

**PENGEMBANGAN PROTOTIPE ANTIGEN dsDNA UNTUK
KIT DIAGNOSIS DINI PADA PASIEN
LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMIK**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Spesialis Patologi Klinik**



Oleh :

Rossy Meilani

NIM. 148070500011003

PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I PATOLOGI KLINIK

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018





LEMBAR PERSETUJUAN

**PENGEMBANGAN PROTOTIPE ANTIGEN dsDNA UNTUK KIT
DIAGNOSIS DINI PADA PASIEN LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMIK**

Oleh :

dr. Rossy Meilani

NIM. 148070500011003

Dinyatakan memenuhi syarat untuk diuji

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK

Dr. dr. Hani Susianti, Sp.PK(K)

NIP. 19560331 198802 2 001

NIP. 19690117 199803 2 005

TESIS

**PENGEMBANGAN PROTOTIPE ANTIGEN dsDNA UNTUK KIT
DIAGNOSIS DINI PADA PASIEN LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMIK**

Oleh:

dr. Rossy Meilani

NIM. 148070500011003

Telah dipertahankan di depan Dewan Penilai

Pada tanggal 24 Juli 2018

Dinyatakan memenuhi syarat

1. Penguji I : dr. I Putu Adi Santosa, Sp.PK

NIP. 19640902 199603 1 003

2. Penguji II : dr. Siti Fatonah, Sp.PK

NIP. 19760227 201410 2 001

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGEMBANGAN PROTOTIPE ANTIGEN dsDNA UNTUK KIT
DIAGNOSIS DINI PADA PASIEN LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMIK**

Oleh:

dr. Rossy Meilani

NIM. 148070500011003



**Telah disetujui menjadi Karya Tugas Akhir dalam memenuhi
persyaratan memperoleh keahlian Spesialis Patologi Klinik**

Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

Ketua Program Studi

Dr.dr.Hani Susianti, Sp.PK(K)

NIP. 19690117 199803 2 005

**PERNYATAAN****ORISINALITAS TESIS**

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan atau daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 24 Juli 2018

Mahasiswa,

Nama : dr. Rossy Meilani

NIM : 148070500011003

PS : Spesialis I Patologi Klinik

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan Tesis dengan judul **“PENGEMBANGAN PROTOTYPE ANTIGEN dsDNA UNTUK KIT DIAGNOSIS DINI PADA PASIEN LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMIK”**. Karya Tugas Akhir ini disusun untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Spesialis Patologi Klinik pada program studi PPDS I Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada semua pihak yang telah membantu dan memberikan masukan serta dukungan dalam bentuk apapun, sehingga penyusunan Tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

Ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya juga disampaikan kepada:

1. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
2. dr. Restu Kurnia Tjahjani, M.Kes selaku Direktur Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang yang telah memberikan kesempatan untuk belajar dan bekerja di lingkungan Rumah Sakit Umum dr. Saiful Anwar Malang
3. Dr. dr. Hani Susianti, Sp.PK(K) sebagai Pembimbing II dan selaku Kepala Program Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik, RSU dr. Saiful Anwar/Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memberi dukungan dan kesempatan

yang seluas-luasnya kepada penulis untuk menempuh pendidikan di Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4. Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK sebagai Pembimbing I yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membimbing dan memberikan motivasi kepada penulis sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

5. dr. I Putu Adi Santosa, Sp.PK sebagai Penguji I dan selaku Kepala Instalasi Laboratorium Sentral RSSA Malang yang bersedia menguji, memberikan saran dan kesempatan kepada penulis untuk belajar di lingkungan Laboratorium Sentral RSSA Malang

6. dr. Siti Fatonah selaku Penguji II yang bersedia menguji dan memberikan saran untuk penyempurnaan tesis ini

7. Dr. dr. Tinny Endang Hernowati, Sp.PK(K) selaku Kepala SMF/Laboratorium Patologi Klinik FKUB

8. Seluruh Staf Pengajar dan dosen pembimbing akademik Patologi Klinik yang selalu meluangkan waktu dan membagikan ilmu serta pengalaman baik di Laboratorium Sentral RSSA maupun dimana pun beliau berada.

9. Seluruh Staf Laboratorium Sentral RSU dr. Saiful Anwar Malang, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk bantuan dan kerjasamanya selama pendidikan dan penelitian.

10. Rekan-rekan PPDS seangkatan periode Januari 2015, dr. Dany, dr. Nelly, dr. Fitri yang selama empat tahun ini saling membantu, mendukung dan memotivasi penulis selama masa pendidikan.

11. Semua rekan-rekan PPDS Patologi Klinik yang ikut mendukung sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

12. Kepada orang tua penulis, Bapak Abdul Hadji (alm) dan Ibu Farida Aini, dan keluarga besar yang selalu memberikan doa, kasih sayang, dukungan serta semangat untuk menyelesaikan pendidikan dan Tesis ini.

13. Suami terkasih, IGN Adi Prabawa yang senantiasa mendoakan, memberikan semangat, dan mendukung penulis selama menjalani pendidikan.

14. Serta pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu-persatu namun telah memberikan banyak bantuan yang berharga.

Penyusun menyadari bahwa tesis ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penyusun mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi perbaikan tesis ini.

Akhirnya semoga Allah SWT membalas atas kebaikan semua pihak yang membantu terselesaikannya tesis ini, dan mudah-mudahan hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pembaca pada umumnya.

Malang, 30 Agustus 2018

Penulis

ABSTRAK

Meilani, Rossy. 2018. **PENGEMBANGAN PROTOTIPE ANTIGEN dsDNA UNTUK KIT DIAGNOSIS DINI LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMIK**. Karya Tugas Akhir. Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembimbing (1) Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK, (2) Dr.dr. Hani Susianti, Sp.PK(K)

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan penyakit peradangan jaringan ikat multisistem yang ditandai dengan terbentuknya autoantibodi terhadap komponen sel sehingga menimbulkan kerusakan pada jaringan. Manifestasi klinisnya sangat bervariasi, sehingga sulit untuk mendiagnosis lupus, karenanya diperlukan tes yang praktis dan akurat untuk meningkatkan kecepatan diagnosis. Salah satu aplikasi alat diagnostik yang mudah digunakan adalah metode *rapid test kit*, atau *immunochromatographic test*(ICT). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui *performance* kandidat antigen DNA untuk deteksi antibodi anti-dsDNA. Sampel penelitian berupa dua kelompok antigen yang berasal dari kultur cell line HeLa dan nukleus limfosit *whole blood*, antibodi dari serum kontrol dan pasien LES sesuai kriteria SLICC 2012. Metode yang digunakan untuk mengisolasi antigen DNA adalah dengan kit ekstraksi DNA, kemudian dilakukan *Dot enzyme immunoassay* (DEI) dengan uji titrasi papan catur (*checkerboard*), untuk menentukan konsentrasi terbaik dari antigen dan antibodi primer yang ditandai dengan densitas perubahan warna yang signifikan. Kemudian dilanjutkan DEI terhadap 24 sampel anti-dsDNA positif dan anti-dsDNA negatif, berdasarkan hasil titrasi *checkerboard* untuk menentukan spesifisitas dan sensitifitas intensitas warna *dot blot assay* terhadap anti-dsDNA hasil pengukuran dengan ELISA. Didapatkan perubahan warna yang paling menonjol pada uji *checkerboard* adalah pada pengenceran antigen dari limfosit *whole blood* 1/640(konsentrasi antigen 3,16ng/ μ L) dan pengenceran antibodi 1/3200. Tidak didapatkan perubahan warna yang signifikan pada uji *checkerboard* dengan antigen dari sel HeLa. Hasil perhitungan uji diagnostik dengan DEI pada cut off 105,23 memiliki sensitivitas 70,83%, spesifisitas 75%, nilai ramal positif(NRP) 73,91% dan nilai ramal negative(NRN) 72,00%. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang pengembangan antigen sel limfosit untuk pembuatan kit diagnostik anti-dsDNA.

Kata kunci : Lupus Eritematosus Sistemik, anti-dsDNA, limfosit, HeLa, kit diagnostik

ABSTRACT

Meilani, Rossy. 2018. **DEVELOPMENT OF CANDIDATE dsDNA ANTIGEN FOR DIAGNOSTIC KIT TO DETECT AUTOANTIBODIES IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**. Thesis. Department of Clinical Pathology, Medical Faculty of Brawijaya University, Malang. Supervisors (1) Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK, (2) Dr.dr. Hani Susianti, Sp.PK(K)

Systemic Lupus Erythematosus(SLE) is multisystem connective tissue inflammatory disorder characterized by presence of autoantibodies against cell components that causing tissue's injury. Clinical manifestations vary widely, so it difficult to diagnosed, therefore a practical and accurate test is needed to improve rate of diagnosis. One of the easiest diagnostic tool applications is using rapid test kit method, or immunochromatographic test(ICT). Aim of this study was to determine performance of DNA antigen candidates for detection of anti-dsDNA antibodies. The samples divided into two groups of antigens derived from HeLa cell line and whole blood lymphocyte nuclei, antibodies from serum control and SLE patients according to SLICC 2012 criteria. DNA extraction kit was used to isolate DNA antigens, followed by Dot enzyme immunoassay (DEI) with checkerboard titration test, to determine the appropriate concentration of antigens and primary antibodies, characterized by significant color change density. Then DEI continued on 24 positive anti-dsDNA and negative anti-dsDNA samples, based on results of the checkerboard titration to determine specificity and sensitivity of dot blot assay color's intensity against anti-dsDNA measurements with ELISA. The most noticeable color change in checkerboard test was on dilution of 1/640(antigen 3,16ng/ μ L) from antigen whole-blood lymphocytes and dilution of 1/3200 antibodies. No significant color change was found on checkerboard test with antigen from HeLa cells. Results of diagnostic test with DEI with cut off 105.23 had sensitivity 70.83%, specificity 75%, positive predictive value(PPV) 73,91% and negative predictive value(NPV) 72%. Further research is needed in lymphocyte cell antigen development for development of anti-dsDNA diagnostic kits.

Key Words : Systemic Lupus Erythematosus, anti-dsDNA, lymphocyte, HeLa cells, diagnostic kit

DAFTAR ISI

Lembar Persetujuan.....	i
Lembar Penguji.....	ii
Lembar Pengesahan.....	iii
Pernyataan Orisinalitas Tulisan.....	iv
Kata Pengantar.....	v
Abstrak.....	viii
Abstract.....	ix
Daftar Isi.....	x
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Gambar.....	xiv
Daftar Lampiran.....	xv
Daftar Singkatan.....	xvi
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Lupus Eritematosus Sistemik.....	6
2.1.1 Definisi.....	6
2.1.2 Epidemiologi.....	6
2.1.3 Etio-Patologi.....	7
	x





2.1.4 Patogenesis.....	8
2.1.5 Diagnosis.....	11
2.2. Autoantibodi anti-dsDNA.....	13
2.3 <i>Cell line</i> (sel HeLa).....	19
2.4 <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (PBMC).....	22
2.5 <i>Dot Enzyme Immunoassay</i> (DEI).....	24
2.6 <i>Immunochromatography</i>	26
2.7 Kerangka teori.....	28
III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka konsep.....	30
IV. METODE PENELITIAN	
4.1 Desain penelitian.....	32
4.2 Populasi dan sampel.....	32
4.3 Lokasi dan waktu.....	35
4.4 Instrumen peneliti.....	35
4.5 Variabel penelitian.....	35
4.6 Definisi operasional variabel.....	36
4.7 Cara pemeriksaan.....	37
4.7.1 Prosedur pembiakan <i>cell line</i> (sel HeLa).....	37
4.7.2 Prosedur ekstraksi DNA.....	40
4.7.3 Prosedur <i>dot blot assay</i> dan <i>checkerboard</i>	43
4.7.4 Prosedur <i>dot blot assay</i> dengan antigen sel HeLa atau sel limfosit.....	44
4.8 Teknik pengumpulan data.....	45
4.8 Analisa statistik.....	45
4.10 Alur penelitian.....	46

V. HASIL PENELITIAN

5.1 Karakteristik subyek penelitian.....47

5.2. Hasil antigenisitas DNA dari sel HeLa dan sel Limfosit.....49

5.3 DEI antigen DNA dengan serum anti-dsDNA negatif dan positif.....51

5.4 Uji Diagnostik tingkat intensitas warna *dot blot assay*.....52

VI. PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik subyek penelitian.....58

6.2. Analisis hasil antigenisitas DNA dari sel HeLa dan sel Limfosit.....58

6.3 Analisa DEI antigen DNA dari sel limfosit dengan serum anti-dsDNA negatif dan positif60

6.4 Nilai diagnostik tingkat intensitas warna *dot blot assay*60

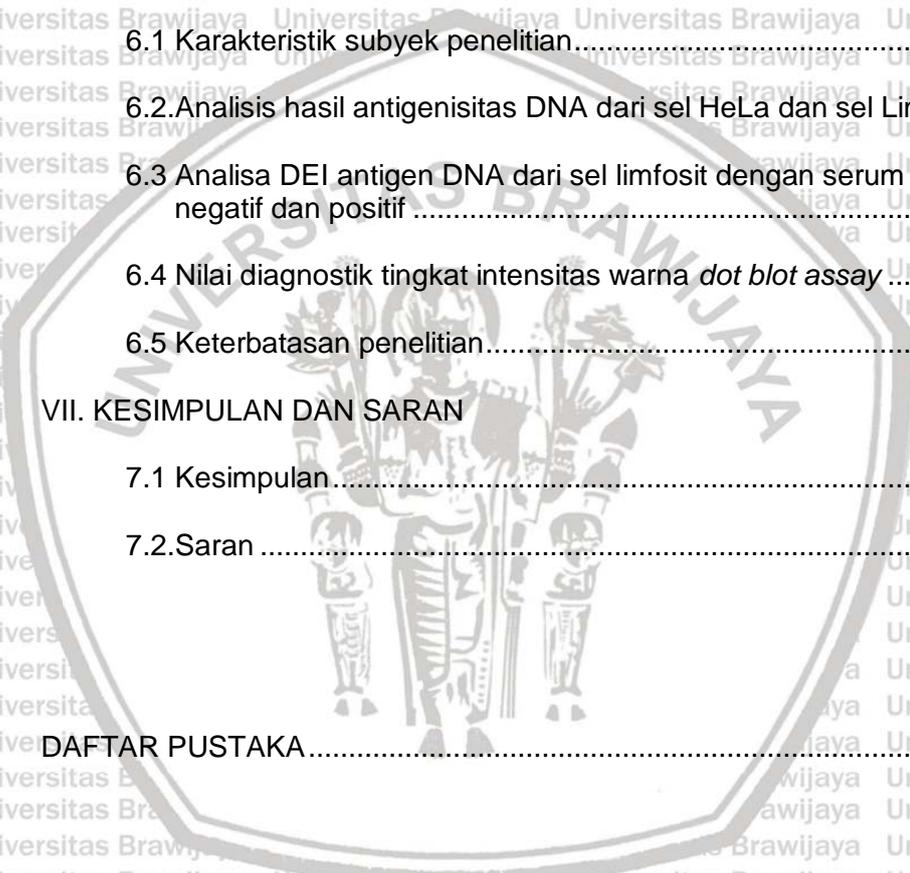
6.5 Keterbatasan penelitian.....61

VII. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan.....63

7.2. Saran64

DAFTAR PUSTAKA.....65



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Kriteria Diagnosis LES	12
Tabel 2.2	Perbandingan metode deteksi antibodi anti-dsDNA	19
Tabel 5.1	Karakteristik subyek penelitian	48
Tabel 5.2	Konsentrasi antigen DNA hasil isolasi	48
Tabel 5.3	Nilai diagnostik intensitas warna dot blot assay	55



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Mekanisme self-tolerance pada individu sehat 9

Gambar 2.2. Patogenesis LES 10

Gambar 2.3. Prinsip kerja RIA dalam mendeteksi antibody anti-dsDNA 17

Gambar 2.4. Anti-dsDNA dengan pewarnaan IFA pada *Chritidia lucilae* 18

Gambar 2.5. Foto sel HeLa 21

Gambar 2.6. PBMC *buffy coat* protocol 24

Gambar 2.6. Prinsip kerja *Dot blot enzyme immunoassay* (DEI) 25

Gambar 2.7. *Dot Enzyme Immuno assay (Checkerboard)* 26

Gambar 5.1. Titrasi Papan Catur (*Checker board*) dengan Antigen DNA yang berasal dari sel limfosit (*whole blood*) 49

Gambar 5.2. Titrasi Papan Catur (*Checker board*) dengan Antigen DNA yang berasal dari sel HeLa 50

Gambar 5.3. *Dot blot assay* pada kelompok LES dan kontrol 51

Gambar 5.4. Kurva ROC pada intensitas warna *dot blot assay* 53

Gambar 5.5. Kurva *cut off* intensitas warna *dot blot assay* 54

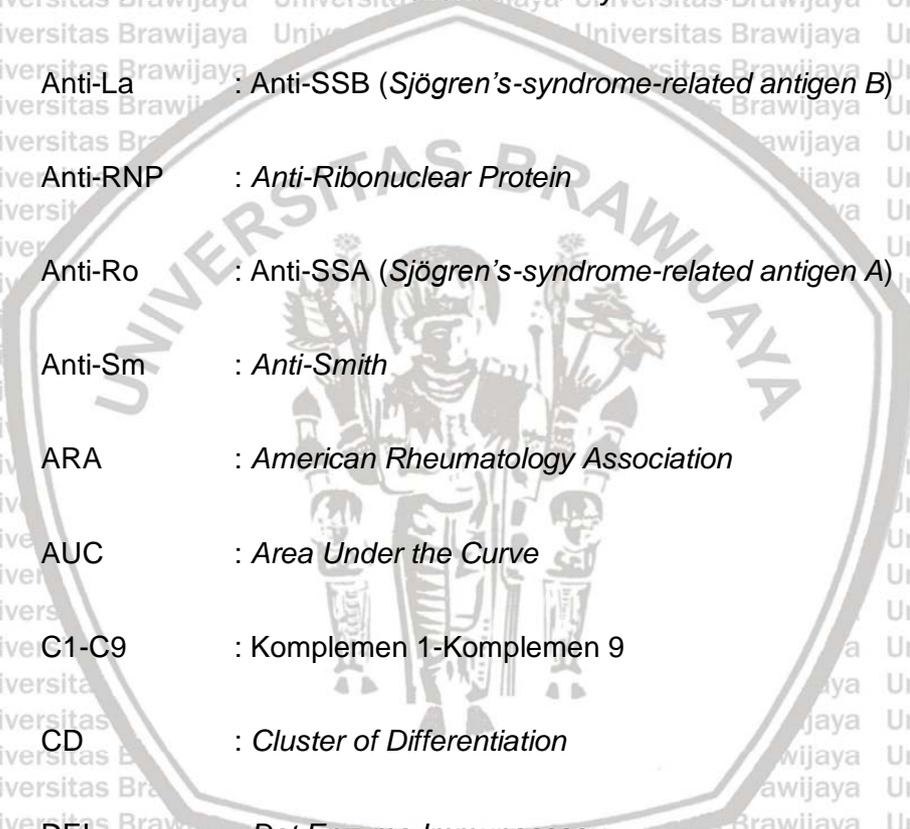
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Subyek Penelitian	70
Lampiran 2. Hasil Analisis Data Karakteristik Subyek Penelitian	72
Lampiran 3. Hasil Analisis Data Intensitas Warna dan kelompok LES	73
Lampiran 4. Keterangan Kelaikan Etik	77
Lampiran 5. Persetujuan Berpartisipasi dalam Penelitian	82
Lampiran 6. Penjelasan Mengikuti Penelitian	83



DAFTAR SINGKATAN

- AKI : Angka Kematian Ibu
- ANA : *Antinuclear Antibody*
- Anti ds-DNA : *Anti double stranded-Deoxyribonucleic Acid*
- Anti-La : *Anti-SSB (Sjögren's-syndrome-related antigen B)*
- Anti-RNP : *Anti-Ribonuclear Protein*
- Anti-Ro : *Anti-SSA (Sjögren's-syndrome-related antigen A)*
- Anti-Sm : *Anti-Smith*
- ARA : *American Rheumatology Association*
- AUC : *Area Under the Curve*
- C1-C9 : *Komplemen 1-Komplemen 9*
- CD : *Cluster of Differentiation*
- DEI : *Dot Enzyme Immunoassay*
- DMSO : *Dimethyl sulfoxide*
- D-PBS : *Dulbecco's phosphate-buffered saline*
- EBV : *Eipstein-Barr virus*
- EDTA : *Ethylenediaminetetraacetic acid*



EIA : *Enzyme Immuno Assay*

ELISA : *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

HEPES : *Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*

HPA : *Hipotalamus-Hipofise-Adrenal axis*

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

HRP : *Horseradish Peroxidase*

ICT : *Immunochromatography Test*

IFA : *Immunofluorescence Assay*

Ig : *Immunoglobulin*

IL : *Interleukin*

LAF : *Laminar air flow*

LES : *Lupus Eritematosus Sistemik*

MAC : *Membrane Attack Complex*

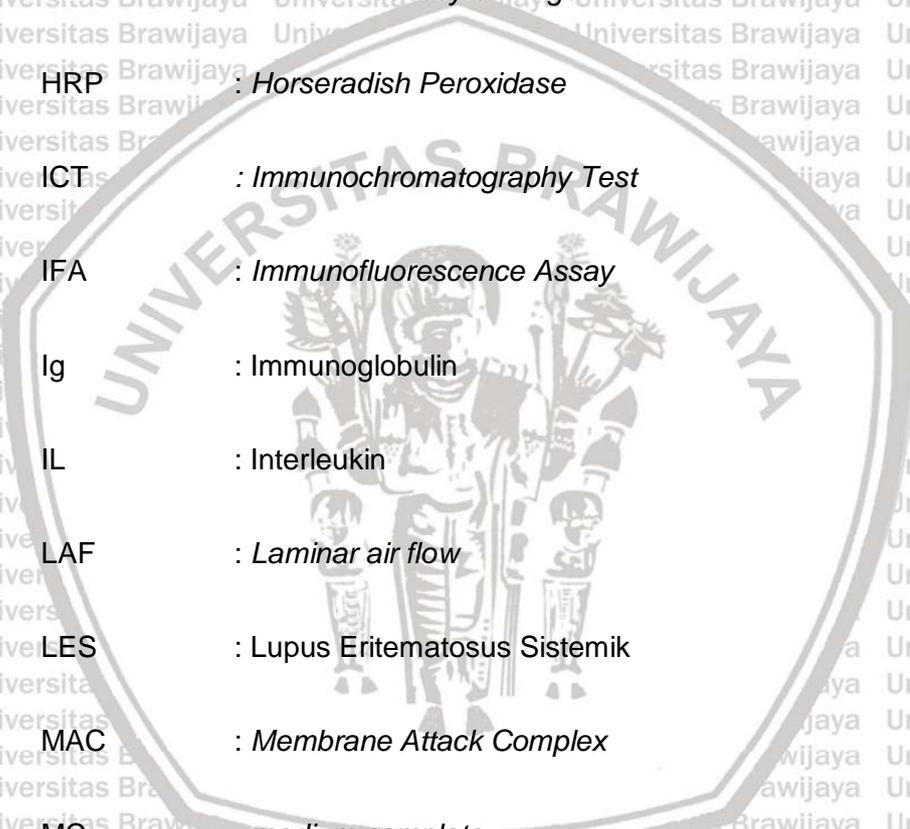
MC : *medium complete*

MBP : *Mannose Binding Protein*

mRNA : *messenger Ribonucleic Acid*

NK : *Natural Killer*

NMDA : *N-methyl-D-aspartate*



PBMC : *Peripheral blood mononuclear cell*

PDCD1 : *Programmed Cell Death 1*

PVDF : *Polyvinylidene Fluoride*

RIA : *Radio Immuno Assay*

ROC : *Receiver Operating Characteristic*

RSSA : *Rumah Sakit Saiful Anwar*

SF-M : *Serum free-media*

ssDNA : *single stranded DNA*

SLEDAI : *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*

SLICC : *Systemic Lupus International Collaborative Clinics*

SPSS : *Statistical Product and Service Solutions*

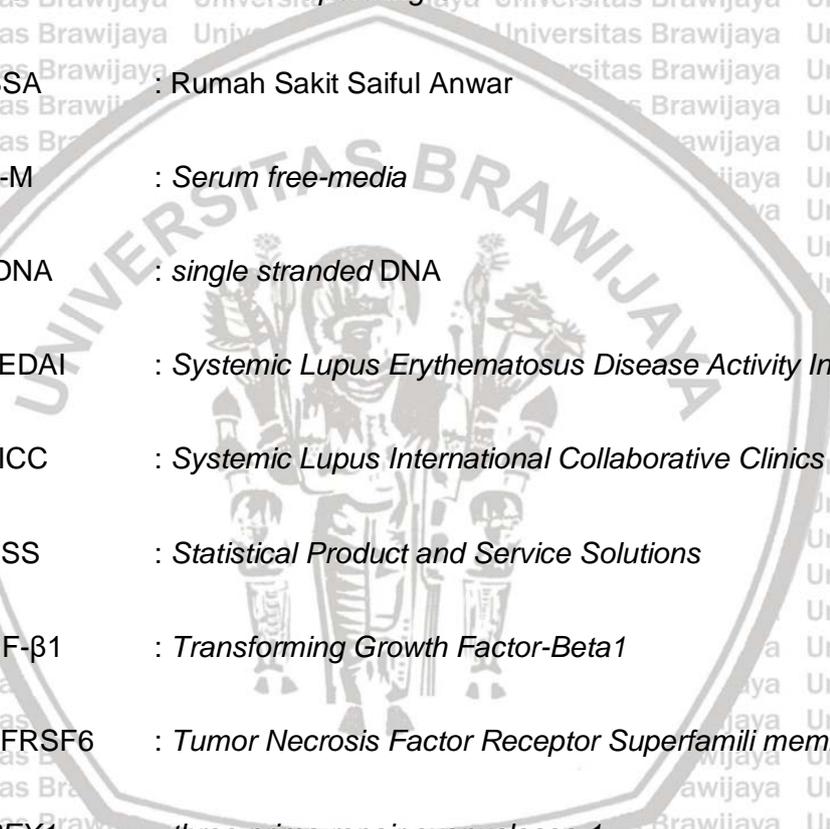
TGF- β 1 : *Transforming Growth Factor-Beta1*

TNFRSF6 : *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamili member 6*

TREX1 : *three prime repair exonuclease 1*

UV : *Ultra violet*

WHO : *World Health Organization*



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) adalah penyakit autoimun multisistem dengan etiologi yang belum diketahui secara pasti, namun telah dibuktikan bahwa terbentuknya autoantibodi memegang peranan penting. Autoantibodi yang terlibat merupakan autoantibodi terhadap komponen-komponen sel dan menyebabkan kerusakan pada jaringan atau organ dengan membentuk kompleks antigen-antibodi atau bereaksi silang dengan antigen yang terkait. (Hughes & UI-Hassan, 2006)

LES lebih sering terjadi pada wanita, dengan rasio wanita dibandingkan dengan pria mencapai 9 : 1. LES juga lebih sering ditemukan pada etnis tertentu, misalnya pada populasi Afrika atau Asia. Faktor predisposisinya meliputi faktor genetik, lingkungan (seperti paparan sinar UV), imunologis dan hormonal. Prevalensi LES di seluruh dunia diperkirakan 4–250 per 100.000. Insiden tertinggi berada di kalangan wanita dan kelompok usia 15–25 tahun. Di Amerika Serikat, jumlah pasien LES lebih dari 250.000 orang. Saat ini, usia harapan hidup pasien LES yang semakin meningkat, dari survival rate 4 tahun mencapai 50% pada tahun 1950an menjadi 80% untuk survival rate 15 tahun. (Rahman & Isenberg, 2008)

Manifestasi klinis LES sangat luas dan bervariasi, dapat berupa ruam, arthritis, anemia, trombositopenia, serositis, nefritis, kejang, bahkan juga

psikosis. Lupus seharusnya dipertimbangkan sebagai diagnosis diferensial pada hampir semua pasien dengan salah satu atau lebih manifestasi klinis serupa, terutama bila terjadi pada pasien wanita berusia 15 - 50 tahun. Angka mortalitas oleh LES mencapai angka yang cukup tinggi, dimana penyebab kematian disebabkan oleh gangguan jantung, infeksi, dan yang paling sering terjadi adalah komplikasi lupus pada ginjal atau dikenal dengan lupus nefritis yakni ditemukan sekitar 50% penderita (Dhar & Sokol, 2006). Selain itu, lupus juga dapat menimbulkan komplikasi kehamilan, seperti keguguran, preeklamsi, yang berkaitan dengan meningkatnya angka kematian ibu (AKI) di Indonesia. (Frankovich *et al.*, 2009; Bramham *et al.*, 2012).

Mengingat manifestasi klinis dan perjalanan penyakit LES yang sangat beragam dengan mortalitas yang tinggi, maka diperlukan upaya pengenalan dini serta penatalaksanaan yang tepat. Diagnosis lupus yang saat ini dinilai memiliki peran yang penting dan akurat adalah pemeriksaan autoantibodi, meliputi *antinuclear antibody* (ANA) dan *anti double strand DNA* (anti-dsDNA). Kedua pemeriksaan tersebut memiliki nilai validitas yang baik untuk menegakkan diagnosis lupus dan spesifik untuk lupus, dijumpai pada 40-90% pasien dengan penyakit aktif. (Pagana & Pagana, 2006)

Anti-dsDNA (*anti-double stranded DNA*) merupakan antibodi yang sangat spesifik untuk lupus, terutama pada pasien dengan penyakit aktif. Secara umum, peningkatan kontinyu kadar antibodi anti-dsDNA, dapat mengindikasikan peningkatan risiko eksaserbasi LES. (Dema & Charles, 2016; Villalta *et al.*, 2013)

Untuk mengembangkan kit untuk deteksi antibodi anti dsDNA, dibutuhkan antigen berupa *human DNA* (antigen dsDNA). Antigen dsDNA bisa didapatkan dengan mengekstraksi DNA, baik pada kromosom inti sel ataupun organel.

Prosedur yang sering digunakan adalah ekstraksi dsDNA dari *cultured cell line*, sel plasmid ataupun dari *whole blood* dan organ tubuh hewan coba. Pada penelitian ini digunakan isolasi dsDNA dari sel HeLa, cell line yang berasal dari sel kanker *cervix*, dengan keunggulan bahwa *cell line* ini dapat bertahan sangat tahan lama dan produktif, sehingga kegunaannya cukup luas dalam penelitian ilmiah. (Rahbari et al, 2009; Acrani et al, 2009). Dalam penelitian ini juga digunakan ekstraksi dsDNA dari *human lymphocyte* pada *whole blood*, karena sel limfosit (termasuk sel T, B limfosit dan NK sel) ini relatif lebih mudah untuk dimurnikan dan sampel darah lebih mudah didapatkan dari pasien ataupun kontrol sehat.

Penelitian *cross-sectional* oleh Sharmin et al di departemen Mikrobiologi Dhaka Medical mengevaluasi keunggulan *dot blot assay* untuk mengidentifikasi antibodi terhadap *Extractable Nuclear Antigen* (anti-ENA) terhadap penyakit *connective tissue disease* (CTD) dibandingkan dengan pengukuran menggunakan ELISA dengan sensitifitas dan spesifisitas yang cukup baik untuk SSA, SSB, Scl-70 antibodi dan RNP.(Sharmin et al, 2011) Sedangkan kit diagnostik untuk lupus sendiri belum banyak dikembangkan. Hal ini dikarenakan beragamnya jenis autoantibodi yang ditemukan pada pasien lupus, sehingga sulit untuk menentukan antibodi yang spesifik untuk diagnosis. Di Indonesia sendiri belum pernah dilakukan *profiling* autoantibodi pada pasien lupus, sehingga belum ada data mengenai autoantibodi apakah yang dominan dihasilkan oleh pasien lupus di Indonesia. Beberapa autoantibodi yang dilaporkan sering ditemukan pada pasien lupus di Indonesia antara lain ANA dan Anti-dsDNA (Kalim et al., 2012)

Kit komersial untuk LES yang beredar di Indonesia saat ini diproduksi oleh perusahaan asing. Namun ada beberapa kendala dalam menggunakan kit komersial tersebut, selain harganya mahal, perlu tenaga (analisis) yang berpengalaman dan hanya dapat dilakukan atau rujukan. Pemeriksaan ini sulit dilakukan pada layanan primer dan sekunder seperti laboratorium puskesmas yang merupakan ujung tombak diagnosis lupus. Dan hanya sedikit pasien yang mampu memanfaatkan fasilitas pemeriksaan laboratorium tersebut karena sebagian besar pasien lupus berasal dari golongan ekonomi yang rendah, sehingga diagnosis menjadi terlambat dengan prognosis yang menurun.

Beberapa kesulitan dalam diagnosis LES ini menyebabkan perlunya upaya pengembangan kit diagnostik lupus yang dapat diaplikasikan dengan mudah, khususnya pada pusat pelayanan kesehatan primer. Salah satu aplikasi alat diagnostik yang mudah dan cepat digunakan adalah metode *rapid test kit*, seperti yang diaplikasikan pada tes pemeriksaan kehamilan atau *immuno chromatographic test* (ICT) pada dengue. Berdasarkan uraian tersebut, dilakukan pengembangan alat diagnostik baru berdasarkan prinsip deteksi autoantibodi lupus untuk dijadikan suatu alat/kit diagnostik berbasis strip yang mudah digunakan untuk diagnosis dini lupus di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah Penelitian

Umum :

Bagaimanakah *performance* kandidat antigen dsDNA untuk deteksi antibodi anti-dsDNA?

Khusus :

1. Bagaimanakah profil antigenisitas (dsDNA) dari *whole blood* (sel limfosit) dan sel HeLa?
2. Bagaimanakah sensitifitas dan spesifisitas antigen (dsDNA) sebagai kandidat kit diagnostik autoantibodi anti-dsDNA dibandingkan *automatic analyzer* ELISA ?

1.3 Tujuan Penelitian**Tujuan Umum:**

Mengetahui *performance* kandidat antigen dsDNA untuk deteksi antibodi anti-dsDNA

Tujuan Khusus:

1. Menentukan profil antigenisitas (dsDNA) dari *whole blood* (sel limfosit) dan sel HeLa
2. Mengetahui sensitifitas dan spesifisitas antigen (dsDNA) sebagai kandidat kit diagnostik anti-dsDNA dibandingkan *automatic analyzer* ELISA.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini, yaitu:

- Ditemukannya profil antigen dsDNA yang berguna untuk menentukan autoantibodi yang spesifik untuk dikembangkan menjadi alat kit diagnostik lupus berbasis ICT (immunochromatographic test) yang baru di Indonesia

- Membantu meningkatkan diagnosis dini penyakit LES, terutama di layanan primer dan sekunder dengan harga yang terjangkau dan aplikasi penggunaan yang mudah.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Lupus Eritematosus Sistemik

2.1.1. Definisi

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) adalah penyakit multisistem yang ditandai dengan adanya inflamasi yang tersebar luas, yang mempengaruhi setiap organ atau sistem dalam tubuh. Penyakit ini berhubungan dengan deposisi autoantibodi dan kompleks imun yang menyebabkan kerusakan jaringan. LES termasuk *soluble immune complexes disease*, dimana gambaran klinisnya cukup luas dan dapat melibatkan banyak organ tubuh (sendi, paru, otot, dan ginjal), serta perjalanan penyakitnya ditandai dengan remisi dan eksaserbasi. Pada pasien LES ditemukan pula antibodi yang berbeda, sehingga target organ spesifiknya berbeda. Dengan dua ciri antibodi tersebut memungkinkan LES dapat menyebabkan kerusakan jaringan luas. (Sudoyo, 2009; Tutuncu ZN, 2007).

2.1.2. Epidemiologi

LES diderita oleh 15-24/100.000 orang di seluruh dunia. Secara keseluruhan, penyakit autoimun mengenai kurang lebih 8% populasi, sehingga sebenarnya merupakan golongan penyakit yang paling banyak dijumpai, dimana sekitar 78% diantaranya adalah perempuan. Khususnya pada penyakit reumatik autoimun sistemik seperti LES, insiden pada wanita lebih banyak dijumpai dibanding pria dengan perbandingan berkisar 9-14 : 1. LES lebih banyak

ditemukan pada ras Afro-Amerika, Hispanik, Asia dan penduduk Amerika asli.

Sebagian pasien yang terdiagnosis sebagai LES dalam rentang umur 15-40 tahun, dan jarang terdiagnosis pada usia tua. Beberapa data yang ada di Indonesia, dari 3 peneliti di departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/ RSCM Jakarta pada periode yang berbeda dan menggunakan kriteria LES yang berbeda pula (kriteria Dubois, kriteria pendahuluan ARA, kriteria ARA yang diperbaiki), diperoleh hasil: pada tahun 1969-1970 ditemukan 5 kasus LES (Ismail Ali) ; pada tahun 1972-1976 ditemukan 1 kasus LES dari setiap 666 kasus yang dirawat (insidensi 15 per 10.000 perawatan); 1988-1990 insidensi rata-rata sebesar 37,7 per 10.000 perawatan. Insidensi di Yogyakarta tahun 1983-1986 ialah 10,1 per 10.000 perawatan (Purwanto, dkk). Di Medan antara 1980-986 insidensi LES sebesar 1,4 per 10.000 perawatan (Tarigan, dkk). (Sudoyo, 2009)

2.1.3. Etiologi Patologi

Etiologi-patologi LES belum diketahui secara pasti, diduga melibatkan interaksi yang kompleks dan multifktorial antaravariasi genetik dan faktor lingkungan. Faktor lain sebagai faktor predisposisi LES yaitu infeksi virus dan kelainan hormonal. Interaksi antara sex, status hormonal, dan aksis hipotalamus-hipofise-adrenal (HPA) mempengaruhi kepekaan dan ekspresi klinis LES. Adanya gangguan dalam mekanisme pengaturan imun seperti gangguan pembersihan sel-sel apoptosis dan kompleks imun merupakan kontributor yang penting dalam perkembangan penyakit ini. Hilangnya toleransi imun, meningkatnya beban antigenik (*antigenic load*), ekspresi sel T yang berlebihan,

gangguan supresi sel B dan peralihan respon imun dari T-helper 1(Th1) ke Th2 menyebabkan hiperaktivitas sel B dan memproduksi autoantibodi patogenik.

Respon imun yang terpapar faktor eksternal/lingkungan seperti radiasi ultraviolet (UV) atau infeksi virus dalam priode yang cukup lama bisa menyebabkan disregulasi sistem imun. (Longo et al, 2009; Sudoyo, 2009; Tutuncu ZN, 2007).

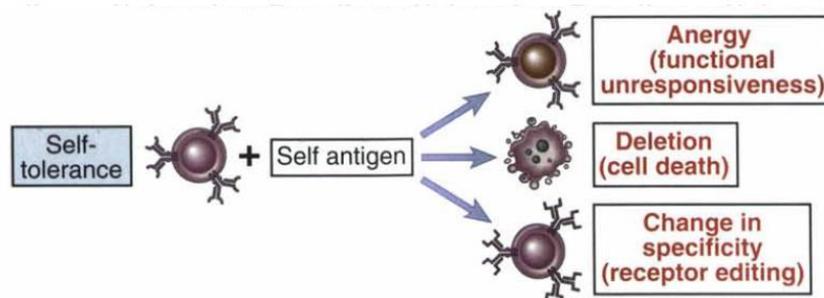
2.1.4. Patogenesis

Interaksi antara *susceptibility genes* dan faktor lingkungan menghasilkan respon imun yang abnormal pada penderita LES. Respon tersebut meliputi : (1) aktifasi *innate immunity* (sel dendritik), (2) penurunan ambang aktivasi dari sel imun adaptif (*antigen-specific* limfosit T dan B), (3) regulasi dan inhibisi inefektif dari sel T CD4 dan CD8+, (4) penurunan bersihan sel apoptosis dan kompleks imun.(Longo et al, 2009)

Sel B dan sel T berinteraksi saling menstimulasi satu sama lain. Sitokin yang dihasilkan pada aktifasi sel T akan mempengaruhi proliferasi sel B, *switching antibody* dari IgM menjadi IgG, dan menyebabkan perubahan pada urutan molekul antibodi yang disekresi sehingga antibodi tersebut dapat mengikat antigen dengan lebih kuat. Dengan demikian, aktifasi sel T pada penderita LES memungkinkan peningkatan produksi autoantibodi IgG yang memiliki afinitas tinggi. Antibodi tersebut terkait erat dengan kerusakan jaringan pada lupus. Sel T regulator berfungsi menekan aktivasi sel T helper dan sel B.

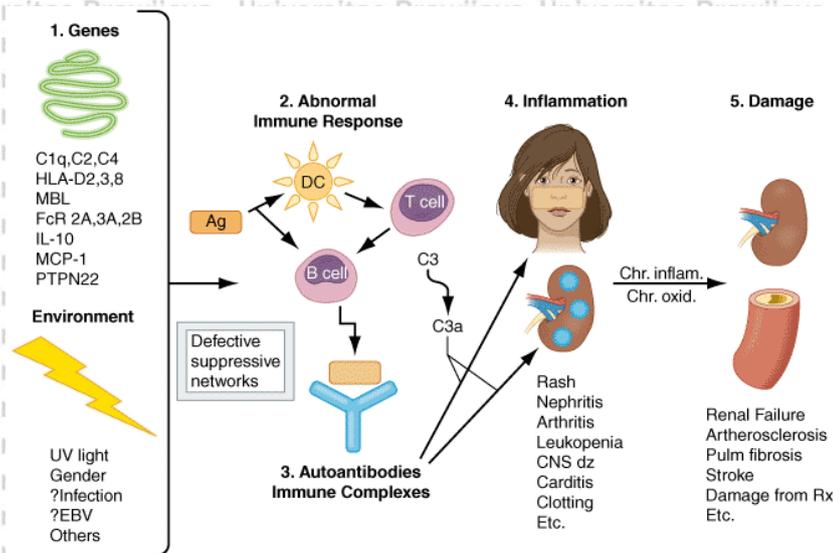
Beberapa peneliti telah melaporkan adanya penurunan sel T regulator pada penderita LES, baik dalam jumlah, fungsi atau keduanya. Penelitian menunjukkan bahwa sel T regulator pada penderita dengan lupus aktif memiliki kemampuan yang lebih rendah untuk menekan proliferasi sel T helper,

dibandingkan dengan sel T regulator pada penderita dengan lupus inaktif atau kontrol sehat. (Rahman & Isenberg, 2008)



Gambar 2.1. Mekanisme *self-tolerance* pada individu sehat (Abbas et al, 2007)

Pada LES, sel B autoreaktif memproduksi antibodi multipel yang bereaksi dengan berbagai macam antigen *self* dari sitoplasma dan nuklear. Sebagian dari autoantibodi ini akan membentuk kompleks imun bersama dengan nukleosom (DNA-histon), kromatin, C1q, laminin, Ro (SS-A), ubikuitin dan ribosom, yang kemudian akan membuat deposit kompleks imun pada berbagai jaringan. Kompleks imun ini akan mengaktifkan kaskade komplemen yang menyebabkan *complement-mediated damage*, infiltrasi leukosit, aktivasi faktor prokoagulan dan pelepasan berbagai sitokin yang dapat menyebabkan kerusakan pada berbagai organ target. Aktifasi kaskade komplemen terjadi melalui 3 jalur yaitu jalur klasik, alternatif dan lektin. Aktivasi jalur klasik terkait dengan deposit kompleks imun pada LES, dimana aktivasi diawali oleh pengikatan C1q ke Fc reseptor IgM atau *C-fixing isotypes* dari IgG. Sistem komplemen selanjutnya melakukan bersihan dari kompleks imun melalui pembentukan *membrane attack complex* (MAC). (Sudoyo, 2009; Longo et al, 2008; Ortega et al, 2010)



Source: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: <http://www.accessmedicine.com>
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

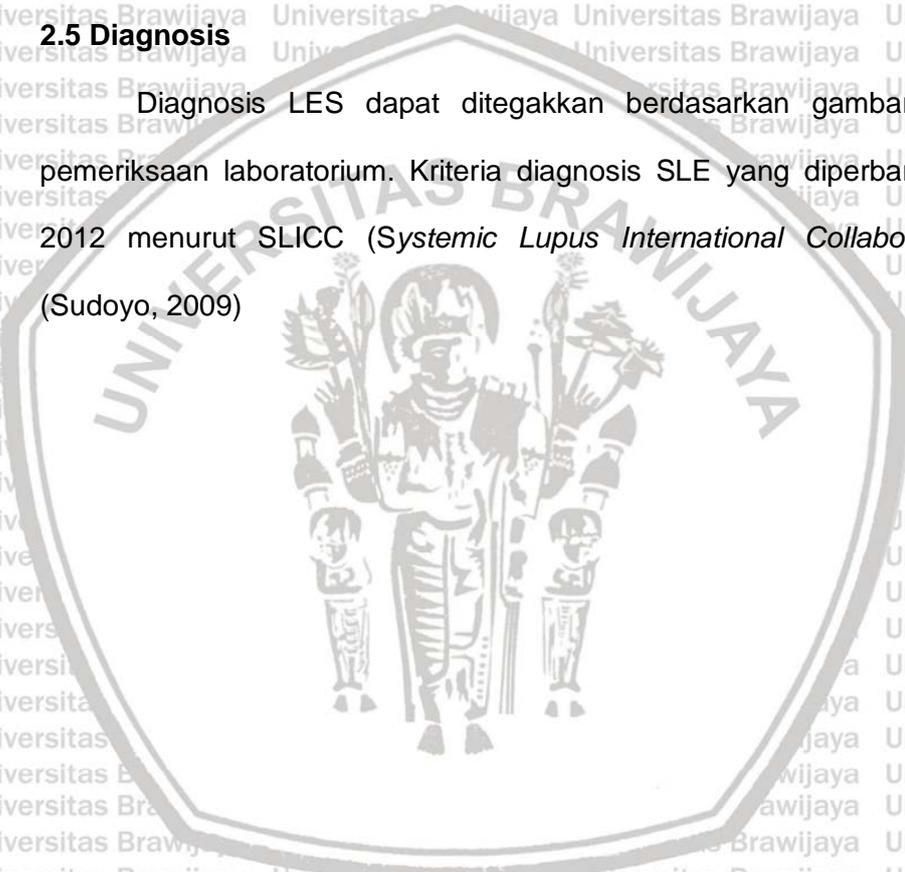
Gambar 2.2 Patogenesis LES (Longo, 2008)

Defisiensi protein jalur komplemen klasik (C1q, C1r, C1s, C2 atau C4) dapat dihubungkan dengan patogenesis LES. Individu dengan defisiensi C1q berisiko tinggi terkena LES karena C1q penting untuk inisiasi aktivasi komplemen. Selain inisiasi aktivasi komplemen, C1q juga berperan mengikat debris sel yang kemudian difagosit oleh makrofag yang memiliki reseptor permukaan C1q. Gangguan bersihan tersebut menyebabkan debris sel dikenali sebagai antigen yang selanjutnya dapat memicu respon imun (Abbas, 2007; Avihingasanon et al, 2006). Gangguan bersihan sel apoptosis karena penurunan aktivitas sel dendritik, makrofag, monosit dan neutrofil juga merupakan faktor kerentanan penting dalam etiopatogenesis LES. Selama apoptosis, *blebs* berisi materi selular terbentuk pada permukaan sel tersebut. Antigen yang seharusnya tersembunyi di dalam sel menjadi terpapar ke permukaan sel, sehingga dapat memicu respon imun. Disregulasi apoptosis (bersihan yang kurang adekuat dari sel apoptosis dan sisa-sisa nuklear) dapat menyebabkan autoimunitas melalui paparan sistem imun terhadap komponen nuklear dan membran sel (Rahman &

Isenberg, 2008; Wallace, 2007). Mutasi atau polimorfisme gen yang terkait dengan defek pada apoptosis ini meliputi gen *tumor necrosis factor receptor superfamili member 6* (TNFRSF6 atau FAS), *Fas ligand* (FasL), *deoxyribonuclease 1* (DNase1), *three prime repair exonuclease 1* (TREX1), dan *programmed cell death 1* (PDCD1). (Avihingsanon et al, 2007)

2.5 Diagnosis

Diagnosis LES dapat ditegakkan berdasarkan gambaran klinik dan pemeriksaan laboratorium. Kriteria diagnosis SLE yang diperbarui pada tahun 2012 menurut SLICC (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics*). (Sudoyo, 2009)



Tabel 2.1 Kriteria Diagnosis Lupus Eritematosus Sistemik (SLICC 2012)

Kriteria Klinis	Kriteria Laboratoris
1. Lupus kutaneus akut atau lupus subkutan akut	1.ANA
2. Lupus kutaneus kronik	2.Anti-dsDNA
3. Ulkus oral atau nasal	3.Anti-Sm
4. Alopesia tanpa jaringan parut (non-scarring alopecia)	4.Antibodi antifosfolipid
5. Artritis	5. Komplemen yang rendah (C3-C4)
6. Serositis	6. Test coombs direk (tidak dihitung bila terdapat anemia hemolitik pada pasien)
7. Manifestasi renal: rasio protein:kreatinin atau protein urine kuantitatif 24 jam 500 mg / 24 jam atau lebih atau ditemukan sedimen eritrosit	
8. Manifestasi neurologis: kejang, psikosis, myelitis,mononeuritis multipleks,neuropati parifer atau kranial,delirium.	
9. Anemia hemolitik	
10. Leukopenia (4000/mm ³) atau limfopenia (<1000/mm ³)	
11. Trombositopenia (<100.000/mm ³)	

Keterangan:

SLE didefinisikan minimal 4 kriteria (dengan paling sedikit masing-masing 1 kriteria klinis dan 1 kriteria laboratoris) ATAU biopsi ginjal sesuai nefritis lupus dengan ANA atau Anti dsDNA Positif

2.2 Autoantibodi anti-dsDNA

Lupus Erythematosus sistemik (LES) ditandai oleh spektrum auto-antibodi yang luas, yang dapat mengenali beberapa komponen seluler. Produksi *self-reactive* antibodi ini bersifat fluktuatif selama perjalanan penyakit dan keterlibatan *antibody-secreting cells* yang berbeda berperan penting dalam patogenesis penyakit. Sel-sel distimulasi melalui berbagai cara, sehingga akan mensekresikan berbagai isotipe dan afinitas yang berbeda. Masing-masing memiliki mekanisme tertentu dalam berikatan dengan antigen spesifik dan dikenali oleh reseptor yang berbeda. Respons efektor akan menyebabkan peradangan jaringan kronis. Autoantibodi ds-DNA adalah autoantibodi yang paling sering diteliti dan memiliki peranan penting dalam patogenesis nefritis Lupus. (Houssiau, 2004; Dema & Charles, 2016)

Autoantibodi adalah suatu antibodi yang terbentuk terhadap bagian dari protein tubuh sendiri. Pada keadaan normal, manusia hanya membentuk antibodi terhadap kuman yang menginfeksi tubuh sebagai suatu mekanisme pertahanan. Pada pasien lupus terbentuk autoantibodi yang merupakan manifestasi dari hilangnya toleransi terhadap antigen sendiri yang mengawali terjadinya peradangan menahun. Banyak autoantibodi yang dapat ditemukan pada seorang pasien lupus, akan tetapi pada tahap awal yang penting ialah *Anti Nuclear Antibody* (ANA), suatu antibodi yang bereaksi terhadap antigen nukleus, nukleoli atau perinuklear seperti asam nukleat, histon, kromatin, dan protein ribonuclear. Nilai ANA mempunyai validitas yang baik untuk menegakkan diagnosis dan termasuk suatu kriteria untuk membuat diagnosis lupus. (Kavanaugh, *et al.*, 2000)

Autoantibodi lain yang ditemukan pada pasien lupus adalah autoantibodi anti-dsDNA (*anti-double stranded DNA*), suatu penanda penting yang digunakan dalam diagnosis dan evaluasi lupus. Antibodi ini sangat spesifik untuk lupus, dijumpai pada 40-90% pasien dengan penyakit aktif. Namun, beberapa pasien dengan penyakit rematik lain atau hepatitis kronis aktif mungkin memiliki peningkatan titer anti-dsDNA yang ringan atau sedang (Pagana & Pagana, 2006). Pada periode lampau, anti-dsDNA ini diukur dengan metode presipitasi, fiksasi komplemen, hemaglutinasi pasif, *Radio-Immuno-Assay* (RIA terutama *Farr assay*). Saat ini, anti-dsDNA lebih sering diperiksa dengan metode *Immuno-Fluorescence-Assay* (IFA) atau *Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay* (ELISA). Sensitifitas metode tersebut sekitar 75-90%. (Dema & Charles, 2016)

Antibodi anti ds-DNA pertama kali ditemukan pada akhir tahun 1950an, merupakan autoantibodi terhadap asam deoksiribonukleat (DNA) yang sangat heterogen berdasarkan aviditasnya, komposisi subkelas imunoglobulin, reaktivitas silang (*cross-reactivity*) dan *complement-fixing ability*. DNA secara primer berbentuk *double stranded* (dsDNA) dan sering ditemukan terhubung dengan histon, dalam bentuk nukleosom. (Tutuncu, 2007)

Pada LES, antibodi anti-DNA dikelompokkan menurut reaktivitasnya terhadap DNA; yaitu antibodi terhadap *single stranded DNA* (ssDNA) yang tidak spesifik untuk LES, dapat ditemukan pada serum pasien dengan penyakit rematik maupun non rematik. Antibodi yang berikatan secara spesifik terhadap dsDNA mungkin mengenali *ribose/phosphate backbone*, pasangan basa atau konfirmasi lain dari *double helix*.

Antibodi anti-dsDNA pertama kali ditemukan dalam serum pasien LES pada tahun 1957 dan prevalensi berkisar antara 60 - 90% pasien. Secara *in vivo*, DNA yang diperkenalkan pada sistem kekebalan tubuh adalah bagian dari struktur kromatin yang mengandung histon (dalam bentuk oktamer yang disebut nukleosom) dimana DNA menjadi penyusun utamanya. Namun antibodi terhadap dsDNA mamalia, yang dideteksi oleh teknik laboratorium yang berbeda pada serum pasien LES, bersifat spesifik untuk struktur yang berbeda: *elongated nucleosome linker* B-DNA (double helix), fosfodeoksiribose *backbone*; struktur DNA *high-order bent* seperti yang terdapat pada nukleosom atau DNA kinetoplas *Crithidia luciliae*; regio ssDNA yang mungkin terdapat di DNA (nukleosomal); Z-DNA dan *cruciform DNA structures*. (Dema & Charles, 2016)

Beberapa hipotesis telah dikemukakan untuk menjelaskan sifat imunogenik dsDNA dan asal antibodi anti-dsDNA. Untuk mendapatkan respon imun yang terus-menerus, diperlukan stimulus sel T helper (TH) untuk sel B yang spesifik terhadap dsDNA. Protein nukleosom yang berbeda (peptida dengan afinitas tinggi terhadap kromatin) diduga dapat mendorong proses ini, dengan mempresentasikan pada MHC kelas II dan memberikan molekul costimulator pada sel TH. Oleh karenanya, adanya antibodi anti-dsDNA dapat memprediksi sejumlah spektrum antibody lain yang spesifik terhadap *chromatin ligands* dan struktur. (Dema & Charles, 2016)

Peningkatan titer antibodi anti-dsDNA merupakan salah satu kriteria serologis klasifikasi ACR. Dalam beberapa penelitian telah disimpulkan bahwa kadar antibodi anti-dsDNA memiliki nilai prognostik dan dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas penyakit pada pasien. Secara umum, peningkatan kontinyu kadar antibodi anti dsDNA, dapat mengindikasikan peningkatan risiko

eksaserbasi LES. Peningkatan kadar secara mendadak dan dramatis, terutama bila disertai dengan penurunan kadar konsentrasi plasma komplemen hemolitik total (C3 dan C4), dapat menunjukkan resiko terjadinya *flare*. (Hughes & UI-Hassan, 2006; Sudoyo, 2009).

Antibodi anti-dsDNA juga diduga berperan dalam patogenesis LES dalam menginduksi gejala di ginjal, ditunjukkan dengan adanya korelasi kuat pada lupus nephritis, antara aktivitas penyakit dengan kadar antibodi anti dsDNA.

Peningkatan kadar antibodi terhadap dsDNA ini diduga berkaitan dengan eksaserbasi glomerulonephritis (Dema & Charles, 2016; Villalta et al, 2013).

Pemeriksaan Laboratorium antibodi anti-dsDNA

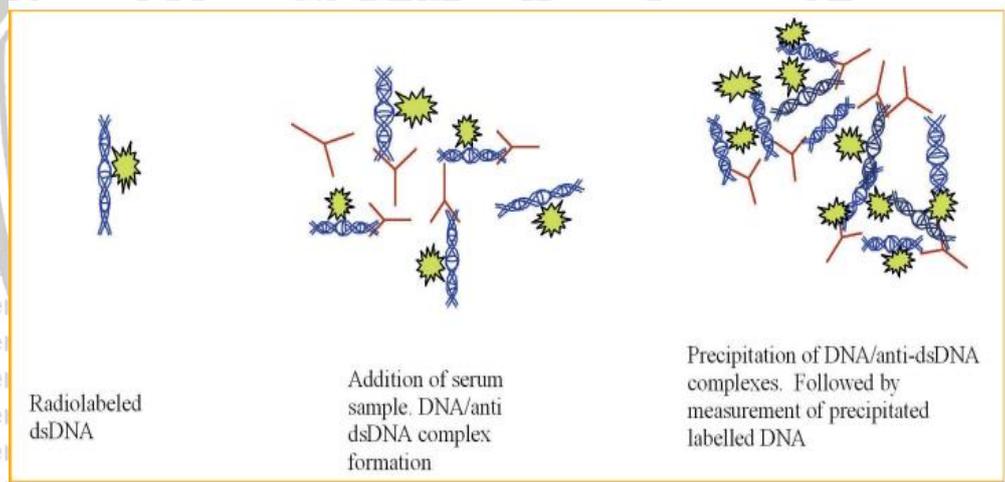
Ada beberapa teknik yang digunakan untuk mendeteksi antibodi anti-dsDNA. Metode awal yang digunakan seperti uji fiksasi komplemen dan hemaglutinasi saat ini sudah tidak digunakan lagi. Metode yang sering digunakan saat ini meliputi immunofluorescent assays (IFA) pada *Crithidia lucilliae*, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) dan radioimmunoassays (RIA). Saat ini, anti-dsDNA lebih sering diperiksa dengan metode *Immuno-Fluorescence-Assay* (IFA) atau *Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay* (ELISA). Sensitivitas metode tersebut sekitar 75-90%. (Dema & Charles, 2016)

Radio-immunoassays (RIA)

Jenis RIA yang paling sering digunakan untuk mendeteksi antibody anti-dsDNA adalah uji Farr, dimana *radiolabelled-dsDNA* diinkubasi dengan serum yang mengandung antibodi anti-dsDNA. Kompleks imun yang terbentuk akan dipresipitasi oleh ammonium sulfat. Akibat konsentrasi garan yang tinggi dalam

proses presipitasi ammonium sulfat, kompleks dsDNA/anti-dsDNA dengan aviditas rendah akan terpisah, sehingga uji ini hanya akan mendeteksi antibodi anti-dsDNA dengan aviditas yang cukup tinggi.

Alternatif lain adalah dengan mempresipitasi kompleks imun dengan *polyethylene glycol* (PEG RIA). Ini akan mencegah disosiasi kompleks imun dengan aviditas rendah, sehingga dapat mendeteksi baik yang aviditasnya rendah maupun tinggi. Sumber dsDNA juga harus diseleksi dengan baik, untuk memastikan benar-benar *double stranded* dan cukup spesifik. Yang biasa digunakan adalah dsDNA yang berasal dari *circular doublestranded bacteriophage DNA* atau plasmid. (Dema & Charles, 2016)



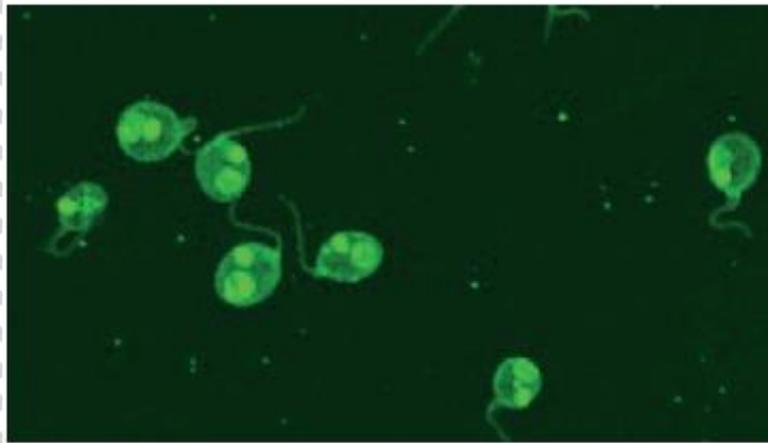
Gambar 2.3. Prinsip kerja RIA dalam mendeteksi antibody anti-dsDNA (Dema & Charles, 2016)

Immunofluorescence assays (IFA)

Crithidia luciliae adalah organisme protozoa monoflagellate yang mengandung *giant-kinetoplast packed with mitochondria*. Di dalam kinetoplast terdapat DNA mitokondrial yang berisi dsDNA sirkular. Antibodi yang menargetkan dsDNA dapat dideteksi berdasarkan kemampuan mereka untuk

mengikat dsDNA di dalam kinetoplas. Tes ini memiliki spesifisitas yang tinggi.

Antibodi yang terikat (biasanya dari kelas IgG), dideteksi dengan menggunakan konjugat fluoresens dan dapat diamati dengan mikroskop epi-fluoresensi.



Gambar 2.4. Anti ds-DNA dengan pewarnaan IFA pada *Crithidia luciliae* (Dema & Charles, 2016)

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

Penggunaan ELISA untuk pemeriksaan antibody anti-dsDNA sudah digunakan secara luas. Selain dapat memberikan hasil secara kuantitatif, ELISA juga relatif lebih mudah dilakukan, relatif tidak terlalu mahal, dan tidak menggunakan radiolabel. ELISA telah distandarisasi oleh WHO sebagai metode pemeriksaan anti-dsDNA.

Tabel 2.2. Perbandingan metode deteksi antibodi anti-dsDNA (Dema & Charles, 2016)

Metodologi	Prinsip	Aviditas Ab	Kelas Ab	Keuntungan	Format hasil	Kelemahan
Farr RIA	Radiolabeled dsDNA diinkubasi dengan serum yang mengandung antibody anti-dsDNA. Kompleks imun dipresipitasi dengan penambahan ammonium sulfat	Tinggi	Semua	Spesifisitas tinggi terhadap LES	Kuantitatif Dapat distandarisasi dalam IU/mL	- Tidak spesifik isotype – dapat mendeteksi IgM Ab - Radiolabel - Butuh tenaga khusus - Mahal - Kontaminasi ssDNA dapat false positif
IFA Chritidia	Antibodi anti-dsDNA berikatan dengan dsDNA dalam kinetoplas. Antibodi yang terikat dideteksi dengan konjugat fluoresens, diamati dengan mikroskop epi-fluoresens	Medium tinggi	- Tergantung spesifisitas konjugat	- Spesifik - Teknik pemeriksaan umum - Isotype Ab dapat diketahui - Tidak ada interferens antibodi anti-ssDNA	Hasil semi kuantitatif – positif, negative atau endpoint	- Terkadang dapat false positif - Waktu lama - Subyektif
ELISA	Kalibrator dan sampel pasien dimasukkan dalam well, antibody yang mengenali antigen dsDNA akan berikatan. Diukur: perubahan warna.	Tinggi dan rendah	Sebagian besar berupa kelas IgG	- Sangat sensitif - Dapat diotomatisasi - Tidak radiolabel	Hasil kuantitatif (IU/mL)	- Kontrol menunjukkan tidak adanya anti-ssDNA harus dimasukkan

2.3 Cell Line (HeLa Cells)

HeLa adalah salah satu jenis *cell line immortal* yang sering digunakan pada penelitian, juga merupakan *human cell line* yang tertua. Sel ini berasal dari sel kanker cervix yang diambil pada 8 February 1951 dari Henrietta Lacks, penderita kanker cervix yang meninggal pada 4 Oktober 1951. *Cell line* ini dapat bertahan sangat tahan lama dan produktif, sehingga kegunaannya cukup luas dalam penelitian ilmiah. (Rahbari et al, 2009; Acrani et al, 2009)

Ahli biologi sel George Otto Gey menemukan bahwa sel ini dapat tetap hidup, dan setelah berhasil mengisolasi satu sel tertentu, kemudian memperbanyaknya, dan mengembangkan *cell line*. Nama 'HeLa' diambil dari dua huruf pertama dari nama depan dan belakang pasien. Ini adalah sel manusia pertama yang tumbuh di laboratorium yang secara 'immortal' secara alami, yang berarti bahwa sel ini tidak mati dan menua setelah sejumlah pembelahan sel, sehingga dapat digunakan untuk melakukan banyak eksperimen medis.

Salah satu penggunaan sel HeLa dalam penelitian medis adalah pengembangan vaksin polio oleh Jonas Salk pada tahun 1952. Sel HeLa juga merupakan *human cell line* pertama yang berhasil dikloning pada tahun 1953 oleh Theodore Puck dan Philip I Marcus di University of Colorado, Denver (Puck et al, 1955). Sejak saat itu, sel HeLa telah digunakan untuk berbagai penelitian medis tentang kanker, AIDS, efek radiasi dan zat beracun, dan lain-lain.

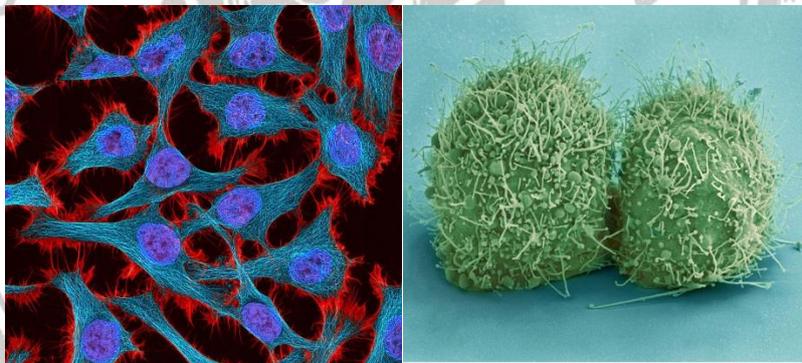
Sel HeLa, seperti *cell line* lainnya, disebut "immortal" karena mereka dapat membelah dalam jumlah yang tidak terbatas pada kultur sel laboratorium selama berada pada lingkungan yang sesuai. Ini dikarenakan sel HeLa merupakan sel kanker yang dapat bermultiplikasi dan tumbuh dengan cepat dibandingkan sel normal. Sel ini juga dapat menyebar dan menginfeksi sel lain.

Sel HeLa dapat menjadi kanker setelah terinfeksi virus human papilloma virus 18 (HPV18).

Pada sel normal, *Hayflick limit means cells* berarti bahwa suatu sel hanya dapat bermitosis dalam jumlah tertentu saja, karena telomer pada ujung kromosom memendek pada setiap kali pembelahan. Ini tidak berlaku untuk banyak jenis sel kanker, karena sel tersebut menghasilkan enzim yang disebut

telomerase, yang dapat memanjangkan telomer setelah kromosom disalin, sehingga memungkinkan sel membelah terus menerus.

Sel HeLa terkadang sulit dikendalikan karena adaptasi mereka terhadap pertumbuhan di kultur jaringan. Dengan *maintenance* yang kurang tepat, mereka dapat mengkontaminasi kultur sel lainnya di laboratorium yang sama, mengganggu penelitian biologis dan memaksa peneliti untuk menyatakan banyak hasil tidak valid. Tingkat kontaminasi sel HeLa di antara jenis sel lainnya tidak diketahui karena hanya sedikit peneliti yang menguji identitas atau kemurnian cell lines. Tingkat kontaminasi cell in vitro oleh sel HeLa diperkirakan berkisar antara 10% - 20%. Stanley Gartler (1967) dan Walter Nelson-Rees (1975) adalah orang pertama yang menerbitkan kontaminasi berbagai lini sel oleh HeLa (Macville et al, 1999)



Gambar 2.5. A. Foto multiphoton fluorescence sel HeLa dengan pewarnaan actin binding toxin phalloidin (merah), microtubules (biru) dan nucleus sel (biru).

Dengan mikroskop Nikon RTS2000MP custom laser scanning B. Scanning electron micrograph dari sel HeLa yang baru membelah. Zeiss Merlin HR-SEM.

2.4 Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) adalah semua sel pada darah perifer dengan nukleus berbentuk mononuklear, terdiri dari limfosit (sel T, sel B, sel NK) dan monosit. Pada sampel darah perifer manusia, limfosit merupakan populasi PBMC terbanyak, diikuti oleh monosit, dan sebagian kecil berupa sel dendritic (Bausinger and Speit, 2016)

Sampel darah perifer manusia sering digunakan dalam berbagai penelitian, baik dalam bentuk *whole blood* maupun PBMC, karena sampel relatif mudah didapatkan dan mengandung berbagai sel darah dalam jumlah cukup banyak. PBMC digunakan secara luas dalam berbagai penelitian, terutama di bidang imunologi (termasuk mengenai autoimun), infeksi, keganasan hematologis, pengembangan vaksin, transplantasi, dan sebagainya. (Collins et al, 2012). Fraksi PBMC dari *whole blood* didapatkan dengan diisolasi dengan Ficoll-Paque – suatu polisakarida hidrofilik, yang setelah sentrifugasi dapat memisahkan darah menjadi beberapa lapisan, dimana lapisan teratas adalah plasma, diikuti dengan lapisan PBMC, dan kemudian sel-sel polimorfonuklear dan eritrosit kemudian dilakukan sentrifugasi. Hasil sentrifugasi akan didapatkan PBMC, yang sebagian besar terdiri dari limfosit (95-98%). Karena limfosit mencakup mayoritas dari PBMC, maka istilah '*isolated lymphocyte*' juga digunakan untuk menyebut PBMC. (Bausinger and Speit, 2016)

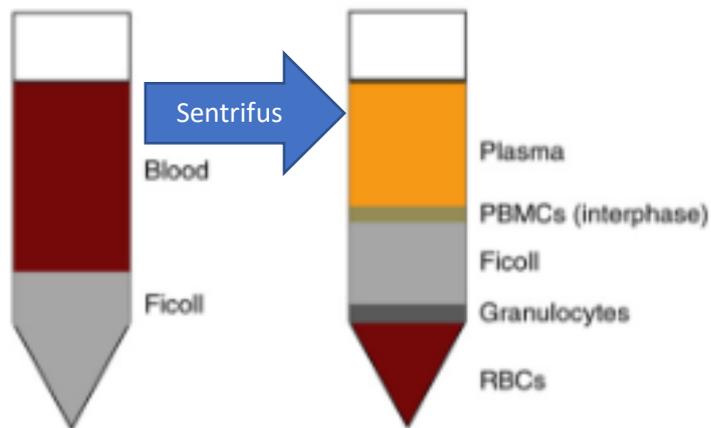
Mekanisme

Sebagian besar PBMC bersifat naif atau '*resting cells*' tanpa fungsi efektor. Saat tidak ada respon imun kontinyu dari sel T, fraksi terbesar dari PBMC, sel T akan bersifat sebagai naif atau sel T memori. Demikian pula

dengan sel B, yang masih bersifat naif sampai pada saat terpapar antigen dan sel B berdiferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi antibody. Di darah perifer, frekuensi limfosit yang spesifik untuk satu antigen saja sangat rendah. Karena itu digunakan aktivator poliklonal pada stimulasi invitro sehingga dapat memstimulasi sebagian besar limfosit, terlepas dari spesifisitas antigennya. Aktivator yang sering digunakan adalah *mitogenic lectins* dan *carbohydrate-binding protein*.(Ashraf and Khan, 2003)

Berbagai faktor fisiologis seperti status nutrisi, kadar hormonal dan inflamasi dapat mempengaruhi reaktivitas sel imun, oleh karenanya, komposisi PBMC tergantung pada donor dan status fisiologisnya. Bila dibandingkan dengan penggunaan *cell lines*, ini akan dapat menyebabkan variasi inter-eksperimental saat digunakan donor multipel. Walaupun demikian, penggunaan donor yang berbeda-beda dapat meningkatkan variasi, kekuatan reproduibilitas dari hasil yang didapatkan.

PBMC merupakan akses yang mudah terhadap sel imun tubuh manusia, namun sel PBMC dapat memiliki perbedaan fenotipik dengan sel imun di organ tubuh. Selain itu, penggunaan PBMC pada penelitian invitro, stimulus dari lingkungan akan lebih terbatas daripada kondisi invivo. Ini dapat menimbulkan respon sel imun yang berbeda dan harus dipertimbangkan dalam menginterpretasi hasil

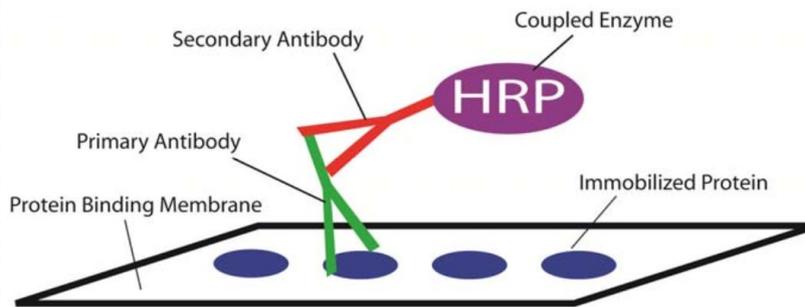


Gambar 2.6 Protokol PBMC *buffy coat*

2.5 Dot Enzyme Immunoassay (DEI)

Dot blot merupakan bentuk *western blotting* yang tidak memerlukan elektroforesis. Dot blot adalah metode dasar yang digunakan dalam penelitian dan pemeriksaan laboratorium diagnostic. Dot blot berupa teknik sederhana untuk mengidentifikasi protein yang telah diketahui pada sampel biologis. Kemudahan dan kesederhanaan tekniknya menyebabkan dot blotting sebagai alat diagnostik ideal. (Fatchiyah, 2012)

Komponen utama Dot blotting adalah penggunaan immunodetection untuk mengidentifikasi protein spesifik. Setelah protein di-immobilisasi pada *protein binding membrane*, biasanya digunakan kertas nitroselulose atau PVDF (*polyvinylidene fluoride*) dalam bentuk dot, selanjutnya di-*probe* dengan antibodi primer yang spesifik terhadap antigen yang akan ditentukan. Adanya antigen selanjutnya dilacak dengan antibodi kedua (antiglobulin terhadap antibodi primer) yang dilabel enzim sehingga dapat memberi perubahan warna pada bahan kromogen yang terdapat dalam substrat. (Handojo, 2004)

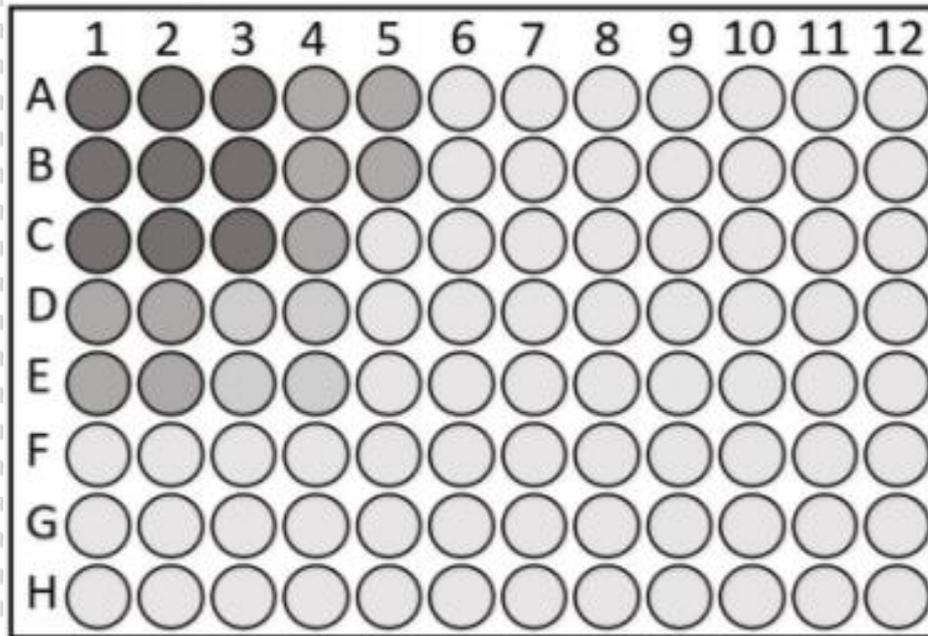


Gambar 2.6. Prinsip kerja Dot Enzyme Immunoassay (DEI)

Prosedur pemeriksaan *dot enzyme immunoassay* meliputi beberapa tahap

- Pengikatan protein atau antigen pada membran
 - Bagian membrane yang tidak mengikat protein diblokade. Tahap ini disebut juga tahap blokade
 - Penambahan antibodi primer atau antibodi dalam specimen klinis (antibodi yang akan ditentukan) terhadap antigen/protein yang terikat pada membran
 - Penambahan antibodi kedua yang berlabel enzim dan spesifik terhadap antibodi primer
 - Bagian yang terikat akan dibuat tampak dengan penambahan substrat berkromogen yang akan diubah oleh enzim menjadi bahan berwarna yang tidak larut (Ermens, 1997).

Metode *dot enzyme immunoassay* adalah metode pengukuran secara kualitatif dengan menggunakan strips membran nitroselulosa yang ditempel antigen yang dimurnikan. Dot blot dapat digunakan untuk memperkirakan konsentrasi antigen.



Gambar 2.7. Dot Enzymes Immunoassay, checkerboard (Handojo, 2004)

2.6 Immunochromatography (ICT)

Immunochromatography test atau disebut juga *lateral flow test* atau disingkat sebagai uji strip (*strip test*) termasuk kelompok imunoasai berlabel seperti imunofluoresens (IFA), RIA dan EIA. Berbeda dengan uji IFA ataupun RIA, uji imunokromatografik tidak membutuhkan alat canggih (mikroskop fluoresens atau *radio-counter*) untuk pembacaan hasil, cukup dengan melihat perubahan warna dengan mata telanjang, sehingga jauh lebih praktis.

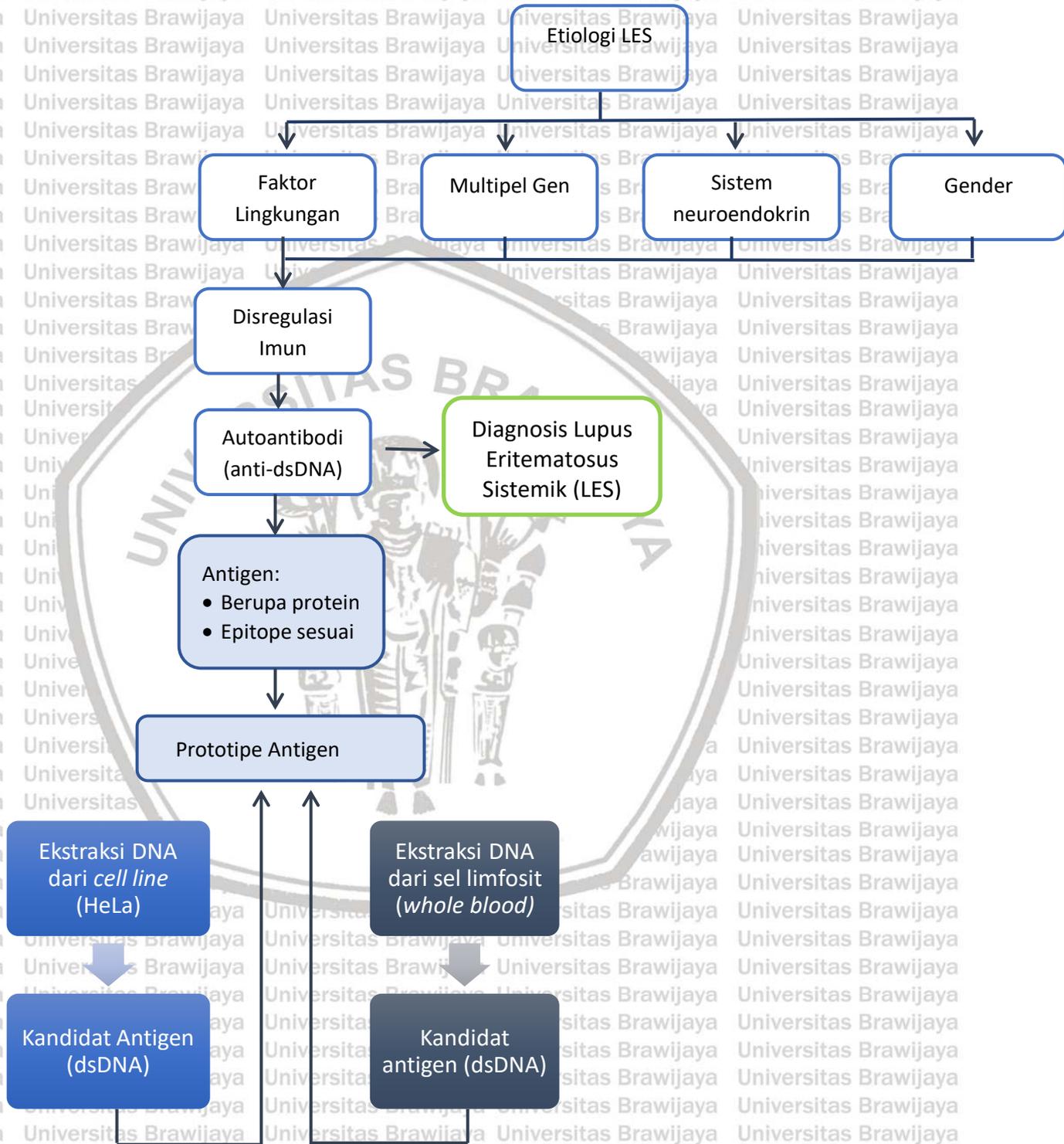
Bila dibandingkan dengan uji EIA, ICT tidak membutuhkan substrat, sehingga dapat memperpendek waktu inkubasinya hingga menjadi 90 detik sampai 15 menit saja (Handojo, 2004). Keuntungan pemakaian ICT meliputi: relative tidak mahal untuk dibuat, tidak membutuhkan keahlian khusus dan waktu yang diperlukan untuk mendapatkan hasil tes cukup singkat. Selain itu, metode

ini dapat dijadikan sebagai pemeriksaan awal (*screening test*) untuk uji kualitatif dan dapat dikerjakan langsung di lapangan karena merupakan alat uji yang sederhana.

Secara umum metode imunokromatografi untuk mendeteksi sebuah spesimen dengan menggunakan dua antibodi. Antibodi pertama berada dalam larutan uji atau sebagian terdapat pada membran berpori dari alat uji. Antibodi ini dilabeli dengan lateks partikel atau partikel koloid emas (antibodi berlabel). Keberadaan antigen akan dikenali oleh antibodi berlabel dengan membentuk ikatan antigen-antibodi. Kompleks ikatan ini kemudian akan mengalir karena adanya kapilaritas menuju penyerap, yang terbuat dari kertas penyaring. Selama aliran, kompleks ini akan dideteksi dan diikat oleh antibodi kedua yang terdapat pada membran berpori, sehingga terdapat kompleks pada daerah deteksi pada membran yang menunjukkan hasil uji (Peng, 2008).

Immunochromatography test (ICT) anti-dsDNA yang diharapkan merupakan uji imunokromatografi yang dapat mendeteksi antibodi yang terdapat pada serum atau plasma. Prinsip dasarnya adalah adanya pengikatan antara antigen (dsDNA) dengan antibody (anti-dsDNA) pada daerah *test line*, selanjutnya antibody akan berikatan dengan *colloidal gold-labeled conjugate*. Komplek yang terbentuk akan bergerak pada membran nitroselulosa.

2.7 Kerangka Teori

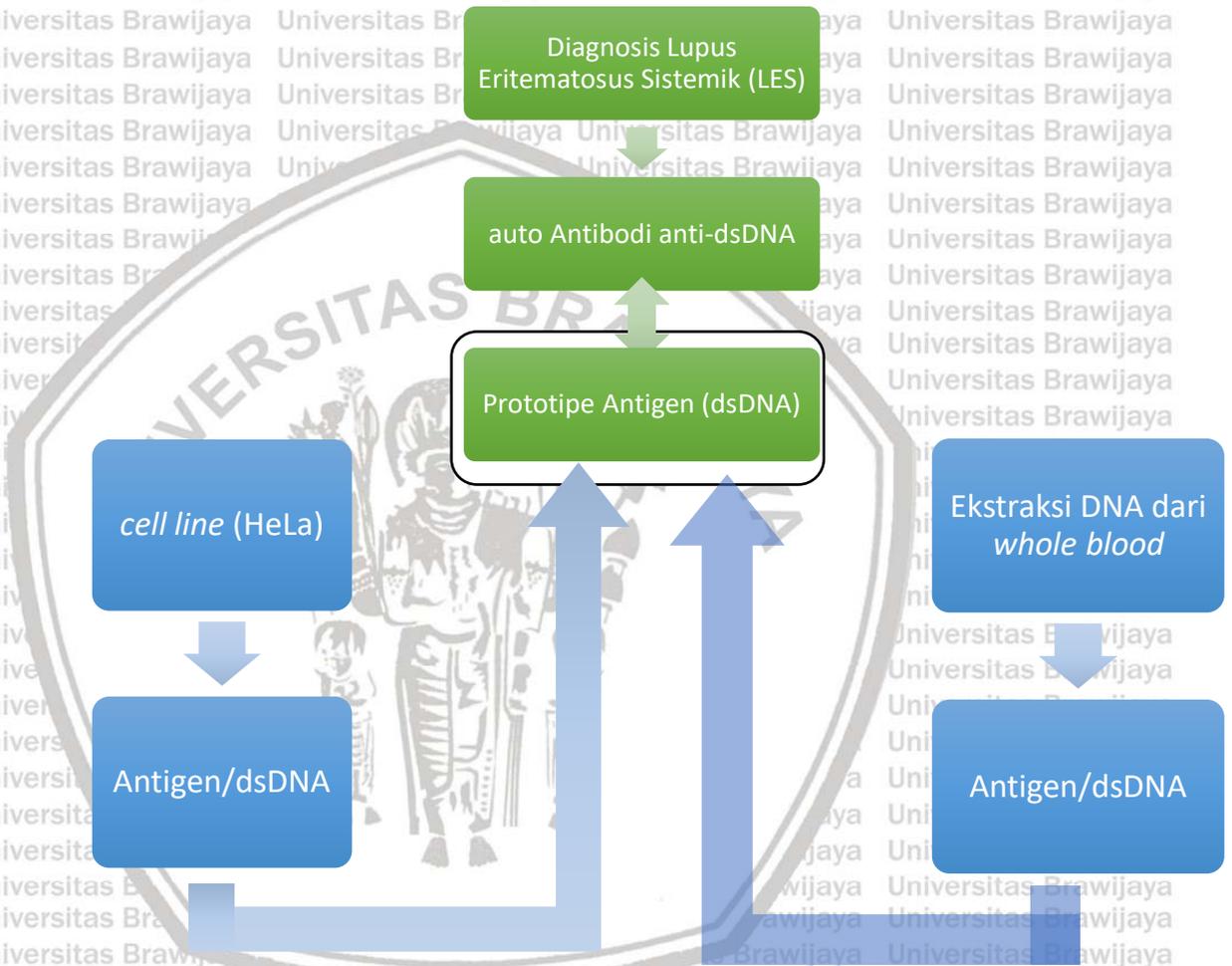


Keterangan:

Etiologi LES masih belum diketahui dengan pasti, namun terdapat beberapa faktor etiologi penting pada LES, yaitu (1) genetik, (2) hormonal, (3) sistem neuroendokrin dan (4) jenis kelamin. Interaksi faktor-faktor ini akan mempengaruhi dan mengakibatkan terjadinya respons imun yang menimbulkan peningkatan aktivitas sel T dan sel B (disregulasi sistem imunitas tubuh penderita), sehingga dapat menghilangkan aktivitas supresor dan terjadi *defective clearance mechanism*, sehingga terjadi peningkatan autoantibodi (termasuk ANA dan anti-dsDNA). Sebagian dari autoantibodi ini akan membentuk kompleks imun; yang kemudian akan membuat deposit (endapan) sehingga terjadi kerusakan jaringan. Salah satu kriteria laboratoris untuk mendiagnosis LES berdasarkan kriteria SLICC 2012 adalah peningkatan kadar anti-dsDNA. Untuk membuat suatu kit diagnostik yang mudah dan sederhana untuk mendeteksi antibodi anti-dsDNA, dan berbasis ICT (*immuno chromatography*), dibutuhkan suatu prototipe antigen dsDNA. Antigen dsDNA didapatkan dari isolasi DNA dari sel limfosit yang berasal dari *whole blood* dan *cell line* (sel HeLa).

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

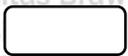
3.1 Kerangka konsep



Keterangan :



: variabel yang diteliti



: prototipe antigen yang dikembangkan

Diagnosis LES dapat ditegakkan berdasarkan gambaran klinik dan pemeriksaan laboratorium. Salah satu kriteria laboratorium LES menurut SLICC (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics*) tahun 2012 adalah peningkatan kadar anti-dsDNA. Untuk membuat suatu kit yang berbasis ICT (*immuno chromatography*) yang akan digunakan untuk mendeteksi autoantibodi anti-dsDNA, perlu dikembangkan suatu prototipe antigen dsDNA. Antigen dsDNA pada penelitian ini didapatkan dari isolasi DNA dari sel limfosit yang berasal dari *whole blood* dan *cell line* (sel HeLa).

Untuk menciptakan suatu assay fase padat yang non-kompetitif, baik kadar antibodi atau antigen pelapis maupun pengenceran konjugat perlu ditentukan, sehubungan dengan hal tersebut, titrasi papan catur (*Checkerboard titration*) merupakan cara yang paling mudah untuk dilaksanakan sebab dengan cara ini tiga tolak ukur dari assay dapat divariasikan secara bersamaan. Kemudian setelah didapatkan pengenceran antigen dan antibodi hasil *checkerboard* yang memberikan ikatan paling kuat (ditunjukkan dengan intensitas warna), dilanjutkan dengan melakukan prosedur *dot enzyme immunoassay* dengan menggunakan antibodi dari serum pasien LES dengan positif anti-dsDNA dan kontrol (anti-dsDNA negatif)

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah penelitian eksperimental, bertujuan mengetahui profil antigen dsDNA yang akan digunakan sebagai kandidat rapid tes untuk diagnostik LES dan menentukan sensitifitas dan spesifisitas antigen yang akan dikembangkan.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi merupakan seluruh subyek atau objek dengan karakteristik tertentu yang akan diteliti. Populasi penelitian untuk diambil autoantibodi serumnya adalah pasien LES yang didiagnosis berdasarkan kriteria SLICC tahun 2012 di RSSA Malang.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Sel HeLa dan sel limfosit dari *whole blood* untuk diisolasi antigen dsDNA nya
2. Pasien LES untuk memperoleh serum anti-dsDNA

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan teknik *Non Probability Sampling* jenis *Consecutive sampling* yaitu semua subyek yang datang berurutan dan memenuhi kriteria pemilihan dimasukkan dalam penelitian sampai jumlah subyek yang diperlukan terpenuhi. Terdapat dua kelompok subyek pada penelitian ini, yaitu kelompok kontrol dan kelompok pasien LES.

Pasien LES yang menjadi subjek penelitian merupakan pasien LES di RSSA Malang yang didiagnosis berdasarkan kriteria diagnosis lupus SLICC tahun 2012.

Kontrol yang menjadi subjek penelitian merupakan subjek yang telah terbukti

tidak terdiagnosis lupus, tidak sedang dalam kondisi sakit, dan tidak memiliki riwayat penyakit inflamasi kronis dan pasien LES dengan anti-dsDNA negatif.

Kriteria Inklusi Kasus

1. Sampel untuk Autoantibodi anti-dsDNA

- Pasien LES yang telah terdiagnosis berdasarkan kriteria SLICC tahun 2012
- Usia 15 – 50 tahun

- Pasien bersedia diikuti dalam penelitian ini dan menandatangani *informed consent*

2. Sampel untuk koleksi antigen dsDNA

- Sel HeLa : *cell line* dari sel kanker serviks sebanyak 6×10^6 sel/mL yang ditumbuhkan pada media biakan
- Sel limfosit yang berasal dari *whole blood* orang sehat berusia 15-50 tahun, tidak terdiagnosis LES dan tidak sedang dalam kondisi sakit, tidak memiliki riwayat penyakit inflamasi kronis

Kriteria Eksklusi

1. Sampel untuk koleksi autoantibodi dsDNA

- Pasien dengan non SLE dengan penyakit inflamasi kronis atau penyakit autoimun pada jaringan ikat lain

2. Sampel untuk koleksi antigen dsDNA

- Sel HeLa : jumlah sel dari media biakan $< 6 \times 10^6$ sel/mL
- Kontrol : subjek yang sedang dalam kondisi sakit atau memiliki riwayat penyakit inflamasi kronis.

Penelitian dikerjakan setelah mendapatkan persetujuan dari komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Seluruh pasien yang diikutkan dalam penelitian ini diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (*Informed Consent*).

Besar Sampel

Besar sampel dihitung dengan rumus untuk penelitian analitik numerik tidak berpasangan :

$$N = \left\{ \frac{(Z\alpha + Z\beta)S}{X1 - X2} \right\}^2$$

- Catatan :
- N = besar sampel
 - Z α = deviat baku α
 - Z β = deviat baku β
 - X1-X2 = selisih minimal yang dianggap bermakna
 - S = standar deviasi

Perhitungan besar sampel :

Kesalahan tipe I = 5 %, hipotesis dua arah Z α = 1,64

Kesalahan tipe II = 10 %, maka Z β = 1,28

Selisih minimal yang dianggap bermakna (X1-X2) = 4

Standar deviasi = 4

$$N = \left\{ \frac{(1,64 + 1,28)4}{4} \right\}^2 = 22 \text{ sampel}$$

Total sampel minimal = 24 sampel kasus dan 24 kontrol

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu 24 pasien LES dengan anti-dsDNA yang positif, dengan kontrol 24 orang dengan anti-dsDNA yang negatif.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di dua tempat yaitu Laboratorium Biomedik FKUB, Laboratorium Sentral Rumah Sakit Umum Daerah Dr Saiful Anwar Malang dalam kurun waktu enam bulan

4.4 Instrumen Penelitian

Alat bantu yang dipakai adalah prosedur untuk isolasi DNA yang berasal dari limfosit sampel *whole blood* dan sel HeLa. Dilakukan uji pengikatan antigen dan antibodi dengan metode *dot enzyme immunoassay* yang merupakan metode imunodeteksi sederhana untuk mengidentifikasi protein spesifik pada sampel. Bila protein telah di-imbilisasi pada membran pengikat protein seperti PVDF (*polyvinylidene fluoride*) ataupun nitroselulosa, kemudian dapat direaksikan dengan antibodi spesifik terhadap protein yang dicari. Setelah terbentuk ikatan antara protein dan antibodi primer (autoantibodi dari serum pasien), dilanjutkan dengan pembentukan ikatan antibodi primer dengan antibodi sekunder yang berlabel. Kemudian akan tervisualisasi dengan perubahan warna label/substrat yang dapat diukur kadarnya dengan alat densitometer.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel Bebas

- Antibodi anti-dsDNA dari sel HeLa
- Antibodi anti-dsDNA dari sel limfosit *whole blood*

Variabel Tergantung

- Intensitas *warna dot blot assay* pada ikatan antigen dsDNA dari limfosit dan antibodi anti-dsDNA dari serum pasien LES dan kontrol
- Intensitas *warna dot blot assay* pada ikatan antigen dsDNA dari sel HeLa dan antibodi anti-dsDNA dari serum pasien LES dan kontrol

4.6 Definisi Operasional Variabel

Dalam penelitian ini yang dimaksud dengan :

- Kadar anti-dsDNA adalah kadar dari anti-dsDNA (*double stranded DNA*) yang ditemukan pada serum pasien LES dan diperiksa dengan alat *auto-analyzer* Alegria yang menggunakan prinsip metode *indirect* ELISA dan perubahan warna yang terjadi dibaca dengan fotometer pada panjang gelombang 650 nm, dalam satuan IU/mL
- Sel HeLa adalah adalah sel epitelial manusia yang berasal dari sel kanker leher rahim sebanyak 6×10^6 sel/ml yang ditumbuhkan dalam media biakan.
- Antigen dsDNA sel HeLa adalah antigen yang didapatkan dari ekstraksi inti sel HeLa dengan Promega extraction kit, dan diukur dengan nano drop, dengan satuan $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- Sel limfosit adalah sel limfosit manusia yang didapatkan dari *whole blood* (sampel EDTA) yang didapatkan dengan ekstraksi kit atau Ficoll-Paque

- Antigen dsDNA sel limfosit adalah antigen yang didapatkan dari ekstraksi inti sel limfosit dengan Promega *extraction kit*, dan diukur dengan nano drop, dengan satuan ng/ μ L
- Intensitas warna adalah perubahan warna yang terbentuk setelah terjadi ikatan antigen dan antibodi yang didapatkan dengan *dot blot assay* (ELISA), dan diukur dengan densitometer (program computer Corel)

4.7 Cara Pemeriksaan

4.7.1 Prosedur Pembiakan Cell line (sel HeLa)

Pembuatan media :

1. Untuk pembuatan 1 ml trypan blue 0.05%, timbang 0.05 gram padatan trypan blue kemudian larutkan dalam 1 ml aquades dan vortex sampai homogen
2. Untuk pembuatan 1L *serum free-media* kultur (SF-M), larutkan 1 sachet RPMI 1640 dalam 1L *deionized water* tambahkan 2 gram NaHCO_3 , 2,4 gram HEPES, dan tambahkan 100 UI/ml-Penicillin 100 μ l/ml-streptomycindan adjust pH 7.2-7.4 kemudian sterilkan dengan filter 0.2 μ m di dalam LAF
3. Untuk pembuatan *medium complete* (MC), tambahkan 10-20 ml FBS ke 100 ml SF-M
4. Untuk pembuatan 1 ml media *cryo*, tambahkan 5-10% DMSO ke MC

Metode Thawing Hela :

1. *Cyrotube* atau tabung *cryo* yang didalamnya terdapat sel hela dikeluarkan dari nitrogen *tank* dan dibawa ke dalam LAF
2. Semprot seluruh peralatan yang digunakan untuk kultur dengan alkohol 70% sebelum masuk ke dalam LAF
3. Tabung *cryo* *dithawing* sampai es yang didalamnya separuh mencair
4. Pindahkan isi tabung *cryo* kedalam *flask* kultur 25 cm² yang telah berisi 10-15 ml MC
5. Inkubasi 1 X 24 jam dalam inkubator dengan kelembapan CO₂ 5% 37°C
6. Ganti media kultur 2-3 hari sekali

Metode Subkultur Hela:

1. Hela di dalam *flask* kultur diamati di mikroskop inverted
2. Subkultur dilakukan apabila hela telah melekat dan konfluen 80-90%
3. Bawa flask kultur hela ke dalam LAF
4. Ambil semua sisa media di dalam *flask*
5. Cuci dalam *flask* dengan D-PBS (dua kali)
6. Tambahkan 1,5-2 ml tripsin-EDTA ke dalam *flask*
7. Inkubasi pada 37°C, sesekali dilihat dengan mikroskop *inverted*, jika sel telah *detach* semua, tambahkan 5 ml MC
8. Pindah semua larutan di dalam *flask* ke dalam *centrifuge tube*
9. Sentrifus dengan kecepatan 700x g selama 10 menit
10. Buang supernatan dan resuspensi pellet dengan 1 ml MC
11. Hitung viabilitas sel dengan mengambil 10µl *suspense ditambah trypan blue* (1:1) kemudian ditaruh di *haemocytometer*

12. Tanam sel hela sesuai dengan kebutuhan

Ex. 10^8 sel/well untuk well 6

13. Inkubasi 1 X 24 jam dalam incubator dengan kelembapan CO_2 5% 37°C

Ganti media kultur 2-3 hari sekali

Metode Freezing Hela :

1. Kultur hela dalam *flask* telah *confluent* 80-90% dibawa ke dalam LAF

2. Tarik semua sisa media kultur di dalam *flask*

3. Cuci dalam *flask* dengan D-PBS

4. Tambahkan 1,5-2 ml tripsin-EDTA ke dalam *flask*

5. Inkubasi pada 37°C , sesekali dilihat dengan mikroskop *inverted*, jika sel telah *detach* semua, tambahkan 5 ml media kultur

6. Pindah semua larutan di dalam *flask* ke dalam *centrifuge tube*

7. Sentrifus dengan kecepatan 700x g selama 10 menit

8. Buang supernatant dan resuspensi *pellet* dengan 0.1 ml MC

9. Hitung viabilitas sel dengan mengambil 10 μl suspense ditambah trypan blue (1:1) kemudian ditaruh di *haemocytometer*

10. Freezing 10^6 sel hela pada media *cryo*

Simpan dalam gradient minus (-20°C lalu -40°C lalu -80°C) selama @2 jam atau

menggunakan Mr Frozty™ kemudian simpan dalam *nitrogen tank* untuk

penyimpanan yang lama (*long term storage*)

4.7.2 Prosedur ekstraksi DNA

Dilakukan untuk mendapatkan antigen dsDNA dari *whole blood* (sampel EDTA).

Material yang dibutuhkan :

- 15ml tabung sentrifus steril (untuk 3ml sampel atau sel sejumlah 6×10^6)
- water bath, 37°C
- isopropanol, suhu ruangan
- 70% ethanol, suhu ruangan
- water bath, 65°C (opsional; untuk *rapid DNA rehydration*)

Prosedur kerja :

1. Tambahkan 9.0ml *Cell Lysis Solution* pada *centrifuge tube* steril 15ml. Darah harus ditempatkan pada tabung dengan antikoagulan EDTA, heparin atau sitras untuk mencegah pembekuan.
2. Tabung berisi darah dikocok perlahan sampai tercampur rata, pindahkan darah ke tabung yang berisi *Cell Lysis Solution*. Bolak-balikkan tabung sekitar 5-6 kali agar tercampur.
3. Inkubasi 10 menit pada suhu ruangan (bolak-balik tabung 2-3 kali selama inkubasi) untuk melisis sel darah merah. Sentrifus pada kecepatan $2,000 \times g$ selama 10 menit pada suhu ruangan.
4. Buang supernatan sebanyak mungkin tanpa menyentuh pellet. Sekitar 50–100µl dari *residual liquid* akan tertinggal pada 15ml *tube*.

Jika sampel darah telah membeku, ulangi step 1-4 sampai *pellet* berwarna putih.

Catatan : Beberapa sel darah merah atau debris sel dapat terlihat bersamaan dengan sel limfosit. Jika *pellet* terlihat hanya berisi sel darah merah, tambahkan *aliquot* tambahan dari *Cell Lysis Solution* setelah membuang supernatan di atas *pellet* sel, kemudian ulangi langkah 3 sampai 4.

5. Vortex tabung dengan kuat hingga sel limfosit teresuspensi selama 10-15 detik

Resuspensi dengan baik untuk mendapatkan lisis sel yang adekuat.

6. Tambahkan *Nuclei Lysis Solution* 3.0ml pada tabung yang berisi sel teresuspensi. Kemudian pipet cairan tersebut 5-6 kali untuk melisiskan sel limfosit. Larutan akan menjadi sangat kental. Jika masih terlihat adanya *clumping* sel setelah *mixing*, maka inkubasi larutan pada 37°C hingga gumpalan terurai. Jika gumpalan masih terlihat setelah 1 jam, tambahkan *Nuclei Lysis Solution* 1.0ml dan ulangi inkubasi.
7. Optional: Tambahkan *RNase Solution* 15µl pada nuclear lysate, dan campurkan sampel dengan membolak-balikkan tabung 2-5 kali. Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, dan dinginkan pada suhu ruangan.

8. Tambahkan *Protein Precipitation Solution* 1.0ml pada *nuclear lysate*, dan vortex dengan kuat and selama 10-20 detik. Mungkin akan terlihat gumpalan kecil protein setelah divortex. Jika dilakukan penambahan *Nuclei Lysis Solution* pada langkah 6, tambahkan 1.3ml *Protein Precipitation Solution*.

9. Sentrifus dengan kecepatan $2,000 \times g$ selama 10 menit pada suhu ruangan. Seharusnya kemudian tampak *pellet* protein berwarna coklat tua. Jika *pellet* tidak terlihat, lihat pada tahap 4.

10. Pindahkan supernatan pada tabung sentrifus 15ml yang berisi isopropanol 3ml dengan suhu ruangan.

Sejumlah supernatan mungkin tersisa pada tabung awal yang berisi *pellet* protein. Biarkan cairan residu ini di tabung untuk mencegah kontaminasi Larutan DNA dengan protein yang terpresipitasi.

11. Campur larutan dengan lembut dengan inversi hingga tampak adanya bentukan seperti benang keputihan dari DNA yang membentuk massa yang terlihat.

12. Sentrifus dengan kecepatan $2,000 \times g$ selama 1 menit pada suhu ruangan. DNA akan terlihat sebagai *pellet* putih kecil.

13. Tuangkan supernatan, dan tambahkan volume 1 sampel dari etanol 70% dengan suhu ruangan pada DNA. Invert tabung dengan lembut beberapa kali untuk mencuci *pellet* DNA dan sisi tabung *microcentrifuge*. Sentrifus seperti pada langkah 12.

14. Hisap etanol perlahan, baik dengan *drawn Pasteur pipette* atau *sequencing pipette tip*. DNA *pellet* akan sangat longgar, sehingga harus berhati-hati untuk mencegah terhisapnya *pellet* pada pipet. Balikkan tabung pada kertas absorben bersih dan biarkan *pellet* mengering dengan sendirinya selama 10–15 menit.

15. Tambahkan DNA Rehydration Solution 250 μ l kemudian inkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam. Campur larutan secara periodik dengan tapping tabung lembut. Alternatifnya, rehidrasi DNA dengan

mengkubasi larutan semalam pada suhu ruangan atau pada suhu 4°C.

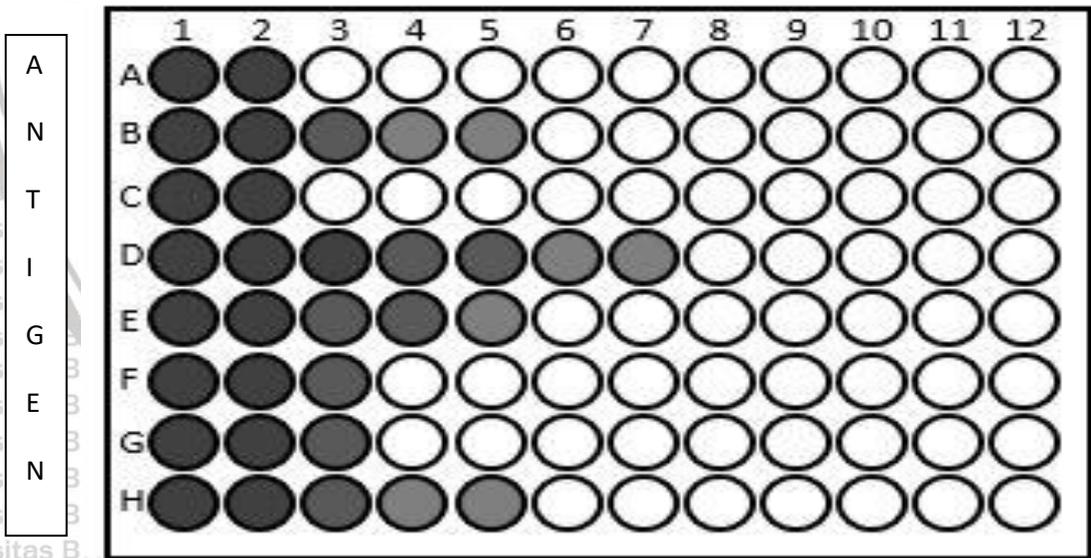
16. Simpan DNA pada suhu 2–8°C.

4.7.3 Prosedur Dot Blot Immunoassay dan checkerboard

A. Protokol Dot Blot assay tahap I

Prosedur dot enzyme immunoassay tahap I ini dilakukan untuk mengetahui ikatan terkuat antigen dsDNA dan anti-dsDNA dari serum pasien LES. Dikerjakan dengan pengenceran antigen dari dua sumber yaitu sel HeLa dan limfosit, pengenceran antibodi dengan teknik checkerboard sebagai berikut:

Pengenceran antibodi DNA dimulai dari 1/100; 1/200, dst



Prosedur :

1. Dilakukan pengenceran antigen dsDNA yang berasal dari sel HeLa dan limfosit dimulai dari 1/20, 1/40, 1/80 dst sedangkan pengenceran antibodi dimulai dari 1/100, 1/200, 1/400, dst

2. Basahi membran nitroselulosa dengan aquades, kemudian tambahkan 50 µl antigen (DNA terisolasi) pada masing-masing well (96 well).
3. Dilakukan prosedur De Gas untuk menempelkan antigen ke membran dengan sempurna
4. Tambahkan 50 µl TBS skim milk pada masing-masing well, lalu diinkubasi selama 2 jam dengan ditutup aluminium foil
5. Kemudian dicuci sebanyak 3 kali @3 menit dengan menggunakan TBS tween 50 µl pada masing-masing well.
6. Setelah dikeringkan dengan kertas adsorben, tambahkan 50µl antibodi primer (autoantibodi dari serum pasien LES) dengan pengenceran yang diinginkan, kemudian ditutup dengan aluminium foil
7. Inkubasi pada suhu 4°C dalam semalam
8. Kemudian cuci sebanyak 3 kali @3 menit dengan menggunakan TBS tween 50 µl pada masing-masing well.
9. Tambahkan 50 µl antibodi sekunder pada setiap well, ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang
10. Kemudian cuci sebanyak 3 kali @3 menit dengan menggunakan TBS tween 50 µl pada masing-masing well.
11. Tambahkan 50 µl substrat di ruangan gelap, diinkubasi selama 20 menit, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi.
12. Perubahan warna diukur dengan densitometer

4.7.4 Prosedur *dot enzyme immunoassay* dengan antigen sel HeLa atau limfosit dan antibodi serum pasien LES dan kontrol sehat dengan menggunakan pengenceran hasil *checkerboard*

Setelah ditentukan pengenceran antigen dan antibodi hasil *checkerboard* yang memberikan ikatan paling kuat (ditunjukkan dengan intensitas warna), maka langkah selanjutnya melakukan prosedur *dot enzyme immunoassay* dengan menggunakan antibodi dari serum pasien LES dengan positif anti-dsDNA dan kontrol (anti-dsDNA negatif) yang didapatkan dari pengukuran menggunakan *automatic analyzer* Alegria, masing – masing sebanyak 24 sampel.

4.8 Teknik Pengumpulan Data

Setiap memperoleh sampel penelitian yang memenuhi kriteria inklusi, data dicatat dalam lembar (*form*) yang telah disiapkan. Sampel disimpan dalam lemari pendingin -80°C . Semua data yang diperoleh dari hasil penelitian dicatat dalam buku khusus penelitian (*log book*) dan disimpan dalam file komputer.

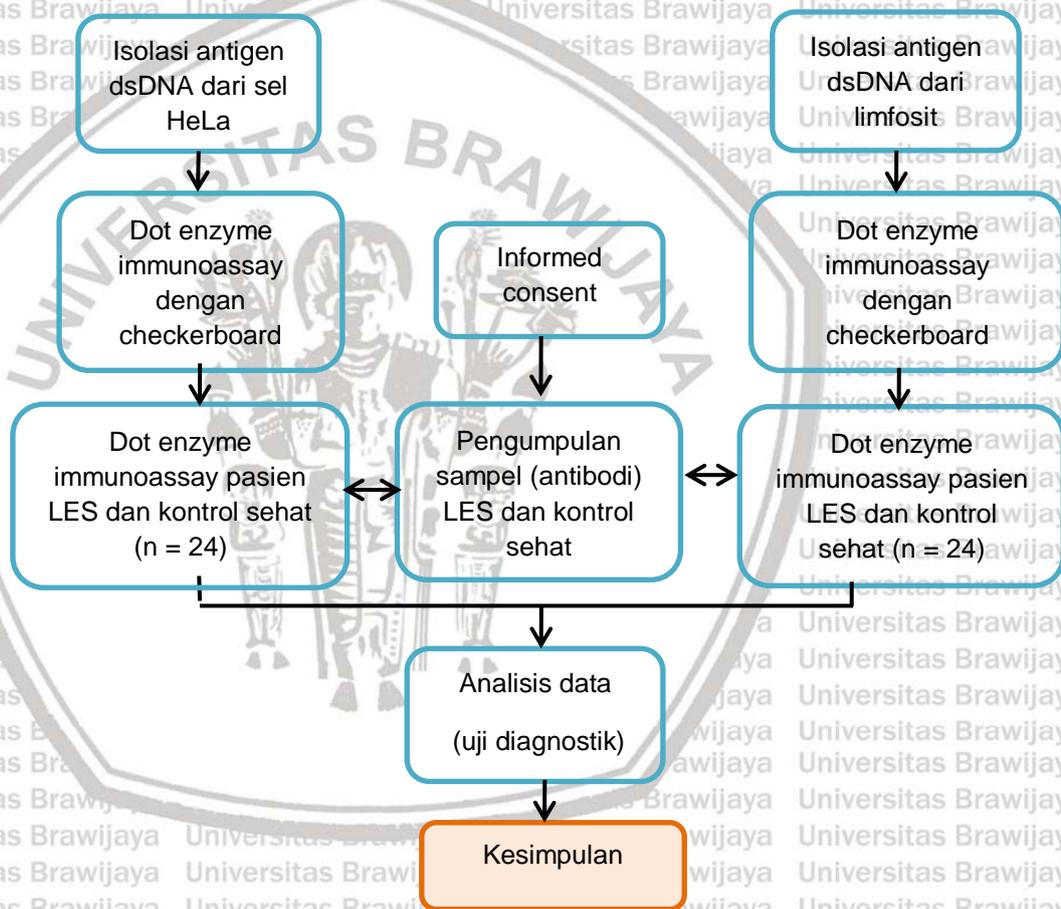
4.9 Analisis Statistik

Data yang diperoleh dari penelitian ini bersifat kuantitatif. Data kuantitatif berupa kadar anti-dsDNA dari alat *automatic analyzer* Alegria dan intensitas warna dengan program Corel. Analisis statistik dilakukan menggunakan *SPSS for Windows software version 17.0*. Uji diagnostik pada penelitian ini menggunakan kurva *Receiver Operating Characteristic* (ROC), yaitu kurva yang dihasilkan dari tarik ulur antara sensitivitas dan spesifisitas pada berbagai titik potong. Prosedur ROC ini menghasilkan *Area Under Curve* (AUC). Penentuan

nilai *cut-off* berdasarkan pada nilai sensitifitas dan spesifisitas yang paling baik.

Penghitungan nilai ramal positif (NRP), nilai ramal negatif (NRN), rasio kemungkinan positif (RKP), rasio kemungkinan negatif (RKN) dan akurasi dihitung dari analisa tabel 2 x 2.

4.10. Alur Penelitian



Keterangan :

Uji Diagnostik : uji diagnostik intensitas warna *dot blot assay* dengan kelompok LES (anti-dsDNA positif yang diperiksa dengan alat *auto-analyzer Allegria*)

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Penelitian ini dilakukan terhadap 48 subyek yang memenuhi kriteria inklusi dan bersedia mengikuti penelitian dan menandatangani informed consent, untuk diambil serum darahnya untuk diperiksa antibodi anti-dsDNA dengan *automatic-analyzer* Allegria dengan metode ELISA indirek. Komposisi subyek penelitian terdiri dari 42 orang wanita (87,5%) dan 6 orang laki-laki (12,5 %), dengan rentang umur berkisar antara 6 – 59 tahun, dan rata-rata umur subyek adalah 32 tahun. Dari seluruh sampel tersebut, 24 orang termasuk dalam kelompok kontrol (kadar anti-dsDNA negatif), dan 24 orang termasuk dalam kelompok LES (kadar anti-dsDNA positif). Kelompok LES sebagian besar terdiri dari wanita, yaitu mencapai 91,6%. Kadar anti-dsDNA IgM dan kadar anti-dsDNA yang terendah secara berurutan adalah 2,5 IU/mL dan 1,9 IU/mL, sedangkan kadar tertinggi adalah >200 IU/mL, baik untuk IgM maupun IgG. Karakteristik demografi menurut umur dan jenis kelamin pada kelompok LES dan kontrol ditunjukkan pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Karakteristik	Pasien LES (anti-dsDNA positif)	Kontrol Sehat	Nilai p
Jumlah Subyek	24	24	
Usia (tahun)			
Rerata± SD	31,17 ± 14,25	31,75 ± 12,16	0,861
Jenis kelamin (n,%)			
Pria	2 (8,4%)	4 (16,67%)	
Wanita	22 (91,6%)	20 (83,33%)	

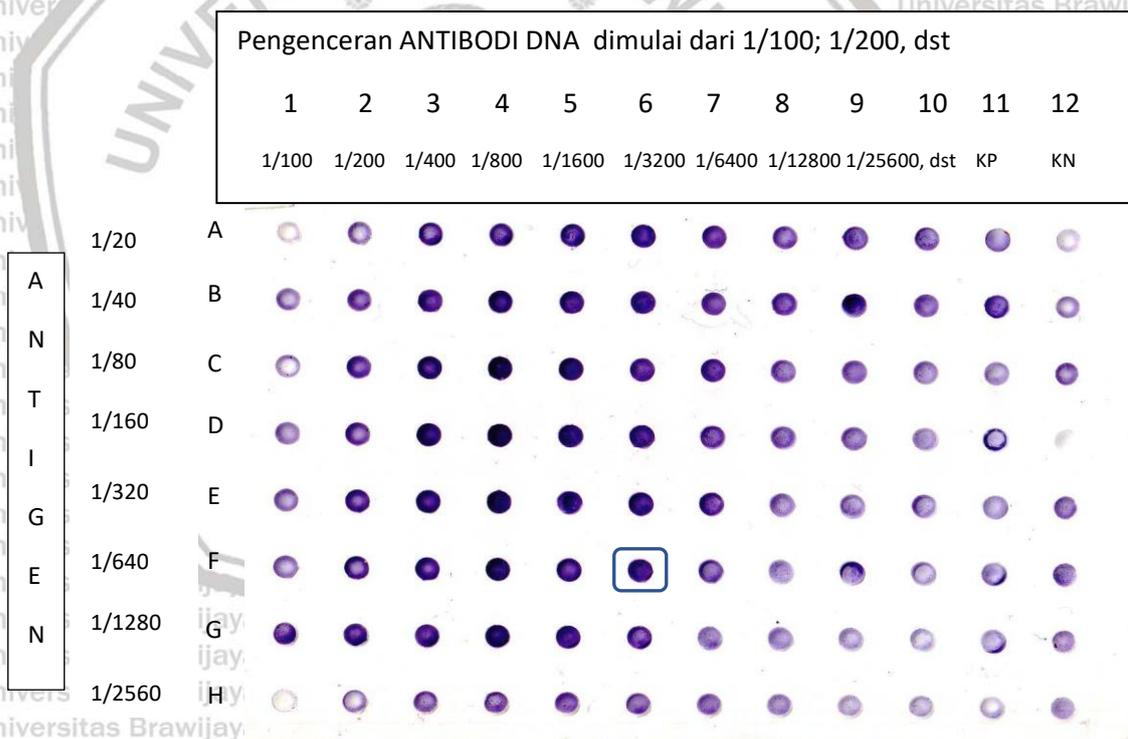
Sampel antigen berupa sel limfosit yang diisolasi dari *whole blood* diambil dari 10 orang sehat, yang terdiri dari 7 orang wanita (70%) dan 3 orang laki-laki (30%) dengan rata-rata umur adalah 32 tahun. Sampel antigen yang berasal dari sel HeLa memenuhi kriteria inklusi dengan sejumlah 6×10^6 sel/mL setelah dibiakkan pada media, dan diisolasi DNANYa. Konsentrasi antigen DNA dari beberapa kali isolasi disajikan dalam tabel 5.2

Tabel 5.2 Konsentrasi antigen DNA hasil isolasi

Sampel	ng/μL	A 260/280
Isolat 1	505,94	2,10
Isolat 2	360,18	1,91
Isolat 3	226,51	1,86
Isolat 4	333,90	1,88
Isolat 5	171,14	1,96

5.2 Hasil Antigenisitas DNA yang berasal dari Sel HeLa dan Sel Limfosit

Pada titrasi papan catur ini, sampel antigen diambil dari plasma EDTA orang sehat dan sel HeLa, sementara antibodi primer diambil dari serum penderita LES dengan konsentrasi anti-dsDNA yang tinggi. Pada antigen yang berasal dari sel limfosit *whole blood*, dilakukan pengenceran antigen dimulai dari 1/20, 1/40, 1/80 dst sedangkan pengenceran antibodi dimulai dari 1/100, 1/200, 1/400, dst. Kemudian dilakukan pengukuran densitas warna Dot Blot assay dengan densitometer, dan didapatkan perubahan warna yang paling menonjol setelah ditambahkan substrat pada posisi F6, yaitu pada pengenceran antigen 1/640 (3,16 ng/μL) dan pengenceran antibodi 1/3200.



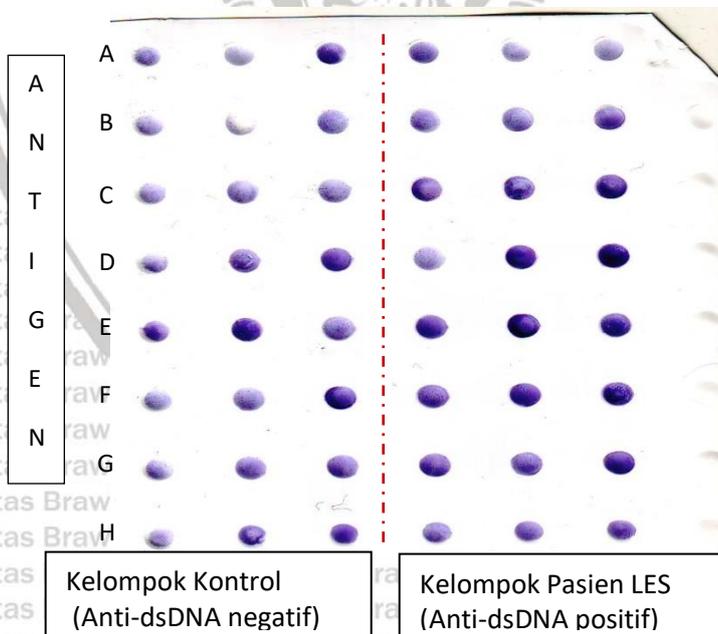
Gambar 5.1 Titrasi Papan Catur (Checker board) dengan Antigen dsDNA yang berasal dari sel limfosit (*whole blood*). Didapatkan perubahan warna yang paling menonjol setelah ditambahkan substrat pada posisi F6 (konsentrasi antigen 3,16 ng/μL).

Keterangan : KP = kontrol positif – kontrol antigen, KN = kontrol negatif – kontrol antibodi

5.3 Dot Enzyme Immunoassay Antigen dsDNA dari Sel Limfosit dengan Serum Anti-dsDNA Positif dan Anti-dsDNA Negatif

Pada tahap selanjutnya, dilakukan uji ikatan antigen dsDNA yang berasal dari sel limfosit terhadap kelompok pasien LES(anti-dsDNA positif) dan kelompok kontrol (anti-dsDNA negatif), dengan pengenceran antigen 1/640 (3,16 ng/μL) dan pengenceran antibodi 1/3200 (posisi F6) untuk dapat menghitung spesifisitas dan sensitifitas intensitas warna dot blot assay terhadap diagnosis LES. Terdiri dari dua kelompok, yaitu :

- Kelompok pasien LES (antibodi serum anti-dsDNA positif) pada pengenceran 1/3200 sebanyak 24 sampel
- Kelompok kontrol sehat (antibodi serum anti-dsDNA negatif) pada pengenceran 1/3200 sebanyak 24 sampel

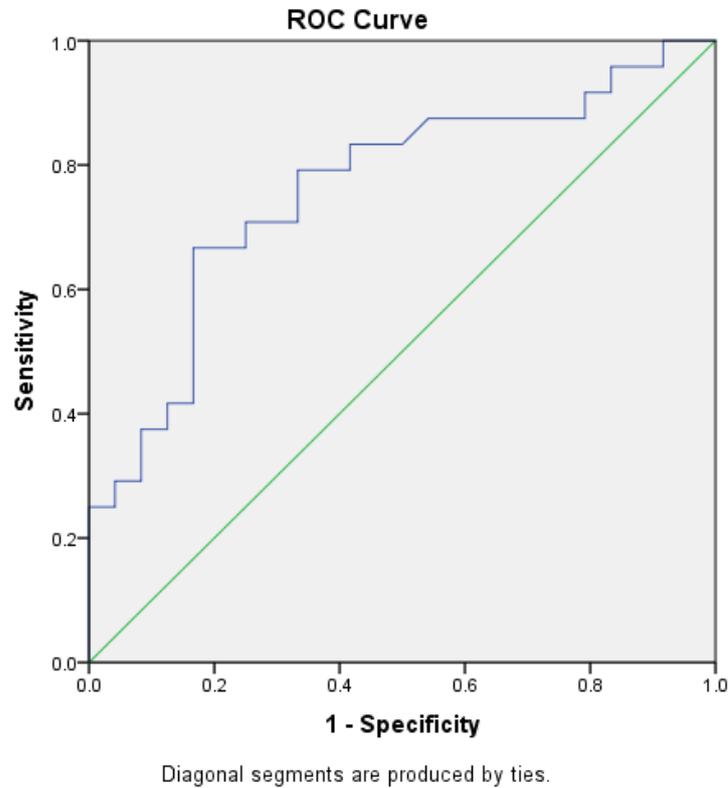


Gambar 5.3 Dot Blot Assay pada kelompok pasien LES (n=24) dan kelompok kontrol (n=24)

5.4 Uji Diagnostik pada tingkat Intensitas Warna dot blot assay

Penelitian ini menggunakan analisis *Receiving Operator Characteristic* (ROC) untuk mendapatkan sensitivitas dan spesifisitas yang optimal serta nilai *cut-off* dari variabel Intensitas Warna *dot blot assay*. Nilai di atas *cut-off point* dianggap sebagai positif LES dan nilai di bawah *cut off* dianggap sebagai non LES. Hasil yang didapatkan kemudian dianalisis dengan tabel 2 x 2 untuk mendapatkan nilai ramal positif (NRP) dan nilai ramal negatif (NRN). Standar emas yang digunakan adalah kadar anti-dsDNA IgG atau IgM dengan ELISA.

Analisis kurva ROC terhadap variabel Intensitas Warna *dot blot assay*, menunjukkan nilai *area under the curve* (AUC) 0,761. Hal ini secara grafik ditunjukkan pada gambar 5.1. Nilai AUC dari intensitas warna dot blot assay adalah 0,761 dan nilai ini termasuk nilai yang baik. Nilai AUC intensitas warna dot blot assay sebesar 0,761 pada gambar di atas ditunjukkan sebagai luasan daerah di bawah kurva ROC (di bawah garis biru).



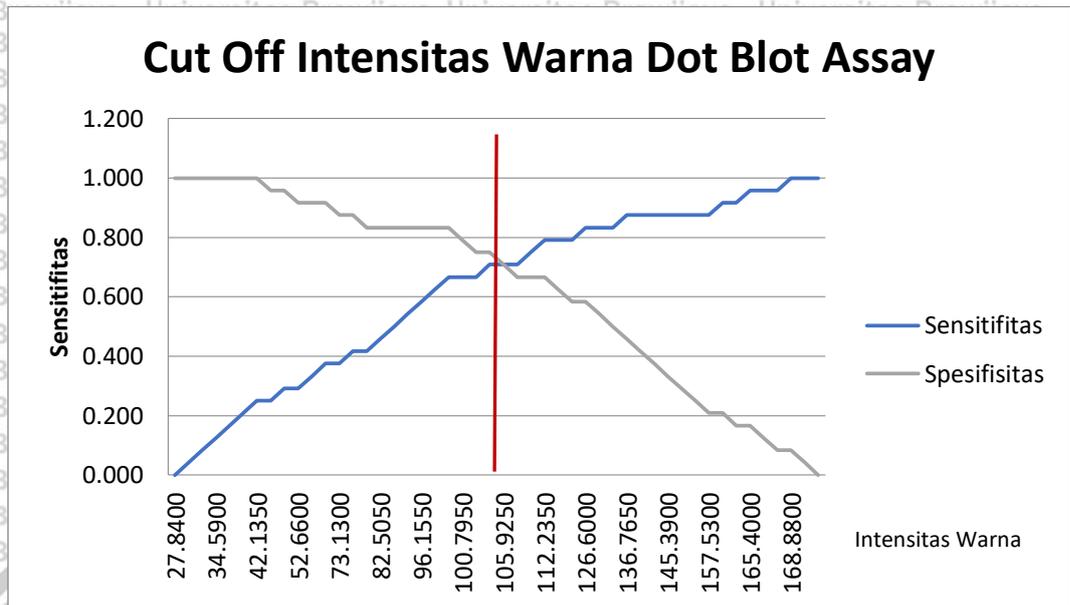
Gambar 5.4 Kurva ROC pada Intensitas Warna dot blot assay subyek LES

Keterangan:

- : Garis biru = kadar intensitas warna dot blot assay
- : Garis hijau = reference line

Peneliti juga ingin mengetahui apakah perubahan intensitas warna dot blot assay pada pasien LES (memenuhi kriteria SLICC 2012 dan kadar anti-dsDNA positif) dan kontrol dapat digunakan sebagai alat diagnostik LES.

Karenanya, ditentukan titik potong yang merupakan hasil tarik ulur antara sensitivitas dan spesifisitas dalam bentuk *coordinates of the curve*. Ditentukan titik potong untuk Intensitas warna dot blot assay sebesar 105,23. Hasil penentuan *Cut off point* Intensitas warna dapat dilihat pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5 Kurva *Cut-off* Intensitas Warna *dot blot* assay pada subyek LES berdasarkan ukuran baku kriteria SLICC 2012

Data intensitas warna sesuai dengan nilai *cut off* (titik potong) 105,23 diubah menjadi data nominal dari kelompok pasien LES maupun kontrol. Data selanjutnya di analisis dengan tabel silang (*cross-tabulation*) 2x2. Standar emas yang digunakan adalah kriteria SLICC 2012, termasuk kadar anti-dsDNA positif yang diukur dengan metode ELISA. Nilai diagnostik variabel intensitas warna dot blot assay ditunjukkan sebagai nilai sensitivitas, nilai spesifitas, nilai ramal positif (NRP), nilai ramal negatif (NRN), rasio kemungkinan positif (RKP), rasio kemungkinan negatif (RKN) dan akurasi, seperti ditunjukkan pada tabel 5.2.

Tabel 5.3 Nilai diagnostik Intensitas Warna dot blot assay untuk diagnosis LES

Indikator	Nilai	95% CI
Sensitifitas (%)	70,83	48,91 – 87,38%
Spesifisitas (%)	75,00	53,26 – 90,23%
NRP (%)	73,91	57,50 – 85,58
NRN(%)	72,00	56,94 – 83,33
RKP	2,83	1.35 – 5.93
RKN	0,39	0,20 – 0,76
Akurasi (%)	72,92	58,15 – 84,72

Keterangan :

- NRP : Nilai ramal positif
- NRN : Nilai ramal negatif
- RKP : Rasio kemungkinan positif
- RKN : Rasio kemungkinan negatif

Hasil perhitungan uji diagnostik dengan DEI memiliki sensitivitas 70,83%, spesifisitas 75%, NRP 73,91%, NRN 72,00%, RKP 2,83, RKN 0,39 dan akurasi 72,92%.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui *performance* kandidat antigen dsDNA yang berasal dari sel HeLa dan limfosit dari *whole blood* untuk deteksi antibodi anti-dsDNA pada serum pasien LES, untuk pengembangan tes cepat/kit diagnostik berbasis strip yang mudah diaplikasikan bagi tenaga kesehatan di pelayanan kesehatan primer atau puskesmas. Se jauh pengamatan peneliti, di Indonesia belum pernah dilakukan penelitian mengenai pembuatan tes deteksi cepat anti-dsDNA, sehingga dibutuhkan lanjutan penelitian ini, yang diawali dengan menentukan prototipe antigen yang memiliki antigenisitas baik terhadap autoantibodi anti-dsDNA.

6.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Pada penelitian ini, didapatkan frekuensi LES pada wanita didapatkan lebih tinggi (87,5%) dibandingkan pada pria (12,5%). Hasil penelitian ini sejalan dengan teori yang menyebutkan bahwa pada penyakit autoimun, khususnya penyakit reumatik autoimun sistemik seperti LES, prevalensi pada wanita lebih tinggi dibanding pria dengan perbandingan berkisar 9-14 : 1 (Sudoyo, 2009). Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti faktor hormonal yang berlebih, faktor kromosom X dan variasi biologis pada wanita, dengan mekanisme yang belum diketahui secara pasti (Tsokos, 2011). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rerata usia pasien LES adalah 32 tahun dengan rerata usia kelompok pasien LES 31,17 tahun dan kelompok kontrol 31,75 tahun. Dari data demografi usia tampak pula bahwa 87,5 % pasien LES berusia 15-40 tahun. Hal ini sesuai dengan teori yang menyebutkan bahwa LES dapat dijumpai pada semua usia,

tetapi paling banyak pada usia 15-40 tahun (masa reproduksi). (Longo et al, 2008)

Data karakteristik demografi usia dan jenis kelamin pada kelompok pasien LES dan kontrol dengan uji Kolmogorov-Smirnov, menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan diantara kedua kelompok. Dengan demikian bias yang terjadi karena perbedaan karakteristik demografi dapat diminimalkan.

Antigen pada penelitian ini berasal dari sel limfosit kontrol sehat yang diambil dari *whole blood* dan *cell line* (sel HeLa). Sampel darah perifer manusia sering digunakan dalam berbagai penelitian, baik dalam bentuk *whole blood* maupun PBMC, karena sampel relatif mudah didapatkan dan mengandung berbagai sel darah dalam jumlah cukup banyak. Darah yang diperoleh dari orang normal mengandung sekitar $1-2 \times 10^6$ sel mononuklear/mL darah (PBMC), dimana sekitar 80% – 90% sel tersebut merupakan sel limfosit dengan viabilitas tinggi dan relatif mudah untuk dimurnikan. (Wiley, 1999 dan Collins et al, 2012).

Sel HeLa merupakan salah satu jenis *cell line* yang sering digunakan secara luas pada berbagai penelitian, yang berasal dari sel kanker cervix. *Cell line* ini dapat bertahan sangat tahan lama dan produktif, sehingga kegunaannya cukup luas dalam penelitian ilmiah. (Rahbari et al, 2009; Acrani et al, 2009)

Salah satu penggunaan sel HeLa dalam penelitian medis adalah pengembangan vaksin polio oleh Jonas Salk pada tahun 1952. Pada penelitian ini, digunakan sel HeLa untuk isolasi antigen dsDNA dikarenakan sifatnya yang mudah membelah dan bersifat '*immortal*', dengan harapan akan didapatkan sumber antigen dengan konsentrasi yang memadai. Namun setelah dilakukan pengukuran dengan menggunakan *nano drop*, hasil isolasi antigen dsDNA dari sel HeLa konsentrasinya rendah (226,51 ng/ μ L). Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa

faktor, seperti pemisahan DNA dari *nuclear* yang kurang sempurna, penggunaan buffer yang kurang tepat, volume sumber antigen yang kurang (G-Biosciences, 2014). Pada penelitian ini, kemungkinan penyebab rendahnya kadar antigen dsDNA adalah dikarenakan penggunaan buffer yang kurang tepat yang kemungkinan dapat diatasi dengan mendinginkan buffer terlebih dahulu dan menggunakan suhu sentrifugasi dan inkubasi yang tepat (4°C). Penggunaan vortex pada jangka waktu yang lebih lama juga dapat membantu melisis sel dengan tetap menjaga nuklear tetap utuh. Prosedur yang digunakan dalam mengekstraksi antigen dsDNA dari sel HeLa juga merupakan modifikasi ekstraksi dsDNA dari *tissue culture* dan *human cell line* lain selain sel HeLa, sehingga diperlukan studi pustaka lebih lanjut untuk menstandarisasi prosedur ekstraksi dsDNA dari sel HeLa.

6.2 Analisis Hasil Antigenisitas DNA yang berasal dari sel HeLa dan sel limfosit dengan Uji Titration Papan Catur (Checkerboard)

Penelitian ini juga mencoba untuk menentukan profil antigenisitas (DNA), dengan melakukan uji ikatan antigen dsDNA yang berasal dari sel limfosit orang sehat dan sel HeLa dengan antibodi primer dari serum pasien LES dengan kadar antibodi anti-dsDNA tinggi, dimana ikatan antigen dengan antibodi yang terkuat akan digunakan sebagai dasar melakukan uji diagnostik antigen dsDNA tersebut dengan serum pasien LES dengan anti-dsDNA positif dan anti-dsDNA negatif.

Pada uji titrasi papan catur (*checkerboard titration*) dengan antigen dsDNA yang berasal dari sel limfosit (*whole blood*), didapatkan perubahan warna yang paling menonjol setelah ditambahkan substrat pada posisi F6, yaitu pada pengenceran antigen 1/640 dan pengenceran antibodi

1/3200. Sementara uji titrasi papan catur dengan antigen dsDNA yang berasal dari sel HeLa, tidak didapatkan perubahan warna yang signifikan, sehingga tidak dilanjutkan pada proses selanjutnya. Dari penelitian oleh Milipore dan Oprandy et al, kegagalan teknik *dot blot assay* dapat disebabkan karena beberapa faktor, seperti penggunaan deterjen pada buffer dalam proses *dot blot assay* dapat menghambat ikatan DNA pada membran, bisa diatasi dengan menggunakan perbandingan buffer dan bahan detergen yang sesuai, volume sampel/sumber antigen yang kurang besar, permukaan area membran nitroselulosa, formulasi buffer untuk pencucian, ataupun viskositas partikel atau bahan lain yang dapat menghambat filtrasi dan melapisi membran sehingga DNA tidak melekat pada membran. Sebagai akibatnya, tidak terjadi perubahan warna saat ditambahkan substrat karena DNA tidak melekat di membran. (Milipore, 1997). Pada penelitian ini, tidak didapatkan perubahan warna yang signifikan pada *dot blot assay*, ini dapat disebabkan karena beberapa faktor, seperti konsentrasi antigen yang kurang sehingga menyebabkan kurang tertutupnya permukaan membran secara optimal pada setiap *well*, atau terjadi ketidakseimbangan jumlah antara antigen dan antibodi karena *analytical error* (teknik pemipetan manual), sehingga tidak didapatkan perubahan warna yang berarti. Untuk mengatasinya, dapat dilakukan sentrifugasi sampel dengan partikulat, dan ambil supernatannya saja untuk ditempatkan pada membran. Dapat juga dilakukan pengenceran sampel dengan menggunakan buffer. (Milipore, 1997; Oprandy et al, 1988)

6.3 Analisa Dot Enzyme Immunoassay Antigen dsDNA yang berasal dari sel limfosit dengan Serum Anti-dsDNA Positif dan Anti-dsDNA Negatif

Pada penelitian ini, tahapan selanjutnya adalah melakukan uji ikatan antigen dsDNA yang berasal dari sel limfosit terhadap kelompok pasien LES (anti-dsDNA positif) sebanyak 24 sampel dan kelompok kontrol (anti-dsDNA negatif) sebanyak 24 sampel, dengan pengenceran antigen 1/640 (3,16 ng/ μ L) dan pengenceran antibodi 1/3200 (posisi F6) untuk dapat menghitung sensitifitas dan spesifisitas intensitas warna dot blot assay terhadap diagnosis LES.

Pada kedua kelompok tersebut, kemudian dilakukan pengukuran intensitas warna dot blot assay dengan menggunakan program Corel di computer dan didapatkan perubahan intensitas warna secara kuantitatif, dimana semakin tinggi tingkat intensitas warnanya, akan semakin kecil angka yang dihasilkan dari program tersebut. Namun pada beberapa *well* pada kelompok pasien LES didapatkan intensitas warna yang rendah, dan begitu pula sebaliknya, pada kelompok kontrol didapatkan intensitas warna yang tinggi pada beberapa *well*.

Dari penelitian oleh Dwi Putra et al dan Milipore, hal ini dapat disebabkan kesalahan teknik pemipetan (faktor analitik) dalam proses *dot blot assay* atau antigen dsDNA yang masih bersifat *whole DNA* yang belum terfragmentasi, sehingga ikatan yang terjadi belum spesifik. (Dwi Putra et al, 2014; Milipore, 1997).

6.4 Nilai Diagnostik pada tingkat Intensitas Warna dot blot assay

Analisis kurva ROC terhadap variabel intensitas warna dot blot assay menunjukkan hasil AUC sebesar 76,1%, artinya apabila intensitas warna dot blot assay digunakan sebagai diagnosis dini dari LES pada 100 pasien maka

kesimpulan yang tepat akan didapatkan pada 76 pasien. Secara statistik, nilai AUC intensitas warna *dot blot* assay tergolong sedang.

Nilai *cut off* pada penelitian ini adalah nilai batas atau titik potong yang menyatakan suatu hasil pemeriksaan positif LES atau negatif LES. Hasil pemeriksaan yang kurang dari nilai *cut off* dianggap positif LES dan berpengaruh terhadap nilai diagnostik. Penelitian *cross-sectional* oleh Sharmin et al di departemen Mikrobiologi Dhaka Medical mengevaluasi keunggulan *dot blot* assay untuk mengidentifikasi antibodi terhadap *extractable nuclear antigen* (anti-ENA) terhadap penyakit *connective tissue disease* (CTD) dibandingkan dengan pengukuran menggunakan ELISA dengan sensitifitas sebesar 100% untuk SSA, SSB, Scl-70 antibodi dan sensitifitas sebesar 90% untuk RNP; kemudian spesifisitasnya mencapai 98% untuk ke-4 antibodi tersebut. Pada penelitian ini didapatkan nilai *cut off* intensitas warna *dot blot* assay sebesar 105,23 memberikan nilai diagnostik sensitivitas sebesar 70,83%; spesifisitas 75%; nilai ramal positif 73,91% dan nilai ramal negatif 72,00%.

Sensitivitas dan spesifisitas yang didapatkan masih belum memuaskan, tetapi bila faktor-faktor yang diduga dapat menyebabkan kurangnya sensitifitas dan spesifisitas tersebut dapat diatasi, diharapkan hasilnya akan menjadi lebih baik pada penelitian selanjutnya.

6.5 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yaitu: sepanjang pengetahuan peneliti, penelitian mengenai pengembangan kit diagnostik cepat LES masih sangat terbatas jumlahnya, sehingga masih diperlukan studi literatur yang lebih mendalam mengenai teknik dan prosedur isolasi antigen dsDNA dan

dot blotting assay serta kesulitannya, terutama pada isolasi antigen sel HeLa dimana prosedur yang digunakan merupakan modifikasi dari *human cell line* lain selain sel HeLa. Kemudian, sumber antigen yang didapatkan konsentrasinya masih kurang memadai, sehingga dibutuhkan sumber antigen dalam jumlah yang lebih besar dengan aksesibilitas baik. Selain itu, sampel yang berasal dari serum pasien LES tidak seluruhnya mengandung kadar anti-dsDNA yang tinggi, karena keterbatasan subyek penelitian, sehingga hasil intensitas warna *dot blot* assay pada serum pasien LES (anti-dsDNA positif) dan kontrol (anti-dsDNA negatif) tidak tampak berbeda secara signifikan pada beberapa sampel.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Hasil uji titrasi papan catur (*checker board*) didapatkan perubahan warna yang paling menonjol setelah ditambahkan substrat pada pengenceran antigen 1/640 (konsentrasi antigen 3,16 ng/ μ L) dan pengenceran antibodi 1/3200.
2. Profil antigen dsDNA yang berasal dari sel limfosit (*whole blood*) menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan antigen dsDNA yang berasal dari sel HeLa, dimana pada antigen dsDNA yang berasal dari sel HeLa tidak didapatkan perubahan intensitas warna yang signifikan.
3. Nilai diagnostik intensitas warna dot blot assay antigen dsDNA yang berasal dari sel limfosit adalah sedang, dengan sensitivitas sebesar 70,83% dan spesifisitas 75%, dengan *cut off dot blot assay* 105,23.

Hal ini kemungkinan disebabkan oleh teknik/prosedur isolasi dsDNA dan *blotting* yang kurang sempurna, kurang tertutupnya permukaan membran secara optimal pada setiap *well*, atau terjadi *analytical error* (karena teknik pemipetan manual).

7.2. Saran

1. Perlu penelitian lanjutan dengan isolasi antigen dsDNA dengan konsentrasi lebih tinggi, bisa dengan memperbaiki teknik ekstraksi DNA, seperti melakukan teknik sentrifugasi dan buffer pada suhu dingin ataupun teknik vortex dalam waktu yang lebih lama.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengembangan kit diagnostik cepat anti-dsDNA dengan antigen dsDNA dari sel limfosit di Indonesia



DAFTAR PUSTAKA

Abbas, AK., Lichtman, AH. & Pillai, S, 2007. Cellular and Molecular Immunology. 6th edition.

Acrani GO, Gomes R, Proenca-Modena JL, da Silva AF, Carminati PO, Silva ML, Santos RI, Arruda E. 2010. Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLA cells is dependent on virus protein expression. *Virus Res.* 149(1): 56-63.doi:10.1016/j.virisres.2009.12.013

Avihingsanon, Y, and Hirankarn, N. 2010. Major lupus organ involvement: severe lupus nephritis. *Lupus.* 19: 1391–1398.

Bausinger, Julia and Speit, Gunter. 2016. The impact of lymphocyte isolation on induced DNA damage in human blood sample measured by the comet assay. *Mutagenesis.* 31:567-572

Bramham, K., Soh, M.,C., and Nelson-Piercy,C.2012. Pregnancy and renal outcomes in lupus nephritis : an update and guide to management. *Lupus* 21:1271-1283

Collins, A., Koppen, G., Valdíglesias, V., *et al.* 2014. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutat. Res.*,759C, 27–39

Dema, Barbara and Charles, Nicholas. 2016. Autoantibodies in SLE: Specificities, Isotypes and Receptors. *MDPI journal.* 5: 2-30

Dhar, J.P and Sokol, R.J. 2006. Lupus and pregnancy : complex yet manageable. *Clinical Medicine &Research* 4: 310-321

Dwi Putra, S.E et al. 2014. Dealing with large sample sizes:comparison of a new one spot dot blot method to western blot. *Clin Lab.* 11 : 1-7

Ermens AA, Bayens AJ, van Gemert AC, van Duijnhoven JL. 1997. Simpe Dot blot method evaluated for detection of antibodies against extractable nuclear antigens. Clin Chem. 43:9120:2420-2

Fatchiyah, Arumingtyas EL, Widyarti S, Rahayu S. 2011. Biologi Molekuler : Prinsip dasar analisis. Erlangga.135-136

Feletar M *et al.* 2003. The impact of the 1997 update of the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus: what has been changed?. Arthritis Rheum. 48(7):2067-9

Frankovich, J., Sanborg, C., Barnes., Hintz and Chakravarty, E. 2008. Neonatal lupus and related autoimmune disorders of infants. Neoreviews. 9; e206. DOI 10.1542/neo.9-5-e206

Hughes, Richard and UI-Hassan, Sarea. 2006. Anti-dsDNA antibodies : their role in the detection and monitoring of SLE. CLI.Pp 13-17

Handojo, Indro. 2004. Pengantar Imunoasai Dasar. Airlangga University Press. 97-107

Houssiau, FA. 2004. Management of Lupus Nephritis : An Update. J Am Soc Nephrol. 15 : 2694–2704

Kalim, H., Singgih Wahono, C., Putra Suryana BP, Lenny Puspitasari, Fajar Hadi Wijayanto, Kusworini Handono. 2012. Association between serum level of Vitamin D with autoantibodies expression, disease activity (SLEDAI) and bone mineral density(BMD) in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Arthritis Research & Therapy, vol. 14(Suppl 1)

Kavanaugh, A., Tomar, R., Reveille, J., Solomon, D., H., and Homburger, H., A.

2000. Guidelines for clinical use of the ANA test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 124(1) : 71-81.

Longo D.L., Kasper D.L., Jameson J.L., Fauci A.S., Hauser S.L. & Loscalzo J.

2008. SLE, RA, and Other Connective Tissue Disease. In: *Harrison's Principle of Internal Medicine 18th ed.* USA : McGraw Hill. p. 1596-1611.

Macville M, Schrock E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D,

Popescu N, Ried T. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* 59(1) 141-50

Ortega, LM, Schultz, DR, Lenz, O, Pardo, V, & Contreras, GN. 2010. Lupus

nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus.* 19 : 557-574.

Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. 2009. A

novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell lines identification. *Bio Techniques.* 46(4): 277-84. Doi:10.2144/000113089

Pagana, K., D. and Pagana, T., J. 2006. *Mosby's Manual of Diagnostic and*

Laboratory Tests 3rd Edition Volume I.; Mosby Elsevier. Philadelphia. 233-235.

Peng Q, Li S, Lu X. 2008. A reversedot blot assay for the screening of twenty

mutations in foon genes associated with NSHL in a Chinese population. *PLoS ONE.* 12(5):e0177196.doi:10.1371/journal.pone.0177196

Puck TT, Marcus PI. A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc Natl Acad Sci.* 15;41(7): 432-437

Rahman, A, & Isenberg, DA. 2008. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 358 : 929-939

Sharmin, S., et al. 2011. Evaluation of Dot Immunoblot for identification of antibodies to Extractable nuclear antigen. *Bangladesh J Med Microbiol.* 05 (01):12-15

Sudoyo A.W., 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam.* Edisi V. Jakarta: Interna Publishing. p. 983-990.

Tsokos, George C., 2011. Mechanism of Disease Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 365:2110-21

Tutuncu Z.N., Kalunian K.C. 2007. The Definition and Classification of Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace D.J., Hahn B.H. (ed) *Dubois Lupus Erythematosus.* 7th

Wallace, Daniel J. 2007. The Clinical Presentation of Systemic Lupus Erythematosus; Differential Diagnosis and Disease Association. In: Wallace, Daniel J, Hahn, Bevr Hannahs. *Dubois' Lupus Erythematosus* 7th ed. California: Lippincott Williams & Walkins Yang et al., 2011

Wiley, John and Sons. 1996. Preparation of Human Mononuclear Cell Population and Subpopulation. *Immunologic Studies in Human.*

Verhoeckx, Kitty and Cotter, Paul. 1970. The Imood bioactives on gut helath : in vitro and ex vivo models., *European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research (Organization),*

Villalta, D. et al. 2013. Anti-dsDNA antibody istotypes in SLE : IgA in addition to IgG anti-dsDNA help to identify glomerulonephritis. PlosOne. 8(8)



Lampiran 1. TABULASI DATA SUBYEK PENELITIAN

DATA SUBYEK PENELITIAN KONTROL SEHAT DAN PASIEN LES

Subyek Kontrol Sehat (anti-dsDNA negatif)							
No	Nama	No MR	Usia	Jenis Kelamin	anti-dsDNA IgM(IU/mL)	anti-dsDNA IgG (IU/mL)	Densitas
1	Ny. U	1510120284	50	P	5.6	3.6	139.92
2	Ny. SH	11244023	26	P	2.6	7.5	154.65
3	Sdri. HD	10100978	16	P	5.6	3.2	166.28
4	Sdr. RA	11258003	15	L	5.8	1.9	151.11
5	Ny. Ag	201502163555	37	P	10.5	4.1	106.45
6	Sdri. SA	11247108	16	P	10	3.2	166.12
7	Tn. AA	11254967	50	P	4.4	4.5	150.84
8	Ny. Ch	11235889	45	P	3.7	0.5	161.11
9	Ny. US	11080990	31	P	5.7	3.7	171.33
10	Ny. S	11237493	38	P	2.1	1.6	217.98
11	Ny. YK	11223340	34	P	2.1	3.1	139.94
12	Ny. ES	201502109129	40	P	7	10.1	99.23
13	Ny. Skr	11125192	39	P	18.8	10.1	43.35
14	Ny. Ro	201502128417	28	P	3.3	9.8	129.41
15	Sdri. SW	11232361	17	P	0.7	2.4	105.40
16	Sdr. NA	11235921	16	L	2	1.8	112.39
17	Ny. Suh	11258098	43	P	2.3	3.6	71.42
18	Ny. LN	11292917	21	P	4.3	6.9	134.16
19	Ny. EW	11211861	25	P	4.3	2	139.37
20	Ny. SU	1108990	31	P	9.2	6	76.30
21	Sdri. AR	11298153	17	P	4.8	4.6	126.71
22	Ny. Nv	11250526	43	P	7.9	3.8	49.65
23	Tn. Sg	11251408	38	L	2	4.4	102.36
24	Ny. CI	11219953	49	P	3.6	2.1	74.84
Pasien LES (Anti-dsDNA Positif)							
No	Nama	No MR	Usia	Jenis Kelamin	anti-dsDNA IgM(IU/mL)	anti-dsDNA IgG (IU/mL)	Densitas
25	Ny. Ms	1509140273	48	P	7.4	>200	98.01
26	Sdr. Rc	11235919	18	L	81	134.1	123.08
27	Sdri. LH	11138452	23	P	9.6	>200	112.08
28	Ny. St	11249398	38	P	13.3	39.5	160.41
29	Sdri. AG	11246655	20	P	77.3	>200	55.67
30	Ny. IW	11260396	28	P	6.6	>200	82.15
31	Ny. Z	11201121	45	P	63.3	14.9	82.86

32	Ny. YA	10023588	34	P	10.5	96.5	134.16
33	Ny. NZ	10603175	38	P	10.9	40.3	164.68
34	Ny. WD	11259584	18	P	7.3	30	126.49
35	Ny. Skr	11240855	33	P	33.8	48.8	96.83
36	Ny. SI	11116230	24	P	27.7	>200	36.71
37	Sdri. MD	11256533	22	P	>200	>200	28.84
38	Ny. Ot	10289593	21	P	>200	>200	48.7691
39	Ny. Sy	11302831	40	P	7	>200	95.48
40	Ny. SS	11287971	50	P	54.8	12.8	109.86
41	Tn. K	201502129409	40	L	3.8	21.2	166.43
42	Ny. AWL	10836683	29	P	28.1	89.7	105.07
43	Ny. SIN	11247104	58	P	10.5	>200	69.76
44	Ny. SM	11254225	33	P	29.7	>200	16.41
45	Sdr. MA	11243397	17	L	12.8	>200	35.88
46	Ny. Ms	11256533	23	P	10.5	>200	33.30
47	Ny. SH		44	P	11.7	>200	40.92
48	Ny. SL	10996969	28	P	2.5	43	91.66

Keterangan :

- P: perempuan
- L: Laki-laki



Lampiran 2. HASIL ANALISIS DATA KARAKTERISTIK SUBYEK PENELITIAN

2.1 Demografi Umur pada Kelompok Kontrol Sehat

Descriptive Statistics

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Statistic
Umur	24	34	16	50	31.75	2.483	12.163	147.935
Valid N (listwise)	24							

2.2 Demografi Umur pada Kelompok Pasien LES

Descriptive Statistics

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Statistic
Umur	24	32	16	50	32.15	2.471	12.078	142.862
Valid N (listwise)	24							

Lampiran 3. HASIL ANALISIS DATA INTENSITAS WARNA DAN KELOMPOK LES (ANTI-dsDNA POSITIF)

3.1 Kurva ROC dan AUC pada Variabel Intensitas Dot blot assay dan anti-dsDNA

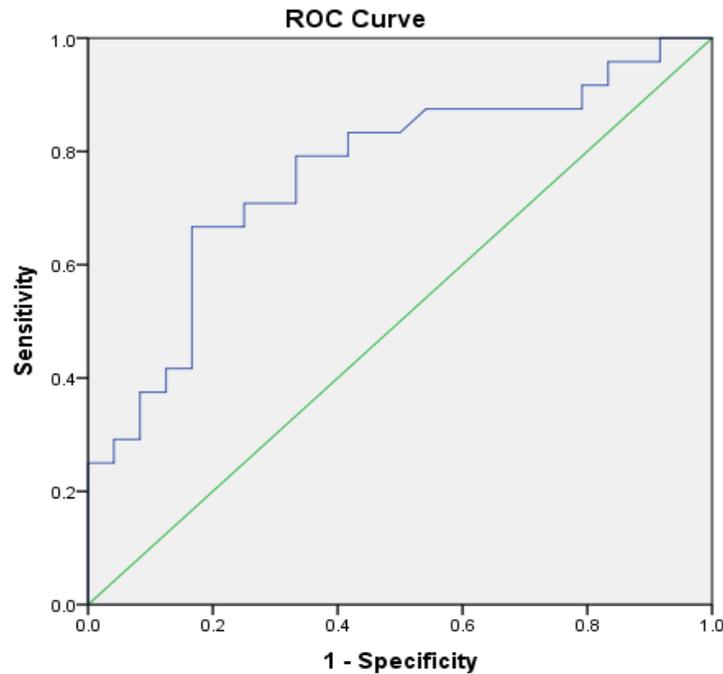
Case Processing Summary

LES	Valid N (listwise)
-----	--------------------

Positive ^a	24
Negative	24

Smaller values of the test result variable(s) indicate stronger evidence for a positive actual state.

a. The positive actual state is 1.



Diagonal segments are produced by ties.

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): Intensitas warna

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.761	.071	.002	.623	.900

The test result variable(s): Intensitas warna has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

3.2 Koordinat kurva sensitifitas dan spesifisitas Intensitas Dot blot assay

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): Intensitas warna

Positive if Less Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
27.8400	.000	.000
30.6250	.042	.000

32.8550	.083	.000
34.5900	.125	.000
36.2950	.167	.000
38.8150	.208	.000
42.1350	.250	.000
46.1300	.250	.042
49.2800	.292	.042
52.6600	.292	.083
62.7150	.333	.083
70.5900	.375	.083
73.1300	.375	.125
75.5700	.417	.125
79.2250	.417	.167
82.5050	.458	.167
87.2600	.500	.167
93.5700	.542	.167
96.1550	.583	.167
97.4200	.625	.167
98.6200	.667	.167
100.7950	.667	.208
103.7150	.667	.250
105.2350	.708	.250
105.9250	.708	.292
108.1550	.708	.333
110.9700	.750	.333
112.2350	.792	.333
117.7350	.792	.375
124.7850	.792	.417
126.6000	.833	.417
128.0600	.833	.458
131.7850	.833	.500
136.7650	.875	.542
139.6450	.875	.583
139.9300	.875	.625
145.3900	.875	.667
150.9750	.875	.708
152.8800	.875	.750
157.5300	.875	.792



160.7600	.917	.792
162.8950	.917	.833
165.4000	.958	.833
166.2000	.958	.875
166.3550	.958	.917
168.8800	1.000	.917
194.6550	1.000	.958
218.9800	1.000	1.000

The test result variable(s): Intensitas warna has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

- a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.



3.3 Sensitifitas dan Spesifisitas Intensitas Warna Dot Blot Assay

Statistic	Formula	Value	95% CI
-----------	---------	-------	--------

Sensitivity	$\frac{a}{a + b}$	70.83%	48.91% to 87.38%
Specificity	$\frac{d}{c + d}$	75.00 %	53.29% to 90.23%
Positive Likelihood Ratio	$\frac{\textit{Sensitivity}}{1 - \textit{Specificity}}$	2.83	1.35 to 5.93
Negative Likelihood Ratio	$\frac{1 - \textit{Sensitivity}}{\textit{Specificity}}$	0.39	0.20 to 0.76
Disease prevalence	$\frac{a + b}{a + b + c + d}$	50.00% (*)	35.23% to 64.77%
Positive Predictive Value	$\frac{a}{a + c}$	73.91% (*)	57.50% to 85.58%
Negative Predictive Value	$\frac{d}{b + d}$	72.00 % (*)	56.94% to 83.33%
Accuracy	$\frac{a + d}{a + b + c + d}$	72.92% (*)	58.15% to 84.72%

Lampiran 4. KETERANGAN KELAIKAN ETIK



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
THE MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF BRAWIJAYA
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
 Jalan Veteran Malang – 65145
 Telp./ Fax. (62) 341 - 553930

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 423 / EC / KEPK / 08 / 2015

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

- JUDUL** : Pengembangan *Rapid Rest Kit* Untuk Deteksi Autoantibodi Sebagai Inovasi Diagnosis Dini Lupus Eritematosus Sistemik Tepat Guna Di Indonesia.
- PENELITI UTAMA** : Dr. dr. Wisnu barlianto, M.SI.Med, Sp.A(K)
- ANGGOTA** : Dr.dr.Hani Susianti,Sp.PK
 dr. C. Singgih Wahono,Sp.PD-KR
 dr. Rossy Meiliani
 dr. Nelly Ismayasih
- UNIT / LEMBAGA** : Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang
- TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya dan RSU dr. Saiful Anwar Malang

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Prof. Dr.dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS, M.Hum
 NIP. 19460516 197111 1 001

Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (A.mandemen Protokol)

FORMULIR ETIK PENELITIAN KESEHATAN

1.	<p>Peneliti Utama (Title Unit Pelayanan)</p> <p>dr. Rossy Meilani</p> <p>Multisenter Ya <input type="checkbox"/> Tidak <input checked="" type="checkbox"/></p>
2.	<p>Judul Penelitian : PENGEMBANGAN PROTOTYPE ANTIGEN dsDNA UNTUK KIT DIAGNOSIS DM PADA PASIEN LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMIK</p>
3.	<p>Subjek</p> <p>Pasien <input checked="" type="checkbox"/> Non Pasien <input type="checkbox"/> Hewan <input type="checkbox"/></p> <p>Jumlah subyek: minimal 22</p> <p>Keterangan: pasien adalah subyek yang langsung mendapat manfaat dari penelitian tersebut</p>



4.	<p>Perkiraan waktu Penelitian yang dapat diselesaikan untuk tiap subyek</p> <p>selama 4 sampai 6 bulan</p>
5.	<p>Ringkasan usulan penelitian yang mencakup objektif / tujuan penelitian/ manfaat / relevansi dan hasil penelitian dan alasan / motivasi untuk melakukan penelitian (ditulis dalam bahasa yang mudah dipahami oleh orang yang bukan dokter)</p> <p>Mengembangkan suatu kit diagnostik lupus berbasis strip (rapid test) untuk deteksi autoantibodi anti dsDNA dalam serum yang mudah diaplikasikan bagi tenaga kesehatan di pelayanan kesehatan primer atau puskesmas untuk meningkatkan diagnosis dini penyakit lupus untuk perbaikan keberhasilan tatalaksana pasien lupus di Indonesia</p>
6.	<p>Masalah etik (Nyatakan pendapat anda tentang masalah etik yang mungkin dihadapi)</p> <p>Pengambilan sampel darah vena perifer menimbulkan rasa tidak nyaman pada penderita, namun ini dilakukan saat penderita diperiksa laboratorium darah lengkap. Komplikasi yang dapat timbul pada pengambilan darah vena adalah hematoma, sangat jarang terjadi infeksi akibat pengambilan darah. Meskipun demikian, tetap dimintakan <i>informed consent</i>.</p>
7.	<p>Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, apakah percobaan pada hewan sudah dilakukan? Bila belum, sebutkan alasan untuk memulai penelitian ini langsung pada manusia</p> <p>Penelitian ini tidak menggunakan hewan coba dan dilakukan pada manusia, karena struktur autoantibodi ANA dan anti-dsDNA pada manusia sangat spesifik dan berbeda dengan struktur pada hewan coba</p>
8.	<p>Prosedur eksperimen (Frekuensi, interval, dan jumlah total segala tindakan invasive yang akan dilakukan, dosis dan cara pemberian obat, isotop, radiasi dan tindakan lain)</p> <p>Pengujian kemampuan ikatan antigen dengan antibodi dilakukan pada dua kelompok subjek, yaitu kelompok kontrol sehat dan pasien LES. Pasien LES yang menjadi subjek penelitian merupakan pasien LES yang kontrol ke Poli Penyakit Dalam RSSA Malang yang didiagnosis berdasarkan kriteria diagnosis lupus SLICC tahun 2012, dengan kadar anti-dsDNA positif. Kontrol sehat yang menjadi subjek penelitian merupakan subjek yang telah terbukti tidak terdiagnosis lupus, tidak sedang dalam kondisi sakit, dan tidak memiliki riwayat penyakit inflamasi kronis. Jumlah minimal subjek berdasarkan rumus penghitungan subjek adalah 22 orang.</p> <p>Pasien LES dan kontrol sehat yang sudah memenuhi kriteria dan bersedia mengikuti penelitian kemudian diambil sampel darahnya (berupa serum darah) untuk diikutkan dalam prosedur penelitian selanjutnya di laboratorium.</p>

9.	<p>Bahaya potensial yang langsung atau tidak langsung segera atau kemudian dan cara mencegah atau mengatasi kejadian (termasuk rasa nyeri dan keluhan lain) :</p> <p>Bisa timbul rasa nyeri saat atau setelah proses pengambilan sampel darah pada pasien maupun kontrol sehat.</p> <p>Dapat diatasi dengan pemakaian torniket pada saat pengambilan sampel dan pemberian informasi pada subjek bahwa bila terjadi bengkak/nyeri di area sekitar daerah pengambilan sampel dapat dilakukan pengompresan dengan air hangat selama 10-30 menit.</p>
10	<p>Pengalaman terdahulu (sendiri atau orang lain) dari tindakan yang hendak diterapkan :</p> <p>Belum ada pengalaman mengenai pengambilan sampel darah (serum) subjek untuk dimasukkan dalam penelitian pembuatan <i>rapid tes kit</i>.</p>
11	<p>Bila penelitian ini menggunakan orang sakit dan dapat memberi manfaat untuk subjek yang bersangkutan, uraikan manfaat itu :</p> <p>Bisa sekaligus sebagai monitoring dan evaluasi klinis terhadap perjalanan penyakitnya (lupus) karena diperiksa juga kadar autoantibodi ANA dan anti- dsDNA pasien lupus tersebut</p>
12	<p>Bagaimana cara memilih pasien / sukarelawan sehat ?</p> <p>Pasien lupus yang menjadi subjek penelitian merupakan pasien LES yang kontrol ke Poli Penyakit Dalam RSSA atau dirawat di bagian Penyakit Dalam RSSA Malang yang didiagnosis berdasarkan kriteria diagnosis lupus SLICC tahun 2012. Pasien lupus yang dijadikan subjek penelitian merupakan pasien dengan kadar anti-dsDNA positif dan bersedia mengikuti penelitian.</p> <p>Kontrol sehat merupakan subjek yang telah terbukti tidak terdiagnosis lupus, tidak sedang dalam kondisi sakit, dan tidak memiliki riwayat penyakit inflamasi kronis, diambil secara acak.</p>
13	<p>Bila peneliti ini menggunakan subjek manusia, jelaskan hubungan antara peneliti utama dengan subjek yang diteliti :</p> <p>Dokter - Pasien <input checked="" type="checkbox"/> Guru – Murid <input type="checkbox"/> Majikan – anak buah <input type="checkbox"/> Lainnya <input type="checkbox"/></p>

14	<p>Bila peneliti ini menggunakan orang sakit, jelaskan diagnosis dan nama dokter yang bertanggungjawab merawatnya. Bila menggunakan orang sehat jelaskan cara pemeriksaan kesehatannya.</p> <p>Menggunakan orang sakit, dalam hal ini yang terduga menderita LES</p>
15	<p>Jelaskan cara pencatatan selama penelitian, termasuk efek samping dan komplikasi bila ada</p> <p>Dilakukan pencatatan setiap hari dan setiap proses, mulai dari pemilihan subjek sampai pelaksanaan prosedur di laboratorium</p>
16	<p>Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, jelaskan bagaimana cara memberitahu dan mengajak subjek (lampirkan contoh surat persetujuan subjek) bila pemberitahuan dan kesediaan subjek bersifat lisan, atau bila karena sesuatu hal subjek tidak dapat atau tidak perlu dimintakan persetujuan, berilah alasan yang kuat untuk itu .</p> <p>Subjek dijelaskan mengenai tujuan dan prosedur penelitian secara lisan, kemudian diminta menandatangani surat persetujuan secara tertulis dengan didampingi dan disaksikan oleh dua orang saksi. Bukti terlampir.</p>
17	<p>Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia apakah subjek dapat ganti rugi bila ada gejala efek samping ? berapa banyak?</p> <p>Subjek mendapatkan ganti rugi bila ada gejala efek samping. Besarannya berdasarkan kesepakatan bersama.</p>
18	<p>Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, apakah subjek diasuransikan</p> <p>Ya <input checked="" type="checkbox"/> Tidak <input type="checkbox"/></p>

Lampiran 5. PERSETUJUAN BERPARTISIPASI DALAM PENELITIAN

Pernyataan Persetujuan untuk

Berpartisipasi dalam Penelitian

Saya yang bertandatangan dibawah ini meyakini bahwa :

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar persetujuan diatas dan telah dijelaskan oleh peneliti
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela bersedia untuk ikut serta menjadi salah satu subyek penelitian yang berjudul :

Pengembangan Prototipe Antigen dsDNA Untuk Kit Diagnosis Dini Pada Pasien Lupus Eritematosus Sistemik

Malang,

Peneliti

Yang membuat pernyataan

(dr. Rossy Meilani)

(.....)

Saksi I

Saksi II

(.....)

(.....)

Lampiran 6. PENJELASAN MENGIKUTI PENELITIAN

PENJELASAN UNTUK MENGIKUTI PENELITIAN

1. Saya, dr. Rossy Meilani, adalah staf peneliti dari Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang, dengan ini meminta anda untuk berpartisipasi dengan sukarela dalam penelitian yang berjudul Pengembangan Prototipe Antigen dsDNA untuk Kit Deteksi Dini pasien Lupus Eritematosus Sistemik

2. Tujuan dari penelitian ini :

Mengembangkan suatu kit diagnostik lupus berbasis strip (rapid test) untuk deteksi autoantibodi anti-dsDNA dalam serum.

Dapat memberi manfaat :

Adanya kit diagnostik lupus berbasis strip (rapid test) untuk deteksi autoantibodi anti-dsDNA dalam serum yang mudah diaplikasikan bagi tenaga kesehatan di pelayanan kesehatan primer atau puskesmas untuk meningkatkan diagnosis dini penyakit lupus untuk perbaikan keberhasilan tatalaksana pasien lupus di Indonesia

Penelitian ini akan berlangsung selama 4 sampai 6 bulan dengan sampel berupa serum darah pasien lupus dan kontrol orang sehat yang akan diambil dengan cara pengambilan darah di vena mediana cubiti pada lengan subjek

Prosedur pengambilan sampel adalah dengan melakukan pengambilan sampel serum darah subjek dengan cara diambil darah subjek dari vena mediana cubiti pada lengan kanan/kiri subjek, ini mungkin menyebabkan rasa nyeri atau bengkak di area sekitar pengambilan sampel, tetapi anda tidak perlu khawatir karena rasa nyeri dan bengkak telah diminimalisir dengan pengikatan torniket di atas area pengambilan sampel, dan bila setelahnya timbul rasa nyeri atau bengkak di area sekitar pengambilan sampel dapat dilakukan pengompresan dengan air hangat selama 10-30 menit.

3. Keuntungan yang anda peroleh dengan keikutsertaan anda adalah bisa sekaligus sebagai monitoring dan evaluasi klinis terhadap perjalanan penyakitnya (lupus) karena diperiksa juga kadar autoantibodi anti-dsDNA pasien lupus tersebut.

4. Seandainya anda tidak menyetujui cara ini maka anda dapat memilih cara lain atau anda boleh tidak mengikuti penelitian ini sama sekali. Untuk itu anda tidak akan dikenai sanksi apapun
5. Nama dan jati diri anda akan tetap dirahasiakan
6. Tanda terimakasih berupa uang tunai sebesar Rp. 100.000,- yang akan diberikan kepada pasien yang mengikuti penelitian



Peneliti,

dr. Rossy Meilani



Lampiran 1. TABULASI DATA SUBYEK PENELITIAN

DATA SUBYEK PENELITIAN KONTROL SEHAT DAN PASIEN LES

Subyek Kontrol Sehat (anti-dsDNA negatif)							
No	Nama	No MR	Usia	Jenis Kelamin	anti-dsDNA IgM(IU/mL)	anti-dsDNA IgG (IU/mL)	Densitas
1	Ny. U	1510120284	50	P	5.6	3.6	139.92
2	Ny. SH	11244023	26	P	2.6	7.5	154.65
3	Sdri. HD	10100978	16	P	5.6	3.2	166.28
4	Sdr. RA	11258003	15	L	5.8	1.9	151.11
5	Ny. Ag	201502163555	37	P	10.5	4.1	106.45
6	Sdri. SA	11247108	16	P	10	3.2	166.12
7	Tn. AA	11254967	50	P	4.4	4.5	150.84
8	Ny. Ch	11235889	45	P	3.7	0.5	161.11
9	Ny. US	11080990	31	P	5.7	3.7	171.33
10	Ny. S	11237493	38	P	2.1	1.6	217.98
11	Ny. YK	11223340	34	P	2.1	3.1	139.94
12	Ny. ES	201502109129	40	P	7	10.1	99.23
13	Ny. Skr	11125192	39	P	18.8	10.1	43.35
14	Ny. Ro	201502128417	28	P	3.3	9.8	129.41
15	Sdri. SW	11232361	17	P	0.7	2.4	105.40
16	Sdr. NA	11235921	16	L	2	1.8	112.39
17	Ny. Suh	11258098	43	P	2.3	3.6	71.42
18	Ny. LN	11292917	21	P	4.3	6.9	134.16
19	Ny. EW	11211861	25	P	4.3	2	139.37
20	Ny. SU	1108990	31	P	9.2	6	76.30
21	Sdri. AR	11298153	17	P	4.8	4.6	126.71
22	Ny. Nv	11250526	43	P	7.9	3.8	49.65
23	Tn. Sg	11251408	38	L	2	4.4	102.36
24	Ny. Cl	11219953	49	P	3.6	2.1	74.84
Pasien LES (Anti-dsDNA Positif)							
No	Nama	No MR	Usia	Jenis Kelamin	anti-dsDNA IgM(IU/mL)	anti-dsDNA IgG (IU/mL)	Densitas
25	Ny. Ms	1509140273	48	P	7.4	>200	98.01
26	Sdr. Rc	11235919	18	L	81	134.1	123.08
27	Sdri. LH	11138452	23	P	9.6	>200	112.08
28	Ny. St	11249398	38	P	13.3	39.5	160.41
29	Sdri. AG	11246655	20	P	77.3	>200	55.67
30	Ny. IW	11260396	28	P	6.6	>200	82.15
31	Ny. Z	11201121	45	P	63.3	14.9	82.86
32	Ny. YA	10023588	34	P	10.5	96.5	134.16
33	Ny. NZ	10603175	38	P	10.9	40.3	164.68

34	Ny. WD	11259584	18	P	7.3	30	126.49
35	Ny. Skr	11240855	33	P	33.8	48.8	96.83
36	Ny. SI	11116230	24	P	27.7	>200	36.71
37	Sdri. MD	11256533	22	P	>200	>200	28.84
38	Ny. Ot	10289593	21	P	>200	>200	48.7691
39	Ny. Sy	11302831	40	P	7	>200	95.48
40	Ny. SS	11287971	50	P	54.8	12.8	109.86
41	Tn. K	201502129409	40	L	3.8	21.2	166.43
42	Ny. AWL	10836683	29	P	28.1	89.7	105.07
43	Ny. SIN	11247104	58	P	10.5	>200	69.76
44	Ny. SM	11254225	33	P	29.7	>200	16.41
45	Sdr. MA	11243397	17	L	12.8	>200	35.88
46	Ny. Ms	11256533	23	P	10.5	>200	33.30
47	Ny. SH		44	P	11.7	>200	40.92
48	Ny. SL	10996969	28	P	2.5	43	91.66

Keterangan :

- P: perempuan

- L: Laki-laki



Lampiran 2. HASIL ANALISIS DATA KARAKTERISTIK SUBYEK PENELITIAN

2.1 Demografi Umur pada Kelompok Kontrol Sehat

Descriptive Statistics

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Statistic
Umur	24	34	16	50	31.75	2.483	12.163	147.935
Valid N (listwise)	24							

2.2 Demografi Umur pada Kelompok Pasien LES

Descriptive Statistics

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Statistic
Umur	24	32	16	50	32.15	2.471	12.078	142.862
Valid N (listwise)	24							

Lampiran 3. HASIL ANALISIS DATA INTENSITAS WARNA DAN KELOMPOK LES (ANTI-dsDNA POSITIF)

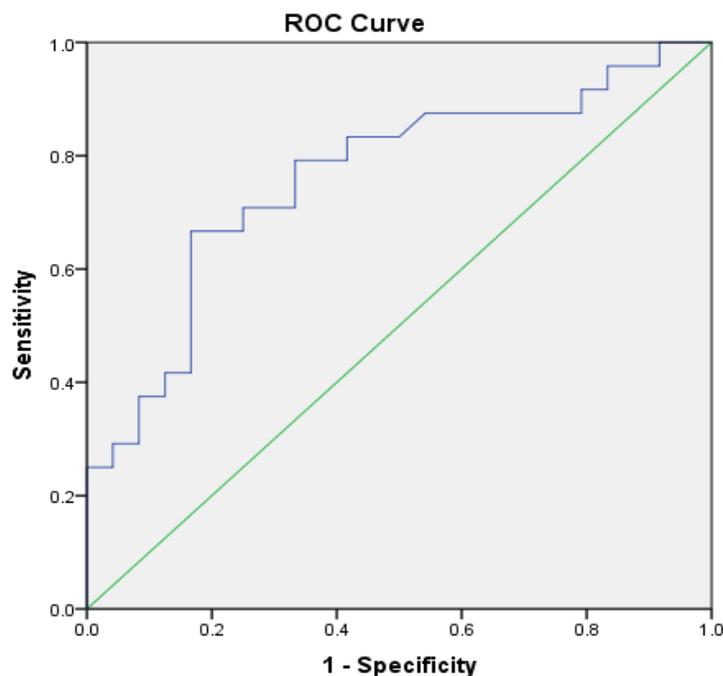
1.1 Kurva ROC dan AUC pada Variabel Intensitas Dot blot assay dan anti-dsDNA

Case Processing Summary

LES	Valid N (listwise)
Positive ^a	24
Negative	24

Smaller values of the test result variable(s) indicate stronger evidence for a positive actual state.

a. The positive actual state is 1.



Diagonal segments are produced by ties.

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): Intensitas warna

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.761	.071	.002	.623	.900

The test result variable(s): Intensitas warna has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

3.2 Koordinat kurva sensitifitas dan spesifisitas Intensitas Dot blot assay

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): Intensitas warna

Positive if Less Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 – Specificity
27.8400	.000	.000
30.6250	.042	.000
32.8550	.083	.000
34.5900	.125	.000
36.2950	.167	.000
38.8150	.208	.000
42.1350	.250	.000
46.1300	.250	.042
49.2800	.292	.042
52.6600	.292	.083
62.7150	.333	.083
70.5900	.375	.083
73.1300	.375	.125
75.5700	.417	.125
79.2250	.417	.167
82.5050	.458	.167
87.2600	.500	.167
93.5700	.542	.167
96.1550	.583	.167
97.4200	.625	.167
98.6200	.667	.167
100.7950	.667	.208
103.7150	.667	.250
105.2350	.708	.250
105.9250	.708	.292
108.1550	.708	.333
110.9700	.750	.333
112.2350	.792	.333
117.7350	.792	.375
124.7850	.792	.417
126.6000	.833	.417
128.0600	.833	.458
131.7850	.833	.500



136.7650	.875	.542
139.6450	.875	.583
139.9300	.875	.625
145.3900	.875	.667
150.9750	.875	.708
152.8800	.875	.750
157.5300	.875	.792
160.7600	.917	.792
162.8950	.917	.833
165.4000	.958	.833
166.2000	.958	.875
166.3550	.958	.917
168.8800	1.000	.917
194.6550	1.000	.958
218.9800	1.000	1.000

The test result variable(s): Intensitas warna has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

- a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

3.3 Sensitifitas dan Spesifisitas Intensitas Warna Dot Blot Assay

Statistic	Formula	Value	95% CI
Sensitivity	$\frac{a}{a + b}$	70.83%	48.91% to 87.38%
Specificity	$\frac{d}{c + d}$	75.00 %	53.29% to 90.23%
Positive Likelihood Ratio	$\frac{\textit{Sensitivity}}{1 - \textit{Specificity}}$	2.83	1.35 to 5.93
Negative Likelihood Ratio	$\frac{1 - \textit{Sensitivity}}{\textit{Specificity}}$	0.39	0.20 to 0.76
Disease prevalence	$\frac{a + b}{a + b + c + d}$	50.00% (*)	35.23% to 64.77%
Positive Predictive Value	$\frac{a}{a + c}$	73.91% (*)	57.50% to 85.58%
Negative Predictive Value	$\frac{d}{b + d}$	72.00 % (*)	56.94% to 83.33%
Accuracy	$\frac{a + d}{a + b + c + d}$	72.92% (*)	58.15% to 84.72%

Lampiran 4. KETERANGAN KELAIKAN ETIK

	<p>KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN THE MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF BRAWIJAYA KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE Jalan Veteran Malang – 65145 Telp./ Fax. (62) 341 - 553930</p>
<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")</p> <p>No. 423 / EC / KEPK / 08 / 2015</p> <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN</p>	
<p>JUDUL</p> <p>PENELITI UTAMA</p> <p>ANGGOTA</p> <p>UNIT / LEMBAGA</p> <p>TEMPAT PENELITIAN</p> <p>DINYATAKAN LAIK ETIK.</p>	<p>: Pengembangan <i>Rapid Rest Kit</i> Untuk Deteksi Autoantibodi Sebagai Inovasi Diagnosis Dini Lupus Eritematosus Sistematis Tepat Guna Di Indonesia.</p> <p>: Dr. dr. Wisnu barlianto, M.SI.Med, Sp.A(K)</p> <p>: Dr.dr.Hani Susianti,Sp.PK dr. C. Singgih Wahono,Sp.PD-KR dr. Rossy Meiani dr. Nelly Ismayasih</p> <p>: Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang</p> <p>: Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya dan RSU dr. Saiful Anwar Malang</p> <p style="text-align: center;">  Malang, 27 AUG 2015 Ketua, Komisi Etik Penelitian Kesehatan Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS, M.Hum NIP. 19460516 197111 1 001</p>
<p>Catatan :</p> <p>Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)</p>	

KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN

THE MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MEDICAL FACULTY BRAWIJAYA UNIVERSITY

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

FORMULIR ETIK PENELITIAN KESEHATAN

<p>1.</p>	<p>Peneliti Utama (Title Unit Pelayanan) dr. Rossy Meilani</p> <p>Multisenter Ya <input type="checkbox"/> Tidak <input checked="" type="checkbox"/></p>
<p>2.</p>	<p>Judul Penelitian : PENGEMBANGAN PROTOTYPE ANTIGEN dsDNA UNTUK KIT DIAGNOSIS DINI PADA PASIEN LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMIK</p>
<p>3.</p>	<p>Subjek</p> <p>Pasien <input checked="" type="checkbox"/> Non Pasien <input type="checkbox"/> Hewan <input type="checkbox"/></p> <p>Jumlah subyek: minimal 22</p> <p>Keterangan: pasien adalah subyek yang langsung mendapat manfaat dari penelitian tersebut</p>

4.	<p>Perkiraan waktu Penelitian yang dapat diselesaikan untuk tiap subyek</p> <p>selama 4 sampai 6 bulan</p>
5.	<p>Ringkasan usulan penelitian yang mencakup objektif / tujuan penelitian/ manfaat / relevansi dari hasil penelitian dan alasan / motivasi untuk melakukan penelitian (ditulis dalam bahasa yang mudah dipahami oleh orang yang bukan dokter)</p> <p>Mengembangkan suatu kit diagnostik lupus berbasis strip (rapid test) untuk deteksi autoantibodi anti-dsDNA dalam serum yang mudah diaplikasikan bagi tenaga kesehatan di pelayanan kesehatan primer atau puskesmas untuk meningkatkan diagnosis dini penyakit lupus untuk perbaikan keberhasilan tatalaksana pasien lupus di Indonesia</p>
6.	<p>Masalah etik (Nyatakan pendapat anda tentang masalah etik yang mungkin dihadapi)</p> <p>Pengambilan sampel darah vena perifer menimbulkan rasa tidak nyaman pada penderita, namun ini dilakukan saat penderita diperiksa laboratorium darah lengkap. Komplikasi yang dapat timbul pada pengambilan darah vena adalah hematoma, sangat jarang terjadi infeksi akibat pengambilan darah. Meskipun demikian, tetap dimintakan <i>informed consent</i>.</p>
7.	<p>Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, apakah percobaan pada hewan sudah dilakukan? Bila belum, sebutkan alasan untuk memulai penelitian ini langsung pada manusia</p> <p>Penelitian ini tidak menggunakan hewan coba dan dilakukan pada manusia, karena struktur autoantibodi ANA dan anti-dsDNA pada manusia sangat spesifik dan berbeda dengan struktur pada hewan coba</p>
8.	<p>Prosedur eksperimen (Frekuensi, interval, dan jumlah total segala tindakan invasive yang akan dilakukan, dosis dan cara pemberian obat, isotop, radiasi dan tindakan lain)</p> <p>Pengujian kemampuan ikatan antigen dengan antibodi dilakukan pada dua kelompok subjek, yaitu kelompok kontrol sehat dan pasien LES. Pasien LES yang menjadi subjek penelitian merupakan pasien LES yang kontrol ke Poli Penyakit Dalam RSSA Malang yang didiagnosis berdasarkan kriteria diagnosis lupus SLICC tahun 2012, dengan kadar anti-dsDNA positif.. Kontrol sehat yang menjadi subjek penelitian merupakan subjek yang telah terbukti tidak terdiagnosis lupus, tidak sedang dalam kondisi sakit, dan tidak memiliki riwayat penyakit inflamasi kronis. Jumlah minimal subjek berdasarkan rumus penghitungan subjek adalah 22 orang.</p> <p>Pasien LES dan kontrol sehat yang sudah memenuhi kriteria dan bersedia mengikuti penelitian kemudian diambil sampel darahnya (berupa serum darah) untuk diikutkan dalam prosedur penelitian selanjutnya di laboratorium.</p>

<p>9.</p>	<p>Bahaya potensial yang langsung atau tidak langsung segera atau kemudian dan cara mencegah atau mengatasi kejadian (termasuk rasa nyeri dan keluhan lain) :</p> <p>Bisa timbul rasa nyeri saat atau setelah proses pengambilan sampel darah pada pasien maupun kontrol sehat.</p> <p>Dapat diatasi dengan pemakaian torniket pada saat pengambilan sampel dan pemberian informasi pada subjek bahwa bila terjadi bengkak/nyeri di area sekitar daerah pengambilan sampel dapat dilakukan pengompresan dengan air hangat selama 10-30 menit.</p>
<p>10</p>	<p>Pengalaman terdahulu (sendiri atau orang lain) dari tindakan yang hendak diterapkan :</p> <p>Belum ada pengalaman mengenai pengambilan sampel darah (serum) subjek untuk dimasukkan dalam penelitian pembuatan <i>rapid tes kit</i>.</p>
<p>11</p>	<p>Bila penelitian ini menggunakan orang sakit dan dapat memberi manfaat untuk subjek yang bersangkutan, uraikan manfaat itu :</p> <p>Bisa sekaligus sebagai monitoring dan evaluasi klinis terhadap perjalanan penyakitnya (lupus) karena diperiksa juga kadar autoantibodi ANA dan anti- dsDNA pasien lupus tersebut</p>
<p>12</p>	<p>Bagaimana cara memilih pasien / sukarelawan sehat ?</p> <p>Pasien lupus yang menjadi subjek penelitian merupakan pasien LES yang kontrol ke Poli Penyakit Dalam RSSA atau dirawat di bagian Penyakit Dalam RSSA Malang yang didiagnosis berdasarkan kriteria diagnosis lupus SLICC tahun 2012. Pasien lupus yang dijadikan subjek penelitian merupakan pasien dengan kadar anti-dsDNA positif dan bersedia mengikuti penelitian.</p> <p>Kontrol sehat merupakan subjek yang telah terbukti tidak terdiagnosis lupus, tidak sedang dalam kondisi sakit, dan tidak memiliki riwayat penyakit inflamasi kronis, diambil secara acak.</p>
<p>13</p>	<p>Bila peneliti ini menggunakan subjek manusia, jelaskan hubungan antara peneliti utama dengan subjek yang diteliti :</p> <p>Dokter - Pasien <input checked="" type="checkbox"/> Guru – Murid <input type="checkbox"/> Majikan – anak buah <input type="checkbox"/> Lainnya <input type="checkbox"/></p>

14	<p>Bila peneliti ini menggunakan orang sakit, jelaskan diagnosis dan nama dokter yang bertanggungjawab merawatnya. Bila menggunakan orang sehat jelaskan cara pemeriksaan kesehatannya.</p> <p>Menggunakan orang sakit, dalam hal ini yang terduga menderita LES</p>
15	<p>Jelaskan cara pencatatan selama penelitian, termasuk efek samping dan komplikasi bila ada</p> <p>Dilakukan pencatatan setiap hari dan setiap proses, mulai dari pemilihan subjek sampai pelaksanaan prosedur di laboratorium</p>
16	<p>Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, jelaskan bagaimana cara memberitahu dan mengajak subjek (lampirkan contoh surat persetujuan subjek) bila pemberitahuan dan kesediaan subjek bersifat lisan, atau bila karena sesuatu hal subjek tidak dapat atau tidak perlu dimintakan persetujuan, berilah alasan yang kuat untuk itu .</p> <p>Subjek dijelaskan mengenai tujuan dan prosedur penelitian secara lisan, kemudian diminta menandatangani surat persetujuan secara tertulis dengan didampingi dan disaksikan oleh dua orang saksi. Bukti terlampir.</p>
17	<p>Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia apakah subjek dapat ganti rugi bila ada gejala efek samping ? berapa banyak?</p> <p>Subjek mendapatkan ganti rugi bila ada gejala efek samping. Besarannya berdasarkan kesepakatan bersama.</p>
18	<p>Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, apakah subjek diasuransikan</p> <p>Ya <input checked="" type="checkbox"/> Tidak <input type="checkbox"/></p>

Lampiran 5. PERSETUJUAN BERPARTISIPASI DALAM PENELITIAN

**Pernyataan Persetujuan untuk
Berpatisipasi dalam Penelitian**

Saya yang bertandatangan dibawah ini meyakini bahwa :

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar persetujuan diatas dan telah dijelaskan oleh peneliti
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela bersedia untuk ikut serta menjadi salah satu subyek penelitian yang berjudul :

Pengembangan Prototipe Antigen dsDNA Untuk Kit Diagnosis Dini Pada Pasien Lupus Eritematosus Sistemik

Malang,

Peneliti

Yang membuat pernyataan

(dr. Rossy Meilani)

(.....)

Saksi I

Saksi II

(.....)

(.....)



Lampiran 6. PENJELASAN MENGIKUTI PENELITIAN

PENJELASAN UNTUK MENGIKUTI PENELITIAN

1. Saya, dr. Rossy Meilani, adalah staf peneliti dari Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang, dengan ini meminta anda untuk berpartisipasi dengan sukarela dalam penelitian yang berjudul Pengembangan Prototipe Antigen dsDNA untuk Kit Deteksi Dini pasien Lupus Eritematosus Sistemik

2. Tujuan dari penelitian ini :
Mengembangkan suatu kit diagnostik lupus berbasis strip (rapid test) untuk deteksi autoantibodi anti-dsDNA dalam serum.

Dapat memberi manfaat :

Adanya kit diagnostik lupus berbasis strip (rapid test) untuk deteksi autoantibodi anti-dsDNA dalam serum yang mudah diaplikasikan bagi tenaga kesehatan di pelayanan kesehatan primer atau puskesmas untuk meningkatkan diagnosis dini penyakit lupus untuk perbaikan keberhasilan tatalaksana pasien lupus di Indonesia

Penelitian ini akan berlangsung selama 4 sampai 6 bulan dengan sampel berupa serum darah pasien lupus dan kontrol orang sehat yang akan diambil dengan cara pengambilan darah di vena mediana cubiti pada lengan subjek

Prosedur pengambilan sampel adalah dengan melakukan pengambilan sampel serum darah subjek dengan cara diambil darah subjek dari vena mediana cubiti pada lengan kanan/kiri subjek, ini mungkin menyebabkan rasa nyeri atau bengkak di area sekitar pengambilan sampel, tetapi anda tidak perlu kuatir karena rasa nyeri dan bengkak telah diminimalisir dengan pengikatan torniket di atas area pengambilan sampel, dan bila setelahnya timbul rasa nyeri atau bengkak di area sekitar pengambilan sampel dapat dilakukan pengompresan dengan air hangat selama 10-30 menit.

3. Keuntungan yang anda peroleh dengan keikutsertaan anda adalah bisa sekaligus sebagai monitoring dan evaluasi klinis terhadap perjalanan penyakitnya (lupus) karena diperiksa juga kadar autoantibodi anti-dsDNA pasien lupus tersebut.

4. Seandainya anda tidak menyetujui cara ini maka anda dapat memilih cara lain atau anda boleh tidak mengikuti penelitian ini sama sekali. Untuk itu anda tidak akan dikenai sanksi apapun

5. Nama dan jati diri anda akan tetap dirahasiakan

6. Tanda terimakasih berupa uang tunai sebesar Rp 100.000,- yang akan diberikan kepada pasien yang mengikuti penelitian



Peneliti,