

## PERBEDAAN WAKTU DAN SUHU INKUBASI TERHADAP TITER SEKRETOR PADA BERCAK SALIVA PUNTUNG ROKOK

*Incubation Time and Temperature Differences on Secretor Titer in Saliva Spots on Cigarette Butts*

Rifanni Luthfi Amanda<sup>1\*</sup>, Betty Nurhayati<sup>2</sup>, Nina Marlina<sup>3</sup>, Adang Durachim<sup>4</sup>

<sup>1\*</sup> Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung  
Email: rifanni2505@gmail.com

<sup>2\*</sup> Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung  
Email: bettynurhayati@gmail.com

<sup>3\*</sup> Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung  
Email: ninamarliana0606@gmail.com

<sup>4\*</sup> Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung  
Email: adangdurachim65@gmail.com

### ABSTRACT

*Individual identification in forensic examinations can be conducted using blood type analysis. In individuals who are secretors, blood group can be determined through body fluids such as saliva. Cigarette butts are frequently found as evidence at crime scenes and can be used as specimens for blood group examination due to the presence of saliva stains. One of the stages in secretor examination is the incubation stage, where the antigen-antibody reaction occurs in the samples and antisera. In this study, secretor titers were collected from 6 different individuals. The cigarette butts were solvent and diluted, then the titer were with temperature variation in a refrigerator (2-8°C) and at room temperature (20-25°C), as well as time variation of 15 minutes and 120 minutes, which compared with the standard time (1080 minutes). The aim was to observe the differences in incubation time and temperature on secretor titers in saliva stains on cigarette butts. The research design used was a quasy-experimental design, the examination performed on the same specimen with different incubation temperature and time using the agglutination-inhibition principle. The results of the study showed the lowest titer at 1/4 and the highest titer at 1/16. The statistic result of the examination conclude there is a difference in titer values in the examination with a 15-minute incubation time, but no difference was found with a 120-minute incubation time. There was no difference in titer in examination between incubation at refrigerator and room temperature.*

**Key words:** *Incubation time, incubation temperature, forensic examination,*

### ABSTRAK

Identifikasi individu pada pemeriksaan forensik dapat menggunakan metode pemeriksaan golongan darah. Pada individu berstatus sekretor, golongan darah dapat diperiksa melalui cairan tubuh seperti saliva. Puntung rokok merupakan barang bukti yang sering ditemukan di TKP dan dapat menjadi spesimen pemeriksaan golongan darah karena terdapat bercak saliva. Salah satu tahapan dalam pemeriksaan sekretor adalah tahap inkubasi untuk menginisiasi reaksi antigen-antibodi antara sampel dan antisera. Dalam penelitian ini, pemeriksaan titer sekretor pada bercak saliva puntung rokok diambil dari 6 individu yang berbeda. Dilakukan perendaman sampel puntung rokok dalam pelarut lalu dilanjutkan dengan pengenceran, kemudian dilakukan inkubasi dengan variasi suhu (2-8° C dan 20-25° C) serta waktu inkubasi (15 dan 120 menit) dibandingkan dengan waktu standar 1080 menit. Desain penelitian yang digunakan

adalah eksperimen semu, dilakukan pemeriksaan dari spesimen yang sama dengan perlakuan suhu dan waktu inkubasi yang berbeda dengan menggunakan prinsip aglutinasi-inhibisi. Hasil penelitian menunjukkan titer terendah 1/4 dan titer tertinggi 1/16. Dapat disimpulkan terdapat perbedaan nilai titer pada pemeriksaan dengan waktu inkubasi 15 menit, namun tidak terdapat perbedaan pada waktu inkubasi 120 menit. Selain itu, tidak terdapat perbedaan titer pada pemeriksaan suhu inkubasi refrigerator maupun suhu ruang.

**Kata Kunci:** Waktu Inkubasi, Suhu Inkubasi, Laboratorium Forensik.

## PENDAHULUAN

Pada peristiwa-peristiwa kriminal dengan kekerasan fisik, hampir semua meninggalkan barang bukti fisik. Barang bukti fisik tersebut melalui pemeriksaan laboratorium dapat memberikan keterangan yang berharga bagi proses keadilan<sup>1</sup>. Salah satu usaha identifikasi yang dilakukan untuk menyortir dan mempersempit tersangka pelaku kejahatan adalah dengan sistem penggolongan darah. Penggolongan darah penting di dunia forensik dan proses peradilan dengan memanfaatkan analisis golongan darah dari sumber darah atau bercak darah dan dari non darah<sup>2</sup>.

Pemeriksaan golongan darah melalui saliva dapat dilakukan pada orang-orang yang memiliki status golongan sekretor. Golongan sekretor ini adalah orang yang mengeluarkan antigen golongan darah yang sama atau identik dengan sel darah merahnya pada cairan tubuh yang dikeluarkan seperti saliva atau sperma<sup>3</sup>. Data menunjukkan sekitar 80% dari populasi merupakan sekretor Saliva yang ditinggalkan pada puntung rokok dapat digunakan untuk pemeriksaan golongan darah yang merupakan komponen pemeriksaan sekunder<sup>4</sup>.

Reaksi antigen antibodi harus diinkubasi pada waktu optimum supaya reaksi antigen-antibodi yang baik dapat tercapai. Waktu inkubasi yang terlalu singkat dapat menyebabkan antigen dan antibodi tidak dapat bereaksi dengan baik, sedangkan inkubasi yang terlalu panjang dapat menyebabkan

kompleks antigen-antibodi yang terdisosiasi<sup>5</sup>.

Inkubasi yang dimaksud adalah inkubasi pada tahap netralisasi reaksi antigen-antibodi ketika sampel sebagai antigen direaksikan dengan antibodi<sup>6</sup>. Untuk memperdalam suhu dan waktu inkubasi, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui waktu dan suhu mana yang paling baik untuk melakukan pemeriksaan sekretor dengan sampel puntung rokok, dan bagaimana perbedaan yang dihasilkan dari variasi atas variabel suhu dan waktu. Suhu yang digunakan adalah suhu ruang dan suhu refrigerator. Sedangkan waktu yang digunakan adalah 15 menit dan 120 menit, dengan 1080 menit (18 jam) sebagai standar<sup>7</sup>.

## METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian quasi-eksperimen. Dilakukan pada variabel suhu inkubasi suhu kamar 20-25°C dan suhu refrigerator 2-8°C, dan variabel waktu inkubasi tahap netralisasi selama 15 menit dan 120 menit. Populasi dalam penelitian ini adalah individu civitas akademika Poltekkes Kemenkes Bandung yang merokok. Sampel pada penelitian ini adalah beberapa individu civitas akademika perokok, bergolongan darah A atau B dan merupakan sekretor.

Penelitian ini telah memperoleh pernyataan layak etik dari KEPK Poltekkes Kemenkes Bandung No. 29/KEPK/EC/VI/2023. Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2023 di Laboratorium Hematologi Jurusan TLM Poltekkes Bandung. Jumlah unit eksperimen yang digunakan adalah

sebanyak 6 unit eksperimen, dengan masing-masing variasi waktu dan suhu.

Puntung rokok yang diambil dari subjek kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan direndam dalam 3mL aquadest, kemudian disentrifugasi 3000 rpm selama 5 menit. Setelah 24 jam, sampel disentrifugasi kembali, diambil bagian supernatan dan dilakukan pengenceran pada tabung reaksi menggunakan NaCl hingga pengenceran 1/128. Pada masing-masing pengenceran ditambahkan anti ABO yang sesuai, lalu dilakukan inkubasi sesuai dengan variasi waktu dan suhu yang telah ditentukan. Waktu yang digunakan adalah 15 menit, 120 menit dan 1080 menit, serta suhu yang digunakan adalah suhu refrigerator (2-8° C) dan pada suhu ruang (20-25° C). Setelah inkubasi, ditambahkan 2% sel darah merah dan kemudian dibaca aglutinasinya.

Data yang didapatkan kemudian diolah menggunakan uji statistik dengan

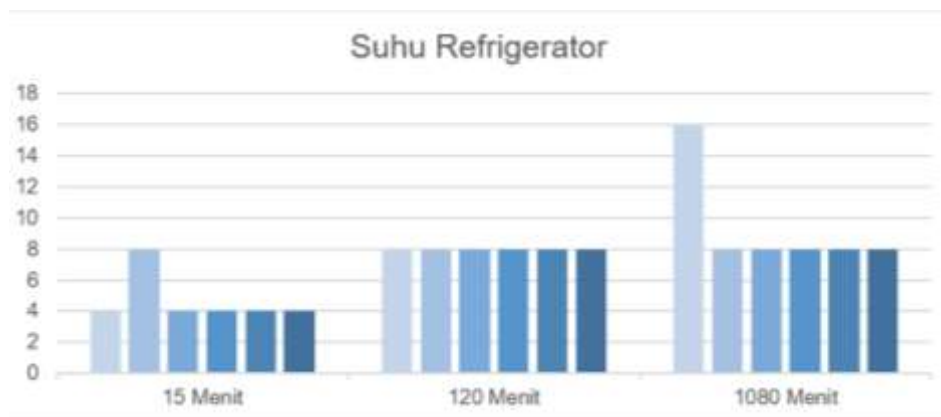
rangkaiannya uji normalitas, uji Friedman dan dilanjutkan uji Wilcoxon untuk melihat perbedaan waktu dan suhu inkubasi terhadap titer sekretor bercak saliva puntung rokok secara statistika.

## HASIL

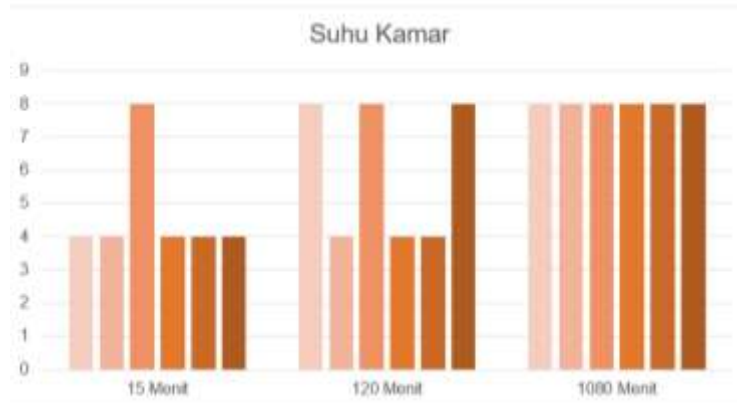
Proses pemeriksaan diawali dengan skrining golongan darah dan skrining sekretor terlebih dahulu. Setelah dikonfirmasi bahwa subjek masuk ke dalam kriteria inklusi, sampel puntung rokok diambil dan dilakukan pengolahan sampel. Setiap sampel hasil pengolahan puntung rokok kemudian dibagi menjadi 2 bagian untuk diperiksa di suhu refrigerator dan suhu kamar dan kemudian dibagi kembali menjadi 3 bagian untuk perlakuan dengan inkubasi 15 menit, 120 menit serta 1080 menit sebagai standar. Hasil pemeriksaan kemudian dilaporkan dalam bentuk tabel yang disajikan pada tabel 1 dengan grafik pada gambar 1 dan 2.

**Tabel 1. Data Hasil Pemeriksaan**

Pengulangan	Suhu Refrigerator			Suhu Ruang		
	15 Menit	120 Menit	Standar	15 Menit	120 Menit	Standar
1	1/4	1/8	1/16	1/4	1/8	1/8
2	1/8	1/8	1/8	1/4	1/4	1/8
3	1/4	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
4	1/4	1/8	1/8	1/4	1/4	1/8
5	1/4	1/8	1/8	1/4	1/4	1/8
6	1/4	1/8	1/8	1/4	1/8	1/8



**Gambar 1 Grafik hasil pemeriksaan pada inkubasi suhu refrigerator**



**Gambar 2** Grafik hasil pemeriksaan pada inkubasi suhu kamar

Berdasarkan hasil pada tabel 1 beserta grafik pada gambar 1 dan gambar 2, hasil pemeriksaan dengan variasi waktu dan suhu inkubasi memiliki rentang nilai titer 1/4 hingga 1/6. Kemudian dilakukan pengolahan data secara statistik meliputi uji normalitas, uji non-parametrik Friedman kemudian dilanjutkan menggunakan uji Wilcoxon. Hasil uji normalitas dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

**Tabel 2 Hasil Uji Normalitas**

Suhu	Waktu	Hasil	Kesimpulan
Refrigerator	15 Menit	P<0,05	Distribusi Tidak Normal
	120 Menit	Konstan	Distribusi Tidak Normal
	1080 Menit	P<0,05	Distribusi Tidak Normal
Kamar	15 Menit	P<0,05	Distribusi Tidak Normal
	120 Menit	P<0,05	Distribusi Tidak Normal
	1080 Menit	Konstan	Distribusi Tidak Normal

Dari tabel 2, hasil uji normalitas diperoleh distribusi tidak normal dari seluruh kelompok data, sehingga pengolahan data dilanjutkan dengan uji Friedman. Hasil uji Friedman terhadap

suhu inkubasi dapat dilihat pada tabel 3.1 dan hasil uji friedman terhadap waktu dapat dilihat pada tabel nomor 3.2.

**Tabel 3.1 Uji Friedman terhadap Suhu Inkubasi**

Suhu	Hasil	Kesimpulan
Refrigerator	P > 0,05	Tidak Terdapat Perbedaan
Kamar	P > 0,05	Tidak Terdapat Perbedaan

Dari tabel 3.1 hasil uji Friedman diatas, diperoleh nilai P > 0,05 yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan. Hal ini berarti hasil pemeriksaan titer sekretor terhadap variasi suhu inkubasi tidak terdapat perbedaan yang bermakna.

**Tabel 3.2 Uji Friedman terhadap Waktu Inkubasi**

Suhu	Waktu	Hasil	Kesimpulan
Refrigerator	15 Menit	P < 0,05	Terdapat Perbedaan
	120 Menit	P < 0,05	Terdapat Perbedaan
	1080 Menit	P < 0,05	Terdapat Perbedaan
Kamar	15 Menit	P < 0,05	Terdapat Perbedaan
	120 Menit	P < 0,05	Terdapat Perbedaan
	1080 Menit	P < 0,05	Terdapat Perbedaan

Berdasarkan tabel tersebut, hasil Uji Friedman didapatkan dilai Sig. < 0,05, hal ini memiliki arti bahwa data pemeriksaan titer antibodi terhadap variasi waktu terdapat perbedaan yang bermakna. Untuk melihat letak spesifik variabel mana yang memiliki beda, maka variabel waktu inkubasi diuji kembali menggunakan uji Wilcoxon dengan hasil pada tabel 4

**Tabel 4 Uji Wilcoxon pada Waktu Inkubasi**

Suhu		Hasil	Kesimpulan
Ruang	15 Menit	P<0,05	Terdapat perbedaan
	120 Menit	P>0,05	Tidak ada perbedaan
Refri-gerator	15 Menit	P<0,05	Terdapat perbedaan
	120 Menit	P>0,05	Tidak ada perbedaan

Dari tabel 4 dapat terlihat pengaruh waktu inkubasi terhadap titer sekretor pada puntung rokok. Hasil uji Wilcoxon pada variasi waktu 15 menit dibandingkan dengan standar 1080 menit, baik suhu ruang maupun suhu refrigerator menunjukkan  $p < 0,05$  yang berarti terdapat perbedaan yang berarti. Sedangkan pada variasi waktu 120 menit dibandingkan dengan standar, baik pada suhu refrigerator maupun suhu ruang menunjukkan  $p > 0,05$  yang berarti tidak terdapat perbedaan yang berarti.

## PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk melihat adanya perbedaan pada titer sekretor dari sampel bercak saliva puntung rokok dengan variasi suhu inkubasi (suhu refrigerator dan suhu kamar) dan waktu inkubasi (15 menit dan 120 menit dengan standar 1080 menit). Dilakukan penelitian dengan pengulangan sebanyak 6 sampel menggunakan metode aglutinasi inhibisi. Berdasarkan penelitian yang

telah dilakukan, didapatkan titer mulai dari 1/4 sampai dengan 1/16.

Pada uji statistika Friedman terhadap suhu inkubasi dihasilkan sig > 0,05, yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Sedangkan pada uji Friedman terhadap waktu inkubasi, dihasilkan sig < 0,05 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Untuk mengetahui secara spesifik variabel mana yang memiliki perbedaan, dilakukan uji Wilcoxon.

Pada uji Wilcoxon, dibandingkan titer pada waktu 1080 menit sebagai standar, dengan variasi waktu 15 menit dan 120 menit. Pada variasi 15 menit terhadap standar, didapatkan nilai sig < 0,05 yang berarti terdapat perbedaan waktu yang signifikan. Sedangkan pada variasi 120 menit terhadap standar didapatkan nilai sig < 0,05 yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Pemeriksaan sekretor golongan darah menggunakan metode aglutinasi inhibisi terdiri dari beberapa tahapan. Pertama adalah tahapan pengolahan sampel, pengenceran sampel, inkubasi, penambahan eritrosit, inkubasi eritrosit, dan pembacaan hasil. Setelah tahap pengolahan sampel dan pengenceran, sampel dilaksanakan, sampel kemudian diinkubasi bersama reagen antibodi sesuai dengan golongan darah subjek (anti-A atau anti-B)<sup>8</sup>. Proses inkubasi ini diperlukan untuk meningkatkan reaksi antigen antibodi<sup>9</sup>.

Suhu dan durasi inkubasi merupakan faktor yang dapat mempengaruhi reaksi antigen-antibodi<sup>10</sup>. Pada penentuan sekretor golongan darah dengan sampel saliva, waktu inkubasi yang dibutuhkan adalah selama 15 menit<sup>11</sup> namun berbeda halnya dengan antigen dari sampel saliva langsung, antigen pada penelitian ini adalah bercak saliva, hal inilah yang menyebabkan antigen dalam sampel hanya sedikit dan perlu waktu lebih untuk bereaksi dengan antibodi. Karena itu, titer antigen yang dihasilkan pada waktu inkubasi 15 menit cenderung



lebih rendah daripada waktu inkubasi 120 menit dan standar 1080 menit.

Oligosakarida yang membawa antigen ABH melekat pada glikoprotein yang merupakan bagian dari membrane sel darah merah yang juga disekresikan pada cairan tubuh seperti saliva pada individu sekretor<sup>12</sup>. Pada penelitian Aliviameita et al., kadar protein pada bercak saliva dari *bitemark* buah, protein yang terkandung hanya sekitar 0.603 mg/mL – 1.127 mg/mL<sup>13</sup>. Sedangkan pada penelitian Bhuptani et al., konsentrasi dari total protein pada saliva remaja hingga dewasa adalah sebesar 2.71 – 3.25 mg/dL<sup>14</sup>. Hal tersebut membuktikan bahwa kadar total protein pada bercak saliva lebih sedikit dibandingkan dengan total protein pada saliva.

Pada hasil pemeriksaan, titer paling tinggi ada pada variasi waktu standar 1080 menit di suhu refrigerator. Hal ini didukung oleh pernyataan Sadikin dkk., bahwa absorpsi antigen ABO memerlukan waktu semalaman pada temperature yang dingin<sup>15</sup>.

Tidak ada perbedaan yang berarti pada pemeriksaan dengan suhu inkubasi refrigerator (2°C - 8°C) dan suhu kamar (20°C - 25°C). Hal ini dikarenakan anti-A dan anti-B termasuk ke dalam kelompok antibodi tipe 'dingin' yang memiliki suhu optimum di bawah 37°C derajat<sup>16</sup>, dan kedua variasi suhu inkubasi yang dilakukan dalam penelitian masuk ke dalam rentang suhu optimum antibodi dingin.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, titer hasil pemeriksaan sekretor pada bercak saliva puntung rokok pada waktu inkubasi 15 menit pada suhu refrigerator dan suhu ruang adalah 1/4 – 1/8. Titer pada waktu inkubasi 120 menit pada suhu refrigerator adalah 1/8 (konstan). Sedangkan pada suhu kamar titer yang dihasilkan adalah 1/4 – 1/8.

Tidak ada perbedaan yang signifikan antara hasil pemeriksaan antara suhu refrigerator dan suhu ruang.

Terdapat perbedaan titer sekretor bercak saliva antara waktu inkubasi 15 menit dibandingkan dengan standar, namun tidak ada perbedaan yang signifikan antara hasil pemeriksaan dengan waktu inkubasi 120 menit dibandingkan dengan standar.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Masse I. Optimalisasi Waktu Dan Suhu Inkubasi Pada Pemeriksaan Golongan Darah Metode Absorpsi-Elusi. *J Forensic Expert.* 2022;2(1):29-37. doi:10.54579/jfe.v2i1.18
2. Nurdianto AR, Setiawan F, Anwari F, Tena HA, Nurdianto RF. *Buku Ajar Immunologi Forensik Dan Imunohematologi.* Nizamia Learning Center; 2021. <https://books.google.co.id/books?id=imRhEAAAQBAJ>
3. Thrumiaya T, Gayathri R, Vishnu Priya V. Efficacy and accuracy of ABO blood group determination from saliva. *J Adv Pharm Educ Res.* 2017;7(2):101-103.
4. Rogers D, McBride BM. *Clinical Forensic Medicine.*; 2011. doi:10.1007/978-1-61779-258-8
5. Armstrong B. Antigen-antibody reactions. *ISBT Sci Ser.* 2008;3(2):21-32. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1751-2824.2008.00185.x>
6. Harmening D. *Antigen-Antibody Characteristic Chart\**; 2019.
7. Fitri A, Oktaviana. B, Warsa. K, Sunarti. RN, Amalia RAHT, Rezakola E. Penentuan Substansi Golongan Darah Pada Rambut, Darah Kering Dan Saliva Dengan Metode Absorpsi- Elusi Dan Absorpsi-Inhibisi. *Pros Semin Nas Sains dan Teknol Terap.* 2019;2(3):1-11.
8. Ruth MSMA, Purnadianti M, Marini MI. Blood group analysis from cigarette butts by absorption inhibition method: An experimental study. *J Int Oral Heal.* 2020;12(3):275-279. doi:10.4103/JIOH.JIOH\_219\_19

9. Shahshahani HJ, Hayati A. Blood Group Discrepancies at a Regional Blood Center. *Int J Hematol Stem Cell Res.* 2020;1:38-44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167605/>
10. Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus.* 2007;5(4):227-240. doi:10.2450/2007.0047-07
11. Ad'hiah A, Ali E, Iqbal M, ALganabi A. *Secretor Status of ABH Blood Group Antigens in a Sample of Iraqi Oral Cancer Patients.*; 2018.
12. Pourazar A. Red cell antigens: Structure and function. *Asian J Transfus Sci.* 2007;1(1):24-32. doi:10.4103/0973-6247.28069
13. Aliviameita A, MAR MS, Yudianto A. Forensic Identification of Blood Types in Pear (*Pyrus bretschneideri*) Fruit Bitemark. *Folia Medica Indones.* 2018;54(4):269. doi:10.20473/fmi.v54i4.10710
14. Bhuptani D, Kumar S, Vats M, Sagav R. Age and gender related changes of salivary total protein levels for forensic application. *J Forensic Odontostomatol.* 2018;36(1):26-33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6195944/>
15. Sadikin A, Moenadjat Y, Hardiany N. ELISA Method to Detect ABO Blood Group in External Secretion Fluids. *Acta Biochem Indones.* 2019;2:32-38.
16. To M, Villantoro V. *A Laboratory Guide to Clinical Hematology (e-Book)*. University of Alberta; 2019. <https://openeducationalberta.ca/mlsci/>