

TERAKREDITASI
SK.No. 26/DIKTI/Kep/2005

ISSN: 1412-1433



JURNAL
BIOSAINS
PASCASARJANA

Volume 10 Nomor 2 Mei 2008

J. Biosains Pascasarjana	Vol. 10	No. 2	Hlm. 63-115	Surabaya Mei 2008	ISSN 1412-1433
-------------------------------------	----------------	--------------	--------------------	------------------------------	---------------------------

Download PDII-LIPI: www.pdii.lipi.go.id/jurnal.html

Nilai Diagnostik Modifikasi Autologous Serum Skin Test pada Urtikaria Autoimun

(Diagnostic Value of Modified Autologous Serum Skin Test in Autoimmune Urticaria)

M. Athuf Thaha*

ABSTRACT

There is an urgent need to find reliable and relevant diagnostic tools for patients with autoimmune urticaria especially in a developing country such as Indonesia. The basophil histamine release assay (HRA) is currently the "gold standard" for detecting functional autoantibodies in serum of patients with chronic urticaria. However, this bioassay is difficult to standardize because it requires fresh basophils from healthy donors, is not widely commercially available, and is time consuming. The detection of patients with autoantibodies using in vivo autologous serum skin test (ASST) also posses challenges. Firstly, the ASST is at the best as due to around 80% its sensitivity and specificity using in vitro HRA as the "gold standard", and secondly, there is some divergence results obtained by different methods used to detect patients with autoantibodies, due to inconsistency in methods, results and interpretation of the ASST in the literatures.

The purpose of this study was to find out and develop a new method of ASST. This new method should be practical and with higher reliability (sensitivity and specificity) as a diagnostic tool for autoimmune urticaria. The method used in this study was to perform a preliminary study followed by advanced study through cross sectional designs. The results of this study showed that the new ASST, has a higher reliability than the former ASST methods reported in literatures. In addition, we also found that disease severity with cut-off value of < 12, could be used as an adjunct to detect patients with positive functional autoantibodies. And last, we also report with pride that we have now the ability to perform HRA which was never done before.

Key words: histamine release assay, autologous serum skin test, functional autoantibodies

PENDAHULUAN

Urtikaria merupakan kelainan kulit yang umum dijumpai. Berdasarkan data kepublikan, kisaran 15–20% populasi akan mengalami episode urtikaria paling tidak 1 kali dalam hidupnya, dan diperkirakan 25% dari mereka akan menderita urtikaria kronis (UK). Kisaran 80–90% kasus UK penyebabnya belum dapat diidentifikasi sehingga dinamai urtikaria kronis ‘idiopatik’ (UKI). Penyakit ini masih menyisakan tantangan utama, terutama dalam identifikasi penyebab, diagnosis, dan penatalaksanaannya, walaupun telah terdapat kemajuan berarti dalam pemahaman mengenai urtikaria kronis (Docrat, 2006). Sejak 20 tahun terakhir, diketahui sebanyak 60% kasus UKI atau 30% kasus UK ternyata disebabkan oleh proses autoimunitas sehingga dinamai urtikaria autoimun (UO) (Sheikh, 2005; Sabroe dan Greaves, 2006). Pasien UO memiliki

autoantibodi IgG (subtipe IgG1/IgG3) sebagai faktor pelepas histamin (*histamine releasing factors*) dalam sirkulasi, yaitu autoantibodi anti-Fc ϵ RI α dan/atau anti-IgE (Fiebiger *et al.*, 1998). Autoantibodi tersebut sebagian besar (30–40%) terikat pada rantai- α reseptor IgE berasifitas tinggi (Fc ϵ RI α), dan sebagian kecil (5–10%) terikat pada IgE yang terdapat pada permukaan mastosit dan sel basofil (Fux, 2005).

Pemeriksaan HRA, sampai saat ini merupakan baku emas diagnosis UO karena asai tersebut merupakan satunya asai *in vitro* yang dapat mengidentifikasi sekaligus fungsionalitas dari anti-Fc ϵ RI α dan anti-IgE yang terdapat dalam serum pasien UKI. Kelemahan pemeriksaan HRA, selain sulit distandardisasi, asai tersebut tidak praktis/sulit dilakukan karena memerlukan sel basofil segar dari darah donor sehat (Sabroe *et al.*, 1999), memerlukan waktu yang

* Bagian ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang

lama untuk memperoleh hasil, dan biaya yang lumayan besar (**Grattan et al.**, 2002).

Berdasarkan hal tersebut di atas, sangat diperlukan sarana diagnostik alternatif UO yang mudah, cepat dan praktis, cukup akurat, dan sekaligus murah terutama untuk negara berkembang seperti Indonesia.

Pemeriksaan *in vivo* ASST, seperti halnya pemeriksaan *in vitro* HRA, bertujuan mendeteksi adanya autoantibodi fungsional dalam serum pasien UKI. Uji kulit ini merupakan uji klinis prediktif yang dapat dipercaya dan merupakan uji klinis *in vivo* terbaik saat ini untuk mendeteksi aktivitas pelepas histamin yang terdapat dalam serum autolog terhadap mastosit kulit (**Sabroe et al.**, 1999).

Keuntungan utama tes kulit ini, yaitu derajat kepraktisannya yang tinggi sehingga dapat dilaksanakan di samping tempat tidur penderita, dan dengan biaya yang relatif murah sehingga amat tepat untuk dipakai di negara sedang berkembang seperti Indonesia. Kelemahan pemeriksaan ASST adalah belum ada metode/teknik yang baku (**Di Lella et al.**, 2004), masing-masing peneliti menggunakan teknik yang berbeda dalam menilai positivitas ASST. Sebagai akibatnya, penelitian yang dilakukan selama ini, menghasilkan sensitivitas dan spesifitas ASST bervariasi antara peneliti yang satu dan peneliti yang lain (**Nettis et al.**, 2002).

Permasalahan tersebut di atas mendorong peneliti untuk mengembangkan suatu sarana diagnostik ASST yang baru, yang merupakan modifikasi dari ASST lama. Pengalaman di klinik dengan menggunakan ASST yang baru ini memberi kesan bahwa sarana diagnostik ini memberikan hasil yang lebih baik dari pada ASST peneliti sebelumnya.

MATERI

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik laboratorik dengan desain potong lintang. Penelitian ini terdiri atas penelitian pendahuluan dan penelitian lanjutan/utama.

Sesuai dengan konsep penelitian, maka untuk mencapai tujuan penelitian utama, perlu dilakukan penelitian pendahuluan untuk mengembangkan sarana diagnostik ASST baru yang sensitivitas dan spesifitas Dx-nya lebih baik, dan mencari upaya yang tepat dan standar agar dapat melakukan pemeriksaan HRA yang belum pernah dilakukan di Indonesia dan yang sangat diperlukan untuk menguji keandalan sarana diagnostik ASST baru.

Penelitian pendahuluan meliputi tahapan berikut. Mencari cara pemeriksaan HRA yang tepat dan baku: Cara pemisahan sel basofil dari darah donor sehat yang tepat dan

baku; Cara pelepasan histamin *stimulated*, spontan, dan total yang tepat dan baku; Cara pembuatan kurva baku dan persamaan linear. Tahapan pengembangan uji ASST baru dan pengujian pendahulunya secara klinis: Meneliti ulang ASST peneliti sebelumnya (Goryachkina, Fagiolo, Platzer, Toubi, Altman, dan Sabroe); Meneliti sensitivitas dan spesifitas semua parameter yang menentukan positivitas ASST, secara tunggal maupun kombinasi; Meneliti variabel yang belum pernah dipakai sebelumnya (diameter *weal* serum dan *weal* salin pada 0 menit); Merangkum hasil ASST peneliti sebelumnya dan hasil ASST peneliti, menghasilkan ASST teoretis baru; Menentukan sensitivitas Dx dan spesifitas Dx ASST teoritik baru; Membuat kesimpulan dalam bentuk ASST operasional baru.

Hasil penelitian pendahuluan, selanjutnya dipakai pada penelitian utama untuk menentukan nilai diagnostik ASST baru dengan baku emas HRA, menilai Sn Dx dan Sp Dx variabel derajat keparahan klinis dengan baku emas HRA, dan meneliti hubungan antara variabel derajat keparahan klinis dan ASST baru.

Subjek penelitian. Pada penelitian pendahuluan, pemeriksaan ASST dilakukan terhadap 34 pasien UKI, dan pada penelitian utama dilakukan pada 79 pasien UKI. Semua sampel penelitian berasal dari pasien yang berobat jalan pada Subbagian Alergi-Imunologi, poliklinik Dept. Kulit dan Kelamin, RSUP Palembang.

Semua pasien UKI, tidak mengkonsumsi antihistamin 2 hari menjelang pemeriksaan ASST. Imunosupresan tidak dikonsumsi minimal 2 bulan sebelum ASST, dan semua pasien berusia ≥ 18 tahun.

Penelitian ini telah dinyatakan layak etik untuk dilaksanakan oleh Unit Bioetika dan Humaniora, FK Unsri, Palembang.

Teknik ASST. Darah vena sampel penelitian ditampung dalam tabung gelas steril tanpa *clotting accelerator*, diamkan membeku pada suhu kamar selama 30 menit. Serum diperoleh dengan sentrifugasi pada 2500 rpm selama 15 menit, untuk selanjutnya dibagi ke dalam beberapa aliquots untuk pemeriksaan ASST dan HRA.

Sampel serum autolog, histamin (10 $\mu\text{g/ml}$), dan salin steril (0,9%), masing-masing 50 μl , disuntikkan intradermal dengan jarak 5 cm pada bagian volar lengan bawah yang bebas lesi urtika minimal 24 jam.

Waktu pembacaan respons *weal* dan *flare* pada lokasi suntikan histamin, serum, dan salin disesuaikan dengan metode tiap peneliti. Pengukuran *weal* dan *flare* akibat serum dikoreksi dengan nilai *weal* dan *flare* akibat salin dan/atau histamin tiap subjek. Perubahan warna *weal* akibat serum pada pembacaan 30 menit dibandingkan dengan

perubahan warna *weal* akibat salin, dan diberi skor 0: bila warna *weal* akibat serum sama dengan warna *weal* akibat salin (*skin coloured* atau *pink*); skor 1: bila warna *weal* akibat serum adalah *pink* sedangkan warna *weal* akibat salin adalah *skin coloured*; dan skor 2: bila warna *weal* akibat serum adalah merah.

Kriteria positif ASST mengikuti kriteria masing-masing peneliti.

Pemeriksaan HRA. Metode pemeriksaan HRA yang akan dipakai dalam penelitian ini diperoleh melalui rangkaian penelitian ulang berbagai metode HRA yang dilakukan peneliti sebelumnya. Penelitian ini memakai kit ELISA yang diproduksi Neogen's Corporation.

Analisis statistik. Data ASST (positif/negatif) dan HRA (positif/negatif) dianalisis untuk menentukan nilai diagnostik ASST. Data derajat keparahan klinis dan ASST baru dianalisis menggunakan analisis korelasi, dan analisis regresi logistik majemuk. Perbedaan nilai diagnostik antara 2 metode pemeriksaan ASST dianalisis menggunakan uji beda proporsi. Data derajat keparahan klinis dan HRA dianalisis untuk menentukan nilai *cut-off*, menggunakan uji diagnostik dengan HRA sebagai baku emas.

HASIL DAN DISKUSI

A. Penelitian Pendahuluan

Cara pemisahan sel basofil dari darah donor sehat. Metode pemisahan sel basofil ialah metode *dextran sedimentation*, yang dilaksanakan sebagai berikut. Enam mililiter darah vena dalam tabung BD *vacutainer* berlapis K2 EDTA 5,4 mg (3 ml) ditambah 2 ml larutan dekstran 3% (berat molekul 250.000), glukosa 3%, salin 0,15 M, dan akuades 100 ml. Campuran diinkubasi selama 45 menit pada 37°C sampai darah terpisah menjadi 3 lapisan, lapisan teratas berupa plasma, lapisan di tengah berupa *buffy coat* mengandung leukosit dan trombosit, dan lapisan terbawah berupa sedimen yang mengandung eritrosit.

Supernatan yang mengandung plasma, trombosit, dan leukosit dipisahkan dari sedimen secara hati-hati. Supernatan disentrifus pada 2500 rpm selama 5 menit sehingga terbentuk sedimen leukosit, sedangkan trombosit terpisah dalam supernatan. Selanjutnya supernatan dibuang.

Pelet leukosit ditambah 3 ml larutan 0,8% NH₄Cl untuk melisikkan eritrosit yang masih tersisa (penambahan NH₄Cl diulang 2× agar semua eritrosit mengalami lisis). Sentrifus pada 2500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang.

Endapan/pelet dicuci 2× dengan larutan 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,7 KCl, 0,4 mM NaH₂PO₄, 5 mM glukosa, dan akuades, serta disuplemen dengan 0,3% *human serum albumin* (HSA). Sentrifus pada 2500 rpm selama 5 menit, lalu buang supernatannya. Pelet diresuspensi dalam larutan yang sama tanpa HSA sehingga volume 600 µL.

Jumlah leukosit/ml dalam suspensi leukosit yang dibutuhkan adalah 2×10^5 /ml. Suspensi leukosit (2×10^5 /ml) dibagi dalam 3 tabung, masing-masing mengandung 50 µL suspensi leukosit donor sehat.

Cara memperoleh *histamine stimulated* (stiHR), histamin spontan (spoHR), dan histamin total (totHR): (1) Limapuluh mikroliter suspensi leukosit dalam tabung 1 diinkubasi selama 40 menit pada 37°C dalam 50 µL serum (pasien UKI atau non-urtikaria), selanjutnya reaksi dihentikan dengan pendinginan di atas es. Sentrifus selama 10 menit pada 3500 rpm, dan supernatan yang diperoleh diperiksa untuk menentukan *stimulated HR* (stiHR) pasien UKI/non-urtikaria, (2) Limapuluh mikroliter suspensi leukosit dalam tabung 2 ditambah 50 µL PBS, dipanaskan pada 85°C selama 40 menit. Sentrifus pada 3500 rpm selama 10 menit, dan supernatan yang diperoleh diperiksa untuk menentukan histamin total (totalHR) pasien UKI dan non-urtikaria, (3) Limapuluh mikroliter suspensi leukosit dalam tabung 3 diinkubasi selama 40 menit pada 37°C dalam 50 µL PBS, dilanjutkan dengan pendinginan di atas es. Sentrifus selama 10 menit pada 3500 rpm, dan supernatan yang diperoleh diperiksa untuk menentukan *spontaneous HR* (spoHR) pasien UKI dan non-urtikaria.

Uji ELISA kompetitif langsung memakai kit ELISA dari Neogen's Corporation. Uji ELISA kompetitif langsung dilakukan sesuai dengan petunjuk dari penghasil kit, dan nilai absorben ditentukan dengan memakai *microELISAreader* yang diset pada 450 nm.

Cara pembuatan kurva baku dan persamaan linear: (1) Nilai absorben histamin baku dikonversi ke dalam persentase ikatan maksimal (%B/Bo) dan logit, dan konsentrasi histamin baku dikonversi ke dalam logConcentration, (2) Kurva baku dan persamaan linear dibuat berdasarkan nilai logit dan logConc memakai program Excel, (3) Penghitungan stiHR, spoHR, dan totHR memakai persamaan linear yang diperoleh ($y = -599,3x + 2178,5$), (4) Persentase pelepasan histamin (%HR) donor sehat (non-urtikaria) dihitung memakai formula $[(\text{stiHR} - \text{spoHR})/\text{totHR}] \times 100$, dan penentuan *cut-off* HRA+/ $(\text{mean} + 2 \text{ SD})$, (5) Persentase pelepasan histamin (%HR) pasien UO: $\geq (\text{mean} + 2 \text{ SD})$, dan pasien UKI non-UO: $< (\text{mean} + 2 \text{ SD})$.

Pemeriksaan ASST metode Sabroe menghasilkan Sn Dx: 71,4% dan Sp Dx: 70% yang lebih baik dari metode peneliti yang lain (AUC: 0,707, +PV Dx: 39,5%, -PV Dx: 89,9%, efisiensi Dx: 70,5%), disusul metode Gory dengan Sn Dx: 92,9% dan Sp Dx: 50% (AUC: 0,714, +PV Dx: 33,7%, -PV Dx: 96,2%, efisiensi Dx: 67,6%).

Perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (2,0 mm) pada 30 menit (S30u2.0), menghasilkan

Sn Dx: 92,9% dan Sp Dx: 45% (AUC = 0,689, +PV Dx: 31,6%, -PV Dx: 95,8%, efisiensi Dx: 64,7%), disusul berturut-turut S30u2.5 dengan Sn Dx: 64,3% dan Sp Dx: 65% (AUC = 0,646, +PV Dx: 33,5%, -PV Dx: 86,9%, efisiensi Dx: 64,7%), dan S30u1.5 dengan Sn Dx: 92,9% dan Sp Dx: 10% (AUC = 0,514, +PV Dx: 22%, -PV Dx: 83,6%, efisiensi Dx: 44,1%).

Tabel 1. Sn Dx dan Sp Dx ASST metode peneliti sebelumnya

	AUC	S.E.	p	95% C.I.	Sn Dx	Sp Dx	+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
Altmann	0.500	0.102	1.0	0.324 – 0.676	100	0	21.5		1.0		
Asero	0.500	0.102	1.0	0.324 – 0.676	100	0	21.5		1.0		
Fagiolo	0.500	0.102	1.0	0.324 – 0.676	100	0	21.5		1.0		
Goryach	0.714	0.093	0.03	0.534 – 0.855	92.9	50	33.7	96.2	1.86	0.14	67.6
Platzer	0.668	0.097	0.10	0.486 – 0.819	78.6	55	32.4	90.4	1.75	0.39	64.7
Sabroe	0.707	0.093	0.04	0.527 – 0.850	71.4	70	39.5	89.9	2.38	0.41	70.6
Toubi	0.525	0.525	0.80	0.347 – 0.698	50	55	23.3	80.1	1.11	0.91	52.9

Keterangan:

AUC : *area under the Reciever Operating Characteristic (ROC) curve*

S.E. : *standard error*

p : nilai kemaknaan pada 0,05

C.I. : *confidence interval*

PV : *predictive value*

LR : *likelihood ratio*

Efis.Dx : efisiensi diagnostik (akurasi)

Tabel 2. Sn Dx dan Sp Dx ASST berdasarkan parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin pada 30 menit (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, dan 2,5 mm)

Parameter diameter	AUC	S.E.	p	95% C.I.		Sn Dx	Sp Dx	+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
				lower	upper							
S30u0.5	0.500	0.102	1.00	0.500	0.700	100	0	21.5		1.0		
S30u1.0	0.489	0.102	0.916	0.289	0.690	92.9	5	21.5		1.0		41.2
S30u1.5	0.514	0.102	0.889	0.315	0.713	92.9	10	22	83.6	1.03	0.71	44.1
S30u2.0	0.689	0.091	0.064	0.511	0.868	92.9	45	31.6	95.8	1.69	0.16	64.7
S30u2.5	0.646	0.098	0.151	0.455	0.838	64.3	65	33.5	86.9	1.84	0.55	64.7

Tabel 3. Sn Dx dan Sp Dx ASST berdasarkan parameter perubahan warna *weal* akibat serum pada 30 menit

	AUC	S.E.	p	95% C.I.		Sn Dx	Sp Dx	+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
				lower	upper							
rs0	0.50	0.10	1.0	0.3	0.7	100	0	21.5		1.0		
rs1	0.67	0.09	0.08	0.49	0.86	85.7	50	32.0	92.7	1.71	0.29	64.7
rs2	0.74	0.09	0.01	0.57	0.92	78.6	70	41.8	92.3	2.62	0.31	73.5

Parameter perubahan warna *weal* serum (merah) pada 30 menit (rs2) menghasilkan Sn Dx: 78,6% dan Sp Dx: 70% (AUC = 0,743, +PV Dx: 41,8%, -PV Dx: 92,3%, efisiensi Dx: 73,5%), lebih baik daripada parameter rs1 yang menghasilkan Sn Dx: 85,7% dan Sp Dx: 50% (AUC = 0,679, +PV Dx: 32%, -PV Dx: 92,7%, efisiensi Dx: 64,7%).

Sensitivitas dan Sp ASST berdasarkan perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (2,0 mm) pada pembacaan 30 menit (S30u2.0), menghasilkan Sn Dx: 92,9% dan Sp Dx: 45% (AUC = 0,689, +PV Dx: 31,6%, -PV Dx: 95,8%, efisiensi Dx: 64,7%), lebih baik daripada pembacaan pada 20 menit dan 40 menit. Pada pembacaan 20 (S20u2.0) Sn Dx dan Sp Dx yang diperoleh adalah 57,1% dan 40% (AUC: 0,48, +PV Dx: 22,7%, -PV Dx: 79,3%, efisiensi Dx: 47%), dan pada 40 menit (S40u2.0)

diperoleh Sn Dx: 42,9% dan Sp Dx: 40% (AUC: 0,41, +PV Dx: 28,1%, -PV Dx: 83,6%, efisiensi Dx: 41,1%).

Parameter tunggal, yaitu perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin pada 0 dan 30 menit (1,5 mm) menghasilkan Sn Dx dan Sp Dx masing-masing 85,7% dan 55% (AUR: 0,704, +PV Dx: 34,3%, -PV Dx: 93,4%, efisiensi Dx: 67,6%).

Pemeriksaan ASST berdasarkan kombinasi parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin ($\geq 1,5$ mm) pada 0 dan 30 menit, dan parameter warna *weal* akibat serum merah pada 30 menit (S030u1.5rs2) menghasilkan Sn Dx: 78,6% dan Sp Dx: 95% terbaik (AUR: 0,868, +PV Dx: 81,1%, -PV Dx: 94,6%, efis. Dx: 88,2%), disusul dengan S30u2.0rs2 (71,4% dan 85%, AUR: 0,782, +PV Dx: 56,6%, -PV Dx: 91,6%, efis. Dx: 79,4%), dan S30u1.5rs2 (71,4 dan 70%, AUC = 0,707, +PV Dx: 39,5%, -PV Dx: 89,9%, efis. Dx: 70,6%).

Tabel 4. Sn Dx dan Sp Dx ASST berdasarkan waktu pembacaan (20, 30, dan 40 menit) perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (1,5 mm dan 2,0 mm)

Parameter Waktu	AUC	S.E.	p	95% C.I.		Sn Dx	Sp Dx	+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
				lower	upper							
S30u2.0	0.68	0.09	0.06	0.511	0.868	92.9	45	31.6	95.8	1.69	0.16	64.7
S20u2.0	0.48	0.10	0.88	0.286	0.696	57.1	40	22.7	79.3	1.07	0.95	47
S40u2.0	0.41	0.10	0.40	0.217	0.612	42.9	40	28.1	83.6	1.43	0.71	41.1
S30u1.5	0.51	0.10	0.88	0.315	0.713	92.9	10	22	83.6	1.03	0.71	44.1

Tabel 5. Sn Dx dan Sp Dx ASST berdasarkan perbedaan parameter diameter *weal* akibat serum-*weal* akibatsalin pada 0 dan 30 menit

Parameter O menit	AUC	S.E.	p	95% C.I.		Sn Dx	Sp Dx	+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
				lower	upper							
Sdsg030u1.5	0.704	0.09	0.04	0.526	0.882	85.7	55	34.3	93.4	1.9	0.26	67.6
Sdsg030u2.0	0.657	0.09	0.12	0.469	0.846	71.4	60	32.8	88.5	1.79	0.48	64.7

Tabel 6. Sn Dx dan Sp Dx ASST berdasarkan kombinasi parameter Sdsg030u1.5 - rs2 (S030u1.5rs2), S30u2.0rs2, dan S30u1.5rs2

ASST teoristik baru	AUR	S.E.	p	Sn Dx	Sp Dx	95% C.I.		+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
						lower	upper					
1 S030u1.5rs2	0.86	0.07	0.000	78.6	95	0.726	1.009	81.1	94.6	15.71	0.23	88.2
2 S30u2.0rs2	0.78	0.08	0.006	71.4	85	0.614	0.950	56.6	91.6	4.76	0.34	79.4
3 S30u1.5rs2	0.70	0.09	0.042	71.4	70	0.525	0.889	39.5	89.9	2.38	0.41	70.6

Penjelasan.

- S030u1.5rs2 adalah kombinasi parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (1,5 mm) pada 0 dan 30 menit dan parameter warna *weal* akibat serum (merah).
- S30u2.0rs2 adalah kombinasi parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (2,0 mm) pada 30 menit dan parameter warna *weal* akibat serum (merah).
- S30u1.5rs2 adalah kombinasi parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (1,5 mm) pada 30 menit dan parameter warna *weal* akibat serum (merah).

Sarana diagnostik ASST operasional baru yang ditemukan ialah S030u1.5rs2, karena jauh lebih baik daripada S30u2.0rs2 dan S30u1.5rs2 (nilai AUC, +PV Dx, -PV Dx, dan efis. Dx lebih baik).

Kriteria ASST positif. Pemeriksaan ASST baru yang dipakai peneliti disebut positif bila kombinasi perbedaan diameter *weal* akibat serum-diameter *weal* akibat salin pada 0 dan 30 menit \geq 1,5 mm dan warna *weal* akibat serum sama dengan warna *weal* akibat histamin pada 30 menit (merah).

B. Penelitian Utama

Sensitivitas Dx dan spesifikasi Dx ASST baru adalah 82,4% dan 93,5% (AUC = 0,880, +PV Dx: 77,8, -PV Dx: 95,1, +LR: 12,76, efis.Dx: 91,1) (lihat Lampiran 12); S30u1.5rs2, 70,6% dan 71% (AUC = 0,708, +PV Dx: 48,0, -PV Dx: 89,8, +LR: 2,43, efis.Dx: 70,9%), dan S30u2.0rs2, 58,8% dan 77,4% (AUC = 0,648, +PV Dx: 41,6, -PV Dx: 87,3, +LR: 2,61, efis.Dx: 73,4).

Keterangan:

S030u1.5rs2: Sarana Dx ASST baru, yang memakai kombinasi parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin pada 0 dan 30 menit, dan warna *weal* serum pada 30 menit.

S30u1.5rs2 dan S30u2.0rs2: adalah sarana Dx ASST teoretis baru yang ditemukan pada penelitian pendahuluan.

Tabel 8. Hasil uji beda proporsi antara Sn Dx ASST baru dan Sn Dx S30u1.5rs2 (ASST Sabroe), memakai program EpiCalc.

Proporsi Sn dan besar sampel	Z score	95% C.I.	p – value (one – sided)	p – value (two – sided)
ASST baru (82.4%, 79) vs S30u1.5rs2 (70.6%, 79)	1.56	11.8%	0.05	0.11

Keterangan.

Uji beda proporsi antara Sn Dx ASST baru dan Sn Dx S30u1.5rs2 (skor Z: 1.56, p = 0,05), menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna.

Tabel 9. Hasil uji beda proporsi antara Sp Dx ASST baru dan Sp Dx S30u1.5rs2 (ASST Sabroe).

Proporsi Sp dan besar sampel	Z score	95% C.I.	p – value (one – sided)	p – value (two – sided)
ASST baru (93.5%, 79) vs S30u1.5rs2 (71%, 79)	3.49	22.5%	0.000	0.000

Uji beda antara Sp Dx ASST baru dan Sp Dx ASST Sabroe penelitian (skor Z = 3.49, p < 0,000), menunjukkan ada perbedaan bermakna.

Variabel derajat keparahan klinis merupakan penjumlahan 7 nilai variabel: diameter dan jumlah urtika, keluhan gatal, distribusi lesi urtika, angioedema, pemicu urtika, faktor atopi, dan keluhan sistemik. Rentang skor derajat keparahan klinis adalah 3–24.

Tabel 7. Sensitivitas Dx dan Sp Dx ASST baru (S030u1.5rs2), S30u1.5rs2 (cara Sabroe), dan S30u2.0rs2, dengan baku emas HRA, memakai program SPSS dan MedCalc.

	AUC	S.E.	p	95% C.I.		Sn Dx	Sp Dx	+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
				lower	Upper							
S030u1.5rs2	0.88	0.05	0.000	0.767	0.992	82.4	93.5	77.8	95.1	12.76	0.19	91.1
S30u1.5rs2	0.70	0.07	0.009	0.566	0.850	70.6	71.0	40	89.8	2.43	0.41	70.9
S30u2.0rs2	0.68	0.07	0.023	0.530	0.833	58.8	77.4	41.6	87.3	2.61	0.53	73.4

Tabel 10. Sensitivitas Dx dan spesifisitas Dx variabel derajat keparahan klinis (skala kontinu) dengan baku emas HRA.

Cut-off	SnDx	SpDx	AUC	S.E.	p	95% C.I.		+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis Dx
						upper	lower					
12	76.5	74.2	0.753	0.058	0.001	0.620	0.887	44.8	92.0	2.96	0.32	74.7

Sensitivitas Dx dan Sp Dx variabel derajat keparahan klinis pada *cut-off* 12, ialah 76,5% dan 74,2% (AUC = 0,753, p = 0,001, +PV Dx: 44,8%, -PV Dx: 92%, efis.Dx: 74,7%).

Tabel 11. Hasil uji beda proporsi antara Sn Dx variabel derajat keparahan klinis dan Sn Dx variabel ASST baru, menggunakan program EpiCalc2000.

Proporsi Sn dan besar sampel	Z score	p-value (one-sided)	p-value (two-sided)	95% C.I.
Derajat keparahan klinis (76,5%, 79 pasien) vs ASST baru (82,4%, 79 pasien)	0.72	0.235	0.471	-7.93 to 19.73

Tidak terdapat perbedaan kemaknaan antara Sn Dx keparahan klinis dan Sn Dx ASST baru ($z = 0.72$ ($p > 0,05$, 95% C.I.: -7.93 sampai 19.73))

Tabel 12. Hasil uji beda proporsi antara Sp Dx variabel keparahan klinis dan Sp Dx variabel ASST baru, menggunakan program EpiCalc2000.

Proporsi Sp dan besar sampel	Z score	p-value (one-sided)	p-value (two-sided)	95% C.I.
Sp keparahan klinis (74,2%, 79 pasien) vs Sp ASST baru (93,5%, 79 pasien)	3.08	0.001	0.002	6.96 to 31.64

Terdapat perbedaan kemaknaan antara Sp derajat keparahan klinis dan Sp ASST ($z = 3.08$ ($p < 0,05$, 95% C.I.: 6.96 sampai 31.64)).

Pemeriksaan HRA dipakai dalam penelitian ini karena sampai saat ini masih merupakan baku emas untuk mendeteksi autoantibodi fungsional di dalam serum pasien UKI (Fiebiger *et al.*, 1998), karena pemeriksaan *in vitro* lainnya, seperti *immunoblot*, dan *flow cytometry* tidak dapat membedakan apakah autoantibodi tersebut fungsional atau tidak. Selain itu, pemeriksaan penurunan jumlah sel basofil dengan *flow cytometry* (Grattan *et al.*, 1997), pemeriksaan petanda aktivasi sel basofil CD63 (Wedi *et al.*, 2000) dan CD203a, masih memerlukan validasi.

Metode pemisahan leukosit donor sehat yang berhasil dilakukan peneliti, diawali dengan inkubasi darah EDTA donor sehat dalam larutan 3% dekstran (BM 250.000), dilanjutkan dengan sentrifugasi, dan penambahan amonium klorida untuk melisikan eritrosit yang tersisa. Komposisi larutan dekstran 3% BM 250.000, dan penambahan amonium klorida yang dipakai pada penelitian ini menghasilkan jumlah leukosit yang cukup untuk pemeriksaan ELISA, dan suspensi leukosit tersebut bebas dari eritrosit. Percobaan memakai komposisi larutan dekstran dengan BM berbeda, tidak berhasil memperoleh jumlah leukosit yang memadai.

Proses pelisikan eritrosit memakai larutan salin hipotonik, larutan akuades dan 10xPBS (San Diego 2006), dan akuades dikombinasikan dengan *light vortexing* menghasilkan suspensi leukosit yang belum bebas dari eritrosit. Setelah proses pelisikan eritrosit, dilanjutkan dengan pencucian dengan larutan bufer (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,7 KCl, 0,4 mM NaH₂PO₄, 5 mM glukosa, dan akuades), yang disuplemen dengan 0,3% HSA, sentrifugasi (2500 rpm selama 5 menit), dan diresuspensi (dalam bufer yang sama, tanpa HSA), lalu dilakukan penghitungan dan penyesuaian jumlah leukosit memakai bantuan mikroskop cahaya, dan jumlah sel yang diperoleh dimasukkan dalam formula Hudson, sehingga menjadi 2×10^5 sel/ml. Jumlah sel/ml tersebut sesuai dengan spesifikasi kit ELISA yang dipakai dalam penelitian ini. Metode pemisahan sel basofil yang dipakai dalam penelitian ini tidak memakai metode pemurnian sel basofil dengan Percoll *density gradients* atau *elutriation* dan *negative selection* dengan *magnetic beads*, karena kedua cara tersebut hanya dipakai pada penelitian sekresi *interleukin* sel basofil atau pada penelitian *intracellular signaling events* sel basofil. Selain

itu, walaupun sel basofil bercampur dengan sel leukosit lain, campuran sel tersebut tidak memengaruhi pemeriksaan HRA karena histamin hanya terdapat dalam granul sel basofil.

Suspensi sel basofil selanjutnya dibagi dalam 3 tabung, tabung 1 diinkubasi dengan serum pasien UKI atau serum orang sehat selama 40 menit pada 37°C, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 3500 rpm selama 10 menit, untuk mendapatkan supernatan yang mengandung *stimulated histamine* sampel penelitian atau *stimulated histamine* sampel orang sehat, tabung 3 diinkubasi dengan PBS selama 40 menit pada 37°C, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 3500 rpm selama 10 menit, untuk mendapatkan supernatan yang mengandung *spontaneous histamine*, dan tabung 2 diinkubasi dengan PBS, dilanjutkan dengan pemanasan pada 85°C selama 40 menit untuk mendapatkan supernatan yang mengandung *total histamine*. Metode pemanasan pada 85°C selama 40 menit dipakai dalam peneliti karena menghasilkan nilai absorben terkecil dibandingkan metode pendidihan (Tong *et al.*, 1997), pemanasan pada 60°C, dan metode *repeated thawing and freezing* (Wedi *et al.*, 2000). Selain itu, metode yang dipakai peneliti menghasilkan nilai absorben yang hampir tidak berbeda dengan yang dihasilkan metode *ultrasonic disintegrator* dengan *ice cold jacket* yang merupakan baku emas untuk memperoleh histamin total.

Kit ELISA Neogen's Corporation, Amerika Serikat dipakai dalam penelitian ini karena kit tersebut dipakai secara luas di Prancis, Inggris, Kanada, Amerika, dalam berbagai penelitian penghitungan kadar histamin. Antibodi monoklonal terhadap histamin telah dilapiskan pada permukaan sumuran lempengan polistiren oleh perusahaan sehingga terjamin kemurnian maupun distribusinya pada dinding sumuran dari lempengan. Spesifikasi performan kit (limit kuantifikasi, rentangan kuantifikasi, presisi inter-asai dan intra-asai) menunjukkan keandalan kit mendekripsi histamin.

Pembuatan kurva baku penelitian ini (penghitungan %B/B₀, logit, dan logConc), dan pembuatan persamaan linear (model *log-logit curve fitting*) berdasarkan kurva baku, mengikuti petunjuk penghasil kit ELISA.

Pemisahan serum autolog dari darah sampel UKI dilakukan secara standar mengikuti pedoman *Laboratory Corporation of America® Holdings and Lexi-Comp Inc.* (2007), dan sesuai dengan persyaratan penyakit yang diteliti (darah diambil waktu penyakit aktif). Prosedur baku pemisahan serum tersebut menghindarkan kemungkinan pelepasan C5a dan bradikinin yang dapat pula memicu pelepasan histamin dari mastosit. Peneliti tidak memakai

anti-FcεRIα fungsional sebagai pengganti serum, karena sampai saat ini belum ada sarana untuk memperoleh anti-FcεRIα fungsional.

Pembacaan diameter *weal* akibat serum dan salin dilakukan pada 0 dan 30 menit. Waktu dan alasan pembacaan pada 0 menit tersebut adalah hasil pengamatan peneliti selama penelitian ini berlangsung. Pada pengamatan selama penelitian, ternyata diameter akibat suntikan serum, salin, dan histamin pada 0 menit tidak selalu sama walaupun volume serum, salin, dan histamin telah diukur dengan cermat. Pada 0 menit, edema akibat suntikan salin dan serum terjadi bukan oleh proses imunologis, tetapi oleh pengaruh volume cairan yang disuntikkan. Pada pembacaan 30 menit, terjadi absorpsi cairan pada lokasi suntikan serum dan salin sehingga perbedaan diameter antara kedua lokasi hanya disebabkan proses imunologis (lokasi serum mengandung bahan imunologis, sedangkan lokasi salin tidak). Peneliti berpendapat apabila perbedaan diameter pada 0 menit tersebut tidak diperhitungkan, akan memengaruhi perbedaan diameter pada 30 menit. Pembacaan pada 30 menit dipakai dalam penelitian ini, karena hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa pembacaan pada 20 dan 40 menit menghasilkan Sn dan Sp ASST yang jauh lebih kecil dibandingkan pada pembacaan 30 menit. Demikian pula, pemilihan parameter warna *weal* akibat serum pada 30 menit (merah), karena menghasilkan Sn dan Sp yang lebih baik dibandingkan dengan perubahan warna merah muda.

Variabel derajat keparahan klinis mempunyai skala kontinu (3–24), dan variabel ASST baru (S030u1.5rs2) berskala binomial. Uji Kolmogorov-Smirnov (*one sample*) terhadap variabel S030u1.5rs2 dan DerKepKlin, menunjukkan data variabel S030u1.5rs2 tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$), sedangkan data variabel derajat keparahan klinis terdistribusi normal ($p \geq 0,05$). Analisis korelasi Spearman antara kedua variabel menunjukkan adanya korelasi positif bermakna (0,509).

Uji diagnostik menggunakan kurva ROC untuk menentukan Sn Dx dan Sp Dx variabel DerKepKlin dengan HRA sebagai baku emas, dapat dilakukan karena skala variabel DerKepKlin adalah kontinyu. Nilai *cut-off* (12) derajat keparahan klinis diperoleh pada kombinasi Sn Dx dan Sp Dx derajat keparahan klinis yang optimal (76,5% dan 74,2%, efis.Dx: 74,7%).

Sarana diagnostik ASST baru yang ditemukan pada penelitian pendahuluan dan dipakai pada penelitian utama ini adalah penambahan parameter perbedaan diameter *weal* serum-*weal* salin pada 0 menit, selain parameter perbedaan diameter *weal* serum-*weal* salin pada 30 menit

dan parameter perubahan warna *weal* serum pada 30 menit (S030u1.5rs2).

Sensitivitas Dx dan Sp Dx parameter kombinasi S030u1.5rs2 yang ditemukan peneliti pada penelitian pendahuluan, menghasilkan Sn Dx dan Sp Dx (78,6% dan 95%, AUC = 0,868, +PV Dx: 81,1%, efis.Dx: 88,2%), lebih tinggi daripada hasil penelitian memakai metode Sabroe, S30u1.5rs2 (71,4% dan 70%, AUC = 0,707, +PVDx: 39,5%, efis.Dx: 70,6%), dan penelitian Sabroe sendiri (65% dan 81%).

Hasil di atas menunjukkan peningkatan Sn Dx dan Sp Dx dari sarana diagnostik ASST yang signifikan sehingga kesalahan mendeteksi pasien UO maupun kesalahan mendeteksi pasien yang bukan UO akan makin kecil. Dampaknya bagi pasien, adalah makin banyak pasien UO dapat segera diobati, dan makin kecil kemungkinan pemberian obat spesialistik terhadap pasien urtikaria yang bukan UO.

Upaya yang dilakukan pada penelitian pendahuluan telah berhasil mendapatkan cara melakukan pemeriksaan HRA yang tepat dan standar yang belum pernah dilakukan di Indonesia dan yang sangat diperlukan untuk menguji keandalan sarana diagnostik ASST baru. Perbedaan utama cara pemeriksaan HRA peneliti dari metode pemeriksaan HRA sebelumnya ialah pada proses mendapatkan histamin total memakai metode pemanasan pada 85° C selama 40 menit.

Keberhasilan pemeriksaan HRA merupakan nilai tambah penelitian. Selama ini pemeriksaan tersebut belum pernah dilakukan di Indonesia.

Penelitian ini mendapatkan nilai *cut-off* derajat keparahan klinis sebesar 12 pada Sn Dx dan Sp Dx variabel derajat keparahan klinis yang optimal, yaitu 76,5% dan 74,2% (AUC = 0,803, 95% C.I.: 0,698 – 0,884, +PV: 44,8%, +LR: 2,96, efis. Dx: 74,7%).

Uji beda proporsi (Sn Dx dan Sp Dx variabel derajat keparahan klinis dan sarana diagnostik ASST baru), menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan dalam Sn Dx ($z = 0,72$, $p > 0,05$), tetapi berbeda secara signifikan dalam Sp Dx ($z = 3,08$, $p < 0,05$). Perbedaan kemaknaan tersebut menunjukkan bahwa perubahan nilai *cut-off* derajat keparahan klinis (< 12) akan berpengaruh terhadap deteksi pasien urtikaria dengan autoantibodi positif, tetapi tidak dapat diandalkan dalam mendeteksi pasien dengan autoantibodi negatif.

Secara khusus, penemuan sarana diagnostik ASST baru yang lebih sensitif dan spesifik, dan penemuan

nilai *cut-off* variabel derajat keparahan klinis (12), akan lebih menguntungkan pasien UKI dari segi biaya yang dikeluarkan karena tidak memerlukan pemeriksaan HRA yang biayanya mahal.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Metode ASST yang baru mempunyai sensitivitas Dx dan spesifisitas Dx yang tinggi sehingga bisa diklasifikasikan sebagai sarana diagnostik yang andal untuk mendeteksi UO.

Spesifisitas Dx yang berbeda secara bermakna menunjukkan bahwa perubahan nilai *cut-off* derajat keparahan klinis (< 12) dapat diandalkan untuk mendeteksi pasien urtikaria dengan autoantibodi positif, tetapi tidak dapat diandalkan mendeteksi pasien dengan autoantibodi negatif.

Metode pemeriksaan HRA yang selama ini belum dapat dilakukan oleh pusat pendidikan, khususnya bidang dermatologi di Indonesia, bahkan di Asia Tenggara, merupakan asai yang andal sebagai baku emas untuk diagnosis UO. Penemuan metode ASST baru dan metode pelaksanaan pemeriksaan HRA, tidak diragukan lagi telah membantu pengembangan Ilmu Pengetahuan dan teknologi kedokteran, terutama dalam pemeriksaan penunjang urtikaria autoimun, yang belum pernah dikerjakan di Indonesia.

Saran

Perlu dilakukan penyebarluasan hasil temuan penelitian ke pusat pendidikan dermatologi di seluruh Indonesia, sehingga dapat memberikan keuntungan ganda, baik bagi pasien urtikaria otoimun, maupun bagi penentu kebijakan dalam hal ini pemerintah. Pasien diuntungkan karena diagnosis segera diketahui, sehingga menghemat biaya untuk pengobatan yang sia-sia. Di lain pihak, pemerintah dapat mengoptimalkan efisiensi kerja pegawai yang sebelumnya sering tidak bekerja akibat penyakitnya.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang lebih luas dengan melibatkan lebih banyak sampel penelitian dari berbagai daerah di Indonesia (melalui penelitian multisenter), dan dengan mempertimbangkan perbedaan faktor suku dan etnis tiap tempat, untuk mencari teknik yang lebih baik sehingga sarana diagnostik ASST yang ditemukan lebih andal tidak hanya spesifisitas diagnostiknya, tetapi juga sensitivitas diagnostiknya.

DAFTAR PUSTAKA

- Di Lella E, Agostinelli D, Brunelli L, Stingeni L, dan Lisi P**, 2004. The intradermal autologous serum skin test: possible interfering factors. Societa' Italiana di Dermatologia Allergologica Professionale Ambientale (SIDAPA) 58: 12–5.
- Docrat ME**, 2006. Skin Focus. Curr Allergy Clin Immunol 19: 145–50.
- Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, dan Maurer D**, 1998. Anti -Fce RI α Autoantibodies in Autoimmune - mediated Disorders. Identification of a Structure- Function Relationship. J. Clin. Invest. 101: 243–51.
- Grattan CE, Walpole D, Niimi N**, 1997. Flow cytometric analysis of basophil numbers in Chronic urticaria: basopenia is related to serum histamine releasing activity. Clin Exp Allergy 27: 1417–24.
- Grattan CEH, Sabroe RA, Greaves MW**, 2002. Chronic urticaria. Continuing Medical Education. J Am Acad Dermatol. 46: 645–57.
- Nettis E, Dambra P, D'Oranzio L**, 2002. Reactivity to autologous serum skin test and clinical features in chronic idiopathic urticaria. Clin Exp. Dermatol. 27: 29–31.
- Sabroe RA, Grattan CEH, Francis DM**, 1999. The autologous serum skin test: a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. Brit J Dermatol 140: 446–52.
- Sabroe RA dan Greaves MW**, 2006. Chronic idiopathic urticaria with functional auto-antibodies: 12 years on. Br J Dermatol 154: 813–9.
- Sheikh J**, 2005. Autoantibodies to the High-affinity IgE Receptor in Chronic Urticaria. How important are they ? Curr Opin Allergy Clin Immunol 5(5): 403–7.
- Tong LJ, Balakrishnan G, Kochan JP**, 1997. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. J Allergy Clin Immunol 99: 461–5.
- Wedi B, Novacovic V, Koerner M, Kaap A**, 2000. Chronic urticaria serum induces histamine release, leukotriene production, and basophil CD63 surface expression — Inhibitory effects of anti - inflammatory drugs. Dermatologic and Ocular diseases. J Allergy Clin Immunol 105: 552–60.