

Petunjuk Pengujian Menggunakan Metode Uji Western Blood IgG pada Serum Pasien terduga *Aspergillus spp.*

Ayu Eka Fatril
ayuekaf@apps.ipb.ac.id

Aspergillosis paru klinik (APK) merupakan infeksi paru kronik yang disebabkan oleh jamur *Aspergillus sp.*^{1,2} faktor resiko utama APK adalah penyakit paru kronik yang disertai dengan kerusakan jaringan paru misalnya TB paru, penyakit paru non-*Mycobacterium tuberculosis*, penyakit paru obstruktif kronik (PPOK), serta penyakit paru kronik lainnya.^{1,3} Diagnosis APK masih menjadi tantangan besar saat ini. Dalam mendiagnosis APK terdapat berbagai metode salah satunya melalui pemeriksaan serologi dilakukan dengan metode ELISA dan Western Blot (WB). Teknik WB menggunakan antigen glikoprotein *A. fumigatus* dengan berat molekul 16 kD, 18-20 kD dan 30 kD.⁴

A. Alat dan Bahan

1. Bahan :

Bahan yang digunakan dalam pelaksanaan WB IgG *Aspergillus spp.* sebagai berikut;

- a. R1 : strip
- b. R2 : *Sample buffer*
- c. R3 : anti IgG conjugate
- d. R5 : substrat NBT/BCIP
- e. R6 : *washing solution* → diencerkan 10x= 10 ml *washing solution*: 90 mL aquades steril. *Washing solution* yang diencerkan disimpan suhu 2-8⁰ C, bertahan 2 bulan. Suhu kamar, bertahan 1 minggu.
- f. R10 : serum kontrol positif
- g. Kertas saring
- h. Gunting/*cutter*, penggaris
- i. Tisu
- j. Aluminium foil

2. Alat :

Alat alat yang diperlukan dalam pelaksanaan WB IgG *Aspergillus* spp. sebagai berikut;

- a. Mikropipet 1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L
- b. *Rocking platform*
- c. Pipet pasteur
- d. Pinset
- e. Tip kuning, tip biru
- f. *Mixer sample*

B. Prosedur pengujian jamur *Aspergillus* spp. Pada serum IgG Western Blot

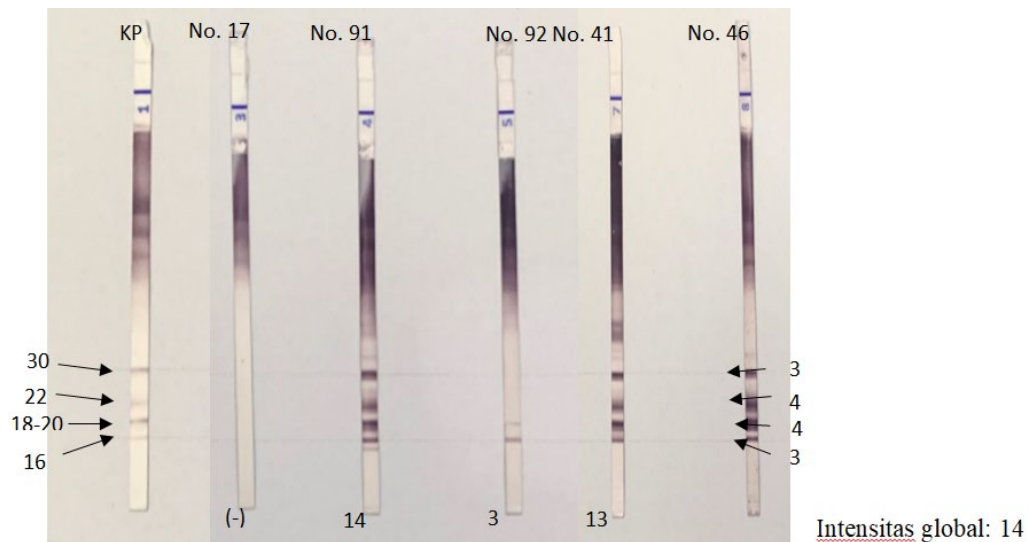
Langkah dalam pelaksanaan WB IgG untuk *Aspergillus* spp. sebagai berikut;

1. Menyiapkan sampel dan kontrol positif (Reagen R10);
2. Memotong strip (R1) sesuai kebutuhan dengan menggunakan *cutter* dan penggaris yang bersih, kering, dan transparan;
catatan : memberikan masing-masing *reservoir/channel* keterangan yang sama dengan no. sampel agar lebih mudah dalam pembacaan hasil;
3. Menambahkan 1,2 mL buffer sampel (R2) pada masing-masing reservoir/channel;
4. Mendingkan strip selama 2 menit, dengan posisi nomer strip terlihat menghadap ke atas, serta menggoyangkan channel/reservoir agar merendam strip dalam buffer dengan merata;
5. Menambahkan control positif (R10) pada channel kontrol sebanyak 10 μ L dan menambahkan sampel pada masing-masing channel sesuai nomer sampel sebanyak 10 μ L. Menggoyangkan channel secara perlahan, kemudian meletakkan channel ke *rocking platform* (nampan rotator) serta menginkubasi selama 90 menit $\pm$ 5 menit suhu 18-25⁰ C;
6. Mengosongkan isi reservoir dengan pipet Pasteur kemudian mambahkan 2-3 mL larutan *washing* yang telah diencerkan pada masing-masing channel. Menginkubasi pada *rocking platform* selama 3 menit. Mengulangi tahap ini sebanyak 2 kali, kemudian mengkosongkan isi reservoir/channel;
7. Menambahkan 1,2 mL anti IgG conjugate (R3) pada masing-masing channel. Meletakkan channel ke *rocking platform* kemudian menginkubasi sampel selama 60 menit $\pm$ 5 menit suhu 18-25⁰ C;
8. Mengulangi tahap no 6 sebagai tahapan pencucian;

9. Menambahkan 1,2 mL substrat NBT/BCIP (R5) pada masing-masing channel. Meletakkan channel ke *rocking platform* kemudian menginkubasi tertutup selama 60 menit $\pm$ 5 menit suhu 18-25⁰ C. Melindungi channel dari cahaya langsung dengan menggunakan alumunium foil;
Catatan : memperhatikan perkembangan warna strip. Perkembangan warna strip dapat dihentikan apabila background strip berwarna gelap sehingga tidak mengganggu pembacaan (kualitas pencucian mempengaruhi background warna strip)
10. Menghentikan reaksi dengan mengambil substrat NBT/BCIP menggunakan pipet pasteur atau membalikkan reservoir/channel. Kemudian menambahkan 2 mL air destilasi/aquades steril dalam channel. Mengulangi tahapan pencucian seperti tahap no 6 lebih dari 1 kali;
11. Mengeringkan strip hasil pembacaan dengan cara mengambil strip menggunakan pinset serta mengeringkannya diatas kertas saring. Menunggu sampai kering, warna strip akan terlihat setelah kering.
12. Menyimpan strip hasil pembacaan.

C. Pembacaan Hasil

Berdasarkan hasil uji WB yang dilakukan pada sampel maka akan diperoleh pola distribusi antigen *Aspergillus* (Gambar 1.).



Gambar 1. Hasil pembacaan IgG Asp. Metode WB

Interpretasi hasil:

Positif : timbul/tampak ≥ 2 pita antara P 16, P 18-20, P 22, dan P30

Negatif : tidak muncul pita sama sekali, atau pita yang muncul < 2

Referensi

1. Salzer HJF, Heyckendorf J, Kalsdorf B, Rolling T, Lange C. Characterization of patients with chronic pulmonary aspergillosis according to the new ESCMID/ERS/ECMM and IDSA guidelines. *Mycoses*. 2017;136-42. doi: 10.1111/myc.12589
2. Takazono T, Izumikawa K. Recent advances in diagnosing Chronic Pulmonary Aspergillosis. *Front. Microbiol.* 2018;9:1–7. doi.org/10.3389/fmicb.2018.01810
3. Bongomin F, Harris C, Hayes G, Kosmidis C, Denning W. Twelve-month clinical outcomes of 206 patients with chronic pulmonary aspergillosis. *PLoS One*. 2018;1–17.
4. Free SJ. *Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis*. Elsevier Inc.; 2013. p.33-82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>