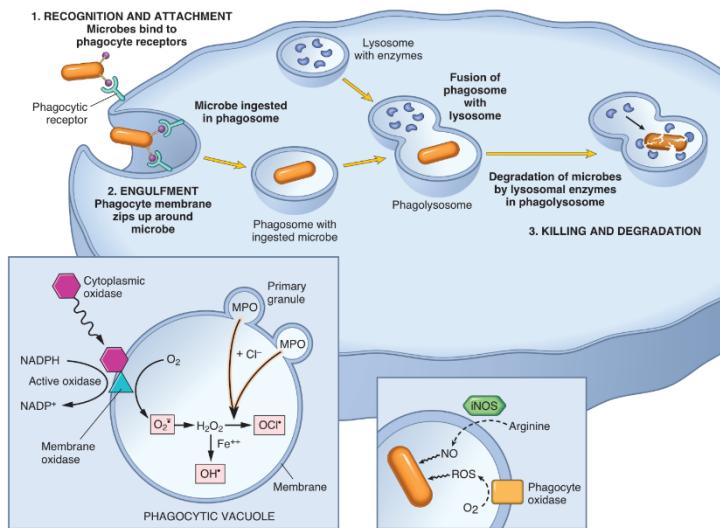
Masa hidup masing-masing jenis leukosit berbeda-beda. Granulosit contohnya, setelah dilepaskan dari sumsum tulang, akan berada di peredaran darah selama 4-8 jam, dan berada pada jaringan yang membutuhkan selama 4-5 hari berikutnya. Akan tetapi, masa hidup ini akan menjadi lebih pendek ketika terjadi infeksi berat, karena granulosit merespons infeksi dengan sangat cepat. Monosit juga memiliki masa edar yang singkat yaitu 10-20 jam di dalam darah sebelum memasuki jaringan. Di dalam jaringan, sel ini akan berdiferensiasi dan membesar ukurannya membentuk makrofag jaringan, yang dapat bertahan hidup sampai berbulan-bulan hingga terjadi kerusakan akibat menjalankan fungsi fagositosis. Makrofag jaringan ini merupakan dasar

sistem makrofag jaringan yang merupakan pertahanan lanjutan dalam melawan infeksi. Sementara limfosit, beredar di dalam pembuluh darah secara kontinu bersama dengan aliran limfa dari nodus limfa dan jaringan limfoid lainnya. Setelah beberapa jam berada di sistem peredaran darah, limfosit akan kembali ke jaringan dengan mekanisme diapedesis. Masa hidup limfosit dapat berminggu-minggu hingga berbulan-bulan tergantung kebutuhan tubuh terhadap sel tersebut (9,10).

Sel Fagosit

Makrofag merupakan salah satu fagosit, yang merupakan residen jaringan. Terdapat dua kemampuan utama sel ini, yaitu sebagai sel efektor dalam respons imun alami selular dengan sistem fagositosisnya, dan sebagai sel penyaji (*Antigen Presenting Cells, APC*) kepada limfosit T untuk pengenalan epitop pada respons imun adaptif (11). Sebagai sel fagosit, makrofag harus dapat secara selektif memilah antigen yang harus dihancurkan, walaupun sel normal atau bagian dari sel tubuh mungkin saja diingesti sebagai bagian dari proses homeostasis. Karena ukurannya yang besar, makrofag dapat menelan partikel-partikel berukuran besar, bahkan sebuah eritrosit utuh, atau sebesar parasit malaria, yang mana hal ini tidak dapat dilakukan oleh netrofil. Setelah menelan dan mendigesti partikel, maka sisa partikel akan

dikeluarkan dari selnya dan tetap bertahan hidup dan berfungsi hingga berbulan-bulan (9).



Gambar 1 Proses fagositosis patogen oleh fagosit (contohnya makrofag). Pada proses ini, patogen dikenali oleh fagosit melalui reseptornya, dan mengaktifasi proses “engulfment” oleh fagosit. Kemudian patogen masuk ke dalam sel dan membentuk fagosom, yang kemudian berikatan dengan lisosom dan membentuk fagolisosom, yang mencerna patogen yang masuk. Sisa produk digesti patogen ini dikeluarkan dari sel fagosit dengan mekanisme eksositosis (9) (robbins cotrand 2021).

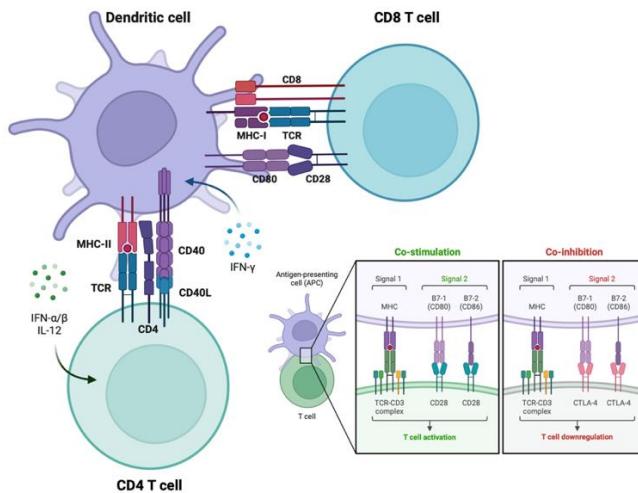
Sel fagosit berikutnya adalah **neutrofil**, yang khusus memiliki kemampuan fagositosis tanpa berperan sebagai APC dalam respons imun. Sel ini hanya berada di sirkulasi darah, hanya keluar dari pembuluh darah saat terdapat patogen yang berada pada jaringan di luar pembuluh darah. Saat akan melakukan fagositosis, neutrofil akan menempel pada partikel target dan memproyeksikan pseudopodia untuk melingkupi partikel. Pseudopodia dari kedua sisi kemudian

akan menyatu (fusi), sehingga menciptakan suatu ruang yang mengandung partikel, yang kemudian mengalami invaginasi dan menyisakan fagosom (vesikel fagositik) di dalam sitoplasma. Sebuah neutrofil dapat mengandung 3 hingga 20 bakteri sebelum akhirnya inaktif dan mengalami kematian (9,10).

Antigen Presenting Cells

Sebelum membicarakan sel yang terlibat pada respons imun adaptif, maka sebaiknya kita pahami terlebih dahulu mengenai sel-sel yang bertugas “menjembatani” kedua respons ini (bawaan/*innate* ke adaptif), yaitu *antigen presenting cells* (kemudian akan disebut sel APC). Sel imun adaptif manusia mengenal antigen melalui dua jenis reseptor, yaitu imunoglobulin yang berperan sebagai reseptor antigen pada sel B, dan reseptor sel T. Imunoglobulin dapat mengenali antigen *native*, tapi sel T hanya dapat mengenali antigen yang dipaparkan atau dipresentasikan oleh molekul *major histocompatibility complex* (MHC) atau *Human Leucocytes Antigen* (HLA) pada manusia di permukaan sel APC. Terdapat dua jenis MHC, yaitu MHC kelas I dan kelas II (terdapat pula MHC kelas III, namun fungsinya tidak banyak diulas pada sel manusia). Pengenalan inilah yang akan mengaktivasi sel T *naive* menjadi bentuk efektornya (12,13).

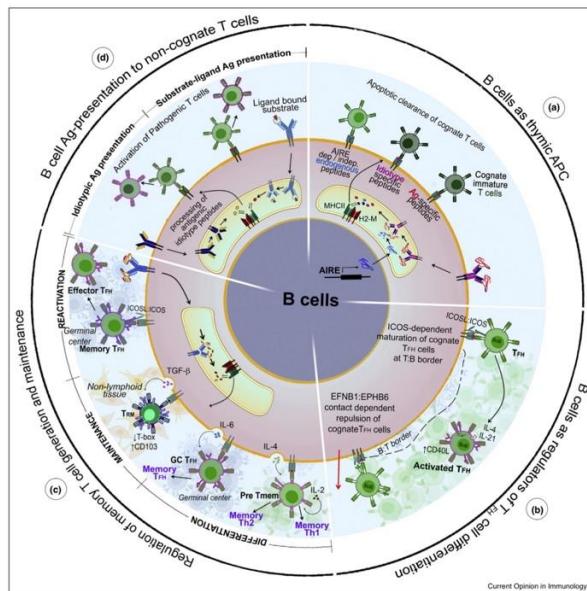
Semua sel yang memiliki nukleus merupakan APC, namun hanya sedikit yang berperan sebagai APC profesional (14). Terdapat tiga jenis utama sel APC, yaitu sel dendritik (DC), sel limfosit B, monosit, dan makrofag, yang berperan dalam pengenalan antigen spesifik. **Sel dendritik** dikenal sebagai APC profesional yang paling kuat di antara APC lainnya, yang berasal dari sel punca hematopoietik pada sumsum tulang. Sel yang pertama kali ditemukan pada tahun 1973 oleh Ralph Steinman dan Zanvil Cohn ini berperan dalam pengikatan sensor imun bawaan terhadap patogen dan prosesor antigen pada sel imun adaptif. DC dapat menangkap antigen pada area periferal dan membawanya menuju organ limfoid untuk menginisiasi respons imun adaptif (14–16). Selain inisiasi respons imun, sel ini juga berperan dalam homeostasis sistem imunitas melalui sensitisasi sel T CD4 dan CD8 terhadap *self-antigen* dalam proses membangkitkan toleransi imun dalam maturasi limfosit. Mengingat peran penting DC dalam sistem imun, telah banyak dikembangkan berbagai penelitian biomedis yang menarget sel DC untuk terapi maupun diagnostik (16).



Gambar 2 Peran sel dendritik (DC) sebagai Antigen Presenting Cells (APC) yang menginisiasi sel T CD4 dan CD8 naive menjadi sel efektornya melalui MHC kelas II dan kelas I. Terdapat pula mekanisme ko-stimulasi maupun ko-inhibisi, bergantung pada signal yang diberikan oleh DC kepada sel T. (diedit menggunakan biorender.com)

Sel APC berikutnya adalah **sel limfosit B**, yang juga merupakan bagian dari sel imun adaptif. Limfosit B dalam prosesnya sebagai APC akan berinteraksi dengan limfosit T, yang berbeda mekanisme dan tujuannya dengan sel DC. Interaksi sel limfosit B dengan limfosit T ini bertujuan untuk presentasi antigen pada timosit (APC timosit) untuk toleransi imun, regulator diferensiasi sel T *folicular helper* (T_{FH}), regulasi sel T memori, dan presentasi pada sel T patogenik (tampak pada gambar 3). Ligasi reseptor sel B (*B cell receptor*, BCR) pada antigenlah yang menginisiasi serangkaian proses molekular untuk deposit antigen pada kompartemen MHC kelas II, yang kemudian melalui

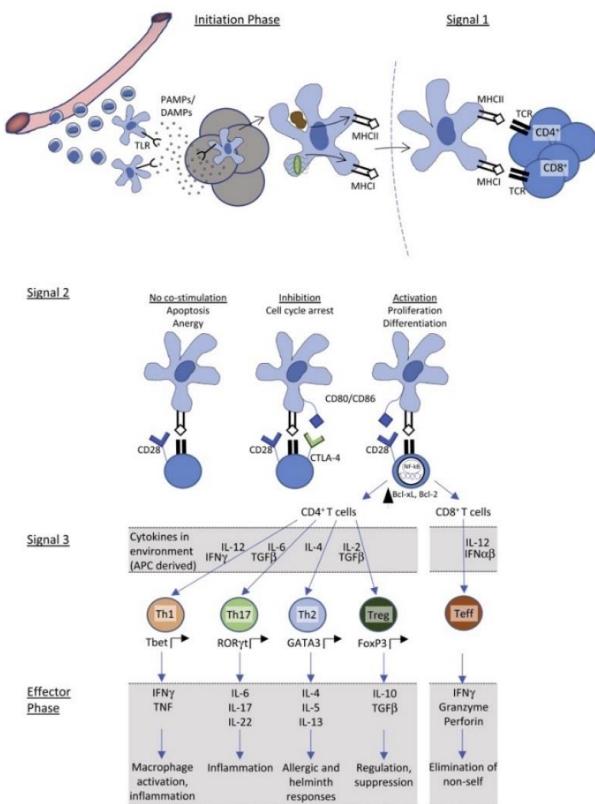
berbagai rangkaian proses untuk berinteraksi dengan limfosit targetnya (14,17). Bagaimana sel B mengenali dan mengambil serta memproses antigen, akan dibahas lebih detail pada Bab selanjutnya.



Gambar 3 Fungsi sel B sebagai Antigen Presenting Cells (APC). (a) Pada timus, sel B berperan sebagai toleransi imun sel T dengan mempresentasikan regulator gene-induced tissue-restricted Ags, antigen idiopatik, dan antigen tangkapan reseptor sel B (BCR) pada MHC kelas II untuk memilah limfosit imatur yang bereaksi terhadap self-antigen. (b) Presentasi antigen oleh sel B sebagai kunci utama dalam proses maturasi sel T follicular helper menjadi sel T_{FH} sentrum germinativum. (c) Presentasi antigen spesifik sel B dan produksi sitokin (IL-4 dan IL-6) dalam diferensiasi sel Th1 memori, Th2 memori, dan sel T_{FH}. (d) Presentasi antigen spesifik sel B terhadap sel T patogenik (non-cognate) (17).

Selain sebagai fagosit, **monosit dan makrofag** merupakan APC profesional yang juga berperan dalam menjembatani respons imun bawaan dan respons imun adaptif. Makrofag merupakan sel yang fundamental dalam

sistem imunitas, salah satunya dengan mengenali antigen dan mendegradasinya. Setelah antigen ini mengalami degradasi, maka makrofag akan mempresentasikan potongan antigen pada permukaannya dengan berikatan pada MHC kelas I atau II, dan mempresentasikannya pada sel T yang sesuai (gambar 4). Peran ini tentu saja tidak terlepas dari jenis antigen yang menstimulus makrofag, dan sinyal lainnya berupa sitokin serta molekul aktuator atau inhibitor tertentu, yang menghasilkan respons sel T yang berbeda pula (18).



Gambar 4 Peran makrofag dalam aktivasi sel T (18)

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Limfosit

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya bahwa terdapat dua subset limfosit pada sistem imun, yaitu limfosit T dan B.

Sel limfosit T (kemudian akan disebut sel T), diturunkan dari sel progenitor hematopoietik di sumsum tulang dan bermigrasi serta mengalami maturasi di timus. Sel T ini memiliki reseptor pengikat antigen yang unik pada membran selnya, yang disebut dengan *T-cell receptor* (TCR). Reseptornilah yang nantinya akan berikatan dengan MHC pada permukaan sel APC, untuk mengenali antigen spesifik. TCR memiliki kapasitas untuk berproliferasi dengan sangat cepat dan berdiferensiasi saat mendapatkan sinyal yang cocok. Ikatan antara TCR dan MHC akan mengaktifasi sel untuk menyekresikan sitokin tertentu yang kemudian mengendalikan diferensiasi sel T pada efektornya, serta proliverasi dan survival sel T. Terdapat dua jenis sel T, yaitu sel T CD8+ dan CD4+. Sel T CD8+ akan berdiferensiasi menjadi efektornya yaitu sel T sitotoksik. Sementara CD4+ memiliki efektor yaitu sel T *helper* (Th) dengan berbagai subsetnya (Th1, Th2, Th17, dan T *folicular helper*) (12,13,19).

Jenis limfosit berikutnya adalah **sel B**, yang juga merupakan turunan dari sel hematopoietik pada sumsum tulang, dan mengalami maturasi di tempat yang sama, baru kemudian bermigrasi menuju sirkulasi. Sel ini dapat mengenali antigen tanpa adanya mekanisme pengenalan

antigen pada MHC dari APC lainnya, maka dari itu sel B juga merupakan APC (untuk aktivasi menjadi sel efektornya). Setelah mengenali antigen spesifik, maka sel ini akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang dapat memproduksi antibodi. Sel plasma ini memiliki masa hidup yang singkat, dan mengalami apoptosis saat antigen penyebab infeksi telah berhasil dieliminasi. Namun, sel ini memproduksi cukup banyak antibodi yang dapat bersirkulasi di seluruh tubuh, untuk melindungi *host* dari patogen spesifik yang kembali masuk (12,13,19). Detail mengenai limfosit B ini akan kita bahas pada BAB selanjutnya yaitu Bab III Limfosit B dan Antibodi.

B. Organ Sistem Imun

Sel-sel imun berasal dari turunan sel progenitor yang berada pada sumsum tulang, yaitu sel hematopoietik (sel pembentuk sel-sel darah). Sel-sel ini beredar berulang kali di dalam sirkulasi darah, jaringan tubuh, dan jaringan limfoid. Sel yang tergabung dalam jenis sel darah putih atau leukosit ini berinteraksi dengan berbagai jenis sel lain dan merekrut sel-sel lainnya pada situs tempat terjadinya infeksi atau inflamasi. Sehingga sistem imun melibatkan berbagai organ, jaringan, dan sel (11).

Seperti yang telah dibahas sebelumnya, leukosit terutama limfosit bertugas mengenali dan membedakan berbagai antigen spesifik yang masuk ke dalam tubuh *host*.

Sementara sel yang berperan sebagai fagosit bertanggung jawab untuk menangkap antigen termasuk partikel, kemudian selanjutnya memecah atau mencernanya untuk dapat dipresentasikan kepada limfosit untuk dikenali. Kedua jenis sel ini saling berinteraksi satu sama lain dalam membangkitkan respons imun (11). Proses pembentukan dan pematangan sel terutama sel limfosit, melibatkan organ limfoid primer dan sekunder, yang akan dibahas pada subtopik ini.

Organ/Jaringan Limfoid Primer

Semua sel-sel darah termasuk eritrosit, platelet dan leukosit berasal dari sel induk atau sel punca (sel progenitor) yang sama yaitu sel hematopoietik yang berada pada sumsum tulang. Sel-sel induk hematopoietik yang disebut dengan hemositoblas menurunkan sel-sel induk (sel progenitor) yang memiliki kapabilitas lebih terbatas, yaitu sel progenitor untuk tromobosit, eritrosit, dan 2 kelompok utama leukosit yaitu granulosit dan agranulosit. Setelah mengalami maturasi di sumsum tulang, maka turunan sel progenitor (kecuali progenitor limfoid) akan langsung bergabung dengan sel-sel darah dalam sirkulasi. Sementara itu, turunan progenitor limfoid akan mengalami maturasi terlebih dahulu baik pada jaringan limfoid primer maupun sekunder, sebelum masuk ke dalam sirkulasi (11).

Berdasarkan proses diferensiasi sel limfoid menjadi limfosit kompeten, dibedakanlah jaringan/organ limfoid primer/sentral dan jaringan/organ limfoid sekunder/perifer. Organ limfoid primer pada manusia adalah sumsum tulang yang merupakan tempat pembentukan sel T dan sel B, serta diferensiasi sel B; dan timus yang merupakan tempat untuk diferensiasi sel T. Sementara jaringan/organ limfoid sekunder mencakup limpa, tonsil, dan sejumlah kelenjar getah bening (*nodus lymphaticus*) yang tersebar di seluruh tubuh, serta jaringan limfoid dari mukosa dari dinding saluran cerna, pernapasan, hingga reproduksi (11,20).

Sumsum tulang merupakan bagian utama dari cavitas tulang yang memiliki perbedaan komposisi bergantung pada spesies dan usia organisme. Terdapat dua bentuk sumsum tulang, yaitu sumsum kuning tulang yang umumnya mengandung banyak adiposit, dan sumsum merah tulang sebagai tempat hematopoiesis. Pada manusia, sumsum merah tulang ini ditemukan pada seluruh skeletal fetus dan selama usia pertama kehidupan. Tapi sejalan dengan pertambahan usia, maka sumsum ini digantikan dengan sumsum kuning tulang. Pada usia dewasa, sumsum merah ini dapat ditemukan pada iga, klavikula, skapula, pelvis, dan vertebra, serta pada sternum dan ujung proksimal os femur (20).

Sumsum merah tulang merupakan tempat dimana eritrosit, platelet, dan sel mieloid seperti sel dendritik, serta

subset limfosit dihasilkan. Di tempat ini pula, sel B dihasilkan dan mengalami diferensiasi. Mungkin jika dianalogikan, fungsi sumsum merah tulang ini untuk sel limfosit B mirip kerjanya dengan organ timus untuk limfosit T, dimana setelah maturasi selesai, sel B baru akan diekspor dari sumsum merah tulang (20).

Hal yang menarik untuk diketahui pula adalah, bahwa limfosit dapat bermigrasi kembali ke sumsum tulang, yaitu sejumlah besar sel T memori dan sel plasma. Sel-sel ini yang bermigrasi dari perifer menuju sumsum tulang, dapat bertahan untuk waktu yang lama. Hal ini merupakan informasi yang penting, bukan hanya untuk pembelajaran mengenai imunologi tapi juga aplikasinya pada fase klinis. Sebagai contohnya, aplikasi pada transplantasi sumsum tulang, harus memperhatikan komposisi sel-selnya, karena tidak hanya sel punca yang akan diinjeksi saat transplantasi, tapi juga limfosit T dan B matur (20).

Timus, seperti yang telah disebutkan sebelumnya, merupakan tempat diferensiasi dan maturasi sel limfosit T. Pada organ ini, sel T imatur mengalami pembelahan cepat dan mengalami diferensiasi menjadi berbagai subset untuk dapat bereaksi terhadap antigen yang spesifik. Sehingga satu timosit (limfosit Timus) akan berkembang menjadi limfosit yang spesifik mengenali satu antigen, dan timosit lainnya berkembang menjadi limfosit yang spesifik terhadap antigen lainnya. Berbagai limfosit berbeda ini kemudian akan dapat

meninggalkan timus dan menyebar ke seluruh tubuh melalui peredaran darah, dan masuk ke dalam jaringan limfoid perifer yang tersebar di seluruh bagian tubuh (9).

Organ/Jaringan Limfoid Sekunder

Organ limfoid sekunder ini merupakan lokasi dimana antigen akan bertemu dengan limfosit T dan B spesifik, dengan dibawa oleh APC. Organ ini melibatkan berbagai organ dan jaringan seperti kelenjar getah bening, limpa, tonsil, dan jaringan limfoid lainnya (*mucosa associated lymphoid tissue, MALT*).

Pada **kelenjar getah bening (KGB)**, limfosit dan sel sistem imun lainnya tersusun pada daerah tertentu, tergantung pada jenis dan fungsinya. Pada pembagian lokasi tertentu di KGB, sel B banyak ditemukan pada daerah folikel. Sel B matur naïve (belum mengenali antigen) umumnya ditemukan pada folikel primer, sedangkan pada proses respons terhadap adanya antigen akan menyebabkan perkembangan sentrum germinativum. Pusat germinativum ini juga dihuni oleh sel dendritik, yang mana akan mempresentasikan antigen dan menyebabkan terbentuknya kompleks antigen-antibodi-C3 (karena sel DC memiliki reseptor untuk C3 dan fragmen Fc IgG). Antigen pada APC ini terus menerus dipresentasikan pula pada sel T, sehingga akan terbentuk sel B memori yang kemudian membentuk pusat-pusat germinativum. Pusat ini merupakan tempat

untuk proliferasi dan seleksi sel B yang menghasilkan antibodi dengan tingkat afinitas tinggi terhadap antigen. Sementara sel plasma akan ditemukan pada area luar sentral germinativum dan memiliki kemampuan untuk bermigrasi keluar kelenjar untuk menuju jaringan lainnya (21).

Terdapat area parakortikal pada KGB, yaitu area di antara folikel dan terletak pada korteks, tempat ditemukannya sel T. Sebagian besar sel ini yaitu sel T CD4+ yang bercampur dengan CD8+. Limfosit T naïve yang belum bertemu dengan antigen, masuk menuju KGB melalui suatu venula khusus yang disebut dengan *high endothelial venules* (HEV). Pada area parakortikal ini, sel T akan bertemu dengan antigen yang dibawa dan disajikan oleh sel dendritik. Sementara area lainnya yaitu medula, merupakan area pada KGB yang mengandung sebaran sel limfosit, makrofag, dan sel dendritik (21).

Organ limfoid sekunder lainnya adalah **limpa**, yang terdiri atas pulpa merah tempat penghancuran eritrosit, dan pulpa putih yang merupakan jaringan limfoid. Limfosit T pada limpa, tersentralisasi pada daerah tengah lapisan limfoid periarteriolar, yang mana dua pertiganya diisi oleh sel T CD4+ dan sepertiga sisanya diisi oleh sel t CD8+. Sel limfosit B sendiri ditemukan pada folikel dan sentral germinativum di daerah perifer. Pada area ini pula dapat ditemukan sel dendritik dan makrofag, yang berperan

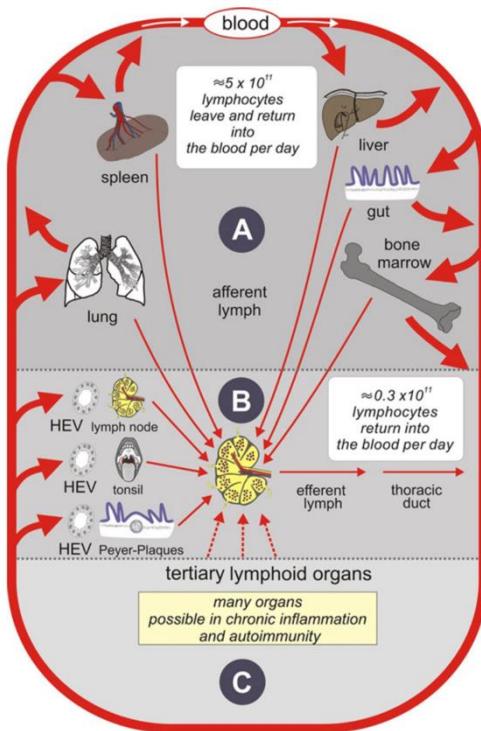
sebagai APC untuk menyajikan antigen kepada sel B dan sel T (21).

Organ/Jaringan Limfoid Tersier

Struktur limfosit tersier (TLS) merupakan jaringan limfoid ektopik yang terbentuk dari respons imun spesifik pada situs inflamasi kronik, berkembang sebagai respons terhadap adanya gangguan homeostasis seperti penyakit autoimun, kanker, infeksi, penyakit inflamasi kronik dan penuaan. Jaringan ini merupakan agregasi limfoid terorganisasi dengan jaringan fibroblas khusus yang memiliki karakteristik struktur dan fungsi mirip jaringan limfoid sekunder, tapi tanpa diliputi oleh kapsul. TLS ini diketahui dilengkapi dengan pembuluh darah khusus yang disebut dengan *high endothelial venules* (HEV) yang berperan dalam memfasilitasi transmigrasi limfosit dari darah menuju jaringan limfoid. Berbagai molekul yang juga berfungsi dalam pertahanan di jaringan limfoid sekunder seperti kemokin dan limfotoksin, dapat ditemukan pula pada TLS (22,23).

Jaringan limfoid tersier dapat memiliki variasi pada komposisi selularnya, dari klaster sel T-sel B longgar hingga struktur dengan organisasi tingkat tinggi dimana zona sel T dan sel B terletak pada sentral germinativum. TLS dapat menghilang saat inflamasi telah menghilang. Sehingga

maturasi TLS ini juga dapat ditekan dengan pengobatan imunosupresan, termasuk kortikosteroid (22,23).



Gambar 5 Rute migrasi leukosit pada berbagai organ (20)

C. Respons Imun Bawaan (*innate*)

Kemampuan imunitas tubuh manusia memang sangat memukau, dengan dapat memberikan pertahanan terhadap hampir semua organisme atau toksin yang dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan dan organ. Terdapat dua jenis respons imun, yaitu imunitas bawaan (*innate*) dan adaptif (didapat). Respons imun bawaan dapat mengenali antigen non-spesifik secara umum, sementara imunitas

adaptif baru dapat diaktivasi setelah mendapatkan paparan terhadap antigen sebelumnya yang lebih spesifik (9).

Respons imun bawaan mencakup proses-proses seperti: (1) fagositosis bakteri maupun antigen yang menginvasi tubuh oleh sel darah putih dan sel yang terlibat dalam sistem makrofag jaringan, (2) destruksi organisme atau antigen yang "ditelan" oleh berbagai enzim, (3) resistensi kulit terhadap invasi organisme, dan (4) adanya zat kimia tertentu pada darah, maupun sel yang menempel pada mikroorganisme asing atau toksin, yang kemudian menghancurkannya (lisozim, polipeptida, kompleks komplemen, dan sel *natural killer*) (9)

Pertahanan pertama sebelum proses-proses yang disebutkan di atas adalah adanya epitel yang utuh, serta adanya substansi antimikroba yang diproduksi pada permukaan epitelial. Jika pertahanan ini pun masih dapat ditembus oleh mikroba, maka proses selanjutnya adalah menghancurkan mikroba dengan cara fagositosis, tanpa membedakan spesifikasi substansi dari antigen asing tersebut. Pada proses ini, leukosit yang termasuk dalam sel fagosit, memegang peran utama terutama sel makrofag, neutrofil, dan monosit (21).

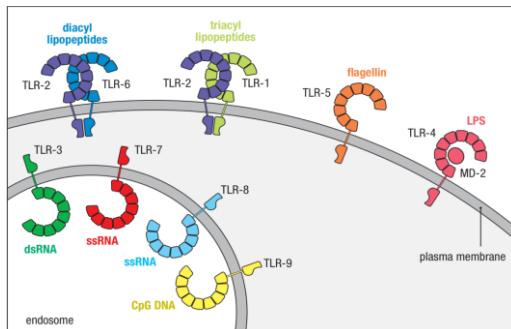
Selain fagositosis, respons imun nonspesifik lainnya melibatkan reaksi inflamasi. Pada proses ini, terdapat upaya untuk memusatkan sel-sel imun yang beredar secara sistemik menuju ke situs infeksi. Terjadi 3 proses penting pada

respons ini, yaitu peningkatan aliran darah ke area infeksi, peningkatan permeabilitas kapiler, dan migrasi leukosit ke luar vaskular. Reaksi ini tentunya membutuhkan berbagai mediator inflamasi seperti histamin yang dilepaskan oleh basofil dan sel mast, amina vasoaktif yang dilepaskan oleh trombosit, dan anafilatoksin yang berasal dari komponen sistem komplemen. Berbagai mediator inilah yang memfasilitasi respons inflamasi dan pergerakan sel polimormonuklear (PMN) leukosit menuju area infeksi (21,24).

Sistem imun bawaan ini, tidak spesifik terhadap substansi yang terdapat pada antigen asing, yang menunjukkan diversitas antigen tersebut. Akan tetapi, sistem imun bawaan mengandalkan reseptor yang dimilikinya untuk mengenali pola tertentu dari antigen asing maupun adanya sel yang mengalami kerusakan. Pola spesifik ini disebut dengan *pathogen associated molecular patterns* (PAMP), sementara reseptor yang dimiliki oleh sel imun bawaan yang mengenali pola ini disebut dengan *pattern recognition receptors* (PRR). Contoh PAMP ini yaitu lipopolisakarida bakteri, peptidoglikan, DNA bakteri, dsRNA, dan glukan. PAMP ini hanya diproduksi oleh unsur patogen mikroba, dan merupakan struktur invariant yang dimiliki bersama oleh seluruh kelas patogen. Sementara PRR hanya diekspresikan oleh sel *host*, dan diekspresikan oleh sel efektor imun bawaan seperti makrofag, sel dendritik, dan sel B yang merupakan

APC profesional, serta pada sel leukosit lainnya seperti sel NK, sel mast, neutrofil, eosinofil, dan pada sel epitelial, sel endotel atau fibroblas. Terdapat 3 kelompok PRR, yaitu PRR yang disekresikan (bentuk opsonin), PRR yang mengalami endositosis untuk memperantara pengambilan antigen dan penyajiannya pada lisosom, dan PRR yang berperan dalam transduksi sinyal (21,24).

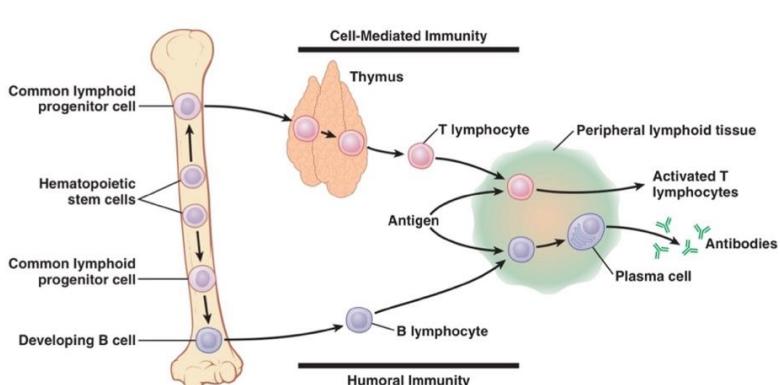
Terdapat berbagai macam PRR, dan *toll-like receptors* (TLR) merupakan salah satu kelompok PRR yang penting dalam sistem imun bawaan. Reseptor ini dikode oleh sedikitnya 13 gen pada mamalia, yaitu TLR1-10 pada manusia, dan TLR1-13 tanpa TLR10 pada tikus. TLR diekspresikan pada berbagai sel, yaitu makrofag, sel dendritik, sel B, sel NK, sebagian sel T, serta pada permukaan sel epitel dan endotel, serta fibroblas. Sebagian TLR berada pada permukaan sel yaitu TLR1, 2, 4, 5, dan 6, dan sebagian lainnya berada terikat pada membran endosomal intraseluler, yaitu TLR 3, 7, 8, dan 9 (24).



Gambar 6 Berbagai jenis *Toll-Like Receptor* (TLR) dan lokasinya pada sel mamalia (*janeway*)

D. Respons Imun Adaptif

Respons imun spesifik yang cukup kuat sangat dibutuhkan oleh tubuh, untuk melawan agen yang masuk dan berpotensi menimbulkan kerusakan, seperti bakteri, virus, toksin, dan jaringan asing yang berasal dari berbagai hewan. Kemampuan imun spesifik ini disebut dengan imunitas adaptif atau imunitas didapat. Terdapat dua jenis respons imun adaptif yaitu humoral atau imunitas sel B, dan imunitas selular atau imunitas sel T. Kemampuan ini disebabkan oleh sistem imun khusus yang dapat membentuk antibodi atau limfosit teraktivasi dengan jalur respons selular, yang kemudian dapat merusak organisme atau toksin tertentu yang menginviasi tubuh. Proses ini melibatkan berbagai sel dan protein seperti sitokin dan kemokin yang bervariasi tergantung pada agen stimulusnya (9).

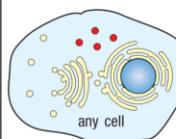
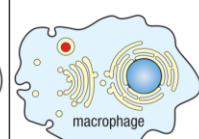
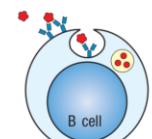


Gambar 7 Pembentukan antibodi dan sensitisasi limfosit sebagai respons terhadap antigen (9)

Respons imun adaptif memerlukan suatu proses pengenalan antigen dengan menggunakan mekanisme tertentu melalui *antigen presenting cells* (APC). Mekanisme pengenalan ini berbeda antara sel B dan sel T. Seperti yang telah diketahui bahwa sel B sendiri merupakan APC, sehingga untuk mengaktivasi respons imun adaptif pada sel B tidak memerlukan APC lainnya. Sementara pada sel T, pengenalan hanya terjadi saat adanya APC yang mempresentasikan antigen pada permukaannya (12,23). Berbagai jenis APC dapat memproses antigen dengan cara yang berbeda, contohnya makrofag menangkap antigen dengan cara fagositosis, sementara sel dendritik tidak dapat melakukan fagositosis. Sifat sel APC juga menentukan respons imun yang timbul. Contohnya antigen yang dipresentasikan oleh APC tanpa adanya ko-stimulasi, akan menyebabkan efek toleransi. Sementara jika APC mengekspresikan MHC II dalam jumlah banyak dan diserta molekul ko-stimulasi, akan dapat mengaktivasi sel T dengan efektif (21).

Selain adanya APC, tipe atau jenis patogen yang menyerang, serta tempat dan cara masuknya antigen ke dalam tubuh, turut menentukan respons imun adaptif spesifik yang terlibat. Terdapat jenis patogen tertentu seperti bakteri dan parasit protozoa yang dapat bertahan terhadap ingestsi dari makrofa, dan mampu bereplikasi di dalam vesikel intrasel dari sistem endosomal-lisosomal. Sementara jenis

patogen lain dapat bereplikasi di luar sel, dan dapat diinternalisasi bersama dengan produk toksiknya melalui fagositosis, endositosis dimediasi reseptor, atau makropinositosis ke dalam endosom dan lisosom, yang kemudian mengalami degradasi oleh enzim. Jenis patogen yang berbeda dapat menginisiasi respons yang berbeda pula (12,21).

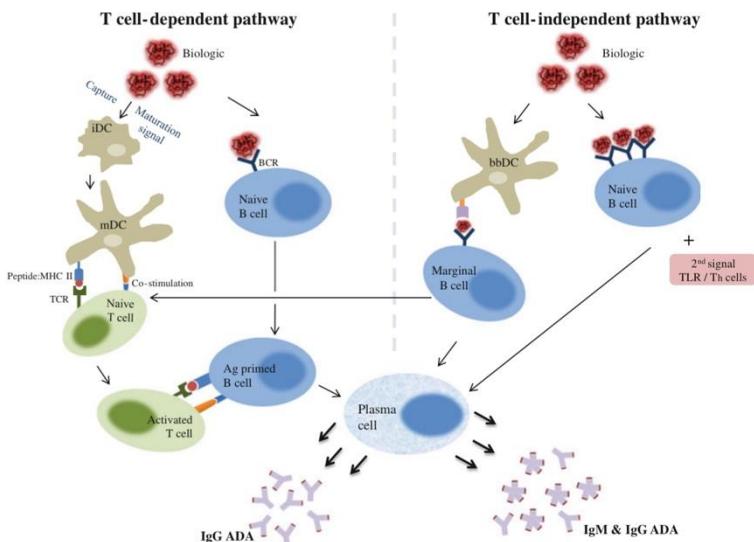
| Cytosolic pathogens | Intravesicular pathogens | Extracellular pathogens and toxins | |
|---|---|---|--|
|  |  |  | |
| Degraded in | Cytosol | Endocytic vesicles (low pH) | Endocytic vesicles (low pH) |
| Peptides bind to | MHC class I | MHC class II | MHC class II |
| Presented to | Effector CD8 T cells | Effector CD4 T cells | Effector CD4 T cells |
| Effect on presenting cell | Cell death | Activation to kill intravesicular bacteria and parasites | Activation of B cells to secrete Ig to eliminate extracellular bacteria/toxins |

Gambar 8 Jenis patogen berbeda dapat menginisiasi respons imun yang berbeda (12)

Respons imun humoral

Seperti yang telah banyak dibahas pada BAB ini, antigen dapat menimbulkan respons imun selular maupun humoral. Sel limfosit T yang distimulus efektoranya oleh antigen, akan menimbulkan respons imun selular, sementara sel B akan menimbulkan respons imun humoral dengan memproduksi antibodi. Sel B sebagai salah satu APC, memiliki kelebihan

dibanding APC lainnya, yaitu sel B dapat menangkap antigen melalui sIg tanpa diproses terlebih dahulu oleh APC lain. Sehingga adanya antigen dalam jumlah kecil, sudah cukup membuat sel B bekerja dengan efisiensi tinggi. Namun, jika konsentrasi antigen cukup tinggi, maka sel B dapat menginternalisasi antigen dengan cara pinositosis fase cair, seperti yang terjadi pada makrofag. Hal menarik lainnya adalah, berbagai klon sel B dapat menangkap antigen, sehingga antigen dalam konsentrasi tinggi pada tubuh inang akan menyebabkan aktivasi poliklonal sel B (21,25).



Gambar 9 Jalur Aktivasi Sel B Melalui Jalur yang Bergantung pada Sel T (*T cell-dependent pathway*) dan Tanpa Sel T (*T cell-independent pathway*) (25)

Terdapat dua jenis jalur aktivasi sel B untuk menghasilkan antibodi melalui sel efektornya, sel plasma, yaitu dengan jalur *T cell-dependent pathway* (Td) dan *T cell-*

independent pathway (Ti) (gambar 9). Pada jalur Td, sel T diaktivasi oleh rekognisi antigen melalui APC yang mempresentasikan antigen pada MHC kelas II, dan terbentuklah efektor sel T yaitu sel T *helper*. Sel T inilah yang kemudian membantu aktivasi sel B. Untuk dapat mengaktifkan sel B, maka antigen yang dipresentasikan pada MHC II kedua sel harus sama. Dengan kata lain, sel T teraktivasi harus distimulus oleh antigen yang sama (oleh APC pada MHC II-nya) dengan yang dikenali oleh sel B pada MHC II-nya pula. Jalur ini menyebabkan ekspansi sel B spesifik epitop. Sementara jalur Ti melibatkan antigen polivalen yang berikatan pada reseptor sel B (BCR) dan menginduksi kluster reseptornya (21,25,26).

Respons imun selular

Sel T memegang peranan penting pada respons imun adaptif, baik humoral maupun selular, dan dapat meregulasi baik respons imun adaptif maupun bawaan. Peran utama sel T adalah mengidentifikasi antigen yang berikatan pada MHC pada APC, melalui reseptornya (*T-cell antigen receptors*, TCR). Segera setelah mengenali antigen, maka sel T akan teraktivasi dan berdiferensiasi menjadi sel efektornya, baik sel T *helper*, sel T sitotoksik, maupun sel T regulator (Treg) (21,27,28).

Respons imun selular yang merupakan bagian dari respons imun adaptif, diperankan oleh sel T sitotoksik.

Aktivasi sel T sitotoksik dari sel T *naive* oleh APC yang mempresentasikan antigennya pada MHC kelas I, dimediasi oleh ikatan antara reseptor sel T (CD3-TCR) dan Ag-MHC, sehingga terjadi diferensiasi dan proliferasi sel T yang sesuai. Sel T sitotoksik yang teraktivasi akan melepaskan perforin, suatu substansi yang dapat merusak membran sel dengan cara pembentukan pori pada sel target. Selain itu, sel T jenis ini juga menghasilkan suatu protease yang tersimpan dalam granula sel, dan dilepaskan untuk membunuh sel targetnya (21,28).

BAB III

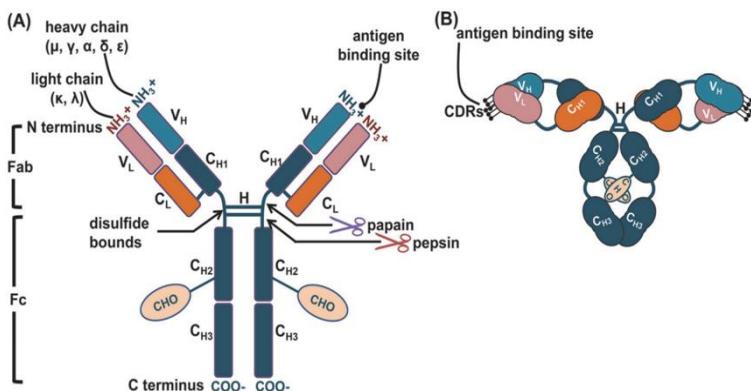
LIMFOSIT B DAN PRODUKSI ANTIBODI

A. Imunoglobulin dan Strukturnya

Imunoglobulin (Ig) yang disekresikan oleh sel plasma (sel efektor sel B), merupakan molekul utama yang memiliki kemampuan untuk menetralisasi sejumlah antigen, contohnya mikroorganisme penyebab infeksi. Ig disintesis oleh sel B dalam dua bentuk berbeda yaitu sebagai reseptor permukaan untuk mengikat antigen, dan sebagai antibodi yang disekresikan ke dalam cairan ekstraseluler. Antibodi ini memiliki sifat spesifik, karena antibodi yang terbentuk sebagai reaksi terhadap suatu jenis antigen akan memiliki susunan asam amino yang khusus mengenali dan dapat berikatan dengan antigen yang menstimulusnya. Selain harus memiliki susunan spesifik, antibodi yang disekresikan ini harus memiliki susunan molekul yang kompleks agar tidak mudah dihancurkan oleh enzim proteolitik, serta harus memiliki struktur yang dapat berikatan dengan fagosit untuk menjalankan fungsinya (21).

Bentuk paling umum imunoglobulin yang beredar di sirkulasi darah berupa heterodimer, dengan ukuran rata-rata mendekati 150 kDa, dengan dua situs antibodi disebut

paratope, yang mengikat epitop antigen spesifik, berlokasi pada fragmen pengikatan antigen (*Fragment antigen-binding*) atau yang dikenal dengan F(ab). Kedua struktur ini terdiri dari dua rantai berat (*heavy chain*, H) identik dan dua rantai ringan (*light chain*, L) yang identik pula. Kedua rantai H dan L ini dihubungkan oleh ikatan disulfida (21,29). Selain F(ab), rantai H memiliki fragmen Fc yang dibentuk oleh domain terminal-C, yang bersifat konstan. Fragmen ini tidak dapat mengikat antigen, tetapi dapat bersifat seperti antigen (determinan antigen), serta berfungsi sebagai efektor sekunder dan menentukan sifat biologi suatu imunoglobulin tertentu seperti kemampuan Ig melekat pada sel, fiksasi komplemen, menembus plasenta, hingga distribusinya di seluruh tubuh (21).



Gambar 10 Struktur molekuler molekul imunoglobulin (Ig) (29)

Struktur imunoglobulin cukup unik, yang memungkinkannya untuk dapat mengenali antigen spesifik

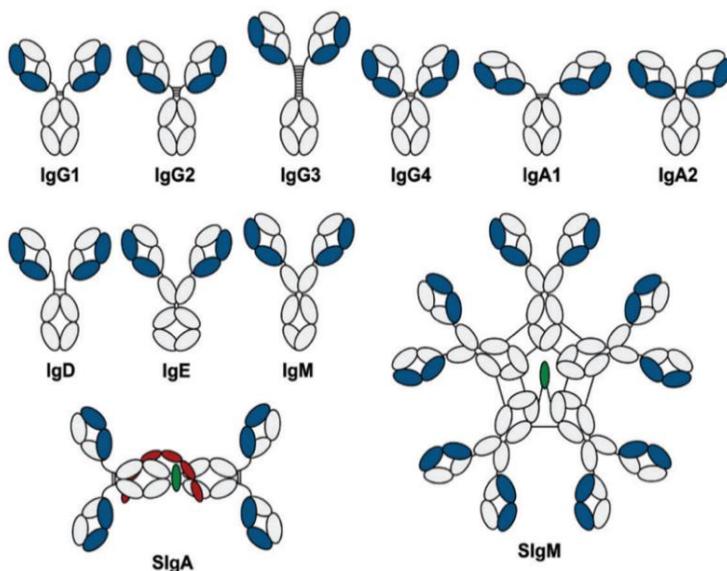
untuk menjalankan fungsinya. Secara fungsional, setiap rantai (Ig) terdiri dari domain konstan (H; C_H, dan L; C_L) dan domain variabel (H; V_H, dan L; V_L). Regio konstan dari rantai H disusun oleh tiga domain untuk IgG, IgA, dan IgD, dan empat domain untuk jenis IgM dan IgE. Domain ini kemudian berlanjut dengan domain konstan yaitu C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, dan C_{H4}. Antara C_{H1} dan C_{H2}, terdapat regio H (*hinge*) kecuali pada IgM dan IgE, yang membantu fleksibilitas struktur. Sementara pada rantai L imunoglobulin, disusun oleh dua domain terpisah, yang masing-masingnya memiliki berat molekuler 12 kDa. Ikatan antara domain variabel rantai H dan L inilah yang membentuk situs perlekatan untuk antigen. Domain konstan memiliki fungsi efektor berupa aktivasi sistem komplemen, atau berikatan dengan FcRs (21,29).

B. Tipe atau Jenis Imunoglobulin

Terdapat lima isotipe atau kelas imunoglobulin, yang berbeda berdasarkan struktur dan fungsinya, yaitu IgM, IgD, IgG, IgA, dan IgE. Perbedaan dari kelas Ig ini terletak pada domain konstan pada rantai H: mu (μ) menentukan kelas IgM, gamma (γ) menentukan kelas IgG, alpha (α) menunjukkan kelas IgA, delta (δ) menunjukkan kelas IgD, dan epsilon (ϵ) menunjukkan IgE. Bagian konstan rantai H dikode oleh beberapa sekuens, sehingga hal ini menyebabkan terbentuknya subtipe Ig, seperti pada IgG (IgG1, IgG2, IgG3,

dan IgG4) dan IgA (IgA1 dan IgA2) yang tersebar pada berbagai cairan tubuh (21,29).

Pada pemanfaatannya di laboratorium, kelima kelas imunoglobulin ini ditentukan berdasarkan sifat migrasi masing-masing protein pada elektroforesis dan sifat serologik. Sel plasma hanya memproduksi satu jenis antibodi spesifik, dan hal ini dimanfaatkan dalam pemeriksaan patologi klinis. Sebagai contohnya, keganasan sel plasma ditandai dengan adanya proliferasi satu klon sel plasma yang tak terkendali, dan terdapat protein monoklonal yang homogen (21).



Gambar 11 Struktur domain imunoglobulin manusia (30)

IgD

Kelas imunoglobulin ini merupakan antibodi kedua yang paling sedikit beredar pada tubuh manusia, dan memiliki masa paruh yang relatif singkat. IgD ini berbentuk monomer, dan ditemukan cukup tinggi konsentrasi pada tali pusat. Peran biologisnya, terutama pada imunitas mukosa masih belum begitu jelas, tapi diketahui bahwa molekul antibodi ini berperan pada reaksi hipersensitivitas terhadap penisilin. Sel plasma penghasil IgD didapat dari jaringan limfoid yang berhubungan nasofaring dan tersebar terbatas pada traktur aero-digestif. Imunoglobulin ini berikatan dengan sel imun bawaan seperti basofil dan sel mast melalui *galectin-9* dan CD44. Ikatan ini menyebabkan pelepasan IL-4 dan menyebabkan respons T *follicular helper type-2 dependent*, dan menyebabkan produksi IgG dan IgE. Walaupun, IgD juga memiliki peran berlawanan, yaitu melemahkan degranulasi IgE sel mast dan basofil, yang tampaknya berperan dalam pertahanan homeostasis pada sawar mukosa (21,30).

IgM

IgM memiliki peran yang sangat penting dalam menginisiasi respons imun dan pembersihan patogen. Imunoglobulin ini diproduksi segera setelah masuknya antigen oleh sel plasma ekstrafolikuler. IgM memiliki struktur pentamer, sehingga berukuran paling besar di antara Ig lainnya. IgM terutama

ditemukan pada area intravaskuler dan merupakan penyusun 10% imunoglobulin serum. Struktur pentamerik IgM ini menyediakan ikatan kuat terhadap antigen, yang kemudian akan menyebabkan adanya perubahan konfirmasi IgM, sehingga area ikatan untuk C1q terekspos dan terjadi aktivasi sistem komplemen. Struktur IgM ini juga menyokong adanya aglutinasi efektif pada mikrobiota usus, sehingga memungkinkan pembersihan mikroba dan membatasi masuknya antigen ke dalam epitel (21,30).

IgA

Pada manusia, sel plasma penghasil IgA berasal dari sel B memori IgM. Terdapat dua kelas IgA pada manusia, yaitu IgA1 dan IgA2. Imunoglobulin A1 ditemukan dalam rasio yang cukup tinggi pada serum, sementara rasio IgA2 lebih banyak ditemukan pada kolon. Sementara pada permukaan mukosa lainnya keduanya memiliki rasio yang seimbang. IgA diproduksi dalam jumlah yang cukup banyak setiap harinya, terutama pada daerah usus. Terdapat perbedaan struktur IgA ini pada serum dan mukosa, dimana struktur IgA serum berupa monomerik, sementara IgA mukosa memiliki struktur dimerik dan membutuhkan transpor ke dalam lumen usus dengan pIgR (*polymeric immunoglobulin receptor*). IgA sekretorik berperan mempertahankan homeostasis intestinal dengan berikatan pada, dan melingkupi berbagai mikroba komensal. Berbeda dengan IgM, IgA tidak berikatan dengan

C1q sehingga tidak dapat mengaktivasi sistem komplemen, melainkan berikatan dengan Fc α RI (CD89) yang diekspresikan oleh sel mieloid dan memediasi fagositosis dan ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) (30).

IgG

Subtipe imunoglobulin ini merupakan Ig dengan jumlah paling banyak di serum dan merupakan efektor utama sebagai respons terhadap inflamasi. Terdapat empat kelas IgG, yang dibedakan berdasarkan struktur *hinge* dan domain Ch2, yang menyebabkan adanya perbedaan ikatan pada reseptor Fc γ dan C1q. Kelas IgG1 dan IgG3 menginduksi respons pro-inflamasi yang kuat, sementara IgG2 dan IgG4 sering kali dikaitkan dengan respons anti-inflamasi atau respons toleransi imun. Selain secara sistemik, peran penting IgG yaitu pada pertahanan permukaan mukosa, terutama mukosa saluran respirasi dan genitalia, dimana konsentrasi IgG bahkan melebihi jumlah IgA. Semua kelas IgG berbentuk monomer dan tidak berikatan dengan pIgR. Imunoglobulin ini mampu berkaitan pula pada reseptor Fc neonatus (FcRn), yang diekspresikan pada sel epitel dan mampu memfasilitasi transpor menembus sawar mukosa, seperti plasenta. FcRn juga diekspresikan pada sel endotelial dan mieloid, sehingga dapat memperpanjang waktu paruh IgG (30).

IgE

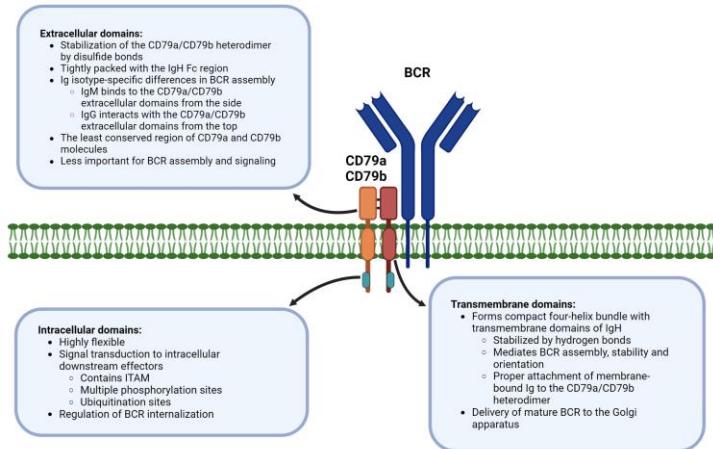
Kelas imunoglobulin ini ditemukan dalam jumlah atau kadar yang rendah di dalam serum, hanya sekitar 0,0004% dari total imunoglobulin yang beredar. Sifat penting dari imunoglobulin ini adalah kemampuan dalam perlekatan secara erat pada permukaan sel mast atau basofil melalui reseptor Fc. Saat sel yang dilapisi IgE terpapar pada suatu alergen, maka sel akan melepaskan mediator yang terlibat dalam reaksi hipersensitivitas, seperti histamin, SRS-A, dan ECF-A. Pelepasan mediator ini menimbulkan gejala alergi terhadap paparan alergen. Sehingga IgE dikenal sebagai imunoglobulin yang berperan dalam reaksi hipersensitivitas tipe segera (*immediate type*), seperti pada rintis musiman, asma, urtikaria, hingga reaksi anafilaksis (21)

Selain itu, IgE juga berperan penting dalam respons imun terhadap investasi cacing dan perlindungan tubuh terhadap parasit. Patogen berupa parasit yang diselimuti oleh IgE, lebih mudah dieliminasi oleh eosinofil. IgE berikatan erat dengan reseptor Fc pada sel mast, kemudian mediator yang dilepaskan akan menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler dan pelepasan ECF-A, merangsang pelepasan *platelet activating factor* (PAF) dan eosinofil peroksidase yang berperan dalam penghancuran parasit (21).

C. Reseptor Sel B

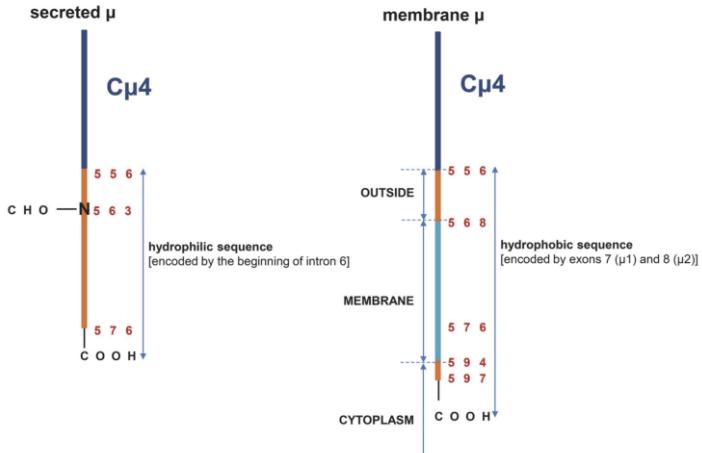
Reseptor sel B membentuk jaringan persinyalan yang penting dalam berbagai tahapan siklus hidup sel B. Reseptor ini merupakan molekul yang menjadi karakteristik sel B dan menentukan kelangsungan hidup sel B, aktivasi, perkembangan, dan transformasi sel ini menjadi efektornya yaitu sel plasma yang menyekresi immunoglobulin (31).

Sel B dikenali dengan adanya Ig yang terikat membran (*membrane-bound Igs*, mIg) yang berperan sebagai reseptor spesifik untuk antigen yang cocok pada sel B, serta sebagai penanda dari lini sel B. Reseptor ini bersama dengan rantai glikoprotein lain, membentuk kompleks yang disebut *B-cell antigen receptor complex* (BCR) (29,31). Hampir setiap molekul reseptor BCR dipresentasikan pada permukaan sel B yang mengandung Ig yang tertanam pada membran (kelas M, D, G, A, atau E) dan tersusun oleh dua rantai ringan dan berat yang terhubung dengan ikatan disulfide (31). Komplek BCR berikatan pada fosfoprotein heterodimer transmembran dengan ikatan disulfida Ig α /Ig β (CD79a dan CD79b), yang dikode oleh gen mb-1 dan B29, serta memiliki kemiripan struktur dengan rantai CD3 γ , δ , dan rantai ϵ pada sel T, sehingga terlibat pada transduksi sinyal pada sel B. Domain intraseluler atau intrasitosolik dari protein inilah yang terlibat dalam inisiasi transduksi sinyal, yang distimulus oleh adanya ikatan antigen spesifik pada mIg (29,31).



Gambar 12 Fungsi domain CD79a/CD79b pada persinyalan reseptor sel B. *BCR, B-cell receptor; Fc region, fragment crystallizable region; IgH, Immunoglobulin heavy chain; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif*(31)

Ketika kita membahas imunoglobulin, maka kita harus dapat membedakan antara Ig yang disekresikan (sIg) dan Ig yang terikat membran sel (mIg), seperti yang kita bahas di atas. Perbedaan utama antara kedua Ig tersebut adalah pada regio C-terminal rantai beratnya. Kedua Ig ini dibedakan oleh ujung COOH pada rantai μ dan tentunya terdapat pula perbedaan ujung 3' mRNA yang mengkodenya. Contohnya, IgM terikat membran berukuran sedikit lebih besar dibandingkan IgM disekresi. Hal ini juga diakibatkan oleh adanya pemanjangan sekuen hidrofobik pada mIg yang berperan untuk melintasi atau menembus lipid lapis ganda pada membran sel (29).



Gambar 13 Perbedaan imunoglobulin yang disekresikan (sIg) dan imunoglobulin terikat membran (mIg) (29)

D. Perkembangan dan Fungsi Sel Limfosit B

Seperti yang telah dibahas sebelumnya, sel B dihasilkan oleh sel punca hematopoietik yang berada pada sumsum tulang. Sel-sel ini berkembang menjadi sel pro-B, kemudian menjadi pre-B, dan sel B imatur, terakhir berkembang menjadi sel B matur yang dicirikan dengan beberapa hal seperti modifikasi penanda diferensiasi pada membran sel, penyusunan ulang gen Ig sehingga dapat diekspresikan sebagai BCR, dan seleksi negatif klonal. Ontogenesis sel B terjadi pada hepar fetus, sumsum tulang, dan berlanjut sepanjang kehidupan individu (29).

Diferensiasi sel punca hematopoietik (HSC) menjadi sel B imatur terjadi dalam beberapa tahapan, yang dapat dikenali melalui penanda tertentu dan berhubungan dengan

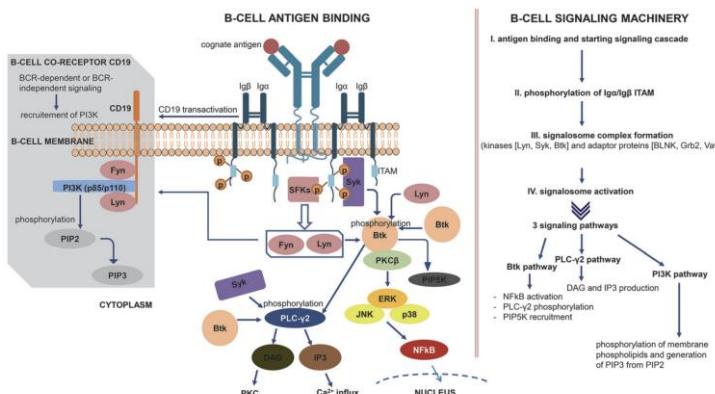
tahap penyusunan ulang gen imunoglobulin (Ig). Berikut merupakan tahapan diferensiasi sel B:(29)

1. Pro-sel B awal, muncul sebelum dimulainya penyusunan ulang gen. Tahapan ini dikenali dengan CD45R, MHC II, dan penanda CD19 dan CD38.
2. Pro-sel B akhir, terjadi rekombinasi domain Variabel (V), *Diversity* (*D*), dan *joining* (*J*) untuk segmen gen rantai H imunoglobulin dan induksi ekspresi reseptor untuk interleukin 7 (IL-7).
3. Pre-sel B, dimana terjadi kontak antara molekul adhesi (khususnya *vascular cell adhesion molecule* 1, VCAM-1/CD106) pada permukaan sel stromal dan ligannya yaitu *very late antigen-4* (VLA-4 atau $\alpha 4\beta 1$ integrin) pada permukaan pre-sel B. Pada tahap ini dapat dideteksi penanda CD20.
4. Sel B imatur, mengekspresikan IgM pada permukaan selnya, yang menstimulus *feedback* negatif yang menghentikan penyusunan ulang gen yang baru, yang dikode oleh rantai L. Sehingga hal ini menyebabkan perkembangan sel B dengan Ig spesifik dan unik. Pada tahap ini sel diidentifikasi dengan adanya penanda CD21.

E. Aktivasi Sel B

Saat terjadi ikatan suatu antigen pada mIg, akan terjadi induksi terhadap agregasi BCR, dan terjadi fosforilasi Ig α /Ig β *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

(ITAM) melalui rekrutmen Syk dan SFK (Fyn, Lyn). Proses ini dimulai dengan pembentukan signalosome, yang kemudian mengaktivasi 3 jalur utama, mencakup Btk, PLC- γ 2, dan PI3K. BCR dapat mengaktivasi juga ko-reseptor sel B CD19, yang membentuk suatu kompleks ko-reseptor tetrametik bersama CD21 dan CD8, tetraspanin 1 (Tspan 1, NET-1), dan Leu 12 (CD225). CD19 sendiri memiliki domain sitoplasmik yang cukup panjang, sehingga dapat berikatan dan mengamplifikasi fungsi SFK dan merekrut sebuah heterodimer PI3K p85/p110 kelas IA secara bersamaan, yang kemudian akan memfosforilasi fosfolipid membran yaitu PIP2, sehingga terjadi produksi *second messenger* PIP3, dan juga mempromosikan Btk dan Akt, serta fosforilasi kinase serine/threonine pada sel B. Jalur Btk menyebabkan adanya aktivasi NfkB, fosforilasi PLC- γ 2, dan rekrutmen PIP5K. Sementara jalur PLC- γ 2 menghasilkan produksi DAG dan IP3, yang nantinya berperan dalam proses masuknya ion kalsium ke dalam sel. Proses ini dapat dilihat pada gambar 14 berikut ini (30).

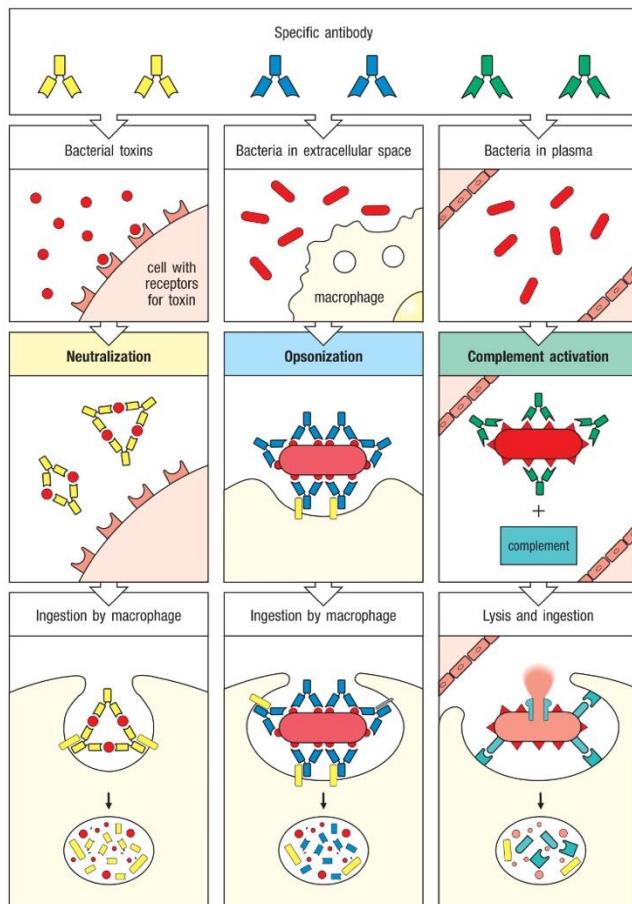


Gambar 14 Proses aktivasi sel B oleh stimulus ikatan sel B pada antigen yang terjadi pada organ limfoid sekunder (SLO). *Akt, protein kinase B/PKB; BCR, B-cell antigen receptor; BLNK, B-cell linker; Btk, Bruton's protein tyrosine kinase/non-receptor kinase; CD, cluster of differentiation; ERK, extracellular signal-regulated kinase; Fyn, proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn/non-receptor Fyn protooncogene; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motifs; JNK, c-Jun N-terminal kinase; Lyn, Lck/yes novel tyrosine kinase; Ig, imunoglobulin terikat membran; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; PIP2, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PIP3, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; PLC γ 2, phospholipase C- γ 2; PKC β , protein kinase C β ; SLOs, secondary lymphoid organs; SFKs, Src-family kinase/Src-protein-tyrosine kinase atau Src family tyrosine kinase; Src, proto-oncogene tyrosine-protein kinase c-Src (cellular Src kinase); Syk, spleen tyrosine kinase/non-receptor tyrosine kinases; Vav, protein yang berperan guanine nucleotide exchange factors (GEFs) untuk small G proteins of the rho family (29).*

F. Fungsi dan Prinsip Kerja Antibodi

Sistem imunitas yang diperankan oleh antibodi disebut dengan imunitas humoral, yang merupakan bagian dari respons imun adaptif. Antibodi dapat ditemukan di dalam plasma dan cairan ekstraseluler. Fungsi pertama dari antibodi yaitu melindungi individu dari patogen atau produknya dengan berikatan pada patogen maupun substansi atau produknya dan memblokade aksesnya menuju sel. Fungsi ini

disebut dengan **netralisasi**, yang terutama berperan pada infeksi virus maupun toksin bakteri. Fungsi berikutnya dari antibodi adalah **opsonisasi**, dimana patogen maupun partikel asing dilapisi oleh antibodi, dan membantu kerja dari sel fagosit. Fungsi ketiga adalah **aktivasi komplemen**. Pada fungsi ini, antibodi berikatan pada permukaan bakteri, dan menyebabkan aktivasi sistem komplemen yang lebih efisien (12).



Gambar 15 Fungsi dan prinsip kerja *antibody* (12)

Buku ini tidak diperjualbelikan.

BAB IV

PRINSIP INTERAKSI ANTIGEN-ANTIBODI

Pada materi sebelumnya telah dijelaskan jenis dan bagaimana antibodi diproduksi oleh sel plasma. Antibodi diproduksi sebagai respons terhadap interaksi antara sel B dengan antigen. Antigen sendiri merupakan molekul yang dapat dikenali oleh reseptor sel B ataupun sel T dan dapat memunculkan respons imun. Antigen umumnya memiliki lebih dari satu epitop (umumnya di permukaan) yang dapat dikenali oleh antibodi. Antibodi akan diproduksi secara spesifik berdasarkan respons terhadap epitop dari antigen target, sehingga satu jenis antigen dapat menstimulasi terbentuknya lebih dari satu jenis antibodi sesuai dengan jumlah dan tipe epitop yang dimiliki (32).

Interaksi antara antigen dan antibodi yang spesifik ini dimanfaatkan oleh manusia untuk beragam metode pemeriksaan. Pada prinsipnya, jika antibodi dapat mengenali antigen secara spesifik, maka secara prinsip antibodi akan dapat mengenali antigen dari patogen secara spesifik, hingga ke tingkat molekuler. Sebagai contoh pada masa pandemi COVID-19, *Rapid Test Antigen SARS-CoV-2* dapat mengenali virus SARS-CoV-2 penyebab COVID-19 secara spesifik dengan menggunakan prinsip interaksi **antigen-antibodi (Ag-Ab)** ini (33). Berdasarkan

prinsip kerja yang sama, manusia mampu mengembangkan beragam alat diagnosis untuk mendeteksi patogen penyebab penyakit. Untuk dapat memiliki pemahaman yang komprehensif mengenai interaksi antara Ag-Ab ini, maka akan dibahas terlebih dahulu beberapa poin penting yang akan berpengaruh pada interaksi Ag-ab tersebut. Selain itu, juga akan dibahas beberapa definisi dan istilah yang umum digunakan dalam pembahasan mengenai interaksi Ag-Ab ini.

A. Antigen dan Imunogen

Secara umum antigen memiliki dua sifat berdasarkan interaksinya dengan sistem imun, antigen dapat bersifat **antigenitas** maupun **imunogenitas**.



Gambar 16 Karakteristik Antigenitas dan Imunogenitas pada Antigen
(32)

Melihat pada sifatnya, maka antigen yang akan memberikan respons imun adalah imunogen sehingga pada buku ini antigen yang dibahas merujuk pada imunogen, bukan hapten. Antigen tersebut umumnya berasal dari patogen seperti virus, bakteri, dan parasit yang memunculkan respons imun dan menyebabkan penyakit pada manusia.

Pada tahap awal terjadinya infeksi, sistem imun harus mampu mengenali antigen (patogen atau non-patogen) yang menginfeksi untuk dapat memulai mekanisme pertahanan. Pada level molekuler, pengenalan yang dilakukan oleh sistem imun adalah dengan mengenali makromolekul penyusun antigen tersebut yang umumnya tersusun dari *protein*, *polisakarida (karbohidrat)*, *lipid*, dan *asam nukleat*. Di antara makromolekul tersebut, protein merupakan antigen dengan imunogenitas tertinggi, diikuti oleh polisakarida. Lipid dan asam nukleat jarang dianggap sebagai immunogen, kecuali jika membentuk kompleks dengan protein atau polisakarida (32).

Dalam pengembangan berbagai jenis alat diagnosis berbasis *immunoassay*, manusia memanfaatkan beberapa *sifat immunogen* dan *mekanisme biologis ketika berinteraksi dengan immunogen tersebut*. Berikut beberapa sifat immunogen yang dapat memengaruhi imunogenitasnya. (34).



Gambar 17 Sifat Imunogen (32)

1. Keasingan

Sel imun seperti sel limfosit memiliki toleransi terhadap sel sendiri. Pada proses pematangannya, limfosit mengenali berbagai komponen tubuh dan mengembangkan toleransi terhadap sel sendiri. Molekul asing yang masuk ke dalam tubuh akan dikenali sebagai benda asing (antigen) oleh limfosit sehingga menstimulasi imunogenitas sel imun. Semakin asing sebuah molekul (berbeda spesies misalkan), maka semakin besar respons imunogenitas yang akan muncul (32).

Sebagai contoh, meskipun sama-sama antibodi (antibodi tersusun atas protein), namun antibodi dari spesies berbeda seperti kelinci dan manusia akan saling mengenali antibodi satu sama lain sebagai antigen. Hal ini terjadi karena keduanya asing satu sama lainnya. Semakin jauh spesies atau famili dari individu (mamalia dan reptil

lebih asing dibandingkan sesama mamalia) maka semakin asing kedua individu tersebut.

2. Ukuran molekul

Semakin besar ukuran molekul, semakin besar potensinya sebagai immunogen. Umumnya molekul dengan ukuran kurang dari 5.000-10.000 dalton (Da) tergolong ke dalam immunogen lemah. Sementara itu immunogen dengan ukuran >100.000 Da dianggap memiliki imunogenitas yang kuat (32).

3. Komposisi kimia dan heterogenitas

Semakin kompleks suatu immunogen, maka semakin kuat imunogenitasnya. Molekul yang homogen akan lebih rendah sifat imunogenitasnya dibandingkan molekul heterogen (32).

4. Interaksi dengan sel imun

Untuk dapat mengaktifkan respons imun, immunogen harus diproses oleh sel imun. Immunogen yang berukuran besar dan tidak larut umumnya memiliki imunogenitas yang kuat karena ukuran molekul yang besar akan lebih mudah diproses oleh sel fagosit. Sementara itu immunogen yang tidak dapat diproses oleh sel fagosit umumnya memiliki imunogenitas yang rendah (32).

Selain sifat dari immunogen itu sendiri, bagaimana mekanisme biologis dari sel inang merespons immunogen juga akan memengaruhi interaksi antara immunogen dan inang (interaksi Ag-Ab). ***Genom inang, dosis immunogen***

dan jalur masuk immunogen akan memengaruhi bagaimana respons imang terhadap immunogen. Gen inang khususnya gen yang mengkodekan sel B, sel T, dan sel yang berperan pada pembentukan dan kinerja *major histocompatibility complex* (MHC) akan menentukan bagaimana respons inang terhadap immunogen (9).

Ketika dosis immunogen yang digunakan rendah, umumnya dosis tersebut tidak mampu menstimulasi respons imun yang diinginkan. Pada kasus ini, maka immunogen diberikan dengan dosis rendah namun berulang (umumnya dikenal dengan istilah **booster**) demi memberikan stimulasi respons imun yang diinginkan. Jalur masuk immunogen juga tak kalah penting dalam menstimulasi respons imun. Immunogen yang diinjeksikan ke dalam vena umumnya akan masuk ke empedu terlebih dahulu, berbeda dengan immunogen yang diinjeksikan melalui jaringan subkutan yang akan langsung menuju saluran dan nodul getah bening terdekat. Dua lokasi berbeda ini akan menstimulasi sel imun yang spesifik berdasarkan lokasi interaksinya (32).

B. Patogen

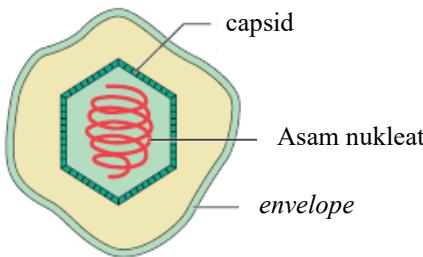
Setelah mempelajari mengenai sifat-sifat dari antigen maupun immunogen, selanjutnya akan dibahas beberapa jenis antigen penyebab penyakit pada manusia atau patogen. Patogen tersebut berperan sebagai antigen yang akan menstimulasi respons imun pada tubuh dan di saat yang sama

menyebabkan penyakit. Karakteristik masing-masing patogen yang unik menjadikan interaksinya dengan antibodi juga akan berbeda dan spesifik.

Adanya interaksi Ag-Ab ketika terjadi infeksi digunakan manusia untuk menjadi landasan berbagai pemeriksaan di bidang kesehatan dan biologi. Interaksi Ag-Ab ini terjadi antara manusia selaku inang dengan patogen penyebab penyakit berupa virus, bakteri, dan parasit. Meskipun setiap patogen akan memiliki mekanisme interaksi spesifik dengan sel imun tubuh, namun secara umum interaksi ini muncul sebagai respons fenotipe dari patogen. Bagian berikut akan dijelaskan fenotipe dari masing-masing patogen tersebut.

1. Virus

Virus merupakan organisme infeksius yang tersusun dari protein dan genom (asam nukleat yang berupa RNA ataupun DNA) yang bersifat parasit. Virus tidak memiliki struktur selular sehingga untuk proses reproduksi dan metabolismenya, virus memanfaatkan komponen selular inang. Partikel virus dewasa (virion) umumnya terdiri dari ***genom***, ***capsid*** dan beberapa di antaranya dilengkapi dengan ***envelope/selubung*** (35).



Gambar 18 Struktur Virus (33)

Berikut penjelasan lebih lanjut mengenai struktur dari virus.

Genom

Material pembawa sifat (genom) dari virus dapat berupa DNA maupun RNA. Urutan genom virus bersifat unik, diturunkan dan dapat mengalami mutasi. Contohnya virus SARS-CoV-2 penyebab COVID-19 merupakan virus dengan genom berupa RNA sepanjang 29.8 – 29.9 kb (36). Selama masa pandemi SARS-CoV-2 telah mengalami banyak mutasi, dari varian Wuhan 1 virus ini bermutasi menjadi varian lain seperti delta dan omicron (37,38). Pada kasus SARS-CoV-2, delesi gen HV69-70 pada gen *spike* menjadi penanda varian Omicron, termasuk Omicron jenis BA.2.40 yang diduga berasal dari Malaysia dan hanya muncul sesaat di Kalimantan Barat (39).

Terdapat beberapa jenis virus yang dapat menyebabkan tumor dan kanker dan dikenal sebagai

Oncovirus. Beberapa strain Human Papilloma Virus (HPV) diketahui dapat menyebabkan kanker serviks, seperti HPV-16 dan HPV-18. Virus jenis ini memiliki gen yang mengkodekan protein E6 dan E7 yang menjadi penanda ada tidaknya infeksi HPV (40). Meskipun material genetik memiliki imunogenitas yang rendah, namun material genetik dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies hingga strain virus tertentu. Identifikasi patogen berbasis material genetik dapat dilakukan dengan analisis biomolekular, salah satunya menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR).

Kapsid

Kapsid merupakan selubung protein yang melindungi material genetik virus. Selain melindungi, kapsid juga berperan pada proses penempelan virus pada inang dan berperan penting pada virulensi virus (35).

Envelope/Selubung

Selubung hanya ditemukan pada beberapa jenis virus dan berperan untuk melindungi genom dan kapsid (sering disebut sebagai *nucleocapsid*). Selubung tersusun dari lipid bilayer yang diselubungi oleh glikoprotein (41). Perlu diingat bahwa protein dan karbohidrat merupakan immunogen kuat sehingga selubung yang mengandung glikoprotein dapat menstimulasi respons imun pada sel inang (35).

Interaksi antara Sistem Imun dan Virus

Ketika menginfeksi sel inang, selubung dan kapsid merupakan komponen pertama dari virus yang akan berinteraksi dengan sel imun inang. Sistem imun bawaan (*innate immune system*) seperti produksi IFN- α dan IFN- β serta Sel NK akan berperan penting di awal infeksi. Namun, respons spesifik yang muncul dari infeksi virus umumnya berupa aktivasi sistem imun humorai berupa pembentukan antibodi (IgA, IgG, dan IgM). Seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya bahwa antibodi dibentuk secara spesifik sesuai dengan antigennya, sehingga antigen dari virus yang menginfeksi akan menstimulasi antibodi yang spesifik pula. Sifat inilah yang kemudian digunakan sebagai dasar pada berbagai pemeriksaan penyakit akibat infeksi virus (32).

Pada kasus COVID-19, SARS-CoV-2 akan menginfeksi sel inang, melepaskan material genetiknya (berupa RNA) ke dalam sitosol sel inang, memanipulasi sel inang sehingga material genetik virus dapat diproduksi. Sel inang yang terinfeksi akan dikenali oleh sel imun dan menginduksi produksi sitokin seperti IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, IFN yang berdampak pada rekruitmen sel dendritik, CD8 $^{+}$, *killer cell*, serta menstimulasi pembentukan antibodi. Di saat yang sama, infeksi SARS-CoV-2 menyebabkan stres oksidasi, kerusakan mitokondria dan DNA sel inang hingga menyebabkan

kematian sel yang pada banyak kasus menyebabkan *cytokine storm* pada pasien COVID-19 (42). SARS-CoV-2 juga akan menginisiasi terbentuknya antibodi melalui aktivasi sel plasma, CD4⁺, CD8⁺, T_{helper}, dan T_{killer}. Sel B yang teraktivasi membentuk sel plasma yang memproduksi antibodi (IgG, IgA, dan IgM), serta sel memori yang dapat memberikan proteksi hingga 6 bulan sejak infeksi (43).

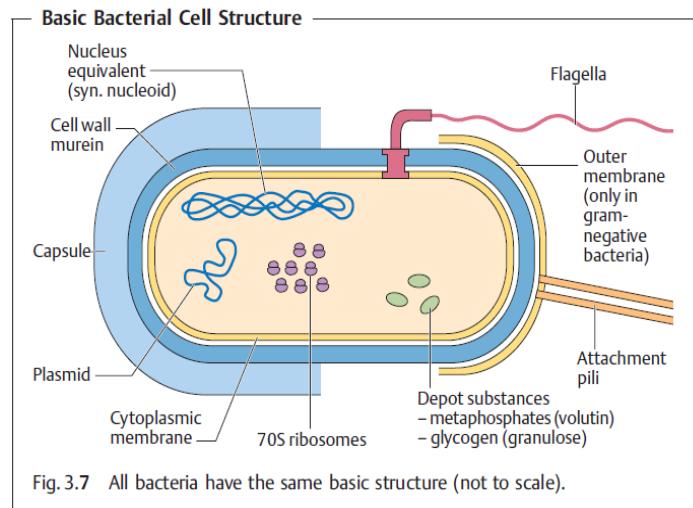
Pada diagnosis COVID-19, sampel uji yang digunakan dapat berupa antibodi dari pasein (IgG dan IgM), maupun antigen berupa protein E, N, S serta genom virus. Pasien yang terinfeksi SARS-CoV-2 akan memproduksi IgM di awal infeksi dan selanjutnya IgG yang dapat bertahan berbulan-bulan pasca infeksi. Keberadaan antibodi ini digunakan sebagai landasan pada pemeriksaan *rapid immunokromatografi* berbasis antibodi (44).

Pemeriksaan lain dengan prinsip yang sama adalah pemeriksaan antibodi dengan menggunakan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), sebuah alat diagnostik yang menggunakan prinsip interaksi Ag-Ab untuk mendeteksi ada tidaknya antigen/antibodi target. Jika ELISA digunakan untuk mendeteksi SARS-CoV-2, umumnya antibodi pasien yang dicurigai terinfeksi SARS-CoV-2 akan direaksikan dengan antigen berupa protein *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2 (45). Pada

tipe pemeriksaan biomolekular lain seperti pemeriksaan *Polymerase chain reaction*, genomik SARS-CoV-2 dapat digunakan sebagai antigen target dengan tujuan untuk memastikan ada tidaknya virus tersebut pada sampel. Deteksi gen dari SARS-CoV-2 tidak hanya memberikan hasil yang akurat, tetapi juga dapat memberikan informasi tambahan mengenai jenis varian SARS-CoV-2 (37,46).

2. Bakteri

Bakteri merupakan organisme uniseluler dengan ukuran 0.3 -3 5 μm . Meskipun organisme uniseluler, namun bakteri memiliki morfologi yang lebih kompleks dibandingkan virus. Secara umum bakteri dapat diklasifikasikan berdasarkan ukuran, bentuk, jenis pewarnaan untuk identifikasi, sifat khas biokimianya, dan klasifikasi berdasarkan genotipenya. Bakteri tergolong ke dalam prokariotik, sehingga inti sel (*nukleoid*) dan organel yang ada di dalam sel tidak memiliki membran. Secara umum, bakteri memiliki struktur sebagai berikut (47):



Gambar 19 Struktur dasar bakteri (33)

a. Bagian permukaan sel bakteri

Bagian permukaan sel merupakan bagian terluar dari sel bakteri yang berinteraksi secara langsung dengan sistem imun manusia ketika menginfeksi. Bagian terluar bakteri ini dapat berupa flagela, pili maupun kapsul. **Flagela** tersusun atas protein yang disebut flagelins dan berfungsi sebagai alat gerak. Beberapa jenis *Enterobacteriaceae* memiliki antigen pada flagelanya berupa H antigen dan O antigen yang sering digunakan untuk mengklasifikasikan bakteri jenis tersebut. **Pili** berbentuk ramping seperti rambut dan banyak ditemukan pada bakteri gram negatif dan berfungsi pada proses penempelan bakteri pada sel inang. Konjugasi antara pili dengan sel inang diperlukan untuk dapat mentransfer plasmid dari

bakteri ke sel inang. Selain itu, beberapa bakteri menyintesis polimer yang akan membentuk semacam dinding pada bakteri yang disebut **kapsul**. Kapsul berperan dalam mencegah bakteri untuk mengalami fagositosis. Umumnya kapsul pada bakteri tersusun atas polisakarida (47).

b. Biofilm

Biofilm merupakan komponen ekstraseluler yang tersusun atas protein (fibrin), polisakarida (*alginate*) dan DNA. Biofilm memiliki fungsi untuk melindungi bakteri dari sistem imun sel inang serta membantu bakteri untuk menempel pada sel inang. Biofilm dapat berukuran tebal sehingga memberikan perlindungan yang diperlukan oleh bakteri untuk menghindar dari sistem imun, antibodi maupun antibiotik. Keberadaan biofilm ini akan menyebabkan bakteri menjadi dorman, namun di saat yang sama menyebabkan kerusakan jaringan dan infeksi akut (48). Infeksi akibat bakteri dengan biofilm umumnya berlangsung lambat, sulit untuk ditangani hanya dengan sistem imun dan tidak memberikan respons yang konsisten terhadap antibiotik (47).

c. Spora

Spora bakteri atau endospora merupakan bentuk dorman (kondisi vegetatif) dari bakteri yang dibentuk dengan tujuan untuk melindungi bakteri dari kondisi

lingkungan yang tidak menguntungkan. Spora umumnya berbentuk oval, tebal dan memiliki resistensi yang tinggi terhadap gangguan fisik dan kimia. Karakteristik utama dari spora ini adalah ketahanannya terhadap panas sehingga dibutuhkan suhu yang sangat tinggi untuk mensterilisasi bakteri berspora (beberapa hingga 150°C). Struktur spora yang tebal, kemampuan dehidrasi spora serta adanya rangkaian ikatan antara protein dengan garam kalsium dari asam pyridine-2,6-dicarboxylic acid ini berkontribusi pada ketahanan spora terhadap panas (35). Bakteri dengan spora contohnya *Bacillus* dan *Clostridium* (49).

d. Dinding Sel dan Selubung sel pada Bakteri Gram

Bakteri umumnya dibagi menjadi bakteri gram positif dan gram negatif berdasarkan struktur antara membran dan kapsulnya yang dikenal dengan istilah dinding sel. Dinding sel berfungsi untuk melindungi komponen sitoplasmik, menjaga keseimbangan antara tekanan osmotik sel dan lingkungan, memberikan bentuk pada sel, serta memfasilitasi komunikasi antara sel bakteri dengan lingkungan sekitar. Struktur penyusun dinding sel ini berupa *peptidoglycan* (sering dikenal dengan nama mukopeptida atau murein) yang tersusun atas rantai polisakarida yang bekaitan dengan berbagai peptida (asam amino). Selain *peptidoglycan*, dinding

sel ini juga mengandung komponen lain seperti polisakarida, peptidoglikolipid, dan asam teikoat. Asam teikoat pada dinding sel dapat menstimulasi makrofag pada sel imun inang untuk memproduksi berbagai sitokin. Struktur dari dinding sel ini memberikan pengaruh pada tingkat patogenitas dari bakteri ketika menginfeksi (35).

Bakteri gram negatif memiliki struktur khas yang tidak dimiliki oleh bakteri gram positif yaitu Lipopolisakarida (LPS). Ketika LPS terdegradasi, molekul penyusun LPS ini akan menjadi endotoksin yang tersusun dari lipoid A (polisakarida) dan rantai O-spesifik polisakarida. Lipoid A merupakan komponen pada LPS yang menyebabkan toksisitas. Lipoid A pada LPS akan berikatan dengan CD14 pada makrofag dan menstimulasi sintesis berbagai sitokin. Lipoid A juga menjadi penentu jenis antibodi yang akan diproduksi oleh inang. Rantai O-spesifik polisakarida atau “Antigen O” merupakan komponen yang sering digunakan untuk menentukan varian antigenitas dari bakteri, misalkan digunakan untuk menentukan sub-tipe bakteri *Salmonella sp*. Meskipun memiliki struktur yang sama, namun bakteri gram positif memiliki ketebalan dinding sel hingga 40 lapisan dan dapat berkontribusi sebanyak 30% dari total berat kering sel. Dinding sel yang lebih tebal ini menyebabkan model

pewarnaan yang digunakan untuk bakteri gram positif berbeda dari bakteri gram negatif (47).

e. Komponen Sitoplasmik

Komponen sitoplasmik merupakan komponen pada sel bakteri yang berada di dalam sitoplasma dan sekitarnya, seperti membran plasma, organel, dan endospora. **Membran plasma** merupakan komponen terluar sitoplasma yang berfungsi untuk transpor, biosintesis dan energi transduksi. Membran plasma umumnya tersusun atas fosfolipid yang terintegrasi dengan berbagai jenis protein. **Organel** memiliki membran yang tersusun dari protein, lipid mono dan bilayer (50).

f. Nukleoid dan Plasmid

Nukleoid bakteri tersusun atas DNA sirkular berutas ganda yang tidak dilindungi oleh selubung/membran. Informasi genetik yang terdapat di dalam nukleoid digunakan oleh bakteri untuk menjalankan fungsi dan metabolisme. Selain nukleoid, informasi genetik pada bakteri juga dapat ditemukan pada **plasmid**. Namun, berbeda dengan nukleoid, informasi genetik pada plasmid umumnya membawa gen yang menentukan fenotipe bakteri terutama terkait kemampuan menginfeksi dan resistensi. Dalam dunia kesehatan terdapat dua jenis plasmid yang sering dibahas, yaitu **plasmid virulen** dan **plasmid resisten**. Plasmid

virulen membawa gen yang menyebabkan bakteri memiliki sifat virulen, contohnya gen enterotoxin (toksin pada saluran pencernaan) dan gen hemolisin (toksin yang menyebabkan kerusakan membran sel darah merah). Sementara itu plasmid resistan merupakan plasmid pembawa gen yang menyebabkan bakteri tahan terhadap substansi antibakterial contohnya gen R (47).

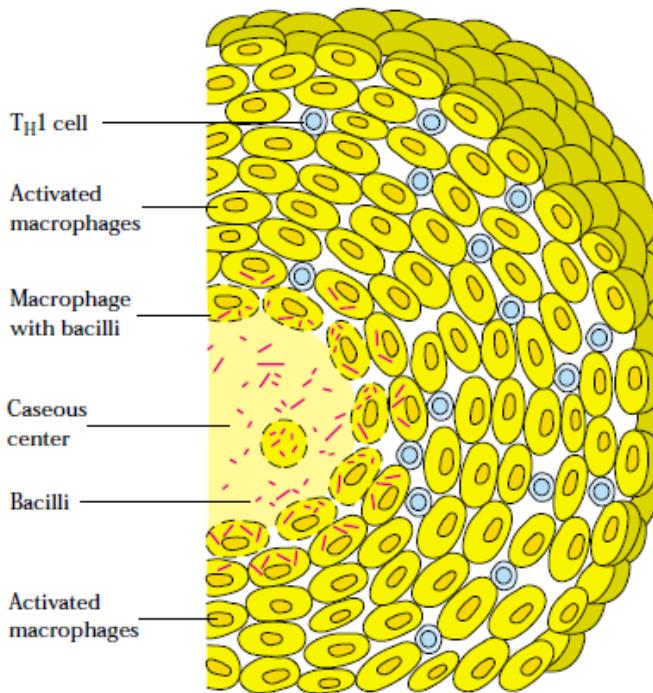
Interaksi antara Sistem Imun dan Bakteri

Setiap bakteri memiliki beragam strategi untuk dapat bertahan dari serangan sel imun ketika menginfeksi. Secara umum bakteri dapat masuk melalui berbagai saluran di dalam tubuh (saluran pernafasan, pencernaan, kelamin) maupun dari luka. Jumlah bakteri dan virulensinya akan menentukan jenis sel imun yang akan bekerja. Infeksi awal dengan jumlah bakteri yang kecil dan atau efek virulensi yang lemah dapat di atasi dengan mengaktivasi sistem imun humoral yang bersifat lokal, seperti aktivasi sel-sel fagosit. Namun, ketika infeksi terjadi dalam jumlah besar dan sifat virulensinya kuat, maka infeksi ini dapat menstimulasi terbentuknya antibodi. Diproduksinya antibodi terjadi sebagai respons adanya **endotoksin** (contohnya LPS) maupun **eksotoksin** (toksin yang diproduksi oleh bakteri, seperti eksotoksin dari bakteri difteri) (32).

Sebagai contoh IgA bekerja dengan cara mencegah bakteri untuk menempel pada mukosa sel epithelial dan merupakan antibodi utama yang mencegah penempelan ini. *Neisseria gonorrhoeae* dan *Neisseria meningitidis* merupakan contoh bakteri yang mampu menghindari IgA dengan menyintesis enzim protease yang dapat merusak IgA. Mekanisme pertahanan lain dimiliki oleh *Streptococcus pneumoniae* yang dapat menghindari fagositosis sel imun karena memiliki kapsul yang tersusun dari polisakarida. Beberapa bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang mengandung endotoksin yang dapat mengaktifasi makrofag, namun di saat yang sama aktivasi makrofag ini meningkatkan konsentrasi sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 dan TNF- α sehingga menyebabkan *shock sepsis* pada pasien (34).

Mycobacterium tuberculosis, bakteri penyebab tuberkulosis, merupakan bakteri berbentuk basil, gram negatif, non-motil (tidak bergerak), anaerob, tahan asam (51), tidak berspora, dan memiliki dinding sel yang relatif tebal yang mengandung lipid bermassa tebal (52). Ketika menginfeksi sel paru, *M. tuberculosis* akan mengaktifasi sel CD4 $^{+}$ (2-6 minggu sejak terinfeksi) yang akan menstimulasi infiltrasi makrofag ke lokasi infeksi dalam jumlah besar. Makrofag tersebut akan memakan dan menelan bakteri *M. tuberculosis* (fagositosis) untuk mencegah infeksi bakteri pada sel lainnya. Namun, *M.*

tuberculosis dapat bertahan hidup meskipun berada di dalam sel makrofag dengan cara mencegah terbentuknya fagolisosom. Makrofag yang terinfeksi tersebut tidak akan mengalami proliferasi sel sehingga *M. tuberculosis* di dalamnya dapat bertahan. Akibatnya, akan terbentuk ekosistem (*tubercle*) yang terdiri dari sejumlah kecil limfosit, makrofag aktif, makrofag yang mengandung bakteri *M. tuberculosis*, dan sel Th1. *Tubercle* akan menghasilkan antigen mikobakterium yang mengaktivasi sel CD4⁺ dan makrofag terus menerus dalam jumlah besar. Akibatnya, disintesis enzim litik yang menghancurkan sel normal lain di sekitarnya (nekrosis) dan menyebabkan terbentuknya lesi dengan struktur yang memiliki konsistensi seperti keju, media ideal pertumbuhan ekstraseluler *M. tuberculosis*. Ketika sel nekrosis ini mulai sembuh, sel nekrosis tersebut akan mengalami kalsifikasi (pengerasan) hingga dapat diamati dengan menggunakan *X-ray* (32).



Gambar 20 Tuberkel yang terbentuk pada kasus tuberkulosis pulmonari (32)

Satu-satunya vaksin yang tersedia untuk mencegah infeksi *M. tuberculosis* adalah vaksin BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*). BCG berisi *Mycobacterium bovis* yang sudah dilemahkan yang akan menstimulasi terbentuknya antibodi yang dapat melindungi dari infeksi *Mycobacterium* (53). Dinding sel bakteri *Mycobacterium bovis* dalam vaksin BCG mengandung antigen (Ag) 85 yang juga terkandung pada *M. tuberculosis*. Ag 85 akan menstimulasi sintesis TNF- α , IL-1 β , IL-6 yang merupakan pro-inflamatori. Ketiga sitokin tersebut

bersama dengan IL-12 akan mengaktifasi sel CD4⁺ dan CD8⁺ yang meningkatkan produksi IFN- γ yang krusial dalam mengaktifasi makrofag dan sel B. Sekitar 4-8 minggu sejak infeksi, sel B akan menghasilkan IgG dan sel B memori. IgG yang terbentuk akan mengopsonisasi sel BCG dan *Mycobacterium tuberculosis*, meningkatkan proses fagositosis dan mencegah pertumbuhan bakteri ekstraseluler. Namun pada kasus infeksi melalui jalur pernafasan, IgA memberikan proteksi lebih baik karena lokasinya yang berada di lapisan mukosa, termasuk mukosa saluran pernapasan (54).

3. Parasit

Kata **parasit** umumnya digunakan untuk menggambarkan suatu makhluk hidup yang menggantungkan seluruh atau sebagian hidupnya pada inang. Virus dan beberapa jenis bakteri yang menggantungkan hidupnya pada inang tergolong pada kelompok parasit. Namun, dalam dunia kesehatan, parasit umumnya digunakan untuk mendefenisikan kelompok organisme penyebab penyakit seperti protozoa dan helmin (kelompok cacing). Helmin sebagai contoh berukuran besar dengan struktur tubuh yang lebih kompleks daripada bakteri dan virus. Menariknya sel eukariotik penyusun helmin dan protozoa mirip dengan sel inang (manusia), sehingga cukup sulit untuk mengembangkan zat antiparasit yang aman bagi manusia. Pada bagian ini akan dibahas kedua parasit,

protozoa dan cacing yang umum menginfeksi manusia (35).

Protozoa

Protozoa merupakan eukariotik uniseluler yang menyebabkan berbagai gangguan kesehatan pada manusia. Infeksi protozoa dapat menstimulasi respons imun yang beragam, bergantung pada lokasi dimana protozoa tersebut berada. Sebagai contoh, banyak protozoa yang salah satu masa hidupnya berupa sel uniseluler yang hidup bebas di dalam aliran darah sehingga sistem humorai antibodi bekerja paling baik pada tahap ini.

Protozoa dapat dibagi menjadi 4 kelompok berdasarkan sistem gerak yang dimiliki, antara lain: 1) **Mastigophora** yang bergerak dengan flagela, 2) **Sarcodina** yang bergerak dengan cara pseudopia (kaki semu), 3) **Apicomplexa** yang bergerak dengan kompleks mikrotubulus yang sering dikenal dengan istilah sporozoan, serta 4) **Ciliophora** yang bergerak dengan menggunakan silia. Protozoa seperti *Plasmodium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma* spp., dan *Leishmania* spp, merupakan protozoa yang paling sering menyebabkan penyakit hingga kematian di Afrika, Asia dan Amerika Selatan dan Tengah (32).

Plasmodium penyebab malaria

Plasmodium seperti *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, dan *P. falciparum* merupakan organisme penyebab malaria dengan *P. falciparum* menjadi spesies yang paling umum dan virulen. Setiap jenis plasmodium akan menyebabkan penyakit malaria dengan karakteristik yang sedikit berbeda. Jenis plasmodium dapat dibedakan dengan menggunakan asupan darah yang diwarnai (pewarna Giemsa) yang mengandung sel darah merah yang terinfeksi untuk selanjutnya diamati di bawah mikroskop. Plasmodium masuk ke dalam tubuh manusia dengan bantuan vektor nyamuk *Anopheles* betina yang akan mentransfer parasit ini ke dalam tubuh manusia. Ketika nyamuk *Anophles* menggigit manusia untuk mendapatkan darah, di saat yang sama *sporozoite* plasmodium akan masuk ke dalam aliran darah, kemudian bergerak menuju hati dan menginfeksi sel hati. Sporozoit berbentuk panjang yang diselubungi dengan antigen berupa protein *circumsporozoit* (CS) yang secara cepat dapat bergabung dengan sel hati (32).

Di dalam hati, sporozoit bertransformasi untuk membentuk dan memproduksi *merozoit* dalam kurun waktu satu minggu. Diprediksi satu sporozoit yang menginfeksi sel hati dapat memproduksi hingga 5.000 – 10.000 merozoit. Merozoit akan menempel pada reseptor permukaan eritrosit sehingga setiap tipe merozoit akan

memiliki tipe sel spesifik yang akan diinfeksi. Sebagai contoh *P. malariae* mayoritas menginfeksi eritrosit tua, *P. vivax* dan *P. ovale* menginfeksi retikulosit, dan *P. falciparum* umumnya menginfeksi eritrosit muda dan tua. Ketika menginfeksi reseptor sel yang sesuai, merozoit ini akan bereplikasi, mengalami diferensiasi hingga sel darah merah yang terinfeksi akan rusak dan kembali melepaskan merozoit baru yang akan menginfeksi lebih banyak sel darah merah. Merozoit yang baru menginfeksi eritrosit (kurang dari 12 jam), akan tampak berbentuk cincin di dalam sitoplasma ketika diberi pewarna Giemsa (32).

Seiring berjalannya waktu beberapa merozoit akan berdiferensiasi menjadi **gametosit jantan dan betina** yang dapat berpindah ke dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina ketika nyamuk tersebut menggigit individu yang sakit malaria. Di dalam tubuh nyamuk, gametosit jantan dan betina akan berdiferensiasi menjadi **gamet** yang kemudian bergabung membentuk zigot. **Zigot** ini selanjutnya akan berkembang dan berdiferensiasi menjadi sporozoit di dalam kelenjar air liurnya. Nyamuk yang terinfeksi ini siap menularkan sporozoit kepada manusia sehat lainnya (32).

Respons imun terhadap infeksi Plasmodium

Ketika eritrosit rusak dan mengeluarkan merozoit, antigen malaria seperti fosfolipid dan glikolipid dilepaskan dan

menstimulasi makrofag dan monosit untuk memproduksi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dan sitokin lain seperti IL-1, IL-6, IL-8. Konsentrasi TNF- α yang terdapat di dalam darah menjadi penanda keparahan infeksi *P. falciparum*, dimana ketika konsentrasinya tinggi maka akan menyebabkan demam, mencegah eritropeisis (proses pembentukan sel darah merah di dalam sumsum tulang), menstimulasi eritrofagositosis, dan menyebabkan rasa mual, muntah dan diare (32).

Ketika *P. falciparum* menginfeksi sel darah merah, akan terbentuk tonjolan pada sel darah merah yang disebut ***P. falciparum eritrosit membran protein (PfEMP)***. Protein ini dapat berikatan dengan beragam reseptor pada sel tubuh termasuk di antaranya ICAM-1 dan ELAM-1 yang berada di otak. Sekitar 5-8 hari sejak infeksi, *P. falciparum*, *P. vivax*, dan *P. ovale* dapat dideteksi dengan pewarnaan Giemsa, namun *P. malariae* membutuhkan waktu hingga 13-16 hari untuk dapat dideteksi. Umumnya, plasmodium akan menghasilkan antigen *Histidine Rich Protein 2* (HRP2) dalam darah yang sering digunakan sebagai target diagnosis berbasis antigen-antibodi. Antigen lain yang dapat digunakan untuk deteksi malaria adalah keberadaan *lactate dehydrogenase* (32).

Ketika seseorang mengalami malaria, tubuh akan membentuk antibodi yang dapat memberikan proteksi pada infeksi di masa mendatang. Meskipun proteksi ini tidak

memberikan perlindungan total, namun adanya proteksi ini membuat pasien malaria di daerah endemik malaria akan memiliki gejala malaria ringan bila dibandingkan dengan penderita yang pertama kali terkena malaria. Namun, pada penderita yang baru pertama kali terinfeksi malaria, antibodi hanya dapat dideteksi paling cepat 10 hari sejak infeksi (32).

Helmin / cacing

Berbeda dengan protozoa, helmin atau cacing berukuran besar dan merupakan organisme multiseluler yang dapat menginfeksi manusia, namun umumnya tidak bereplikasi (memperbanyak diri) di dalam tubuh. Terdapat beberapa jenis helmin, seperti *Platyhelminthes* (cacing pipih), *Nematoda* (cacing gilig), *Acanthocephala* (cacing berkepala duri) (32).

Cacing pipih umumnya menyebabkan infeksi pada saluran pencernaan maupun infeksi somatik. Infeksi pada saluran pencernaan terjadi ketika manusia mengonsumsi daging yang mengandung larva cacing. Sementara itu infeksi somatik terjadi ketika manusia tanpa sengaja mengonsumsi telur cacing tersebut. Cacing gilig merupakan organisme tak bersegmen biseksual yang dapat menginfeksi melalui saluran pencernaan dan jaringan tubuh (32).

Salah satu infeksi parasit yang endemik di Indonesia adalah Limfatik Filariasis. Limfatik filariasis merupakan penyakit akibat cacing gilig (*Nematoda*) dari kelompok

famili Filariodidea yang terdiri dari 3 jenis cacing, antara lain: *Wuchereria bancrofti*, jenis cacing penyebab 90% kasus filariasis, *Brugia malayi*, dan *Brugia timori*. Berbeda dari parasite lain yang ditularkan oleh satu jenis nyamuk, parasit ini dapat ditularkan oleh beberapa jenis nyamuk seperti *Anopheles*, *Culex*, dan *Aedes* spp (55).

Infeksi filariasis di awali ketika larva tahap III cacing masuk ke dalam permukaan kulit melalui gigitan nyamuk betina. Larva ini kemudian langsung bergerak menuju pembuluh limfatik lokal terdekat untuk selanjutnya berkembang membentuk larva tahap IV. Selama 6-9 bulan larva berkembang di beberapa pembuluh limfatik eferen hingga berkembang menjadi cacing jantan dan betina dewasa. Cacing dewasa berukuran besar dan memiliki masa aktif bereproduksi selama 5-7 tahun. Cacing betina dewasa mayoritas akan hidup di pembuluh limfatik eferen di bagian ekstrimitas atas dan bawah, serta di pembuluh limfa organ reproduksi pria. Cacing ini juga dapat hidup kulit. Cacing betina dewasa dapat menghasilkan hingga 10.000 larva tahap I yang disebut *microfilariae* per hari yang dapat berpindah dari pembuluh limfatik ke pembuluh darah. Ketika nyamuk menggigit individu tersebut, maka *microfilariae* yang ada di dalam pembuluh darah akan berpindah ke nyamuk untuk selanjutnya berkembang hingga menjadi larva tahap III (seluruh proses terjadi selama 14 hari). Uniknya, *microfilariae* di dalam pembuluh darah akan berada di

pembuluh perifer di malam hari dan berada di pembuluh bagian dalam di siang hari. Fenomena ini meningkatkan peluang *microfilariae* untuk dapat berpindah ke nyamuk yang umum menggigit di malam hari (32).

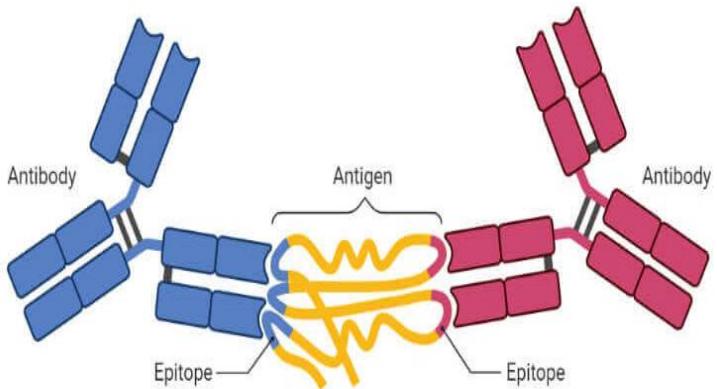
Diagnosis filariasis dapat dilakukan secara mikroskopis dengan menggunakan apusan darah. Pengambilan darah untuk pembuatan apusan sebaiknya dilakukan di malam hari ketika *microfilariae* berada di pembuluh periferal. Pemeriksaan yang lebih sensitif dapat dilakukan dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* yang dapat mendeteksi gen dari *microfilariae* atau dengan menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. ELISA digunakan untuk mendeteksi antigen yang diproduksi oleh parasit, seperti protein HSP70 (56).

C. Pemanfaatan Interaksi Antigen-Antibodi Pada Immunoassay

Reaksi antara antigen dan antibodi secara luas digunakan untuk berbagai alat diagnostik dan analisis kuantitatif baik secara *in-vivo* maupun *in-vitro*. Reaksi antigen-antibodi ini merupakan reaksi dapat balik (*reversible*) yang umumnya akan mengikuti reaksi berikut ini:

$$\text{antigen} + \text{antibodi} \rightleftharpoons \text{kompleks antigen * antibodi}$$

Terbentuknya kompleks antigen-antibodi ini tidak terlepas karena adanya ikatan antara molekul antigen dengan molekul antibodi yang sesuai. Ikatan ini sering dikenal dengan istilah afinitas. **Afinitas** merupakan kekuatan ikatan yang muncul ketika satu antigen berikatan dengan satu titik tertentu pada antibodi (*Antigen binding site*). Ikatan yang timbul dari interaksi keduanya bukanlah ikatan yang kuat, namun tergolong ke dalam “ikatan lemah” dalam bidang kuantum mekanika. Antigen yang umumnya merupakan protein memiliki epitop yang akan dikenali secara spesifik oleh paratope antibodi (Paratope merupakan lokasi pada antibodi tempat antigen berikatan). Ketika antigen dan antibodi berada pada jarak yang dekat ($0.4\text{-}8 \text{ nm}^2$), maka keduanya akan saling tarik menarik akibat adanya ikatan ionik ataupun hidrofobik yang diperantarai oleh molekul air. ketika jarak keduanya semakin mengecil, ikatan *van der Waals* (ikatan paling lemah dalam kimia kuantum) akan terbentuk dan turut menstabilkan ikatan antara antigen dan antibodi (57).



Gambar 21 Interaksi antara Antibodi dan Antigen. Ilustrasi bagaimana epitop antigen berikatan dengan paratop dari antibodi. Besarnya afinitas antigen-antibodi ini menjadi salah satu faktor penentu efektivitas dari antibodi secara *in-vivo* (58)

Ikatan kimia yang terbentuk pada kompleks antigen-antibodi menjadi penentu efikasi suatu antibodi. Selain ikatan van der Waals, juga terdapat beberapa ikatan lain yang dapat muncul akibat interaksi antigen-antibodi. Beberapa di antaranya: a) Ikatan elektron, b) Ikatan hidrogen, c) interaksi hidrofobik.

Interaksi antara antigen dan antibodi tidak hanya terjadi antara 1 molekul saja, beberapa jenis antibodi dapat secara bersama-sama berikatan dengan keseluruhan antigen melalui interaksi pada berbagai epitopnya. Antibodi jenis ini dikenal dengan istilah *polyclonal antibody*. Poliklonal antibodi memiliki kemampuan mengikat antigen yang tinggi karena menargetkan banyak epitop dari antigen sehingga sering kali dimanfaatkan pada berbagai alat diagnosis seperti pada ELISA.

Istilah lain yang sering disebutkan adalah **Aviditas**. Aviditas menggambarkan keseluruhan kekuatan ikatan yang muncul ketika terbentuk kompleks antigen-antibodi. Jadi, jika afinitas hanya menggambarkan kekuatan dari 1 ikatan antigen-antibodi, maka aviditas menggambarkan keseluruhan kekuatan ikatan yang terbentuk. Aviditas kompleks antigen-antibodi dipengaruhi oleh a) afinitas dari antibodi, b) jumlah titik ikatan yang terbentuk antara epitop antigen dan antibodi (valensi), dan c) pengaturan struktural dari epitop dan paratope dari antigen (32).

Faktor-faktor yang memengaruhi interaksi antigen-antibodi

Terdapat beberapa faktor yang memengaruhi interaksi antara antigen dan antibodi, antara lain (57):

1. Suhu

Setiap jenis ikatan yang terbentuk antara antigen dan antibodi memiliki karakteristik kimia khusus, misalkan saja ikatan hidrogen bersifat eksotermal (mengeluarkan panas) dan lebih stabil pada suhu rendah. Sementara itu ikatan hidrogen akan semakin kuat seiring dengan peningkatan suhu. Namun secara keseluruhan, interaksi antara antigen dan antibodi cenderung stabil pada suhu rendah (57).

2. pH

Kompleks antigen-antibodi bekerja secara optimal pada pH 6.5 – 8.4. Perubahan pH yang ekstrem dapat mengubah konfirmasi antibodi sehingga berpotensi merusak interaksinya dengan antibodi (57).

3. Muatan ion-ion

Ion-ion yang ada di dalam plasma darah memiliki berbagai jenis muatan (negatif, positif, atau netral). Muatan ion tersebut dapat memengaruhi berbagai jenis sel darah di dalam tubuh, termasuk kompleks antigen-antibodi. Sebagai contoh, ion sodium (Na^+) dan klorida (Cl^-) yang umum ditemukan di dalam plasma darah akan menyelubungi kompleks antigen-antibodi yang berpotensi menghasilkan muatan yang netral. Muatan yang terbentuk ini turut berpotensi mengganggu ikatan pada kompleks antigen-antibodi (57).

4. Perlakuan dengan enzim

Beberapa jenis enzim proteolitik diketahui dapat meningkatkan reaksi antigen-antibodi seperti enzim papain, *ficin*, dan bromelin. Pemberian enzim pada kompleks antigen-antibodi dapat meningkatkan ikatan antigen-antibodi hingga dua kali lipat (57).

5. Konsentrasi antigen dan antibodi

Peningkatan konsentrasi antigen dan antibodi dalam *assay* akan meningkatkan potensi terbentuknya ikatan antara antigen-antibodi (57).

6. Jumlah antigen-binding site pada antibodi

Sebuah antibodi dapat memiliki lebih dari satu titik perikatan dengan antigen (*antigen-binding site*). Semakin banyak *antigen-binding site* yang dimiliki oleh antibodi, semakin besar pula potensi terbentuknya kompleks antigen-antibodi. Sebagai contoh IgM merupakan molekul pentamer dengan 10 *antigen-binding site* akan berpotensi lebih banyak berikatan dengan antigen bila dibandingkan dengan IgG yang merupakan monomer dengan 2 *antigen-binding site* (57).

7. Lamanya waktu inkubasi

Untuk dapat mencapai reaksi yang optimum, antigen dan antibodi harus mencapai reaksi yang ekuilibrium (jenuh). Namun ekuilibrium akan tercapai setelah 4 jam reaksi pada suhu 37°C untuk ikatan ionik. Namun, reaksi pada ikatan yang lebih lemah umumnya terjadi dalam waktu yang lebih singkat, sehingga pembentukan ikatan antigen-antibodi mungkin terjadi dalam waktu yang lebih singkat. Semakin lama waktu inkubasi umumnya akan meningkatkan potensi terbentuknya kompleks antigen-antibodi. Namun, waktu inkubasi yang lama tidak selalu berdampak pada peningkatan jumlah ikatan yang signifikan sehingga perlu ditentukan waktu inkubasi optimum untuk setiap reaksi (57).

8. Sensitivitas dari *assay*

Selain waktu inkubasi, reaksi antigen-antibodi pada *immunoassay* juga akan melibatkan proses *washing* (pencucian). *Washing* bertujuan untuk menghilangkan antibodi bebas yang tidak berikatan dengan antigen. Di saat yang sama, *washing* akan menyebabkan sebagian kompleks antigen-antibodi mengalami disosiasi (terlepas dari ikatannya). Hal ini diminimalkan dengan melakukan *washing* pada suhu ruang atau tidak dilakukan *washing* sama sekali. Umumnya *washing* tidak dilakukan pada kompleks antigen-antibodi dengan jenis ikatan yang sangat lemah karena hal ini dapat merusak kompleks antigen-antibodi yang terbentuk (57).

Cross Reactivity

Setelah mengetahui berbagai faktor yang dapat memengaruhi ikatan antigen-antibodi, terdapat suatu fenomena yang dapat mengganggu kinerja dari *immunoassay*, yaitu *cross reactivity*. Meskipun interaksi antara antigen-antibodi merupakan reaksi yang spesifik, namun pada beberapa kasus, antibodi dapat mengenali epitop yang mirip dari beberapa antigen berbeda. Kejadian ini dikenal dengan istilah *cross reactivity*. *Cross reactivity* sering kali terjadi pada antigen yang berupa polisakarida yang umumnya tersusun atas residu oligosakarida yang mirip. Sebagai contoh bakteri *Streptococcus pyogenes*

menghasilkan antigen berupa “antigen M” (protein dinding sel). Antibodi yang terbentuk sebagai respons terhadap antigen M juga dapat berikatan dengan protein *myocardial* dan protein otot rangka yang menyebabkan gangguan jantung dan kerusakan ginjal pada pasien yang terinfeksi *Streptococcus*. Kejadian *cross reactivity* merupakan fenomena yang tidak diinginkan pada berbagai alat diagnositik, namun fenomena ini lebih sering terjadi pada *polyclonal antibody* (32).

Jenis interaksi antigen-antibodi

Reaksi antara antigen dan antibodi dapat dibagi menjadi dua tipe reaksi, antara lain:

- a. **Interaksi *in vivo*.** Merupakan kejadian terbentuknya kompleks antigen-antibodi pada kondisi alamiah seperti ketika terbentuknya antibodi pada saat terjadi infeksi.
- b. **Interaksi *in vitro*.** Merupakan kejadian terbentuknya kompleks antigen-antibodi yang dibuat oleh manusia (artifisial), contohnya pada berbagai jenis alat tes serologis dan *immunoassay*. Pada buku ini, kita akan membahas lebih detail mengenai reaksi *in vitro* yang banyak digunakan pada berbagai *immunoassay*. Beberapa contoh dari reaksi *in-vitro* seperti:
 - 1) Aglutinasi,
 - 2) Presipitasi,
 - 3) Fiksasi komplemen,

- 4) Netralisasi,
- 5) *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA),
- 6) *Radioimmunoassay* (RIA),
- 7) *Western Blotting*,
- 8) *Immunochromatography* (ICT),
- 9) *Immunofluorescence*,
- 10) *Flow Cytometry* dan *Fluorescence*.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

BAB V

PEMERIKSAAN IMUNOLOGI DENGAN SAMPEL JARINGAN

Mari kita ingat lagi pembahasan pada Bab-Bab sebelumnya, dimana peranan antibodi sangat penting dalam mekanisme pertahanan tubuh. Setiap individu, termasuk hewan, memiliki kemampuan dasar untuk membentuk antibodi ini. Antibodi dapat mengenali hampir semua jenis antigen maupun epitop, dan secara spesifik membedakan antar epitop yang mirip. Spesifisitas antibodi dimanfaatkan baik di bidang klinis maupun industri, untuk kebutuhan diagnosis maupun terapi. Sebagai contohnya dalam pengembangan terapi atau diagnostik kanker maupun penyakit infeksi, hingga penyakit autoimun (21).

Penemuan antibodi monoklonal oleh Kohler dan Melstein pada tahun 1975 menjadi pintu utama pengembangan berbagai metode diagnostik dan terapi berbasis antibodi dengan spesifisitas tunggal. Kedua peneliti ini mencoba mengombinasikan sifat pertumbuhan tak terbatas dari mieloma dengan sel-sel limpa yang telah dikenalkan pada antigen tertentu sebelumnya. Teknik ini dikenal dengan *somatic cell hybridization* dan hasilnya merupakan suatu hibridoma. Prosedur ini menggunakan hewan coba dalam proses pembuatannya.

Sehingga salah satu kelemahan metode ini adalah terbentuknya *human anti mouse antibody* (HAMA). Untuk menjawab tantangan ini, saat ini perkembangan antibodi monoklonal telah diproduksi dengan rekayasa genetika immunoglobulin (21)

Antibodi monoklonal ini dapat dimanfaatkan untuk: (1) identifikasi penanda fenotip sel, (2) imunodiagnosis, (3) imunoterapi, dan (4) analisis fungsi permukaan sel atau substansi yang diseikresikan (21). Dasar inilah yang dimanfaatkan bidang klinis dan industri untuk pengembangan metode diagnosis, salah satunya dengan metode imunohistokimia untuk deteksi protein pada jaringan dan imunofluosensi untuk deteksi penanda spesifik pada sel maupun jaringan. Bab ini akan membahas secara dalam dengan contoh-contoh pemanfaatan kedua metode pemeriksaan ini.

A. Imunohistokimia

Imunohistokimia (IHK) merupakan metode pemeriksaan yang umum dikerjakan pada laboratorium patologi anatomi, untuk klasifikasi sel dan kebutuhan diagnostik, menggunakan antibodi yang menarget penanda atau antigen tertentu yang spesifik pada suatu jaringan atau sel, sehingga dapat menentukan tipe sel dan asal organnya. Jenis metode ini menggunakan sampel jaringan dengan blok parafin (*formalin fixed paraffin embedded*, FFPE), yang memiliki kelebihan berupa kemudahan dalam proses penyimpanan. Metode ini telah banyak dimanfaatkan untuk menilai

penanda prediktif atau prognostik pada banyak jenis kanker, termasuk kanker payudara, saluran cerna, paru, hingga sistem saraf pusat (59,60).

Salah satu alasan IHK masih sering digunakan di bidang klinis adalah kemampuan metode dalam penilaian pola ekspresi molekul target pada suatu sel atau jaringan dan lingkungannya, tanpa merusak arsitektur dari preparat histologi. Hal ini memungkinkan proses ko-analisis target molekul dan hubungannya dengan molekul lainnya pada subseluler, selular dan interseluler. Hal ini tentu saja akan meningkatkan perkembangan penelitian di bidang patologi seperti dalam hal pengembangan obat baru, maupun pengembangan biomarker prognostik atau prediktif (60).

Terdapat beberapa tahapan penting dalam metode IHK ini, yang mencakup perlakuan spesimen, fiksasi yang tepat, preparasi blok parafin, *antigen retrieval*, seleksi dan preparasi antibodi serta reagen, inkubasi, pencucian, dan *counterstaining*. Pewarnaan secara manual membutuhkan proses optimasi reaksi antibodi spesifik terhadap antigen, sehingga akan memberikan hasil yang optimal, terutama pada prosedur penelitian (59,61).

1. Perlakuan dan fiksasi jaringan

Telah diketahui bahwa perbedaan waktu iskemia pada jaringan, akan memengaruhi hasil IHK. Iskemia yang terjadi pada spesimen yang dipotong sebelum dilakukan fiksasi akan menyebabkan degradasi protein, RNA, dan

DNA karena adanya aktivasi enzim dan autolisis jaringan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya variasi dan perubahan pada ekspresi reseptor estrogen, reseptor progesteron, *human epidermal growth factor 2* (HER2), dan Ki-67 pada IHK akibat variasi waktu iskemia (60).

Spesimen pembedahan difiksasi pada *neutral buffered formalin* (NBF) 10%. Proses ini ditujukan untuk mencegah autolisis dan mempertahankan morfologi sel dan jaringan. Fiksasi umumnya dilakukan selama 24 jam pada suhu ruangan, dengan rasio jaringan dan cairan fiksatif yaitu 1:1 hingga 1:20. Durasi fiksasi, formula fiksatif, dan rasio ini dapat memengaruhi hasil IHK (60).

2. Pemotongan dan penyimpanan

Ketebalan potongan jaringan yang disarankan untuk IHK adalah 4 μ m, walaupun hal ini juga dapat disesuaikan dengan kebutuhan. Selain itu, penyimpanan potongan jaringan juga dapat memengaruhi hasil IHK. Sebagai contohnya, potongan jaringan yang disimpan lebih dari 2 bulan akan menyebabkan kehilangan protein p53. Hal ini dikaitkan dengan komponen air di dalam dan sekitar jaringan yang dapat memengaruhi kehilangan antigen (60).

3. Antigen Retrieval

Epitop atau antigen pengikat antibodi dapat tertutupi pada proses fiksasi berbasis formaldehida, yang dikarenakan adanya ikatan silang gugus amino pada molekul yang

berdekatan. Sehingga proses *antigen retrieval* sangat penting dilakukan untuk "membuka" epitop ini. Optimatisasi proses ini dapat mengembalikan sifat antigenitas terutama pada potongan yang berasal dari blok parafin. Secara umum, proses ini tidak diperlukan pada sampel dari potongan beku. Akan tetapi, kadang kala potongan beku yang difiksasi dengan aseton dan NBF memerlukan tindakan ini, untuk mencegah hilangnya antigen terutama antigen yang bersifat larut (59,60).

Metode yang diketahui cukup banyak digunakan untuk *retrieval antigen* ini yaitu dengan induksi panas (*Heat induced epitop retrieval*, HIER), yaitu dapat menggunakan *oven microwave*, plat pemanas, *pressure cookers*, *autoclave*, maupun *water bath*. Suhu yang umum digunakan jika menggunakan *autoclave* atau *microwave* yaitu 120⁰C pada tekanan penuh dan 750-800 W, biasanya dalam 10 menit. Sementara jika alat yang digunakan adalah plat pemanas, maka inkubasi dilakukan pada suhu 100⁰C selama 30 menit (60).

4. Penghambatan protein

Tahapan ini bertujuan untuk mengurangi pewarnaan pada *background* yang tidak diinginkan, yang disebabkan oleh adanya pengikatan nonspesifik bagian Fc antibodi primer atau sekunder. Terdapat berbagai agen untuk proses ini, yaitu *buffer* protein seperti albumin serum bovine 0,1%-0,5%, gelatin, atau susu kering nonfat. Agen ideal untuk

bloking adalah 5%-10% serum normal yang berasal dari spesies yang sama dengan antibodi sekunder. Masa inkubasi yang diperlukan untuk *bloking* bervariasi dari 30 menit hingga dibiarkan semalam. Suhu yang digunakan juga bervariasi dari 4°C hingga suhu ruangan. Hal yang penting untuk diperhatikan pula adalah proses pencucian yang cukup setelah *bloking*, untuk menghilangkan protein yang menumpuk dan menghambat deteksi antigen target (60).

5. Penghambatan aktivitas enzim endogen

Proses ini sangat penting, terutama karena menggunakan sistem peroksidase antiperoksidase pada tahapan deteksi, sehingga diperlukan hambatan aktivitas peroksidase endogen. Peroksidase hidrogen terdilusi 3% umumnya digunakan untuk proses ini. Untuk menghambat fosfatase alkalin endogen yang sering ditemukan pada jaringan beku, agen blokade yang digunakan adalah levamisol pada konsentrasi 10 mM. Pada jaringan tertentu yang tinggi akan biotin endogen, seperti hepar dan ginjal, perlu dilakukan blokade dengan menginkubasi potongan jaringan di dalam larutan avidin selama 15 menit, diikuti pencucian dengan PBS, dan inkubasi potongan pada larutan biotin selama 15 menit, yang keseluruhan prosedur dilakukan pada suhu ruangan (59,60).

6. Pemilihan dan validasi antibodi

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, antibodi terbagi menjadi dua kelompok, yaitu monoklonal dan poliklonal. Antibodi poliklonal didapat dari percobaan hewan coba melalui stimulasi antigen secara berulang. Antibodi ini berikatan pada berbagai epitop yang berbeda pada antigen tunggal, dan karenanya bersifat lebih sensitif. Sementara antibodi monoklonal bereaksi pada epitop tunggal pada sebuah antigen, dan bersifat lebih spesifik. Jenis ini didapat dari kloning hibridoma yang memproduksi antibodi. Saat ini, antibodi monoklonal dari kelinci atau ayam, telah diidentifikasi dan diketahui menghasilkan hasil IHK yang lebih baik untuk antigen yang sulit diwarnai. Pemilihan antibodi, optimasi, dan validasi menjadi sangat penting dalam menentukan hasil IHK yang dikerjakan (59,60).

7. Sistem Deteksi

Pengecatan dengan berbasis imunologi merupakan proses mendeteksi antigen target dengan mendeteksi adanya interaksi antara antigen dan antibodi spesifik, serta memanfaatkan metode tidak langsung dengan menggunakan antibodi sekunder yang ditandai dengan label seperti dengan sistem enzim. Sistem deteksi ini menggunakan metode kompleks avidin-biotin, metode streptavidin biotin terlabel, metode fosfatase anti-fosfatase, sistem deteksi berbasis polimer, dan sistem

amplifikasi tiramin. Hal yang harus diperhatikan adalah, semakin sensitif metode yang digunakan, maka sinyal *background* akan meningkat bersamaan dengan sinyal target. Hasil IHK bergantung pada pemilihan metode yang tepat dan optimal untuk amplifikasi sinyal dari molekul yang ditargetkan dan jaringan sekitarnya (59,60).

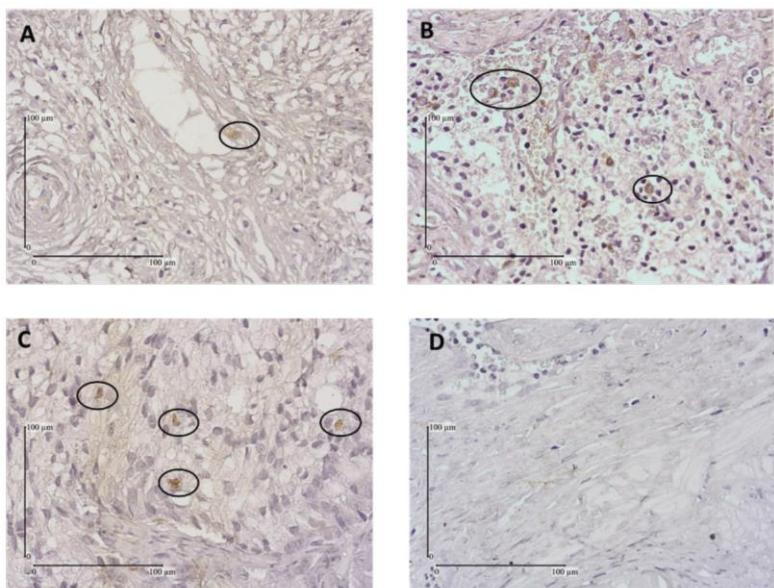
8. Counter staining

Prosedur ini bertujuan untuk memberikan kontras pada kromogen, untuk dapat menghasilkan perbedaan yang lebih baik pada sinyal target. Proses ini dapat memberikan informasi berupa tipe sel dan lokasi tepatnya hasil target sinyal yang didapatkan dari IHK. Pewarnaan yang umum digunakan adalah dengan hematoksilin. Sementara pewarnaan lainnya yang dapat digunakan pula yaitu eosin, metilen *blue*, metilen *green*, dan toluidine *blue*. Pada pewarnaan IHK multipleks, pewarnaan jaringan ini harus dipilih dengan hati-hati, agar tidak menimbulkan kesalahan informasi (60).

Aplikasi Imunohistokimia pada penelitian dan klinis

Pemanfaatan metode imunohistokimia dalam deteksi berbagai protein telah digunakan baik di bidang klinis maupun penelitian. Salah satu penyakit yang sering memanfaatkan metode ini dalam penapisan maupun diagnosis di bidang klinis, dan penelitian dalam pengembangan biomarker, penelusuran jalur, maupun

pengembangan terapi target, yaitu kanker. Sebagai contoh, pada penyakit kanker prostat yang telah kami teliti sebelumnya. Telah diketahui bahwa sel-sel imun berperan penting dalam tumorigenesis, salah satunya pada kanker prostat. Pada penelitian yang dilakukan pada kelompok pasien Tumor jinak prostat (*Benign Prostate Hyperplasia*, BPH), neoplasia intraepitelial prostat derajat tinggi (*High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia*, HGPN), dan adenokarsinoma prostat (*Prostate Adenocarcinoma*, PRAD), terdapat perbedaan kepadatan populasi makrofag. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan perbedaan signifikan antara ketiga kelompok, dimana populasi makrofag lebih padat pada HGPN dan PRAD dibandingkan BPH. Pada penelitian ini, untuk menentukan dan mengidentifikasi makrofag, digunakan metode imunohistokimia dengan penanda CD68+, yang merupakan penanda pan makrofag (62). Penelitian ini menjadi salah satu contoh pemanfaatan metode IHK dalam identifikasi jenis sel pada penyakit, baik untuk pemanfaatan klinis maupun penelitian translasional.



Gambar 22 Pewarnaan untuk identifikasi makrofag pada sediaan Tumor jinak prostat (*Benign Prostate Hyperplasia*, BPH), neoplasia intraepitelial prostat derajat tinggi (*High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia*, HGPN), dan adenokarsinoma prostat (*Prostate Adenocarcinoma*, PRAD) dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi anti-CD68. Perbesaran 400x. A. BPH, B. HGPN, C. PRAD, D. Kontrol negatif tanpa antibodi CD68 (62)

Contoh pemanfaatan IHK berikutnya yaitu pada deteksi protein tertentu pada kanker payudara di bidang klinis. Biomarker kanker payudara yang digunakan dalam menentukan subtipe saat ini yaitu dengan mendeteksi ekspresi dari reseptor hormon estrogen (ER), reseptor progesteron (PR) dan *human growth factor receptor 2* (HER2) (63). Saat ini metode imunohistokimia telah digunakan untuk mendeteksi berbagai reseptor tersebut, untuk menentukan subtipe molekuler kanker payudara, dan

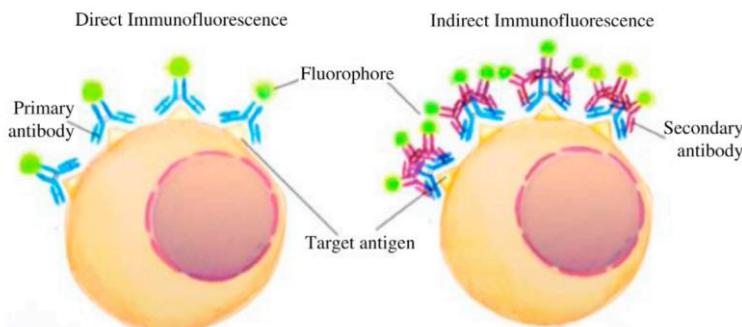
tentu saja dapat membantu dalam menentukan terapi yang tepat.

B. Imunofluoresensi

Teknik atau metode imunofluoresensi (IF) pertama kali diperkenalkan pada tahun 1942 dan dimodifikasi oleh Coon pada tahun 1950, yang menggunakan mikroskop fluoresensi untuk membaca reaksi spesifik imunologi pada jaringan atau sel yang berada pada slide (64,65). Terdapat empat jenis teknik utama imunofluoresensi: (64)

1. Teknik imunofluoresensi langsung, merupakan prosedur pengecatan satu tahap, yang bertujuan untuk mengidentifikasi antibodi *in vivo* yang berikatan pada antigen jaringan, menggunakan antibodi tunggal yang terlabel dengan fluorofor untuk mengcat jaringan atau sel.
2. Teknik imunofluoresensi tak langsung, yaitu teknik dua tahap untuk mendeteksi antibodi bersirkulasi di cairan tubuh, menggunakan dua antibodi. Antibodi primer yang tidak terlabel berikatan spesifik pada molekul target, sementara antibodi sekunder yang terlabel fluorofor akan mengikat antibodi primer.
3. Teknik imunofluoresensi komplemen-fiksasi tak langsung (IIF-CF), dimana antigen dan antibodi saling berikatan untuk membentuk molekul C3.

4. Teknik imunofluoresensi ganda, yang dapat mengidentifikasi adanya dua antigen yang berbeda pada sel atau untuk identifikasi sel spesifik pada jaringan dengan dua antibodi yang terlabeli dengan fluorofor yang berbeda. Pengecatan ini dapat menggunakan metode langsung maupun tidak langsung.



Gambar 23 Dua metode umum imunofluoresensi yaitu metode langsung dan tak langsung (61)

Seperti yang telah dibahas pada sub-bab sebelumnya, metode imunohistokimia merupakan teknik yang rutin dilakukan untuk diagnosis klinis patologis. Namun, ketika suatu penelitian atau klinis memerlukan ko-lokalisasi suatu protein, maka metode imunofluoresensi merupakan teknik yang tepat. Teknik IF ini menggunakan sistem deteksi menggunakan emisi cahaya dari antibodi yang terkonjugasi fluorofor. Komponen kimia fluoresen yang dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang spesifik, sehingga menghasilkan emisi cahaya pada gelombang energi panjang

maupun pendek, disebut sebagai fluorofor. Jenis fluorofor yang berbeda memiliki panjang gelombang emisi yang berbeda pula, sehingga banyak antigen dapat divisualisasi pada sampel biologi yang sama dengan mengonjugasikan antibodi multipel yang mengenali antigen pada fluorofor yang memiliki spektrum emisi yang berbeda. Kelebihan kedua dari IF dibandingkan IHK adalah kemampuan IF dalam mengidentifikasi antigen target yang diekspresikan dalam kompartemen intraseluler tertentu, dengan bantuan mikroskop konfokal (65,66).

Teknik imunofluoresensi dapat dilakukan pada berbagai sampel, mencakup sel primer dan *cell line* yang ditumbuhkan pada *petri dish*, sel yang ditumbuhkan pada suspensi kultur dan matriks semisolida, serta sampel jaringan dari manusia maupun hewan. Untuk melakukan teknik IF, maka sampel jaringan harus melalui proses pemotongan terlebih dahulu menjadi potongan yang tipis dan menempel pada *slide* pengamatan. Potongan jaringan dapat diambil dari jaringan segar atau jaringan yang telah tertanam pada blok parafin. Untuk jaringan dalam blok parafin, potongan dapat dilakukan pada ketebalan 4-8 um, sementara jaringan dari potongan beku dapat dilakukan pada ketebalan potongan 6-8 um. Pada jaringan dari blok parafin, sebelum pengecatan harus dilakukan deparafiniasi terlebih dahulu dengan pencucian xilen beberapa kali, kemudian dilakukan proses hidrasi dengan alkohol bertingkat. Fiksasi dengan formalin

dan penanaman pada parafin dapat menyebabkan penutupan antigen target, sehingga sampel harus melalui pemanasan atau ditambahkan pepsin atau saponin, untuk proses *unmasking* antigen (65,66).

Proses berikutnya adalah permeabilisasi sel, yang memungkinkan rusaknya membran sel target, sehingga antibodi dapat berikatan pada antigen intraseluler. Akan tetapi langkah ini dapat dilewatkan, jika protein target yang akan dicat berada pada membran sel, atau jika proses fiksasi menggunakan aseton. Untuk meningkatkan efisiensi permeabilisasi, detergen yang digunakan umumnya adalah saponin, *Tween-20*, *triton X-100*, dan *sodium dodecyl sulfate* (SDS) (65).

Seperti halnya pada IHK, pengecatan IF ditingkatkan hasilnya dengan memblokade interaksi nonspesifik antara antibodi primer maupun sekunder dengan sampel biologis. Pengikatan nonspesifik akan menyebabkan pengikatan yang tidak perlu antara antibodi dan molekul neoantigen. Proses inkubasi sampel pada larutan protein sebelum inkubasi dengan antibodi primer, dapat menghambat ikatan nonspesifik ini. Sampel dapat diinkubasi dengan agen blokade seperti albumin serum *bovine*, susu, dan serum. Serum blokade ini harus berasal dari spesies yang berbeda dari asal antibodi primernya, dan sebaiknya berasal dari spesies yang sama dengan asal pembuatan antibodi sekundernya pada metode IF tak langsung (65,66).

Tahapan IF selanjutnya adalah inkubasi dengan antibodi primer. Antibodi primer yang baik yaitu memiliki afinitas tinggi dan spesifisitas yang baik terhadap antigen. Umumnya antibodi di dilusi pada rasio 1:100 hingga 1:10000 (atau di luar ini), bergantung pada keberadaan antigen, konsentrasi antibodi, dan afinitas antibodi pada antigen. Sehingga, sering kali diperlukan optimasi terlebih dahulu untuk mencari rasio dilusi yang tepat. Dilusi antibodi dilakukan pada *buffer blocking* dan disebar di permukaan sampel. Setelah itu, dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam, atau pada suhu 4^0 C selama satu malam, ataupun kombinasi keduanya (65,66).

Selanjutnya dilakukan inkubasi dengan antibodi sekunder yang terkonjugasi fluorofor. Rasio dilusi antibodi ini yaitu 1:200 hingga 1:500, yang dilarutkan pada *buffer blocking* dan ditambahkan pada sampel. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 1 jam atau pada suhu 4^0 C selama satu malam. Hal yang perlu diingat adalah, ketika akan mengecat sampel dengan antibodi primer multipel, antibodi sekunder yang digunakan harus berkonjugasi dengan fluorofor yang berbeda, sehingga tidak memancarkan emisi pada spektrum yang sama dan menyulitkan pembacaan hasil (65,66).

Aplikasi Imunofluoresensi pada penelitian dan klinis

Identifikasi pola ekspresi kompleks biomarker multipel sering kali diperlukan untuk mengetahui respons terapi maupun luaran terapi pada penyakit seperti kanker. Teknologi imunofluoresensi menjadi salah satu pilihan untuk dapat digunakan sebagai modalitas identifikasi berbagai biomarker dalam sampel biologi yang sama. Salah satu pemanfaatan metode IF adalah pada deteksi protein tertentu pada kanker. Salah satu penelitian pada kanker orofaringeal meneliti mengenai lingkungan mikro kanker orofaringeal dengan HPV16 positif, yang menunjukkan adanya sel subset sel dendritik yang menghasilkan sitokin yang berperan penting dalam mekanisme antitumor. Pada penelitian ini, salah satu variabelnya diteliti dengan imunofluoresensi untuk mewarnai jenis atau tipe sel tertentu di lingkungan mikro kanker orofaringeal, dengan empat warna pengecatan. Penelitian ini menunjukkan peran metode atau teknik IF dalam mengidentifikasi jenis sel atau subset sel yang diinginkan (67).

Pemanfaatan teknik IF selain pada kanker atau tumor, juga dapat digunakan dalam identifikasi penyakit autoimun, salah satunya pada penyakit endokrin autoimun. Salah satu contoh penyakit ini adalah penyakit autoimun tiroid, yang ditandai dengan adanya auto-antibodi terhadap tiroglobulin (TGAbs) dan auto-antibodi mikrosomal tiroid (TMAbs). Antibodi seperti TGAbs dapat dideteksi melalui

Buku ini tidak diperjualbelikan.

imunopresipitasi pada agar dan dengan teknik imunofluoresensi tak langsung (IIF) pada potongan tiroid yang difiksasi dalam metanol. Begitu pula TMAbs, telah diidentifikasi sejak lama menggunakan metode IIF ini. Kedua antibodi ini ditemukan pada 85-95% pasien dengan tiroiditis kronis dan pada 85% pasien penyakit Graves' (64).

Buku ini tidak diperjualbelikan.

BAB VI

PEMERIKSAAN IMUNOLOGI PADA PERHITUNGAN SEL

A. Immunofluoresensi Pada Sel

Immunofluorescence (IF) merupakan suatu teknik yang memungkinkan visualisasi berbagai komponen dari suatu jaringan atau sel. Kemampuan IF untuk memvisualisasikan komponen ini karena penggunaan antibodi yang terkonjugasi dengan molekul *fluorescence*. IF dapat digunakan pada kultur sel, suspensi sel, maupun sampel jaringan dengan target spesifik dari suatu organisme.

Molekul *fluorescence* merupakan molekul penting pada teknik ini. Molekul *Fluorescence* adalah molekul yang dapat mengabdsorbsi cahaya pada satu panjang gelombang tertentu (*excitation*) dan mengeluarkan cahaya dengan panjang gelombang yang umumnya berbeda (*emission*). Ketika antibodi terkonjugasi dengan molekul fluorescence seperti *fluochrome*, kompleks antigen-antibodi yang terbentuk dapat dideteksi dengan cara memberikan sinar dengan panjang gelombang tertentu yang sesuai dengan *fluochrome* tersebut. Cahaya yang diabsorpsi oleh *fluorochrome* kemudian akan mengemisikan cahaya tertentu

yang dapat ditangkap oleh mikroskop *fluorescence*. Contoh molekul *fluorescence* seperti (32):

1. ***Fluorescein***: Merupakan pewarna organik yang umum digunakan sebagai label pewarna pada prosedur IF. Mengabsorpsi cahaya biru terang pada panjang gelombang 490 nm dan mengemisikan cahaya kuning kehijauan yang terang pada panjang gelombang 517 nm (32).
2. ***Rhodamine***: Molekul organik yang mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 515 nm yang berwarna kuning hingga hijau dan akan mengemisikan cahaya berwarna merah gelap pada panjang gelombang 546 nm. *Rhodamine* mampu mengemisikan panjang gelombang dengan interval lebih panjang daripada *fluorescein* sehingga molekul ini sering kali dipilih untuk *assay* yang membutuhkan dua tipe warna. Sebagai contoh, jika ingin dilakukan analisis pada dua jenis antibodi, seperti pada kasus visualisasi antigen berbeda pada sel yang sama, maka salah satu antibodi dapat dikonjugasikan dengan *fluorescein* yang berwarna kuning kehijauan dan dapat dibedakan dari *rhodamine* yang berwarna merah (32).
3. ***Phycoerythrin***: Merupakan salah satu molekul dengan efisiensi menyerap cahaya 30x lebih baik daripada *fluorescein*. Molekul ini akan mengemisikan cahaya berwarna merah seperti pada *rhodamine*. Efisiensi dalam mengabsorpsi cahaya inilah yang menjadikan

phycoerythrin banyak digunakan pada berbagai *immunofluorescence assay* (32).

Sebelum analisis IF dapat dilakukan, sel ataupun jaringan sampel harus difiksasi terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya autolisis, menjaga morfologi sel, serta mempertahankan antigenitas sel/jaringan sampel. Fiksasi yang baik akan memastikan antigen target tetap berada di posisinya dan tidak mengganggu struktur apa pun dari sampel sehingga antibodi dari *assay* dapat bekerja dengan optimal.

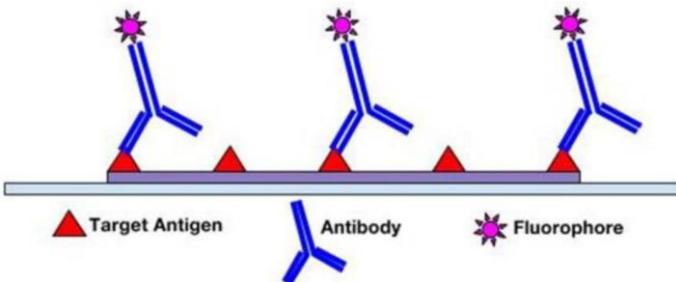
Proses fiksasi ini dapat menyebabkan perubahan struktur protein sampel yang dapat mengganggu atau menutupi target epitop sehingga diperlukan upaya pengambilan kembali antigen (*antigen retrieval*) atau perbaikan antigen (*antigen recovering*). Teknik yang umum digunakan untuk memperbaiki antigen sampel dapat dilakukan dengan metode *Protease-Induced Epitop Retrieval (PIER)* dan *Heat-Induced Epitop Retrieval (HIER)*(68).

Selanjutnya proses analisis dengan teknik IF dilanjutkan dengan pewarnaan. Pewarnaan yang dilakukan pada *immunofluorescence* dapat dibedakan menjadi dua jenis, yaitu:

1. Perwarnaan langsung (*direct staining*)

Pada pewarnaan langsung, antibodi spesifik yang akan berikatan dengan antigen target telah dikonjugasikan dengan molekul *fluorochrome* tertentu dan secara

langsung berikatan dengan antigen target. Metode ini lebih cepat dibandingkan metode *indirect staining* (32).

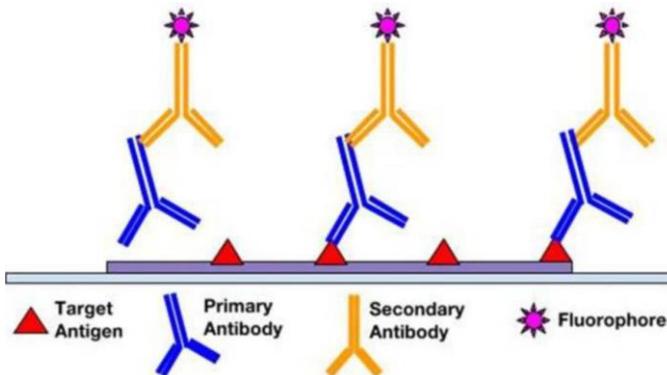


Gambar 24 Indirect Staining pada Immunofluorescence dimana antibodi primer terkonjugasi dengan fluorophore/fluorochrome dan menempel langsung pada antigen target (68)

2. Pewarnaan tidak langsung (*indirect staining*)

Pada jenis pewarnaan ini, *fluorochrome* tidak langsung dikonjugasikan dengan antibodi primer yang akan berikatan dengan antigen target. *Fluorochrome* dikonjugasikan dengan antibodi sekunder ataupun protein pembawa yang akan berikatan dengan antibodi primer. Ada dua keunggulan dari penggunaan metode pewarnaan tidak langsung ini. *Pertama*, antibodi primer yang akan berikatan dengan antigen target tidak perlu terkonjugasi dengan *fluorochrome*. Hal ini akan meminimalkan potensi kerusakan pada antibodi primer yang mungkin terjadi akibat proses konjugasi. *Kedua*, penggunaan metode ini akan meningkatkan sensitivitas dari uji. Penggunaan *indirect staining* akan memungkinkan beberapa molekul *fluorochrome* untuk berikatan dengan antibodi primer

sehingga dapat meningkatkan intensitas cahaya yang diemisikan oleh antibodi primer (32).

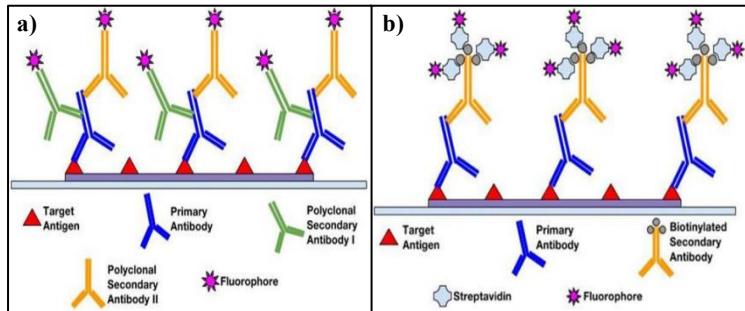


Gambar 25 *Indirect Staining* dimana digunakan dua jenis antibodi, antibodi primer yang berikatan langsung dengan antigen target dan antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan *fluorophore/fluorochrome* (68)

Untuk mencegah terjadinya reaktivitas silang (*cross reactivity*) yang tidak diinginkan antara antibodi sekunder dengan Ig pada sampel, sebaiknya antibodi primer yang digunakan berasal dari spesies yang berbeda dari sampel. Misalkan, jika sampel adalah manusia, maka antibodi primer sebaiknya berasal dari spesies lain (kambing, kelinci, etc). Reaktivitas silang juga dapat terjadi pada antibodi sekunder, sehingga pemilihan spesies yang berbeda dari sampel dan antibodi primer juga harus dilakukan.

Selain penggunaan antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan *fluorochrome*, penambahan antibodi sekunder lain yang berfungsi untuk memperkuat sinyal

juga umum dilakukan. Umumnya, digunakan antibodi poliklonal pada kasus ini (68).



Gambar 26 a) Terdapat dua jenis antibodi sekunder yang digunakan untuk meningkatkan intensitas sinyal pada teknik IF, dimana antibodi sekunder I dan II dikonjugasikan dengan *fluorophore*, sementara b) digunakan 1 jenis antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan beberapa molekul *fluorophore* (68)

Immunofluorescence umum digunakan untuk mengidentifikasi beberapa jenis limfosit, seperti CD4⁺ dan CD8⁺ serta digunakan untuk identifikasi bakteri spesifik, deteksi kompleks antigen-antibodi pada kasus autoimun Penggunaan paling umum dari teknik ini adalah untuk mengidentifikasi lokasi spesifik pada jaringan atau organ tertentu yang menjadi target penelitian (32).

B. *Flow Cytometry*

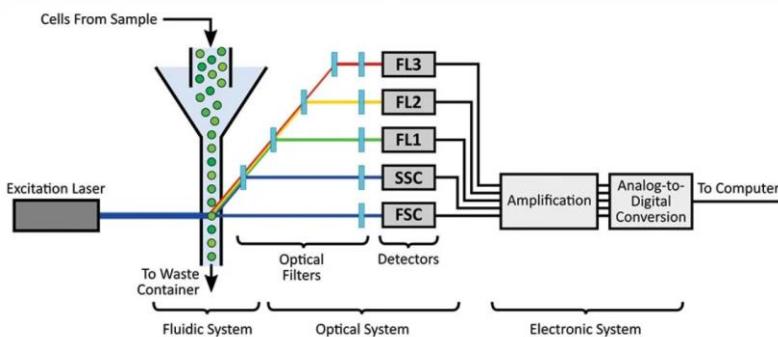
Penggunaan *fluorescence* untuk identifikasi antigen hanya mampu memberikan informasi data kualitatif, namun tidak kuantitatif. Kekurangan inilah yang berhasil diakomodasi oleh *flow cytometry*. *Flow cytometry* (*FC*) dapat menghitung

dan mengidentifikasi sel spesifik berdasarkan antigen penandanya. *Flow cytometry* merupakan suatu teknik yang dapat memberikan analisis multiparametrik dari larutan yang berisi kumpulan sel. Teknik ini menggunakan berbagai jenis laser sebagai sumber cahaya dimana cahaya ini akan disebarluaskan atau diterima oleh sampel dan selanjutnya akan dibaca oleh detektor. Sample dapat berupa sel akan dikonjugasikan dengan molekul *fluorescence*, DNA yang berikatan dengan pewarna khusus (contoh *Propodium Iodide*), ion yang berikatan dengan pewarna, antibodi yang terkonjugasi dengan molekul *fluorescence* (contoh CD3 FITC), maupun protein yang terkonjugasi dengan molekul *fluorescence* (contoh: *Green Fluorescent Protein*, GFP) (69).

Prinsip kerja FC adalah sebagai berikut: sel dengan antigen spesifik yang digunakan sebagai penanda berikatan dengan antibodi primer yang telah terkonjugasi dengan *fluorochrome* ataupun berikatan dengan antibodi sekunder terkonjugasi *fluorochrome*. Selanjutnya setiap sel akan melewati suatu saluran (*flow*) yang akan menyortir setiap sel. Saluran tersebut dilengkapi dengan laser yang akan memancarkan cahaya pada panjang gelombang tertentu (*visible light scatter*). Sel yang melewati *flow* dan akan mengabsorpsi cahaya yang dipancarkan oleh laser, selanjutnya sel akan mengemisikan warna yang panjang gelombangnya akan ditangkap oleh detektor yang ada pada FC. Adanya *flow* ini memungkinkan setiap sel untuk

dianalisis satu per satu. Cahaya yang diterima oleh sel atau sampel akan diukur dalam dua jenis arah yang berbeda, arah depan atau *Forward Scatter* or FSC yang mengindikasikan ukuran relatif dari sel, dan arah 90° atau *Side Scatter* (SSC) yang menggambarkan kompleksitas internal atau tekstur granula pada sel (69).

Proses konjugasi sampel (sel ataupun molekul) dengan molekul penanda yang berupa *fluorescence* maupun pewarna lainnya menggunakan konsep yang sama dengan teknik IF. perbedaan antara FC dan IF terletak pada cara deteksinya. Berikut ilustrasi dari cara kerja FC (69).



Gambar 27 Skema cara kerja *Flow Cytometry* (70)

Beragamnya sampel yang dapat dianalisis dengan menggunakan teknik ini, maka model pewarnaan yang digunakan juga akan beragam tergantung pada jenis sampel yang akan dianalisis. Pada proses identifikasi jenis-jenis sel, maka pewarnaan dilakukan pada antigen permukaan yang

spesifik pada setiap jenis sel. Antigen permukaan ini berada pada membran sel yang mudah untuk diakses oleh antibodi terkonjugasi dengan molekul *fluorescence*. Namun, model pewarnaan lain dibutuhkan untuk analisis komponen intraseluler pada sel. Proses pewarnaan molekul intraseluler membutuhkan tahap fiksasi dan tahap permeabilitas agar antigen di dalam sel dapat berinteraksi dengan antibodi yang terkonjugasi dengan pewarna (interaksi antigen-antibodi) (69).

Pemanfaatan FC dalam bidang klinis cukup menjanjikan karena dapat memberikan beberapa informasi penting, seperti:

1. Memberikan informasi kualitatif mengenai berapa jumlah sel yang mengekspresikan antigen tertentu. Data ini dapat berupa jumlah maupun persentase. Sebagai contoh, jika kita ingin menghitung jumlah sel limfosit T yang terdapat pada serum darah, maka dengan menggunakan FC, dapat diketahui jumlah sel T berdasarkan jumlah antigen yang terdeteksi dan dibandingkan dengan total sel yang ada pada serum sehingga diperoleh data berupa jumlah maupun persentase.
2. Memberikan informasi distribusi setiap sel dalam populasi berdasarkan jenis antigen yang dideteksi. Jika pada satu sel diekspresikan lebih dari 1 jenis antigen, dan setiap antigen berikatan dengan *fluorochrome* yang akan dideteksi oleh FC, maka alat ini mampu memberikan

informasi mengenai densitas antigen dari suatu jenis sel, tidak hanya densitas sel itu sendiri.

3. Informasi mengenai ukuran sel. Informasi ini diperoleh setelah data mengenai jumlah populasi sel dianalisis lebih lanjut pada model *light-scattering*.

Aplikasi *Flow Cytometry*

Saat ini FC menjadi alat diagnosis penting dalam bidang imunologi, biologi sel dan kedokteran (69). Berikut beberapa aplikasi dari pemanfaatan FC sebagai berikut:

1. Imunologi

Dalam imunologi, FC sering kali digunakan dalam *immunophenotyping* atau membedakan berbagai jenis sel berdasarkan berbagai karakter yang dimiliki. Pada proses ini, antigen spesifik pada membran sel direaksikan dengan antibodi terkonjugasi dengan *fluorochrome* sehingga dapat dibedakan dari sel lainnya. Sebagai contoh digunakan istilah CD (*cluster of differentiation*) yang dikeluarkan oleh *Human Leukocyte Differentiation Workshop* untuk mendefinisikan berbagai monoklonal antibodi yang berikatan dengan antigen spesifik. Sebagai contoh *immunophenotyping* penanda atau *marker* untuk sel T seperti CD3, CD4, dan CD8, *marker* pada sel B seperti CD19, CD 20, *marker* monosit CD14 dan CD11b, serta *marker* untuk sel NK seperti DC56 dan CD161. Sebagai contoh, alat ini digunakan pada penentuan jenis

kanker pada kasus leukimia. Pengobatan leukimia sangat ditentukan oleh jenis sel yang terlibat, sehingga analisis terkait jenis sel yang terlibat pada kasus leukimia di setiap pasien penting untuk dapat diidentifikasi dengan benar. FC juga dapat digunakan untuk menganalisis sitokin intraseluler, respons antigen spesifik, analisis proliferasi sel, dan analisis proses apoptosis (69).

2. Biologi Molekular

Pada biologi molekuler, FC dapat dimanfaatkan untuk analisis berbagai jenis protein. Pada proses ini, sel disisipkan dengan plasmid yang mengandung sekuens promotor yang akan mengkodekan protein target yang telah dilengkapi dengan protein *fluorescence*. Adanya ekspresi dari protein *fluorescence* tersebut menjadi indikator dari ekspresi gen target. Pemeriksaan ini umum digunakan untuk pemantauan transplantasi pada sel, bakteri dan virus, serta pemantauan suatu gen yang mengalami *knock out*. Pemanfaatan FC dalam biologi molekuler juga dilakukan pada analisis siklus hidup sel, dan mendeteksi ekspresi RNA bersama-sama dengan deteksi ekspresi protein (69).

3. Penyortiran sel

FC dapat digunakan untuk memisahkan dan memurnikan sel agar dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut. Secara konsep, semua sel yang dapat diwarnai dengan teknik *immunofluorescence*, maka dapat disortir dengan

menggunakan FC. Contoh sampel yang umum disortir dalam sel punca, sel limfosit dengan tumor, sel tumor, dan sel darah putih (69).

BAB VII

PEMERIKSAAN IMUNOLOGI PADA SAMPEL CAIRAN TUBUH

Terdapat berbagai jenis pemeriksaan berbasis immunoassay yang dapat digunakan untuk pemeriksaan sampel berupa cairan tubuh. Berikut akan dijelaskan beberapa di antaranya:

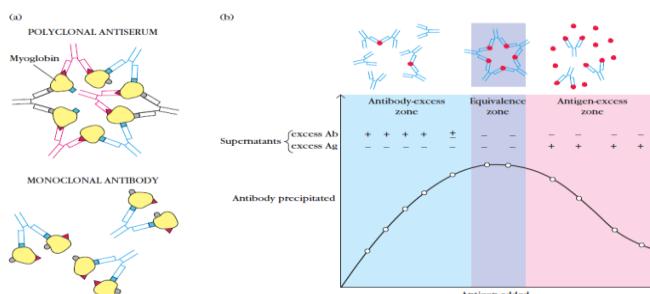
A. Presipitasi

Antibodi dan antigen yang bersifat larut (*soluble*) berinteraksi dalam lingkungan cair membentuk kompleks antigen-antibodi yang tidak larut (*unsoluble*) berupa *precipitins* yang tampak secara kasat mata. Umumnya reaksi ini melibatkan antigen berukuran kecil yang larut (*soluble*). Reaksi ini terjadi dalam hitungan menit, namun beberapa dapat terjadi dalam hitungan hari.

Kecepatan terbentuknya *precipitins* pada reaksi presipitasi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti:

1. Antibodi yang bereaksi harus bivalen. Reaksi presipitasi tidak akan terbentuk pada antibodi monovalen.
2. Antigen yang bereaksi harus berupa bivalen atau polivalen. Selain itu, antigen juga harus memiliki paling sedikit 2 titik dengan epitop yang sama, atau memiliki epitop yang berbeda yang bereaksi dengan beberapa jenis antibodi yang ada pada poliklonal antibodi.

Teknik presipitasi dapat digunakan untuk mendeteksi antigen atau antibodi yang ada pada sampel dalam *assay* cairan maupun gel. Pada *assay* berupa cairan, antibodi pada *assay* disiapkan di dalam beberapa jenis tabung dan masing-masing tabung ditambahkan antigen target dengan konsentrasi yang berbeda. Setiap tabung akan membentuk kompleks antigen antibodi yang dapat diisolasi dengan menggunakan *sentrifuse* untuk selanjutnya dihitung konsentrasinya. Konsentrasi kompleks presipitat yang terbentuk tergantung pada konsentrasi antigen dan antibodi yang bereaksi. Untuk mencapai hasil reaksi presipitasi yang maksimal, konsentrasi antigen maupun antibodi harus optimal sehingga dapat mencapai zona ekuivalen. Kelebihan antigen atau antibodi akan menyebabkan tidak terbentuknya presipitat yang maksimal (32).



Gambar 28 Reaksi presipitasi a) poliklonal antibodi akan membentuk agregat dalam larutan sampel. Namun, jika yang digunakan adalah monoklonal antibodi, maka tidak akan terbentuk agregat presipitasi yang diinginkan. b) kurva presipitasi yang menghubungkan antara jumlah antigen dan antibodi. Untuk dapat mencapai zona ekuivalen, jumlah antigen dan antibodi berada pada jumlah yang seimbang sehingga terbentuk agregat presipitasi (32)

Pada *assay* berupa gel (medium padat), antigen atau antibodi dari sudah berada didifusikan ke dalam gel. Ketika antigen atau antibodi sampel diinjeksikan ke dalam gel, terbentuklah kompleks antigen-antibodi yang menciptakan kompleks presipitasi berupa garis yang kasat mata. Sama seperti pada *assay* cair, presipitasi akan terbentuk jika reaksi antara antigen dan antibodi mencapai zona ekuilibrium (32).

B. Aglutinasi

Aglutinasi merupakan reaksi yang mirip dengan presipitasi. Reaksi aglutinasi terjadi ketika antigen (umumnya berukuran besar dan bersifat tidak larut (*insoluble*) berikatan dengan antibodi membentuk gumpalan. Antibodi yang mampu membentuk gumpalan tersebut pada reaksi aglutinasi disebut ***agglutinin***. Sama seperti reaksi presipitasi, reaksi aglutinasi melibatkan antigen polivalen yang akan membentuk gumpalan jika mencapai zona ekuilibrium. Konsentrasi antibodi yang berlebihan akan mencegah terbentuknya gumpalan, peristiwa ini dikenal dengan istilah ***efek prozone***. Namun, efek *prozone* ini dapat dicegah dibanyak jenis immunoassay dan akan dijelaskan lebih lanjut (32). Beberapa fenomena yang dapat menyebabkan efek *prozone*, antara lain:

1. Jika konsentrasi antibodi lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah epitop pada antibodi, maka mayoritas antibodi akan membentuk ikatan univalen dengan antigen,

- bukannya ikatan multivalen yang diperlukan untuk membentuk reaksi aglutinasi.
2. Meskipun jarang terjadi, namun penggunaan poliklonal antibodi juga berpotensi menghasilkan efek prozone. Konsentrasi antibodi yang tinggi yang berikatan dengan antigen, namun tidak terbentuk gumpalan. Sebagai contoh, di dalam tubuh, manusia memiliki IgG dan IgM dengan fungsinya masing-masing. Antibodi kelas IgG merupakan jenis antibodi yang “tidak lengkap” sehingga sulit untuk menghasilkan reaksi aglutinasi. Sebaliknya, IgM merupakan antibodi yang mudah mengalami aglutinasi. Namun, ketika terdapat antigen, IgG dengan konsentrasi tinggi akan mendominasi ikatan dengan antigen, sehingga IgM tidak dapat berikatan dengan antigen dan membentuk gumpalan aglutinasi. Fenomena ini hanya terjadi pada antibodi poliklonal, dan tidak pada antibodi monoklonal (32).

Dalam dunia kesehatan, sering terdengar istilah hemagglutinasi. Hemagglutinasi merupakan reaksi aglutinasi yang terjadi pada darah dan sering kali digunakan sebagai metode deteksi golongan darah. Setiap sel darah merah memiliki antigen spesifik yang membedakan antara satu dan lainnya. Jika direaksikan dengan antisera yang sesuai maka sel darah yang mengandung antigen spesifik akan membentuk gumpalan aglutinasi sesuai dengan antigennya.

Pada kasus infeksi bakteri seperti pada kasus temam tifoid, pasien yang terinfeksi akan memiliki antibodi terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Antibodi pasien direaksikan dengan bakteri dan hasil positif akan ditandai dengan terbentuk gumpalan aglutinasi. Banyak *immunoassay* dikembangkan dengan menambahkan partikel sintetik untuk meningkatkan konsistensi, keseragaman, dan stabilitas *assay*, seperti penambahan lateks. Penambahan lateks pada antigen bakteri juga dapat mempercepat terjadinya reaksi aglutinasi (sering kali dalam hitungan 3-5 menit). Aglutinasi merupakan reaksi yang mudah untuk dilakukan, tidak membutuhkan peralatan yang mahal, serta dapat mendeteksi antibodi dalam jumlah yang sedikit (hingga konsentrasi nanometer per milimeter) (32).

C. *Radioimmunoassay (RIA)*

Radioimmunoassay (RIA) merupakan salah satu teknik yang sangat sensitif untuk mendeteksi keberadaan antigen maupun antibodi. Pertama kali dikembangkan pada tahun 1960 untuk mengukur konsentrasi insulin pada penderita diabetes, teknik ini berkembang untuk digunakan pada pengukuran hormon, serum protein, obat dan vitamin hingga pada konsentrasi 0.001 mg (32).

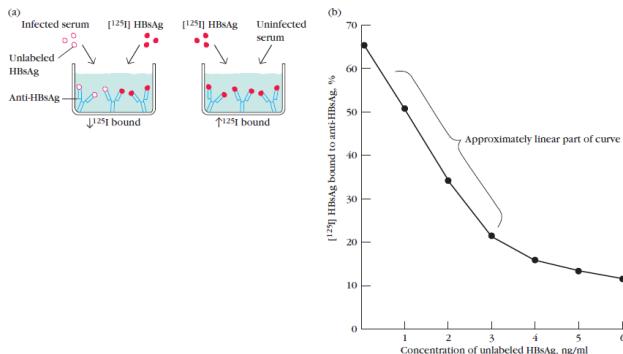
Pada prinsipnya, teknik ini akan menempatkan antigen yang sudah diberi label (biasanya dengan menggunakan isotop seperti ^{125}I atau ^3H) dan pasangan

antibodinya di dalam suatu *assay* dalam konsentrasi yang diketahui dan jenuh yang ditandai dengan seluruh antibodi berikatan dengan antigen yang berlabel tersebut. Ketika sampel yang mengandung antigen target dengan konsentrasi yang tidak diketahui namun dalam jumlah yang besar ditambahkan ke dalam *assay*, maka akan terjadi kompetisi antara antigen berlabel dan antigen tidak berlabel dari sampel untuk berikatan dengan antibodi. Antibodi dalam *assay* dapat berikatan dengan keduanya, namun umumnya antibodi akan berpotensi berikatan lebih banyak dengan antigen yang lebih banyak jumlahnya di dalam *assay*. Akibatnya, antigen sampel yang tidak berlabel akan berikatan dengan antibodi menggantikan antigen berlabel. penurunan konsentrasi antigen berlabel dalam *assay* merepresentasikan jumlah antigen sampel. Antigen berlabel yang berikatan dengan antibodi selanjutnya akan mengalami presipitasi untuk memisahkannya dari antigen bebas dari sampel. Presipitasi tersebut diukur dan merepresentasikan konsentrasi antigen target (32).

Proses pemisahan kompleks antigen(berlabel)-antibodi dari antigen bebas merupakan proses kompleks sehingga dikembangkan beberapa jenis metode untuk memisahkannya. Sebagai contoh, untuk memaksimalkan proses presipitasi maka *assay* juga dapat ditambahkan dengan antiserum dari kompleks antigen-antibodi yang terbentuk. Pada kasus dimana kompleks antigen-antibodi

yang terbentuk mengandung antibodi berupa IgG dari kelinci, maka ke dalam *assay* tersebut dapat ditambahkan dengan antigen khusus untuk kelinci yang akan mengikat kompleks dan meningkatkan peluang terjadinya presipitasi, sehingga kompleks antigen-antibodi dapat terpisah dari antigen bebas yang tidak berikatan. Contoh lain adalah dengan menambahkan protein A dari bakteri *Staphylococcus aureus* yang sangat mudah berikatan dengan IgG antibodi. Kompleks antigen-antibodi yang mengandung IgG akan membentuk presipitasi ketika *assay* ditambahkan dengan bakteri *S. aureus* yang sudah dimatikan.

Tidak hanya pada *assay* cair, RIA juga dapat diterapkan pada media padat. Pada media ini, antibodi dapat dilekatkan pada lapisan *polystyrene* atau *polyvinylchloride* sehingga antigen akan berikatan dan terjerap pada lapisan tersebut. Sisa antigen yang tidak berikatan yang berada di *supernatant* selanjutnya dapat dihitung. Atau sebaliknya, antigen yang diperiksa ke lapisan media padat dan antibodi yang tidak berikatan dapat dihitung. Pada metode ini hanya dibutuhkan sampel dalam jumlah yang sangat sedikit (*microliter*) (32).



Gambar 29 a) pemeriksaan HbsAg yang telah diberi label dengan isotop ¹²⁵I , b) Kurva standar dari RIA (32).

D. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) memiliki prinsip kerja yang mirip dengan RIA, yang membedakan hanya antigen-antibodi pada *assay* tidak dilabeli dengan radioisotop, namun dilabeli dengan enzim. Pada ELISA, enzim yang melabeli antibodi akan bereaksi dengan substrat tak berwarna pada *assay*. Ketika enzim bereaksi dengan substrat tersebut, maka akan terbentuklah produk berwarna yang digunakan sebagai indikator pada ELISA. Substrat seperti ini dikenal dengan istilah substrat **chromogenic**. Beberapa enzim yang sering digunakan pada ELISA seperti enzim alkalin *phosphatase*, *Horseradish peroxidase*, dan β -galaktosidase. Keunggulan lain dari ELISA selain memiliki sensitivitas sebaik RIA, ELISA juga lebih murah dan lebih aman karena tidak menggunakan radioisotop (32).

Terdapat beberapa jenis ELISA dengan kemampuan mendeteksi antigen atau antibodi target secara kualitatif

maupun kuantitatif. Beberapa di antaranya seperti *Indirect ELISA*, *Sandwhich ELISA*, *Competitive ELISA*, *Chemiluminescence*, *Elispot Assay* (32).

Indirect ELISA

Pada jenis *indirect ELISA*, antigen yang melekat pada *assay* akan bereaksi dengan sampel yang mengandung antibodi target. Setelah antibodi target berikatan dengan antigen pada *assay*, antibodi bebas dibersihkan melalui proses *washing* (pencucian). Untuk mendeteksi konsentrasi antibodi yang berikatan dengan antigen pada *assay*, ditambahkan antibodi sekunder yang berkonjugasi dengan enzim. Umumnya antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer dan sisa antibodi sekunder akan hilang pada proses pencucian kedua. Selanjutnya ditambahkan substrat yang akan bereaksi dengan enzim pada antibodi sekunder tersebut. Banyaknya produk berwarna yang diproduksi oleh reaksi tersebut kemudian dideteksi dengan menggunakan spektrofotometer *reader* pada panjang gelombang tertentu (32,71).

Sandwhich ELISA

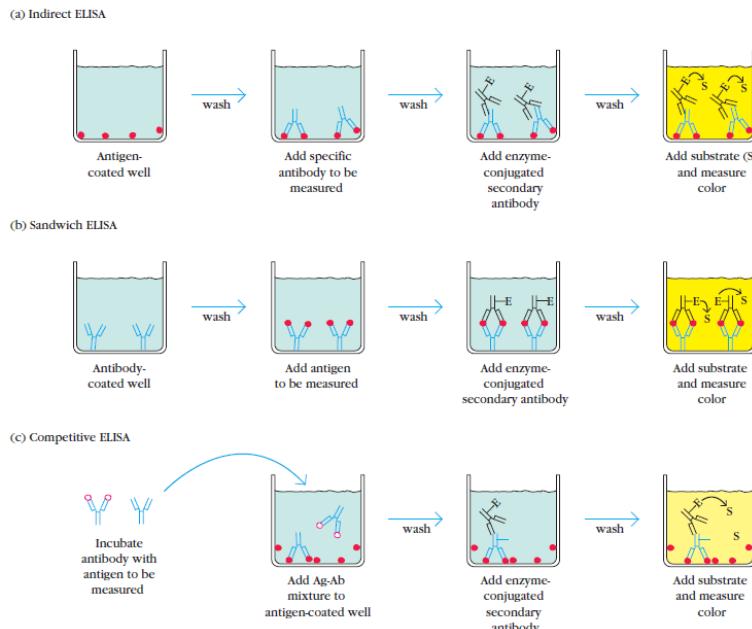
Antigen pada sampel dapat dideteksi dengan menggunakan ELISA model ini. Pada teknik ini antibodi melekat pada *assay* dan sampel yang mengandung antigen target direaksikan dengan antibodi tersebut. Antigen bebas hilang melalui proses pencucian dan menyisakan antigen yang berikatan dengan antibodi pada *assay*. Untuk dapat

mendeteksi seberapa banyak konsentrasi antigen tersebut, ditambahkan antibodi sekunder yang telah terkonjugasi dengan enzim. Antibodi sekunder ini akan berikatan dengan antigen target pada epitop yang berbeda sehingga antigen berada ditengah-tengah antara antibodi primer dan sekunder, seperti *sandwhich* (roti lapis). Sama seperti teknik ELISA lainnya, sisa antibodi yang tidak berikatan hilang pada proses pencucian dan konsentrasi antigen target dapat dihitung berdasarkan banyaknya produk berwarna yang muncul akibat reaksi enzim pada antibodi sekunder (32,71).

Competitive ELISA

Pada Teknik ini, antigen sampel direaksikan dengan antibodi sekunder sehingga membentuk kompleks antigen-antibodi, kompleks ini kemudian direaksikan dengan *assay* yang telah ditempeli dengan antigen pada bagian permukaannya. Antibodi primer yang tidak berikatan dengan antigen target akan berikatan dengan antigen pada permukaan *assay* ini sehingga terjadi kompetisi antara antigen *assay* dengan antigen target untuk berikatan dengan antibodi primer. Selanjutnya antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim ditambahkan dan akan berikatan dengan antibodi primer. Berbeda dengan jenis ELISA lainnya, semakin banyak antigen sampel, maka semakin sedikit antibodi primer yang berikatan dengan antigen *assay* yang berarti semakin sedikit

produk enzimatik yang dihasilkan (hasil berupa nilai absorbansi yang rendah) (32,71).



Gambar 30 Mekanisme kerja a) Indirect ELISA b) Sandwich ELISA c) Competitive ELISA (32)

E. *Chemiluminescence*

Pada teknik ini, antibodi masih berkonjugasi dengan enzim, namun substrat yang digunakan bukanlah substrat kromogenik, namun substrat *luxogenic*, yaitu substrat yang dapat menghasilkan cahaya. Sebagai contoh oksidasi dari komponen yang mengandung luminol oleh H_2O_2 dan enzim *horseradish peroxidase* (HRP) akan menghasilkan cahaya. Teknik ini akan menghasilkan hasil yang lebih sensitif dibandingkan dengan menggunakan substrat kromogenik hingga 5×10^{-18} moles. Selain itu, penggunaan substrat ini

juga dapat meningkatkan batas deteksi *assay* hingga 10 kali dibandingkan dengan penggunaan substrat kromogenik (32).

F. *Western Blotting*

Western Blotting merupakan suatu teknik yang dapat mengidentifikasi protein spesifik dari campuran protein. Nama *western blotting* memiliki prinsip kerja dengan *southern blotting* yang mendeteksi fragmen DNA dan *Northern blotting* yang mendeteksi mRNAs. Pada metode *Western Blotting*, campuran protein dipisahkan menggunakan agen pemisah berupa seperti gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) yang akan memisahkan setiap protein melalui mekanisme elektroforesis (dengan bantuan gaya listrik). Protein yang telah terpisah melekat pada gel dan selanjutnya akan diidentifikasi dengan menggunakan antibodi yang terkonjugasi dengan radioisotop (seperti pada RIA) atau enzim (seperti pada ELISA) yang secara spesifik akan berikatan dengan protein target (antigen) sehingga terbentuk kompleks antigen-antibodi. Jika antibodi terkonjugasi dengan radioisotop, maka visualisasi protein target dapat dilakukan dengan menyinari gel dengan sinar X (metode ini dikenal dengan istilah autoradiografi). Jika antibodi terkonjugasi dengan enzim, maka penggunaan substrat kromogenik seperti pada ELISA menjadi pilihan. Hasil analisis *western blot* umumnya akan memberikan hasil

yang lebih sensitif jika antibodi terkonjugasi dengan komponen *chemiluminescent* (32).

Tak hanya untuk mendeteksi antigen (protein), *western blotting* juga berkembang untuk mendeteksi antibodi. Pada metode ini, SDS-PAGE digunakan untuk memisahkan antigen (protein yang telah diketahui berat jenisnya) yang nantikan akan membentuk kompleks dengan antibodi target. Ketika antigen telah terjerap pada gel SDS-PAGE, maka sampel yang berisi antibodi target dicampurkan pada *assay* sehingga terbentuklah kompleks antigen-antibodi. Untuk mendeteksi keberadaan antibodi target, digunakan antibodi sekunder yang telah terkonjugasi dengan radioisotop, enzim ataupun agen *chemiluminescent*. Metode ini sering kali digunakan untuk uji konfirmasi pada pasien HIV (32).

G. Immunopresipitasi

Berbeda dari jenis teknik analisis lainnya, imunopresipitasi (IP) memungkinkan kita untuk dapat mendeteksi sekaligus mengisolasi antigen target untuk analisis lebih lanjut. Teknik ini juga dapat mendeteksi keberadaan antigen yang terdapat pada jaringan atau sel tertentu. Pada kasus ini, sel atau jaringan yang mengalami kerusakan akan menghasilkan antigen yang menjadi target analisis. Penambahan antibodi yang sesuai dengan antigen target akan membentuk kompleks antigen-antibodi yang selanjutnya akan

mengalami presipitasi membentuk endapan. Endapan presipitasi tetap dapat terbentuk meskipun jumlah antigen yang diproduksi oleh sel atau jaringan sedikit, meskipun membutuhkan waktu yang jauh lebih lama untuk dapat membentuk endapan presipitasi (jam atau bahkan hari) (32).

Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, maka dikembang beberapa mekanisme khusus pada *assay immunoprecipitation*. Salah satunya adalah dengan membuat antibodi primer atau antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan pemberat sintetik (*synthetic bead*), protein A, G, atau L agarose yang akan membantu kompleks antigen-antibodi yang terbentuk untuk dapat diisolasi dengan menggunakan teknik sentrifugasi (72).

Kecepatan terbentuknya kompleks Ag-Ab bergantung pada konsentrasi akhir dari antigen dan antibodi yang terkandung di dalam sampel, serta kekuatan ikatan yang terbentuk. Umumnya, antibodi ditambahkan ke dalam sampel terlebih dahulu sebelum ditambahkan *bead*. Pembentukan kompleks Ag-ab akan lebih cepat terbentuk bila sampel berada pada medium cair-cair, sedangkan apabila sampel berada pada medium cair-padat, pembentukan kompleks ag-ab akan lebih lambat terbentuk (72).

PENUTUP

Dalam era kemajuan teknologi dan penelitian ilmiah yang semakin pesat, pemahaman yang mendalam tentang teknik *immunoassay* dan aplikasinya dalam berbagai bidang kehidupan menjadi sangat penting. Buku ini telah membawa pembaca melalui perjalanan komprehensif yang dimulai dari dasar-dasar imunologi hingga aplikasi praktis dari *immunoassay* dalam berbagai konteks, mulai dari deteksi penyakit hingga penelitian biologi molekuler.

Teknik *immunoassay* yang berakar dari penemuan awal oleh Landsteiner hingga perkembangan modern oleh Berson dan Yallow, telah menjadi alat yang tak tergantikan dalam dunia medis dan penelitian. Keakuratannya dalam mendeteksi dan mengukur analit dengan presisi tinggi membuka banyak peluang untuk diagnosis dini, pemantauan terapi, dan penemuan obat baru. Selain itu, fleksibilitasnya memungkinkan penerapan pada berbagai sampel biologis, menjadikannya esensial di laboratorium klinis dan penelitian.

Bab-bab dalam buku ini tidak hanya membahas teori tetapi juga praktik, memberikan pembaca pemahaman yang holistik tentang bagaimana *immunoassay* dapat diterapkan dalam dunia nyata. Dari pembahasan mendalam tentang sel-sel dan organ sistem imun, hingga teknik-teknik spesifik seperti *immunohistokimia*, *flow cytometry*, dan ELISA, buku ini

dirancang untuk menjadi referensi lengkap bagi mahasiswa, peneliti, dan profesional di bidang kesehatan dan biologi.

Seiring dengan perkembangan teknologi, teknik *immunoassay* terus mengalami inovasi. Namun, prinsip dasar interaksi antigen-antibodi yang menjadi fondasi dari teknik ini akan selalu relevan. Oleh karena itu, pemahaman yang kokoh tentang prinsip-prinsip ini tidak hanya memperkaya pengetahuan tetapi juga mempersiapkan kita untuk beradaptasi dengan inovasi yang akan datang.

Kami berharap buku ini tidak hanya menjadi sumber informasi tetapi juga inspirasi bagi pembaca untuk terus menjelajahi dan mengembangkan aplikasi teknik *immunoassay*. Dengan pemahaman yang baik, kita dapat memanfaatkan teknologi ini untuk kemajuan di bidang kesehatan, penelitian, dan industri farmasi, demi kesejahteraan masyarakat luas.

Terima kasih telah mengikuti pembahasan dalam buku ini. Semoga pengetahuan yang diperoleh dapat diaplikasikan dengan baik dan menjadi dasar untuk pengembangan lebih lanjut di masa depan. Mari kita terus bergerak maju, menggabungkan pengetahuan dan inovasi untuk mencapai kemajuan yang lebih besar dalam ilmu pengetahuan dan kesehatan.

REFERENSI

1. N. Alice Lee, Ivan R. Kennedy. *Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications.* Elsevier Inc; 2018.
2. Darwish IA. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *Int J Biomed Sci IJBS.* 2006 Sep;2(3):217–35.
3. Findlay JW, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal.* 2000 Jan;21(6):1249–73.
4. Fiets WE, Blankenstein MA, Struikmans H, Ruitenberg HM, Nortier JWR. The prognostic value of hormone receptor detection by enzyme immunoassay and immunohistochemistry: a prospective study in patients with early breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2002 Mar;17(1):24–32.
5. Astuti P, Beurskens D, Vajen T, Nicolaes GA, Zhang M, Haenen GR. Protection against neutrophil extracellular trap (NET) toxicity by antioxidant monoHER. *Makara J Health Res.* 2019;23(2):8.
6. Gemmink A, Daemen S, Wefers J, Hansen J, van Moorsel D, Astuti P, et al. Twenty-four hour rhythmicity in mitochondrial network connectivity and mitochondrial respiration; a study in human skeletal muscle biopsies of young lean and older individuals with obesity. *Mol Metab.* 2023 Jun 1;72:101727.
7. Riondato F, Comazzi S. Flow Cytometry in the Diagnosis of Canine B-Cell Lymphoma. *Front Vet Sci.* 2021;8:600986.

8. Varadé J, Magadán S, González-Fernández Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(4):805–28.
9. Hall JE, Hall ME. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 14th Editi. Canada: Elsevier; 2021.
10. Subowo. Sitokin. *Imunobiologi.* 2014;119(7):157–99.
11. Subowo. *Imunobiologi.* 3rd ed. Subowo, editor. Jakarta: Sagung Seto; 2014. 3 p.
12. Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. Ninth Edition. 9th editio. New York: Taylor & Francis; 2017. (Garland Science).
13. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14.
14. Rastogi I, Jeon D, Moseman JE, Muralidhar A, Potluri HK, McNeel DG. Role of B cells as antigen presenting cells. *Front Immunol.* 2022 Sep;13.
15. Kotsias F, Cebrian I, Alloatti A. Antigen processing and presentation. In: International Review of Cell and Molecular Biology. Elsevier Inc.; 2019. p. 69–121.
16. Zanna MY, Yasmin AR, Omar AR, Arshad SS, Mariatulqabtiah AR, Nur-Fazila SH, et al. Review of dendritic cells, their role in clinical immunology, and distribution in various animal species. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug;22(15).
17. Ghosh D, Jiang W, Mukhopadhyay D, Mellins ED. New insights into B cells as antigen presenting cells. *Curr Opin Immunol.* 2021 Jun;70:129–37.
18. Guerriero JL. Macrophages. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2019 Jan;342:73–93.

19. Orakpoghenor O, Avazi DO, Markus T, Olaolu O. Lymphocytes: A Brief Review. *Sci J Immunol Immunother.* 2019;3(1):005–8.
20. Pabst R. The bone marrow is not only a primary lymphoid organ: The critical role for T lymphocyte migration and housing of long-term memory plasma cells. *Eur J Immunol.* 2018 Jul;48(7):1096–100.
21. Kresno SB. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi keli. Jakarta: Badan Penerbit FKUI; 2010.
22. Bery AI, Shepherd HM, Li W, Krupnick AS, Gelman AE, Kreisel D. Role of tertiary lymphoid organs in the regulation of immune responses in the periphery. *Cell Mol Life Sci.* 2022 Jul;79(7).
23. Sato Y, Silina K, van den Broek M, Hirahara K, Yanagita M. The roles of tertiary lymphoid structures in chronic diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2023 Aug;19(8):525–37.
24. Wicherka-pawlowska K, Wróbel T, Rybka J. Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs) and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec;22(13397):1–21.
25. Sethu S, Govindappa K, Alhaidari M, Pirmohamed M, Park K, Sathish J. Immunogenicity to biologics: Mechanisms, prediction and reduction. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012 Oct;60(5):331–44.
26. Kinker GS, Vitiello GAF, Ferreira WAS, Chaves AS, Cordeiro de Lima VC, Medina T da S. B Cell Orchestration of Anti-tumor Immune Responses: A Matter of Cell Localization and Communication. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jun;9.

27. Gaber T, Chen Y, Krauß PL, Buttgerit F. Metabolism of T Lymphocytes in Health and Disease. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2019 Jan;342:95–148.
28. Spetz J, Presser AG, Sarosiek KA. T Cells and Regulated Cell Death: Kill or Be Killed. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2019 Jan;342:27–71.
29. Aribi M. Introductory Chapter: B-Cells. In: Normal and Malignant B-Cell. IntechOpen; 2020.
30. James LK. B cells defined by immunoglobulin isotypes. *Clin Exp Immunol.* 2022;210(3):230–9.
31. Tkachenko A, Kupcova K, Havranek O. B-Cell Receptor Signaling and Beyond: The Role of Ig α (CD79a)/Ig β (CD79b) in Normal and Malignant B Cells. *Int J Mol Sci.* 2024 Jan;25(1).
32. Owen J, Punt J, Stranford SA, Jones PP. Kuby Immunology. Seventh ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2013.
33. WHO. Implementation of Antigen RDT (Ag-RDT) to detect COVID-19 cases in Indonesia. WHO [Internet]. 2020; Available from: [https://www.who.int/indonesia/news/detail/08-12-2020-implementation-of-antigen-rdt-\(ag-rdt\)-to-detect-covid-19-cases-in-indonesia](https://www.who.int/indonesia/news/detail/08-12-2020-implementation-of-antigen-rdt-(ag-rdt)-to-detect-covid-19-cases-in-indonesia)
34. Owen P. Kuby Immunology, 7th Edition [Internet]. Available from: <https://books.google.co.id/books?id=-JgatAEACAAJ>
35. Fritz H. Kayser, Kurt A. Bienz, Johannes Eckert, Rolf M. Zinkernagel. Medical Microbiology. Stuttgart: Thieme; 2005.
36. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020 Apr;5(4):536–44.

37. Giovanetti M, Benedetti F, Campisi G, Ciccozzi A, Fabris S, Ceccarelli G, et al. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Jan 29;538:88–91.
38. Papanikolaou V, Chrysovergis A, Ragos V, Tsiambas E, Katsinis S, Manoli A, et al. From delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants. *Gene*. 2022 Mar 10;814:146134.
39. Liana DF, Novianry V, Andriani A, Mahyarudin M, Astuti P. Disappearance of Imported Cases of Omicron Lineage BA.2.40 in West Kalimantan, Indonesia. *Iran J Med Sci [Internet]*. 2023; Available from: https://ijms.sums.ac.ir/article_49634.html
40. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe*. 2014 Mar 12;15(3):266–82.
41. Gelderblom HR. Structure and Classification of Viruses. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Chapter 41 [Internet]. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8174/>
42. Maison DP, Deng Y, Gerschenson M. SARS-CoV-2 and the host-immune response. *Front Immunol [Internet]*. 2023;14. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1195871>
43. Qi H, Liu B, Wang X, Zhang L. The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol*. 2022;23(7):1008–20.
44. Basile L, Guadalupe-Fernández V, Valdivia Guijarro M, Martínez Mateo A, Ciruela Navas P, Mendioroz Peña J, et al. Diagnostic Performance of Ag-RDTs and NAAT for SARS-

CoV2 Identification in Symptomatic Patients in Catalonia. *Viruses*. 2021 May 14;13(5).

45. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*. 2020;58(6):10–1128.
46. Adil MT, Rahman R, Whitelaw D, Jain V, Al-Taan O, Rashid F, et al. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. *Postgrad Med J*. 2021 Feb;97(1144):110–6.
47. Salton MRJ, Kim KS. Structure. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. [Internet]. USA: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8477/>
48. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiot Basel Switz*. 2020 Feb 3;9(2).
49. Marina Basta, Pavan Annamaraju. Bacterial Spores. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556071/>
50. Murat D, Byrne M, Komeili A. Cell biology of prokaryotic organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Oct;2(10):a000422.
51. Adam S, Astuti P, Amalia P, Sukandiar syah F. Pengembangan Automated Image Analysis untuk Menentukan Jumlah Bakteri Tahan Asam (BTA) pada Kasus Tuberkolosis. *J Teknol Inf Dan Ilmu Komput*. 2022;9(4):809–18.
52. Cook GM, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, Danilchanka O, et al. Physiology of mycobacteria. *Adv Microb Physiol*. 2009;55:81–182, 318–9.

53. Chika Okafor, Ayesan Rewane, Ifeanyi Momodu. *Bacillus Calmette Guerin* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538185/>
54. Covián C, Fernández-Fierro A, Retamal-Díaz A, Díaz FE, Vasquez AE, Lay MK, et al. BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Front Immunol.* 2019;10:2806.
55. Lourens GB, Ferrell DK. Lymphatic Filariasis. *Nurs Clin North Am.* 2019 Jun;54(2):181–92.
56. Ahmad F, Liebau E, Rathaur S. Human immune response against filarial HSP70 and its role in the diagnosis of lymphatic filariasis. *Parasite Immunol.* 2023 May 1;45(5):e12978.
57. Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus Trasfus Sangue.* 2007 Nov;5(4):227–40.
58. Sagar Aryal. Antigen-Antibody Interaction- Definition, Stages, Types, Examples. 2022; Available from: <https://microbenotes.com/introduction-to-antigen-antibody-reactions/>
59. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An introduction to the performance of immunohistochemistry. In: *Methods in Molecular Biology.* Humana Press Inc.; 2019. p. 289–98.
60. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for pathologists: Protocols, pitfalls, and tips. *J Pathol Transl Med.* 2016;50(6):411–8.
61. Maity B, Sheff D, Fisher RA. Immunostaining. Detection of Signaling Protein Location in Tissues, Cells and Subcellular Compartments. In: *Methods in Cell Biology.* Academic Press Inc.; 2013. p. 81–105.

62. Putri RG, Pratiwi SE, Heriyanto DS, Danarto D, Astuti I, Arfian N, et al. Overexpression of MiR-155-5p and increased number of macrophage population in precancerous prostatic disease. *Health Sci J Indones*. 2020 Dec;11(2):85–91.
63. Masuda S, Nakanishi Y. Application of Immunohistochemistry in Clinical Practices as a Standardized Assay for Breast Cancer. *Acta Histochem Cytochem*. 2023;56(1):1–8.
64. Betterle C, Zanchetta R. The immunofluorescence techniques in the diagnosis of endocrine autoimmune diseases. *Autoimmun Highlights*. 2012 Aug;3(2):67–78.
65. Joshi S, Yu D. Immunofluorescence. In: Basic Science Methods for Clinical Researchers. Elsevier Inc.; 2017. p. 135–50.
66. Zaqout S, Becker LL, Kaindl AM. Immunofluorescence Staining of Paraffin Sections Step by Step. *Front Neuroanat*. 2020 Nov;14.
67. Santegoets SJ, Duurland CL, Jordanova EJ, van Ham VJ, Ehsan I, Loof NM, et al. CD163+ cytokine-producing cDC2 stimulate intratumoral type 1 T cell responses in HPV16-induced oropharyngeal cancer. *J Immunother Cancer*. 2020 Aug;8(2).
68. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An introduction to performing immunofluorescence staining. In: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.; 2019. p. 299–311.
69. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Feb 21;120:5.1.1-5.1.11.
70. AAR Bioquest. Fundamentals of Flow Cytometry. 2019; Available from: <https://www.aatbio.com/resources/assaywise/2019-8-1/fundamentals-of-flow-cytometry>

71. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Methods Mol Biol Clifton NJ. 2022;2508:115–34.
72. DeCaprio J, Kohl TO. Immunoprecipitation. Cold Spring Harb Protoc. 2017 Dec 1;2017(12):pdb.prot098640.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

GLOSARIUM

Analit, Kandungan zat yang akan diukur pada penelitian di laboratorium.

Antibodi, Protein yang dihasilkan oleh sel imun tubuh (sel B/sel plasma) yang bersifat spesifik dan berperan untuk mengeliminasi suatu antigen, sebagai respons tubuh terhadap adanya antigen yang masuk.

Antigen, molekul, partikel, peptida, protein, lipid, asam nukleat, maupun alergen yang dapat berikatan dengan sel imun.

Apoptosis, kematian sel terprogram.

Biofilm, komponen ekstraseluler yang tersusun atas protein (fibrin), polisakarida (*alginate*) dan DNA.

Eksotoksin, Bahan metabolit atau bakteri yang dikeluarkan ke dalam lingkungan mikroorganisme untuk berkembang biak dan bersifat racun.

Endotoksin, Racun pada bakteri gram negatif berupa lipopolisakarida pada membran luar dinding sel, yang pada keadaan tertentu bersifat toksik pada inang tertentu.

Enzim, merupakan biomolekul yang memiliki fungsi sebagai katalis pada suatu reaksi kimia.

Fagositosis, Proses menelan dan menghancurkan mikroorganisme dan benda asing yang masuk ke dalam tubuh oleh sel-sel fagosit.

Granulosit, jenis sel darah putih atau leukosit yang memiliki banyak butiran granula pada sitoplasmanyanya dan bersifat fagosit.

Hematopoietik, sel-sel pada sumsum tulang atau organ limfoid primer yang memproduksi sel darah merah, sel darah putih, serta keping darah.

Imunosupresan, obat-obatan atau agen yang dapat menekan kerja sistem imun.

Kemokin, Kelompok sitokin yang memiliki peran untuk merekrut dan mengaktivasi leukosit.

Kortikosteroid, jenis obat anti inflamasi yang digunakan untuk meredakan peradangan pada berbagai kondisi seperti aleri, penyakit autoimun, maupun radang pada sendi.

Pinositosis, Suatu proses endositosis untuk menelan cairan yang dibutuhkan oleh sel.

Plasmid, merupakan DNA ekstrakromosomal yang dapat bereplikasi secara autonom dan didapatkan pada sitoplasma mikroorganisme yang berbentuk sirkular.

Pseudopodia, alat gerak pada bakteri yang berperan dalam pergerakan sel.

Reseptor, Molekul protein yang berperan menerima sinyal kimia dari luar atau dalam sel.

Sitokin, Molekul sinyal yang memediasi dan memodulasi sistem pertahanan tubuh.

Sitoplasma, ruangan di dalam sel yang dibatasi oleh membran sel sebagai tempat penyimpanan bahan kimia yang penting bagi metabolisme sel.

Vesikel, ruang di dalam sel yang dikelilingi oleh membran sel, yang berperan dalam proses sekresi, ambilan dan transpor material.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

INDEX

A

| | |
|------------------|---|
| Analit | 154 |
| Antibodi | 2, 24, 43, 58, 60, 89, 90, 95, 97, 98, 103, 108, 111, 113, 127, 130, 132, 137, 154 |
| Antigen | 2, 6, 15, 17, 19, 20, 29, 60, 61, 62, 75, 85, 89, 90, 101, 122, 127, 133, 136, 145, 147, 151, 154 |
| APC | 6, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 28, 29, 30, 35, 37, 38, 39, 41, 42 |
| Apoptosis | 154 |

B

| | |
|----------------|------------------------|
| Bakteri | 2, 71, 74, 75, 77, 150 |
| Biofilm | 73, 150, 154 |

C

| | |
|-------------------------|----|
| Cross reactivity | 95 |
|-------------------------|----|

E

| | |
|--|------------------|
| Eksotoksin | 154 |
| Endotoksin | 154 |
| Enzim | 154 |
| Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 88, 96, 135, 152 |

F

| | |
|-----------------------|-------------------|
| Fagositosis | 155 |
| Fiksasi | 96, 100, 110, 116 |
| Flow cytometry | 120 |

G

| | |
|-------------------|---------|
| Granulosit | 13, 155 |
|-------------------|---------|

H

| | |
|---------------------|--------|
| Helmin | 81, 86 |
| Hematopoitik | 155 |

I

| | |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Immunoassay | 1, 2, 8, 89, 144, 162 |
| Immunochromatography (ICT) | 96 |
| Imunohistokimia | 2, 6, 98, 105 |
| Imunologi | 124, 146 |
| Imunosupresan | 155 |

K

| | |
|-----------------------|-----|
| Kanker | 161 |
| Kemokin | 155 |
| Kortikosteroid | 155 |

Buku ini tidak diperjualbelikan.

L

| | |
|-----------------|---------------------------|
| Limfosit | 2, 19, 22, 24, 29, 30, 54 |
|-----------------|---------------------------|

M

| | |
|-----------------|----------------|
| Makrofag | 14, 15, 21, 78 |
|-----------------|----------------|

| | |
|------------|---|
| MHC | 7, 17, 19, 20, 21, 23, 38, 41, 42, 55, 65 |
|------------|---|

| | |
|----------------|----|
| Monosit | 14 |
|----------------|----|

N

| | |
|--------------------|----|
| Netralisasi | 96 |
|--------------------|----|

| | |
|-----------------|----|
| Nucleoid | 76 |
|-----------------|----|

P

| | |
|----------------|-------|
| Parasit | 2, 81 |
|----------------|-------|

| | |
|--------------------|-----|
| Pinositosis | 155 |
|--------------------|-----|

| | |
|----------------|-------------|
| Plasmid | 76, 77, 155 |
|----------------|-------------|

| | |
|-------------------|--------|
| Plasmodium | 82, 84 |
|-------------------|--------|

| | |
|--------------------|-----------------|
| Presipitasi | 3, 96, 127, 133 |
|--------------------|-----------------|

| | |
|-----------------|----|
| Protozoa | 82 |
|-----------------|----|

| | |
|--------------------|---------|
| Pseudopodia | 16, 155 |
|--------------------|---------|

R

| | |
|-------------------------------|------------|
| Radioimmunoassay (RIA) | 3, 96, 132 |
|-------------------------------|------------|

| | |
|-----------------|--------------------|
| Reseptor | 2, 23, 35, 52, 156 |
|-----------------|--------------------|

S

| | |
|-------------------|----------|
| Sitokin | 145, 156 |
| Sitoplasma | 156 |
| Spora | 73 |

V

| | |
|----------------|-----|
| Vesikel | 156 |
|----------------|-----|

W

| | |
|-------------------------|------------|
| Western Blotting | 3, 96, 139 |
|-------------------------|------------|

Buku ini tidak diperjualbelikan.

BIOGRAFI PENULIS



Puji Astuti, menempuh pendidikan sarjana di program studi Biokimia IPB University dan pendidikan magister di bidang *Biomedical Science* di Maastricht University, Belanda. Penulis aktif mengajar sebagai dosen sejak tahun 2019 di Program Studi D-IV Teknologi laboratorium Medik, Politeknik ‘Aisyiyah Pontianak hingga 2022. Pada tahun 2022 penulis mulai aktif bekerja sebagai dosen di program studi kedokteran Universitas Tanjungpura dengan bidang keahlian biokimia dan biologi molekuler. Hingga saat ini selain aktif sebagai dosen, penulis juga aktif melakukan berbagai riset baik di bidang biokimia maupun di bidang lainnya.

Sari Eka Pratiwi, menyelesaikan gelar Sarjana Kedokteran dan Profesi dokter di Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura Pontianak dan mendapatkan gelar Master Ilmu Biomedik di FK-KMK Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Aktif sebagai dosen di Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura sejak tahun 2012 hingga saat ini. Bidang yang ditekuni adalah kedokteran molekuler yang mencakup biologi sel, genetika dan epigenetika, mikro-RNA, imunologi, imuno-onkologi, dan patobiologi serta imuno-informatika di bidang penyakit degeneratif dan kanker. Buku ilmiah yang telah terbit sebelumnya adalah “*Kanker dan Perilaku Seksual Berisiko pada Remaja*”, “*Konsep Dasar Biologi Molekuler Kanker Untuk Mahasiswa Kedokteran dan Kesehatan*”, “*Konsep Dasar Patobiologi Kanker Payudara*”, “*HPV A-Z*” dan “*Konsep Dasar Biologi Molekuler Kanker Untuk Mahasiswa Kedokteran dan Kesehatan edisi ke-2*”. Buku Ajar yang telah terbit sebelumnya berjudul “*Membran Sel*”, “*Organela Sel*”, dan “*Inflamasi, Regenerasi, dan Repair Jaringan*”.



Buku ini tidak diperjualbelikan.

SINOPSIS

Immunoassay merupakan metode bioanalitik yang digunakan untuk menghitung sejumlah analit berdasarkan reaksi yang terjadi antara antigen (analit) dengan antibodi. Prinsip kerja dari *immunoassay* ini adalah dengan memanfaatkan reaksi yang terbentuk antara suatu analit atau antibodi berlabel yang jumlahnya diketahui dengan sampel (berupa antigen ataupun antibodi) yang tidak diketahui jumlahnya. Metode pemeriksaan berbasis *immunoassay* ini banyak digunakan di berbagai bidang kehidupan seperti untuk mendeteksi berbagai jenis penyakit, memonitor terapi dengan obat tertentu, uji farmakokinetik klinis, penemuan berbagai jenis obat maupun untuk berbagai kebutuhan di industri farmasi. Pemanfaatan *immunoassay* juga banyak digunakan pada berbagai penelitian di bidang biologi molekular.

Pada buku ini akan dibahas berbagai prinsip kerja dari teknik pemeriksaan *immunoassay*, prinsip dasar dari imunologi dan interaksi antigen-antibodi yang menjadi dasar pemeriksaan *immunoassay*. Dengan memahami prinsip-prinsip dasar dan aplikasi praktis yang dijelaskan dalam buku ini, diharapkan pembaca dapat mengaplikasikan teknik *immunoassay* secara efektif dalam berbagai konteks penelitian dan klinis, serta terus mengikuti perkembangan teknologi dalam bidang ini.

IMMUNOASSAY

PUJI ASTUTI
SARI EKA PRATIWI

Fakultas Keguruan dan Pendidikan Cendekia Muhammadiyah
Jl. Raya Palembang-Pematang Panjang, Sijunjung
Singaraja, Sumatera Barat - Indonesia 23554
Email: cendekiamuslimimpres@gmail.com
Website: www.cendekiamuslim.com



KESEHATAN

ISBN 978-623-92054-0-1

