

BAB V

HASIL PENELITIAN

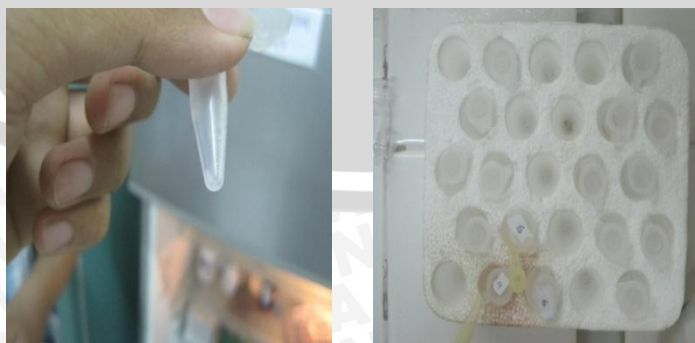
5.1. Pengambilan Sampel Saliva di Ruang Anak RS dr Saiful Anwar, Malang



Gambar 5.1. Peneliti Mengambil Sampel Saliva Anak Penderita Demam Berdarah Dengue

Pengambilan sampel saliva dilakukan di Ruang Anak RS dr Saiful Anwar, Malang. Pengambilan sampel saliva dimulai dengan penjelasan penelitian kepada orang tua anak yang akan diambil sampel salivanya, mengisi informed consent and penanda tangan informed consent oleh orang tua penderita yang diambil sampel saliva. Jumlah penderita yang diambil salivanya sebagai sampel dalam penelitian ini adalah 20 orang, dimulai bulan April-Agustus 2011.

5.2. Isolasi Protein sIgA dari Saliva Anak Penderita DBD



Gambar 5.2. Kristal yang Merupakan Presipitat sIgA Saliva

Setelah mendapatkan sampel saliva, saliva disentrifugasi untuk mendapatkan presipitat slgA saliva.

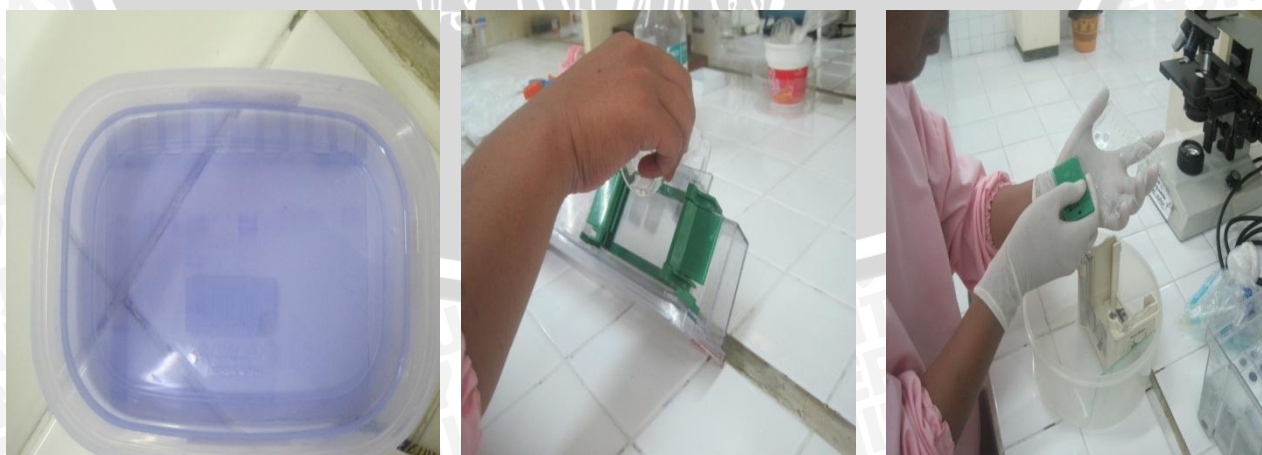
5.3. Persiapan Gel dan Persiapan Sampel SDS Page (Sodium Dosecyl Sulfate Polyacrylamide gel Electrophoresis)



Gambar 5.3. Peneliti Dibantu Analis Laboratorium Sedang Mempersiapkan Gel dan Persiapan Sampel SDS PAGE

Dilakukan persiapan gel dan persiapan sampel SDS Page sebelum memulai proses elektroforesis untuk mendapatkan protein slgA murni.

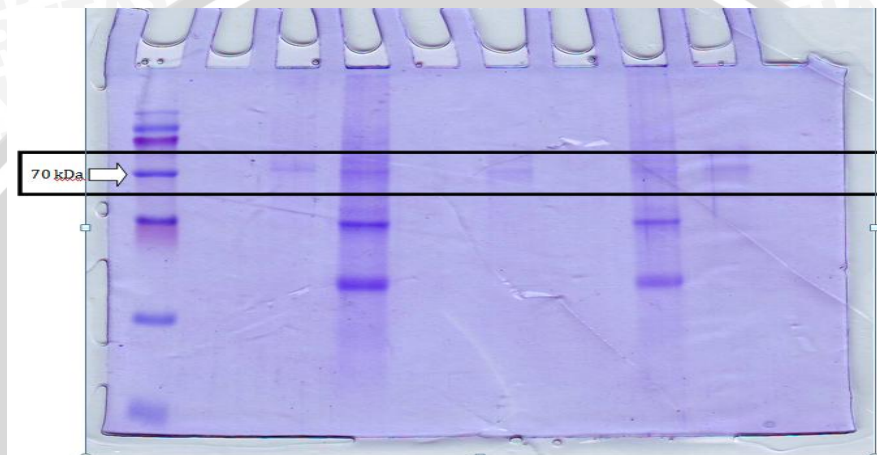
5.4. Tahap Elektroforesis SDS Page (Sodium Dosecyl Sulfate Polyacrylamide gel Electrophoresis)



Gambar 5.4. Peneliti Dibantu Analis Laboratorium Melaksanakan SDS PAGE

Metode elektroforesis adalah metode pemisahan protein berdasarkan berat molekul protein tersebut yang spesifik. Pemisahan molekul berdasar berat molekulnya dilakukan dengan memberi tegangan listrik 120 Volt pada sampel protein yang berada dalam gel.

5.5. Hasil Elektroforesis Sampel Saliva



Gambar 5.5. Hasil Elektroforesis Sampel Saliva, Didapatkan Molekul sIgA dengan BM 70kDa

Setelah dilakukan elektroforesis dengan metode SDS PAGE, didapatkan pita sIgA dengan berat molekul 70 kDa. Setiap molekul memiliki berat molekul yang spesifik terhadap molekul tersebut.

5.6. Tahap Elektroelusi dan Dialisa antibodi sIgA



Gambar 5.6. Peneliti Melakukan Pemotongan Pita sIgA



Gambar 5.7. Pita sIgA Dimasukkan Dalam Selovan



Gambar 5.8. Pita sIgA + selovan + buffer fosfat diputar selama semalam dalam suhu 4°C

Dilakukan metode elusi dan dialisa untuk mendapatkan sIgA murni yang akan diinjeksikan pada kelinci.

5.7. Metode Pembuatan anti-antibodi sIgA dengan Metode Poliklonal

5.7.1. Imunisasi Antibodi sIgA dan CFA pada Kelinci



Gambar 5.9. Sampel stok antibodi sIgA ditambahkan CFA sebanyak 200 cc



Gambar 5.10. Setelah itu divortex selama 1 jam



Gambar 5.11. Imunisasi Kelinci Secara Intraperitoneum di 4 Lokasi

Dilakukan imunisasi kelinci dengan antibodi sIgA murni ditambahkan CFA (*Completed Freud Adjuvant*). CFA ditambahkan agar sIgA terdeposit pada jaringan otot kelinci dan akan dilepaskan perlahan-lahan ke intravaskuler. Penambahan CFA mutlak diperlukan agar sIgA tidak dilawan oleh imunitas sel kelinci secara cepat.

5.7.2. Metode *Bleeding* Kelinci



Gambar 5.12. Peneliti Mengambil Darah Kelinci Melalui Vena Telinga Kelinci



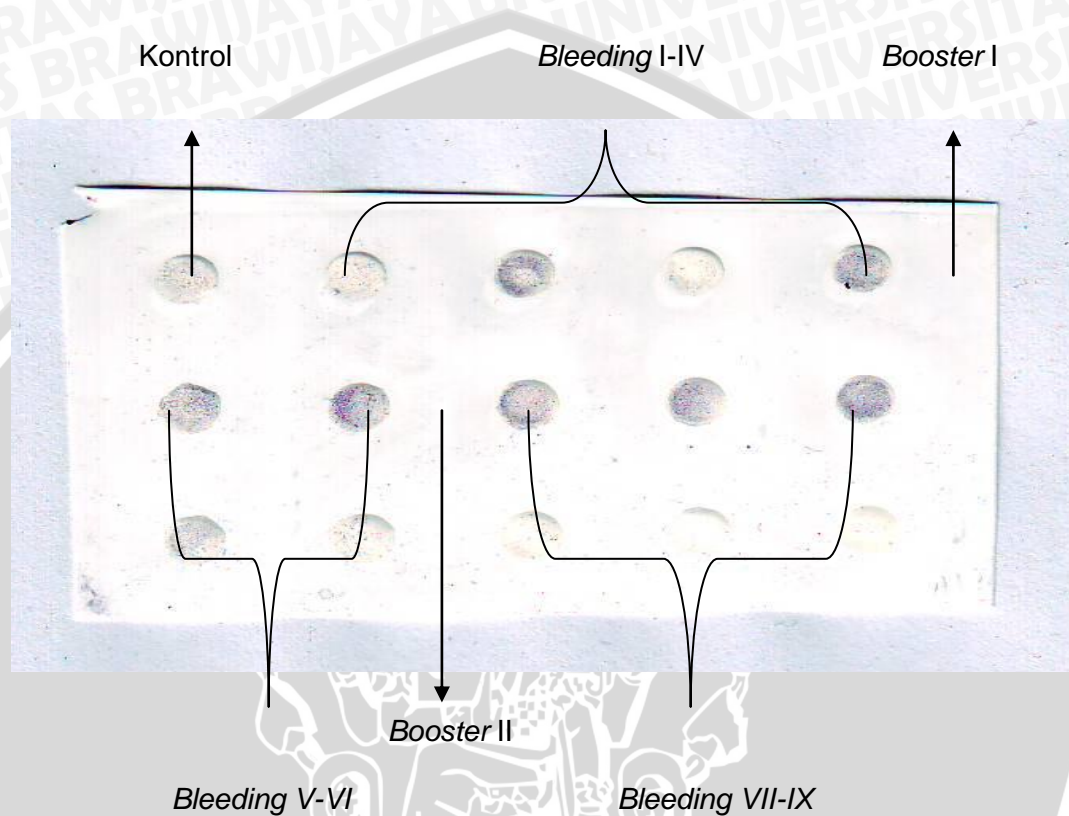
Gambar 5.13. Darah Kelinci Diambil Serumnya Untuk Dimurnikan

Dilakukan pengambilan darah kelinci untuk mendapatkan antibodi poliklonal sIgA. *Bleeding* kelinci dilakukan sebanyak sembilan kali untuk agar antibodi poliklonal yang didapatkan cukup.

5.7.3. Metode *Booster* Kelinci

Dilakukan *booster* dua kali pada kelinci percobaan. *Booster* dilakukan dengan menginjeksikan sIgA ditambah IFA (*Incompleted Freud Adjuvant*) pada kelinci secara intraperitoneal.

5.8. Tahap Uji Spesifisitas dan Sensitivitas dengan Metode Dot Blot



Gambar 5.14. Hasil Uji Dotblot dan Keterangan, Tampak Hasil Negatif (tidak ada perubahan warna) Pada Kelompok Kontrol, dan Hasil Positif (kecenderungan semakin pekat) Pada Bleeding I-IX.

Uji *dot blot* merupakan uji untuk mengetahui ada tidaknya reaksi antigen dan antibodi. Antigen yang diujikan dalam *dot blot* adalah IgA yang telah dimurnikan dari saliva pasien anak penderita Demam Berdarah Dengue. Antibodi yang diujikan adalah anti-antibodi sIgA hasil poliklonal. Penanda positif pada uji *dot blot* adalah timbulnya warna biru dari kompleks antigen-antibodi yang diujikan.

Pada uji dotblot yang dilakukan, tampak hasil negatif (tidak ada perubahan warna) pada kelompok kontrol. Pada bleeding pertama sampai bleeding kesembilan, tampak warna biru yang merupakan hasil positif. Kecenderungan hasil pada bleeding pertama sampai bleeding kesembilan adalah semakin pekat.

5.9. Tahap Pembuatan Kit Dipstick

5.9.1 Pelabelan Anti-slgA dengan AP (*Alkaline Phospatase*)

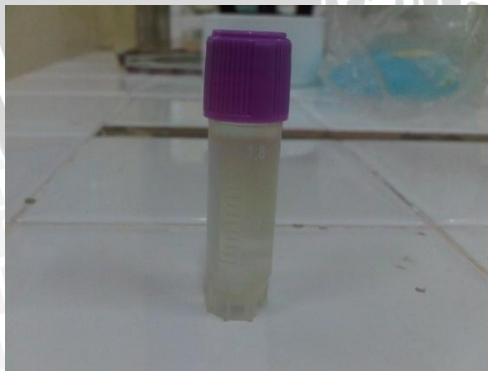


Gambar 5.15. anti-antibodi slgA ditambahkan 1,5 mg AP



Gambar 5.16. Tambahkan gluta-raldehid 15% - 0,2%

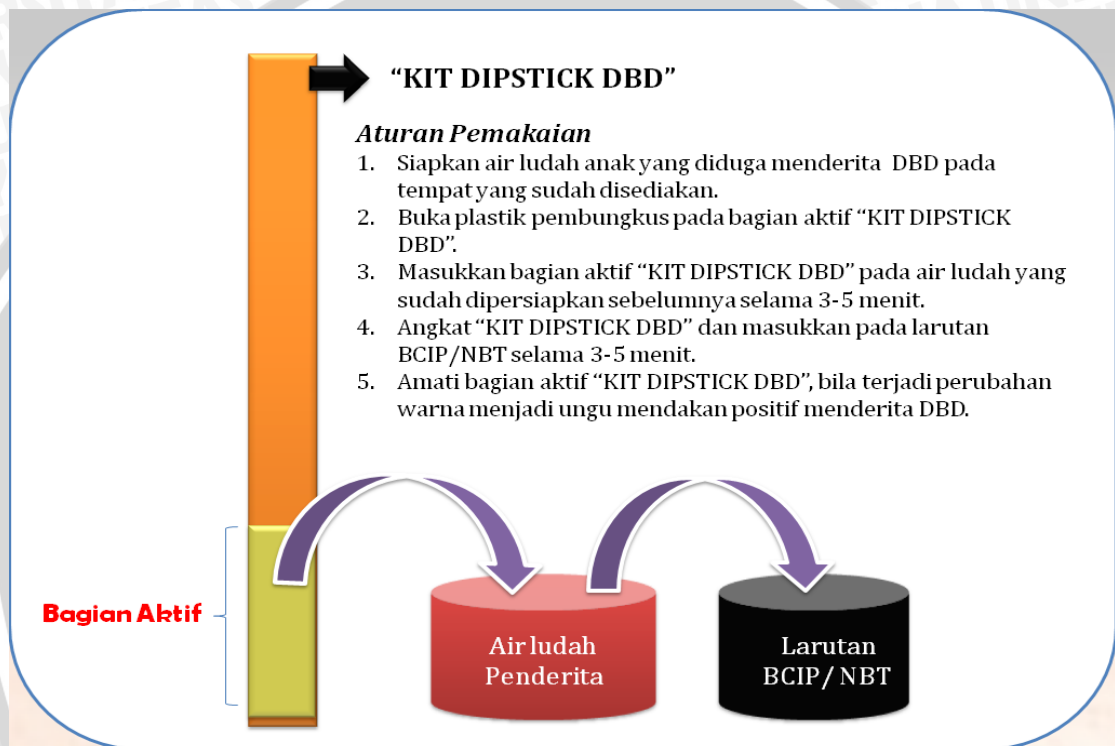
5.9.2 Pelekatan pada kertas VPDF



Gambar 5.17. Hasil Kit Dipstick setelah ditetesi Anti- Antibodi slgA yang berlabel AP

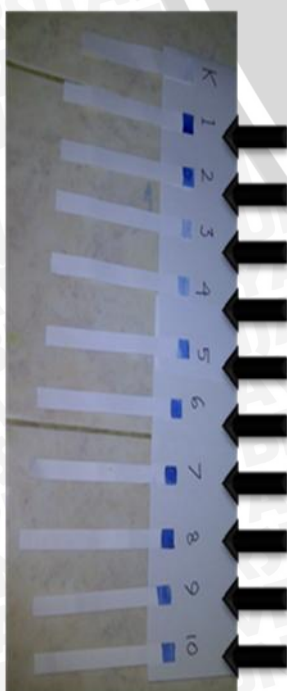
Dilakukan pelabelan anti-antibodi sIgA dengan menambahkan enzim konjugat AP (*Alkaline Phopatase*) untuk mempercepat reaksi antigen-antibodi. Kemudian peneliti melekatkan pada kertas VPDF.

5.9.3 Penggunaan Kit Dipstick DBD



Gambar 5.18. Aturan Penggunaan Kit Dipstick DBD

5.10. Tahap Pengujian Kit Dipstick



No	Nama	Keluhan	Trombosit Count	MRS hari ke-	IgM Anti Dengue
1.	An. A	Pusing, Muntah, Mual, Panas Badan	40.000	4	(+)
2.	An. Zul	Pusing, Muntah, Panas Badan	70.000	2	(+)
3.	An. Lili	Pusing, Muntah, Panas Badan	80.000	2	(+)
4.	An. Deni W.	Pusing, Muntah, Mual, Panas Badan	42.000	3	(+)
5.	An. Winda	Panas Badan	100.000	4	(+)
6.	An. Aldi	Muntah, Mual, Panas Badan	68.000	4	(+)
7.	An. Rheissa	Pusing, Muntah, Mual, Panas Badan	80.000	5	(+)
8.	An. Dilla	Pusing, Panas Badan	120.000	6	(+)
9.	An. Benny	Pusing, Muntah, Mual, Panas Badan	75.000	5	(+)
10.	An. Sisi	Pusing, Muntah, Mual, Panas Badan	70.000	4	(+)

Gambar 5.19. Data Rekam Medis, Hasil Uji Trombosit, Hasil Uji IgM Anti Dengue, dan Hasil Uji Kit Dipstick pada 10 pasien anak penderita DBD

Setelah kit dipstick DBD selesai dibuat, peneliti melakukan pengujian untuk mengetahui sensivitas kit dipstick (anti-antibodi sIgA yang berlabel *Alkaline Phosphatase*) dalam mendeteksi sIgA saliva anak penderita DBD. Tabel diatas adalah data rekam medis, hasil uji trombosit, dan hasil uji IgM Anti Dengue terhadap 10 pasien anak penderita DBD yang masuk Rumah Sakit Saiful Anwar, Malang. Gambar disebelah kiri tabel menunjukkan hasil uji kit dipstick DBD pada 10 pasien anak tersebut. Hasilnya menunjukkan terjadi perubahan warna menjadi ungu.

