

## ARTIKEL ASLI

## DETECTION OF SPECIFIC IGA ANTIBODIES IN SALIVA DURING DENGUE FEVER WITH THE ELISA TECHNIQUE

## DETEKSI ANTIBODI IGA-SPEKIFIK DALAM SALIVA PENDERITA DEMAM DENGUE DENGAN TEKNIK ELISA

Rooije R.H. Rumende \*, Marsetyawan HNES \*\*, dan Sutaryo \*\*\*

\* Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sam Ratulangi, Manado

\*\* Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

\*\*\* Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

## ABSTRACT

Dengue fever (DF) is a kind of diseases caused by dengue virus. At now, the serological examination to dengue infection using blood still faces several constraints. The most popular constraints are being afraid and hurt feeling from patients when blood taking, and the needs of skilled technician. Other method using saliva has been widely used recently because it is easy, lets intervention procedure, and more economic. The development of this examination was directed to the detection of antibodies in saliva. The antibody detection namely for specific IgG and IgM of dengue infection in saliva has been investigated, but not for specific IgA. The aim of this study was to detect specific IgA in saliva during DF infection by using ELISA technique. This study was conducted in two stages. First, the collection of saliva from normal healthy children as a control, and that saliva collection from DF, and nondengue individuals based on WHO criteria. Second, the detection of specific IgA in the saliva of both groups with ELISA technique. The result indicated that ELISA technique could detect specific IgA in the saliva during DF. From 14 samples of normal children, the cut off value was 0,417. It could be concluded that specific IgA during dengue infection could be detected in the saliva. The OD average of nondengue fever patients (typhoid) fluctuated in the negative dengue rate.

**Key words:** Saliva specific IgA antibodies, dengue fever, ELISA technique

## ABSTRAK

Demam dengue (DD) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus dengue. Pemeriksaan secara serologis terhadap infeksi dengue dengan menggunakan darah sampai saat ini masih terdapat beberapa kendala. Kendala yang sering dijumpai adalah pasien tidak bersedia karena merasa takut dan sakit saat pengambilan darah, dan membutuhkan teknisi yang terampil. Akhir-akhir ini sedang dikembangkan pemeriksaan serologis menggunakan saliva dengan alasan lebih mudah, tidak intervensif dan lebih ekonomis. Pengembangan pemeriksaan diarahkan pada deteksi antibodi yang ada dalam saliva. Deteksi antibodi (IgG dan IgM) pada saliva yang terinfeksi dengue telah dilaksanakan, sedangkan IgA-spesifik hingga kini belum pernah diperiksa. Tujuan penelitian secara umum adalah untuk mendeteksi IgA-spesifik terhadap virus dengue pada saliva anak-anak yang terinfeksi DD dengan teknik ELISA. Sedangkan tujuan secara khusus adalah mendapatkan gambaran kadar IgA-spesifik terhadap virus dengue secara sekuensial (serial) pada saliva anak-anak yang terinfeksi DD dengan teknik ELISA. Metodologi yang digunakan dalam penelitian ini ada dua tahap. Pertama, pengumpulan saliva individu sehat dan saliva penderita DD/demam nondengue menurut gejala klinis sesuai kriteria WHO. Kedua, deteksi IgA-spesifik dalam saliva individu (anak) sehat dan saliva penderita DD/demam nondengue dengan teknik ELISA. Pengumpulan saliva penderita (secara serial) dilakukan di Bagian Anak/SMF RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta. Saliva individu (anak) sehat dikumpulkan sekali bertempat di Yogyakarta. Hasil penelitian ini adalah IgA-spesifik pada saliva anak-anak yang terinfeksi DD dapat dideteksi dengan teknik ELISA. Dari 14 sampel saliva dari anak-anak yang sehat, cut off value didapat 0,417. Kesimpulan penelitian adalah IgA-spesifik terhadap virus dengue pada saliva anak-anak yang terinfeksi dengue dapat dideteksi. Rerata kadar OD dari penderita demam nondengue (tifoid) mengalami fluktuasi dan dalam tingkat dengue negatif.

**Kata kunci:** spesimen saliva, antibodi spesifik DD, pemeriksaan ELISA

## PENDAHULUAN

Demam dengue (DD) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus dengue. Virus ini merupakan *Arthropod borne virus (arboviruse)* yang termasuk dalam genus *flavivirus*, dari famili *Flaviviridae*. DD sebagaimana telah disebutkan di atas disebabkan oleh virus dengue dengan 4 serotipe, yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Serotipe DEN-3 merupakan serotipe

yang dominan dan banyak berhubungan dengan kasus berat (1). Pada infeksi dengue dikenal dua infeksi yaitu, pertama: infeksi primer yang terjadi dengan infeksi virus dengue untuk pertama kalinya; kedua: infeksi sekunder, atau infeksi dengan virus dengue yang kedua kalinya (2).

Selain pemeriksaan serologis dengan menggunakan darah, akhir-akhir ini sedang dikembangkan diagnosis dengan

menggunakan saliva untuk menentukan adanya infeksi virus dengue. Pengembangannya diarahkan pada identifikasi antibodi dalam saliva. Perhatian para peneliti untuk menggunakan saliva sebagai spesimen dalam diagnosis laboratorium, didasarkan pada beberapa pertimbangan. Pertama, terdapatnya beberapa kendala pengambilan darah pada anak-anak sebagaimana telah diuraikan di atas. Kedua, konsentrasi antibodi dalam saliva orang normal adalah 19,9 mg/100 ml (IgA), 1,4 mg/100 ml (IgG), dan 0,2 mg/100 ml (IgM) (3). Ketiga, keunggulan saliva untuk keperluan diagnosis adalah cara pengambilan lebih mudah, tidak intervensif dan menakutkan, lebih ekonomis dan mengurangi risiko penularan lewat tusukan jarum suntik, serta dapat dipakai untuk pemeriksaan berbagai penyakit. Keempat, pengiriman spesimen perpos tanpa perlindungan suhu dingin asalkan diberi antibiotika dan anti-fungi serta medium konservan yang dapat mencegah degradasi protein antibodi (4). Kelima, penelitian dengan menggunakan saliva untuk penderita yang terinfeksi dengue telah berhasil dilaksanakan dan telah dipublikasikan (3,5). Adanya penelitian yang mendeteksi IgM dan IgG dalam saliva yang terinfeksi dengue dan penelitian yang membandingkan konsentrasi IgM dalam serum penderita DD dengan teknik ELISA dapat dijadikan dasar untuk pengembangan penelitian lanjutan pada saliva yang terinfeksi dengue (3,5).

IgA yang terdapat pada saliva dalam bentuk *Secretory IgA* (SIgA), mempunyai fungsi sebagai suatu "zat antiseptik" pada permukaan mukosa. Hasil penelitian lainnya mengenai antibodi IgA terhadap *Streptococcus mutans*, candida dan virus polio adalah mencegah infeksi pada gigi atau selaput mukosa. Keuntungan yang lain dari SIgA adalah lebih tahan terhadap pemecahan proteolitik daripada imunoglobulin lainnya (6).

Penelitian tentang respons humoral antibodi IgA-spesifik dalam saliva secara serial terhadap infeksi dengue pada anak-anak berdasarkan pertimbangan seperti berikut. Pertama, IgA dalam saliva memiliki konsentrasi yang paling tinggi dibandingkan jenis antibodi lainnya. Kedua, terdapat kemudahan cara pada pengambilan/ pengumpulan saliva untuk keperluan diagnostik. Ketiga, belum pernah dilakukan deteksi IgA-spesifik dalam saliva secara serial terhadap infeksi dengue pada anak-anak. Keempat, untuk mendapatkan suatu standar yang baik dalam pembuatan alat diagnostik.

Tujuan penelitian secara umum adalah untuk memperoleh data anak-anak yang terinfeksi dengan melakukan deteksi IgA-spesifik pada saliva DD dengan teknik ELISA. Sedangkan tujuan penelitian secara khusus adalah untuk mendapatkan gambaran rerata OD ELISA ELISA secara serial pada anak-anak yang terinfeksi DD.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Bahan dan Alat Penelitian

Saliva yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari 40 penderita DD, 3 penderita nondengue (tifoid) yang dirawat di Instalasi Rawat Inap II Kesehatan Anak RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta dan 14 anak sehat di Yogyakarta. Bahan lain yang digunakan adalah antigen campuran DEN-1 (Hawai); DEN-2 (New-Guinea-C); DEN-3 (Philippines H-87) dan DEN-4 (Philippines H-241) yang diperoleh dari Laboratorium Ilmu Hayati, UGM Yogyakarta; *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH

7,4; larutan PBS-T 0,05 % tween 20, BSA 1 %, konjugat anti human IgA terlabel enzim alkalin fosfatase; 4-Nitrofenilfosfat (SIGMA), dietanolamin HCL (SIGMA); alkohol. Penelitian ini menggunakan alat berupa *Plate 96* sumuran jenis *Maxishop* merek Nunc, ELISA *photoreader* jenis *Bio-Rad* merek *Benchmark*.

### Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap. Pertama, pengumpulan sampel saliva penderita DD/demam nondengue (tifoid) dan pengumpulan sampel saliva anak sehat (berdasarkan Gejala klinis sesuai kriteria WHO). Kedua, deteksi IgA-spesifik dalam saliva anak sehat dan penderita DD/demam nondengue (tifoid) dengan teknik ELISA (7,8). Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Hayati Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Setiap *Plate* yang terdiri atas 96 sumur digunakan untuk pengujian 15 sampel saliva positif, 1 sampel saliva positif, 1 sampel saliva kontrol positif, 1 sampel saliva kontrol negatif, dan 1 untuk blanko. Setiap sampel saliva diencerkan dengan perbandingan 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, dan setiap pengenceran dimasukan pada sumur *Plate* dengan sistem duplo.

### Pengumpulan Sampel Saliva

Setiap sampel anak sehat diambil salivanya sebanyak 1-1,8 ml dan pengambilannya dilaksanakan setiap pagi hari secara serial mulai saat pasien masuk rumah sakit sampai hari terakhir sebelum pasien kembali ke rumah. Pengumpulan sampel saliva anak sehat dilaksanakan sekali saja. Pengambilan saliva berdasarkan acuan pada protokol pengumpulan saliva.

### Prosedur Pemeriksaan IgA Dengan Teknik ELISA

Pengujian deteksi IgA-spesifik dalam sample saliva demam dengue, demam berdarah dengue, demam non dengue dan saliva normal dilakukan dengan teknik ELISA yang prosedurnya adalah sebagai berikut (7,8).

- Coating antigen*; 100 µl Antigen virus dengue campuran (2 µg/ml dalam natrium bikarbonat 0,84 g/100 ml. pH 9,6) dimasukan dalam sumuran *microplate* dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 4 °C.
- Microplate* dicuci tiga kali dengan dapar PBS-T 0,05 % (PBS + Tween 20).
- 100 µl larutan bloking (BSA 1 % dalam PBS-T), kemudian ditambahkan 100 µl sampel saliva dengan pengenceran 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, dan diinkubasikan 1 jam pada suhu 37 °C. Setelah diinkubasikan 1 jam, sumuran cuci tiga kali dengan PBS-T.
- 100 µl konjugat anti human IgA berlabel enzim alkalin fosfatase dalam media dimasukan ke dalam setiap sumuran dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37 °C.
- Sumur dicuci dua kali dengan PBS-T, dan satu kali dicuci dengan NaCl 150 mM pH 8,5; kemudian ditambahkan 100 µl larutan substrat (4-nitrofenilfosfat 1 mg/ml dalam larutan dietanolamin-HCl) dan diinkubasikan 1 jam pada suhu 37 °C. *Optical density* masing-masing sumuran kemudian dibaca dengan menggunakan ELISA *Reader* 405 nm.

Hasil ELISA dari keseluruhan saliva penderita DD/demam nondengue (tifoid), semuanya dikelompokkan sesuai hari sakit

berdasarkan riwayat sakit penderita yang dilanjutkan dengan menghitung rerata OD setiap hari sakit dari penderita.

## HASIL PENELITIAN

Sampel saliva yang terkumpul selama pengambilan sampel pada penderita DD/demam dengue dan individu sehat adalah 153 sampel saliva. Sampel saliva yang diambil adalah 43 yang terdiri dari 40 penderita DD, 3 penderita demam nondengue (tifoid). Sedangkan sampel saliva dari individu sehat adalah 14 anak.

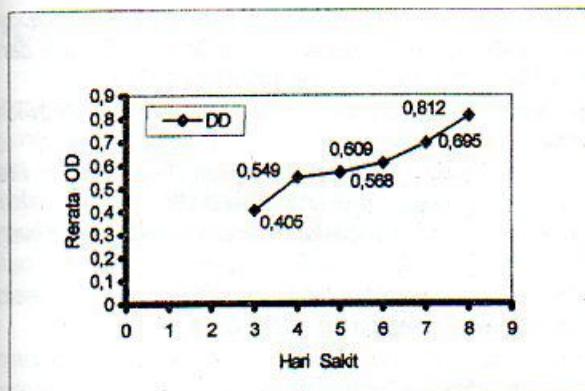
Tabel 1: Kadar OD ELISA sampel saliva normal

ANAK	UMUR (Tahun)	KADAR OD ELISA
1	10	0,332
2	11	0,384
3	10	0,291
4	10	0,305
5	8	0,361
6	8	0,341
7	9	0,396
8	9	0,290
9	9	0,363
10	6	0,332
11	11	0,367
12	10	0,391
13	11	0,389
14	8	0,351

$$\bar{X} = 0,349$$

$$SD = 0,034$$

$$\begin{aligned} \text{Cut off value} &= \text{Rerata OD kontrol negatif} + 2 \text{ SD Kontrol negatif} \\ &= 0,349 + 2 (0,034) \\ &= 0,417 \end{aligned}$$



Gambar 9: Gambaran IgA saliva pada ELISA dari penderita DD selama perawatan di rumah sakit

## PEMBAHASAN

Rerata OD dari ke-14 sampel saliva normal yang diuji adalah 0,349 dengan *Standard deviation* (SD) 0,034 (tabel 1). Berdasarkan rerata OD seluruh sampel dan SD, maka *cut off value* dari Tabel 1 adalah 0,417. Rerata OD di bawah 0,417 dianggap sebagai dengue negatif dan rerata OD di atas atau sama dengan 0,417 dianggap sebagai dengue positif. *Cut off*

*value* ini diperoleh berdasarkan rerata OD kontrol negatif + 2 SD kontrol negatif (5,9).

Hasil pengujian 120 sampel saliva dari 40 penderita DD menunjukkan rerata OD tertinggi pada hari sakit ke-8 adalah 0,812. Rerata OD pada hari sakit 3-8 berkisar pada 0,405 sampai 0,812. Rerata OD hari sakit 3-8 dapat dilihat pada Gambar 1.

Sedangkan hasil uji pada 19 sampel saliva yang berasal dari 3 penderita demam nondengue yang dilaksanakan selama pasien dirawat di rumah sakit pada kurun waktu 6-14 hari, rerata OD yang diperoleh adalah berfluktuasi dari 0,262 – 0,469 atau yang disimpulkan sebagai dengue negatif (tabel 3).

Saat ini pemeriksaan IgA, IgM dan IgG dari saliva masih memerlukan standarisasi menggunakan cara pengumpulan sampel, khususnya untuk anak. Apabila hal ini dapat dikerjakan, maka akan membantu proses diagnosis oleh karena praktis dan tanpa pemeriksaan invasif (10). Rerata OD untuk hari sakit 3-8 mulai dari yang rendah 0,405 sampai mencapai 0,812. Sampai hari sakit kedelapan titer pasien DD tetap mengalami kenaikan terus dan penurunannya tidak diketahui. Hal ini disebabkan karena pasien DD dirawat di rumah sakit hanya sampai pada hari kedelapan. Sesudah hari tersebut pasien telah dipulangkan ke rumahnya karena telah membaik atau sembuh. Keadaan ini mengakibatkan tidak didapatkan sampel saliva di atas hari kedelapan untuk dilaksanakan pengujian. Puncak titer DD di hari kedelapan sesuai dengan hasil penelitian dari Talarmin (5).

Hasil ELISA sampel penderita demam nondengue (tifoid) menunjukkan bahwa titer yang dihasilkan adalah dengue negatif atau berada di bawah *cut off value* yaitu 0,476. Hal ini disebabkan karena penderita tidak mengalami infeksi dengue, tetapi sakit dengan diagnosis tifoid.

Beberapa peneliti telah melaksanakan penelitian dengan menggunakan saliva untuk menunjang diagnosis beberapa penyakit infeksi, seperti AIDS, leptospirosis, *meales*, hepatitis A dan B, serta rubella (3).

Penelitian dengan menggunakan uji serologis saliva untuk penderita yang terinfeksi dengue, masih jarang dilakukan. Publikasi terakhir adalah penelitian yang mendeteksi antibodi IgM dan IgG dengan teknik ELISA dengan menggunakan sample saliva. Hasil penelitian tersebut, memperjelas pasien dikategorikan sebagai positif dengue apabila memiliki titer lebih besar atau sama dengan 0,6. Pasien dikategorikan negatif dengue apabila memiliki titer lebih kecil dari 0,6. Selanjutnya pada pasien yang terinfeksi primer, mayoritas memiliki titer IgM yang tinggi tanpa titer IgG yang dapat dideteksi. Sedangkan mayoritas pasien dengan infeksi sekunder menunjukkan tingkat IgG yang tinggi dengan atau tanpa IgM yang dapat dideteksi (3).

Laporan penelitian mengenai faktor-faktor yang mempertahankan mukosa mulut hanya sedikit. Meskipun demikian, terdapat suatu penemuan yang konsisten berupa kurangnya penetrasi jasad renik pada selaput mukosa mulut. Hal ini disebabkan karena pengaruh peran saliva sebagai benteng pertahanan pertama mukosa mulut yang sangat diperhitungkan. Fungsi SIgA pada saliva adalah sebagai suatu "zat antiseptik" pada permukaan mukosa mulut (11).

Salah satu respons antibodi pada infeksi virus dengue adalah adanya peningkatan produksi IgA. Kenyataan ini dapat dilihat dari penelitian oleh Summers, (1984) yang menunjukkan

bahwa IgA pada virus dengue dapat dideteksi secara tidak langsung atau dengan isotype-capture immunoassay (11).

Secara umum SIgA saliva berfungsi dalam menetralkan infeksi dengue, karena SIgA saliva mampu menetralkan toksin atau virus dan mencegah terjadinya kontak antara toksin atau virus dengan sel sasaran immunoassay (12,13). Pendapat lain menyatakan bahwa tidak semua antibodi dapat menetralkan toksin atau virus. Ada virus mampu mengubah struktur antigennya dan melepaskan diri melalui membran sel sebagai partikel yang infeksius, sehingga virus dapat menyebar ke dalam sel yang berdekatan secara langsung. Salah satu virus yang memiliki cara demikian adalah virus dengue. Tentunya berbagai pendapat yang telah diuraikan ini, masih perlu untuk dipelajari dan ditindaklanjuti dengan penelitian (14).

#### KESIMPULAN DAN SARAN

IgA-spesifik terhadap virus dengue pada saliva anak-anak yang terinfeksi DD dapat dideteksi dengan teknik ELISA. IgA-spesifik terhadap virus dengue pada saliva penderita DD

terdeteksi pada hari keempat dan rerata OD meningkat sampai hari kedelapan atau hari terakhir pasien dirawat di rumah sakit.

Perlu dilaksanakan penelitian lanjutan untuk pengumpulan dan pengujian sampel saliva bagi penderita DD setelah pasien kembali ke rumah karena telah sembuh. Penelitian lanjutan ini dilaksanakan untuk mendapatkan data dari keadaan rerata OD DD di hari selanjutnya setelah sembuh.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktur RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta khususnya pimpinan dan staf di Instalasi Rawat Inap II Kesehatan Anak RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, yang telah mengizinkan untuk tempat pengambilan sampel. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Kepala Laboratorium Ilmu Hayati Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan para teknisi yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini. Kepada semua yang telah membantu sehingga suksesnya penelitian ini, disampaikan terima kasih.

#### DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Sri Rezeki, H.H., S. Soegijanto, S.Wuryadi, dan Th Suroso., Tatalaksana Demam Dengue/demam Berdarah Dengue pada Anak. Demam Berdarah Dengue dalam *Naskah lengkap Pelatihan bagi Pelatih Dokter Spesialis Anak dan Dokter Spesialis Penyakit dalam, dalam Tatalaksana Kasus DBD*. Jakarta. 24-26 November 1998: 82-136.
2. Suharyono, W., Diagnosis Laboratorium Infeksi Virus Dengue: Demam Berdarah Dengue dalam *Naskah Lengkap Pelatihan bagi Pelatih Dokter Spesialis dan Dokter Spesialis Penyakit Dalam, dalam Tatalaksana Kasus DBD*. Jakarta. 24-26 November 1998: 55-64.
3. Cuzzubbo, A.J., D.W. Vaughn, A. Nisalak, S. Suntayakorn, J. Aaskov, and P.L. Devine., Detection of Specific Antibodies in Saliva during Dengue Infection. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (12): 3737-3739.
4. Suwardji, H., Pemeriksaan Saliva pada DHF: *Naskah pada KONAS - II PETRI*. Surabaya. 6-9 Desember 1996.
5. Talarmin, A., Bh. Labeau, J. Lelarge and J.L. Sarthou., Immunoglobulin A-Specific Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Dengue Fever. *J. Clin. Microbiol.* May 1998; 36 (5): 1189-1192.
6. Lehner, T., *Imunologi pada Penyakit Mulut*. EGC. Edisi 3. Jakarta. 1995: 8-15.
7. Burgess, W.G., *Teknologi ELISA Dalam Diagnosis Dan Penelitian*. Gadjah Mada University Press. 1995.
8. Wahyono, D.J., Sutaryo, dan S.R. Umniyati., Laporan Kemajuan Riset RUT III Tahun Ke-I 1995/1996 Tahap Akhir: *Produksi Antibody monoclonal Virus Dengue Serotip-3 untuk Deteksi Spesifik Virus Dengue Serotipe-3 pada Penderita Demam Berdarah Dengue dan Vektornya*. Kerjasama Fakultas Kedokteran dengan Proyek Puspitek Kantor Menteri Negara Riset Dan Teknologi. 1996
9. Zheung, V. et al., Parasite Antigen in Sera and Urine of Patients with Bancroftian and Brugian Filariasis Detected by Sandwich ELISA with Monoclonal Antibodies. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 36 (3): 554.
10. Sutaryo., *Perkembangan Diagnosis Demam Berdarah Dengue: Seminar Perkembangan Ilmu Kedokteran Tropis dalam Era Globalisasi, Pusat Kedokteran Tropis dan Program Magister Ilmu Kedokteran Tropis UGM*. Yogyakarta. 3 Maret 2001.
11. Innis, B.J., Antibody responses to dengue virus infection in Gubler D.J. and Kuno G (ed): *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Cab. International USA. 1997: 233.
12. Berkow, R. and A.J. Fletcher., *The Merck manual*. Edisi enam belas. Jilid satu. Binarupa Aksara, Indonesia. 1999.
13. Kresno, S.B., *Imunologi: Diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi ketiga. Fakultas Kedokteran UI. 1996: 31.
14. Subowo., *Imunobiologi*. Angkasa Bandung. 1993: 120.
15. Baratawidjaja, K.G. *Imunologi dasar*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1996: 22-23.