

Peranan Diagnostik Teknik Imunofluoresensi Dalam Dermatologi

Oleh: Hardyanto dan Soedarmadi

Bagian Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Hardyanto & Soedarmadi — *The diagnostic role of immunofluorescence techniques in dermatology*

Diagnostic procedures by means of immunofluorescence techniques have been greatly used in investigations of some diseases which have immunologic background. These tests are now accepted as routine diagnostic procedures in dermatology in advanced countries beside electron microscopy. The main purpose of this paper is to summarize intelligibly immunofluorescence results obtained so far in various skin disorders. The methods of application can be divided into direct and indirect method.

The basic principle, technical procedures, some problems and application of immunofluorescence on various skin diseases are discussed.

Key Words: immunofluorescence techniques — direct and indirect immunofluorescence — antigen-antibody tracing — immunologic skin diseases — dermatoses

Selama sepuluh tahun terakhir ini penyelidikan-penyelidikan dengan teknik imunofluoresensi dan mikroskop elektron telah menambah kekayaan dalam penelitian bermacam-macam penyakit kulit pada manusia. Imunofluoresensi merupakan suatu cara imunohistokimiawi yang digunakan untuk menentukan letak bahan-bahan (antigen atau antibodi) di dalam sel-sel atau jaringan. Teknik ini mula-mula diperkenalkan oleh Coons (1941). Ia menggunakan *beta-anthraccena* (suatu bahan yang berfluoresensi biru) untuk mendekati antigen *Pneumococcus* pada jaringan tikus. Baru setelah itu ia dan kawan-kawannya menggunakan *fluorescein*, suatu bahan yang dapat memancarkan warna hijau, sehingga dapat dibedakan dengan warna biru akibat autofluoresensi dari jaringan.

Fluoresensi ialah pemancaran gelombang sinar tertentu jika suatu bahan disinari dengan gelombang sinar yang berbeda. Gelombang sinar yang dipancarkan ini mempunyai panjang gelombang lebih panjang daripada yang diterima. Bahan yang dapat memancarkan sinar fluoresensi disebut: *bahan fluorochrom*.

Bahan fluorochrom yang sering dipakai adalah:

- **Fluorescein:** merupakan bahan yang paling sering dipakai. Bahan ini paling baik dalam bentuk ikatan dengan protein, yang disebut: *Fluorescein-Isothiocyanat* (FITC) yang memancarkan sinar kehijauan pada panjang gelombang 517 nm.
- **Rhodamin :** bahan ini paling baik dalam bentuk ikatan yang disebut: *tetramethyl-rhodamin-isothiocyanat* (TRITC) yang memancarkan fluoresensi merah-jambu pada panjang gelombang 580 nm.

PRINSIP DASAR IMMUNOFLUORESENSI

Prinsip cara ini adalah bahwa bahan fluorochrom yang dikenai sinar ultra-violet akan memancarkan fluoresensi dengan warna yang tergantung pada bahan fluorochrom yang dipakai. Kemudian jika zat warna fluorochrom ini berikatan dengan protein tertentu (misalnya antibodi) setelah ditambahkan pada jaringan atau disuntikkan ke tubuh binatang percobaan, maka ikatan antibodi — zat fluorochrom ini (selanjutnya disebut: konjugat) dapat dijadikan pelacak ("tracer") yang peka dengan spesifisitas imunologik yang tidak berubah.

Konjugat (antibody yang telah ditandai) tersebut kemudian ditambahkan pada sel-sel atau jaringan dan akan berikatan dengan antigen, sehingga membentuk suatu kompleks imun (kompleks antigen-antibodi) yang stabil. Protein-protein yang tidak mempunyai sifat antibodi akan terbuang waktu pencucian, sehingga hasil tersebut dapat dilihat jelas melalui mikroskop fluoresensi.

Menurut teknik pewarnaannya cara ini dapat dilakukan secara:

- langsung (*direct immunofluorescence*)
- tak langsung (*indirect immunofluorescence*).

Kedua cara ini dapat dipergunakan untuk melacak baik antigen maupun antibodi dalam jaringan.

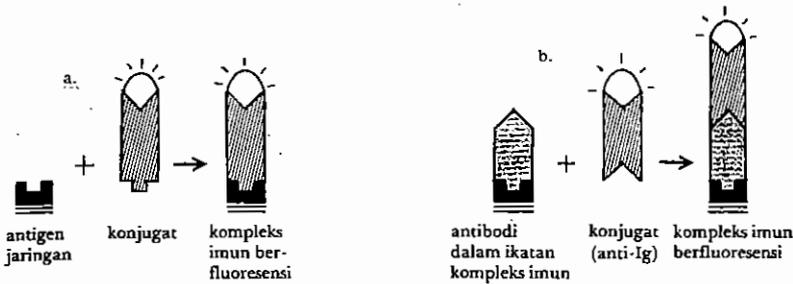
IMUNOFLUORESENSI LANGSUNG

a. Pelacakan antigen (*antigen tracing*)

Suatu konjugat (antibodi spesifik yang telah ditandai dengan zat fluorochrom) ditambahkan pada antigen pada sediaan jaringan (substrat) yang berada di atas gelas obyek. Kemudian dilakukan pencucian untuk menghilangkan antibodi lain yang tidak spesifik. Konjugat tersebut akan berikatan dengan antigen yang sesuai (lihat GAMBAR 1a).

b. Pelacakan antibodi (*antibody tracing*)

Cara langsung dapat juga dipakai untuk menentukan antibodi. Dalam hal ini konjugat yang dipakai terdiri atas anti-immunoglobulin yang telah ditandai dengan zat fluorochrom, misalnya: "fluorescein-labelled anti-human-IgG" (lihat GAMBAR 1b).



GAMBAR 1. — Imunofluoresensi langsung

IMUNOFLUORESENSI TAK LANGSUNG

a. Pelacakan antigen

Kepada sediaan jaringan yang mengandung antigen ditambahkan antisera spesifik yang tidak ditandai. Kemudian pada kompleks imun tersebut ditambah suatu konjugat yang terdiri atas anti-immunoglobulin yang telah ditandai. Maka akan terjadi kompleks ikatan antara antigen-antibodi dan konjugat yang dapat dilihat melalui mikroskop fluoresensi.

Cara penentuan antigen ini pertama kali dipergunakan oleh Weller dan Coons (1954) untuk mencari letak antigen virus varicella-zoster yang berada pada biakan jaringan (lihat GAMBAR 2a).

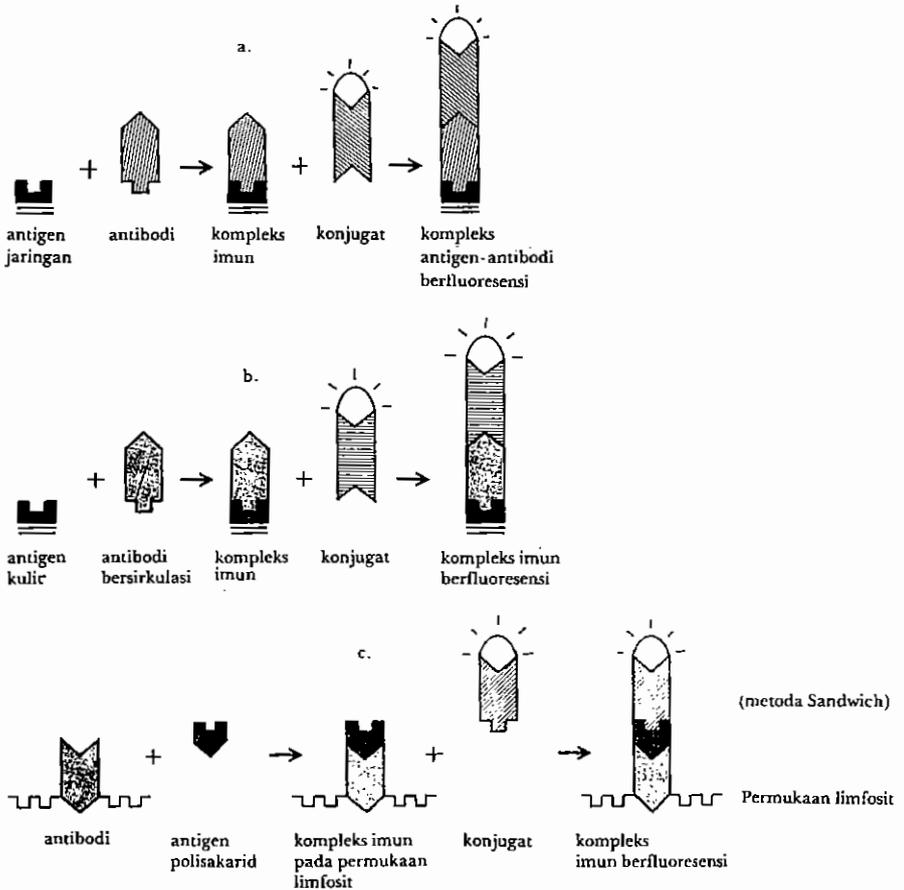
b. Pelacakan antibodi

Dengan cara taklangsung ini dapat ditentukan antibodi yang bersirkulasi. Adanya antibodi spesifik terhadap antigen jaringan (misalnya: antigen kulit) dapat diperiksa dengan menambahkan antisera penderita pada irisan jaringan yang mengandung antigen (biasanya diambil dari biopsi kulit bibir *Cavia*, esofagus, atau kulit penderita sendiri). Akan terjadi kompleks imun. Kemudian ditambahkan suatu konjugat yang terdiri atas anti-immunoglobulin yang telah ditandai dengan zat fluorochrom. Maka akan terbentuk kompleks antigen-antibodi-anti immunoglobulin dan zat fluorochrom (lihat GAMBAR 2b).

Modifikasi cara taklangsung ini disebut: metoda *Sandwich*. Dengan cara ini dimaksudkan untuk mengetahui adanya antibodi yang melekat pada permukaan sel (limfosit). Setelah sel-sel limfosit difiksasi, ditambahkan kepadanya suatu larutan antigen polisaccharid, sehingga terbentuk kompleks imun pada permukaan sel. Kemudian ditambah suatu konjugat terhadap antigen polisaccharid tersebut, maka akan terbentuk kompleks antibodi-antigen-konjugat pada permukaan sel (Roitt, 1974) (lihat GAMBAR 2c).

Cara taklangsung ini lebih peka daripada cara langsung, oleh karena akan lebih banyak konjugat (anti-immunoglobulin yang dilabel) terikat pada antibodi, daripada konjugat (antibodi yang dilabel) pada cara langsung. Lagi pula, dengan cara taklangsung hanya diperlukan satu macam kon-

jugat untuk memeriksa beberapa serum penderita, sedang dengan cara langsung, harus selalu dibuat konjugat baru jika akan memeriksa bermacam-macam antigen. Hanya kerugian cara taklangsung ini adalah bahwa nampak terlalu berbelit dan sering terjadi pemancaran (emisi) yang tidak spesifik, karena adanya ikatan antara antibodi yang tak-spesifik dengan konjugat (Parish. 1972).



GAMBAR 2. — Imunofluoresensi taklangsung

CARA KERJA

1. Persiapan

Jaringan (kulit) yang dipilih, diinsisi atau dibiopsi dengan anestesi lokal dengan etilklorida kira-kira sebesar 3-5 mm. Kemudian dapat dibekukan dengan macam-macam cara (Bean, 1976):

- jaringan segar tersebut langsung dimasukkan dalam cryostat atau dibekukan dulu dengan CO₂ padat baru kemudian ke cryostat

- dibekukan dengan nitrogen cair dalam suatu bungkus aluminium
- dibekukan dengan campuran CO₂ padat dan acetone dalam tabung reaksi

Kemudian bahan-bahan tadi dipotong-potong, dibuat "coupe" dalam cryostat pada suhu 23° Celsius.

2. Teknik pewarnaan

a. Cara langsung

Coupe jaringan yang telah dibuat tersebut diletakkan di atas gelas obyek, yang bersih dan bebas lemak, kemudian dikeringkan selama 30 menit pada suhu kamar. Setelah sediaan dibasahi secukupnya dengan salin yang di"buffer" (*buffered-saline*), kemudian ditetesi dengan 1 tetes konjugat selama 30 menit. Cuci dalam salin (pH 7,0), kemudian bilas dengan "buffered-salin" selama 1—2 jam untuk menghilangkan antibodi yang berlebihan.

Bila pada *coupe* jaringan tersebut mengandung antigen, maka akan terbentuk kompleks antigen-konjugat yang dapat dilihat dengan mikroskop fluoresensi.

b. Cara taklangsung

Pada *coupe* jaringan atau kulit (biasanya dari biopsi kulit bibir *Cavia*, esofagus atau kulit penderita sendiri) ditambahkan antibodi dari penderita yang belum dilabel selama 30 menit. Cuci kemudian dengan salin, kemudian bilas dengan larutan "buffered-saline" selama 30 menit. Selanjutnya ditambah konjugat (yang terdiri dari anti-immunoglobulin terhadap antibodi penderita yang telah dilabel dengan zat fluorochrom) selama 30 menit. Cuci lagi dalam salin, bilas dengan larutan "buffered-saline" selama 1—2 jam.

Bila dalam serum penderita terdapat antibodi yang bersirkulasi, maka akan terbentuk kompleks antigen-antibodi dan konjugat yang dapat dilihat dengan mikroskop-fluoresensi.

3. Mikroskop fluoresensi

Mikroskop yang digunakan untuk melihat bahan imunofluoresensi merupakan modifikasi sederhana mikroskop standard biasa.

Mikroskop fluoresensi mempunyai sumber sinar dengan intensitas tinggi, dengan filter-filter pembangkit yang menghasilkan suatu gelombang sinar yang mampu menyebabkan aktivitas fluoresensi dan suatu filter penahan untuk menghilangkan pengaruh gelombang-gelombang sinar lain.

Penggunaan mikroskop yang kurang baik pada pemeriksaan imunofluoresensi akan merupakan hambatan dalam ketepatan interpretasi terutama dalam bidang imunodermatologi. Oleh karena akan banyak menyebabkan terjadinya autofluoresensi dan bayangan gelap yang menutupi letak yang tepat bahan yang dideteksi (Cormane, 1973).

Sejak tahun 1967 Ploem memperkenalkan suatu sistem epi-iluminasi dengan menggunakan suatu iluminator vertikal dan kaca "dicroic". Pada sistem ini gelombang bangkitan dipusatkan secara langsung pada sediaan melalui lensa obyektif. Kemudian sinar fluoresensi yang dipancarkan dari bahan epi-

iluminasi ini dipindahkan ke mata melalui cermin "dicroic". Keuntungan sistem Ploem ini adalah bahwa iluminator akan memberikan kemungkinan untuk mengaktifkan zat fluorochrom dengan memancarkan sinar yang mempunyai panjang gelombang mendekati panjang gelombang sinar bangkit. Dan setiap pemeriksa umumnya menghendaki keadaan yang demikian ini (Stites, 1976).

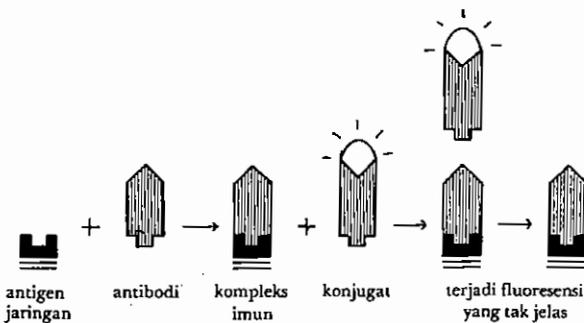
Di samping itu dengan dapat digantikannya sistem filter akan dengan cepat dilakukan pemeriksaan bahan pada panjang gelombang berbeda dengan pewarnaan yang berbeda pula, misalnya merah (rhodamin) dan hijau (fluorescein) secara berganti-ganti.

KESULITAN-KESULITAN TEKNIS

1. Tes-tes kontrol

Jika diragukan apakah antibodi dari konjugat bergabung secara spesifik atau tidak dengan antigen, maka harus dilakukan tes kontrol, yang disebut: "Blocking test" (Parish, 1972).

Sediaan mula-mula ditetesi dengan antibodi yang tidak dilabel, kemudian dicuci atau dibilas. Selanjutnya ditetesi dengan antibodi yang sama yang telah dilabel (konjugat). Jika reaksi yang terjadi benar-benar spesifik, maka pada tahap pertama antibodi akan bergabung dengan antigen, dan ini akan memblok antibodi konjugat pada tahap kedua (lihat GAMBAR 3).



GAMBAR 3. — "Blocking test"

Blocking test ini bukan suatu hal yang bersifat rutin, yang harus selalu dikerjakan, tetapi hanya jika terdapat keragu-raguan seperti tersebut.

2. Autofluoresensi

Jaringan-jaringan yang dikenai sinar ultraviolet akan memancarkan fluoresensinya. Hal ini dapat dipergunakan sebagai latar belakang dalam menentukan lokalisasi bahan imunofluoresensi spesifik. Tetapi jika sinar yang dipancarkan tersebut mempunyai panjang gelombang sama dengan yang dipancarkan oleh bahan fluorochrom, maka agar didapat kontras yang baik harus digunakan filter-filter. Misalnya: jaringan yang banyak mengandung collagen akan memancarkan autofluoresensi kuning-kehijauan dengan latar belakang hijau coklat, yang akan menutupi warna hijau dari fluorescein.

Pada beberapa jaringan, autofluoresensi ini dapat dihilangkan dengan memfiksasi sediaan dalam acetone atau metanol. Tetapi pada pemeriksaan bahan dari kulit dengan cara ini saja masih sukar untuk menghilangkan autofluoresensi. Paling baik kalau dengan memakai filter-filter tertentu pada mikroskop.

3. Pewarnaan non-spesifik

Yang dimaksud dengan pewarnaan non-spesifik adalah pewarnaan oleh konjugat yang menimbulkan fluoresensi jaringan, tetapi bukan karena reaksi antigen-antibodi. Hal-hal yang sering menimbulkan pewarnaan non-spesifik:

- pemberian label dengan fluorescein yang berlebihan pada anti-sera
- berlebihan konjugat yang bersifat non-antibodi dalam sera
- daya elektrostatis antara jaringan dengan konjugat
- larutan globulin yang terlalu pekat
- adanya absorpsi globulin oleh sel-sel netrofil, eosinofil, dan histiosit
- adanya "natural antibody" pada konjugat yang bergabung dengan tempat-tempat selain yang mengandung antigen.

Pewarna-pewarna non-spesifik ini dapat dihindari dengan menggunakan antisera dengan pudor jaringan yang sama asal dengan jaringan yang diperiksa, penggabungan imunoglobulin dengan hanya 2 atau 3 molekul zat fluorochrom dan menggunakan antisera dengan pengenceran tinggi (Parish, 1972).

PEMERIKSAAN IMUNOFLUORESENSI PADA BERBAGAI DERMATOSA

Imunofluoresensi merupakan suatu teknik diagnostik yang dapat digunakan untuk mendeteksi imunoglobulin, mikroorganisma, antigen dalam jaringan dan kultur.

Di negara-negara maju pemeriksaan dengan cara imunofluoresensi dilakukan secara rutin pada penyakit-penyakit kulit imunologik seperti: pemphigus, *bullous pemphigoid*, dermatitis herpetiformis, lupus erythematosus dan vasculitis. Hal ini disebabkan dengan pemeriksaan histopatologik saja kadangkadangkang masih sulit ditetapkan diagnosa penyakit-penyakit kulit tersebut secara pasti, sedangkan dengan imunofluoresensi langsung diagnosa dapat ditetapkan 100% dan dengan imunofluoresensi taklangsung antara 70—100% (Klokke, 1976).

Di bawah ini dikemukakan beberapa hasil pemeriksaan imunofluoresensi pada beberapa dermatosa tersebut:

1. Pemphigus

Pada semua jenis pemphigus (pemphigus vulgaris, pemphigus vegetans, pemphigus foliaceus dan pemphigus erythematosus) secara histopatologik terlihat pembentukan bulla intra-epidermal dengan adanya acantholysis.

Dengan imunofluoresensi langsung pada penderita yang masih aktif dapat ditunjukkan adanya deposisi autoantibodi pada ruang-ruang antar sel dalam epidermis bulla dan sekitarnya. Antibodi ini sebagian terbesar terdiri atas IgG dan sebagian kecil IgM dan IgA yang terikat dengan antigen antar sel.

Dengan imunofluoresensi taklangsung dapat dibuktikan adanya antibodi golongan IgG yang bersirkulasi, yang juga bereaksi terhadap bahan antar sel epitel kulit. Tingginya titer antibodi-pemphigus ini berubah sesuai dengan kondisi penderita dan dapat dipergunakan untuk mengukur berat-ringan dan aktifitas penyakitnya (Cormane, 1973; Provost, 1976), sehingga dapat dipergunakan untuk penetapan dosis corticosteroid dalam pengobatan (Klokke, 1976).

2. Pemphigoid

Pada pemphigoid terdapat autoantibodi golongan IgG terhadap membrana basalis kulit penderita sendiri, sehingga dengan pemeriksaan histopatologik terdapat bulla sub-epidermal. Dengan imunofluoresensi langsung pada kulit penderita aktif, pada bulla atau sekitarnya selalu dapat ditunjukkan adanya antibodi golongan IgG yang terlihat sepanjang membrana basalis. Kadang-kadang juga ditemukan IgM, IgD dan IgE (Piamphongsant, 1978; Provost, 1976), sedangkan dengan imunofluoresensi taklangsung dapat ditunjukkan autoantibodi yang bersirkulasi dalam serum penderita yang bereaksi terhadap antigen membrana basalis epitel kulit. Tetapi tinggi titer antibodi dengan aktifitas penyakit tidak selalu ada korelasi (Klokke, 1976; Piamphongsant, 1976).

Pada pemphigus maupun *bullous pemphigoid* biopsi hendaknya dilakukan pada kulit perbatasan bulla yang masih baru.

3. Dermatitis herpetiformis

Dengan pemeriksaan imunofluoresensi langsung dapat ditunjukkan adanya deposisi I yang hampir selalu dapat dijumpai pada daerah perbatasan dermoepidermal. Deposisi ini biasanya bersifat granuler, kadang-kadang linear, dijumpai jelas pada ujung-ujung apabila kulit perbatasan sehat (Piamphongsant, 1978; Provost, 1976).

Autoantibodi yang beredar tidak dapat ditunjukkan dengan imunofluoresensi taklangsung. Untuk biopsi sebaiknya dilakukan pada kulit sehat dekat bulla atau erosi atau pada lesi berbentuk urtica (Bean, 1976).

4. Lupus erythematosus

Dengan imunofluoresensi langsung dijumpai adanya deposisi IgG dan IgM secara granuler pada daerah perbatasan dermoepidermal di mana ada lesi lupus, juga pada dinding pembuluh-pembuluh darah dan daerah perivaskuler dermis (Provost, 1976).

Pada *systemic lupus erythematosus* deposisi tersebut selain ditemukan pada biopsi kulit di mana ada lesi, juga dapat ditunjukkan pada kulit normal yang terkena sinar matahari (Bean, 1976; Provost, 1976), sedangkan pada *discoid lupus erythematosus* deposisi tersebut hanya ditemukan pada lesi kulit yang kronik.

Baik pada SLE maupun DLE dapat ditunjukkan adanya antibodi-antinuklear pada pemeriksaan imunofluoresensi taklangsung. Hanya pada SLE antibodi ini terdapat dalam jumlah yang lebih besar (Parish, 1972; Piamphongsant, 1978).

5. Herpes gestationes

Merupakan penyakit kulit bullosa yang jarang terdapat, terjadi pada gravida akhir trimester II atau awal trimester III. Dengan imunofluoresensi langsung dapat dijumpai adanya deposisi IgG pada membrana basalis. Kadang-kadang deposisi juga terdiri atas IgE.

Dengan imunofluoresensi taklangsung bisa ditemukan adanya antibodi terhadap membrana basalis.

6. Allergic cutaneous vasculitis (*Leucocytoclastic vasculitis*)

Merupakan suatu bentuk vasculitis yang mengenai kulit, ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel polimorfonuklear dan perubahan-perubahan fibrinoid pada pembuluh-pembuluh darah kulit (Ryan & Wilkinson, 1972). Vasculitis ini merupakan suatu bentuk reaksi hipersensitivitas tipe III (*complex immune reaction*).

Dengan imunofluoresensi sediaan jaringan dari lesi kulit menunjukkan adanya deposisi IgG dan IgM beserta komplemen di dalam dan sekitar pembuluh-pembuluh darah kulit (Parish, 1972; Piamphongsant, 1978).

7. Primary cutaneous amyloidosis

Adanya timbunan masa amyloid pada papilla dermis, dapat diperkuat dengan imunofluoresensi, yaitu ditemukannya deposisi IgG, IgA dan IgM beserta komplemen di dalam masa amyloid tersebut (Piamphongsant, 1978).

RINGKASAN

Cara-cara diagnostik dengan teknik imunofluoresensi telah banyak digunakan dalam penyelidikan-penyelidikan beberapa penyakit dengan latar belakang imunologik.

Di dalam dermatologi teknik ini telah merupakan cara diagnostik yang dikerjakan secara rutin di negara-negara maju. Dengan pemeriksaan imunofluoresensi diagnosa dapat ditentukan lebih tepat.

Dibicarakan secara terperinci prinsip-prinsip, cara kerja baik imunofluoresensi langsung maupun taklangsung serta keuntungan dan kekurangannya masing-masing. Demikian pula beberapa kesulitan teknis serta pemakaiannya pada penyakit-penyakit kulit imunologik seperti: pemphigus, pemphigoid, dermatitis herpetiformis, lupus erythematosus dsb.

KEPUSTAKAAN

- Bean, Samuel F. 1976 Proper biopsy technique for immunofluorescence tests on skin. *J. Dermatol. Surg.* 2:148-50.
- Cormane, R. H., Van Joost, Th., & Kint, A. 1973 Immunofluorescence and electron microscopic studies of bullous disease, dalam Arthur Rook (ed.): *Recent Advances in Dermatology*, pp. 285-322. Longman Group Ltd., Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Jong, M. C. J. M. de 1976 *Pengantar Teknik Penyelidikan Imunofluoresensi*. Immunopathologisch Laboratorium, Kliniek voor Dermatologie, Academisch Ziekenhuis, Groningen.

- Parish, William E. 1972 Immunofluorescence, *dalam* Arthur Rook, D. S. Wilkinson & F. J. G. Ebling (eds): *Textbook of Dermatology*, vol. 1, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Piamphongsant, Thada 1978 Recent advances in cutaneous immunopathology. Preconference Educational Course, *3rd Regional Conference of Dermatology*, Denpasar.
- Provost, Thomas T. 1976 Dermatologic diseases, *dalam* H. H. Fudenberg *et al.* (eds): *Basic and Clinical Immunology*, pp. 497-510. Lange Medical Publications, Los Altos, California.
- Roitt, Ivan M. 1974 *Essential Immunology*, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Stites, Daniel P. 1976 Laboratory methods for detection of antigen antibodies, *dalam* H. H. Fudenberg *et al.* (eds): *Basic and Clinical Immunology*, pp. 303-308. Lange Medical Publication, Los Altos, California.
-