

**TITER ANTI-HBS DENGAN VARIASI WAKTU PEMBACAAN  
ABSORBANSI PADA ELISA READER**

**SKRIPSI**

Diajukan sebagai salah satu syarat menyelesaikan  
Pendidikan Diploma IV Kesehatan  
Program Studi Analis Kesehatan



Diajukan Oleh :  
Septi Tri Andini  
G1C011028

**PROGAM D-IV ANALIS KESEHATAN  
FAKULTAS ILMU KEPERAWATAN DAN KESEHATAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SEMARANG  
2016**

**HALAMAN PERSETUJUAN**

Skripsi dengan judul “Titer Anti-Hbs Dengan Variasi Waktu Pembacaan Absorbansi Pada ELISA *Reader*” oleh Septi Tri Andini ( NIM : G1C011028 )

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan D IV Kesehatan Program Studi Analis Kesehatan

Telah disetujui oleh:

**Pembimbing I**



**Dr Budi Santosa, SKM,M.Si Med**

NIK. 28.6.1026.033

Tanggal, 27 September 2016

**Pembimbing II**



**Herlisa Anegraini, SKM, M.Si Med**

NIK. 28.6.1026.014

Tanggal, 27 September 2016

**Mengetahui**

**Ketua Program Studi D IV Analis Kesehatan**

**Fakultas Ilmu Keperawatan dan kesehatan**



**Dra Sri Sinto Dewi, M.Si Med**

NIK. 28.6.1026.032

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini telah diajukan pada sidang Ujian Jenjang Pendidikan Tinggi Diploma IV Kesehatan Program Studi Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang.

Tanggal Sidang: 20 September 2016

Susunan Tim Penguji

No	Nama	Nara Sumber	Tanda Tangan	Tanggal
1	Dr. Sri Darmawati, M.Si	Penguji I		27/09/2016
2	Dr. Budi Santosa, SKM, M.Si. Med	Penguji II		27/09/2016
3	Herlisa Anggraini, SKM, M.Si. Med	Penguji III		27/09/2016

## TITER ANTI-HBS DENGAN VARIASI WAKTU PEMBACAAN ABSORBANSI PADA ELISA READER

Septi Tri Andini <sup>1</sup>, Budi Santosa <sup>2</sup>, Herlisa Anggraini <sup>3</sup>

<sup>1</sup>. Progam Studi D IV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang  
septiandini23@gmail.com<sup>1</sup>

<sup>2,3</sup>. Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang  
budisantosa@unimus.ac.id <sup>2</sup>, herlisa@uimus.ac.id <sup>3</sup>

### ABSTRAK

*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) adalah suatu teknik biokimia yang digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Pembacaan pada ELISA *reader* ada beberapa hal yang perlu diperhatikan salah satunya adalah waktu pembacaan absorbansi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui titer anti-HBs dengan variasi waktu pembacaan absorbansi (1, 15 dan 30 menit) pada ELISA *reader* setelah penambahan *stop solution*. Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan pendekatan *cross sectional*. Populasi penelitian ini adalah mahasiswa DIV Analis Kesehatan FIKKES Universitas Muhammadiyah Semarang semester tujuh *post* vaksinasi hepatitis B. Analisis statistik dilakukan uji *Friedman*. Hasil pemeriksaan Anti-HBs pada menit pertama yaitu sebesar 0,922 mIU/ml, menit ke 15 didapatkan hasil 0,998 mIU/ml dan menit ke 30 didapatkan hasil 0,991 mIU/ml. Hasil analisis pada SPSS didapatkan nilai probabilitas atau signifikansi yaitu 0,599 ( $p > 0,05$ ) sehingga diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara variasi waktu pembacaan absorbansi pada metode ELISA

Kata Kunci : **Hepatitis B, anti-HBs, ELISA**

## ANTI-HBS TITER WITH VARIATION OF TIME IN ELISA ABSORBANCE READING READER

Septi Tri Andini <sup>1</sup>, Budi Santosa <sup>2</sup>, Herlisa Anggraini <sup>3</sup>

<sup>1</sup>. Medical Laboratory Study Progame of Health and Nursing Faculty  
Muhammadiyah University of Semarang,  
septiandini23@gmail.com <sup>1</sup>

<sup>2,3</sup>.Molecular Biologi Laboratory at Health and Nursing Faculty Muhammadiyah  
University of Semarang.  
budisantosa@unimus.ac.id <sup>2</sup>, herlisa@uimus.ac.id <sup>3</sup>

### ABSTRACT

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was a biochemical technique used in the field of immunology to detect the presence of antibodies or antigens in a sample. Readings on ELISA reader there were several things to note one of which is the absorbance reading time. The purpose of this research was to determine the anti-HBs titers comparison with the time variation of readings (1, 15 and 30 minutes) absorbance in the ELISA reader. This research was an experimental study with cross sectional approach. The population in this research were students of medical laboratory University of Muhammadiyah Semarang seventh semester post vaccination against hepatitis B. Statistical analysis was *Friedman* test. Anti-HBs test results in the first minute is equal to 0.922 mIU / ml, 15 min to the results obtained 0.998 mIU / ml and 30 minutes for the results obtained 0.991 mIU / ml SPSS analysis results obtained value or significance probability is 0.599 ( $p > 0.05$ ) so it is known that there is no significant difference between the time variation in the method ELISA absorbance readings.

Keywords : **Hepatitis B, anti-HBs, ELISA**

## HALAMAN PERNYATAAN ORIGINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (sarjana), baik di Universitas Muhammadiyah Semarang maupun di perguruan tinggi lain.
2. Skripsi ini murni gagasan, rumusan, dan penelitian saya sendiri tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan Tim Pembimbing dan masukan Tim \penguji.
3. Dalam skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai sumber acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidak benaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh, serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku diperguruan tinggi ini.

Semarang, September 2016

Yang membuat pernyataan,



Septi Tri Andini

NIM. G1C011028

## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat, hidayah dan Inayah-Nya, Sholawat dan salam kepada junjungan kita Baginda Rasulullah SAW beserta keluarga dan para Sahabat-nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “Titer Anti-Hbs Dengan Variasi Waktu Pembacaan Absorbansi Pada ELISA *Reader*”.

Penyusunan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan Diploma IV Analisis Kesehatan di Universitas Muhammadiyah Semarang 2016.

Penulis menyadari bahwa terselesaikannya Tugas Akhir ini tidak lepas dari bimbingan, dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Dr. Budi Santosa, SKM, M.Si. Med selaku pembimbing pertama
2. Herlisa Anggraini, SKM, M.Si. Med selaku pembimbing kedua
3. Dra Sri Sinto Dewi, M.Si Med selaku ketua program studi
4. Ibunda dan ayahanda tersayang, yang selalu mendoakan dan memberikan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Teman-teman seangkatan 2012 atas persahabatan, persaudaraan, motivasi, dan kerjasamanya.
6. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, atas bantuan dan dukungannya untuk penulis dari awal proses sampai skripsi ini dapat terselesaikan.

Penulis menyadari masih banyak ketidak sempurnaan dan kekurangan dalam penulisan tugas akhir ini. Kritik dan saran yang membangun. Semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi para pembaca.

Semarang, September 2016

Penyusun

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>SURAT PERNYATAAN ORIGINALITAS</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Hepatitis B .....	5
2.1.1 Etiologi Hepatitis B .....	6
2.1.2 Masa Inkubasi Hepatitis B.....	6
2.1.3 Penularan Hepatitis B.....	7
2.1.4 Manifestasi Klinis Hepatitis B.....	7
2.1.5 Replikasi Hepatitis B .....	9
2.1.6 Diagnosis Hepatitis B.....	9
2.2 Anti-HBs.....	12
2.3 ELISA .....	14
2.4 Kerangka Teori .....	17
2.5 Kerangka Konsep.....	17
2.6 Hipotesis .....	17
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Desain Penelitian .....	18
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	18
3.3 Populasi dan Sampel.....	18
3.3.1 Populasi Penelitian.....	18
3.3.2 Besar Sampel .....	18
3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel .....	19
3.4 Variabel Penelitian.....	19
3.5 Definisi Operasional Variabel .....	19
3.6 Bahan dan Alat Penelitian.....	20
3.7 Prosedur Pemeriksaan.....	20
3.7.1 Pengambilan Sampel Darah vena.....	20

3.7.2 Pembuatan Serum.....	20
3.7.3 Pemeriksaan Anti-HBs dengan ELISA .....	21
3.8 Alur Penelitian .....	22
3.9 Alur Pemeriksaan.....	23
3.10 Pengolahan dan Analisis Data .....	23
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Gambaran Umum sampel .....	25
4.2 hasil penelitian .....	25
4.3 Pembahasan .....	26
<b>BAB V PENUTUP</b>	
5.1 Kesimpulan .....	28
5.2 Saran .....	28
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	29
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b>	



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Definisi Operasional .....	20
2. Distribusi sampel berdasarkan hasil pemeriksaan anti-HBs dengan ELISA .....	25



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Virus Hepatitis B .....	6
2. Macam-macam Metode ELISA .....	15
3. Kerangka teori perbandingan titer anti-HBs dengan variasi waktu pembacaan absorbansi pada ELISA Reader.....	17
4. Kerangka konsep perbandingan titer anti-HBs dengan variasi waktu pembacaan absorbansi pada ELISA Reader.....	17



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur ELISA kit anti-HBs .....	31
2. Hasil Penelitian Pemeriksaan Anti-HBs .....	33
4. Hasil Uji SPSS <i>Friedman</i> .....	33
5. Dokumentasi Penelitian .....	34



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hepatitis B merupakan infeksi virus yang menyerang hati dan dapat menyebabkan penyakit akut maupun kronik dan secara potensial merupakan infeksi hati yang mengancam nyawa (WHO, 2012). Virus hepatitis B telah menginfeksi lebih dari 350 juta orang di dunia atau kurang lebih 5% populasi dunia (Aswati *et al.*, 2013).

Penderita dengan infeksi hepatitis B akut ditemukan antibodi permukaan hepatitis B (anti-HBs) hampir 80% dari subyek dalam 1 sampai 3 bulan setelah hilangnya antigen permukaan hepatitis B (HBsAg). Anti-HBs merupakan komponen antibodi yang secara khusus mampu menghambat penempelan virus dan masuknya VHB ke dalam sel inang. Kehadiran anti-HBs merupakan faktor penting dalam diagnosis dan prognosis infeksi VHB. Anti-HBs dapat timbul setelah terinfeksi oleh virus hepatitis B atau setelah vaksinasi hepatitis B (Weber, 2005).

Metode pemeriksaan VHB antara lain adalah *Immunochromatography* (ICT), *Enzym Linked Imunosorbent Assay* (ELISA), *Enzym Imunosorbent Assay* (EIA) dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode EIA dan PCR tergolong mahal dan hanya tersedia pada laboratorium yang memiliki peralatan lengkap. Metode yang sering digunakan dan direkomendasikan oleh Kemenkes RI (2012) untuk pemeriksaan Anti-HBs adalah ELISA. *Enzyme-Linked Imunosorbent Assay* (ELISA) adalah suatu teknik biokimia yang digunakan dalam bidang

imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel (Rahman et al, 2008). ELISA secara khusus memiliki reporter dan substrat yang menghasilkan beberapa bentuk perubahan warna yang dapat diamati untuk mengetahui kehadiran antigen (Leng et al, 2008).

Prinsip dari pemeriksaan ELISA adalah reaksi antigen-antibodi (Ag-Ab) dimana setelah penambahan konjugat yaitu antigen atau antibodi yang dilabel enzim dan substrat akan terjadi perubahan warna. Saat cahaya dengan panjang gelombang tertentu disinarkan pada suatu sampel, kompleks antigen atau antibodi akan berfluoresensi sehingga jumlah antigen pada sampel dapat disimpulkan berdasarkan besarnya fluoresensi. Perubahan warna akan diukur intensitasnya dengan alat pembaca yang disebut spektrofotometer atau ELISA *reader* dengan menggunakan panjang gelombang tertentu (Primadharsini & Wibawa, 2013).

Hasil dari proses ELISA terdiri dari dua bentuk yaitu kualitatif dan kuantitatif. Hasil secara kualitatif adalah perubahan warna pada *well plate* yang mengindikasikan bahwa terjadi reaksi yang spesifik antara antigen dengan antibodi. Perubahan warna tersebut dihasilkan oleh reaksi antara substrat dengan enzim yang terdapat di anti-antibodi. Hasil secara kuantitatif berupa besaran konsentrasi dan nilai absorbansi pada sampel.

Pengukuran absorbansi pada hasil ELISA menggunakan mesin ELISA *reader* yang prinsipnya sama dengan mesin spektrofotometer. Intensitas cahaya yang diserap oleh sampel pada panjang gelombang tertentu berbanding lurus dengan besar nilai absorbansi. Semakin banyak intensitas cahaya yang diserap, maka semakin besar nilai absorbansi. Semakin kecil nilai

intensitas cahaya yang diserap oleh sampel, semakin kecil pula nilai absorbansi (Crowther 2001: 10).

Pembacaan pada ELISA *reader* ada beberapa hal yang perlu diperhatikan antara lain panjang gelombang, waktu pembacaan absorbansi dan ketelitian serta ketepatan dalam pemeriksaan itu sendiri. Menurut Kit Anti-Hbs “*New Hepalisa*” dijelaskan pembacaan absorbansi dalam pemeriksaan ELISA ini diharuskan dibaca dalam waktu kurang dari 15 menit dengan menggunakan panjang gelombang 450 nm. Hal tersebut mendorong peneliti untuk melakukan uji perbandingan titer anti-hbs dengan variasi waktu pembacaan absorbansi pada ELISA *reader* sehingga dapat mengetahui keakuratan dari metode tersebut.

## **1.2 Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas penulis ingin mengetahui bagaimana perbandingan titer anti-HBs dengan variasi waktu pembacaan absorbansi pada ELISA *reader*.

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Berdasarkan latar belakang dan perumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbandingan titer anti-HBs dengan variasi waktu pembacaan (1, 15 dan 30 menit) absorbansi pada ELISA *reader*.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Menghitung titer anti-HBs berdasarkan waktu pembacaan absorbansi 1 menit

2. Menghitung titer anti-HBs berdasarkan waktu pembacaan absorbansi 15 menit sebagai control
3. Menghitung titer anti-HBs berdasarkan waktu pembacaan absorbansi 30 menit
4. Menganalisis adanya perbedaan antara waktu pembacaan absorbansi 1, 15 dan 30 menit.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

##### **1. Manfaat Bagi Penulis**

Mengembangkan pengetahuan dan pengalaman ilmiah dalam suatu penelitian tentang perbandingan titer anti-HBs dengan variasi waktu pembacaan absorbansi pada ELISA *reader*

##### **2. Manfaat Bagi Akademik**

Penelitian ini dapat menambah kepustakaan bagi akademi dan dapat menjadi referensi untuk penelitian selanjutnya

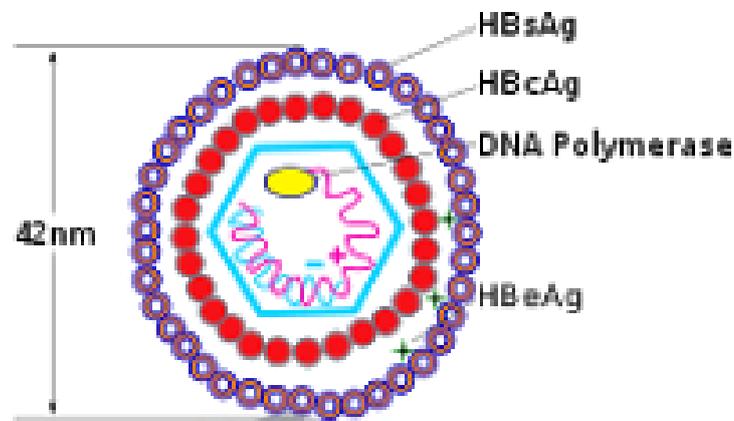
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Hepatitis B

Hepatitis B adalah penyakit inflamasi dan nekrosis dari sel-sel hati yang disebabkan oleh VHB (Astuti dan Kusumawati, 2014). Infeksi dari VHB dapat menyebabkan peradangan hati akut atau kronik (Busca dan Kumar, 2014) yang pada sebagian kecil kasus dapat berlanjut menjadi sirosis hati atau kanker hati (Ishikawa, 2010).

Virus Hepatitis B (VHB) termasuk dalam anggota famili *Hepadnavirus* yang dapat menyebabkan peradangan hati akut atau menahun yang pada sebagian kecil kasus dapat berlanjut menjadi sirosis hati atau kanker hati. Infeksi hepatitis B menjadi problem kesehatan masyarakat di seluruh dunia. Diperkirakan ada 350 juta carrier (pengidap) di dunia. Pada penderita hepatitis B kronis, bisa timbul komplikasi seperti sirosis (pengerasan hati) dan kanker hati. Prevalensi rata-rata hepatitis B di Indonesia 10 persen. Variasi berkisar 3,4 - 20,3 persen di setiap daerah. Di luar Jawa, kecuali Lombok dan Sumbawa, umumnya prevalensi rendah. Kemungkinan akan menjadi kronik lebih tinggi bila infeksi terjadi pada usia balita dimana respon imun belum berkembang secara sempurna. VHB memiliki 3 jenis antigen spesifik yaitu HBsAg, HBeAg dan HBcAg. Protein pada selubung virus membentuk HBsAg, sedangkan pada inti virus terdapat HBcAg dan pada *nucleocapsid* terdapat HBeAg (Dienstag, 2008)



**Gambar 1:** Struktur Virus Hepatitis B (Sumber: Misnadiarly, 2007)

### 2.1.1 Etiologi Hepatitis B

Menurut National Institutes of Health (2006) etiologi Hepatitis B adalah virus dan disebut dengan Hepatitis B Virus. Misnadiarly (2007) menguraikan VHB terbungkus serta mengandung genom DNA melingkar. Virus ini merusak fungsi lever dan terus berkembangbiak dalam sel-sel hati (*hepatocytes*). Akibat serangan itu sistem kekebalan tubuh kemudian memberi reaksi dan melawan. Apabila tubuh berhasil melawan maka virus akan terbasmi habis, tetapi jika gagal virus akan tetap tinggal dan menyebabkan Hepatitis B kronis dimana pasien sendiri menjadi karier atau pembawa virus seumur hidupnya.

### 2.1.2 Masa Inkubasi Hepatitis B

Masa inkubasi VHB ini biasanya 45 – 180 hari dengan batasan 60 – 90 hari, dimana setelah 2 minggu infeksi virus Hepatitis B terjangkit, HBsAg dalam darah penderita sudah mulai dapat dideteksi. Perubahan dalam tubuh penderita akibat infeksi virus Hepatitis B terus berkembang. Dari infeksi akut berubah menjadi kronis, sesuai dengan umur penderita. Makin tua umur, makin besar

kemungkinan menjadi kronis kemudian berlanjut menjadi pengkerutan jaringan hati yang disebut dengan sirosis. Bila umur masih berlanjut keadaan itu akan berubah menjadi karsinoma hepatoseluler (Yatim, 2007)

### **2.1.3 Penularan Hepatitis B**

Cara penularan paling utama di dunia ialah dari ibu kepada bayinya saat proses melahirkan. Jika bayinya tidak divaksinasi saat lahir bayi bisa menjadi carrier seumur hidup bahkan bisa menderita gagal hati dan kanker hati. Selain itu penularan juga dapat terjadi ketika terjadi kontak dengan darah yang terinfeksi virus Hepatitis B (Misnadiarly, 2007).

Menurut Franco et al. (2012) infeksi virus hepatitis B merupakan masalah kesehatan masyarakat yang serius dimana infeksi dapat ditularkan melalui hubungan seksual, kontak parenteral atau dari ibu yang terinfeksi kepada bayinya saat lahir dan , jika menginfeksi sejak awal kehidupan, dapat menyebabkan penyakit hati kronik, termasuk sirosis dan karsinoma hepatoselular.

### **2.1.4 Manifestasi Klinis Hepatitis B**

Manifestasi klinis infeksi VHB pada pasien hepatitis akut cenderung ringan. Kondisi asimtomatis ini terbukti dari tingginya angka pengidap tanpa adanya riwayat hepatitis akut. Apabila menimbulkan gejala hepatitis, gejalanya menyerupai hepatitis virus yang lain tetapi dengan intensitas yang lebih berat (Juffrie et al, 2010).

Infeksi Hepatitis B yang akut terjadi dalam waktu 30 sampai 180 hari setelah virus memasuki tubuh. Pengaruh infeksi Hepatitis B pada banyak kasus yang tidak menunjukkan gejala klinis yang khas. Namun, pada sebagian orang

menunjukkan gejala klinis yang klasik seperti dimulai dengan gejala prodromal atau gejala pertama yang dirasakan oleh pasien adalah demam tidak terlalu tinggi, rasa tidak selera makan, mual, dan kadang-kadang muntah. Gejala lain juga terjadi rasa lemas, sakit kepala, rasa takut cahaya, sakit menelan, batuk, dan pilek.

Gejala Hepatitis B sangat mirip dengan flu, dimana 1 sampai 2 minggu kemudian barulah timbul kuning pada seluruh badan penderita. Saat ini biasanya penderita sudah pergi berobat karena merasa ada kelainan pada tubuhnya yang berwarna kuning. Warna kuning ini diikuti oleh perubahan fungsi hati (biasanya meningkat) pada pemeriksaan laboratorium. Fungsi hati biasanya digambarkan oleh kenaikan SGOT dan SGPT. Satu sampai lima hari sebelum badan kuning, keluhan kencing seperti teh pekat dan warna buang air besar yang pucat seperti diliputi lemak juga dirasakan oleh penderita.

Pada saat badan kuning, biasanya diikuti pula dengan oleh pembesaran hati dan diikuti rasa sakit bila ditekan di bagian perut kanan atas. Setelah gejala tersebut, timbul fase resolusi yang biasanya berada dalam rentang waktu 2 -12 minggu. Pada fase ini, badan kuning dan ukuran hati berangsur kembali normal. Demikian juga dengan kenaikan fungsi hati dari hasil pemeriksaan laboratorium berangsur-angsur mencapai normal kembali. Hepatitis B akut yang tidak mengalami komplikasi, akan mengalami resolusi lengkap berkisar 3 sampai 4 bulan. Bila fungsi hati ini tidak mencapai normal dalam waktu 6 bulan atau lebih, maka inilah yang dikatakan dengan Hepatitis B kronis (Zain, 2006).

### **2.1.5 Replikasi Virus Hepatitis B**

Replikasi merupakan suatu cara virus untuk tetap bertahan hidup. Virus hepatitis B memiliki DNA yang berbentuk sirkuler untai ganda tetapi ada bagian yang berantai tunggal sehingga terbentuk gap. Replikasi virus hepatitis B terjadi pada bagian DNA virus. Pada mulanya DNA virus tersebut diubah menjadi bentuk *closed circular* (cc DNA) oleh DNA polymerase yang dikemas dalam viron, kemudian ditranskripsi menjadi 2 kelas molekul RNA, yaitu mRNA yang dikhususkan untuk sintesis protein dan RNA genomic yang ditranskripsikan dengan enzim *reverse transcriptase* untuk menjadi DNA genom (P.Hadi, 2005).

### **2.1.6 Diagnosis Hepatitis B**

Diagnosis ditegakkan dengan anamnesis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan penunjang. Anamnesis umumnya tanpa keluhan, perlu digali riwayat transmisi seperti pernah transfusi, seks bebas, riwayat sakit kuning sebelumnya. Pemeriksaan fisik didapatkan hepatomegali.

Pemeriksaan penunjang terdiri dari pemeriksaan laboratorium, USG abdomen dan Biopsi hepar (Mustofa & Kurniawaty, 2013). Pemeriksaan USG abdomen tampak gambaran hepatitis kronis, selanjutnya pada biopsi hepar dapat menunjukkan gambaran peradangan dan fibrosis hati (Mustofa & Kurniawaty, 2013).

Pemeriksaan laboratorium pada VHB terdiri dari pemeriksaan biokimia, serologis, dan molekuler (Hardjoeno, 2007).

#### **1. Pemeriksaan Biokimia**

Stadium akut VHB ditandai dengan AST dan ALT meningkat > 10 kali nilai normal, serum bilirubin normal atau hanya meningkat sedikit, peningkatan Alkali Fosfatase (ALP) > 3 kali nilai normal, dan kadar albumin serta kolesterol dapat mengalami penurunan. Stadium kronik VHB ditandai dengan AST dan ALT kembali menurun hingga 2 -10 Kali nilai normal dan kadar albumin rendah tetapi kadar globulin meningkat (Hardjoeno, 2007)

## 2. Pemeriksaan serologis

Indikator serologi awal dari VHB akut dan kunci diagnosis penanda infeksi VHB kronik adalah HBsAg, dimana infeksi bertahan di serum >6 bulan (EASL, 2009). Pemeriksaan HBsAg berhubungan dengan selubung permukaan virus. Sekitar 5 - 10% pasien, HBsAg menetap di dalam darah yang menandakan terjadinya hepatitis kronis atau carrier (Hardjoeno, 2007).

Setelah HBsAg menghilang, anti-HBs terdeteksi dalam serum pasien dan terdeteksi sampai waktu yang tidak terbatas. Karena terdapat variasi dalam waktu timbulnya anti-HBs, kadang terdapat suatu tenggang waktu (window period) beberapa minggu atau lebih yang memisahkan hilangnya HBsAg dan timbulnya anti-HBs. Selama periode tersebut, anti-HBc dapat menjadi bukti serologik pada infeksi VHB (Asdie et al, 2012)

Hepatitis B core antigen dapat ditemukan pada sel hati yang terinfeksi, tetapi tidak terdeteksi di dalam serum (Hardjoeno, 2007). Hal tersebut dikarenakan HBcAg terpendam di dalam mantel HBsAg. Penanda Anti-HBc dengan cepat terlihat dalam serum, dimulai dalam 1 hingga 2 minggu pertama

timbulnya HBsAg dan mendahului terdeteksinya kadar anti-HBs dalam beberapa minggu hingga beberapa bulan (Asdie et al, 2012).

Penanda serologi lain adalah anti-HBc, antibodi ini timbul saat terjadinya gejala klinis. Saat infeksi akut, anti HBc IgM umumnya muncul 2 minggu setelah HBsAg terdeteksi dan menetap  $\pm$  6 bulan. Pemeriksaan anti-HBc IgM penting untuk diagnosis infeksi akut terutama bila HBsAg tidak terdeteksi (window period). Penanda anti-HBc IgM menghilang, anti-HBc IgG muncul dan menetap dalam jangka waktu lama (Hardjoeno, 2007).

Beberapa metode yang digunakan untuk mendiagnosis hepatitis adalah Immunochromatography (ICT), ELISA, EIA, dan PCR. Metode EIA dan PCR tergolong mahal dan hanya tersedia pada laboratorium yang memiliki peralatan lengkap. Peralatan rapid diagnostic ICT adalah pilihan yang tepat digunakan karena lebih murah dan tidak memerlukan peralatan kompleks (Rahman et al, 2008).

### 3. Pemeriksaan molekuler

Pemeriksaan molekuler menjadi standar pendekatan secara laboratorium untuk deteksi dan pengukuran DNA VHB dalam serum atau plasma. Pengukuran kadar secara rutin bertujuan untuk mengidentifikasi carrier, menentukan prognosis, dan monitoring pengobatan antiviral. Metode pemeriksaannya antara lain:

- Radioimmunoassay (RIA) mempunyai keterbatasan karena waktu paruh pendek dan diperlukan penanganan khusus dalam prosedur kerja dan limbahnya.

- Hybrid Capture Chemiluminescence (HCC) merupakan teknik hibridisasi yang lebih sensitif dan tidak menggunakan radioisotope karena sistem deteksinya menggunakan substrat chemiluminescence.
- Amplifikasi signal (metode branched DNA/bDNA) bertujuan untuk menghasilkan sinyal yang dapat di deteksi hanya dari beberapa target molekul asam nukleat.
- Amplifikasi target (metode Polymerase Chain Reaction/PCR) telah dikembangkan teknik real-time PCR untuk pengukuran DNA VHB. Amplifikasi DNA dan kuantifikasi produk PCR terjadi secara bersamaan dalam suatu alat pereaksi tertutup (Hardjoeno, 2007).

## 2.2 Anti HBs

Anti HBs merupakan antibodi spesifik untuk HBsAg, muncul di darah 1 sampai 4 bulan setelah terinfeksi virus hepatitis B. Anti HBs diinterpretasikan sebagai kekebalan atau dalam masa penyembuhan penyakit hepatitis B. Antibodi ini memberikan perlindungan terhadap penyakit hepatitis B. Anti-HBs pada seseorang yang telah terinfeksi virus hepatitis B timbul pada 1 sampai 3 bulan setelah menghilangnya HBsAg (stadium konvalesensi) (Rosalina, 1012). Vaksinasi hepatitis B dilakukan sebanyak tiga tahap, setelah pemberian vaksinasi tubuh akan merespon ditandai dengan timbulnya anti-HBs yang akan aktif dalam tubuh  $\pm$  5 tahun (Rulistiana,2008).

Vaksin hepatitis B diberikan dalam 3 dosis pada bulan ke 0,1 dan 6. Dua dosis pertama merupakan dosis yang penting untuk membentuk antibodi. Dosis ketiga diberikan untuk mencapai kadar antibody anti-HBs yang tinggi. Vaksinasi

hepatitis B mampu memberikan perlindungan selama lebih dari 20 tahun pada individu yang sehat melalui immune memori spesifik terhadap HBsAg yang tetap ada (Poovorawan *et al.*, 2011). WHO tidak merekomendasikan pemberian *booster*, namun dosis *booster* sebaiknya dipertimbangkan pada individu *immunocompromised* (imunitas lemah) atau penderita dengan kekebalan tubuh menurun berdasar evaluasi serologis seperti penderita HIV, AIDS, penderita gagal ginjal kronis, kanker, keganasan atau terapi dengan sitostatika (Meireles *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa titer anti-Hbs masih memberikan efek proteksi pada 2-4 tahun, bahkan sampai 10 tahun setelah vaksinasi primer. Titer antibodi hepatitis B dikatakan protektif bila titer antibody anti-HBs >10 mIU/mL (Hofmann dan Kralj, 2009). Menurut Lydia (2013) beberapa faktor yang mempengaruhi kadar anti-HBs setelah vaksinasi, seperti status imun, genetik, kualitas dan kuantitas vaksin, penyakit keganasan, dan penyakit kronik. Bila titer berada di bawah ambang pencegahan atau negatif maka diperlukan imunsasi ulangan. Indikator bahwa seseorang mempunyai kekebalan terhadap hepatitis B adalah anti-HBsAg yang dapat diperiksa di laboratorium melalui pemeriksaan darah. Bila hasil pemeriksaan menunjukkan >10 mIU/mL berarti orang tersebut sudah memiliki kekebalan terhadap hepatitis B dan tidak perlu diberikan imunisasi, begitu juga sebaliknya (Lydia, 2013). Penanda serologis pada infeksi VHB akut yang pertama terdeteksi dalam serum adalah HBsAg (Kao, 2008), setelah HBsAg menghilang, anti HBs terdeteksi dalam serum pasien dan terdeteksi sampai waktu yang tidak terbatas sesudahnya karena terdapat variasi

dalam waktu timbulnya anti-HBs, kadang terdapat suatu tenggang waktu (*window period*) beberapa minggu atau lebih yang memisahkan hilangnya HBsAg dan timbulnya anti-HBs. Selama periode tersebut anti-HBc dapat menjadi bukti serologic pada infeksi VHB (Noer dan Sundoro, 2007)

Pemeriksaan Anti-HBs dilakukan untuk mengetahui adanya antibodi spesifik terhadap virus hepatitis B (HBV) pada serum atau plasma pasien. Pemeriksaan ini sebaiknya dilakukan bersama-sama dengan HBsAg ketika seseorang perlu atau tidak mendapatkan vaksin hepatitis B (Hofmann dan Kralj, 2009). Pemeriksaan Anti-HBs dapat dilakukan dengan metode *rapid test*, EIA dan ELISA.

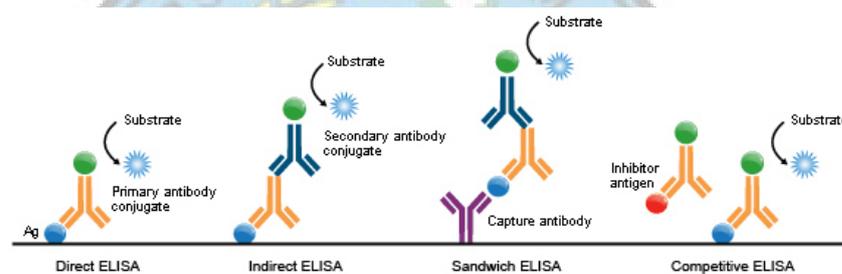
### **2.3 Enzim-linked immunosorbent assay (ELISA)**

*Enzim-linked immunosorbent assay* (ELISA) atau dalam bahasa indonesianya disebut sebagai uji penentuan kadar imunosorben taut-enzim, merupakan teknik pengujian serologi yang didasarkan pada prinsip interaksi antara antibodi dan antigen. Pada awalnya, teknik ELISA hanya digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi keberadaan antigen maupun antibodi dalam suatu sampel seperti dalam pendeteksian antibodi IgM, IgG, & IgA pada saat terjadi infeksi (pada tubuh manusia khususnya). Namun seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, teknik Elisa juga diaplikasikan dalam bentuk lain termasuk menganalisis kadar hormon yang terdapat dalam suatu organisme. Antigen yang berlabel dan antigen yang tidak berlabel saling bersaing untuk berikatan dengan antibodi yang terdapat dalam jumlah terbatas (Hausmann et al, 2007).

ELISA diperkenalkan pada tahun 1971 oleh Peter Perlmann dan Eva Engvall untuk menganalisis adanya interaksi antigen dengan antibodi di dalam

suatu sampel dengan menggunakan enzim sebagai pelapor (Lequin, 2005). Prinsip dari pemeriksaan *Enzym Linked Imuno Sorbent Assay* (ELISA) adalah reaksi antigen - antibodi (Ag - Ab) dimana setelah penambahan konjugat yaitu antigen atau antibodi yang dilabel enzim dan substrat akan terjadi perubahan warna. Perubahan warna ini yang akan diukur intensitasnya dengan alat pembaca yang disebut spektrofotometer atau Elisa reader dengan menggunakan panjang gelombang tertentu (Hausmann et al, 2007).

ELISA terdiri dari bermacam-macam metode diantaranya ada Direct, Indirect, Sandwich dan Kompetitif.



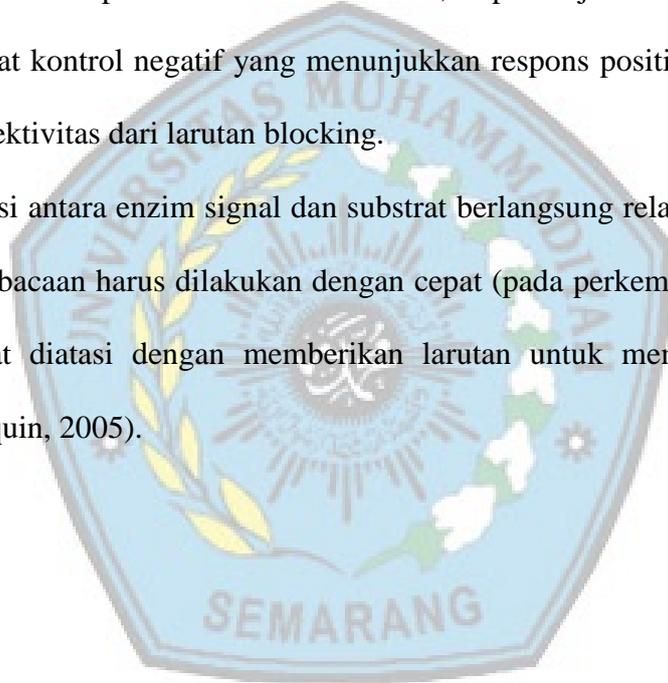
**Gambar 3.** Macam-macam metode Elisa (Sumber: Hausmann et al, 2007)

Teknik ELISA juga mempunyai beberapa kelebihan diantaranya adalah

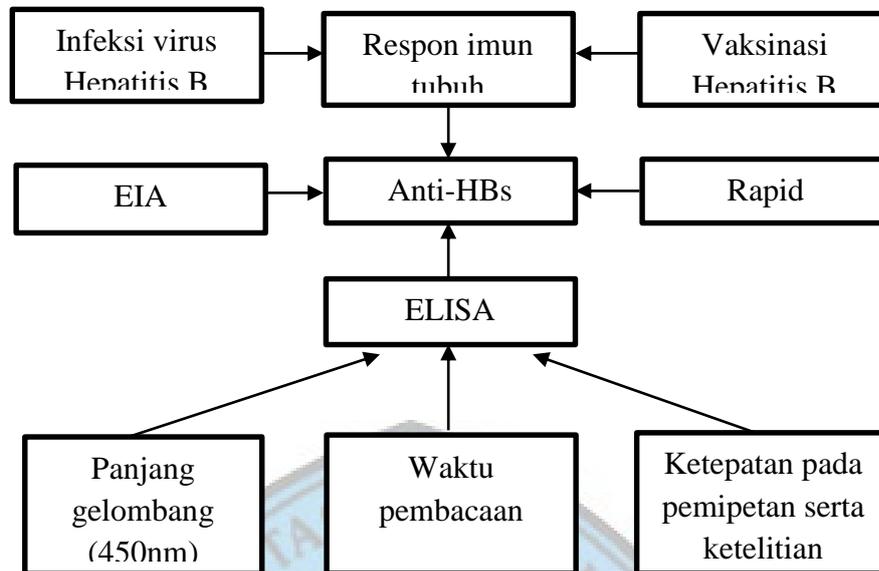
- teknik pengerjaan yang relatif sederhana
- ekonomis
- memiliki sensitivitas yang cukup tinggi
- dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen walaupun kadar antigen tersebut sangat rendah.

Sedangkan kekurangan dari teknik ELISA antara lain :

- jenis antibodi yang dapat digunakan pada uji dengan teknik ELISA ini hanya jenis antibodi monoklonal (antibodi yang hanya mengenali satu antigen)
- harga antibodi monoklonal relatif lebih mahal daripada antibodi poliklonal, sehingga pengujian teknik ELISA ini membutuhkan biaya yang relatif mahal.
- pada beberapa macam teknik ELISA, dapat terjadi kesalahan pengujian akibat kontrol negatif yang menunjukkan respons positif yang disebabkan inefektivitas dari larutan blocking.
- reaksi antara enzim signal dan substrat berlangsung relatif cepat, sehingga pembacaan harus dilakukan dengan cepat (pada perkembangannya, hal ini dapat diatasi dengan memberikan larutan untuk menghentikan reaksi) (Lequin, 2005).

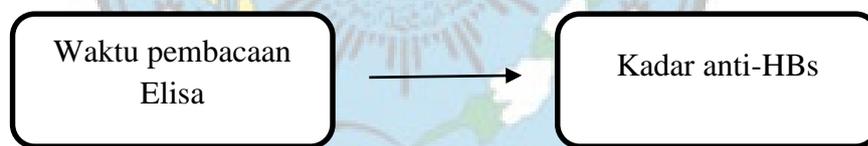


## 2.4 Kerangka Teori



**Gambar 3.** Kerangka teori perbandingan titer anti-HBs dengan variasi pembacaan absorbansi pada ELISA Reader

## 2.5 Kerangka Konsep



**Gambar 4.** Kerangka konsep perbandingan titer anti-HBs dengan variasi pembacaan absorbansi pada ELISA Reader

## 2.6 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dipaparkan sebelumnya, hipotesis dalam penelitian ini adalah:

Ada perbedaan waktu pembacaan absorbansi yang dibaca 1 menit, 20 menit dan 30 menit terhadap pemeriksaan anti-HBs.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan pendekatan *cross sectional*.

#### **3.2 Waktu dan tempat Penelitian**

- Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juni 2016

- Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Analisis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang.

#### **3.3 Populasi dan sampel Penelitian**

##### **3.3.1 Populasi Penelitian**

Populasi penelitian ini adalah mahasiswa dan mahasiswi D4 Analisis Kesehatan FIKKES Universitas Muhammadiyah Semarang Angkatan tahun 2012 *post* vaksinasi hepatitis B.

##### **3.3.2 Besar Sampel**

Besar sampel pada penelitian ini adalah seluruh total populasi yang berjumlah 29 mahasiswa karena menurut Sugiyono (2007) jumlah populasi yang kurang dari 100, maka seluruh populasi dijadikan sampel penelitian.

Kriteria Inklusi:

- a. Mahasiswa dan mahasiswi D IV Analis Kesehatan FIKKES Universitas Muhammadiyah Semarang angkatan tahun 2012.
- b. Telah melakukan vaksinasi hepatitis B
- c. Bersedia diambil darah untuk berpartisipasi dalam penelitian ini

Kriteria Eksklusi:

- a. Belum memasuki minggu ke 32 *post* vaksinasi hepatitis B

### 3.3.3 Tehnik Pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *total sampling* yaitu mengambil seluruh populasi menjadi sampel.

### 3.4 Variabel Penelitian

Variable yang digunakan oleh penelitian ini adalah

- a. Variabel bebas (*independent variable*) adalah waktu pembacaan absorbansi
- b. Variabel terikat (*dependent variable*) adalah hasil pemeriksaan anti-HBs dengan Elisa.

### 3.5 Definisi Operasional variabel

**Tabel 1.** Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Skala Ukur
1.	Pembacaan Absorbansi	Pembacaan nilai Od dengan menggunakan alat Elisa <i>reader</i>	Nominal
2.	Pemeriksaan anti-HBs dengan Elisa	Deteksi antibodi pemeriksaan virus Hepatitis B secara kuantitatif menggunakan metode Elisa yang dibaca pada waktu 1, 20 dan 30 menit.	Nominal

### 3.6 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel (serum), kit ELISA anti-HBs
2. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Centrifuge*, Mikropipet, Inkubator, *Stopwatch*, *ELISA Reader*, tabung vacuntainer (*clot*) berwarna merah, tourniquet, kapas alcohol 70%, cup sampel, spuit 3cc, *yellow tip*.

### 3.7 Prosedur Pemeriksaan

#### 3.7.1 Pengambilan Sampel Darah Vena

Vena lengan yang akan ditusuk dibersihkan dengan menggunakan alcohol 70% dan dibiarkan sampai kering. Tourniquet dipasang pada lengan atas untuk memperlihatkan dan agak menonjolkan vena. Kulit ditegangkan di atas vena dengan jari-jari tangan kiri untuk memastikan vena agar tidak dapat bergerak. Kulit ditusuk dengan jarum spuit dengan tangan kanan sampai ujung jarum masuk ke dalam lumen vena. Tourniquet dilepas dan perlahan-lahan penghisap spuit ditarik sampai di dapat jumlah darah yang dikehendaki. Kapas alcohol diletakkan di atas jarum lalu dicabut jarum spuitnya secara perlahan. Darah dimasukkan ke dalam tabung vacutainer.

#### 3.7.2 Pembuatan Serum

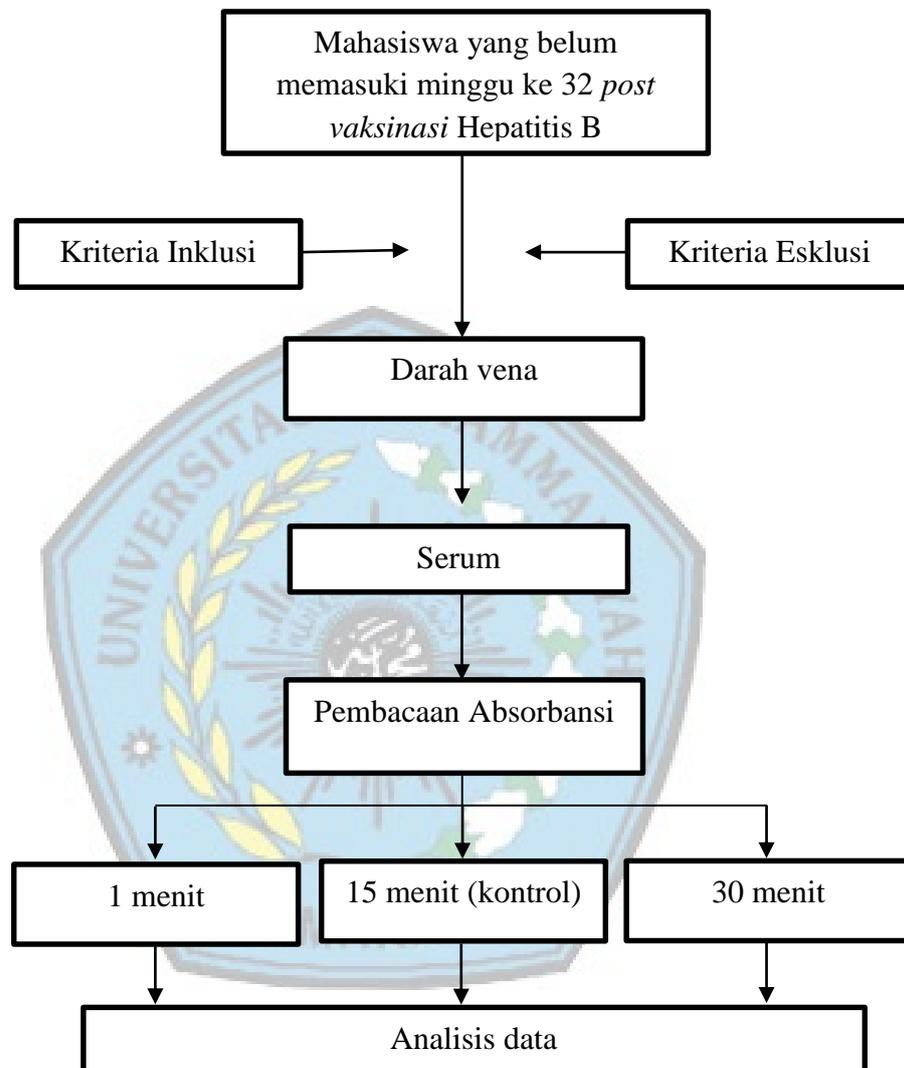
Darah yang sudah beku dimasukkan ke dalam *centrifugator* untuk dilakukan pemusingan. Posisi tabung diatur dantam *centrifugator* dengan posisi yang seimbang. Pemusingan dilakukan dengan kecepatan 3000 rpm dalam waktu

10 menit. Serum yang terbentuk dipisahkan untuk dilakukan pemeriksaan atau dapat disimpan di dalam *freezer* bersuhu  $-20^{\circ}\text{C}$

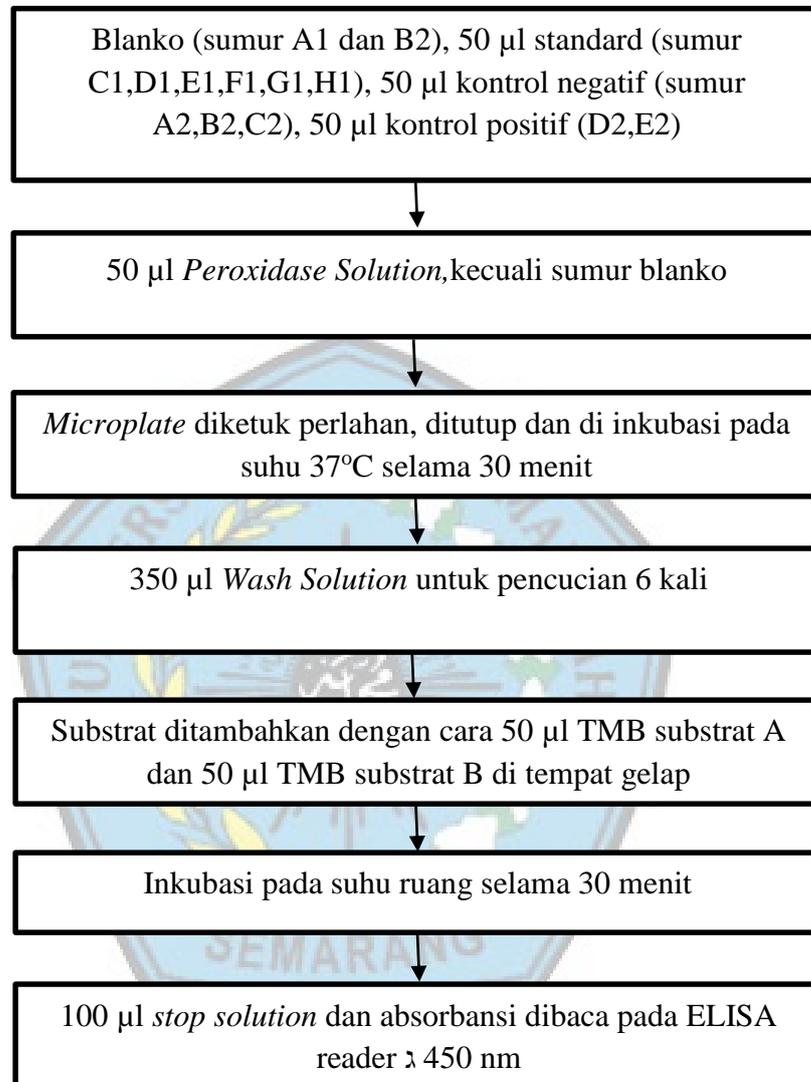
### 3.7.3 Pemeriksaan Anti-HBs dengan ELISA

Reagen dan serum yang akan digunakan sebaiknya dalam suhu normal (suhu ruang). Sumur A1 dan B1 dikosongkan untuk blanko. Sumur C1,D1,E1,F1,G1,H1 ditambah standar masing-masing 50  $\mu\text{l}$ . Sumur A2,B2 dan C2 ditambah kontrol negatif 50  $\mu\text{l}$  dan sumur D2 dan E2 ditambah kontrol positif masing-masing 50  $\mu\text{l}$  dan 50  $\mu\text{l}$  serum pada sumur selanjutnya. Ditambahkan 50  $\mu\text{l}$  *peroxidase solution* ke masing-masing sumuran kecuali pada 2 sumur blanko. Ketuk *microplate* secara perlahan kemudian lepaskan *protective backing* dari *adhesive slip* dan tempelkan pada *plate* sehingga dapat menempel dengan kuat. *Plate* diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit. Lepaskan *Adhesive slip* dan cuci *plate* 6 kali dengan mengikuti “*Plate Washing Procedures*”. Proses selanjutnya yaitu menambahkan 50  $\mu\text{l}$  *TMB Substrate Solution A* dan *B* ke dalam sumuran. Tutup *plate* dengan *black cover* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  *Stop Solution* ke masing-masing sumuran termasuk 2 sumur blanko. Baca absorbansi pada panjang gelombang 450 nm dalam waktu 15 menit.

### 3.8 Alur penelitian



### 3.9 Alur Pemeriksaan Anti-HBs dengan ELISA



### 3.10 Pengolahan dan Analisis Data

#### 3.10.1 Pengolahan data

Data yang telah diperoleh dari proses pengumpulan data akan diolah secara statistik. Proses pengolahan data menggunakan program komputer ini terdiri dari beberapa langkah:

- a. Editing, untuk melakukan pengecekan apakah semua data pemeriksaan sudah lengkap, jelas, dan relevan.
- b. Coding, untuk mengkonversikan (menerjemahkan) data yang dikumpulkan selama penelitian ke dalam simbol yang cocok untuk keperluan analisis.
- c. Entry, merupakan suatu kegiatan memasukkan data ke dalam komputer.
- d. Verifikasi, melakukan pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan ke komputer.

### 3.10.2 Analisis data

Data pemeriksaan serologi berupa nilai optical density (OD) dari serum. Data primer yang telah diperoleh dari hasil penelitian anti-HBs dengan pembacaan absorbansi 1 menit, 20 menit dan 30 menit dalam suhu kamar dihitung secara manual. Analisis statistik dilakukan dengan uji *Friedman* menggunakan program SPSS 16 for window pada komputer.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Gambaran Umum Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel yang diambil dari mahasiswa D IV Analisis Kesehatan semester tujuh yang belum memasuki minggu ke 32 *post* vaksinasi hepatitis B pada tahun 2013, sebanyak 29 sampel yang didominasi oleh perempuan yaitu 20 orang (68,9%) dan 9 (31,1%) orang berjenis kelamin laki-laki. Rentang usia sampel dari 21-24 tahun. Serum yang diuji dalam keadaan tidak hemolisis.

#### 4.2 Hasil Penelitian

Sampel dilakukan pemeriksaan anti-Hbs berdasarkan variasi waktu pembacaan absorbansi pada metode ELISA. Hasil pemeriksaan dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Distribusi sampel berdasarkan hasil pemeriksaan anti-HBs dengan metode ELISA

Waktu Pembacaan Absorbansi	Rata-rata Hasil Pemeriksaan
1 menit	0,922 mIU/ml
15 menit	0,998 mIU/ml
30 menit	0,991 mIU/ml

Tabel 2 menunjukkan rata-rata nilai absorbansi dengan variasi waktu pembacaan absorbansi pada metode ELISA yaitu pada menit pertama didapatkan hasil sebesar 0,922 mIU/ml yang diperoleh dari rata-rata 29 sampel, pada menit ke 15 didapatkan hasil 0,998 mIU/ml dan menit ke 30 didapatkan hasil 0,991 mIU/ml

sehingga dapat diartikan bahwa pada pembacaan absorbansi dengan variasi waktu pembacaan tidak terlalu jauh dan selisih dari ke 3 data tersebut kurang lebih 0,1 %. Langkah selanjutnya adalah dengan menguji normalitas dari data tersebut dengan menggunakan rumus Kolmogorov-smirnov pada SPSS. Hasil dari uji normalitas adalah data tidak terdistribusi normal (sig 0,000:  $p < 0,05$ ) sehingga dilanjutkan dengan uji *Friedman* untuk menentukan ada tidaknya perbedaan yang bermakna antara variasi waktu pembacaan absorbansi..

Analisis statistik menggunakan uji *Friedman* didapatkan nilai probabilitas atau signifikansi yaitu 0,599 ( $p > 0,05$ ) sehingga diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara variasi waktu pembacaan absorbansi pada metode ELISA.

#### **4.3 Pembahasan**

Pembacaan pada ELISA reader menunjukkan tiap variasi waktu memiliki absorbansi yang berbeda, namun selisih absorbansi setiap sampel tidak terlalu jauh ( $< 0,01\%$ ). Kadar absorbansi tidak menunjukkan adanya perbedaan dalam variasi waktu pembacaan. Hasil analisis statistik juga membuktikan bahwa nilai probabilitas atau signifikansi yaitu 1,000 ( $p > 0,05$ ) yang membuktikan tidak ada perbedaan yang bermakna antara variasi waktu pembacaan absorbansi pada metode ELISA.

Hasil penelitian yang didapat menunjukkan adanya variasi waktu pembacaan absorbansi tidak memberikan perubahan terhadap hasil, baik dalam waktu 1, 20 dan 30 menit, yang menandakan bahwa *stop solution* bekerja dengan baik karena fungsi dari *stop solution* adalah menghentikan reaksi yang terjadi,

oleh karena itu walaupun dibaca dalam waktu lebih dari 15 menit tidak menunjukkan perbedaan.

*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) adalah suatu teknik biokimia yang digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel (Rahman et al, 2008). Kompleks antigen atau antibody akan berfluoresensi sehingga jumlah antigen pada sampel dapat disimpulkan berdasarkan besarnya fluoresensi. Perubahan warna akan diukur dengan spektrofotometer atau *ELISA reader* dengan menggunakan panjang gelombang tertentu (Primadharsini & Wibawa, 2013).



## BAB V

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Simpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari hasil penelitian ini yaitu

1. Pemeriksaan titer anti-Hbs berdasarkan waktu pembacaan absorbansi 1 menit didapatkan hasil rata-rata 0,922 mIU/ml
2. Pemeriksaan titer anti-Hbs berdasarkan waktu pembacaan absorbansi 15 menit didapatkan hasil rata-rata 0,998 mIU/ml
3. Pemeriksaan titer anti-Hbs berdasarkan waktu pembacaan absorbansi 30 menit didapatkan hasil rata-rata 0,991 mIU/ml
4. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara variasi waktu pembacaan absorbansi pada ELISA *reader* ( $p=0,599$ )

#### 5.2 Saran

Walaupun dalam penelitian tidak menunjukkan perubahan, namun hendaknya dibaca sesuai ketentuan yang tertera pada Kit Anti-HBs.

## Lampiran 1. Prosedur ELISA kit anti-HBs

**indec**  
DIAGNOSTICS

### New Hepalisa Anti HBs

An enzyme immunoassay kit for the qualitative and quantitative detections of antibody to Hepatitis B surface antigen in human serum or plasma

**IVD** *In vitro* diagnostic use only

**CAT** BE-V271/96 Tests/Kit

2-8°C

REG NO KEMENKES RI : AKL20065311884

#### FEATURES

- Quantitative test using standards defined and expressed in mIU/ml for a given patient follow up controls become possible.
- Sandwich principle assay using pure HBsAg as coating antigen to obtain high sensitivity and specificity test.
- One washing step only for a convenient assay.

#### PREFACE

HEPATITIS B (HB) is a disease caused by viral infection. The route of infection can be an improper needle puncture or blood transfusion.

Hepatitis B has become a significant problem for public health management. Almost one in every ten adults, who has been infected by Hepatitis B Virus (HBV), develops some forms of chronic liver disease and becomes a long-term carrier of HBV.

Hepatitis B is an immune disease. Invasion of the human body by HBV induces autoimmune responses, which damage the liver. The components of the virus (antigen) and the host responses (antibody) have often been used as diagnostic tools. There are six types of immunological markers of HBV: Hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B core antigen (HBcAg), hepatitis B - c antigen (HBcAg) and their respective antibodies. The antibody to HBsAg or anti-HBs however is the test of last marker to show up in the serum. The presence of anti-HBs generally means the conclusion of and immune to HBV infection.

#### PRINCIPLES OF THE TEST

New Hepalisa Anti HBs (TMB) adopts the sandwich principle as the basis of the assay. The wells of polystyrene microplate have been coated with HBsAg. When the test sample containing anti-HBs is incubated with HBsAg + Peroxidase solution in the wells, HBsAg - Anti-HBs - HBsAg + Peroxidase complexes are formed on the wells. After washing to remove unbound materials, a peroxidase substrate is added and color develops in proportion to the amount of Anti-HBs bound. The level color is greatest in the presence of anti-HBs and falls from its level with decreasing concentrations of anti-HBs in the sample.

#### CONTENTS OF THE KIT

Item 1-7 in the following table should be refrigerated at 2-8°C and the others should be stored at room temperature (20-30°C).

ITEMS	96 TESTS
1. Microwells HBsAg coated: with extra pure of Human HBsAg.	1 plate
2. Standard 0 mIU/ml with a white marker 10 mIU/ml with a green marker 100 mIU/ml with a purple marker 250 mIU/ml with a yellow marker 500 mIU/ml with an orange marker 1000 mIU/ml with a pink marker	1 tube, 200 µl 1 tube, 200 µl
3. Negative Control: Serum non-reactive for HBV markers, but contains Protein Stabilizers, Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle 1.5 ml
4. Positive Control: Anti - HBs serum in Buffer with Protein Stabilizers, Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle 1 ml
5. Peroxidase Solution : HBsAg (Human) Peroxidase Conjugate in Buffer with Protein Stabilizers, Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle 6 ml
6. Wash Buffer Concentrate (20x): Phosphate buffer with Tween-20	1 bottle 50 ml
7. TMB Substrate Solution A : 0.6 mg/ml of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in an organic base.	1 bottle 10 ml
8. TMB Substrate Solution B: Citrate Acid Buffer containing 0.03% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	1 bottle 10 ml
9. Stop Solution: 2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	1 bottle 10 ml

1 piece of each Black Cover, Adhesive Slip, Adsorbent Pad, Plastic Bag, Product Insert, and Form "Keluhan Pelanggan".

#### OTHER MATERIALS AND DEVICES NEEDED BUT NOT PROVIDED

- 50 µl and 100 µl micropipette and disposable tips.
- Automatic microplate washing equipment.
- Precision ELISA Reader: capable for 450 nm wavelength reading is necessary.
- Fully automatic EIA microplate analyzer e.g. DYNATECH MR4000, MR5000, MR7000, Labotech, Rosys Plato 3000 (optional).

#### PRECAUTIONS

- This kit is for physicians or medical technicians used only.
- This reagent kit is for *in vitro* diagnosis only.

- Do not use kit beyond its expiration date.
- Do not interchange reagents between different lots.
- Reagents must be protected from microbial contamination.
- The standards, positive and negative controls sera have been inactivated, however, for safety reason, they must be treated as infectious material.
- Do not smoke or eat in areas where specimens or reagents are handled.
- Do not pipette by mouth.
- Wear gloves when handling reagents or specimens, and wash hands thoroughly afterwards.
- Infectious specimens and non acid containing spills should be wiped up thoroughly with 5% sodium hypochlorite.
- All waste materials should be properly desinfected before disposal. Both liquid and solid waste should be autoclaved for at least 1 hour at 121°C. Solid waste can also be incinerated. Non-acidic liquid waste can be treated with sodium hypochlorite diluted to a final concentration of 1%. Liquid wastes containing acid must be neutralized before similar treatment and should stand for 30 minutes to obtain effective desinfection.
- TMB substrate solution A contains dimethyl sulfoxide, an irritant to skin and mucous membranes. Avoid contact of TMB substrate solution and sulfuric acid with skin and mucous membranes.

#### SPECIMENS COLLECTION AND STORAGE

- Either serum or plasma can be used with this diagnostic kit. Whole blood specimens should be separated as soon as possible in order to avoid hemolysis. Also, clots must be removed.
- Specimens must be stored at 2-8°C and avoided heat-inactivation to minimize deterioration. For long-term storage, they should be frozen below -20°C.
- Avoid multiple freeze-thaw procedures.
- Frozen specimens must be thawed thoroughly and mixed before test.
- Specimens must not contain any sodium azide, which inhibits the peroxidase activity.

#### REAGENT STORAGE

- The kit must be stored at 2-8°C. Do not freeze.
- Strips of the plate should be used within one month after open the original aluminium foil bag. The unused strips should be kept in the aluminium foil bag and tapped the opening tightly.
- Return the reagents to 2-8°C immediately after use.
- Washing Solution D (20x) Concentrate should be stored at room temperature to avoid crystallization. If the crystal has been precipitated before use, warm up the solution in a 37°C water bath till crystal dissolved.

#### PLATE WASHING PROCEDURE

**NOTE:** Dilute Wash Buffer Concentrate (20x) with distilled or deionized water to 1:20 dilution. Do not use tap water.

#### A. AUTOMATIC OR SEMI-AUTOMATIC PLATE WASHER

Any commercial automatic microplate washer or other liquid aspirating/dispensing devices can be used for washing purpose. The user should test the devices to determine the proper volume of water and wash cycles to insure proper washing.

We suggested 6 wash cycles with at least 350 µl per well per wash and soaking for 10 seconds is necessary.

#### B. MANUAL PLATE WASH

Cover the reaction plate with an absorbent Pad. Invert the plate and allow the liquid absorb into the pad, then return the plate back to upright position. Fill each well with 350 µl per well washing buffer. Aspirate the water after soaking 10 seconds. Repeat this procedure 6 times.

Blot dry by inverting the plate and tapping firmly into absorbent paper. All residual washing buffer should be blotted dry.

#### WARNING:

Improper washing can cause false results.

#### TEST PROCEDURES

- Bring all reagents and specimens to room temperature (20-30°C) before assay.
- Reserve 2 wells for blank 6 wells for standard, 3 negative and 2 positive controls. Add 50 µl each standard, control or specimen to appropriate wells of reaction plate.

**NOTE:** Use a new pipette tip after each sampling to avoid cross contamination.

- Add 50 µl of Peroxidase Solution to each well except 2 blanks.
- Gently tap the plate.
- Remove the protective backing of the Adhesive Slip and press it on the reaction plate, so that it is tightly sealed.
- Incubate the reaction plate at 37 ± 1°C for 1 hour.
- At the end of the incubation period, remove and discard the Adhesive Slip and wash the plate by following "PLATE WASHING PROCEDURES".

#### Choose one of the following two methods for color development:

- Mix equal volume of TMB Substrate Solution A and B in a clean container immediately prior to use. Add 100 µl of the mixture to each well including 2 blank wells.
- Add 50 µl of TMB Substrate Solution A first, then add 50 µl of TMB Substrate Solution B into each well including 2 blanks. Mix well gently.

**NOTE:** TMB Substrate Solution A should be colorless to light blue, otherwise, should be discarded. The mixture of TMB Substrate Solution A and B should be used within 30 minutes after mix. The mixture should be avoided from intense light.

- Cover the plate with Black Cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
- Stop the reaction by adding 100 µl Stop Solution to each well including 2 blanks.

11. Determine absorbance of Controls and test specimens within 15 minutes with a precision spectrophotometer at 450 nm or 450/650 nm (450 nm reading wavelength with 650 nm reference wavelength). Use the lighter color of two blank wells to blank spectrophotometer.

NOTE: The color of the blank should be colorless to pale yellow, otherwise, the test must be repeated.

#### CALCULATIONS OF RESULT

##### A. QUALITATIVE RESULT

1. Calculation of NCx (Negative Control Mean Absorbance)

Example: Sample No.	Absorbance
1	0.015
2	0.016
3	0.014

$$NCx = (0.015 + 0.016 + 0.014) / 3 = 0.015$$

NCx must be  $\leq 0.2$ , otherwise, the test is invalid.

2. Calculation of PCx (Positive Control Mean Absorbance)

Example: Sample No.	Absorbance
1	0.846
2	0.902

$$PCx = (0.846 + 0.902) / 2 = 0.874$$

PCx must be  $\geq 0.5$ , otherwise, the test is invalid.

3. Calculation of the P-N Value

$$P-N = PCx - NCx$$

Example:

$$P-N = 0.874 - 0.015 = 0.859$$

P-N Value must be  $\geq 0.3$ , otherwise, the test is invalid.

4. Calculation of the Cutoff Value

$$\text{Cutoff Value} = NCx + 0.025$$

Example:

$$\text{Cutoff Value} = 0.015 + 0.025 = 0.040$$

5. Calculation of the Retest Range

$$\text{Retest Range} = \text{Cutoff Value} \pm 10\%$$

Example: Cutoff Value = 0.040

$$\text{Retest Range} = (0.040 - 0.004) \text{ to } (0.040 + 0.004)$$

$$= 0.036 \text{ to } 0.044$$

##### RESULT INTERPRETATION

- Specimens with absorbance values LESS than the Cut-off Value are considered NON-REACTIVE for Anti-HBs by the criteria of New Hepalisa Anti HBs.
- Specimens with absorbance values GREATER than or EQUAL to the CUTOFF VALUES is considered REACTIVE for Anti-HBs.
- If the data is within the Retest Range, the test must be repeated in duplicate and interpreted as above.

##### B. QUANTITATIVE RESULT

- The ready to use standards of the New Hepalisa Anti HBs are defined and expressed in milli International Unit (mIU/ml). Consequently for a given patient follow up controls become possible.
- For a quantitative evaluation the absorbation of the standards are graphically drawn against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorbations.
- Alternatively the use of electronic device is possible. The result can also be calculated with normal programs for automatic data processing. In the laboratory the Standard Curve should be established in each assay run.

##### SENSITIVITY AND SPECIFICITY

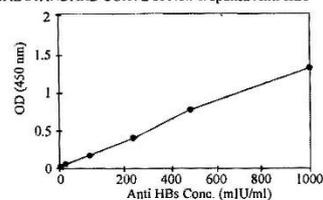
New Hepalisa Anti HBs kit has a sensitivity of 99.3% and specificity of 98.3%. Compared to reference ELISA kit with clinical trial result are summarized in the following table:

Reference ELISA kit	New Hepalisa Anti HBs			Total
	Positive	Negative	Total	
Positive	150	1	151	
Trace	1	0	1	
Negative	1	59	60	
Total	152	60	212	

##### EXAMPLE OF STANDARD CURVE

Anti HBs Standards (mIU/ml)	OD (450 nm)
0 mIU/ml	0.016
10 mIU/ml	0.025
100 mIU/ml	0.127
250 mIU/ml	0.419
500 mIU/ml	0.812
1000 mIU/ml	1.404

##### TYPICAL STANDARD CURVE of New Hepalisa Anti HBs



##### TROUBLESHOOTING

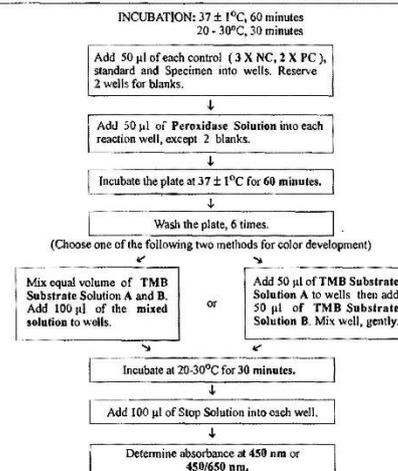
If the result can not be reproduced, please do your own preliminary troubleshooting by checking the possibilities listed below.

- Improper washing procedure.
- Contaminated with strong positive specimen.
- Improper specimen, such as hemolyzed serum or plasma, specimen containing precipitate or specimen not being mixed well before use.
- Incubate with wrong temperature or prolonged/insufficient incubation period.
- Use outdated or improper storage of reagents.
- Microtiter strips have been opened beyond one month.
- All the specimens and reagents did not bring to room temperature before test.

##### BIBLIOGRAPHY

- Ginsberg, A., Conrad, M., Bancroft, W., Ling, C.M., and Overby, L.R., Antibody to Australia Antigen: Detection with a sample Radioimmuno Assay, Incidence in Military Populations and Role in the Prevention of Hepatitis B with Gamma Globulin. J. Lab. Clin. Med. 82(2):317, 1973.
- Lander, J., Alter, H. and Purcell, R., Frequency of Antibody to Hepatitis Associated Antigen as Measured by a New Radioimmunoassay Technique. J. Immunology, 106:1166, 1971.
- Lander, J.J., Holland, P.V., Alter, J.H. et al., Antibody to Hepatitis Associated Antigen. Frequency and Pattern of Response Detected by Radioimmuno-precipitation. J.A.M.A., 220:1079, 1972.
- Ling, C.M., Radioimmunoassays for Hepatitis B Virus Markers, in Rose, N. and Friedman, H., editors, Manual of Clinical Immunology, 2nd ed. 1980, ASM, Washington DC. pp. 372-375.
- Millman, I. and McMichael, J.C., Glycoprotein of Natural Origin with an Affinity for Hepatitis B surface Antigen. Infection and Immunity, 21:879, 1978.
- Overby, L.R., Ling, C.M., Desker, R.H., Mushahwar, I.K., and Chau K., Serodiagnostic Profile of Viral Hepatitis in Viral Hepatitis, 1981, Franklin Institute Press, Philadelphia, pp. 169-182.
- Perters, R.L., Collins, M.J., O'Beime, A.J., et al., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to Murine Hepatitis Virus, J. Clinical Microbiology, 10:595, 1979.
- Walsh, J., Yalow, R. and Berson, S., Detection of Australia Antigen and Antibody by Means of Radioimmunoassay Techniques. J. Infectious Disease. 121:550, 1970.

##### SIMPLIFIED PROCEDURE OF New Hepalisa Anti HBs



##### GLOSSARY OF SYMBOLS:

- IVD** In vitro diagnostic use only
- CAT** Catalogue Number
- LOT** Lot Number
- Store at 2-8°C
- Expiry Date
- See Instructions for Use
- EN.002-11

##### PT INDEC DIAGNOSTICS

Kompleks Perkantoran Taman Pulo Gebang A3 No.17-20,  
Jl. Raya Bekasi Km. 24, Jakarta 13910, Indonesia  
Telp. +62-21-4608822, Fax +62-21-4609977  
e-mail: im\_support@indec-diagnostics.co.id  
website: www.indec-diagnostics.co.id

### Lampiran 2. Hasil Penelitian Pemeriksaan Anti-HBs

No	Kode Sampel	Jenis Kelamin	Hasil ELISA			Keterangan
			1 Menit	15 menit	30 Menit	
1	1 B	P	1,744	1,802	1,791	Positif
2	2 B	P	1,703	1,773	1,759	Positif
3	3 B	P	1,637	1,707	1,691	Positif
4	4 B	P	1,021	1,104	1,093	Positif
5	5 B	P	0,938	1,024	1,029	Positif
6	6 B	L	1,033	1,125	1,124	Positif
7	7 B	L	0,239	0,323	0,325	Positif
8	8 B	P	0,248	0,345	0,346	Positif
9	9 B	P	0,224	0,312	0,313	Positif
10	10 B	P	0,145	0,235	0,236	Positif
11	11 B	P	0,162	0,249	0,250	Positif
12	12 B	L	0,540	0,612	0,620	Positif
13	13 B	L	0,546	0,627	0,635	Positif
14	14 B	L	0,173	0,261	0,270	Positif
15	15 B	P	0,177	0,258	0,265	Positif
16	16 B	P	1,223	1,330	1,331	Positif
17	17 B	L	0,753	0,842	0,848	Positif
18	18 B	P	0,797	1,887	1,847	Positif
19	19 B	P	0,810	0,907	0,913	Positif
20	20 B	L	1,841	1,882	1,841	Positif
21	21 B	L	1,905	1,947	1,905	Positif
22	22 B	P	1,365	1,421	1,365	Positif
23	23 B	P	0,407	0,485	0,407	Positif
24	24 B	P	1,468	1,527	1,468	Positif
25	25 B	P	0,137	0,225	0,137	Negatif
26	26 B	P	0,138	0,224	0,138	Negatif
27	27 B	L	0,977	1,065	0,977	Positif
28	28 B	P	0,961	1,028	1,045	Positif
29	29 B	P	2,430	2,407	2,288	Positif

Keterangan ELISA: *Cut Off* menit 1 = < 0,141

menit 15 = < 0,230

menit 20 = < 0,230

### Lampiran 3. Hasil Uji SPSS *Friedman*

#### a. Hasil Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			WaktuPembacaanAbsorbansi	HasilPemeiksaan
			nAbsorbansi	nr
N			87	87
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean		2.00	1.94
	Std. Deviation		.821	.234
Most Extreme Differences	Absolute		.222	.539
	Positive		.222	.403
	Negative		-.222	-.539
Kolmogorov-Smirnov Z			2.068	5.032
Asymp. Sig. (2-tailed)			.000	.000
a. Test distribution is Normal.				

#### b. Hasil Uji *Friedman*

#### NPar Tests

Test Statistics <sup>a</sup>	
N	87
Chi-Square	.276
df	1
Asymp. Sig.	.599

a. Friedman Test

#### Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian



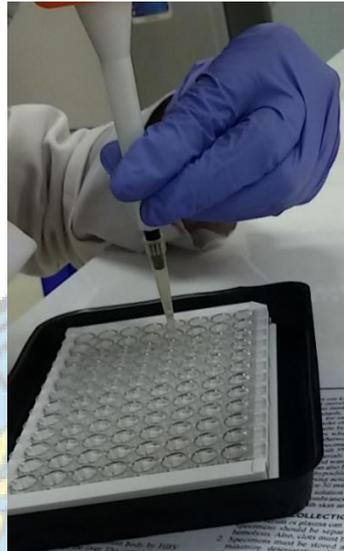
Pengambilan sampel darah vena



Pemusingan sampel darah vena



ELISA kit anti-HBs “*New Hepalisa*”



**Pemeriksaan Anti-HBs dengan ELISA**



**Pembacaan Absorbansi dengan ELISA reader**

<http://lib.unimus.ac.id>