

## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1. Pembuatan Anti-antibodi slgA Hasil poliklonal dari Antibodi slgA pada Pasien Anak Demam Berdarah Dengue.

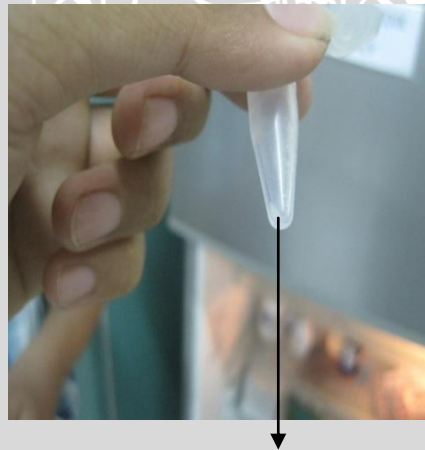
Dengue merupakan penyakit yang disebabkan virus dan ditransmisikan oleh nyamuk yang paling cepat menyebar di seluruh dunia. WHO (2009) memperkirakan 50 juta manusia terinfeksi virus dengue, dan 2,5 milyar manusia di dunia hidup di negara endemis infeksi dengue. Konferensi dunia yang dilakukan WHO, *World Health Assembly resolution* (2005), memasukkan dengue sebagai contoh penyakit yang dapat menyebabkan kejadian *emergency* pada kesehatan masyarakat dan merupakan kewajiban seluruh dunia untuk mengurangi cepatnya penularan infeksi ini.

Vektor penularan virus dengue pada manusia adalah melalui gigitan nyamuk *Aedes*, khususnya *Ae. Aegypti*. Nyamuk ini hidup pada daerah tropis dan subtropis, tersebar sangat luas pada seluruh daerah di dunia. Nyamuk *Ae. Aegypti* dapat hidup pada keadaan musim panas, namun tidak bertahan lama pada musim dingin. Nyamuk ini juga jarang dijumpai pada daerah dengan ketinggian lebih dari 1000 meter, dikarenakan suhu udara yang rendah. Jenis nyamuk lainnya antara lain *Ae. albopictus*, *Ae. polinesiensis*, dan beberapa spesies dari *Ae. scuteralis kompleks*. Nyamuk *Aedes aegypti* merupakan vektor penting di daerah perkotaan (daerah urban) sedangkan daerah pedesaan (daerah rural) semua spesies nyamuk tersebut berperan dalam penularan ( Small crab, 2008).

Menurut kriteria diagnosis WHO (2009), keadaan yang dapat digolongkan sebagai Demam Berdarah Dengue adalah tinggal atau berkunjung ke tempat *endemik virus dengue* dan memenuhi minimal dua kriteria WHO.

Pengambilan darah untuk diagnosis dengue pada anak-anak memiliki banyak kendala, diantaranya anak-anak takut terhadap tusukan pengambilan darah, membutuhkan teknisi yang terlatih, dan sebelum pemeriksaan harus ada perlakuan untuk memisahkan serum dan plasma (Cuzzubo, et al, 1998). Hal ini merupakan kendala tersendiri bagi ketepatan dokter atau ahli medis lain untuk melakukan diagnosis pasti Demam Berdarah Dengue pada anak-anak.

Dalam penelitian ini, peneliti awalnya mengumpulkan sampel berupa 20 saliva anak penderita Demam Berdarah Dengue di ruang anak Rumah Sakit dr Saiful Anwar Malang. Sampel saliva ini kemudian disentrifugasi agar protein sIgA dapat diisolasi dari saliva. Hasilnya berupa kristal-kristal yang merupakan presipitat sIgA saliva.

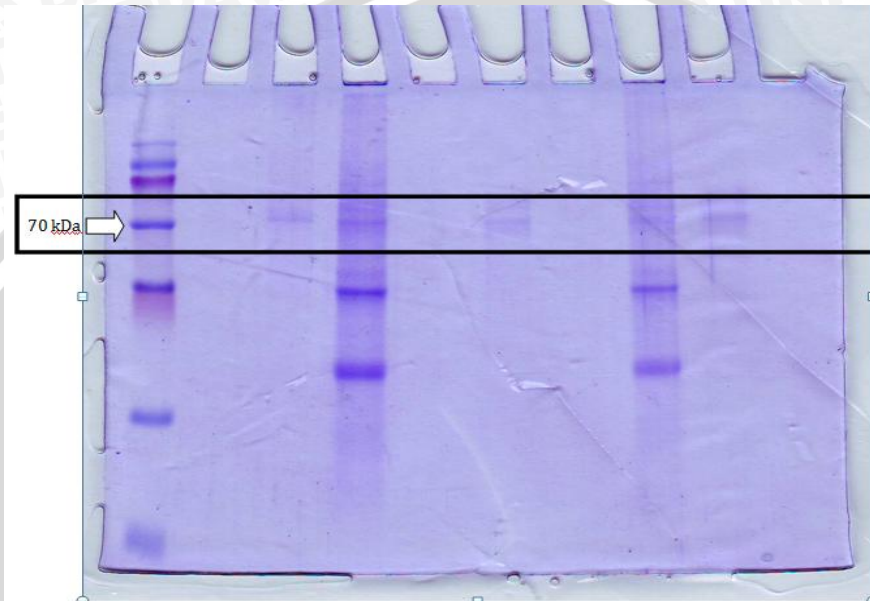


Presipitat sIgA saliva

**Gambar 6.1. Hasil Presipitat sIgA Saliva**

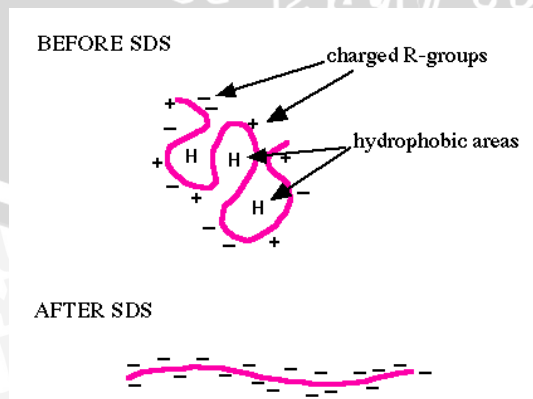
Langkah berikutnya adalah melakukan elektroforesis pada presipitat sIgA saliva. Elektroforesis adalah metode pemisahan molekul berdasarkan berat

molekulnya masing-masing. Pemisahan molekul ini menggunakan listrik dengan sumber 120 Volt selama 1-2 jam sampai semua molekul dalam saliva mengendap sesuai berat molekulnya. Dalam penelitian ini, molekul slgA memiliki berat molekul yang spesifik, yakni sekitar 70 kDa.



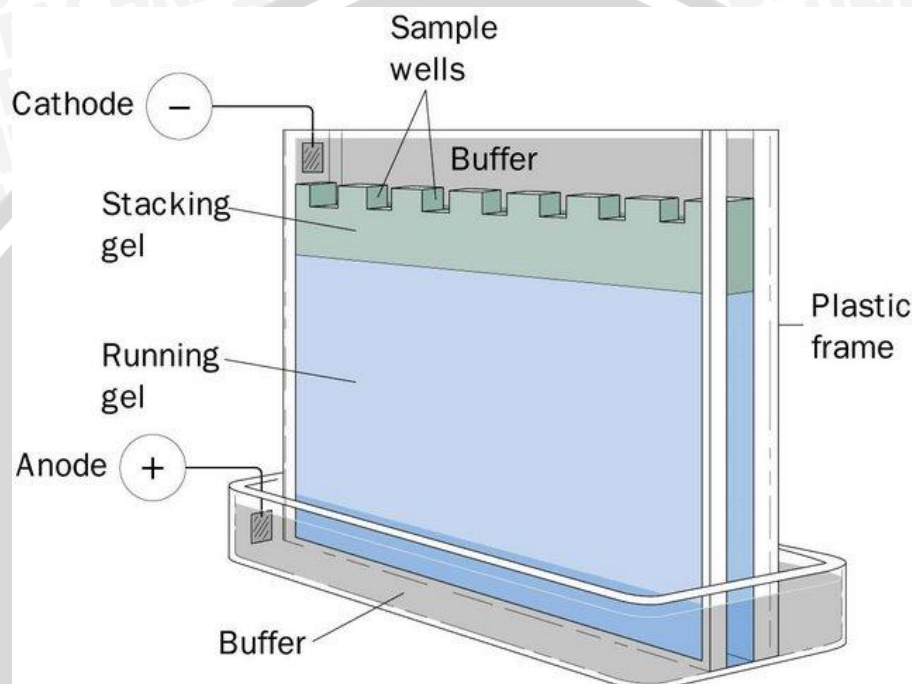
**Gambar 6.1. Hasil Elektroforesis, Didapatkan Pita slgA dengan BM 70kDa**

Tujuan dari metode elektroforesis SDS-PAGE ini adalah untuk memisahkan protein berdasarkan ukurannya. Secara singkat, SDS-PAGE akan membuat protein menjadi terdenaturasi sehingga berbentuk struktur primer (memanjang).



**Gambar 6.2. Struktur Protein Setelah Penambahan SDS-PAGE (Corley,2005)**

Prinsip dari metode elektroforesis SDS PAGE adalah protein yang bermuatan negatif tersebut akan bergerak ke arah kutub positif dalam gel poliakrilamida berdasarkan ukurannya ketika dilakukan metode *running* pada voltase 120 Volt (Corley, 2005).



**Gambar 6.3. Diagram Konsep SDS-PAGE** (Corley, 2005)

Setelah didapatkan pita slgA dengan berat molekul 70 kDA, pita slgA tadi dipotong dan dipersiapkan untuk melakukan metode dialisa. Fungsi metode dialisa adalah untuk mendapatkan slgA murni dalam bentuk cair sehingga dapat diinjeksikan pada kelinci. Pita slgA hasil elektroforesis tadi dimasukkan dalam selovan dan dicampur dengan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5%, EDTA pH 8, Aquadest Steril serta *Running buffer*. Selovan kemudian dimasukkan dalam aquadest steril ditambah TRIS Cl 0,5 M pH 8 dan diputar selama 24 jam pada suhu  $-4^\circ\text{C}$ . Selovan merupakan membran semipermeabel yang memungkinkan molekul-molekul lain selain slgA akan keluar sehingga akan tersisa slgA yang telah dimurnikan.

Ketika akan melakukan prosedur imunisasi pada kelinci, slgA murni dicampur dengan CFA (*Completed Freud Adjuvant*). CFA sangat diperlukan supaya slgA dapat terdeposit di otot kelinci dan dilepas perlahan-lahan ke intravaskular. Pelepasan slgA perlahan-lahan ke intravaskular menyebabkan sel imunitas kelinci dapat mengenali antigen slgA tersebut dan merespons dengan membentuk antibodi. Tanpa CFA, slgA akan langsung dilepas ke intravaskular sehingga makrofag dan neutrofil akan langsung merespons antigen asing tersebut tanpa sempat membentuk antibodi.

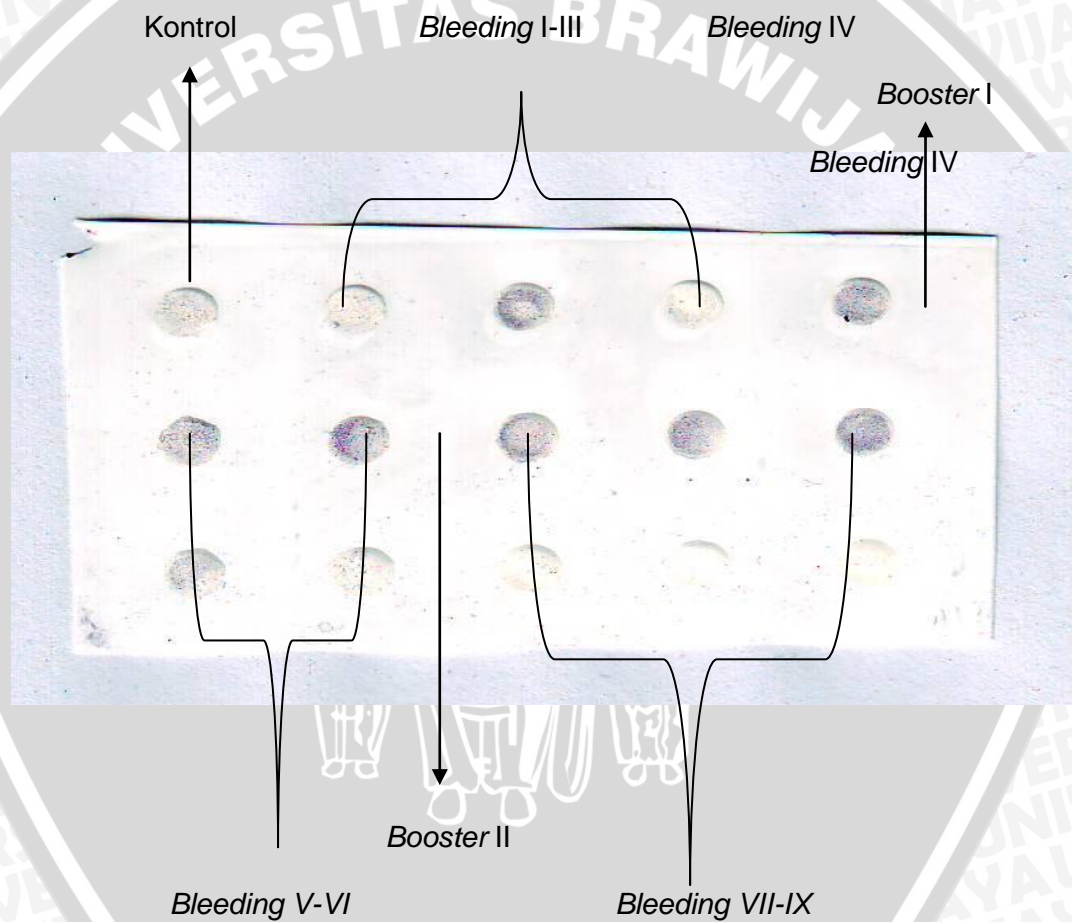
*Booster* diperlukan agar imunitas kelinci dapat makin mengenali antigen (slgA) sehingga antibodi yang dihasilkan makin banyak. *Booster* dilakukan dengan menginjeksikan slgA murni ditambah IFA (*Incompleted Freud Adjuvant*). Mekanisme kerja IFA pada dasarnya serupa dengan CFA, hanya potensinya saja yang dikurangi. Pada penelitian ini, dilakukan dua kali *booster* agar didapatkan antibodi dalam jumlah yang mencukupi.

Bagian antigen yang dapat menimbulkan terjadinya respons imun dan dapat bereaksi dengan produk dari respons imun tersebut disebut sebagai antigen determinan atau epitop. Setiap antigen apabila terdapat dalam tubuh vertebrata akan menimbulkan sejumlah besar klon-klon limfosit yang berbeda-beda sesuai dengan jumlah epitop yang terkandung dalam antigen tersebut. Klon-klon yang terstimulasi akan berproliferasi dan berdiferensiasi yang kemudian menghasilkan antibodi. Antibodi yang berasal dari produksi berbagai klon disebut sebagai antibodi polikonal. *Secretory Immunoglobulin A* yang berasal dari saliva penderita Demam Berdarah Dengue pada anak bila diimunisasikan pada kelinci dikenali oleh sel imun kelinci sebagai antigen.

Respons kemudian adalah membentuk antibodi untuk melawan antigen tersebut.

Antibodi tersebut merupakan poliklonal antibodi anti-secretory *Immunoglobulin A*.

**6.2. Anti-antibodi sIgA Hasil Poliklonal dari sIgA Saliva Pasien Anak Demam Berdarah Dengue Dapat Digunakan Untuk Mendeteksi Demam Berdarah Dengue.**



**Gambar 6.4. 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.

	Bleeding ke-								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hasil	1	2,5	1	4	4	4	4	4	5,5

**Tabel 6.1. Pembacaan Hasil *dot blotting***

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.

Peningkatan konsentrasi antibodi terjadi pada bleeding pertama dan kedua. Skor yang ditunjukkan tidak terlalu tinggi karena respon imun yang dihasilkan masih berupa respon imun primer. Menurut Tizard (1988), antibodi baru ditemukan sekitar satu minggu setelah pemberian antigen pertama dan kadarnya meningkat dalam serum dan mencapai puncaknya setelah 10-14 hari sebelum menurun lagi dengan cepat. Jumlah antibodi yang terbentuk dan tingkat daya proteksi selama respon imun primer relatif kecil sehingga pada bleeding ketiga terjadi penurunan skor akibat produksi antibodi yang telah berkurang.

Pemberian booster pertama dilakukan dua hari setelah bleeding ketiga. Kemudian skor hasil *dot blot* mengalami peningkatan yang konstan pada bleeding keempat, kelima dan keenam. Peningkatan kembali terjadi setelah pemberian booster kedua. Booster kedua dilakukan dua hari setelah bleeding keenam. Lalu skor hasil *dot blot* kembali konstan pada bleeding kedelapan.

Konsentrasi tertinggi tercapai pada bleeding kesembilan. Menurut Baratawidjaja (2006), imunisasi berulang dengan selang waktu tertentu dapat meningkatkan respon imun suatu individu.

Hasil dot blot tersebut menunjukkan gambaran bahwa konsentrasi antibodi tertinggi diperoleh pada bleeding kesembilan setelah booster kedua dengan skor 5,5. Konsentrasi antibodi tertinggi ini disebabkan pada bleeding kesembilan antibodi yang terkandung dalam serum berada dalam konsentrasi yang paling tinggi.

Pemberian imunisasi setelah pengambilan darah pre-imun hanya memberikan hasil peningkatan skor dengan nilai 2,5 pada bleeding kedua. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Abbas dan Litchman (2005) bahwa respon imun primer mengakibatkan aktivasi pada sel B sedangkan respon imun sekunder menstimulasi peningkatan jumlah sel B memori. Oleh karena itu respon imun sekunder memiliki kandungan antibodi yang diproduksi lebih tinggi daripada respon imun primer.

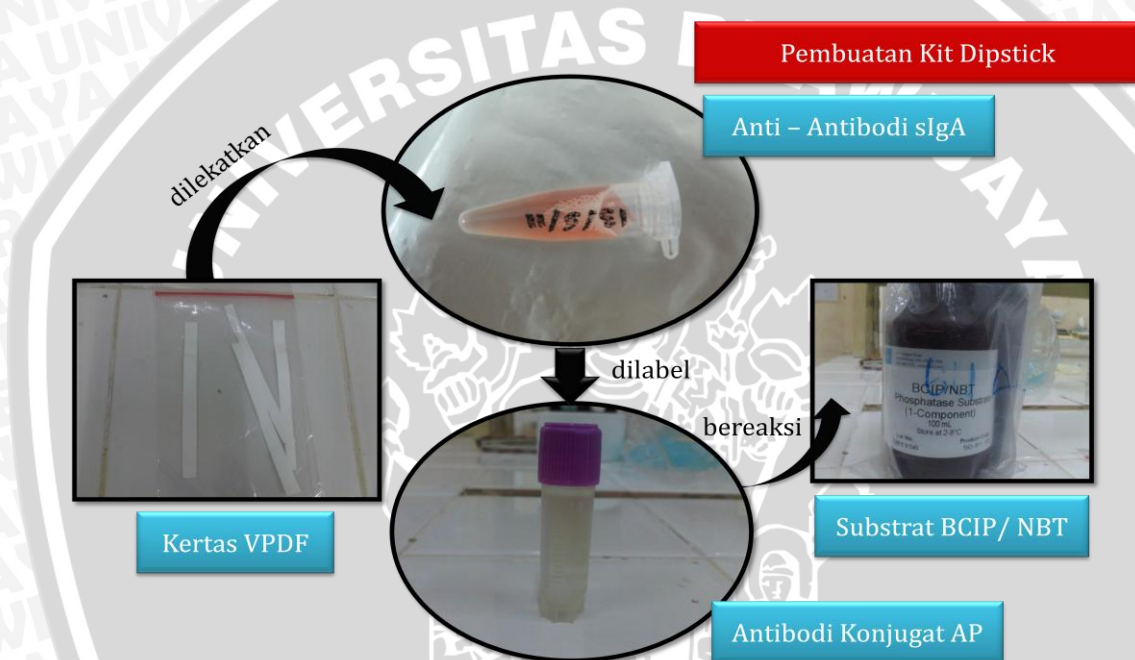
Beraksinya antigen yakni sIgA yang telah dimurnikan dengan anti-antibodi sIgA hasil poliklonal merupakan suatu reaksi yang menjadi dasar dibuatnya suatu alat berupa kit dipstick untuk diagnosis Demam Berdarah Dengue pada anak.

### **6.3. Pembuatan Kit Dipstick Diagnostik Reaksi Anti-antibodi sIgA dan antibodi sIgA pada Saliva Anak Penderita Demam Berdarah Dengue untuk Menegakkan Diagnosis Demam Berdarah Dengue pada Anak**

Konsep pembuatan kit dipstick ini pada dasarnya menggunakan pijakan reaksi antigen yakni sIgA yang telah dimurnikan dengan anti-antibodi sIgA hasil poliklonal. Modifikasi yang dilakukan peneliti untuk membuat kit dipstick antara lain dengan melakukan pelabelan anti-antibodi sIgA dengan menambahkan

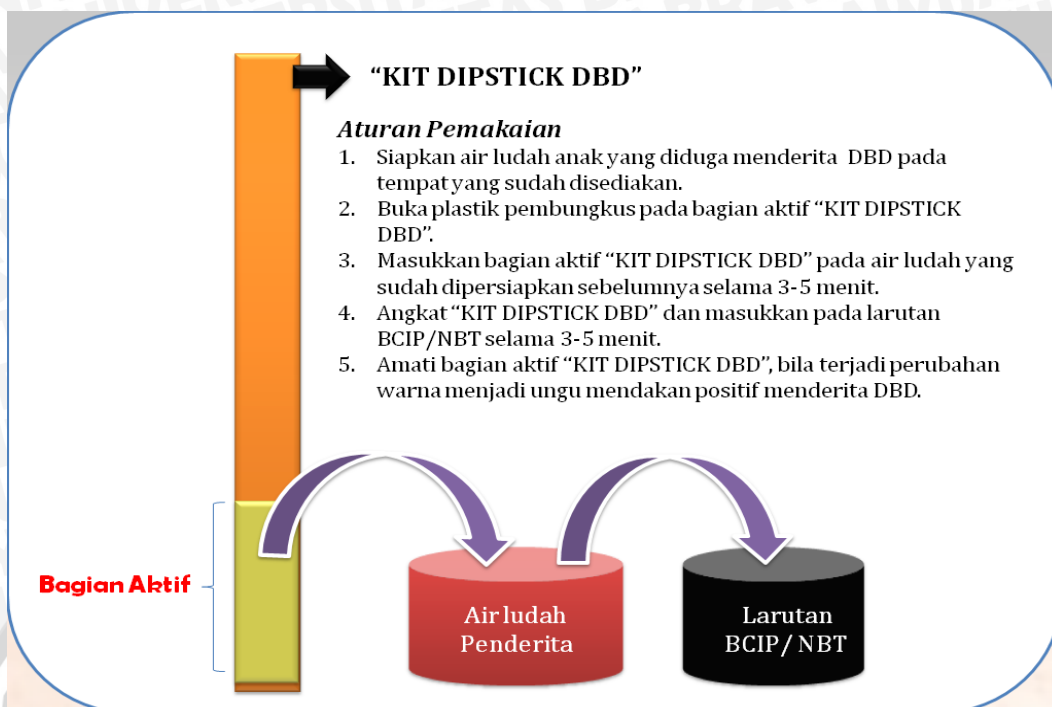


enzim konjugat AP (*Alkaline Phosphatase*) untuk mempercepat reaksi antigen-antibodi, lalu menempelkan antibodi hasil poliklonal pada kertas VPDF serta terdapatnya substrat kromogen BCIP/NBT agar dapat mengindikasikan perubahan warna apabila bereaksi dengan enzim konjugat AP (*Alkaline Phosphatase*). Berikut adalah konsep pembuatan kit dipstick yang tercantum dalam bagan dibawah,



**Gambar 6.5. Pembuatan kit dipstick diagnostik Demam Berdarah Dengue**

Untuk penggunaan kit dipstick, langkah-langkah yang harus dilakukan dengan menyiapkan saliva anak yang diduga menderita Demam Berdarah Dengue lalu memasukkan kit dipstick pada saliva tersebut selama 3-5 menit, kemudian memasukkan kit dipstick pada substrat kromogen BCIP/NBT selama 3-5 menit yang berfungsi untuk memberikan warna apabila bereaksi. Kemudian amati apakah ada perubahan warna menjadi ungu yang menandakan anak tersebut positif menderita Demam Berdarah Dengue. Berikut adalah bagan mengenai aturan pemakaian kit dipstick DBD,



Gambar 6.6. Aturan Penggunaan kit dipstick diagnostik DBD

### 6.3. Pengujian Kit Dipstick DBD pada pasien

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 6.7. Data Rekam Medis, Hasil Uji Trombosit, Hasil Uji IgM Anti Dengue, dan Hasil Uji kit dipstick pada 10 pasien anak penderita DBD

Pengujian kit dipstick DBD dilakukan untuk mengetahui sensitivitas kit dipstick (anti-antibodi sIgA yang berlabel *Alkaline Phosphatase*) dalam mendeteksi sIgA pada 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.

Dari data diatas dapat dilihat terdapat kesesuaian hasil kit dipstick DBD (warna positif ungu) dengan ringkasan data rekam medis, hasil uji trombosit, dan hasil uji IgM Anti Dengue pada 10 pasien anak penderita DBD yang dirawat di Rumah Sakit Saiful Anwar, Malang. Sebagai contoh, anak no 1 yang bernama A, dengan keluhan pusing, muntah, mual, dan panas badan serta masuk rumah sakit hari ke-empat telah diuji hitung trombosit dengan hasil 40.000 dan hasil uji IgM Anti Dengue menunjukkan hasil positif. Peneliti melakukan uji kit dipstick sesuai dengan aturan pemakaian dan didapatkan perubahan warna menjadi ungu.

Perubahan warna kit dipstick DBD dari warna putih menjadi ungu ini menunjukkan bahwa terjadi reaksi antara anti-antibodi sIgA dengan sIgA pada saliva anak A yang berarti positif menderita DBD. Begitu pula dengan kesembilan pasien anak yang lain. Semuanya menunjukkan hasil positif. Kesesuaian ini menandakan sensitivitas kit dipstick cukup baik dan dapat diproduksi lebih lanjut untuk dijadikan alat deteksi Demam Berdarah Dengue yang murah, mudah serta tidak invasif. Dengan terciptanya kit dipstick diagnostik untuk Demam Berdarah Dengue diharapkan anak Indonesia khususnya di pedalaman dapat dengan cepat didiagnosis infeksi dengue dan dilakukan penanganan segera. Tingkat mortalitas juga akan ditekan dengan diagnosis yang lebih dini.