

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

*Human Leukocyte Antigen* (HLA) adalah sekelompok gen dalam *Major Histocompatibility Complex* (MHC) yang sangat penting dalam pengenalan antigen asing oleh sistem imun. Sistem ini merupakan pusat dari mekanisme pertahanan tubuh terhadap patogen dan juga menentukan kemampuan sistem imun dalam membedakan sel tubuh sendiri dan sel asing, seperti pada proses transplantasi. Sistem HLA dikodekan oleh lebih dari 100 gen yang terletak di lengan pendek kromosom 6p21.3 dan memegang peranan kunci dalam pengaturan fungsi imun (Aisagbonhi and Morris, 2022). *Human Leukocyte Antigen* juga berperan penting dalam mengatur aktivasi dan inhibisi sel *natural killer* (NK), serta mendukung toleransi imun (Wan et al., 2018). Ekspresi molekul HLA tertentu seperti HLA-E dan HLA-G diketahui dapat menekan sitotoksitas sel NK, yang penting dalam berbagai konteks imunologis termasuk transplantasi dan kehamilan (Maeda et al., 2013).

Terbentuknya anti-HLA selama kehamilan yang disebabkan oleh kehamilan multipel, merupakan bentuk sensitisasi imun yang dapat bertahan lama dan berdampak pada kondisi imunologis di masa mendatang seperti pada proses transfusi atau transplantasi (Persson et al., 2021; Tersigni et al., 2020). Dalam praktik klinis, pendonor dengan anti-HLA yang terbentuk selama kehamilan dapat menyebabkan komplikasi serius bagi resipien, salah satunya adalah *Transfusion-Related Acute Lung Injury* (TRALI) merupakan sindrom klinis berupa edema paru akut nonkardiogenik yang disertai hipoksia dan sering muncul selama atau setelah transfusi darah (Cho et al., 2023). Komplikasi ini menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas akibat transfusi di banyak negara maju (van Wonderen et al., 2022). *Transfusion-Related Acute Lung Injury* terutama disebabkan oleh antibodi terhadap antigen leukosit, seperti anti-HLA dan antibodi terhadap *Human Neutrophil Antigens* (HNA), yang sering ditemukan dalam plasma donor wanita dengan riwayat kehamilan (Bayat et al., 2021; Tung et al., 2022). Sekitar 50%-80% kasus TRALI berkaitan dengan keberadaan antibodi terhadap HLA atau HNA dalam komponen darah donor wanita multipara (Bayat et al., 2021). Antibodi HLA kelas II lebih sering ditemukan pada donor yang terkait kasus TRALI, meskipun sel target seperti neutrofil dan endotelium tidak secara langsung mengekspresikan antigen HLA tersebut (Sachs et al., 2011). Jumlah paritas ini mempengaruhi jumlah anti-HLA, sehingga penting untuk melakukan skrining antibodi anti-HLA, khususnya pada donor wanita dengan riwayat multiparitas, untuk meminimalkan risiko kejadian

TRALI dan komplikasi transfusi lainnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan identifikasi terhadap kadar anti-HLA, khususnya pada kelompok donor berisiko tinggi seperti wanita yang sudah melahirkan beberapa kali.

Berdasarkan bahwa sensitisasi HLA sangat mungkin terjadi pada wanita dengan riwayat kehamilan, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan kadar anti-HLA pada pendonor berdasarkan paritas, usia, riwayat kehamilan, infeksi kronik dan transfusi darah. Informasi ini penting untuk penguatan kebijakan seleksi donor, peningkatan keamanan transfusi, serta sebagai dasar ilmiah bagi praktik klinis transfusi darah yang lebih aman.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah terdapat perbedaan kadar anti-HLA antara pendonor berdasarkan paritasnya?

## **1.3 Hipotesis Penelitian**

Terdapat perbedaan kadar anti-HLA antara pendonor berdasarkan paritasnya, semakin tinggi paritas memiliki kadar anti-HLA yang lebih tinggi.

## **1.4 Tujuan Penelitian**

### **1.4.1 Tujuan Umum**

Mengetahui perbedaan kadar anti-HLA antara pendonor berdasarkan paritasnya untuk mendukung upaya peningkatan keamanan transfusi darah, khususnya dalam pencegahan komplikasi seperti TRALI.

### **1.4.2 Tujuan Khusus**

- a. Mengetahui kadar antibodi anti-HLA pada pendonor darah wanita nullipara.
- b. Mengetahui kadar antibodi anti-HLA pada pendonor darah wanita primipara.
- c. Mengetahui kadar antibodi anti-HLA pada pendonor darah wanita multipara.
- d. Mengetahui kadar antibodi anti-HLA pada pendonor darah wanita grand multipara.
- e. Mengetahui perbedaan kadar antibodi anti-HLA antara keempat kelompok tersebut
- f. Mengetahui kadar antibodi anti-HLA pada pendonor berdasarkan usia

## 1.5 Manfaat Penelitian

### 1.5.1 Aplikasi Klinis

- a. Memberikan kontribusi ilmiah terhadap pemahaman mekanisme pembentukan anti-HLA sebagai dampak dari kehamilan.
- b. Menjadi dasar ilmiah bagi kebijakan seleksi donor darah berbasis status kehamilan, khususnya dalam transfusi plasma.
- c. Mendukung peningkatan keamanan transfusi dengan meminimalkan risiko komplikasi imunologis seperti TRALI.

### 1.5.2 Pengembangan Penelitian

- a. Menjadi acuan bagi penelitian lanjutan terkait faktor-faktor yang memengaruhi pembentukan anti-HLA, seperti jumlah kehamilan, usia, atau interval antar kehamilan.
- b. Membuka peluang untuk penelitian lebih lanjut terkait dampak anti-HLA terhadap hasil klinis pada pasien penerima transfusi

## 1.6 Tinjauan Pustaka

### 1.6.1. Donor Darah

Donor darah adalah kegiatan mendonorkan atau menyumbangkan darah secara sukarela. Pendonor adalah individu yang secara sukarela memberikan darahnya untuk keperluan transfusi atau pengolahan komponen darah. Pendonor darah dapat dibedakan menjadi beberapa tipe, seperti pendonor sukarela yang tidak menerima imbalan, pendonor pengganti (biasanya keluarga atau teman pasien), dan pendonor profesional yang mendonorkan darah dengan imbalan uang (Armstrong, et al. 2020). Motivasi utama pendonor biasanya berkaitan dengan rasa kemanusiaan, keinginan membantu sesama, dan kadang-kadang insentif sosial atau emosional seperti membantu keluarga. Namun, terdapat juga hambatan seperti ketakutan terhadap prosedur donor, kurangnya waktu, dan kurangnya informasi yang memadai mengenai proses donor. Oleh karena itu, strategi rekrutmen dan retensi pendonor perlu mempertimbangkan motivasi dan hambatan ini agar pasokan darah tetap aman dan cukup. Menurut *World Health Organization* (WHO), pendonor darah harus merupakan individu yang memenuhi persyaratan medis, etika, dan keselamatan untuk menjamin keamanan baik bagi pendonor maupun penerima transfusi (Ajmani, P. Etal. 2020).

Pendonor darah dapat diklasifikasikan berdasarkan jenis produk yang disumbangkan dan tujuan donor, antara lain: Pendonor darah utuh (*whole blood donor*) yaitu pendonor yang menyumbangkan darah lengkap lalu selanjutnya dapat diproses menjadi sel darah merah, plasma, dan trombosit. Pendonor komponen darah (*apheresis donor*) yaitu pendonor yang menyumbangkan komponen tertentu seperti plasma atau trombosit melalui prosedur aferesis. Pendonor sukarela dan pendonor pengganti yaitu pendonor sukarela menyumbangkan darah tanpa keterikatan pada pasien tertentu. Pendonor pengganti mendonorkan darah untuk pasien tertentu dan saat ini semakin dibatasi karena risiko keselamatan transfusi yang lebih tinggi (Ajmani, P. Etal. 2020).

Beberapa karakteristik pendonor diketahui berpengaruh terhadap kualitas dan keamanan produk darah, antara lain: Usia, usia pendonor berkaitan dengan kondisi fisiologis dan riwayat paparan imunologis. Usia yang lebih lanjut mencerminkan akumulasi paparan antigen asing, termasuk antigen HLA, yang dapat meningkatkan risiko aloimunitisasi. Jenis kelamin dan riwayat kehamilan, pendonor wanita dengan riwayat kehamilan memiliki risiko lebih tinggi membentuk antibodi anti-HLA akibat paparan antigen HLA janin. Faktor ini menjadi dasar pembatasan pendonor plasma wanita multipara dalam kebijakan transfusi modern. Riwayat transfusi, pendonor dengan riwayat transfusi sebelumnya berisiko mengalami sensitisasi terhadap antigen HLA donor, yang dapat memengaruhi keamanan plasma yang didonorkan (Merz, et al. 2024).

Antibodi anti-HLA pada pendonor memiliki implikasi klinis penting, terutama dalam kejadian *Transfusion-Related Acute Lung Injury* (TRALI). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa antibodi anti-HLA lebih sering ditemukan pada pendonor wanita dengan riwayat kehamilan dan pendonor dengan riwayat transfusi. Oleh karena itu, banyak negara menerapkan kebijakan: pembatasan donor plasma dari wanita multipara, atau skrining antibodi anti-HLA pada pendonor plasma (Blatyta, P, et al. 2013). Pendonor darah merupakan komponen utama dalam sistem transfusi yang aman. Seleksi pendonor yang ketat dan pemahaman terhadap faktor-faktor yang memengaruhi karakteristik imunologis pendonor, termasuk pembentukan antibodi anti-HLA, sangat penting untuk menjamin keselamatan transfusi dan mendukung praktik klinik berbasis bukti (Merz, et al. 2024).

### 1.6.2 Anti-Human Leukocyte Antigen (anti-HLA)

*Human Leukocyte Antigen* (HLA) adalah sekelompok gen dalam *Major Histocompatibility Complex* (MHC) yang sangat penting dalam pengenalan antigen asing oleh sistem imun. Sistem ini merupakan pusat dari mekanisme pertahanan tubuh terhadap patogen dan juga menentukan kemampuan sistem imun dalam membedakan sel tubuh sendiri dan sel asing, seperti pada proses transplantasi. Sistem HLA dikodekan oleh lebih dari 100 gen yang terletak di

lengan pendek kromosom 6p21.3 dan memegang peranan kunci dalam pengaturan fungsi imun (Aisagbonhi and Morris, 2022). *Human Leukocyte Antigen* juga berperan penting dalam mengatur aktivasi dan inhibisi sel *natural killer* (NK), serta mendukung toleransi imun (Wan et al., 2018)

Sistem HLA berperan penting dalam presentasi antigen kepada sistem imun, yang merupakan proses krusial dalam respons imun adaptif (Shang et al., 2023). Sistem imun dapat mengenali dan merespons agen patogen, namun juga dapat memberikan efek yang merugikan dalam kondisi seperti autoimunitas dan penolakan transplantasi (Nordquist and Jamil, 2023). Protein HLA menyajikan peptida pendek kepada limfosit T ketika protein HLA berikatan dengan reseptor sel T di permukaan limfosit T, hal ini akan memicu aktivasi sel T serta merekrut komponen imun lainnya. Ketujuh lokus pengkode HLA termasuk gen yang sangat polimorfik dalam genom manusia, menghasilkan ribuan alel berbeda di populasi. Tingginya tingkat polimorfisme ini dapat menimbulkan aloimunitas yang dimediasi antibodi terhadap HLA, dikenal sebagai antibodi HLA (Savulescu et al., 2020).

#### **1.6.2.1 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pembentukan anti-HLA**

Faktor yang mempengaruhi anti-HLA sebagai berikut :

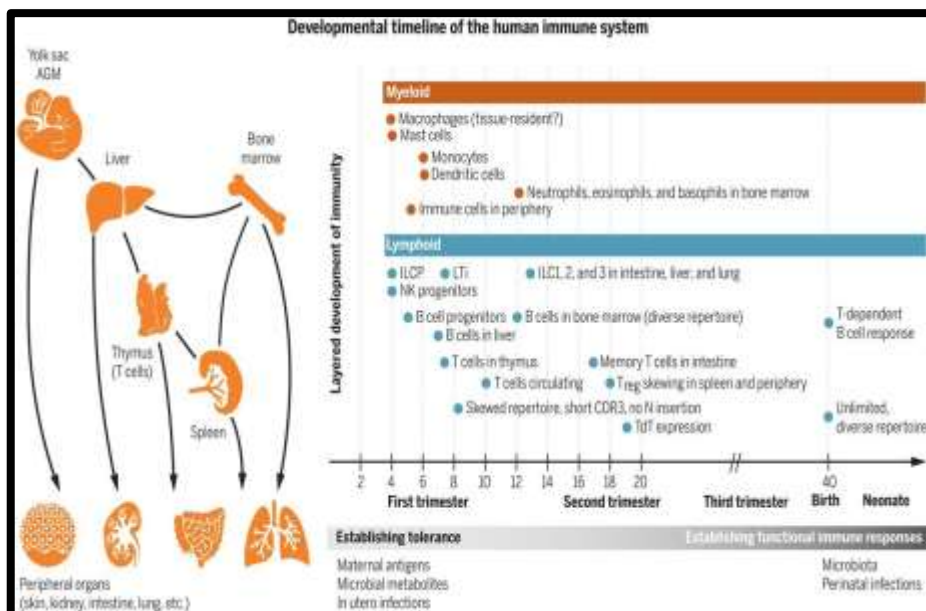
1. Usia
2. Riwayat transfusi darah
3. Riwayat transplantasi organ
4. Pasien gangguan imun
5. Riwayat infeksi EBV

#### **1. Mekanisme Pembentukan anti-HLA Berdasarkan Usia**

Perkembangan darah dan sistem imun manusia selama kehidupan awal manusia terjadi di beberapa lokasi anatomi. Lokasi utama hematopoiesis dari *Yolk Sac Ekstraembrionik* ke *Aorta Gonad Mesonephrons* (AGM) intraembrionik, hati, dan sumsum tulang. Differensiasi dan pematangan sel T terbatas pada timus. Sel-sel imun menyebar ke organ limfoid atau perifer lainnya termasuk kelenjar getah bening, kulit, usus, ginjal dan paru-paru. Berbagai jenis sel imun berkembang dan matang pada berbagai tahap kehamilan (Gambar 1) (Park JE, et al 2020)

Pada janin dan neonatus (0-1 bulan) ekspresi HLA masih rendah terutama HLA kelas II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) dan sel dendritik serta makrofag belum matur sehingga terjadi toleransi imun maternal-fetal. Usia bayi dan anak (1 bulan – 12 tahun, organ timus sangat aktif ekspresi HLA sangat meningkat terutama HLA kelas II meningkat seiring dengan maturasi APC. Dewasa muda (18 – 40 tahun) terjadi interaksi HLA kelas I dan kelas HLA kelas II untuk presentasi

antigen secara maksimal terjadid homeostasis imun yang stabil karena ekspresi HLA sangat optimal akibat kematangan APC. (Cunningham, Sarah, 2021). Usia tua > 60 tahun sudah terjadi proses penuaan yang disebut imunosenesensi. Disfungsi imun bawaan dan adaptif yang menyertai penuaan. Imunosenesensi didefinisikan sebagai kerusakan dan perubahan struktur organ imun serta disfungsi imun bawaan dan adaptif seiring bertambahnya usia, yang menyebabkan hasil vaksinasi yang buruk, dan peningkatan kerentanan terhadap infeksi, penyakit terkait usia, dan keganasan. Penurunan kapasitas adaptasi terkait usia dan peningkatan status proinflamasi yang menyertainya adalah ciri khas imunosenesensi. Hal ini disebabkan oleh beban antigen dan stres yang konstan, serta involusi timus merupakan salah satu perubahan yang paling umum terjadi. Imunosenesensi memengaruhi sistem imun bawaan dan adaptif, dan jenis sel imun tertentu lebih terpengaruh. Selama penuaan sistem imun, tiga jenis sel T yang disfungsi dapat diamati yaitu sel T yang kelelahan, sel T yang menua, dan sel T yang sudah tua. Kemampuan makrofag untuk memfagositosis patogen menurun seiring bertambahnya usia. Dibandingkan dengan donor dewasa muda, makrofag dari individu lanjut usia menunjukkan penurunan kapasitas presentasi antigen karena penurunan ekspresi koreseptor dan molekul MHC kelas II kecuali mikroglia. Penurunan ekspresi *Toll-Like Receptor* (TLR) yang signifikan pada makrofag selama penuaan. (Liu Z, *et al* 2023)



Gambar 1. Perkembangan temporal dan sistem imun manusia (Park JE, *et al* 2020)

## 2. Pasien dengan Riwayat Transfusi Darah

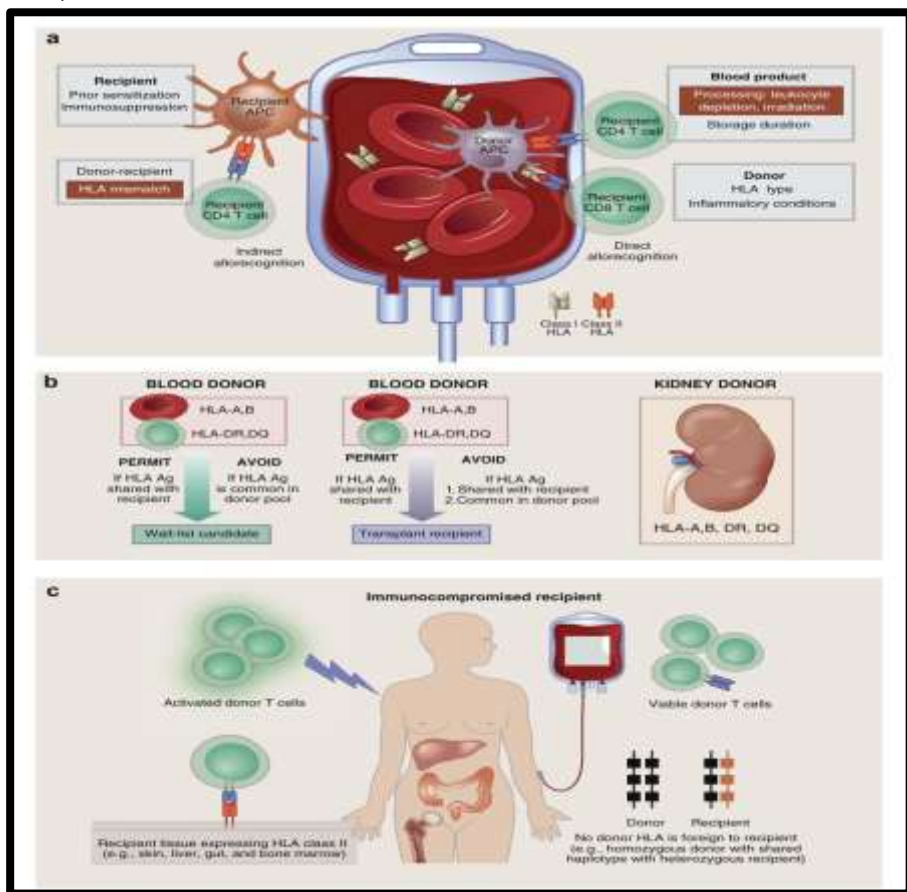
Mekanisme sensitisasi HLA yang diinduksi transfusi setelah transfusi darah, banyak faktor yang saling berinteraksi kemungkinan berkontribusi pada risiko individualisasi sensitisasi HLA yang disebabkan oleh transfusi darah (Gambar 2a). Salah satu pertimbangan penting untuk risiko sensitisasi HLA adalah produk darah yang ditransfusikan. Transfusi sel darah merah yang terdiri dari sel darah merah yang dipisahkan dari plasma (atau volume plasma dikurangi). (WHO, 2024) Antibodi HLA kelas I dapat berkembang setelah transfusi sel darah merah karena sel darah merah mengekspresikan antigen HLA kelas I dalam kadar rendah (Weinstock, 2019). Faktor-faktor yang menentukan ekspresi HLA pada donor dapat mencakup tipe HLA, usia sel, dan keberadaan kondisi proinflamasi, seperti infeksi dan kondisi autoimun. Paparan antigen HLA donor melalui sel darah merah (kelas I) dan sel penyaji antigen (APC) residual (kelas I dan II). Pengenalan alloimunisasi terjadi secara langsung melalui HLA utuh pada APC donor yang mengaktifkan sel T CD4 dan CD8 penerima, atau secara tidak langsung, melalui APC penerima yang menyajikan molekul HLA donor yang telah diproses kepada sel T CD4 penerima. Faktor-faktor yang dapat dimodifikasi terbukti mengurangi risiko HLA (Gambar 2a). (Willicombe M, 2024).

## 3. Pasien dengan Riwayat Transplantasi Organ

Sensitisasi HLA akibat transfusi pasca-transplantasi bahwa rata rata 40% dari semua penerima transplantasi ginjal menerima transfusi sel darah merah pada tahun pertama pasca transplantasi. Transfusi terjadi dengan frekuensi lebih tinggi pada wanita, pasien lanjut usia, pasien yang sensitif, dan pasien menjalani dialisis dalam jangka waktu lama sebelum transplantasi, penerima transplantasi dari donor yang telah meninggal dan pasien yang menerima agen limfodepleting juga memiliki risiko lebih tinggi untuk menerima transfusi. (Hassan, 2023). Risiko yang terkait dengan transfusi pasca transplantasi menyebabkan *de novo* sensitisasi HLA, penggunaan transfusi sel darah merah yang digunakan berdasarkan HLA ketika transfusi tidak dapat dihindari dapat membantu membatasi respons aloimun dan potensi cedera aloimun yang diakibatkannya. Diakui bahwa penolakan yang dimediasi antibodi adalah salah satu penyebab utama kegagalan transplantasi, yang didorong oleh keberadaan antibodi spesifik donor / *donor specific antibody* (DSA). (Aubert, 2017). Prinsip-prinsip seleksi HLA darah untuk mengurangi risiko sensitisasi pada kandidat dan penerima transplantasi. Semua antigen HLA (Ag) yang sama dengan penerima diperbolehkan, tetapi kecocokan penuh tidak mungkin terjadi. Penghindaran antigen HLA umum dalam kumpulan transplantasi sangat penting, dengan tambahan penghindaran antigen HLA pada donor ginjal dalam pengaturan pasca-alokasi dan transplantasi (Gambar 2b). (Willicombe M, 2024).

#### 4. Pasien dengan Gangguan Imun

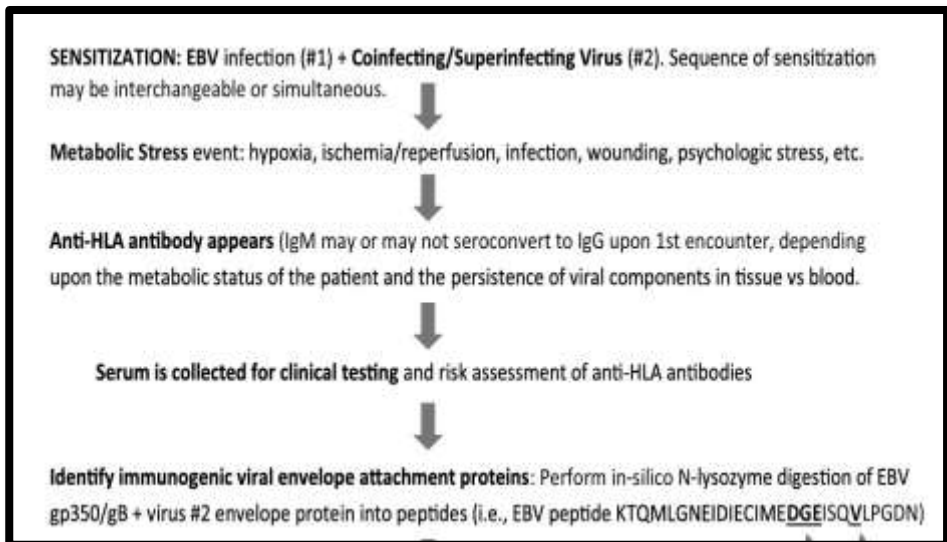
Transfusi merupakan imunomodulator melalui mekanisme transfusi menginduksi penekanan imun terutama dengan mengganggu imunitas seluler, dan mungkin berperan dalam mengurangi respons alloimun terhadap transfusi sel darah merah tertentu. Ekspresi HLA pada sel darah merah cenderung menurun seiring waktu, yang dapat mengurangi risiko sensitisasi HLA pada sel darah merah yang ditransfusikan setelah periode penyimpanan sehingga mempengaruhi imunomodulasi terkait transfusi. (Aguilar, 2021). Penyakit graft-versus-host terkait transfusi dapat terjadi ketika sel T donor yang masih hidup ditransfusikan ke pasien yang mengalami immunosupresi, di mana sistem kekebalan pasien tidak mengenali sel T donor sebagai benda asing. Sel T donor yang masih hidup dapat diaktifkan oleh ekspresi HLA pasien pada jaringan, memicu respons imun terhadap jaringan tersebut. (Gambar 2c). (Willicombe M, 2024).



Gambar 2. Sensitisasi HLA yang diinduksi oleh a) Transfusi Darah b) Transplantasi Ginjal c) Pasien dengan gangguan imun (Willicombe M, 2024)

## 5. Pasien dengan Riwayat Infeksi EBV

Kondisi kehamilan, transfusi produk darah atau transplantasi dapat menyebabkan reaktivasi EBV dan virus lainnya oleh proses stress oksidatif. Faktor pemicu stres oksidatif meliputi kekurangan oksigen/ *Ischemia reperfusion Injury* (IRI), ketidakseimbangan metabolisme, stres psikologis, luka, racun, dan infeksi lainnya. Munculnya antibodi anti-HLA baru yang mengikuti pola paparan EBV berulang, koinfeksi, atau superinfeksi, sering kali dipicu oleh peristiwa stres oksidatif. Peristiwa paparan meliputi: 1) koinfeksi oleh EBV ditambah virus kedua yang berbeda, 2) superinfeksi oleh EBV, didahului atau diikuti oleh infeksi oleh virus kedua yang berbeda, atau 3) infeksi oleh EBV didahului atau diikuti oleh paparan virus kedua yang berbeda melalui vaksinasi. Waktu paparan terhadap setiap pasangan virus lebih sering terjadi secara berurutan (superinfeksi termasuk EBV atau infeksi EBV didahului atau diikuti oleh vaksinasi), terkadang dengan jeda yang signifikan antara paparan EBV dan virus kedua yang berbeda. Virus EBV memiliki protein pengikat selubung virus imunogenik dianggap sebagai penyebab potensial karena tingkat glikosilasinya. Peptida virus yang dicerna N-lisozim secara *in silico* dan proses proteolisis pada residu asam amino tertentu (lisin, kecuali metionin pada peptida pertama yang dicerna dari setiap protein), lisozim juga menghilangkan N-glikan dari protein, diatur oleh kekurangan oksigen (misalnya, IRI) dan telah diidentifikasi pada eksosom yang terkait dengan stres kronis dan peradangan. N-glikan dapat dihilangkan dari protein selubung virus melalui N-lisozim, sehingga mengekspos determinan antigenik baru (neoepitop). (Heron, 2025)



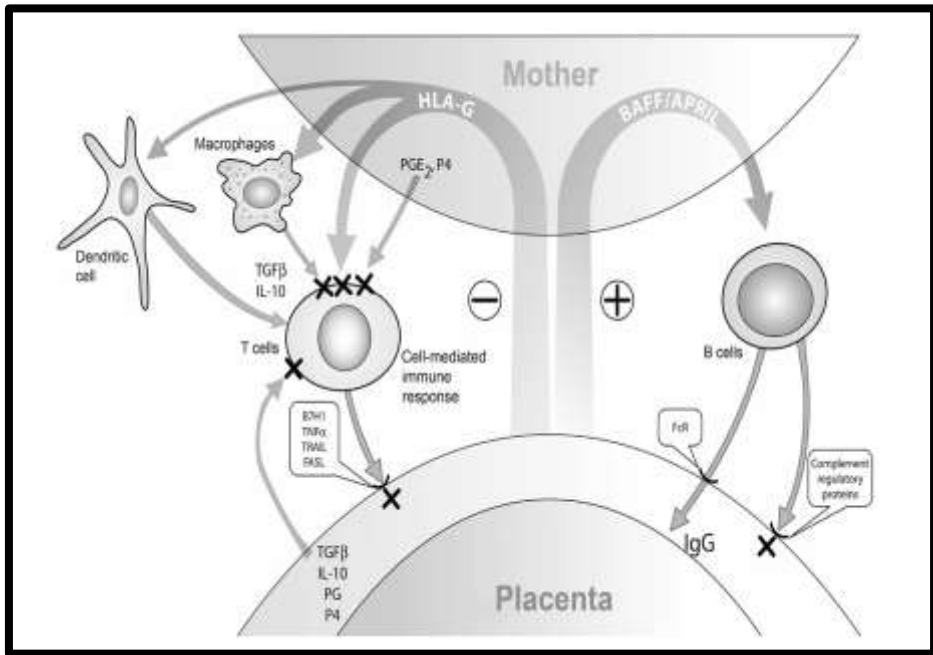
Gambar 3. Algoritme *Neoepitope Transplant Rejection and Autoimmune Disease* (NETRAD) Pada Virus EBV. (Heron, 2025)

### 1.6.3. Anti-HLA Pada Kehamilan

Kehamilan dapat dianggap sebagai suatu bentuk "transplantasi alami", sistem imun ibu harus mentoleransi janin yang mengandung antigen paternal. Janin yang bersifat semi-alogenik memerlukan akses ke sirkulasi ibu untuk memperoleh nutrisi dan oksigen selama masa perkembangan. Klasifikasi paritas terbagi menjadi empat, yaitu nullipara, primipara, multipara, grandmultipara. Studi saat ini membuktikan bahwa plasma dari donor wanita yang pernah melahirkan memiliki peluang lebih tinggi untuk mengandung anti-HLA dibandingkan dengan donor pria dan wanita nullipara. Peningkatan tren frekuensi aloimunisasi HLA terlihat seiring dengan peningkatan skor paritas. Penelitian ini membuktikan bahwa plasma dari donor wanita yang pernah melahirkan memiliki kemungkinan lebih tinggi mengandung antibodi anti-HLA dibandingkan dengan donor wanita dan pria yang belum pernah. Powers et al dan Triulzi et al mendeteksi anti-HLA pada 65,6% wanita dengan >5 kehamilan dan 32,2% wanita dengan >4 kehamilan, ditemukan bahwa anti-HLA terhadap HLA paternal terdeteksi lebih banyak pada wanita multipara dibandingkan pada wanita primipara (Priyadarsini et al., 2021). Berbeda dengan respons imun yang kuat terhadap rangsangan alogenik pada umumnya, sistem imun maternal tidak menimbulkan respon inflamasi terhadap janin dalam kondisi fisiologis normal. Keadaan toleransi imunologis ini difasilitasi oleh perkembangan dan fungsi plasenta. Plasenta yang merupakan organ janin berperan sebagai tempat interaksi antara sel ibu dan janin. Sel trofoblast plasenta merupakan sel janin utama yang secara langsung terpapar pada sistem imun maternal. Trofoblas vili yang terdiri atas lapisan dalam sitotrofoblas dan lapisan luar sinsitiotrofoblas berkontak langsung dengan darah ibu di ruang intervili dan berinteraksi dengan sistem imun sistemik maternal (Aisagbonhi and Morris, 2022).

Pada kehamilan normal, sel dendritik dan makrofag menginduksi dan mengontrol fenotipe sel T. Fenotipe sel T yang dihasilkan seperti sitokin tipe Th1, Th2, Th17 dan T regulator yang berperan proses sistem imun bawaan. Kehamilan normal terdapat kadar sitokin Th2 tinggi pada maternal-janin, dan respons antibodi pada maternal kuat. Sitokin tipe Th1, seperti IFN $\gamma$  dan TNF, memiliki peran penting dalam homeostasis rahim dan plasenta selama kehamilan. Respons yang dimediasi sel Th1 dan Th17 ditekan oleh sitokin anti-inflamasi plasenta seperti TGF $\beta$  dan IL-10 serta progesteron dan prostaglandin, sedangkan respons antibodi yang diatur oleh Th2 dapat dipertahankan dan bahkan ditingkatkan oleh dua ligan superfamili TNF yang tidak menginduksi apoptosis yang diproduksi di plasenta, BAFF (juga dikenal sebagai BlyS [stimulator limfosit B], TALL-1, THANK, zTNF4) dan APRIL (ligan penginduksi proliferasi). Dalam skema mekanisme Gambar 4, HLA-G bersama dengan sitokin imunosupresif, prostaglandin, dan progesteron, menghambat imunitas seluler maternal. Sel efektor terganggu oleh adaptasi khusus pada sinsitiotrofoblas plasenta yang mencakup ekspresi sitokin penghambat.

Imunitas yang dimediasi antibodi dapat ditingkatkan oleh anggota ligan superfamili TNF yang tidak menginduksi apoptosis, BAFF dan APRIL. Antibodi sitotoksik yang ditujukan pada antigen plasenta dihambat oleh ekspresi protein pengatur komplemen pada sinsiotrofoblas sementara IgG yang bermanfaat diangkut ke janin. (Sarah A, *et al.* 2015)



Gambar 4. Mekanisme Pembentukan Antibodi HLA Maternal (Sarah A, *et al.* 2015)

### Respons Imun terhadap Pembentukan anti-HLA

Respons imun maternal terhadap antigen janin tampaknya dimediasi oleh mekanisme yang sangat spesifik. Diasumsikan bahwa *Antigen Presenting Cell* (APC) di desidua termasuk makrofag, *Dendritic Cell* (DC) bertanggung jawab dalam menyajikan antigen janin kepada sistem imun ibu. Faktor-faktor utama yang bisa mengaktivasi APC adalah mikroba, sitokin inflamasi, interaksi CD40-CD40 ligand, *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs) dan *Patogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Abbas et al., 2024). Dalam sistem imun adaptif, sel utama yang berperan adalah limfosit B dan limfosit T, Sel T yang membantu limfosit B disebut T follicular helper (Tfh), penelitian sebelumnya pada tikus yang telah dilakukan pelacakan sel T spesifik janin secara konsisten didapatkan, bahwa sel T ibu merespon antigen janin selama kehamilan. Sel T CD8 dan CD4 ibu diaktifkan secara kuat oleh antigen janin dan terjadi proliferasi sel T. Banyak sel T CD8+ ibu spesifik janin tampaknya mengalami penghapusan

cepat setelah aktivasi dan ekspansi awal pada tikus. Studi ini menunjukkan bahwa sel T maternal spesifik fetus dapat menjadi T helper spesifik fetus sebagai respon terhadap antigen fetus. Limfosit B mengenali dan diaktifkan oleh berbagai macam antigen yang berbeda secara kimiawi, termasuk protein, polisakarida, lipid, asam nukleat, dan bahan kimia kecil. Limfosit T helper memainkan peran penting dalam aktivasi sel B oleh antigen protein. Sebutan helper berasal dari penemuan bahwa beberapa sel T merangsang atau membantu limfosit B untuk menghasilkan antibodi. Agar sel T dapat membantu sel B, setiap sel harus mengenali antigen protein yang sama. Oleh karena itu, sel T membantu respons sel B hanya terhadap antigen protein karena sel T hanya dapat mengenali peptida yang berasal dari protein dan ditampilkan oleh MHC. Sel T ibu telah terbukti merespons aloantigen paternal secara *in vitro*. Sel B spesifik antigen dipersiapkan selama kehamilan dan akhirnya berdiferensiasi menjadi sel plasma yang menghasilkan anti-HLA (Wang et al., 2023).

### **Proses Terbentuknya anti-HLA pada Kehamilan**

Pada kehamilan, ibu terpapar antigen HLA paternal yang diekspresikan oleh sel-sel janin. Meskipun terdapat mekanisme toleransi imun maternal-fetal, paparan antigen HLA janin tetap dapat memicu respons imun ibu, terutama pada kehamilan berulang (multiparitas). Proses transfer ini dimulai sekitar usia kehamilan 13 minggu dan meningkat secara progresif seiring bertambahnya usia kehamilan, dengan puncak transfer terjadi pada trimester ketiga. Penyaluran antibodi melewati plasenta dimediasi oleh *Neonatal Fc Receptor* (FcRn), dan sebagian besar antibodi yang ditransfer adalah imunoglobulin G (IgG). Penelitian menunjukkan bahwa bayi prematur memiliki kadar IgG yang jauh lebih rendah saat lahir dibandingkan dengan bayi cukup bulan. Meskipun imunoglobulin A (IgA) juga dapat melewati plasenta, jumlahnya relatif kecil, karena jalur utama transfer IgA ke bayi adalah melalui pemberian Air susu ibu (ASI) setelah kelahiran. Selama kehamilan, wanita memproduksi antibodi terhadap antigen janin, termasuk antibodi terhadap HLA (Savulescu et al., 2020).

Sel-sel janin atau fragmen antigen HLA paternal dapat masuk ke sirkulasi maternal melalui plasenta. Antigen ini kemudian ditangkap oleh APC ibu, seperti sel dendritik, dan dipresentasikan kepada sel T helper (CD4<sup>+</sup>). Aktivasi sel T helper akan menstimulasi sel B spesifik HLA, yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel plasma dan sel B memori. Sel plasma menghasilkan antibodi anti-HLA kelas I dan/atau kelas II, sedangkan sel B memori berperan dalam respons imun sekunder pada paparan antigen berikutnya, misalnya pada kehamilan selanjutnya atau transfusi darah. Semakin sering kehamilan terjadi, semakin tinggi peluang aloimunisasi HLA, sehingga wanita multipara memiliki risiko lebih tinggi untuk memiliki antibodi anti-HLA yang persisten. Antibodi ini memiliki implikasi klinis penting, terutama dalam konteks donor plasma, *transfusion-related acute lung injury* (TRALI), serta transplantasi organ (Aisagbonhi and Morris, 2022).

Kehadiran antibodi terhadap HLA kelas I maupun kelas II dapat memicu reaksi transfusi yang merugikan. Secara umum, gen HLA kelas I dan II memiliki struktur dan fungsi yang serupa, terdiri dari rantai berat dan ringan. Gen yang mengkode rantai berat HLA kelas I serta rantai  $\alpha$  dan  $\beta$  dari HLA kelas II terletak pada wilayah MHC di kromosom 6. Semua molekul HLA kelas I memiliki rantai ringan  $\beta$ 2-mikroglobulin yang dikode di luar MHC, yaitu di kromosom 15 (Stroncek et al., 2007). Human Leukocyte Antigen (HLA) kelas I yang relevan dalam konteks transfusi meliputi HLA-A, HLA-B, dan HLA-C. Ketiga gen ini mengkode rantai berat dengan struktur serupa yang mencakup delapan ekson, masing-masing bertanggung jawab untuk mengkode domain seperti  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3, wilayah transmembran, ekor sitoplasma, dan daerah yang tidak diterjemahkan. Domain  $\alpha$ 1 dan  $\alpha$ 2 sangat polimorfik dan berperan dalam pengikatan peptida serta pengenalan oleh reseptor sel T (Stroncek et al., 2007). Berbeda dengan kelas I, molekul HLA kelas II terdiri dari heterodimer rantai  $\alpha$  dan  $\beta$  dengan ukuran hampir setara. Gen pengkode rantai  $\alpha$  terdiri dari lima ekson, sementara rantai  $\beta$  terdiri dari enam ekson. Ekson 1 mengkode peptida pemimpin, ekson 2 dan 3 mengkode domain ekstraseluler, dan sisanya mengkode domain transmembran, ekor sitoplasma, dan daerah tidak diterjemahkan (Stroncek et al., 2007). Terdapat lima isotipe molekul HLA kelas II, yaitu HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ, dan HLA-DR. Masing-masing dikode oleh pasangan gen  $\alpha$  dan  $\beta$  yang ditandai sebagai "A" dan "B", seperti HLA-DPA1 dan HLA-DPB1 untuk HLA-DP. Ekspresi HLA-DR lebih kompleks dibandingkan molekul HLA kelas II lainnya. Semua rantai  $\alpha$  HLA-DR dikode oleh gen DRA yang sama, yaitu HLA-DRA1. Namun, rantai  $\beta$  dikode oleh beberapa gen fungsional seperti DRB1, DRB3, DRB4, atau DRB5, serta gen-gen pseudogen seperti DRB2 dan DRB6-9. Komposisi gen DRB yang dimiliki tiap individu membentuk haplotipe HLA-DR yang berbeda, yang menentukan variasi ekspresi dan fungsi HLA-DR pada setiap orang (Stroncek et al., 2007).

Pada Grand multipara terjadi paparan HLA sebanyak 5 kali menyebabkan jumlah dan afinitas sangat meningkat, reaktivitas terhadap lebih banyak jenis HLA menyebabkan spektrum antibodi yang lebih luas terhadap lebih banyak alel anti-HLA, terutama pada wanita dengan >4 kali menandakan spektrum sensitasi tinggi pada grand multipara (Priyadarsini et al., 2021; Küssel et al., 2017). Sel B yang teraktivasi di pusat germinal dapat berdiferensiasi menjadi sel memori. Sel B memori tidak mengeluarkan antibodi tetapi dapat bermigrasi ke jaringan dan organ limfoid sekunder. Sel ini bertahan hidup selama berbulan-bulan atau bertahun-tahun tanpa adanya paparan antigen tambahan, mengalami siklus lambat, dan siap merespon dengan cepat jika antigen diperkenalkan kembali. Oleh karena itu, memori dari respons antibodi yang bergantung pada T dapat bertahan seumur hidup. Sel B berafinitas tinggi berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mensekresi antibodi. Sel-sel yang mensekresi antibodi awal, yang disebut plasmablas, memasuki sirkulasi dan bermigrasi dengan cepat ke sumsum tulang atau jaringan mukosa. Di sumsum tulang, sel-sel ini dapat

berdiferensiasi lebih lanjut menjadi sel plasma berumur panjang, yang bertahan hidup selama bertahun-tahun dan terus memproduksi antibodi berafinitas tinggi, bahkan setelah antigen hilang. Diperkirakan lebih dari separuh antibodi dalam darah orang dewasa normal diproduksi oleh sel plasma berumur panjang ini. Dengan demikian, antibodi yang beredar mencerminkan riwayat paparan antigen setiap individu. Antibodi ini memberikan tingkat perlindungan langsung jika antigen (mikroba atau toksin) masuk kembali ke dalam tubuh (Abbas et al., 2024).

Proses aloimunisasi anti-HLA yang diinduksi oleh kehamilan telah dikaitkan dengan berbagai faktor biologis dan genetik, meskipun mekanismenya secara keseluruhan belum sepenuhnya dipahami (Persson et al., 2021). Fenomena produksi anti-HLA selama kehamilan pertama kali diamati oleh Van Rood dan rekan-rekannya pada tahun 1958. Mereka menemukan bahwa baik anti-HLA nonspesifik maupun yang secara spesifik menargetkan protein HLA paternal dapat terbentuk pada banyak kehamilan sehat, terutama setelah kehamilan memasuki usia 20 hingga 28 minggu. Frekuensi terbentuknya antibodi ini cenderung meningkat seiring bertambahnya paritas, dengan prevalensi mencapai 74 % pada wanita yang telah melahirkan lebih dari dua kali. Meskipun demikian, antibodi HLA yang terbentuk selama kehamilan tidak selalu dapat terdeteksi beberapa tahun setelah persalinan, meskipun dapat tetap tersimpan dalam memori imunologi. Dalam konteks imunologi janin, telah dibuktikan bahwa fetus manusia mampu memproduksi imunoglobulin M (IgM) dan imunoglobulin A (IgA). Imunoglobulin M merupakan jenis antibodi pertama yang dihasilkan oleh limfosit B, memiliki aviditas tinggi serta kemampuan penggumpalan yang kuat, meskipun dengan spesifisitas dan afinitas antigen yang relatif rendah. Seiring paparan antigen berulang, limfosit B akan melakukan pergantian isotype ke imunoglobulin G (IgG), yang memiliki spesifisitas lebih tinggi serta rentang fungsi efektor yang lebih luas. Berdasarkan bukti yang ada, fetus tidak memproduksi IgG sendiri, sehingga IgG yang ditemukan saat lahir termasuk antibodi terhadap HLA kemungkinan besar ditransfer secara pasif dari ibu melalui plasenta. Hingga kini, waktu pasti dan pemicu utama yang menyebabkan bayi mulai menghasilkan IgG sendiri masih belum diketahui (Savulescu et al., 2020).

Alloantibodi dapat berkembang secara alami, tanpa terpapar antigen HLA, penolakan organ yang diakibatkan oleh *Antibody Mediated Rejection* (AMR) dapat terjadi dalam beberapa minggu hingga beberapa tahun setelah infeksi virus Epstein Barr (EBV) (Heron et al., 2025). Pada HLA kelas I B pada nullipara terutama HLA-F yang terdeteksi secara intraseluler hanya pada sel B lini, sel B, dan jaringan yang mengandung sel B dan tidak terdeteksi protein HLA-F dalam lini sel T sehingga mengurangi kemungkinan reaksi silang (Ravindranath et al., 2024). Potensi patogenik antibodi polireaktif, baik yang bereaksi silang dengan HLA atau tidak, masih menjadi pertanyaan penting yang belum terjawab. Anti-HLA juga berkembang dengan mimikri molekuler telah

diasumsikan sebagai stimulus untuk alloantibodi yang terjadi secara alami ini, Dampak anti-HLA terhadap hasil kehamilan nullipara belum sepenuhnya dipahami. Beberapa penelitian melaporkan bahwa kadar antibodi HLA yang tinggi selama kehamilan, baik pada usia kehamilan awal maupun lanjut, berhubungan dengan hasil kehamilan yang buruk. Namun demikian, penelitian lainnya menunjukkan bahwa kadar antibodi HLA yang tinggi justru berkorelasi positif dengan keberhasilan kehamilan (Savulescu et al., 2020) Terbentuknya anti-HLA selama kehamilan merupakan bentuk sensitisasi imun yang dapat bertahan lama dan berdampak pada kondisi imunologis di masa mendatang, seperti pada proses transfusi atau transplantasi. (Persson et al., 2021; Tersigni et al., 2020)

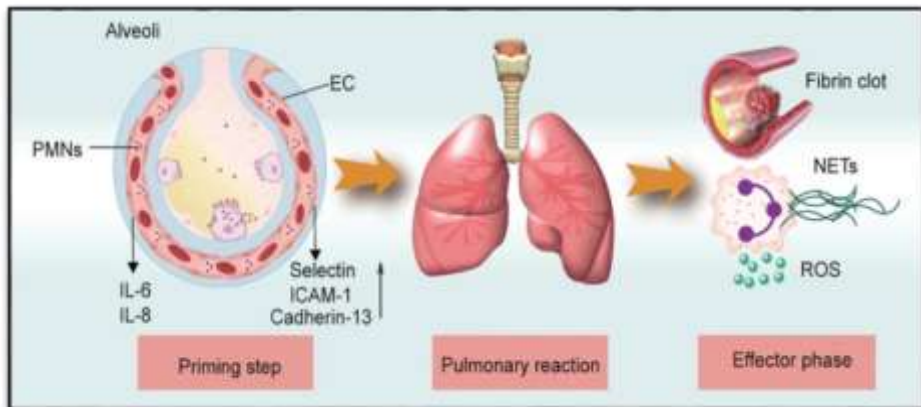
#### 1.6.4. Anti-HLA dan Reaksi Transfusi

Reaksi transfusi yang berhubungan dengan anti-HLA (*Human Leukocyte Antigen*) terutama melibatkan respons imun terhadap antibodi HLA dalam plasma donor bereaksi dengan antigen leukosit donor dan menyebabkan kerusakan paru akut atau demam. Ini biasanya terjadi karena resipien sudah memiliki antibodi anti-HLA akibat paparan sebelumnya (transfusi berulang, kehamilan, atau transplantasi). Reaksi imunologis yang tersering terjadi seperti *transfusion-related acute lung injury* (TRALI). *Transfusion-related acute lung injury* adalah sindrom klinis serius yang ditandai oleh biasanya muncul dalam enam jam pasca transfusi dan merupakan penyebab utama kematian terkait transfusi menurut *Food and Drug Administration* (FDA), dengan insiden bervariasi tergantung jenis komponen darah yang ditransfusikan. Insidennya diperkirakan sebesar 1 kasus per 5000 unit transfusi sel darah merah, 1 per 2000 unit komponen yang mengandung plasma, dan 1 per 400 unit konsentrat trombosit dari darah utuh. Secara klinis, TRALI memiliki onset akut, dengan manifestasi utama berupa hipoksemia ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$  mmHg atau saturasi oksigen  $< 90\%$  pada udara ruangan), disertai gambaran edema paru bilateral pada pencitraan toraks, tanpa adanya tanda-tanda kelebihan cairan atau edema paru kardiogenik (Cho et al., 2023; van Wonderen et al., 2022).

*Transfusion-Related Acute Lung Injury* memiliki gejala khas seperti demam, hipotensi, infiltrat bilateral pada toraks, dan hipoksemia tanpa tanda-tanda kelebihan cairan. Diagnosis ditegakkan jika tidak ada penyebab lain cedera paru, dan dibedakan dari kondisi seperti Transfusion-Associated Circulatory Overload (TACO) (Cho et al., 2023). Secara patofisiologis, TRALI dibagi menjadi bentuk imun dan non-imun. Pada bentuk imun, antibodi anti-HLA atau anti-HNA dari donor atau resipien bereaksi dengan leukosit lawan, menyebabkan aktivasi neutrofil, pelepasan sitokin dan Reactive Oxygen Species (ROS), serta kerusakan endotel paru (Fang et al., 2025; Yu and Lian, 2023). Transfusion-Related Acute Lung Injury yang tidak dimediasi oleh mekanisme imun dapat dikaitkan dengan transfusi senyawa aktif biologis, yang terakumulasi

dalam komponen darah yang tersimpan, seperti lipid bioaktif, sitokin proinflamasi, atau mikropartikel trombosit dengan aktivitas prokoagulan tinggi. Pada kasus TRALI yang tidak dimediasi imun, tidak terdeteksi adanya antibodi, meskipun gejala klinis tetap muncul (Álvarez et al., 2015). Sel inflamasi utama yang terlibat dalam patogenesis TRALI adalah neutrofil polimorfonuklear. Untuk perkembangan TRALI, produksi antibodi terhadap leukosit dianggap sangat penting. Silliman et al., mengemukakan hipotesis model "two-hit", yang mengasumsikan bahwa timbulnya TRALI bergantung pada koeksistensi dua faktor: faktor predisposisi yang ada pada penerima dan keberadaan senyawa pengaktif leukosit dalam darah yang ditransfusikan (Álvarez et al., 2015). Ada dua teori mekanisme "hit" yang dapat menjelaskan perbedaan ini. Hipotesis mekanisme two-hit menyatakan bahwa TRALI terjadi akibat dua proses yang berurutan (Ardhaneswari and Mahartini, 2023).

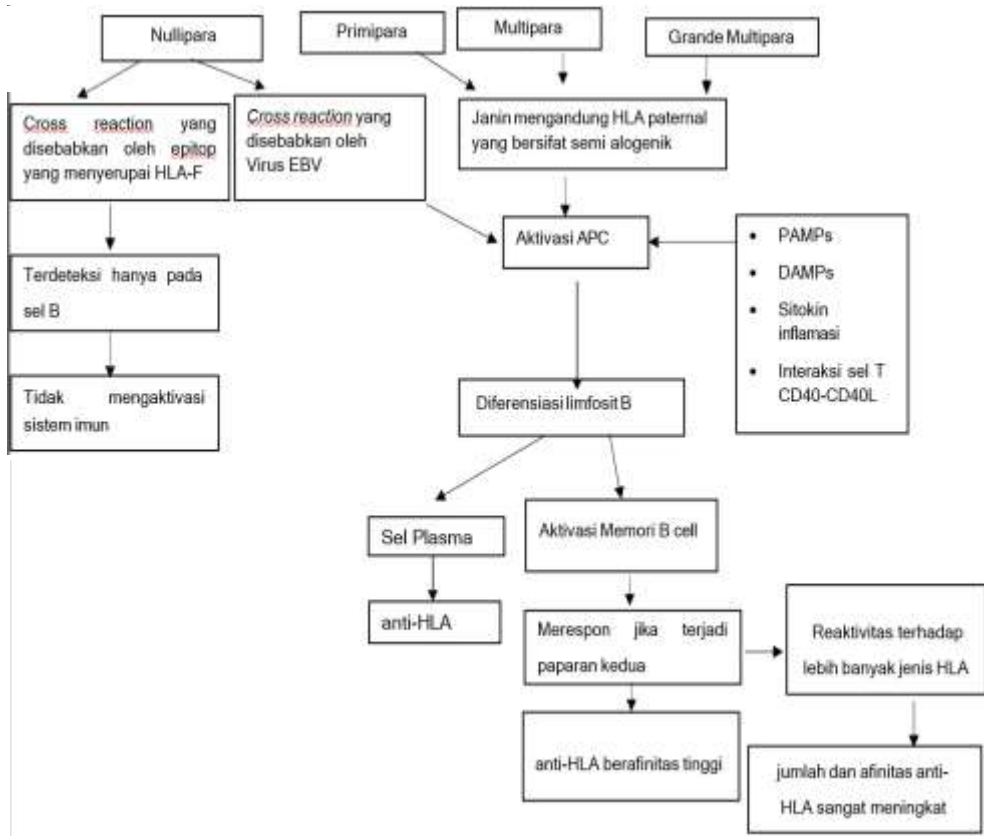
Berdasarkan teori ini, predisposisi resipien bersama dengan keberadaan faktor-faktor merugikan dalam komponen darah memainkan peran yang signifikan (Yu and Lian, 2023). "First hit" dimediasi oleh kondisi proinflamasi apa pun, yaitu agresi yang mengaktifkan endotelium paru dan mendorong perekutan serta perlekatan neutrofil pada endotelium kapiler, yang kemudian menyebabkan kerusakan pada penghalang permeabilitas alveolar-kapiler paru. "Second hit" diinduksi oleh transfusi komponen darah, yang mengandung senyawa yang mengaktifkan neutrofil dan merangsang pelepasan faktor sitotoksik. Proses ini menyebabkan kerusakan pada endotelium dan cedera kapiler. Neutrofil yang teraktivasi akan melepaskan mediator proinflamasi seperti sitokin (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa), enzim proteolitik (misalnya elastase, azurosidin), serta ROS. Peristiwa ini memicu kaskade reaksi imun yang mengarah pada kerusakan pada endotelium vaskular, menghasilkan kebocoran cairan dari kapiler paru ke dalam ruang alveolar, yang kemudian menyebabkan edema. Peradangan saluran napas neutrofilik pada paru dan gangguan pada penghalang permeabilitas alveolar-kapiler paru tampaknya mirip dengan yang terlihat pada bentuk Acute Lung Injury (ALI) lainnya, meskipun dengan asal yang berbeda (Álvarez et al., 2015).



Gambar 5. Tiga langkah patogenesis TRALI.(Yu and Lian, 2023).

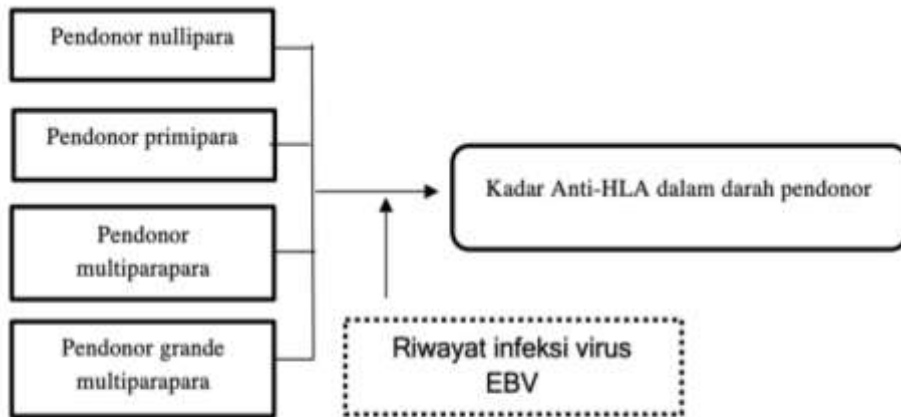
*Transfusion-Related Acute Lung Injury* berkaitan dengan keberadaan antibodi terhadap HLA atau HNA dalam komponen darah donor wanita multipara (Bayat et al., 2021). Bahkan, antibodi HLA kelas II lebih sering ditemukan pada donor yang terkait kasus TRALI, meskipun sel target seperti neutrofil dan endotelium tidak secara langsung mengekspresikan antigen HLA tersebut (Sachs et al., 2011). Deteksi anti-HLA saat ini dapat dilakukan dengan teknologi berbasis solid-phase seperti ELISA dan sistem deteksi berbasis antigen tunggal (*Single Antigen Beads/SAB*), yang menawarkan sensitivitas dan spesifisitas tinggi (San Segundo et al., 2025). Meskipun demikian, pendekatan deteksi antibodi HLA masih bervariasi antar institusi dan wilayah, dan belum menjadi prosedur rutin di sebagian besar pusat transfusi di negara berkembang (Courtwright et al., 2018). Pengetahuan tentang status anti-HLA sangat penting tidak hanya dalam transplantasi organ, tetapi juga dalam konteks transfusi darah, terutama ketika donor wanita digunakan untuk komponen darah seperti trombosit apheresis (Tait, 2016).

### 1.6.4 Kerangka Teori



Gambar 6. Kerangka Teori

### 1.6.5 Kerangka Konsep



Gambar 8. Kerangka Konsep

Keterangan :

: Variabel Independen

: Variabel Dependen

: Variabel perancu

Gambar 7. Kerangka Konsep

## **BAB II**

### **METODE PENELITIAN**

#### **2.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Unit Pengelola Darah (UPD) RS Wahidin Sudirohusodo Makassar, untuk pengambilan sampel darah dan pengumpulan data subjek. *Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC)*, sebagai tempat pemeriksaan laboratorium untuk analisis kadar anti-HLA-DRA. Penelitian berlangsung mulai bulan Agustus 2025 hingga Oktober 2025.

#### **2.2 Alat dan Bahan**

Penelitian ini menggunakan berbagai alat dan bahan untuk mendukung proses pengumpulan dan analisis data. Alat yang digunakan menggunakan metode ELISA. Formulir *informed consent*. Perlengkapan pengambilan darah seperti alkohol swab, jarum, kapas, dan tabung vakutainer. Penelitian ini juga menggunakan form pengumpulan data dan kode subjek untuk menjaga identitas dan kerahasiaan partisipan.

#### **2.3 Metode Penelitian**

##### **2.3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian analitik dengan menggunakan desain cross-sectional. Desain ini digunakan untuk mengetahui perbedaan kadar anti-HLA antara empat kelompok pendonor darah yaitu nullipara, primipara, multipara, dan grand multipara pada satu waktu pengamatan tertentu. Desain ini dipilih karena efisien dalam menggambarkan perbedaan antara variabel tanpa memerlukan waktu yang panjang.

##### **2.3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah semua pendonor darah perempuan yang tergolong nullipara, primipara, multipara, dan grand multipara di Unit Pengelola Darah RS Wahidin Sudirohusodo Makassar, baik pendonor darah rutin maupun tidak rutin. Sampel penelitian adalah bagian dari populasi yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Teknik pemilihan sampel dilakukan secara *purposive sampling*, yaitu pemilihan subjek berdasarkan pertimbangan karakteristik tertentu yang relevan dengan tujuan penelitian.

### 2.3.3 Kriteria Inklusi

- a. Perempuan pendonor darah rutin maupun yang tidak rutin baik sebagai pendonor sukarela maupun pendonor pengganti yang memenuhi kriteria donor darah
- b. Bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani lembar persetujuan tertulis (*Informed consent*).

### 2.3.4 Kriteria Eksklusi

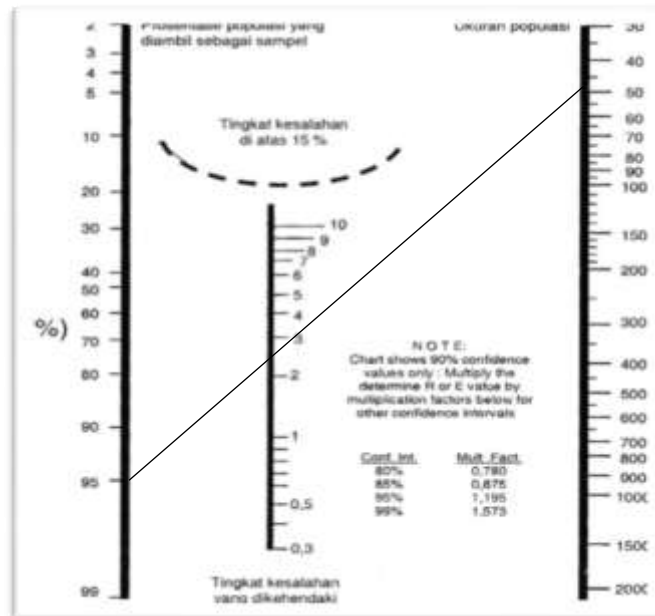
- a. Subjek dengan riwayat transfusi dan transplantasi
- b. Subjek dengan riwayat melahirkan bayi yang tidak hidup setelah usia kehamilan >20 minggu
- c. Sampel serum yang tidak layak analisis (ikterik, lipemik, atau hemolisis berat) dan tidak dapat dilakukan pengambilan sampel ulang

### 2.3.5 Perkiraan Besar Sampel

Besarnya sampel ditentukan menggunakan metode Nomogram Harry King, sebagaimana dijelaskan oleh Sugiyono (Sugiyono, 2011). Berdasarkan populasi sebanyak 50 orang, taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ), dan faktor pengali 1,195, maka:

- a. Proyeksi persentase sampel dari nomogram: 90%
- b. Perhitungan:  $0,90 \times 50 \times 1,195 = 53,78$
- c. Dibulatkan menjadi 54 orang

Dengan demikian, jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 54 pendonor perempuan (Gambar 9).



Gambar 8. Nomogram Harry King (Sugiyono, 2011).

### 2.3.6 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini akan dilakukan melalui beberapa tahap. Pertama, seluruh data yang diperoleh dari formulir pengumpulan data, hasil laboratorium, dan kuesioner kepatuhan akan dikoding dan dimasukkan ke dalam perangkat lunak pengolahan statistik, yaitu SPSS versi 25.0. Sebelum dilakukan analisis inferensial, data akan diuji distribusinya menggunakan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* untuk menentukan apakah data berdistribusi normal atau tidak. Untuk menilai perbedaan antara paritas dengan anti-HLA, maka dilakukan perbandingan kadar anti-HLA berdasarkan kategori Paritas dengan menggunakan *Kruskal-Wallis*. Kemudian dilanjutkan menggunakan *Least Significant Difference (LSD test)* untuk menilai perbandingan mean/median antar kelompok. Nilai  $p < 0,05$  akan dianggap bermakna secara statistik dalam penelitian ini.

### 2.3.7 Izin Studi dan Kelayakan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin - Rumah Sakit Universitas Hasanuddin - Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo (KEPK FKUH RSUH-RSWS) dengan nomor *Ethical Clearance* : 630/UN4.6.5.31/PP36/2025 *Informed Consent* tertulis diperoleh dari seluruh subjek sebelum dilakukan pengambilan sampel. Data subjek dijaga kerahasiaannya dan hanya digunakan untuk keperluan akademik.

## 2.4 Pelaksanaan Penelitian

### 2.4.1 Cara Kerja Penelitian

#### 2.4.1.1 Skrining dan Rekrutmen Subjek

- a. Rekrutmen dilakukan di UPD RS Wahidin Sudirohusodo Makassar. Petugas akan memverifikasi status nullipara, primipara, multipara, dan grand multipara melalui wawancara dan/atau dokumen medis pendukung.
- b. Calon subjek yang memenuhi kriteria inklusi akan dijelaskan mengenai prosedur penelitian dan diminta untuk menandatangani *informed consent*.
- c. Dilakukan pengambilan darah secara vena sebanyak  $\pm 5$  mL, disentrifugasi untuk memperoleh serum
- d. Pemeriksaan kadar anti-HLA-DRA dilakukan dengan metode ELISA (*Enzyme- Linked Immunosorbent Assay*) menggunakan *Human Anti-HLA-DRA Antibody ELISA Kit*.
- e. Data hasil pemeriksaan dikumpulkan dan dicatat ke dalam formulir kerja, kemudian diolah secara statistik.

#### 2.4.2 Prosedur Pemeriksaan Kadar anti-HLA-DRA

##### A. Persiapan sampel

Pasien tidak memerlukan persiapan khusus, namun disarankan untuk beristirahat cukup dan menghindari aktivitas berat sebelum pengambilan sampel guna memperoleh hasil optimal. Sampel yang digunakan adalah sampel serum. Kumpulkan dan sentrifugasi serum pada 3000 rpm selama kurang lebih 20 menit. Kumpulkan supernatannya dengan hati-hati. Segera lakukan pengujian atau simpan sampel pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  atau  $-80^{\circ}\text{C}$ . Hindari siklus pembekuan/pencairan berulang. Sampel disentrifugasi selama 15 menit pada 1000 rpm setelah pengumpulan dan supernatan dipisahkan. disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dalam waktu 3 bulan.

**B. Alat dan bahan****Alat**

- a. Air suling
- b. Kertas saring
- c. Pipet dan ujung pipet sekali pakai
- d. Tabung sampel
- e. Pembaca ELISA mampu mengukur absorbansi pada 450 nm
- f. Inkubator
- g. *96 well microtiter plates*
- h. *Microtiter plate reader*
- i. Alat sentrifuge

**Bahan**

- a. Spesimen serum
- b. *Biotinylated Detection Ab working solution*
- c. *Wash solution*
- d. *Stop solution*
- e. *Chromogen solution A*
- f. *Chromogen solution B*
- g. *HRP-Conjugate Reagent*
- h. *Closure plate membrane*

### C. Prinsip Tes

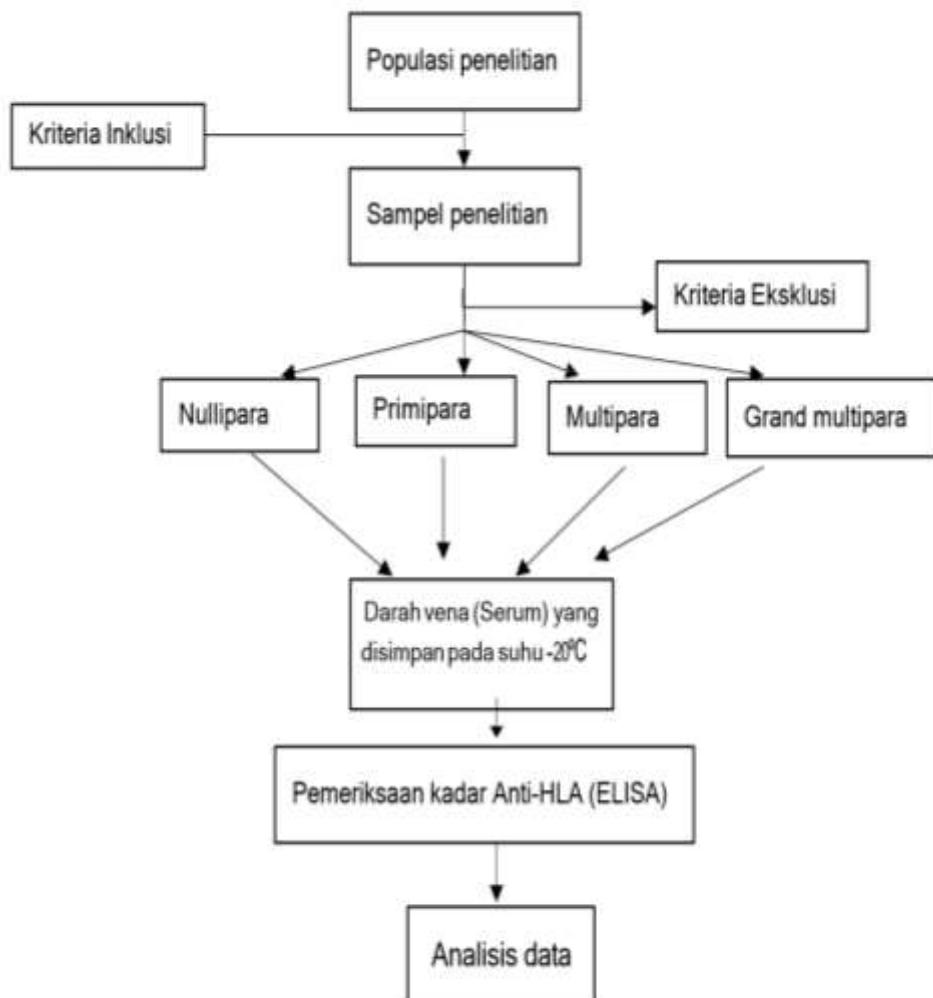
Pemeriksaan ini menggunakan metode sandwich *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Antibodi spesifik untuk *human* anti-HLA-DRA dilapiskan sebelumnya ke pelat 96-sumur. Antibodi terkonjugasi biotin digunakan sebagai antibodi pendeteksi. Standar, sampel uji dan antibodi pendeteksi terkonjugasi biotin ditambahkan ke sumur, dan dicuci dengan buffer pencuci. Horseradish peroxidase (HRP) Streptavidin ditambahkan dan konjugat yang tidak terikat dicuci bersih dengan buffer pencuci. Substrat Tetramethylbenzidine (TMB) digunakan untuk memvisualisasikan reaksi enzimatis HRP. TMB dikatalisis oleh HRP untuk menghasilkan produk warna biru yang berubah menjadi kuning setelah penambahan larutan penghenti asam. Kepadatan kuning sebanding dengan jumlah target sampel yang ditangkap di piring. Baca *optical density* (OD) absorbansi pada 450nm dalam *microplate reader*, dan kemudian konsentrasi target dapat dihitung.

### D. Cara Kerja

1. Semua reagen, larutan standar dan sampel dipersiapkan. Periksa label dan warna sampul vial/botol dan pastikan cocok dan tidak ada kesalahan.
2. *Plate*, semua reagen dan sampel dibiarkan mencapai suhu kamar (18°C - 25°C) secara alami sebelum memulai prosedur pengujian. Jangan gunakan pemanas air panas untuk memanaskan *plate*, reagen atau sampel.
3. Piring dari kantong foil dihapus. *Plate* dilepas dan strip yang tidak terpakai dikembalikan ke kantong foil dengan paket pengering dan tutup kembali untuk mencegah kelembapan.
4. *Blank wells*, *standar wells*, *sample wells* diatur
5. Larutan standart (S1,S2,S3,S4,S5) sebanyak 50 µL ditambahkan ke *well* sesuai standar, lalu sampel sebanyak 50 µL ditambahkan ke dalam setiap *sample wells*
6. *HRP-Conjugate reagent* sebanyak 100 µL ditambahkan ke setiap *well* kecuali *blank wells*
7. *Plate* dengan *closure plate membrane* ditutup dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C
8. Semua *well* (termasuk semua *blank well*) dicuci 4 kali
9. Chromogen solution A sebanyak 50 µL ditambahkan ke setiap *well*

10. Chromogen solution B sebanyak 50  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke setiap *well*.  
(Lindungi larutan chromogen B dari cahaya)
11. *Plate* diaduk perlahan dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C  
(lindungi plat dari cahaya)
12. *Stop solution* sebanyak 50  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke setiap sumur
13. *Optical density* pada 450 nm dibaca menggunakan pembaca ELISA  
dalam waktu 15 menit setelah *stop solution* ditambahkan (sekitar 5  
menit biasanya merupakan waktu terbaik).

## 2.5 Alur Penelitian



## 2.6 Definisi Operasional dan Kriteria Objektif

- a. Anti-HLA : Kadar antibodi spesifik terhadap HLA-DRA yang terdeteksi dalam serum dan diperiksa dengan metode ELISA menggunakan Kit *Assay Genie* dengan satuan ng/mL
- b. Pendonor darah adalah individu yang secara sukarela memberikan darah untuk keperluan transfusi atau pengolahan komponen darah yang memenuhi syarat donor darah.
- c. Paritas adalah jumlah kehamilan yang menghasilkan janin yang mampu hidup di luar rahim
  - Nullipara adalah perempuan yang belum pernah melahirkan yang akan melakukan donor darah.
  - Primipara adalah perempuan yang telah melahirkan satu kali yang akan melakukan donor darah dengan usia kehamilan >20 minggu
  - Multipara adalah perempuan yang telah melahirkan dua sampai empat kali yang akan melakukan donor darah dengan usia kehamilan >20 minggu
  - Grand Multipara adalah perempuan yang telah melahirkan lebih dari empat kali sampai 9 kali yang akan melakukan donor darah dengan usia kehamilan >20 minggu