

Uji Validitas ReagenSD BIOLINE HBsAg Untuk Deteksi HBsAg Dalam Serum Dengan ELISA Sebagai Standar Baku

K a l i m a *)

*) Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Makassar

Abstrak

Sampai saat ini diagnosis hepatitis B yang digunakan secara rutin di Laboratorium Rumah Sakit dan Laboratorium Pusat Kesehatan Masyarakat adalah diagnosis serologis dengan teknik imunokromatografi yang sering dikenal dengan Rapid Test. Teknik imunokromatografi dapat dilakukan dalam waktu relatif singkat serta tidak diperlukan fasilitas laboratorium yang khusus. Saat ini ada beberapa jenis reagen untuk diagnosis hepatitis B dengan teknik imunokromatografi, diantaranya ReagenSD BIOLINE HBsAg. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui validitas hasil deteksi HBsAg menggunakan Reagen SD BIOLINE HBsAg dengan ELISA sebagai Standar Baku. Penelitian dilaksanakan pada tanggal 7 sampai dengan 19 Maret 2016 di Laboratorium Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Makassar dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Makassar. Penelitian ini merupakan penelitian observasi laboratorium dengan 60 spesimen serum pasien suspek hepatitis B yang diperoleh dari beberapa rumah sakit di kota Makassar. Setiap spesimen serum dari 60 pasien suspek hepatitis B, dilakukan deteksi HBsAg menggunakan reagen SD BIOLINE HBsAg dan ELISA. Data hasil penelitian yang diperoleh setelah dilakukan uji Validitas menunjukkan bahwa Sensitivitas 91,17%, Spesifisitas 100%, Nilai Ramal Positif 100%, dan Nilai Ramal Negatif 89,66%. Simpulan Reagen SD BIOLINE HBsAg dapat digunakan untuk deteksi HBsAg dalam specimen atau bahan pemeriksaan.

Kata kunci :ELISA, HBsAg, Imunokromatografi SD BIOLINE, Validitas.

Pendahuluan

Hepatitis B adalah salah satu penyakit menular berbahaya yang dapat menyebabkan Kejadian Luar Biasa (KLB) dan termasuk masalah kesehatan masyarakat di dunia termasuk Indonesia. Penyakit Hepatitis B juga merupakan penyakit infeksi virus yang dapat menyerang hati dan selanjutnya akan berkembang menjadi penderitanya atau bahkan kanker hati hingga menyebabkan kematian.

Menurut *World Health Organization*(WHO) Hepatitis B adalah jenis penyakit yang paling umum di negara-negara berkembang. Jenis penyakit ini juga 50 hingga 100 kali lebih gampang menular dibandingkan HIV. Virus ini dapat ditularkan dari ibu ke bayinya ataupun pengguna narkoba. Kementerian Kesehatan mencatat sekitar 24 juta penduduk Indonesia pernah terinfeksi penyakit Hepatitis B. Data yang diperoleh dari Unit Transfusi Darah Provinsi Sulawesi Selatan tahun 2013, terdapat 576 (3,13%) sampel yang reaktif terhadap HBsAg dari 18.379 sampel.

Dengan banyaknya kasus HBsAg, maka kebutuhan suatu metode atau reagen untuk menegakkan diagnosis penyakit Hepatitis B yang sifatnya sensitif dan spesifik yang dapat mendukung gejala-gejala klinis sangatlah perlu.

HBsAg dalam darah dapat dideteksi dengan *Enzyme Linked Immunoassay* (*ELISA*), namun metode pemeriksaan ini masih terdapat kendala dan keterbatasan. Diantaranya membutuhkan alat yang lebih banyak, harga lebih mahal, diperlukan pelatihan khusus dan interpretasi hasil membutuhkan waktu yang lebih lama (1 sd 4 jam). Sebagai konsekuensinya diperlukan pengembangan, yaitu metode *Immunochromatography Test*(ICT). Metode ICT mudah, praktis, cepat dan hasil dapat diinterpretasikan dalam waktu 20 menit. (Handojo Indro, 2003)

Pada saat ini banyak merek produk pemeriksaan HBsAg menggunakan metode ICT yang beredar dipasaran. Banyak produk menggunakan metode ICT kadang-kadang membingungkan bagi petugas laboratorium

yang akan menggunakannya. Pada umumnya pemeriksaan HBsAg metode ICT diharapkan memiliki sensitivitas 100% dan spesifisitas 100 %, namun pada kenyataannya hal tersebut belum terwujud.

Salah satu yang menjadi masalah dalam bidang kesehatan sampai saat ini yang berkaitan dengan metode ICT pada pemeriksaan HBsAg yaitu belum diketahuinya validitas semua metode ICT. Selain itu hasil deteksi suatu metode ICT di suatu daerah atau Negara terbukti validitasnya baik, belum tentu sama di daerah atau Negara lain. Hal tersebut antara lain disebabkan kemungkinan strain virus hepatitis B berbeda antara satu daerah dengan daerah yang lain.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian Uji Validitas Reagen SD BIOLINE HBsAg Untuk Deteksi HBsAg dengan ELISA Sebagai Standar Baku.

Hepatitis virus akut merupakan penyakit infeksi yang penyebarannya luas dalam tubuh, walaupun efek yang menyolok terjadi pada hati. Telah ditemukan 5 kategori virus yang menjadi agen penyebab: Virus Hepatitis A (HAV), Virus Hepatitis B (HBV), Virus Hepatitis C (HCV), Virus Hepatitis D (HDV), Virus Hepatitis E (HEV). Walaupun kelima agen ini dapat dibedakan melalui petanda antigeniknya, tetapi kesemuanya memberikan gambaran klinis yang mirip, yang dapat bervariasi dari keadaan subklinis tanpa gejala hingga keadaan infeksi akut yang fatal. Bentuk hepatitis yang paling dikenal adalah HAV (Hepatitis A Virus) dan HBV (Hepatitis B Virus). Soemoharjo Soewignjo, Gunawan Stepanus (2008).

Virus Hepatitis B (HBV) utuh adalah suatu virus DNA yang berlapis ganda (*double shelled*) dengan diameter 42 nm. Bagian luar virus ini terdiri dari HBsAg sedang bagian dalam adalah nukleokapsid yang terdiri dari HBcAg. Dalam nukleokapsid didapatkan kode genetik VHB yang terdiri dari DNA untai ganda (*double stranded*) dengan panjang 3200 nukleotida. Soemoharjo Soewignjo, Gunawan Stepanus (2008)

Infeksi HBV terjadi bila partikel utuh HBV berhasil masuk ke dalam hepatosit, kemudian kode genetik HBV akan masuk ke dalam inti sel hati dan kode genetik itu akan "memerintah" sel hati untuk membuat protein-protein yang merupakan komponen HBV. Jadi, sebenarnya virus yang ada di dalam tubuh penderita itu dibuat sendiri oleh hepatosit penderita yang bersangkutan dengan genom HBV yang pertama masuk sebagai cetak biru.

Berikut ini adalah berbagai macam petanda serologic Hepatitis B serta maknanya:

a) HBsAg (*Hepatitis B Surface Antigen*)

Suatu protein yang merupakan selubung luar partikel HBV. HBsAg yang positif menunjukkan bahwa pada saat itu yang bersangkutan mengidap HBV.

HBsAg ada dalam tiga bentuk, yaitu selubung luar partikel Dane dan partikel HBsAg lepas yang berbentuk sferik (bulat) dan partikel HBsAg yang berbentuk tubuler (filanen). Dalam perjalanan infeksi HBV ada saat-saat ketiga bentuk partikel tersebut bisa ditemukan dalam darah secara bersamaan. Pada infeksi HBV akut keadaan sedangkan pada infeksi Hepatitis Kronik hal ini terjadi pada fase reflektif. Infeksi HBV ada saat partikel berbentuk sferik dan filament saja yang ada dalam peredaran darah, misalnya pada fase integrasi yang merupakan fase nonreflektif.

b) Anti-HBs

Antibodi terhadap HBsAg. Antibodi ini baru muncul setelah HBsAg hilang. Anti-HBs yang positif menunjukkan bahwa individu yang bersangkutan telah kebal terhadap infeksi HBV baik yang terjadi setelah suatu infeksi HBV alami atau setelah imunisasi Hepatitis B.

c) Anti HBc

Antibodi terhadap protein core. Antibodi ini muncul pada semua kasus dengan infeksi HBV pada saat ini (*current infection*) atau infeksi pada masa yang lalu (*past infeksi*). Anti HBc yang sering muncul pada hepatitis B akut. Karena itu, positifnya IgM anti-HBc pada kasus hepatitis akut dapat memperkuat diagnosis Hepatitis B akut. Namun karena IgM anti-HBc bisa

kembali menjadi positif pada Hepatitis Kronik dengan reaktivasi, IgM anti-HBc tidak dapat dipakai untuk membedakan Hepatitis Akut dengan Hepatitis Kronik secara mutlak.

- d) HBeAg
Suatu protein non structural dari HBV (bukan merupakan bagian dari HBV) yang disekresikan ke dalam darah dan merupakan produk gen precore dan gen core. Didapatkan pada fase awal Hepatitis Akut atau Kronik. Positifnya HBeAg merupakan petunjuk adanya aktivitas replikasi HBV yang tinggi dari seseorang individu HBsAg.
- e) Anti-HBe
Antibodi yang timbul terhadap HBeAg pada infeksi HBV tipe liar. Positifnya anti-HBe menunjukkan bahwa HBV ada dalam fase nonreplikatif. Berbeda dengan anti-HBc atau anti-HBs yang bertahan lama, anti HBe biasanya hilang setelah beberapa bulan atau tahun.
- f) DNA HBV
Positifnya DNA HBV dalam serum menunjukkan adanya partikel HBV yang utuh (partikel Dane) dalam tubuh penderita. DNA HBV adalah petanda HBV secara kuantitatif memegang peran yang sangat penting untuk menentukan tingkat replikasi HBV, menentukan indikasi terapi antiviral dan menilai hasil terapi.

Teknik Immunochromatography disebut juga tes aliran lateral, merupakan alat sederhana yang dimaksudkan untuk mendeteksi kehadiran (atau ketiadaan) dari analit target dalam sampel tanpa membutuhkan peralatan khusus dan mahal, meskipun aplikasi di beberapa laboratorium ada yang didukung oleh peralatan membaca. Biasanya, tes ini digunakan untuk diagnosa medis baik untuk pengujian di rumah, pengujian perawatan, atau penggunaan laboratorium. Salah satu aplikasi yang tersebar luas dan terkenal adalah tes HBsAg.

Teknologi ini didasarkan pada serangkaian kapiler, seperti potongan kertas berpori. Masing-masing elemen memiliki kapasitas untuk mengangkut cairan (misalnya serum) secara spontan. Elemen pertama (sampel pad) bertindak sebagai spons dan memegang kelebihan cairan

sampel. Setelah direndam, cairan berpindah ke elemen kedua (conjugate pad) di mana produsen telah disimpan yang disebut konjugasi, format kering partikel bio-aktif dalam matriks garam-gula yang berisi segala sesuatu untuk menjamin dioptimalkan reaksi kimia antara molekul target (misalnya antigen) dan mitra kimia (misalnya, antibodi) yang telah bergerak pada permukaan partikel. Sedangkan cairan sampel melarutkan matriks garam-gula, juga melarutkan partikel dan dalam satu tindakan transportasi gabungan sampel dan konjugat campuran sementara mengalir melalui struktur pori.

Dengan cara ini, analit mengikat partikel saat bermigrasi lebih lanjut melalui kapiler ketiga. Bahan ini memiliki satu atau lebih daerah (sering disebut garis-garis) di mana molekul ketiga telah bergerak oleh produsen. Pada saat campuran sampel-konjugat mencapai strip ini, analit telah terikat pada partikel dan molekul 'menangkap' ketiga mengikat kompleks. Setelah beberapa saat, ketika semakin banyak cairan telah melewati garis, partikel menumpuk dan garis-daerah berubah warna. Biasanya setidaknya ada dua garis: satu (kontrol) yang menangkap partikel apapun dan dengan demikian menunjukkan bahwa kondisi reaksi dan teknologi bekerja dengan baik, yang kedua berisi molekul capture spesifik dan hanya menangkap partikel-partikel ke mana molekul analit telah bergerak. Setelah melewati zona reaksi ini cairan memasuki bahan berpori akhir, sumbu, yang hanya bertindak sebagai wadah limbah. Pengujian Arus Lateral dapat beroperasi baik sebagai kompetitif atau tes sandwich.

Prinsip Kerja HBsAg Strip :

Hasil positif : Ikatan HBsAg yang terdapat dalam serum atau plasma akan berikatan dengan Anti HBs berlabel colloidal gold pada bantalan conjugate. Ikatan tersebut akan bergerak sepanjang membrane reaksi dan selanjutnya akan berikatan dengan Anti-HBsAg Antibody pada garis test dan membentuk garis merah, kelebihan Anti HBs Colloidal Gold berikatan dengan Anti-Mouse Antibody membentuk garis warna merah.

Hasil Negatif : Anti HBs *Colloidal Gold* akan bergerak sepanjang membrane dan selanjutnya akan berikatan dengan Anti-Mouse Antibody membentuk garis warna merah.

Kelebihan dari strip imunokromatografi HBsAg antara lain :

Lebih sederhana dan mudah diinterpretasikan, tidak memerlukan listrik dan pelatihan khusus, waktu yang diperlukan untuk pengujian relative singkat dan hasil uji dapat dilihat secara langsung, dapat disimpan pada temperatur kamar (usahakan tidak terkena cahaya matahari langsung).

Hepatitis B adalah suatu penyakit yang dapat menginfeksi hati sehingga menimbulkan peradangan hati akut atau menahun yang pada sebagian kecil kasus dapat berlanjut menjadi sirosis hati atau kanker hati. Di dalam hati virus hepatitis B mengalami siklus replikasi yang meliputi penempelan virus pada sel hepatosit, pelepasan partikel core yang terdiri dari HBcAg, enzim polymerase dan DNA virus kedalam sitoplasma. Selanjutnya HBsAg diproduksi dalam jumlah banyak oleh hepatosit yang terinfeksi dan dilepaskan kedalam darah. HBsAg yang dilepaskan kedalam darah dapat dideteksi dengan menggunakan metode *immunochromatography* test.

Metode

Jenis penelitian menggunakan metode observasi laboratoriu, yaitu untuk mengetahui Validitas Reagen SD BIOLINE HBsAg Untuk Deteksi HBsAg dengan ELISA Sebagai Standar Baku.

Bahan dan alat yang digunakan adalah reagen SD BIOLINE HBsAg, Hepalisa HBsAg Indec Diagnostic, aquabides, specimen serum, mikroplate, mikropipet, tips, tabung reaksi, centrifuge, alat ELISA (Profesional Lab-Adaltis).

Persiapan bahan uji dilakukan dengan mempersiapkan alat-alat yang akan digunakan. Vena yang akan ditusuk diusahakan vena *median cubital* atau *cephalic*. Kulit pada bagian yang akan dilakukan penusukan dibersihkan menggunakan kapas alcohol dan dibiarkan kering. Kemudian dilakukan penusukan pada bagian vena, setelah volume darah

dianggap cukup, tali pembendung dilepaskan, kapas diletakkan pada area penusukan lalu plester.

Prosedur Pemeriksaan

Prosedur pemeriksaan HBsAg Metode *Immunochromatography* menggunakan reagen SD BIOLINE HBsAg yaitu, perangkat test dikeluarkan dari kemasan dan kemudian diletakkan pada permukaan yang datar dan kering. Serum 100µl ditambahkan ke dalam sumur sampel. Hasil dibaca dalam waktu 20 menit. Hasil tidak dapat diinterpretasikan setelah 30 menit. Hasil deteksi dicatat.

Prosedur Pemeriksaan HBsAg metode ELISA: reagen dan specimen serum dibiarkan pada suhu kamar. Alat ELISA dinyalakan (on), lalu diprogram untuk pemeriksaan HBsAg. Reagen dan specimen dimasukkan sesuai posisi masing-masing. Proses selanjutnya meliputi: diinkubasi, cuci, penambahan subtract, inkubasi, penambahan larutan stop dengan waktu dan suhu masing-masing sesuai manual reagen. Hasil pemeriksaan dicatat.

Hasil

Berdasarkan pemeriksaan yang telah dilakukan di Laboratorium Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Makassar dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Makassar terhadap 60 spesimen serum suspek Hepatitis B diperoleh hasil sebagai berikut :

Tabel 1. Hasil Deteksi HBsAg menggunakan reagen SD BIOLINE HBsAg:

Positif		Negatif		Jumlah	
n	%	n	%	n	%
31	51,67	29	48,33	60	100

Hasil deteksi atau pemeriksaan HBsAg menggunakan reagen SD BIOLINE HBsAg dari 60 spesimen serum 31 (51,67% positif dan 29 (48,33%) negatif.

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan HBsAg Metode ELISA

Positif		Negatif		Jumlah	
n	%	n	%	n	%
34	56,67	26	43,33	60	100

Hasil pemeriksaan HBsAg metode ELISA dari 60 spesimen serum 34 (56,67%) positif dan 26 (43,33%) negatif.

Tabel 3. Hasil Reagen SD BIOLINE HBsAg Sebagai Teknik Yang Diuji dan Hasil ELISA Sebagai Standar Baku :

Teknik atau Metode Pemeriksaan HBsAg	ELISA (Standar Baku)		
	+	-	
Reagen SD BIOLINE HBsAg (reagen yang diuji)	+	31	0
	-	3	26

Positif benar : 31
 Negatif benar : 26
 Positif palsu : 0
 Negatif palsu : 3

Dari data tersebut ditentukan sensitivitas, spesifisitas, nilai ramal positif dan nilai ramal negatif Reagen SD BIOLINE HBsAg sebagai berikut:

$$\text{Sensitivitas: } \frac{31}{31 + 3} \times 100\% = 91,17\%$$

$$\text{Spesifisitas: } \frac{26}{26 + 0} \times 100\% = 100\%$$

$$\text{Nilai ramal positif: } \frac{31}{31 + 0} \times 100\% = 100\%$$

$$\text{Nilai ramal negatif: } \frac{26}{26 + 3} \times 100\% = 89,66\%$$

Pembahasan

Berdasarkan tinjauan pustaka menyatakan bahwa HBsAg merupakan selubung luar partikel virus hepatitis B. HBsAg

yang positif menunjukkan bahwa pada saat itu pasien mengidap penyakit hepatitis B. HBsAg dalam darah dapat dideteksi dengan teknik imunokromatografi atau *Immunochromatography Test*. Pada penelitian ini digunakan teknik atau metode imunokromatografi Reagen SD BIOLINE HBsAg.

Reagen SD BIOLINE HBsAg adalah merupakan salah satu reagen metode *Immunochromatography* yang dirancang untuk penelitian kualitatif HBsAg dalam serum atau plasma manusia. Berdasarkan referensi, perusahaan yang memproduksi reagen SD BIOLINE HBsAg telah melakukan pengujian dengan menggunakan 276 sampel yang terdiri dari 98 sampel positif dan 178 sampel negatif yang berasal dari Africa, Asia, Eropa dan Amerika Latin. Berdasarkan penelitian dari sampel tersebut diperoleh hasil yaitu, sensitivitas 100 % dan spesifisitas 100%.

Dengan mengacu pada data pengujian tersebut peneliti ingin menentukan validitas Reagen SD BIOLINE HBsAg untuk deteksi HBsAg dalam serum orang Indonesia khususnya di Makassar.

Hal tersebut menarik diteliti karena suatu reagen atau perangkat diagnostik yang validitas hasilnya baik di negara produsennya, belum pasti validitas hasilnya baik di negara atau di daerah lain. Hal tersebut antara lain dapat disebabkan karena strain mikroba misalnya virus atau bakteri di satu negara atau daerah mungkin berbeda. Selain itu pembentukan antibodi di dalam tubuh manusia atau hewan juga dipengaruhi beberapa faktor diantaranya: faktor gen yang bersifat menurun dan atau organ yang memproduksi antibodi di dalam tubuh.

Penelitian ini menggunakan spesimen serum suspek hepatitis B dari beberapa laboratorium rumah sakit di kota Makassar. Setiap spesimen serum diperiksa atau dideteksi HBsAg menggunakan 2 (dua) jenis metode atau perangkat diagnostik yakni: metode imunokromatografi dengan reagen SD BIOLINE HBsAg sebagai metode yang diuji dan metode ELISA sebagai standar baku. Dari 60 spesimen atau

sampel yang diperiksa didapatkan hasil : metode imunokromatografi reagen SD BIOLINE HBsAg 32 sampel positif HBsAg, sedangkan metode ELISA 34 sampel positif HBsAg.

Berdasarkan hasil analisa data penelitian menunjukkan validitas metode imunokromatografi Reagen SD BIOLINE HBsAg untuk mendeteksi HBsAg menunjukkan hasil sebagai berikut : sensitivitas 91,17%, spesifisitas 100%, nilai ramal positif 100% dan nilai ramal negative 89,66%. Dari 60 spesimen serum yang diperiksa ternyata terdapat 2 (dua) specimen yang hasilnya berbeda antara kedua metode yang digunakan. Hal ini dapat terjadi karena analit dalam kedua spesimen serum kadar atau titer masih rendah sehingga pada metode imunokromatografi Reagen SD BIOLINE HBsAg belum terdeteksi, sedangkan pada metode ELISA kadar analit yang rendah dapat terdeteksi. Hal tersebut menunjukkan sensitivitas laboratorium metode ELISA sangat baik, itulah salah satu alasan metode ELISA dapat digunakan sebagai Standar Baku, walaupun prosedur kerjanya agak rumit dan membutuhkan alat khusus membaca hasilnya.

Metode imunokromatografi termasuk Reagen SD BIOLINE HBsAg prosedur kerjanya praktis, memiliki kontrol internal, tidak membutuhkan alat khusus untuk membaca hasilnya. Perangkat diagnostik metode imunokromatografi yang ada sekarang, umumnya dirancang atau diset hanya untuk uji kualitatif. Metode imunokromatografi dipengaruhi banyak faktor yang dapat mempengaruhi sensitivitas dan spesifitas diantaranya: reagen pelacak pada conjugated, reagen pengikat pada garis tes dan bantalan absorben.

Atas dasar hasil dan pembahasan penelitian dapat disimpulkan bahwa Reagen SD BIOLINE HBsAg dapat digunakan untuk mendeteksi HBsAg dalam suatu spesimen atau bahan pemeriksaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2012 . Inset Kit Reagen SD BIOLINE HBsAg
- Cahyono SB. Hepatitis B. Dalam: Hepatitis B Cegah Kanker Hati. Cetakan ke-5. Kanisius. Yogyakarta. 2010:22-4.
- Hamurwono B.G, 2003. Modul 2 Uji Saring Untuk Penyakit Infeksi. Jakarta: *Japan Bank for International Cooperation*.
- Harjoeno H, 2012. Interpretasi Hasil Tes Laboratorium Diagnostik. Makassar : Hasanuddin University Press (Lephass).
- Handojo Indro, 2003. Imunoasai Terapan Pada Beberapa Penyakit Infeksi. Surabaya : Airlangga University Press.
- Kresno B. S, 2010. Imunologi: Diagnosis Dan Prosedur Laboratorium. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Price A Sylvia & Wilson M Lorraine, 1994. Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Soemoharjo Soewignjo, Gunawan Stepanus, 2008. Hepatitis B Virus. Mataram : Penerbit Buku Kedokteran EGC.*
- Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. *Edisi Revisi. Mikrobiologi Kedokteran*. Tangerang : Binarupa Aksara Publisher.

Sastroasmoro S dan Ismael S, 1995. Dasar-Dasar Penelitian Klinik. Jakarta: Bina Aksara.

World Health Organisation, 2013 .Hepatitis B. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/, 25 April 2014.