

1. IMMUNOGLOBULINS

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

2. DENGUE VIRUS

KK

T103/01

Bumi

P

TESIS

PROFIL RESPON PRIMER IMUNOGLOBULIN G DAN IMUNOGLOBULIN M PADA MENCIT SETELAH IMUNISASI PROTEIN E VIRUS DENGUE

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



CANDRA BUMI
NIM. 099813094

PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2001

TESIS

**PROFIL RESPON PRIMER IMUNOGLOBULIN G DAN
IMUNOGLOBULIN M PADA MENCIT SETELAH IMUNISASI
PROTEIN E VIRUS DENGUE**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



CANDRA BUMI
NIM. 099813094

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

**PROFIL RESPON PRIMER IMUNOGLOBULIN G DAN
IMUNOGLOBULIN M PADA MENCIT SETELAH IMUNISASI
PROTEIN E VIRUS DENGUE**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK

TESIS

Untuk memperoleh Gelar magister
dalam Program Studi Immunologi
pada Program Pasca Sarjana Univeritas Airlangga

Oleh :

CANDRA BUMI
NIM. 099813094

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal,

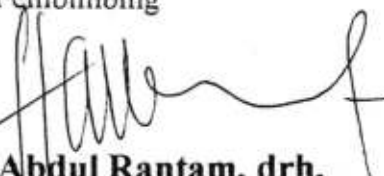
**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL,**

Oleh
Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Soegeng Soegijanto, SpAK, dr.
NIP. 140 047 022

Pembimbing



Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
NIP 131 653 434

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Imunologi
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga



Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
NIP 131 653 434

Telah diuji pada

Tanggal, 19 Februari 2001

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, MSc, dr.

Anggota : Prof. Dr. Soegeng Soegijanto, SpAK, dr.

Prof. Dr. I Putu Gde Konthen, SpPD, dr.

Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.

Dr. Made Mertaniasih, MSc, dr.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah S.W.T. Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Kepada Prof. Dr. Soegeng Soegijanto, SpAK, dr. sebagai Pembimbing Ketua saya menyampaikan terima kasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya yang dengan perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran hingga terselesainya tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang tinggi kepada Dr. Fedik Abdul Rantam, drh, sebagai Ketua Program Studi Imunologi yang dari awal hingga akhir pendidikan telah memberikan bimbingan belajar penelitian dan kesempatan, yang baik untuk menyelesaikan studi saya, termasuk tesis ini.

Saya sampaikan pula terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Abdul Kadir yang telah memberikan bantuan finansial selama masa studi sehingga meringankan beban selama menyelesaikan Program Magister.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya menyampaikan terima kasih juga kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof. H. Soedarto, dr., DTMH., PhD. Atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama Program Magister. Rektor dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti program Magister. Saya sampaikan pula terima kasih kepada Direktur TDC Unair Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, MSc, dr., atas ijin untuk menggunakan fasilitas serta peralatan di Lab. DHF TDC Unair menyelesaikan penelitian. Helen sebagai teknisi di Lab. DHF dan Tissue culture yang telah banyak membantu di TDC Unair dan kepada rekan-rekan Imunologi Iwan, Iwang, Ratna, Hasdiana saya sampaikan terima kasih atas kerja samanya sehingga dapat menyelesaikan program magister.

Saya sampaikan pula terima kasih sebesar-besarnya kepada segenap Tim Penguji yang telah memberikan informasi, kritik dan saran demi perbaikan kualitas tesis ini.

Saya sampaikan terima kasih kepada kedua orang tua yang telah memberikan dorongan moril dan doa restunya demi terselesaikannya tesis ini, dr. Singgih atas pinjaman bukunya, juga kepada Heni Fatmawati atas dorongan semangatnya.

RINGKASAN

**PROFIL RESPON PRIMER IMUNOGLOBULIN G DAN
IMUNOGLOBULIN M PADA MENCIT SETELAH IMUNISASI
PROTEIN E VIRUS DENGUE**

Virus Dengue (DEN) adalah tergolong virus RNA anggota dari genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, sangat patogen pada manusia yang cepat menyebar melalui gigitan nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* terutama di negara tropis termasuk Indonesia. Lebih dari 100 negara di dunia ini memiliki resiko serius terhadap infeksi virus dengue, dimana minimal 20 juta per tahun manusia terinfeksi virus dengue.

Usaha yang dilakukan untuk menanggulangi hal ini telah dilakukan tetapi mengalami kegagalan. Sampai sekarang belum ditemukan vaksin yang bersifat tetravalen yang dapat melindungi dari keempat strain virus penyebab penyakit ini. Protein E merupakan salah satu protein virus dengue yang dapat mengikat reseptor pada sel monosit sehingga akan merangsang sel B menghasilkan antibodi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya antibodi dan profil antibodi M dan antibodi G setelah imunisasi fraksi protein E virus dengue pada mencit. Disamping itu, juga untuk mengetahui respon imunseluler pada mencit yang diinduksi protein E virus dengue. Dengan diketahui hal tersebut maka protein E dapat digunakan sebagai bahan pembuatan vaksin sub unit.

Telah dilakukan penelitian terhadap 40 ekor mencit (*mus musculus*) strain BALB/c yang terbagi dalam tiga kelompok, terdiri dari 5 ekor mencit yang di beri PBS sebagai kontrol, 15 ekor mencit yang diberi fraksi protein E dengan dosis 500 mg/ekor, dan 15 ekor mencit yang diberi fraksi protein E dengan dosis 1 gr/ekor. Selanjutnya serum mencit di ambil pada hari ke 4, 7, 10, 15, 22, dan 30 kemudian di analisa dengan ELISA untuk mengukur kadar imunoglobulin yang terbentuk. Pada hari ke 5 darah mencit di ambil untuk pemeriksaan *flowcytometri*.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,005$) kadar imunoglobulin antara IgM dan IgG, juga antara IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b baik pada dosis 500 mg/ekor atau pada dosis 1 gr/ekor. Terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,005$) kadar imunoglobulin antara dosis 500 mg/ekor dengan dosis 1 gr/ekor kecuali pada IgM. Pada imunitas seluler mencit terdapat kenaikan CD4 sebesar 3,7% dan CD8 4,1%.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	vii
Abstrak	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Virus Dengue	8
2.1.1 Klasifikasi Virus Dengue	9
2.1.2 Morfologi Virus Dengue	10
2.1.3 Biologi Virus Dengue	12
2.2 Patofisiologi dan Patogenesis DBD/DSS	15
2.2.1 Patofisiologi DBD dan DSS	15
2.2.2 Patogenesis DBD dan DSS	18
2.3 Respon Imun Infeksi Virus Dengue	24
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	27
3.1 Kerangka Konseptual	27
3.2 Hipotesa Penelitian	28
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	29
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	29
4.2 Materi Penelitian	29
4.2.1 Hewan Percobaan	29
4.2.2 Fraksi Protein E Virus Dengue	29
4.3 Bahan dan Alat Penelitian	30
4.3.1 Bahan Penelitian	30
4.3.2 Alat Penelitian	30
4.4 Karakterisasi Protein E	30
4.4.1 SDS-PAGE	30
4.4.2 Semidry Blotting	31
4.5 Isolasi dan Purifikasi Protein E Virus Dengue	32
4.6 Perlakuan pada Hewan Percobaan	33

4.7 Pengukuran Kadar Immunoglobulin	33
4.7.1 ELISA IgM	33
4.7.2 ELISA IgG	34
4.8 Flowcytometer	34
4.9 Identifikasi Variabel	35
4.9.1 Variabel Bebas	35
4.9.2 Variabel Tergantung	35
4.9.3 Variabel Kendali	35
4.10 Definisi Operasional Variabel	35
4.11 Rancangan Penelitian	36
4.12 Analisa Data	36
BAB 5 HASIL PENELITIAN	37
5.1 Karakterisasi Protein Immunogen	37
5.2 Purifikasi Protein E Spesifik	38
5.3 Kadar Immunoglobulin	39
5.3.1 Kadar Immunoglobulin dengan Dosis Fraksi Protein E 500 mg	39
5.3.2 Kadar Immunoglobulin dengan Dosis Fraksi Protein E 1 gram	41
5.3.3 Perbandingan Kadar Immunoglobulin antara Pemberian Fraksi Protein E Dosis 500 mg dengan dosis 1 gram ..	42
5.4 Respon Imunitas Seluler	46
BAB 6 PEMBAHASAN	47
6.1 Karakterisasi dan Isolasi Protein E	47
6.2 Kadar Immunoglobulin	47
6.3 Respon Imunitas Seluler	50
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	52
7.1 Kesimpulan	52
7.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	59

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Morfologi Virus Dengue	11
Gambar 5.1 : Analisis Protein Virus Dengue dengan SDS-PAGE	37
Gambar 5.2 : Analisis Protein E dengan Western Blott	38
Gambar 5.3 : Hasil Pengamatan Fraksi Protein E dari Elusi dengan Metode SDS-PAGE	39
Gambar 5.4 : Grafik Kadar Immunoglobulin Setelah Imunisasi Fraksi Protein E dengan Dosis 500 mg/ekor	40
Gambar 5.5 : Grafik Kadar Immunoglobulin Setelah Imunisasi Fraksi Protein E dengan Dosis 1 gr/ekor	41
Gambar 5.6 : Grafik Kadar IgM dengan Imunisasi Fraksi Protein E Dosis 500 mg dan Dosis 1 gram	43
Gambar 5.7 : Grafik Kadar IgG1 dengan Imunisasi Fraksi Protein E Dosis 500 mg dan Dosis 1 gram	44
Gambar 5.8 : Grafik Kadar IgG dengan Imunisasi Fraksi Protein E Dosis 500 mg dan Dosis 1 gram	44
Gambar 5.9 : Grafik Kadar Ig2a dengan Imunisasi Fraksi Protein E Dosis 500 mg dan Dosis 1 gram	45
Gambar 5.10 : Grafik Kadar Ig2b dengan Imunisasi Fraksi Protein E Dosis 500 mg dan Dosis 1 gram	45
Gambar 5.11 : Respon CD4 pada Mencit Terhadap induksi Protein E	46
Gambar 5.12 : Respon CD8 pada Mencit Terhadap induksi Protein E	46

DAFTAR SINGKATAN

Ab	: Antibodi
Ag	: Antigen
APS	: Amonium Peroxodisulfat
ADE	: Antibody Dependent Enhancement
BSA	: Bovine Saline Albumin
CD	: Cluster of Differentiation
CPE	: Cytopathogenic Effect
DBD	: Demam Berdarah Dengue
DEN	: Dengue
DF	: Dengue Fever
DSS	: Dengue Shock Syndrome
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorben Assay
FITC	: Fluorescence Isothiocyanat
HCL	: Hidroklorida
HLA	: Human Leucocyte Antigen
HMAF	: High Mice Antibody Fluid
IFN	: Interferon
Ig	: Immunoglobulin
JE	: Japanese Encephalitis
kb	: kilo base
kDa	: kilo dalton
LPB	: Limfosit Plasma Biru
OPD	: Ortho Phenyl Diphospat
ORF	: Open Reading Frame
PAF	: Platelet Activating Factor
PBS	: Phospat Buffer Saline
PBS-T	: Phospor Buffer Saline Tween
p-NPP	: para-Nitrophenyl Phosphate
PNM	: Pure Nitrocellulose Membrane
RNA	: Ribo Nucleic Acid
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Elektrophoresa
TBE	: Tick Borne Encephalitis
Temed	: N, N, N, N- Tetra Methyendiamine
TNF	: Tumor Necrotizing Factor
WHO	: World Health Organization

BAB 1

PENDAHULUAN

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1.1 Latar Belakang Penelitian

Di banyak negara tropis infeksi virus dengue merupakan masalah yang serius dan dapat bermanifestasi klinik yang berat seperti demam berdarah dengue (DBD) dan *dengue shock syndrome* (DSS) (Anderson et al. 1997). Di seluruh dunia telah dilaporkan 30.000 anak meninggal karena DBD/DSS dan di Asia tenggara pada tahun 1987 sampai dengan 1989 lebih dari satu juta anak terkena DBD/DSS (Lanciotti et al. 1992).

Di Indonesia penyakit DBD cenderung semakin luas penyebarannya sejalan dengan meningkatnya mobilitas dan kepadatan penduduk. Di Indonesia pada tahun 1991 dilaporkan meninggal karena DBD sebanyak 21.120. Penyakit DBD telah tersebar keseluruh wilayah Indonesia terutama ke pulau Jawa, Bali dan sebagian Kalimantan (Suroso, 1992).

Kasus DBD di Surabaya tercatat pertama kali pada tahun 1968 dengan penderita 58 dan 24 meninggal. Dari tahun 1974 sampai dengan 1996 kasus DBD di Surabaya meningkat secara dramatis dari 27 kasus tahun 1975 dengan rata-rata insiden 1,3/100.000 penduduk menjadi 1680 kasus pada 1996 dengan rata-rata insiden 59,9/100.000 penduduk (Lawuyan, 1997).

Upaya pencegahan penyakit DBD telah dilakukan melalui beberapa pendekatan yaitu kebijakan, strategi dan kegiatan. Sejak tahun 1992 telah dikeluarkan kebijakan untuk melakukan kontrol terhadap larva *Aedes aegypti*

melalui partisipasi masyarakat. *Fogging* dilakukan dengan radius 100 meter dari kasus DBD. Kemudian strategi dan kegiatan yang dilakukan adalah pencegahan dan mengontrol DBD melalui pelaksanaan bulan bakti tiga M (menguras, menutup dan mengubur benda yang dapat menjadi sarang nyamuk) (Kuntarjanto, 1998).

Bila ditemukan kasus DBD tambahan atau kasus panas yang tak diketahui sebabnya dan larva *A. aegypti* juga ditemukan maka dilakukan *fogging* sebanyak dua kali dengan interval satu minggu, penyuluhan kesehatan untuk masyarakat, monitoring larva yang teratur, kontrol larva oleh organisasi masyarakat, koordinasi intersektoral (Suroso, 1992).

Upaya tersebut mengalami kegagalan dan kematian akibat penyakit DBD masih saja terjadi. Kegagalan tersebut disebabkan oleh empat keterlambatan sehingga terjadi kematian karena penyakit DBD. Keterlambatan tersebut yaitu: terlambat mengetahui gejala penyakit DBD oleh masyarakat, terlambat merujuk ke sarana kesehatan, terlambat mendiagnosa oleh petugas kesehatan, dan terlambat menangani oleh petugas kesehatan (Kuntarjanto, 1998).

Sebagai tindakan preventif penyakit DBD sampai saat ini hanya ditujukan pada vektornya dan *breeding place* dari vektor. Selama ini hasilnya kurang memuaskan dengan bukti terjadinya wabah yang berulang-ulang. Untuk itu diperlukan upaya lain dalam menanggulangi penyakit DBD yaitu melalui vaksinasi (Soegijanto, 1997). Tetapi masalahnya sekarang adalah virus dengue secara serologis mempunyai empat strain yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4. Virus dengue sangat patogen dan mempunyai reaksi silang yang kuat satu sama

lain dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi (Pardue and Ward, 1999).

Sampai saat ini tidak ada terapi yang spesifik untuk berbagai macam patogenik virus dengue dan masih sangat sedikit vaksin yang dapat di gunakan antara lain: vaksin monovalen dan polivalen dari virus dengue yang dilemahkan, rekombinan vaksin polivalen atau sub unit dari protein E, protein prM, protein non struktural 1 (NS1) dan NS3. Berkaitan dengan fungsi protein E pada infeksi virus dalam sel, dan kemampuan stimulasi antibodi melalui sifat antigenik asam amino, maka protein E mempunyai arti penting pada reaksi imun. Protein E dapat menginduksi respon antibodi pada mencit, dan secara laboratorik protein E pada membran nitroselulosa dapat bereaksi dengan antibodi poliklonal dan monoklonal dan menunjukkan, bahwa protein E mempunyai tingkat reaktivitas yang tinggi terhadap antibodi (Rantam 1999). Protein E merupakan protein asam amino 494 dapat menginduksi antibodi yang protektif untuk empat serotipe sehingga dapat mencegah resiko DBD. Vaksin yang dibuat tergantung pada imunitas vaksin untuk mengikat subsekuen heterotipik infeksi dengue (Rantam 1998). Hal ini mengakibatkan vaksin dengue seharusnya menginduksi antibodi jangka lama dan menghasilkan tipe antibodi tetravalen yang spesifik. Hubungan antara protein E dan protein prM ditunjukkan oleh *mapping* peptida dua dimensi yang merupakan peptida identik dan dapat terjadi *overlapping*. Hal ini menyebabkan terjadi reaksi silang. Sehingga protein E dapat menginduksi menghasilkan antibodi yang tipe tetravalen dan diharapkan berjangka lama (Rantam et al. 1999).

Usaha untuk menciptakan vaksin sudah pernah di coba di beberapa pusat penelitian penyakit tropis baik vaksin aktif maupun vaksin pasif, tetapi masih belum bisa melindungi dari serangan virus ini. Di Thailand telah mengembangkan vaksin dari virus yang utuh dari salah satu strain, sehingga antibodi yang dibentuk tidak spesifik dan dapat memacu terjadinya demam berdarah dengue dan hanya mengenai salah satu strain (Sittisombut, 1994).

Bhamarapravati (2000) telah mengembangkan vaksin dengue tetravalen dari virus dengue. Lebih dari 12 tahun vaksin tersebut telah dikembangkan dan diuji cobakan sebagai kandidat vaksin di Universitas Mahidol Thailand.

Di Jepang selama empat dekade menggunakan model virus *Japanese encephalitis* untuk mempelajari virus dengue. Di Rusia menggunakan model virus *chimeric* yang mirip dengan virus dengue dan sesuai dengan mencit, untuk mempelajari virus dengue. Hal ini disebabkan belum ada hewan percobaan yang benar-benar cocok untuk pembiakan virus dengue yang respon imunnya sesuai dengan manusia (Rice, 1996).

Telah dikembangkan produksi rekombinan protein virus untuk membuat rekombinan partikel subviral. Vaksin yang mengkode protein prM dan E diimunisasikan ke sel *HeLa*, sehingga diproduksi protein prM dan E yang tertanam di dalam membran sel *HeLa*. Protein yang di hasilkan ini merupakan imunogenik kuat ketika diimunisasikan ke mencit. Vaksin DNA juga telah dikembangkan untuk mengatasi virus dengue. Vaksin terdiri dari gen protein prM dan protein E. Cara ini dapat menghilangkan respon imun yang tidak diperlukan (Konishi et al, 1999).

Penggunaan antibodi monoklonal anti NS1 secara pasif mencegah virus dengue pada mencit sedangkan mencit yang telah diimunisasi dengan antibodi anti NS3 mempunyai daya tahan hidup yang lebih lama terhadap virus dengue dengan dosis mematikan (Beasley, 1994).

Sekarang ada dua strategi untuk membuat vaksin yaitu rekombinan polivalen dari virus dengue atau vaksin sub unit. Untuk rekombinan polivalen virus dengan cara memproduksi partikel virus atau protein yang dipadukan, sedangkan untuk vaksin sub unit dengan cara memproduksi rekombinan berbagai epitop dari polipeptida virus (Beasley, 1994).

Pemurnian protein E dari virion DEN 2 merangsang pembentukan antibodi netralisasi dan sebagian dapat mencegah kematian intraserebral. Penentuan antigenik determinan pada protein E adalah penting sekali tidak hanya mengerti bagaimana antibodi berhubungan dengan virus dengue tetapi juga untuk membuat vaksin sub unit. Protein E mempunyai tiga antigenik domain dan yang dapat menimbulkan antibodi netralisasi yaitu pada domain III (Sittisombut, 1994).

Identifikasi dan karakterisasi imunoglobulin terhadap protein E diharapkan dapat menunjukkan kemampuan protein E dalam menginduksi sistem imun untuk menghasilkan antibodi, sehingga dapat diketahui profil imunoglobulin yang diproduksi oleh sistem imun.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian, maka dapat diambil suatu rumusan masalah, yaitu:

- 1.2.1 Apakah fraksi protein E virus dengue dapat menginduksi imunoglobulin M dan G pada mencit.
- 1.2.2 Macam apakah sub tipe imunoglobulin yang diinduksi oleh fraksi protein E virus dengue pada mencit.
- 1.2.3 Apakah fraksi protein E virus dengue dapat menginduksi respon seluler pada mencit.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk pembuatan vaksin sub unit dari fraksi protein E virus dengue dari virion yang diisolasi dari virus dengue isolat lokal yang dapat mengenali ke empat strain.

1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini mempunyai tujuan khusus untuk:

- 1.3.2.1 Menemukan profil imunoglobulin dan sub tipe imunoglobulin setelah diimunisasi fraksi protein E virus dengue pada mencit.
- 1.3.2.2 Mengetahui macam sub tipe imunoglobulin yang diinduksi oleh fraksi protein E virus dengue pada mencit.
- 1.3.2.3 Mengetahui respon seluler yang diinduksi fraksi protein E virus dengue pada mencit

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh pada penelitian ini adalah: memberikan informasi ilmiah tentang profil imunoglobulin dan imunitas seluler setelah diinduksi protein E, sehingga lebih lanjut dapat dilakukan penelitian biomolekuler untuk model pembuatan vaksin sub unit virus dengue tetra valen yang mengenali keempat strain.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus Dengue

Virus dengue pertama kali di laporkan pada akhir tahun 1770 di daerah Afrika, Asia, Amerika Utara dan secara epidemik DBD di Asia Tenggara dilaporkan pertama kali pada tahun 1950 (Pardue and Ward, 1999).

Virus Dengue adalah virus yang infeksius terhadap manusia, virus ini menyebar didaerah tropis dan sub tropis. Virus dengue masuk ke dalam tubuh manusia melalui gigitan nyamuk, yang bertindak sebagai vektor adalah nyamuk *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes scutellaris*, dan *Aedes polynesiensis*. Vektor yang utama adalah *Ae. aegypti* (Superintendent, 1999). Virus yang terhisap nyamuk akan mengadakan replikasi di dalam tubuh nyamuk selama 7-14 hari (periode inkubasi ekstrinsik) sebelum dapat ditularkan kepada manusia. Setelah masuk virus berkembang biak di dalam sel retikuloendotelial dan setelah tujuh hari terjadi viremia yang diikuti tanggap kebal terhadap virus dengue baik humoral atau seluler (Soewondo, 1998).

Kasus dengue di Indonesia sebenarnya sudah dikenal sejak abad ke 18 di Batavia oleh Bylon pada tahun 1779. Setelah itu ditemukan di Surabaya dan Jakarta pada tahun 1968. Kejadian pertama di Surabaya dimana jumlah penderita pada waktu itu 58 orang dan yang meninggal 24 orang (CFR 41,3%). Semenjak itu kasus dengue pada tahun-tahun berikutnya jumlah penderita terus meningkat dan menyebar ke seluruh propinsi di Indonesia. Hal ini terbukti dengan kejadian

yang luar biasa dan mencapai puncaknya pada tahun 1973 dengan jumlah kasus 10.189 dan selanjutnya jumlah kasus menurun sampai pada tahun 1982 kemudian meningkat lagi pada tahun 1983 dan mencapai puncaknya pada tahun 1988 dengan jumlah kasus 47.573. Setelah itu kasus dengue menurun walaupun angka kesakitan masih cukup tinggi. Tetapi pada tahun 1998 kasus dengue kembali meledak dengan jumlah kasus relatif besar dibanding dengan 5 tahun sebelumnya (Suroso, 1992).

2.1.1 Klasifikasi Virus Dengue

Virus dengue merupakan anggota famili *Flaviviridae* dan genus *Flavivirus*. *Flavivirus* termasuk di dalamnya terdapat lebih dari 68 anggota yang dipisah ke dalam grup berdasarkan perbedaan dan persamaan serologis. Yang terakhir didasarkan pada perbandingan sekuensi genom *Flavivirus* (McBride et al. 1997). Pada umumnya *Flavivirus* termasuk *arthropod-borne disease* yaitu ditularkan melalui vektor nyamuk dan kutu. Ditemukan juga isolasi dari kelelawar dan hewan pengerat tanpa diketahui vektornya. *Flavivirus* menyebabkan penyakit pada hewan dan manusia yang khas dan tersebar di seluruh dunia. Berbagai macam gejala klinis termasuk demam, ensefalitis, dan demam berdarah. Masalah yang mendapat perhatian dunia selain demam dengue yang dapat menjadi DBD/DSS, juga *Japanese encephalitis (JE)*, *Yellow fever(YF)*, *Tick borne encephalitis(TBE)*, *Kyasanur Forest disease*, *West Nile encephalitis(WN)*, *St. Louis encephalitis(SLE)*, dan *Murray Valley encephalitis (MVE)*. Sejauh ini vaksinasi yang sudah dapat digunakan untuk YF menggunakan strain 17D yang

dilemahkan dan untuk TBE dan JE menggunakan virus yang di inaktivasi. Famili *Flaviviridae* selain beranggotakan *Flavivirus* juga terdiri dari genus *Pestivirus* dan virus Hepatitis C (Rice, 1996).

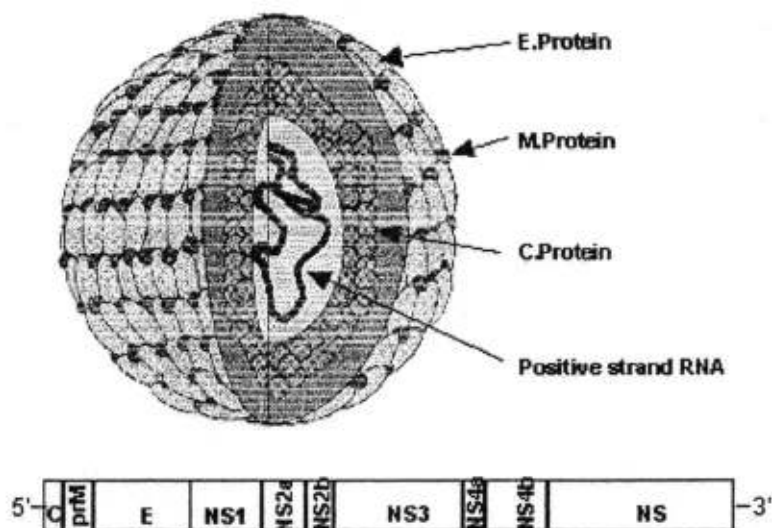
2.1.2 Morfologi virus dengue

Flavivirus berbentuk sferis dengan ukuran diameter 40-60 nm. Nukleokapsid berbentuk sferis dengan diameter 30 nm dan dikelilingi oleh lipid bilayer (Rice, 1996). Komposisi virionnya terdiri dari 6% RNA, 66% protein, 9% karbohidrat dan 17% lipid. Protein envelope (E), dan M (membran) adalah tipe protein membran yang menempel dalam lapisan lipid pada hidrofobik c-terminal. Virion yang dikeluarkan mengandung sejumlah M prekursor (prM) (Teo and Wright, 1997).

Komposisi nukleokapsid adalah protein kapsid (C-protein) dan genomik dengan densitas 1,30-1,31 g/ml, bahan-bahan ini dapat diisolasi setelah envelopenya disolubilisasi dengan deterjen non ionik. Partikel virus yang imatur mengandung prM dan sedikit infeksius daripada virion (Kitayapon, 1994).

Secara antigenik terdapat 4 serotipe dari virus dengue: DEN1, DEN2, DEN3, dan DEN4 (Despress et al. 1993). DEN1 adalah serotipe yang tersering terisolasi dari 1982 sampai 1995 (47%) dari semua isolat kemudian diikuti oleh DEN4 (30%), DEN2 (20%) dan DEN3 hanya 19 penderita dengan DF tanpa DBD (Garcia et al 1996). DEN1 adalah serotipe yang sering mengakibatkan DBD berat di Indonesia (Sutaryo et al, 1997). Serotipe ini juga bervariasi dalam virulensinya. Keempat serotipe hampir tak dapat dibedakan dalam gejala klinik dan gejala

patologi yang disebabkan olehnya, tetapi dapat dibedakan dengan tes netralisasi menggunakan antibodi monoklonal dan *polymerase chain reaction* (PCR).



Gambar 2.1 Morfologi virus dengue

Dengue mempunyai 10,5 kb genom viral panjang terdiri dari ssRNA + yang diorganisasi didalam *single open reading frame* (ORF) dengan gen yang mengkode protein struktural C, prM, dan E dan protein non struktural NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5. Tak ada hubungan antara berat ringannya DBD dengan non struktural protein (Kitayapon, 1994). Genom virus tertutup didalam kapsid virus terdiri dari protein *core* (C) single 12-14 kDa. Envelope virus terdiri dari 50-55 kDa protein E dan 8 kDa protein membran (M), sebagian 19-23 kDa prekursor M yang melingkupi kapsid virus. Protein struktural dan non struktural yang disebutkan di atas diidentifikasi dengan celah proteolitik dari poliprotein yang dikode oleh ORF. Protein struktural dikode oleh 5' sepertiga dari ORF dan sisanya mengkode protein nonstruktural.

Protein E adalah protein envelope utama dari virion. Protein ini diyakini memegang peranan penting dalam sejumlah proses penting termasuk perangkaian virion, ikatan reseptor, dan penggabungan membran, dan target utama untuk antibodi netralisasi (Rice, 1996).

Protein prM adalah prekursor glikosilasi dari protein struktur M. PrM pecah ke bentuk protein M dan N-terminal segmen yang disekresi ke dalam medium ekstraseluler. Sebaliknya pemecahan ini terjadi secara singkat sebelum atau bersamaan dengan pelepasan virion karena prM dan M ditemukan pada virion intraseluler dan ekstraseluler. Antibodi terhadap prM dapat membuat imunitas yang protektif mungkin oleh netralisasi dari pelepasan virion yang berisi beberapa prM yang tak pecah (Sittisombut, 1994). Protein M bukan merupakan glikosilasi (Hanel et al, 1990).

Protein C adalah kecil kira-kira 11 kd masih lebih besar protein yang membentuk komponen dari nukleokapsid (Sittisombut, 1994).

2.1.3 Biologi Virus Dengue

Virus dengue menyerang permukaan sel host melalui reseptor sel yang dapat terinfeksi. Virus mungkin masuk ke dalam sel melalui fusi membran atau dengan invaginasi dan pembentukan vesikel endositik (Hanel et al, 1990). Hal ini dipengaruhi dari host-range virus dan tropisme jaringan, dan keadaan molekul permukaan sel yang diidentifikasi sebagai reseptor virus. Protein E virus dengue (protein asam amino 494 dengan dua daerah glikosilasi) adalah protein penyerang. Protein E mempunyai epitop netralisasi multiple yang terlibat dalam



penggabungan pada membran virus dan dalam pengikatan virus pada molekul reseptor sel (Pardue and Ward, 1999). Protein permukaan pada monosit mempunyai beberapa glikoprotein dan glikosaminoglikan, telah menjadi perdebatan mempunyai peran sebagai virus reseptor dalam penelitian terdahulu. Bielefeldt-Ohmann menyatakan bahwa sejumlah ikatan virus dengue pada bermacam-macam permukaan sel membran pada tiap tipe sel, juga tidak jelas bagaimana molekul ikatan virus dengue yang berhubungan dengan sejumlah ikatan virus dengue (Rantam 1998).

Proses di atas yang berperan adalah protein E yang terjadi pada pH rendah karena dapat mendorong fusi virion dengan liposom membran atau plasma membran. Setelah virus berkembang cukup banyak virus dapat dijumpai pada aliran darah yang dikenal dengan viremia. Puncak konsentrasi virus dalam darah terjadi mulai dua hari sebelum panas dan dua hari pertama panas. Setelah itu virus dengan cepat berangsur-angsur turun.

Juga protein ikatan virus mempunyai afinitas yang berbeda untuk keempat serotipe virus dengue. Fisiologi pH, *E forms dimer* pada permukaan virion kemudian paparan terhadap pH di bawah 6,5, terjadi perpindahan konformasi yang mengakibatkan pengaturan kembali *E form* ke bentuk trimer, adalah peristiwa yang mengakibatkan penggabungan antara virion dan membran sel host. RNA dengue secara langsung dibaca oleh ribosom dari sel host, berfungsi seperti mRNA normal yang berada di dalam sel. Hal ini merangsang sel host untuk memperbanyak semua komponen virus melalui proses replikasi, transkripsi, dan translasi. Untuk membuat RNA virus baru, RNA virus membuat *anti sense*

sebagai cetakan. Virus baru yang terbentuk kemudian meninggalkan sel host dengan proses *budding*. Virus dengue mempunyai afinitas untuk sel monosit-makrofag, limfosit B, dan sumsum tulang manusia yang menyebabkan terjadinya panas tinggi, sakit perut, muntah, sakit kepala, dan kasus yang berat yaitu rendahnya hitung trombosit dan kolaps sirkulasi (Pardue and Ward, 1999).

Daya tarik awal penginfeksi virus dengue pada sel belum diketahui dengan jelas. Begitu juga spesifik reseptor seluler glikoprotein pada virion belum teridentifikasi. Mekanisme yang mungkin dapat diterima saat ini, bagaimana proses daya ikat dan proses awal infeksi virus dengue pada sel adalah tergantung adanya *antibody dependent enhancement* (ADE). Hal ini merupakan peranan penting proses DBD/DSS dari penginfeksi yang terus menerus oleh serotipe virus dengue yang berbeda, begitu juga pada bayi adanya maternal antibodi yang tinggi (Rantam, 1998).

Virus dengue dapat dibiakkan pada sel mamalia seperti *Baby Hamster Kidney* (BHK21 klon 13), sel ginjal kera (*Vero Cell*), *Avian cells*, sel artropoda, sel nyamuk *Ae. albopictus* (C6/36). Pada biakan sel virus dengue mempunyai sifat yang berbeda ada yang berakibat *cytopathogenic effect* (CPE) ada yang tidak. Terjadinya perbedaan CPE pada biakan sel sangat tergantung pada tipe sel. Pada sel vertebrata dapat terjadi CPE dan perubahan struktur termasuk vakuolisasi dan proliferasi membran intraseluler. Sedang pada sel nyamuk sering CPE tidak terlihat sehingga terjadi infeksi persisten. Walaupun pada umumnya penginfeksi virus pada sel bersifat sitosidal meskipun beberapa virus tidak menunjukkan CPE sehingga infeksinya bersifat khronis. Pada biakan sel artropoda

dapat menimbulkan terbentuknya CPE tetapi sebagian besar hanya terlihat adanya sel fusi dan syncitium (Rantam, 1998).

2.2 Patofisiologi dan Patogenesis DBD/DSS

Patofisiologi dan patogenesis DBD/DSS menjadi subyek yang utama dalam bidang penelitian dengue, dalam upaya untuk menjelaskan manifestasi klinis dengue yang sangat luas, dari ringan sampai berat. Tetapi penelitian yang sudah hampir satu abad belum dapat menerangkan mekanisme yang sesungguhnya tentang patofisiologi dan patogenesis DBD/DSS. Kesulitan peneliti salah satunya karena model binatang percobaan untuk menimbulkan gejala klinis yang benar-benar mirip DHF pada manusia belum ditemukan (Soewondo, 1998).

2.2.1 Patofisiologi DBD dan DSS

Infeksi dengan virus dengue dapat menimbulkan dua macam penyakit yaitu: demam dengue (DD) dan DBD. Yang membedakan antara ke dua penyakit tersebut adalah adanya peningkatan permeabilitas dinding pembuluh darah yang mengakibatkan kebocoran plasma ke daerah ekstrasvaskuler. Akibatnya akan terjadi menurunnya volume plasma intravaskuler dan menurunnya tekanan darah (hipotensi). Apabila terjadi kebocoran yang hebat dapat terjadi shock hipovolumik (DSS), yang apabila tidak diatasi dapat terjadi anoksia jaringan, asidosis metabolik, dan kematian (Soewondo, 1998).

Perubahan pokok patofisiologi yang terjadi pada DHF/DSS adalah pertama vaskulopati, ke dua trombopati, ke tiga koagulopati, ke empat perubahan imunitas

humoral dan seluler. Diperkirakan perubahan patofisiologi tersebut disebabkan oleh tidak hanya satu faktor tetapi disebabkan oleh multifaktorial. Vaskulopati ditandai dengan adanya kerapuhan pembuluh darah dan peningkatan permeabilitas kapiler. Kerapuhan pembuluh darah dibuktikan dengan uji *tuorniquet* atau *Rumpel Leede* atau uji Hess. Uji ini mungkin positif meskipun waktu perdarahan normal. Sehingga muncul pertanyaan mendasar terhadap kriteria WHO (1986) mengapa fenomena ini dipakai dalam lingkup kriteria manifestasi perdarahan yang minimal. Tes resistensi kapiler tersebut sebaiknya dipisahkan dari kriteria manifestasi perdarahan (Sutaryo, 1992).

Permeabilitas kapiler yang meningkat menyebabkan protein plasma dan cairan dari intravaskuler bocor ke ekstrasvaskuler. Hal tersebut terbukti dengan timbulnya hemokonsentrasi, efusi pleura, ascites, edema, hipoproteinemia terutama hipoalbuminemia. Sedangkan secara laboratoris proses kebocoran plasma tersebut dapat dibuktikan dengan percobaan "*131 labelled human albumin*" diduga peningkatan permeabilitas dinding pembuluh darah tersebut disebabkan oleh adanya bahan mediator farmakologis yang bekerja cepat yang mengakibatkan gangguan fungsional (Suwondo, 1998). Biopsi pada bercak merah dikulit menunjukkan adanya edema perivaskuler pada mikrovaskuler terminal di daerah papila kulit, dengan infiltrasi limfosit dan monosit. Di daerah ini dapat ditemukan antigen dengue, deposit komplemen, imunoglobulin dan fibrinogen pada dinding vasa. Pada fase awal timbul vaskulopati dan disfungsi trombosit, selanjutnya muncul trombositopeni. Fungsi trombosit yang terganggu berupa penurunan agregasi, kenaikan *platelet factor 4* (PF4) dan penurunan *beta*

tromboglobulin (BTG) disertai memendeknya umur trombosit. Mekanisme hipoagregasi trombosit belum jelas. Kemungkinan agregasi trombosit dihambat oleh adanya kompleks imun yang terdiri dari antigen virus dengue dengan antibodi anti dengue di dalam plasma atau dihambat oleh *fibrinogen degradation product* (FDP). Tetapi karena FDP tidak selalu ada, penjelasan melalui hambatan FDP tidak dapat dipertahankan. Boonpucknavig et al. (1979) menunjukkan adanya antigen dengue dan kompleks antibodi di permukaan trombosit. Apakah hal ini yang menyebabkan terjadinya hipoagregasi belum diketahui. Trombositopeni pada DBD dapat disebabkan karena adanya kompleks imun di permukaan trombosit. Kompleks imun tersebut akan menyebabkan rusaknya trombosit yang kemudian akan diambil hati dan lien. Trombositopeni dapat terjadi juga karena depresi sumsum tulang dan konsumsi yang berlebihan di sirkulasi (Sutaryo, 1992).

Koagulopati dibuktikan dengan adanya penurunan faktor fibrinogen, faktor V, VII, VIII, X, dan XII. Pada DBD fase akut terjadi koagulasi intravaskuler dan fibrinolisis. Telah dibuktikan adanya pemanjangan *partial thromboplastin time*, perpanjangan *thrombin time*, penurunan fibrinogen dan kenaikan FDP bersamaan dengan penurunan antithrombin III, alfa-2 antiplasminogen. Koagulopati hanya nampak dengan jelas pada DSS, apalagi kalau disertai *disseminated intravascular coagulation* (DIC). Umumnya manifestasi perdarahan hebat berupa perdarahan gastrointestinal.

Perubahan imunologik pada DBD terdiri atas perubahan imunologik humoral dan seluler. Perubahan humoral dapat dibuktikan dengan terbentuknya

antibodi IgG yang dipakai sebagai dasar uji *hemaglutinasi inhibition* (HI) dan *Dengue Blot*, dan IgM yang pada umumnya dideteksi dengan *IgM Elisa Capture*. Selain kompleks imun IgG dan IgM, juga ada kompleks imun IgE dan IgA. Perubahan imunologik seluler adalah terjadinya lekopeni pada fase akut disertai aneosinofil, kenaikan basofil dan monosit. Pada fase akut limfosit T menurun dan limfosit B meningkat.

Secara hematologis didarah tepi dengan pengecatan May Grunwald, Giemsa atau Wright muncul satu tipe khas sel limfosit atipik yang disebut limfosit plasma biru (LPB). LPB ini berbentuk bulat tetapi adakalanya amuboid. Sitoplasma biru tua sampai gelap dengan vakuolisasi. Sebetulnya perubahan pada limfosit ini sudah lama diamati. Pada awal penyakit dengue proporsi limfosit kecil meningkat, lalu diikuti limfosit besar yang dominan. Setelah itu muncul mononuklear yang besar dan *transitional cells*. Munculnya *transitional cells* atau limfosit yang sejenis itu juga ditemukan oleh penelitian. Karena bentuk LPB menyerupai plasma sel, dan pada saat itu muncul kenaikan imunoglobulin dan kenaikan limfosit B maka diduga LPB adalah termasuk populasi limfosit B. Hasil imunoperoksidase dengan menggunakan antibodi monoklonal CD4, CD7, CD8, CD22, Ia dan DR didapatkan LPB tersebut merupakan campuran dari limfosit T dan limfosit B dengan perbandingan 1:1 (Sutaryo, 1992).

2.2.2 Patogenesis DBD dan DSS

Dari penjelasan di atas yaitu adanya perubahan vaskuler, trombosit, koagulasi, imunologi seluler dan humoral, para ahli kemudian menyusun teori

patogenesis. Berbagai macam teori patogenesis diajukan oleh banyak pakar, dan kadang bertentangan. Hal ini menunjukkan bahwa patogenesis DBD belum jelas disini akan dibicarakan patogenesis secara umum.

Patogenesis DBD dan DSS merupakan proses imunopatologis. Ada 4 hipotesis mengenai DBD/DSS yaitu: *the secondary heterologous infection hypothesis* atau *the sequential reinfection hypothesis*, *the virus virulence hypothesis*, dan *the immun enhancement hypothesis* (Soewondo, 1998).

Menurut hipotesis yang pertama DBD hanya timbul pada seseorang yang mempunyai kekebalan (antibodi) terhadap virus dengue akibat infeksi dengan salah satu serotipe virus sebelumnya (infeksi primer) mengalami infeksi ke dua (infeksi sekunder) dengan serotipe virus yang lain. Kejadian manifestasi klinis dari penyakit yang merupakan reinfeksi dengan virus jenis lain pada beberapa waktu setelah serangan pertama. Kesimpulan tersebut berdasarkan pengamatan wabah dengue disekitar perang dunia ke dua. Teori infeksi sekunder itu dikembangkan oleh Halstead (1969). Pada studi epidemiologi didapatkan bahwa kasus DBD/DSS lebih banyak didapatkan pada populasi dengan reaksi serologis yang menunjukkan infeksi sekunder, ada dua puncak distribusi kasus di Thailand, virus cepat menghilang setelah fase akut. Lalu disusun teori sebagai berikut: penyakit akan muncul bilamana seseorang setelah terinfeksi virus dengue untuk pertama kali kemudian mendapatkan infeksi ke dua dengan virus dengue tipe lain dalam jarak waktu enam bulan sampai 5 tahun. Sangkawibha (1994) dan Burke (1988) membuktikan bahwa faktor resiko yang penting adalah infeksi berturut-turut virus dengue diikuti dengan DEN2. Sebagian besar sarjana menganut hipotesis

yang pertama. Hal ini disebabkan karena didukung beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa hampir semua (90%) kasus DBD, ternyata telah mempunyai kekebalan (IgG) terhadap virus dengue sebelumnya (dari infeksi primer) (Sutaryo, 1992).

Antibodi terhadap dengue sebelum infeksi yang ke dua merupakan faktor penting patogenesis dengue. Menurut hipotesa ini infeksi primer pada umumnya menyebabkan penyakit ringan. Infeksi sekunder pada individu yang telah mempunyai antibodi heterolog merupakan kondisi kritis untuk terjadinya DBD/DSS. Ada kemungkinan bahwa vaksinasi JE diikuti infeksi virus dengue akan menimbulkan gejala klinis penderita dengue yang lebih berat karena pasca vaksinasi muncul antibodi terhadap flavivirus.

Sedangkan menurut hipotesa yang ke dua DBD dapat timbul akibat infeksi virus dengue dengan strain yang ganas. Berbeda dengan pendapat di atas, ahli lain berpendapat bahwa yang menyebabkan penyakit adalah virulensi virus. Teori virulensi virus menyatakan bahwa untuk timbulnya DBD tidak perlu dua kali infeksi, satu kali saja cukup bila virusnya virulen. Teori tersebut didukung oleh kenyataan bahwa ada bayi dengan perdarahan dan shok dengan isolasi virus dan *Plaque Reduction Neutralization Test* (PRNT) yang positif melaporkan adanya gambaran yang tidak umum pada epidemi dengue tipe 2 di Kepulauan Niue pada tahun 1985. Sebagian populasi sudah mempunyai antibodi terhadap dengue tipe 2 tetapi tak ada kasus DBD/DSS yang dijumpai. Penelitian di Kepulauan Niue menyimpulkan bahwa komplikasi yang serius tidak selalu akibat dari epidemi yang berturut-turut berdasar tipe virus yang berbeda. Ahli virologi Nigeria

menunjukkan sirkulasi dari DEN1 dan DEN2 di negaranya lebih dari 50% dari dewasa mempunyai antibodi netralisasi (Durand et al, 2000).

Menurut hipotesa yang ke tiga antibodi kompleks virus yang terbentuk akan merangsang komplemen yang kemudian akan mengeluarkan bahan mediator C3a dan C5a anafilatoksin yang mempunyai efek farmakologis cepat dan pendek. Bahan ini bersifat vasoaktif dan prokoagulan sehingga menimbulkan kebocoran plasma (syok hipovolumik) dan perdarahan. Kenaikan IgG dan IgM diduga juga berperan dalam merangsang komplemen. Karena C3 proaktivator normal maka Ikeuchi (1981) menduga bahwa aktivasi komplemen bukan melalui jalur alternatif. Virus dengue cepat hilang dari darah dan jaringan. Hal tersebut diduga antigen virus dinetralisir oleh antibodi. Malasit (1987) mendapatkan kenaikan C3a mempunyai korelasi dengan berat ringan penyakit. Kadar C3a pada DEN4 secara bermakna lebih tinggi daripada kelompok yang lain, adanya sirkulasi kompleks imun dalam darah dan histamin pada air kencing, semuanya memperkuat teori aktivasi komplemen (Thein, 1994).

Teori infeksi sekunder yang berturutan dengan serotipe lain tersebut ternyata tidak dapat selalu dapat menerangkan kejadian DBD/DSS. Pertanyaan yang masih tetap belum terjawab adalah mengapa tidak semua penyakit infeksi sekunder menimbulkan infeksi berat dan itu merupakan proporsi yang sangat besar (97-98% tidak shock). Kalau teori tersebut benar maka di daerah endemis akan sangat mungkin muncul infeksi ke tiga, ke empat dan seterusnya yang tentunya akan menimbulkan reaksi lebih berat. Demikian juga akan sangat riskan kalau mendapat vaksin karena akan menimbulkan antibodi di dalam tubuh.

Infeksi beratpun dapat juga pada infeksi primer, hal tersebut dilaporkan di Jakarta, kepulauan Tonga, Manila, dan Bangkok. Di beberapa kepulauan Pasifik pernah terjadi hanya satu tipe virus yang beredar tetapi dapat menimbulkan shock, jadi tidak harus heterologis.

Untuk menjawab pertanyaan tersebut lalu muncul teori *antibody enhancement hypothesis* (ADE) (Chu et al, 1992). Virus dengue termasuk flavivirus. Pada flavivirus ada kejadian, suatu peningkatan pembiakan virus kalau sebelumnya sudah ada antibodi. Tetapi dengan syarat antibodi ini tidak menetralsir infeksi flavivirus yang datang belakangan. Antibodi tersebut bersifat subnetralising. Karena antibodi yang subnetralising tersebut malahan memacu pertumbuhan virus disebut ADE. Teori tersebut memperkirakan proses terjadinya kenaikan replikasi virus adalah sebagai berikut: pada infeksi sekunder akan terbentuk imun kompleks yang dibentuk oleh virus dengan antibodi kadar rendah yang bersifat subnetralising dari infeksi primer. Imun kompleks itu lalu melekat pada reseptor Fc pada mononuklear fagositosis (terutama makrofag). Ini akan mempermudah virus masuk sel dan meningkatkan multiplikasi. Kejadian tersebut menimbulkan viremia yang lebih hebat dan semakin banyak sel makrofag yang terkena.

Penemuan pada flavivirus tersebut kemudian diteliti pada dengue yang ternyata hasilnya memang serupa. Pada kera yang sudah pernah mendapat infeksi sebelumnya, kejadian viremia lebih hebat dari pada yang tidak terinfeksi sebelumnya. Untuk menjawab adanya kasus berat pada anak dibawah 1 tahun, diadakan penelitian kemungkinan imunoglobulin pasif anti dengue dari ibu yang

dibawa anak. Ternyata antibodi tersebut menurun setelah 8 bulan. Pada saat antibodi maternal dari ibu mencapai kadar subnetralising disitulah dapat timbul serangan DBD. Dan hal itu menerangkan infeksi primer pada bayi sebetulnya seperti infeksi sekunder.

Peranan ADE tak dapat dipisahkan dengan peranan makrofag. Kemudian muncul hipotesis yang keempat yaitu sel target untuk replikasi virus dengue adalah sel fagosit mononuklear yang membawa reseptor Fc dipermukaannya. Makrofag adalah salah satu sel target pada infeksi dengue. Pemiakan virus terjadi didalam sel ini, semakin banyak sel makrofag yang diinfeksi virus makin berat penyakit yang timbul. Infeksi aktif pada penderita yang telah mempunyai antibodi (IgG) terhadap virus dengue akibat infeksi sebelumnya akan membentuk imun kompleks sehingga virus lebih mudah masuk ke dalam sel-sel mononuklear tersebut dibanding dengan virus bebas. Kemudian T sitotoksik (T8) akan teraktivasi sehingga terjadi *immun clearance*. Akan tetapi proses ini justru berdampak negatif karena akan melepaskan bahan mediator (sitokin) yang memiliki sifat vasoaktif atau prokoagulasi misalnya: interleukin, tumor necrotizing factor (TNF), *platelet activating factor* (PAF). Berat ringan penyakit dapat diduga dipengaruhi secara genetis, yaitu dengan cara membantu atau dengan menghambat pertumbuhan virus dalam monosit. Di Kuba mononuklear orang kulit putih lebih peka daripada kulit hitam (Sutaryo, 1992).



2.3 Respon imun Infeksi Virus Dengue

Setelah virus dengue masuk dalam tubuh manusia melalui gigitan vektor infektif, virus berkembang biak dalam sel retikuloendotelial yang selanjutnya diikuti adanya viremia yang berlangsung sekitar 5-7 hari. Pada masa inkubasi virus sulit untuk diisolasi, karena jumlah virus masih sedikit. Tetapi setelah terjadi demam 2-3 hari virus mudah untuk diisolasi karena jumlahnya dalam aliran darah meningkat (Rantam, 1998).

Akibat adanya invasi virus ini maka timbul respon imun baik humoral maupun seluler, antara lain: antineutralisasi, antihemaglutinin, antikomplemen. Antibodi ini pada umumnya adalah kelas IgG disamping itu IgM. Antibodi ini muncul setelah beberapa hari terinfeksi dengue dan bertahan sampai beberapa bulan.

Pada imunitas seluler virus dengue yang menginfeksi monosit menstimulasi reaksi silang serotipe limfosit CD4⁺ sehingga aktif dan memproduksi interferon (IFN) gamma, IL2, dan sitokin lainnya (Sangkawibha, 1994). IFN gamma meningkatkan ADE infeksi virus dengue dengan regulasi Fc reseptor (FcR) pada monosit. Selanjutnya IFN gamma mengaktifkan monosit dan molekul HLA kelas I dan II, yang merupakan fasilitas untuk mengenali epitope virus dengue oleh CD4⁺ dan CD8⁺ (O'hanley et al, 1992). Sehingga monosit dapat dilisis dan kandungan intraselulernya dikeluarkan. *Tumor growth factor* (TGF) β -1 dapat sebagai faktor prediktif dari beratnya dengue yang sitokin ini secara bermakna tinggi selama 3 hari setelah panas pada anak dengan DBD.

Kadar C3 pada pasien dengue tertekan selama fase akut dari penyakit dan penekanan yang terbesar diamati pada DSS. Kadar C3a secara bermakna lebih tinggi pada DSS dari pada penderita DF. Faktor B dan C4 tidak tertekan dan mempunyai peranan penting dalam pemecahan C3 pada jalur klasik dan alternatif. Hal ini menunjukkan bahwa rendahnya kadar C3 pada DF disebabkan oleh keluarnya ke dalam ekstrasvaskuler atau C3 telah dipecah oleh enzim.

Kadar CRP (*C reactive protein*) meningkat lebih tinggi pada fase akut daripada fase penyembuhan. TNF alfa meningkat pada fase akut dari pasien DSS.

Pada imunitas humoral IgG1 mempunyai peran dalam ADE dan aktivasi komplemen. Pada penelitian lain IgM dan IgG secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal ini tidak sesuai dengan teori infeksi sekunder yang mana kadar IgG tinggi sejak permulaan sakit (Sugiyanto dan Samsi, 1992). Hal ini dapat terjadi pada keadaan malnutrisi (Wood and Yusuf, 1997).

Russel et al, (1968) melaporkan terjadi kenaikan IgG pada infeksi sekunder, tetapi IgM tidak meninggi. Dengan cara yang lebih spesifik IgM dapat diukur secara kuantitatif. IgM anti dengue menurun sampai tidak dapat dideteksi kadarnya setelah 30-60 hari. Pada 151 penderita DBD yang dipastikan secara virologis, IgM terdapat pada 77,5% kasus. IgM akan muncul pada fase awal penyakit yang dimulai pada hari ke empat. Infeksi sekunder tidak selalu menimbulkan dengue berat, dengue berat hanya muncul pada 1-3% kasus. Salah satu faktor yang mempengaruhi kejadian itu adalah IgM spesifik terhadap dengue. IgM yang bersifat netralisasi dapat berikatan dan menetralsasi infeksi sekunder sehingga mencegah timbulnya sakit yang berat. Bila IgM tidak cukup akan timbul

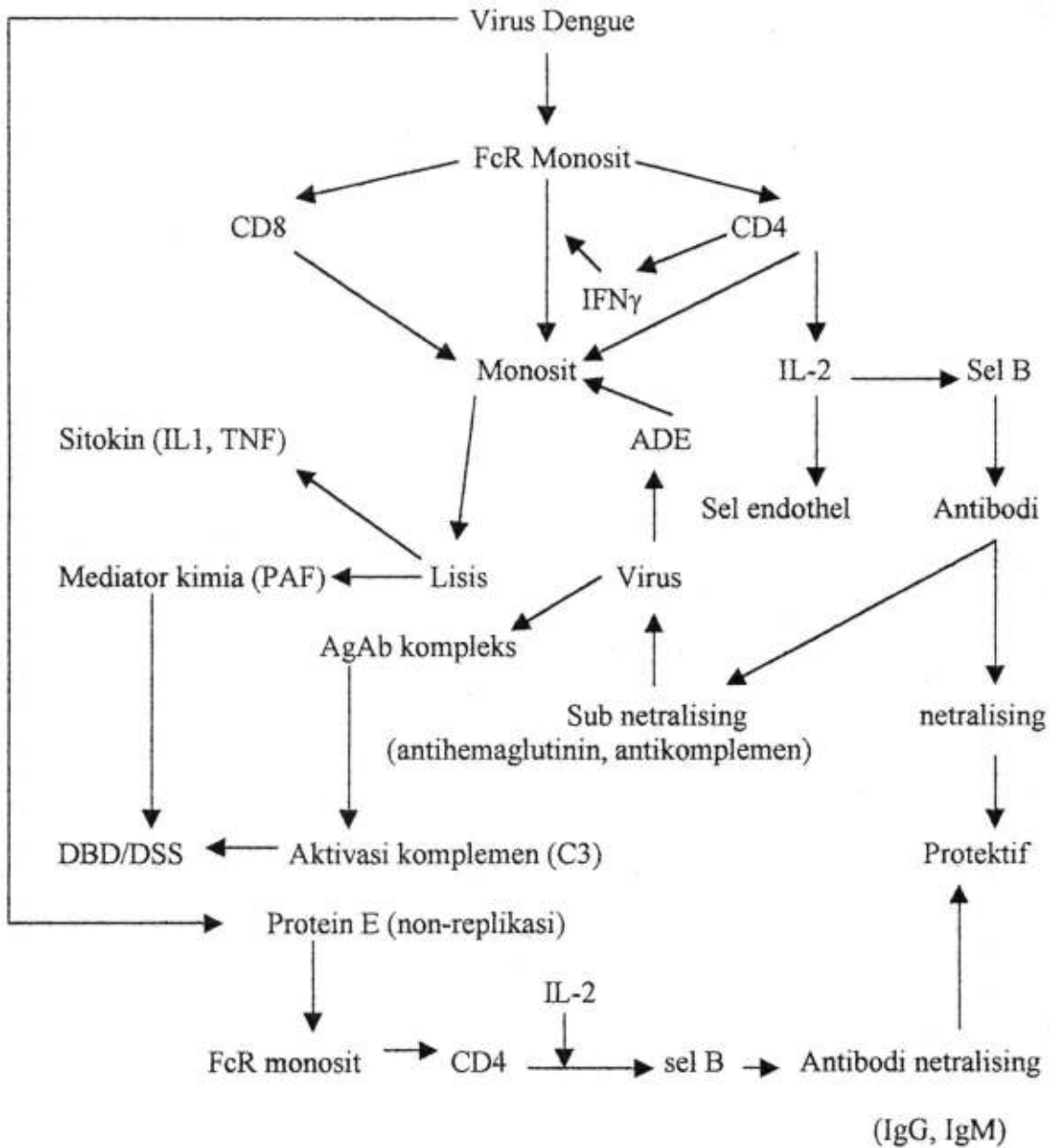
peningkatan IgG yang menghasilkan dengue bentuk yang berat (Sutaryo, 1992). Serum imun dapat mempunyai dua efek yang berlawanan pada virus dengue yang tumbuh dalam kultur yaitu netralisasi dan enhancement. Jika netralisasi aktivitasnya tinggi maka tidak terjadi enhancement begitu pula sebaliknya (Kliks et al, 1989). Didapatkan 100% antibodi terhadap protein struktural (E, M, prM, C) pada penderita DBD (Ng et al, 1997)

Infeksi virus dengue pada endothel juga akan meningkatkan molekul adhesi VCAM-1, ICAM-1, dan E-selectin (Anderson et al 1997).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan: ADE : Antibodi dependent enhancement, TNF: Tumor necrosis factor, IFN: Interferon, CD: Cluster of differentiation, AgAb: Antigen antibodi IL: Interleukin, PAF: Platelet activating factor.

3.2 Hipotesa Penelitian

Pada penelitian ini dapat ditarik hipotesis, yaitu:

- 3.2.1 Fraksi protein E virus dengue dapat menginduksi imunoglobulin pada mencit.
- 3.2.2 Terdapat perbedaan kadar imunoglobulin dan sub tipe imunoglobulin setelah imunisasi fraksi protein E virus dengue pada mencit.
- 3.2.3 Fraksi protein E virus dengue dapat menginduksi respon seluler pada mencit.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di kandang hewan percobaan Fakultas Kedokteran Hewan Unair, sebagai tempat pemeliharaan hewan percobaan dan laboratorium DHF Tropical Disease Centre (TDC) Unair, sebagai tempat isolasi protein E virus Dengue dengan SDS-PAGE dan ELISA.

Waktu penelitian yang direncanakan selama 4 bulan, mulai Agustus-November tahun 2000.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit strain BALB/c, jenis kelamin betina dengan umur rata-rata dua bulan, rata-rata berat badan 245 gram (range 226-250 gram). Jumlah mencit yang digunakan sebanyak 40 ekor. Hewan percobaan tersebut diperoleh dari pengembang biakan hewan percobaan Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma). Hewan percobaan diaklimatisasi pada kondisi kandang, pakan, dan minum, yang sama. Pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*.

4.2.2 Fraksi Protein E Virus Dengue

Isolat virus dengue diperoleh dari Lab. Virologi (TDC) Unair. Virus Dengue tersebut terdiri dari e

DEN2, DEN3, DEN4. Dari ke empat serotipe tersebut di campur ke dalam satu ependorf yang nantinya protein E akan diisolasi dengan menggunakan SDS-PAGE.

4.3 Bahan dan Alat Penelitian

4.3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah Acrylamid, Tris HCl pH 8,8, Tris HCL 6,8, SDS 0,8%, Temed, APS 10%, Asam asetat 7,5%, Methanol 50%, Glutaraldehyda 10%, NaOH 0,36%, NH₃, AgNO₃, Formaldehyda 3,7%, Zitronensaurin 5%, PBS, Ethanol, coating buffer, alfa human IgM, kremer, substrat OPD, goat alfa human IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, kertas whartman, kertas nitroselulosa, TBS, PUDF, BSA 10%, HMAF, Substrat P-NPP.

4.3.2 Alat Penelitian

Alat yang diperlukan adalah jarum suntik, alat elektroforesa, alat blotting, alat *flowcytometer*, *ELISA reader*.

4.4 Karakterisasi Protein E

4.4.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamid Gel Electrophorese) merupakan metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi fraksi protein berdasarkan berat molekulnya, prinsip dasar dari metode ini adalah denaturasi

protein oleh Sodium Dodecyl Sulphate dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis dengan menggunakan gel, dalam hal ini yang digunakan adalah Polyacrylamid. Metode ini dapat mengikat atau mendeteksi protein dengan berdasarkan berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu. Prosedurnya adalah sebagai berikut : Pertamakali *running gel* dibuat dan dimasukkan kedalam plate kaca. Setelah mengeras pada bagian atasnya kita masukkan stacking gel yang telah dipersiapkan terlebih dahulu. Running gel dan stacking gel dibuat dengan mencampurkan Acrylamid, Tris HCL, SDS 0,8%, aquades, Temed, APS didalam beker glass. Setelah stacking gel mengeras lalu sampel yang telah direbus terlebih dahulu dapat dimasukkan. Kemudian plate kaca dimasukkan ke alat elektroforesis yang terlebih dahulu diberi buffer. Gel yang telah dielektroforesis di cuci dengan larutan yang terdiri dari aquades, methanol, asam asetat, dan glutaraldehyd. Setelah dicuci, gel dapat di warnai dengan AgNO_3 kemudian diberi larutan pengembang warna yang terdiri Formaldehyd 3,7%, Zitronsaure 5%, dan aquades. Setelah band terlihat terwarnai maka dapat distop dengan asam asetat 10%.

4.4.2 Semidry Blotting

a. Semi-dry elektrophoresis

Protein dari gel kemudian di transfer ke membran nitroselulosa (PUDF) dengan cara memotong kertas whatman dan PUDF sesuai dengan besarnya gel. Enam lembar kertas absorben pada anoda buffer I dan tiga lembar pada anoda buffer II dan enam lembar pada katoda buffer.

Membran diinkubasikan pada anoda buffer II selama lima menit kemudian disusun enam lembar kertas absorben dari buffer I, 3 lembar dari buffer II, PNM, polyacrylamid dan enam lembar kertas absorben dari katoda buffer. Selanjutnya diberi aliran listrik dengan $0,8 \text{ mA/cm}^2$ dari gel. Setelah protein ditransfer, PNM dicuci dengan aquades selama 10 menit dan larutan TBS selama 10 menit yang selanjutnya dilakukan blotting.

b. Immunoblotting

Blot diblok dengan BSA 10% selama 30 menit pada temperatur ruangan kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Selanjutnya direaksikan dengan anti protein E dan sebagai kontrol direaksikan dengan *Hyperimmune Mouse Ascitic Fluid* (HMAF). Setelah itu diinkubasikan pada temperatur ruangan selama satu jam. Setelah dicuci dengan larutan TBS tiga kali direaksikan dengan konjugat alkalis fosfatase dan substrat P-NPP dan diwarnai dengan fast-ret. Akhirnya dikeringkan pada temperatur ruangan.

4.5 Isolasi dan Purifikasi Protein E virus Dengue

Hasil fraksi protein dari SDS-PAGE yang berat molekulnya 50-55 kDa diambil dan dimasukkan ke dalam selopan yang diberi PBS 1 kali. Kemudian dilakukan Elusi selama 3-4 jam sehingga protein E larut di dalam PBS. Protein E yang telah larut di beri ethanol dengan didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar sehingga terbentuk endapan yang merupakan protein E yang siap diimunitasikan ke mencit.

4.6 Perlakuan Pada Hewan Percobaan

Empat puluh ekor mencit strain BALB/c dipersiapkan dengan melakukan aklimatisasi selama 4 minggu. Kemudian di bagi tiga kelompok. Kelompok I (kelompok kontrol) sebanyak 5 ekor diinjeksi dengan PBS, Kelompok II 15 ekor diimunisasi dengan fraksi potein E sebanyak 500 mg/ekor intramuskuler dan kelompok III 15 ekor diimunisasi dengan fraksi protein E sebanyak 1 gram/ekor intramuskuler. Kemudian setelah hari ke 4, 7, 10, 15, 22, 30 diambil darahnya sebanyak 1 ml untuk dilakukan pemeriksaan ELISA..

4.7 Pengukuran Kadar Imunoglobulin

4.7.1 ELISA IgM

Coating buffer ditambah *alfa human* IgM dengan perbandingan 1:100/100 $\mu\text{l}/1000$ μl dimasukkan 50 $\mu\text{l}/100$ μl per well, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4 °C. Setelah diinkubasi hasilnya dibloking dengan kremer 4% yang diencerkan dengan PBS satu kali. Kemudian dilakukan pencucian sebanyak enam kali. Setelah itu sampel dimasukkan (1:100) 10 μl serum ditambahkan 990 μl kemudian dibloking dan diinkubasi 37 °C selama 60 menit. Dilakukan pencucian sebanyak enam kali. Selanjutnya dimasukkan mix antigen 50 $\mu\text{l}/100$ μl per well dan diinkubasi 37 °C selama 60 menit. Lalu hasilnya dilakukan pencucian sebanyak enam kali. Kemudian dimasukkan konjugat (1:100) 50 $\mu\text{l}/100$ μl per well, diinkubasi 37 °C selama 60 menit. Konjugat sebanyak 11 μl ditambah dengan 11 ml PBS 1 kali. Setelah dilakukan pencucian sebanyak enam kali, lalu dimasukkan substrat OPD 5 $\mu\text{l}/100$ μl per well, diinkubasi diruangan gelap dan

ditunggu 20-30 menit. Setiap 10 menit dilihat adanya perubahan warna. Bila ada perubahan reaksi distop dengan H_2SO_4 1 N 50 μ l/100 μ l per well. Kemudian hasil dibaca dengan ELISA reader.

4.7.2 ELISA IgG

Sumuran *dicoating* dengan antigen mix 50 μ l/100 μ l per well, lalu diinkubasi *over night* (24 jam) pada suhu 4 °C dengan ditutup aluminium foil. Setelah dicuci sebanyak enam kali, dilakukan pengenceran sampel (1:100) 10 μ l serum : 990 μ l blocking. Selanjutnya plate diambil dan diblocking dengan kremer 4%, 50 μ l/100 μ l per well dan diinkubasi 37 °C selama 60 menit. Kemudian dilakukan pencucian sebanyak enam kali. Selanjutnya sampel dimasukkan 50 μ l:100 μ l per well, lalu diinkubasi 37 °C selama 60 menit. Dilakukan pencucian sebanyak enam kali. Setelah itu dimasukkan *goat alfa human* IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 (konjugat 1:1600) 12,5 μ l/20 ml PBS 1 kali, diinkubasi 37 °C selama 60 menit, lalu dilakukan pencucian 6 kali. Kemudian substrat dimasukkan dan didiamkan di tempat gelap kira-kira 5 menit sampai terjadi perubahan warna. Setelah terjadi perubahan warna, stop reaksi dimasukkan lalu dibaca dengan ELISA reader.

4.8 Flowcytometer

Sel limfosit yang diisolasi dari darah mencit dengan sistim *ficol histopaque* kemudian diimunisasi dengan protein E virus dengue. Setelah 8 jam post imunisasi dilakukan pengecatan pada permukaan sel dengan *fluorescence*

isothiocyanat (FITC) anti CD4 (klon GK1.5) dan *R-phycoerithris-conjugate* anti CD8 (klon 53-6.7). Untuk pengecatan intraseluler, sel limfosit difiksasi dan dilakukan permeabilitas (cytofix/cytopern kit) dan selanjutnya pewarnaan sitokin dilakukan dengan konjugat *allophycocyanin* anti interferon gamma (IFN γ). Selanjutnya dianalisis dengan *Becton-Dickson FACScalibur flow catometer*.

4.8 Identifikasi Variabel

4.8.1 Variabel Bebas

Kadar fraksi protein E virus dengue yang diinfeksi pada mencit untuk menimbulkan respon imun.

4.8.2 Variabel Tergantung

Profil IgG dan IgM pada mencit setelah diinfeksi dengan fraksi protein E virus Dengue.

4.8.3 Variabel Kendali

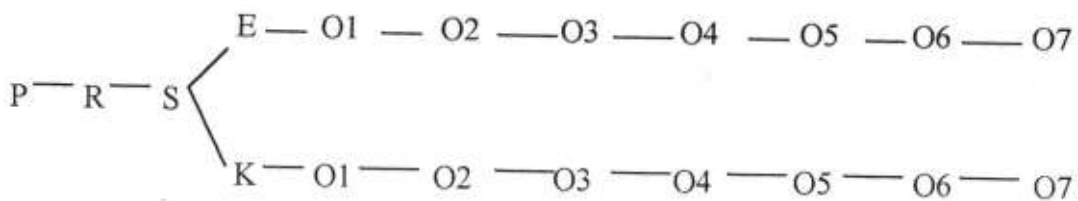
- a. Jenis hewan percobaan, umur, jenis kelamin, berat badan, diet, dan jenis virus.
- b. Cara karakterisasi dengan SDS-PAGE.
- c. Cara pemeriksaan dan pengukuran IgG dan IgM dengan ELISA.

4.9 Definisi Operasional Variabel

- Kadar protein E: Kadar protein E yang diperoleh dari virus dengue serotipe DEN1, DEN2, DEN3, DEN4.
- Profil IgG dan IgM: Meningkat atau menurunnya kadar IgG dan IgM pada mencit setelah diberi fraksi protein E.

4.10 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan penelitian *randomized extended control group pre test post test design*. Penelitian ini menggunakan 30 sampel serum yang diambil dari 30 ekor mencit yang telah di infeksi dengan protein E virus dengue. Pengukuran kadar IgG dan IgM dari 40 sampel tersebut dilakukan pada hari ke 4, 7, 10, 15, 22, 30. Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Keterangan:

P = Populasi	E = Eksperimen
R = Randomized	K = Kontrol
S = Sampel	O = Observasi

4.11 Analisa Data

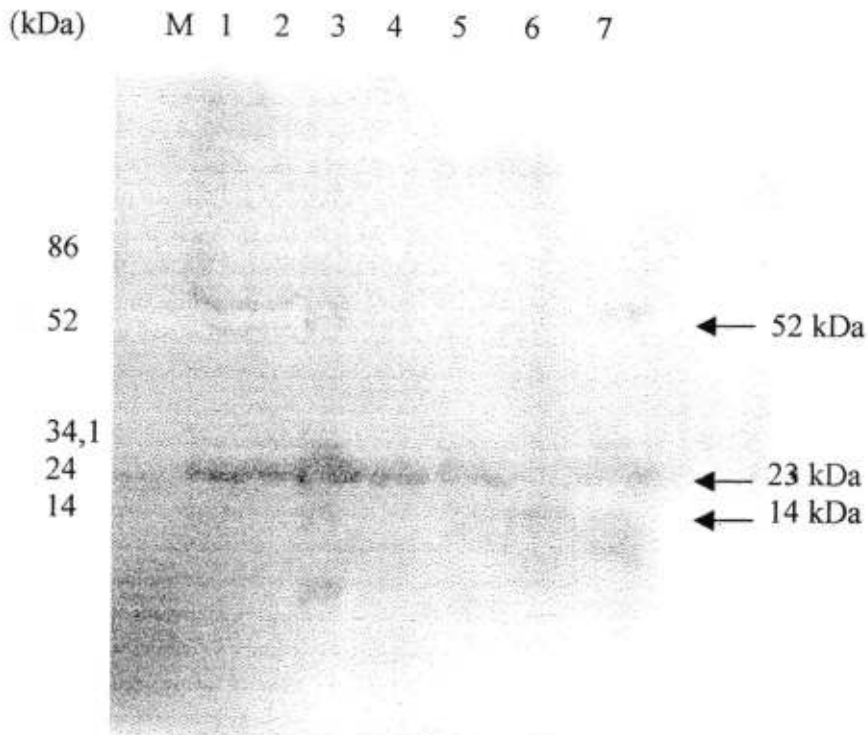
Analisa statistik terhadap data menggunakan Anova satu arah dan regresi dengan metode growth dan eksponensia

BAB 5

HASIL PENELITIAN

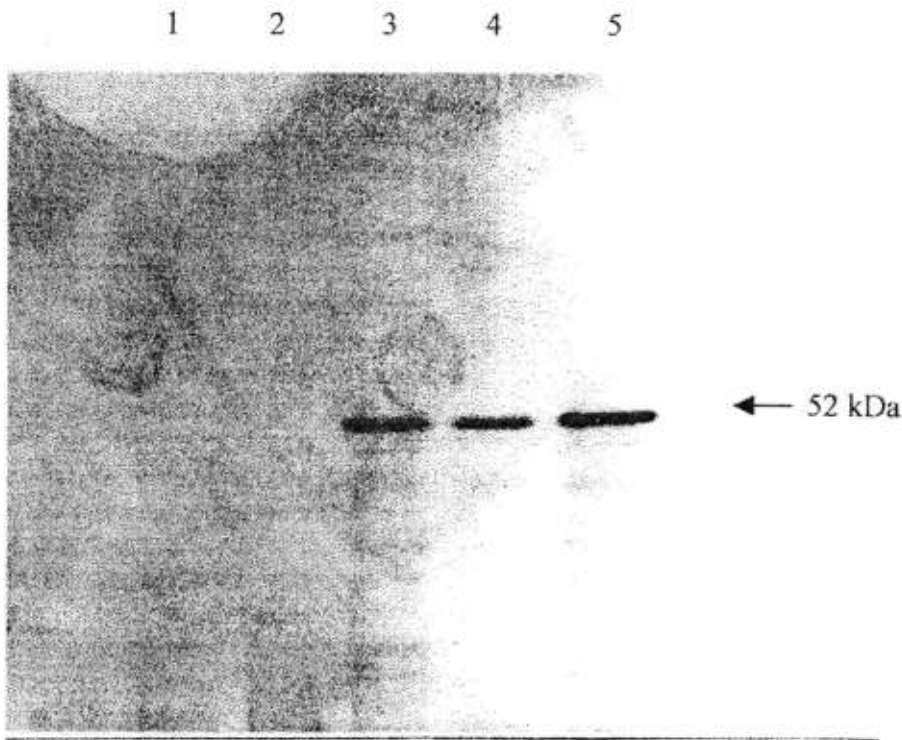
5.1 Karakterisasi Protein Immunogen.

Setelah dilakukan SDS-PAGE 12% dan divisualisasikan dengan pewarnaan silver (AgNO_3) menunjukkan adanya tiga macam protein yang mempunyai berat molekul antara lain 52 kDa, 23 kDa dan 14 kDa.



Gambar 5.1 Analisis Protein Virus Dengue dengan SDS-PAGE: M= marker, pengenceran serum pada kolom 1= 1: 16, kolom 2 = 1:14, kolom 3 = 1:12, kolom 4 = 1:10, kolom 5 = 1:8, kolom 6 = 1:6, kolom 7 = 1:4.

Dari hasil di atas agar dapat ditentukan protein E yang spesifik, maka dilakukan analisis reaktivitas antara antigen dan antibodi dengan imunoblotting. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.2 di bawah ini.



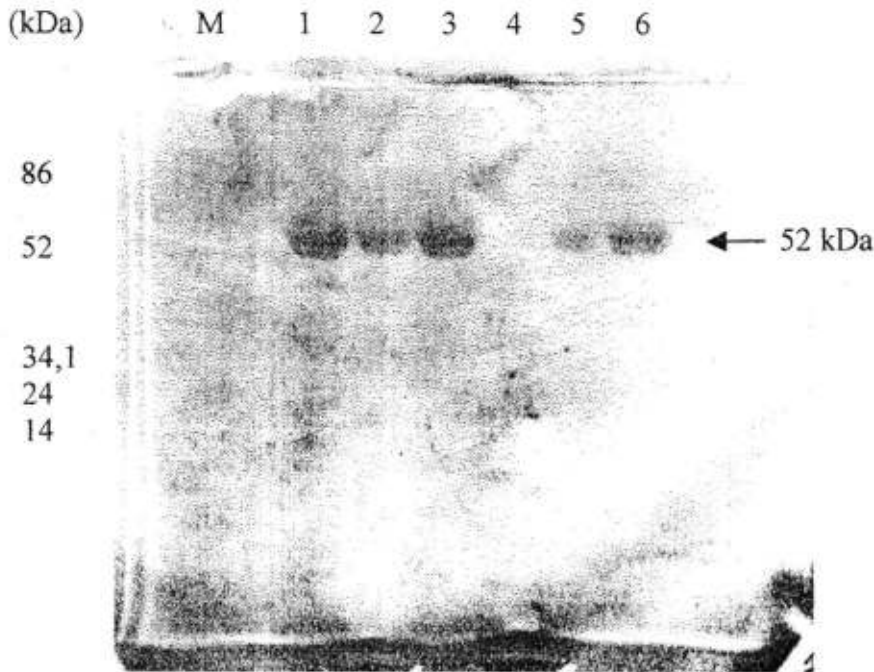
Gambar 5.2 Analisis Protein E dengan Western Blot: Pengenceran serum pada kolom 1 = 1:12, kolom 2 = 1:10, kolom 3 = 1:8, kolom 4 = 1:6, kolom 5 = 1:4.

Tampak reaktivitas protein E terhadap antibodi poliklonal dimulai pada kolom 3 dan reaktivitas yang terkuat pada kolom 5.

5.2 Purifikasi Protein E Spesifik.

Pada pemurnian protein E yang dilakukan dengan preparatif gel elektroforesis telah didapatkan hasil yang murni seperti terlihat pada gambar 5.3.

Pada gambar tersebut telah dilakukan elektroforesis kembali dan menunjukkan protein E spesifik dengan berat molekul 52 kDa.



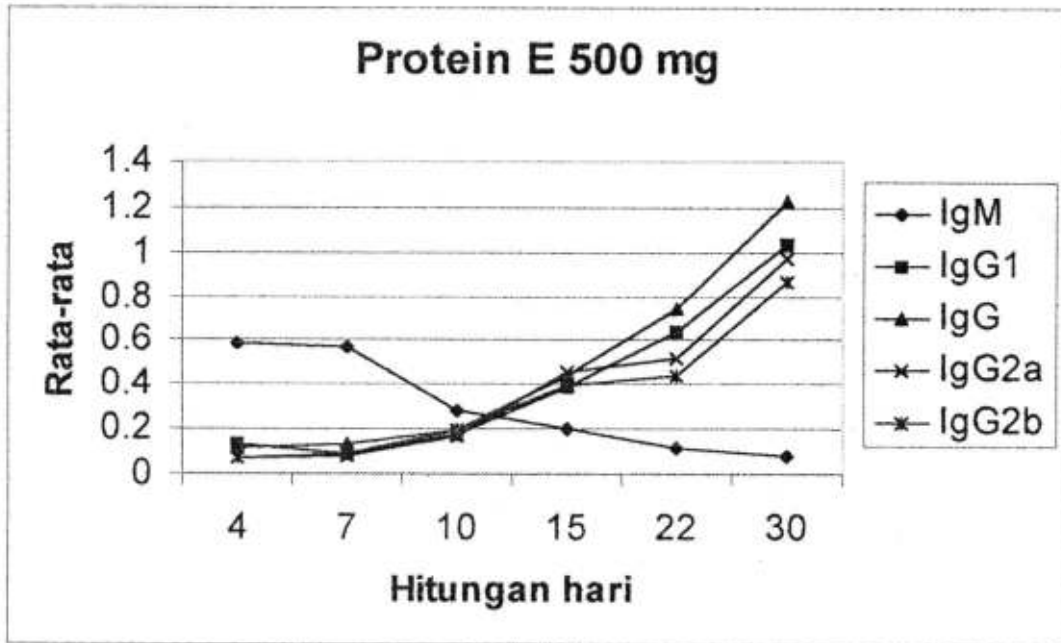
Gambar 5.3 Hasil Pengamatan Fraksi Protein E dari Elusi dengan Metode SDS-PAGE: M = marker, pengenceran serum kolom 1 = 1:14, kolom 2 = 1:12, kolom 3 = 1:10, kolom 4 = 1:8, kolom 5 = 1:6, kolom 6 = 1:4.

Pada kolom empat tidak terlihat adanya pita, hal ini menunjukkan pada kolom empat tidak terdapat protein E virus dengue.

5.3 Kadar Immunoglobulin.

5.3.1 Kadar Immunoglobulin dengan Dosis Fraksi Protein E 500 mg.

Kadar imunoglobulin yang telah diukur dengan ELISA ternyata memberikan hasil seperti yang disajikan dalam bentuk grafik dibawah ini.



Gambar 5.4 Grafik Kadar Immunoglobulin Setelah Pemberian Fraksi Protein E dengan Dosis 500 mg/ekor.

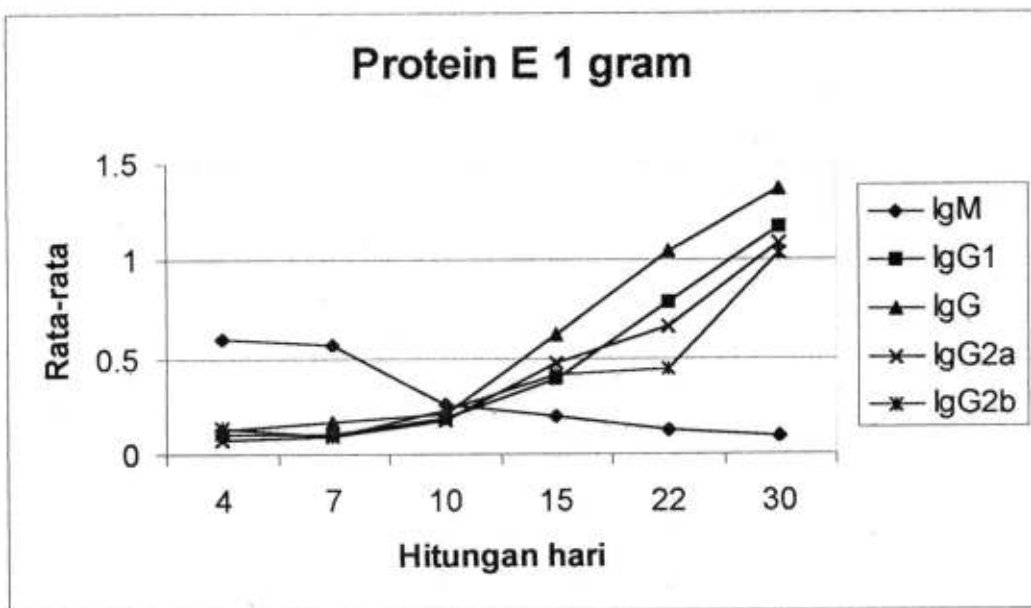
Setelah data dilakukan analisis dengan metode regresi menunjukkan hasil yang bermakna ($p < 0,05$), R^2 0,973 dan SE 0,15, suatu bentuk model kurva eksponensial untuk IgM dan model kurva growth untuk IgG dan sub tipenya. Hal ini seperti terlihat pada grafik 5.4 yang disebabkan kadar IgM yang menurun sedangkan kadar IgG yang terus meningkat.

Dengan Uji Anova satu arah terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara IgG, IgG1, IgG2a dan IgG2b yang kemudian dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menunjukkan, bahwa pada hari ke 4 tak ada perbedaan yang bermakna antara IgG, IgG1, IgG2a dan IgG2b. Pada hari ke 7 mulai tampak perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara IgG1 dengan sub tipe IgG yang lain. Pada hari ke 10 tak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) diantara 4

imunoglobulin tersebut. Kemudian hari ke 15 terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara IgG2a dengan IgG dan IgG2b. Pada hari ke 22 dan 30 jelas terlihat terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

5.3.2. Kadar Imunoglobulin dengan Dosis Fraksi Protein E 1 gram.

Untuk imunisasi fraksi protein E dengan dosis 1 gram setelah kadar imunoglobulin diukur dengan ELISA memberikan hasil seperti yang dirangkum pada gambar 5.5 dibawah ini.



Gambar 5.5 Grafik Kadar Imunoglobulin Setelah Pemberian Fraksi Protein E dengan Dosis 1 gr/ekor.

Setelah data dilakukan analisis dengan metode regresi menunjukkan hasil yang bermakna ($p < 0,05$), R^2 0,964 dan SE 0,16, suatu bentuk model kurva eksponensial untuk IgM dan model kurva growth untuk IgG dan sub tipenya. Hal

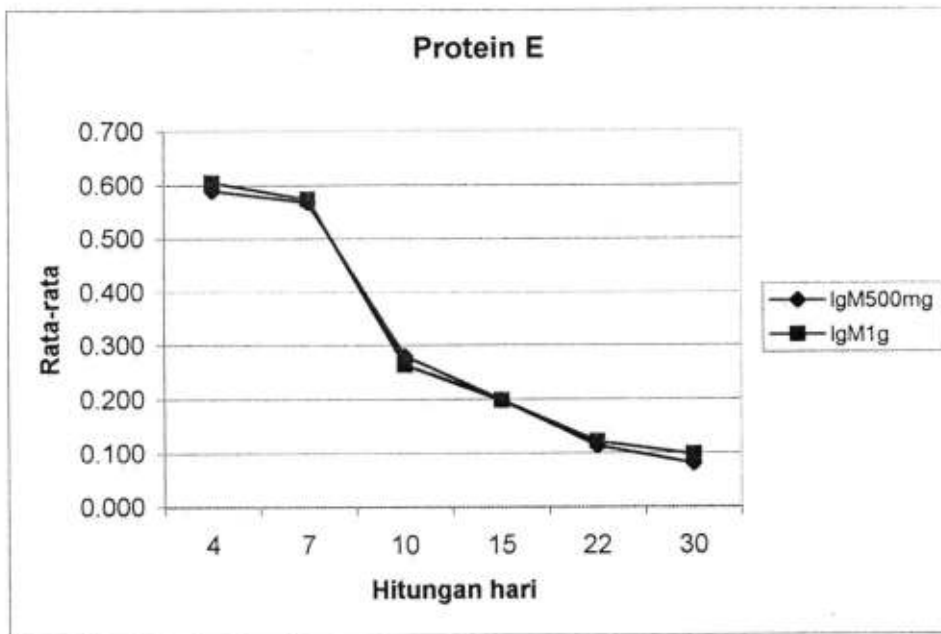
ini seperti terlihat pada grafik 5.4 yang disebabkan kadar IgM yang menurun sedangkan kadar IgG yang terus meningkat.

Dengan Uji Anova satu arah terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara IgG, IgG1, IgG2a dan IgG2b yang kemudian dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menunjukkan, bahwa pada hari ke 4 tak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) antara IgG, IgG1, IgG2a dan IgG2b, tetapi pada hari ke 7 mulai tampak perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara IgG1 dengan sub tipe IgG yang lain. Hal ini sama seperti pada imunisasi fraksi protein E dosis 500 mg/ekor. Pada hari ke 10 terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara IgG2b dengan IgG2a dan IgG, dan pada hari ke 15 terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara IgG2a dengan IgG dan IgG2b juga, antara IgG1 dengan semua sub tipe IgG. Pada hari ke 22 terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) diantara semua imunoglobulin. Pada hari ke 30 terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara IgG dengan IgG2b dan IgG1 dengan semua sub tipe IgG. Kalau dilihat pola kenaikan imunoglobulin menunjukkan gambaran yang hampir sama antara imunisasi fraksi protein E dosis 500mg/ekor dengan dosis 1 gram/ekor. Pola tersebut tampak pada gambar 5.4 dan gambar 5.5 yaitu kadar $IgG > IgG1 > IgG2a > IgG2b$.

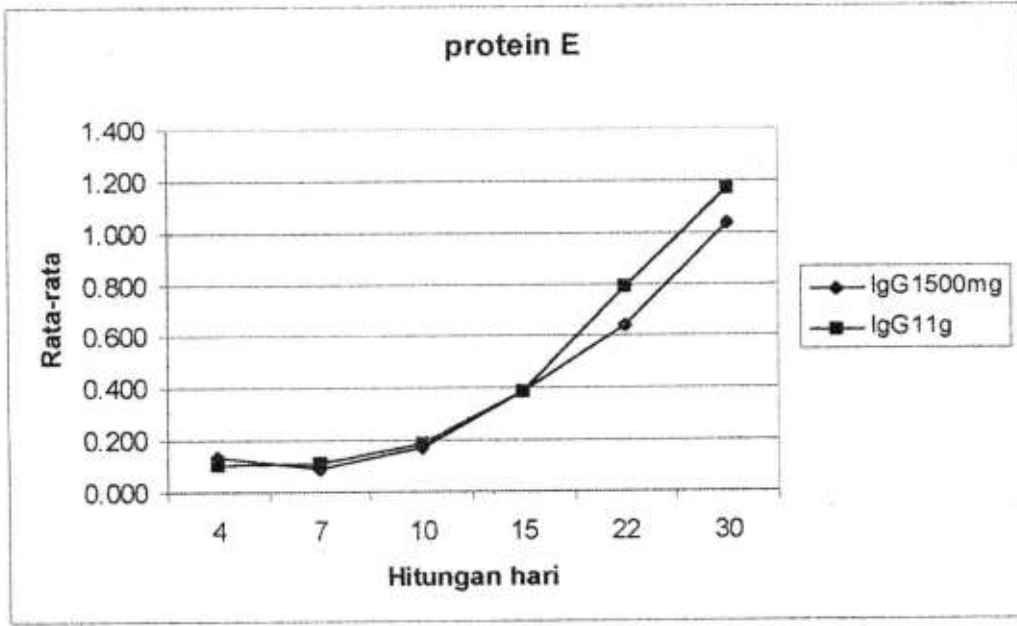
5.3.3. Perbandingan Kadar Imunoglobulin antara Pemberian Fraksi Protein E Dosis 500 mg/ekor dengan Dosis 1 gr/ekor

Kadar IgM tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,005$) antara dosis 500 mg/ekor dengan dosis 1 gr/ekor. Untuk kadar IgG1 dan IgG2a terdapat

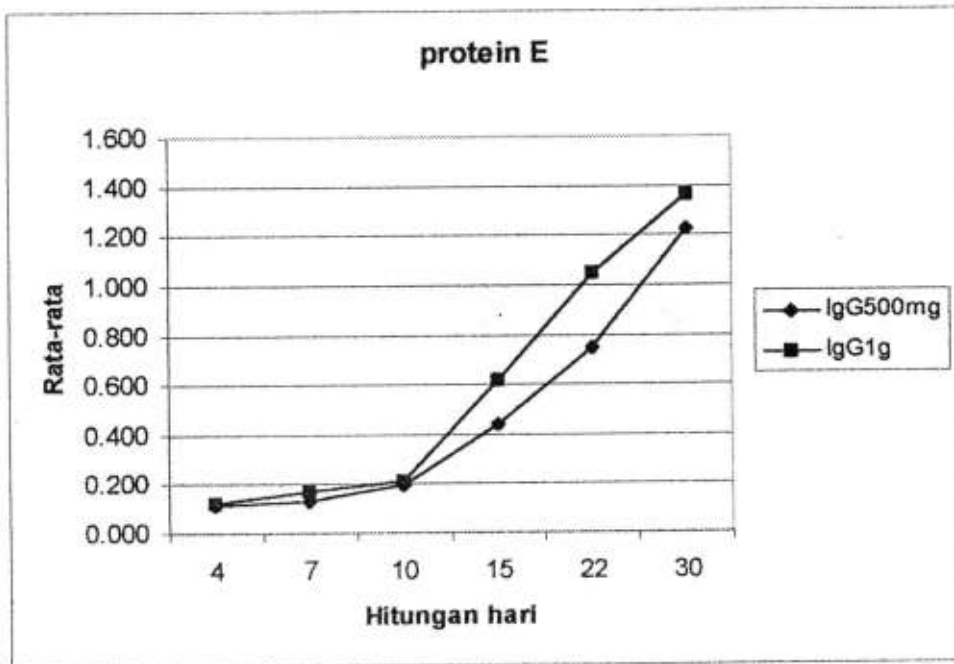
perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) setelah hari ke 15 antara dosis 500 mg/ekor dengan dosis 1 gr/ ekor, sedangkan kadar IgG terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) setelah hari ke 10. Untuk IgG2b terdapat perbedaan bermakna setelah hari ke 22 ($p < 0,05$). Hal ini dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5.6 Grafik Kadar IgM dengan Imunisasi Fraksi Protein E Dosis 500 mg dan Dosis 1 gr.

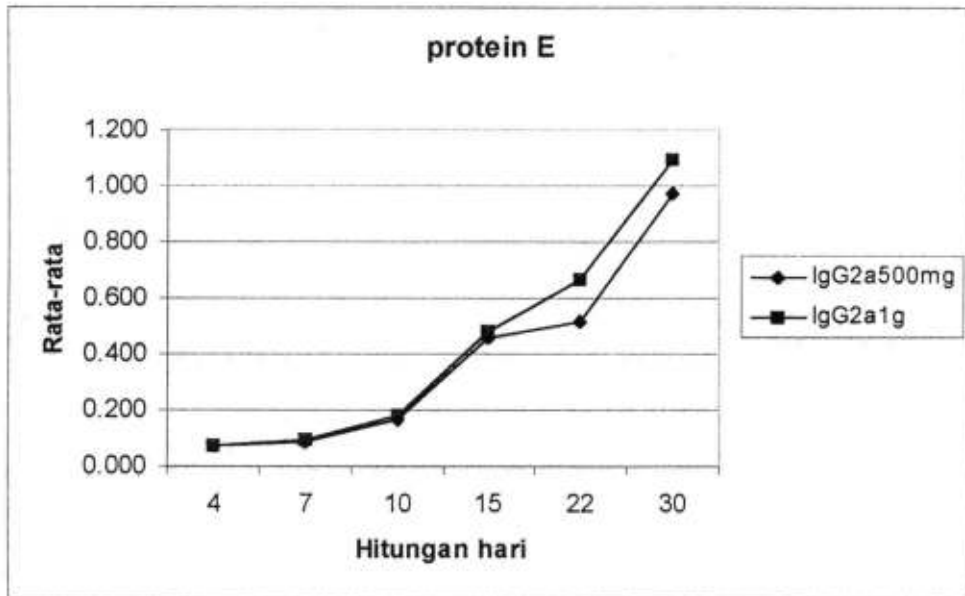


Gambar 5.7 Grafik Kadar IgG1 dengan Imunisasi Fraksi Protein E Dosis 500 mg dan Dosis 1 gr.

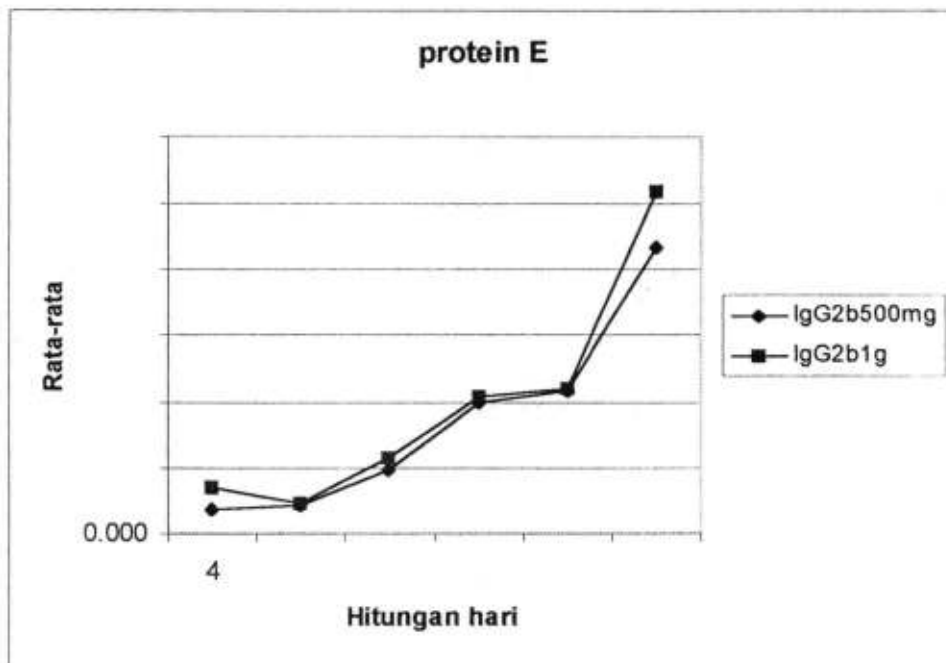


Gambar 5.8 Grafik Kadar IgG dengan Imunisasi Fraksi Protein E Dosis 500 mg dan Dosis 1 gr.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



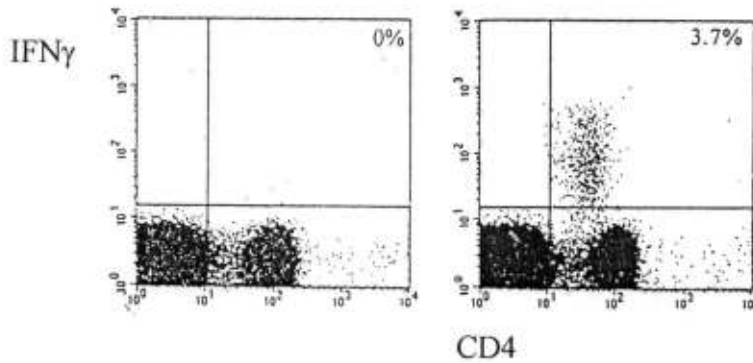
Gambar 5.9 Grafik Kadar IgG2a dengan Imunisasi Fraksi Protein E Dosis 500 mg dan Dosis 1 gr.



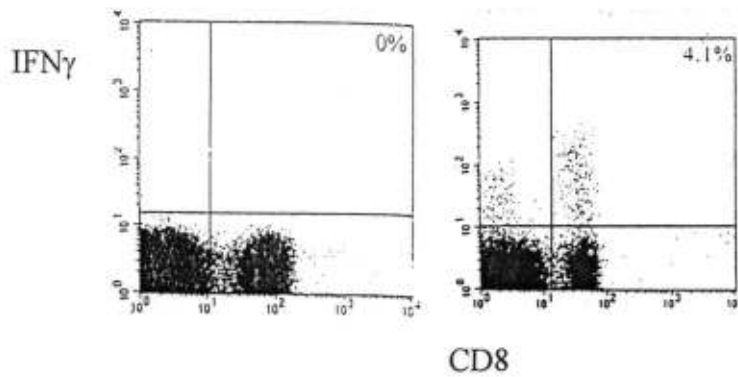
Gambar 5.10 Grafik Kadar IgG2b dengan Imunisasi Fraksi Protein E Dosis 500 mg dan Dosis 1 gr.

5.4 Respon Imunitas seluler

Dari pemeriksaan dengan metode flowcytometri didapatkan peningkatan aktivitas CD4 sebesar 3,7% dan peningkatan CD8 sebesar 4,1%. Hal ini dapat dilihat pada gambar 5.11 dan 5.12 dibawah ini



Gambar 5.11 Respon CD4 pada Mencit terhadap Induksi Fraksi Protein E.



Gambar 5.12 Respon CD8 pada Mencit terhadap Induksi Fraksi Protein E.

Pada gambar 5.11 terlihat IFN γ meningkat sampai konsentrasi 10^3 dan pada gambar 5.12 tampak IFN γ meningkat sampai konsentrasi 10^3 .

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Karakterisasi dan Isolasi Protein E

Setelah dilakukan SDS-PAGE 12% dan divisualisasikan dengan pewarnaan silver ditemukan beberapa macam protein dengan berat molekul 52 kDa, 23 kDa, 14 kDa. Selanjutnya untuk memastikan protein E spesifik virus dengue, maka dilakukan imunoblotting dan menunjukkan bahwa protein E spesifik virus mempunyai berat molekul 52 kDa yang diinduksi oleh gen protein E ca 1,5 kb. Tingkat reaktivitas protein E terhadap antibodi poliklonal sangat dominan dibanding dengan protein lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa protein E menunjukkan sifat imunogenik sehingga dapat digunakan sebagai bahan vaksin. Hasil ini telah didukung oleh penelitian Rantam (1998) pada analisis dua dimensi protein E telah menunjukkan, bahwa terdapat *overlapping* peptida satu dengan lainnya sehingga mempunyai sifat tetravalen.

6.2 Kadar Imunoglobulin

Setelah protein E diimunisasikan pada mencit menunjukkan bahwa IgM sudah dapat dideteksi pada hari ke empat, hal ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Beasley (1994). Produksi IgM memerlukan waktu untuk pengenalan terhadap sel T dan sel B sehingga baru muncul pada hari ke empat. Protein E di kenali

terlebih dahulu oleh Fc reseptor pada sel monosit. Kemudian terjadi reaksi imun seluler dan humoral yang akan membentuk antibodi.

Kadar IgM pada hari ke empat ditemukan lebih tinggi dibanding dengan IgG dan selanjutnya kadarnya terus menurun sampai pada titik yang sama dengan kadar IgG ditemukan pada hari ke 10. Sampai pada titik pertemuan ini kadar imunoglobulin M tidak meningkat lagi tetapi justru menurun, sedangkan pada IgG justru meningkat. Adanya titik pertemuan ini yang mengakibatkan terjadinya viremia. Hal ini sesuai dengan Bhamarapravati (2000). Kadar IgG dan IgM sama pada saat terjadi viremia. Pada manusia viremia terjadi 2 hari sebelum dan sesudah panas (Sugianto, 1998). Pada infeksi sekunder terjadi kenaikan IgG yang tinggi tetapi IgM tidak meninggi. Kadar IgM akan menurun terus setelah hari ke 30-60 (Beasley, 1994). Pada penelitian ini merupakan model infeksi primer karena mencit untuk pertama kalinya di imunisasi dengan protein E sehingga kadar IgM lebih tinggi dari pada kadar IgG.

Tingginya kadar IgM dibandingkan dengan kadar IgG pada infeksi primer disebabkan perlunya *isotype swtching* pada tingkat genetik dari sel B. Sel B pada keadaan native mempunyai reseptor permukaan berupa IgD dan IgM. Reseptor permukaan ini yang pertama kali mengenali antigen yang kemudian memproduksi antibodi sesuai dengan reseptornya. (Stites et al, 1987). Perbedaan kadar ini dapat dipakai untuk menentukan suatu infeksi primer atau sekunder (Innis, 1989).

Pada penelitian ini protein E yang diimunisasikan pada mencit telah menginduksi IgG dan IgM. Selain itu juga ditemukan subtipe yaitu IgG1, IgG2a, dan IgG2b. Pada gambar 5.4 dan gambar 5.5 tampak bahwa kadar

IgG>IgG1>IgG2a>IgG2b. Kadar imunoglobulin pada setiap tipe dan sub tipe mempunyai perbedaan yang bermakna ($p<0,05$). Hal ini kemungkinan disebabkan terlambatnya masing-masing imunoglobulin yang diinduksi oleh protein E dengan komposisi asam amino yang berbeda yang terletak pada tiga domain.

IgG2b dan IgG1 dapat mengaktivasi sistem komplemen melalui jalur klasik (Stites et al, 1987). Terbentuknya antibodi IgG dapat sebagai dasar uji hemaglutinasi inhibition (HI) dan *Dengue blot*. Antibodi IgG virus dengue dapat dideteksi puncaknya pada hari ke 14 setelah infeksi primer dan 2 hari setelah infeksi sekunder dengan rasio kadar IgM lebih tinggi dibanding dengan IgG yaitu 1,8:1 (Innis et al., 1989).

Keadaan ini biasa diikuti dengan perubahan imunologi seluler sehingga pada fase akut disertai aneosinofili, kenaikan basofil dan monosit. Limfosit T dan Limfosit B meningkat pada fase akut (Sutaryo 1992). Pada penelitian ini tidak di temukan adanya IgG3 dan IgG4. Pada penelitian epidemiologi terjadi perubahan kadar dari beberapa protein darah yaitu IgG1-4, C3, C3a, C4 Faktor B, faktor H, Faktor I, CRP, TNF alfa, pada penderita dengue dari berbagai macam tingkat berat ringannya penyakit. Tingkat kadar dari IgG1 dari serum yang dikumpulkan (1990, 1991, 1992) tidak berhubungan dengan berat ringannya penyakit (Thein et al., 1994).

Perbedaan dosis pada waktu pemberian protein E juga berpengaruh terhadap tingkat kadar dari imunoglobulin terutama IgG. Imunisasi protein dipengaruhi oleh cara pemberian, dosis pemberian, lokasi pemberian (Stites 1987). Dalam

penelitian ini yang berbeda adalah dosis pemberian, semakin lama harinya maka makin tampak perbedaan kadar antibodi yang dibentuk.

Dengan analisis regresi didapatkan pola kurva dari IgM berupa kurva eksponensial sedangkan pola kurva untuk IgG dan sub tipenya adalah kurva growth. Selanjutnya kedua kurva ini dapat dipakai sebagai model acuan untuk penelitian imunisasi protein E pada mencit.

6.3. Respon imunitas seluler

Setelah dilakukan pemeriksaan flowcytometer maka terlihat adanya peningkatan CD4 dan CD8. Protein E yang diimunisasikan ke mencit akan ditangkap oleh reseptor monosit, lalu monosit akan mengeluarkan interferon gamma ($IFN\gamma$) dan alfa ($IFN\alpha$). Pada penelitian ini yang dideteksi adalah produksi $IFN\gamma$ oleh CD4 dan CD8, sehingga semakin tinggi produksi $IFN\gamma$ maka semakin banyak pula sel yang terespon.

Populasi yang spesifik dari CD4 dan CD8 juga telah dilaporkan oleh Beasley (1994). CD4 melalui MHC kelas II akan melisiskan virus sedangkan CD8 akan melalui MHC kelas I akan memacu fagositosis. CD4 dan CD8 akan memacu sel *natural killer* (NK) untuk memproduksi IFN dan *tumor necosis factor* (TNF).

Selain sel CD4 dan CD8, maka sel non spesifik lain seperti sel NK, netrofil, granulosit lain, dan monosit juga berperan dalam mematikan sel yang terinfeksi virus dengue (Beasley, 1994).

Peningkatan CD4 sesuai dengan peningkatan kadar imunoglobulin yang diproduksi oleh mencit setelah imunisasi dengan protein E. Hal ini disebabkan

CD4 akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mempunyai kemampuan untuk memproduksi imunoglobulin. CD4 sendiri juga mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel memori. Sel memori mempunyai peranan penting dalam pengenalan kembali antigen dengan cepat, sehingga kadar imunoglobulin yang terbentuk akan semakin tinggi. Hal ini yang dipakai sebagai landasan dari cara bekerja dan waktu pemberian vaksin. Menurut Innis (1989), kadar IgG diproduksi dengan kadar paling tinggi adalah setelah hari ke 14 infeksi primer.

Virus bersifat intraseluler sehingga akan mengaktifkan CD8 terlebih dahulu melalui pengenalan reseptor sel fagosit. Setelah itu CD4 baru aktif dengan tujuan produksi imunoglobulin (Stites, 1987). Hal ini yang mungkin menjelaskan mengapa kadar CD8 lebih tinggi dari CD4.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan pada mencit setelah diimunisasi dengan protein E virus dengue, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

- Kadar IgM tinggi pada hari ke empat yang kemudian kadarnya terus menurun, sedangkan kadar IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b pada hari ke empat rendah yang selanjutnya kadarnya terus meningkat.
- Macam subtipe yang terinduksi oleh protein E virus dengue adalah IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b dan terjadi perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) diantara subtipe tersebut.
- Terjadi perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara imunisasi dengan dosis 500/ekor mg dan dosis 1 gram/ekor pada IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b.
- Terjadi peningkatan kadar CD4 sebesar 3,7% dan CD8 sebesar 4,1% pada mencit setelah imunisasi protein E virus dengue.

7.2 Saran

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kapan timbulnya viremia yang dikaitkan dengan profil IgM, IgG, dan sub tipenya.
- Dengan diketahuinya perbedaan induksi protein E terhadap IgM dan IgG serta sub tipenya pada mencit, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui determinan antigenik protein E.

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimum protein E yang diimunitasikan.

DAFTAR PUSTAKA

- 1999. Imported Dengue-Florida 1997-1998. From the Superintendent of Documents, US. Washington. Dec. 48(50): 1150-2
- Anderson, R., S. Wang, C. Osiowy, and AC. Issekutz. 1997. Activation of Endothelial Cells via Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection of Peripheral Blood Monocytes. *Journal of Virology*. June. 71(6): 4226-4232.
- Beasley, D. 1994. Preparation of Recombinant Dengue Virus Vaccine. Centre for Molecular Biotechnology. Queensland University. Australia.
- Bhamarapravati, N., Sutee, Y. 2000. Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine. Mahidol University. Thailand. *Vaccine*. May. Suppl 2:44-7
- Boonpucknavig, S., Lohachitranond, C., Nimmannitya, S. 1979. The Pattern and Nature of the Lymphocyte Population Response in Dengue Hemorrhagic Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 28: 885-889.
- Burke, DS., Nisalak, A., Johnson, DE., Scott, R. 1988. A Prospective Study of Dengue Infection in Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*;38: 172-180.
- Chu, M., GB. Jennings, C. Na'roef, H. Wulur, and TK. Samsi. 1992. A Study of Human Peripheral Blood Leucocytes from Dengue Immune Persons; Relationship between Fc Receptor Expression and Virus Growth. *Cermin Dunia Kedokteran Edisi Khusus*. No. 81. Hal. 72.
- Dacie, JW., Lewis, SM.1975. *Practical Hematology*. Ed. 5th. Churchill-Livingstone-Edinburgh-Beasley-New York. Pp.69-70 and 324.
- Despres, P., MP. Frenkiel, and V. Deubel. 1993. Differences between Cell Membrane Fusion Activities of Two Dengue Type-1 Isolates Reflect Modifications of Viral Structure. *J. Vir*. May. 26: 209-219.
- Durand, JP., L. Vallee, JJ. DePina, and H. Tolou. 2000. Isolation of a Dengue Type 1 Virus From a Soldier in West Africa. *Emerging Infectious Diseases*. 6(1): 1-3.
- Garcia, BB., HG. Dantes, EA. Ramirez, R. Montesano, A. Laura, V. Martinez, S. Ibanez, Bernal, G. Madrigal, Ayala, C. Ruiz, Matus, A. Flisser, and RT. Conyer. 1996. Potential Risk for Dengue Hemorrhagic Fever: The

- Isolation of Serotype Dengue-3 in Mexico. *Emerging Infection Diseases*. 2(2). 1-6.
- Halstead, SB., Udomsakdi, S., Singharaj, P., Nisalak, A. 1969. Dengue and Chikungunya Virus Infection in Man in Thailand, 1962-1964. III. Clinical, Epidemiological and Virological Observations on Disease in non-Indigenous White Persons. *Am. Trop. Med. Hyg.* ;18:984-96.
- Hanel, E., R. Hengeveld, N. Hunter, A. Ojo, and S. Valiquet, 1990. Dengue Virus. *Clin. Micro. Rev.* 3: 376-396.
- Ikeuchi, H. 1981. Immunopathological Analysis of Serum and Lymphocyte of DHF patients. *Proceeding of the First ICMR Seminar*. Nov. 21-22. 169-176.
- Innis, BL., Nisalak A., Nimmannitya S., 1989. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Characterize Dengue Infections Where Dengue and Japanese Encephalitis Cocirculate, *Am. J. Trop. Med.* 40:418-427.
- Kitayaporn, D. 1994. Current Status of the Knowledge on Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrom in Thailand. I. Epidemiology During the Last 5 Years. In *Mosquito Borne Diseases Bulletin*. Mar. 11(1):1-5.
- Kliks, SC., A. Nisalak, WE. Brandt, L. Wahl, and DS. Burke. 1989. Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Growth in Human Monocytes as a Risk Factor for Dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40(4): 444-451.
- Konishi, E., Yamaoka, M., Win, KS., Takada, K., Kurane, I., Mason, PW. 1999. DNA Vaccines for Dengue and Japanese Encephalitis. In *Proceeding International Seminar on Dengue Fever/Dengue Hemorrhagic Fever*. Oct. 139-144.
- Kuntarjanto. 1998. Epidemiologi dan Penanggulangan Penyakit DBD di Jawa Timur tahun 1993 s.d. 1997. *Seminar Demam Berdarah Dengue*. Surabaya. TDC Unair. 19 sep.: hal. 1-14.
- Lanciotti, RS., CH. Calisher, DJ. Gubler, GJ. Chang, and AV. Vorndam. 1992. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microb.* Mar. 30 (3): 545-551.
- Lawuyan, S. 1997. Dengue Hemorrhagic Fever in Surabaya. In *Proceeding Seminar on Tropical Diseases in Asia*. TDC Unair. Feb. 26.

- Leenaars, M., FM. Hendriksen, WA. De leeuw, F. Carat, P. Delahaut, R. Fischer, M. Halder, WC. Hanly, J. Hartinger, J. Hau, EB. Linbald, W. Nicklas, IM. Outschoorn, and DES. Stewart. 1994. The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop. 79-102.
- Malasit, P. 1987. Complement and Dengue Haemorrhagic Fever/Shock Syndrome Southeast Asian. *J. Trop. Med. Public Health*; 3: 316-320.
- McBride, WJH. GW. Burgess, and S. Vasudevan. 1997. Studies of Dengue Infection: Diagnostic Methods and Epidemiology in North Queensland. Departemen of Microbiology and Immunology. James Cook University of North Queensland. 1-5.
- Ng, MML., SY. Se Thoe, and AE. Ling. 1997. Immune Responses of Dengue Virus Infected Human Sera. In Proceeding Seminar on Tropical Diseases in Asia. TDC Unair. Feb. 28.
- O'Hanley, P., GB. Jennings, R. Larasati, S. Diegagunarsa, N. Pudjoprawoto, C. Ma'roef, N. Punjabi, H. Wulur, and TK. Samsi. 1992. Potential Pathogenics Roles of Acute Inflammatory Cytokines and HLA Status in DHF. *Cermin Dunia Kedokteran Edisi Khusus*. No. 81. Hal. 71.
- Pardue, S., and S. Ward. 1999. Viral Hemorrhagic Fevers: Assesing the Global Health Risk. *Emerging and Reemerging Disease*. ALS 398H.
- Rantam, FA. 1998. Aspek Virologi Demam Berdarah Dengue. Seminar Demam Berdarah Dengue. Surabaya. TDC Unair. 19 sep.: hal. 23-31.
- Rantam, FA., Soetjipto, and YP. Dachlan. 1999. Envelope (E) Protein is Once Alternative of a New Generation of Vaccines Development of Dengue Virus. In Proceeding International Seminar on Dengue Fever/Dengue Hemorrhagic Fever. Oct. 139-144.
- Rice, CM. 1996. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Field Virology*. 3th. Philadelphia. 931-954.
- Russel, PK., Yuill, TM., Nisalak, A., Udomsakdi, S., Gould, DJ., Winter, PE. 1968. An Insular Outbreak of Dengue Hemorrhagic Fever. II. Virologic and Serologic Studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*;17:600-8.
- Sangkawibha, N. 1994. Current Status of the Knowledge on Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrom in Thailand. II. Aetiology:

- Virological Studies. In Mosquito Borne Diseases Bulletin. Mar. 11(1):20-27.
- Sittisombut, N. 1994. Current Status of the Knowledge on Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrom in Thailand. II. Aetiology: Molecular Biology of Dengue Virus. In Mosquito Borne Diseases Bulletin. Mar. 11(1):6-19.
- Soegijanto, S. 1997. The Role of Biomolecular Study in Control of DHF. In Proceeding Seminar on Tropical Diseases in Asia. TDC Unair. Feb. 27.
- Soewondo, ES. 1998. Demam Berdarah Dengue Pada Orang Dewasa Gejala Klinik dan Penatalaksanaannya. Seminar Demam Berdarah Dengue. Surabaya. TDC Unair. 19 sep.: hal. 51-54.
- Stites PD., MD., Stobo DJ., MD., Wells JV., MD. 1987. Basic and Clinical Immunologi. Ed. 6th. Appleton and Lange. Connecticut New York. 669-689.
- Sugianto, D. dan TK. Samsi, 1992. Demam Berdarah Dengue Berat dengan Konfirmasi Virologik. Cermin Dunia Kedokteran Edisi Khusus. No. 81. Jakarta. hal. 42.
- Suroso, T. 1992. Kebijakan Nasional pada Demam Berdarah Dengue. Cermin Dunia Kedokteran Edisi Khusus. No. 81. Jakarta. hal. 14-18.
- Suroso, T. 1999. Epidemiological Situation of Dengue Hemorrhagic Fever and it's Control in Indonesia. In Proceeding International Seminar on Dengue Fever/Dengue Hemorrhagic Fever. Oct. 15-25.
- Sutaryo. 1992. Patogenesis dan Patofisiologi Demam Brdarah Dengue. Cermin Dunia Kedokteran Edisi Khusus. No. 81. Jakarta. hal. 35-39.
- Sutaryo, S. Rahmah, D. Wahyono, and W. Arthama. 1997. Dengue Monoclonal Antibody Production. In Proceeding Seminar on Tropical Diseases in Asia. TDC Unair. Feb. 29.
- Teo, KF., and PJ. Wright. 1997. Internal Proteolysis of the NS3 protein Specified by Dengue Virus 2. J. Gen. Vir. 78: 337-341
- Thein, S. 1994. Risk Factors in Dengue Haemorrhagic Fever. Thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy in the Tropical Health Program. University of Queensland. Mar. 1-3.

Wood, R., and J. Yusuf. 1997. Dengue Haemorrhagic Fever or Dengue Shock Syndrome Causes. School of Public Health. University of Texas. 1-2.

World Health Organization. 1986. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment and Control. Geneva.

LAMPIRAN

Lampiran 1a: Hasil Pemeriksaan ELISA Kadar IgM, IgG, IgG1, IgG2a, dan IgG2b pada Mencit Setelah Diimunisasi Protein E Dosis 500 mg

Kadar Imunoglobulin M dengan Dosis Fraksi Protein E 500 mg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.681	0.680	0.590	0.344	0.117	0.099	0.021
0.575	0.574	0.314	0.215	0.099	0.087	0.052
0.608	0.600	0.405	0.202	0.097	0.076	0.003
0.711	0.701	0.500	0.257	0.161	0.099	0.030
0.605	0.599	0.340	0.231	0.121	0.097	0.045
0.556	0.553	0.250	0.211	0.115	0.093	
0.405	0.401	0.199	0.179	0.105	0.077	
0.557	0.550	0.125	0.113	0.099	0.065	
0.557	0.500	0.250	0.227	0.121	0.091	
0.608	0.599	0.110	0.105	0.088	0.067	
0.505	0.480	0.200	0.199	0.112	0.092	
0.506	0.490	0.120	0.112	0.087	0.057	
0.577	0.495	0.150	0.145	0.107	0.069	
0.713	0.680	0.380	0.228	0.156	0.083	
0.681	0.620	0.275	0.225	0.125	0.072	

Kadar Imunoglobulin G1 dengan Dosis Fraksi Protein E 500 mg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.026	0.075	0.087	0.287	0.579	0.887	0.023
0.075	0.060	0.099	0.299	0.588	0.893	0.050
0.022	0.087	0.160	0.327	0.671	0.941	0.005
0.202	0.230	0.260	0.439	0.711	1.125	0.030
0.098	0.110	0.250	0.425	0.709	1.112	0.046
0.081	0.070	0.112	0.323	0.659	0.953	
0.079	0.080	0.130	0.342	0.673	0.977	
0.071	0.081	0.140	0.357	0.652	0.968	
0.070	0.075	0.135	0.341	0.713	1.135	
0.890	0.090	0.209	0.427	0.721	1.565	
0.085	0.058	0.123	0.327	0.531	0.891	
0.040	0.070	0.209	0.474	0.427	0.771	
0.048	0.080	0.239	0.481	0.499	0.811	
0.105	0.110	0.243	0.497	0.695	0.956	
0.098	0.098	0.207	0.419	0.789	1.560	

Kadar Immunoglobulin G dengan Dosis Fraksi Protein E 500 mg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.048	0.118	0.198	0.399	0.668	0.971	0.024
0.087	0.097	0.139	0.345	0.671	0.998	0.039
0.099	0.119	0.169	0.371	0.787	1.135	0.025
0.250	0.270	0.290	0.491	0.799	1.255	0.040
0.117	0.230	0.270	0.487	0.780	1.179	0.045
0.099	0.119	0.179	0.369	0.767	1.125	
0.101	0.120	0.188	0.398	0.785	1.198	
0.102	0.125	0.189	0.399	0.871	1.577	
0.099	0.118	0.199	0.411	0.831	1.517	
0.119	0.129	0.205	0.425	0.799	1.588	
0.101	0.112	0.159	0.499	0.676	0.979	
0.115	0.120	0.197	0.487	0.621	0.981	
0.099	0.119	0.187	0.479	0.616	0.988	
0.152	0.100	0.207	0.491	0.735	1.312	
0.098	0.099	0.144	0.469	0.791	1.587	

Kadar Immunoglobulin G2a dengan Dosis Fraksi Protein E 500 mg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.049	0.085	0.125	0.387	0.497	0.887	0.023
0.046	0.081	0.150	0.377	0.455	0.891	0.038
0.070	0.042	0.177	0.398	0.505	0.915	0.027
0.110	0.130	0.133	0.359	0.575	0.998	0.041
0.080	0.100	0.111	0.321	0.501	0.991	0.043
0.080	0.049	0.144	0.396	0.571	1.112	
0.060	0.079	0.159	0.412	0.525	0.979	
0.070	0.091	0.166	0.459	0.539	0.971	
0.071	0.092	0.168	0.487	0.624	1.125	
0.088	0.110	0.222	0.528	0.612	1.112	
0.084	0.054	0.175	0.527	0.423	0.877	
0.048	0.041	0.173	0.499	0.370	0.818	
0.047	0.067	0.182	0.537	0.391	0.797	
0.098	0.099	0.188	0.545	0.565	0.991	
0.096	0.120	0.227	0.597	0.597	1.101	

Kadar imunoglobulin G2b dengan Dosis Fraksi Protein E 500 mg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.081	0.047	0.169	0.321	0.465	0.887	0.019
0.048	0.088	0.163	0.341	0.412	0.879	0.037
0.070	0.045	0.179	0.229	0.345	0.789	0.026
0.099	0.112	0.212	0.237	0.461	0.891	0.040
0.085	0.109	0.207	0.302	0.497	0.994	0.043
0.085	0.055	0.177	0.386	0.498	0.897	
0.059	0.080	0.188	0.397	0.493	0.893	
0.069	0.099	0.198	0.452	0.489	0.899	
0.070	0.090	0.192	0.461	0.537	0.981	
0.080	0.115	0.217	0.496	0.533	0.979	
0.085	0.060	0.186	0.426	0.335	0.777	
0.048	0.057	0.182	0.419	0.299	0.689	
0.047	0.067	0.154	0.477	0.287	0.690	
0.090	0.117	0.227	0.496	0.411	0.872	
0.093	0.120	0.225	0.502	0.477	0.898	

Lampiran 1b: Hasil Pemeriksaan ELISA Kadar IgM, IgG, IgG1, IgG2a, dan IgG2b pada Mencit Setelah Diimunisasi Protein E Dosis 1 gram

Kadar Immunoglobulin M dengan Dosis Fraksi Protein E 1 gr/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.687	0.687	0.570	0.345	0.121	0.113	0.021
0.580	0.579	0.311	0.207	0.113	0.097	0.052
0.618	0.611	0.399	0.212	0.095	0.093	0.003
0.715	0.756	0.387	0.275	0.160	0.117	0.030
0.615	0.613	0.313	0.213	0.127	0.109	0.045
0.560	0.557	0.125	0.213	0.129	0.112	
0.425	0.451	0.187	0.180	0.115	0.091	
0.577	0.576	0.125	0.112	0.110	0.085	
0.581	0.497	0.225	0.225	0.123	0.117	
0.615	0.525	0.115	0.115	0.105	0.075	
0.521	0.485	0.222	0.188	0.117	0.123	
0.560	0.487	0.125	0.127	0.127	0.087	
0.587	0.494	0.155	0.130	0.118	0.072	
0.735	0.675	0.387	0.218	0.140	0.089	
0.692	0.618	0.309	0.216	0.127	0.091	

Kadar Immunoglobulin G1 dengan Dosis Fraksi Protein E 1 gr/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.069	0.074	0.093	0.296	0.688	0.982	0.023
0.085	0.066	0.098	0.311	0.678	0.987	0.050
0.054	0.091	0.178	0.333	0.782	1.112	0.005
0.225	0.240	0.286	0.451	0.813	1.325	0.030
0.099	0.125	0.275	0.423	0.827	1.224	0.046
0.099	0.075	0.137	0.327	0.778	1.124	
0.093	0.087	0.130	0.372	0.788	1.114	
0.089	0.080	0.141	0.367	0.765	1.113	
0.087	0.076	0.137	0.331	0.833	1.327	
0.091	0.084	0.215	0.445	0.861	1.675	
0.097	0.125	0.132	0.328	0.932	0.997	
0.070	0.127	0.213	0.473	0.637	0.896	
0.081	0.139	0.259	0.482	0.699	0.978	
0.215	0.155	0.244	0.496	0.728	1.117	
0.099	0.085	0.270	0.412	0.979	1.567	

Kadar Immunoglobulin G dengan Dosis Fraksi Protein E 1 gr/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.099	0.127	0.197	0.497	0.887	1.124	0.024
0.095	0.099	0.149	0.478	0.888	1.158	0.039
0.098	0.125	0.159	0.525	0.971	1.352	0.025
0.276	0.287	0.297	0.682	1.135	1.423	0.040
0.130	0.254	0.282	0.676	1.127	1.327	0.045
0.112	0.181	0.187	0.565	1.098	1.250	
0.118	0.117	0.198	0.572	1.118	1.315	
0.105	0.135	0.190	0.562	1.257	1.668	
0.099	0.140	0.201	0.641	1.128	1.619	
0.127	0.155	0.215	0.625	1.092	1.679	
0.119	0.212	0.179	0.645	0.898	1.139	
0.125	0.220	0.198	0.681	0.891	1.151	
0.110	0.157	0.178	0.671	0.876	1.211	
0.176	0.189	0.235	0.783	1.078	1.417	
0.099	0.119	0.247	0.696	1.235	1.678	

Kadar Immunoglobulin G2a dengan Dosis Fraksi Protein E 1 gr/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.059	0.097	0.137	0.389	0.568	0.991	0.023
0.057	0.094	0.169	0.387	0.571	0.979	0.038
0.081	0.079	0.172	0.399	0.595	1.112	0.027
0.109	0.185	0.123	0.396	0.783	1.102	0.041
0.079	0.112	0.117	0.341	0.593	1.121	0.043
0.081	0.054	0.176	0.411	0.787	1.250	
0.061	0.081	0.166	0.417	0.727	1.125	
0.069	0.090	0.188	0.479	0.743	1.131	
0.070	0.087	0.271	0.497	0.831	1.235	
0.085	0.117	0.202	0.588	0.804	1.115	
0.087	0.055	0.168	0.578	0.529	0.987	
0.049	0.043	0.176	0.512	0.452	0.992	
0.050	0.068	0.180	0.567	0.461	0.879	
0.089	0.098	0.176	0.593	0.775	1.115	
0.095	0.137	0.217	0.616	0.746	1.211	

Kadar Imunoglobulin G2b dengan Dosis Fraksi Protein E 1 mg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.087	0.087	0.177	0.335	0.452	0.941	0.019
0.050	0.077	0.173	0.363	0.352	0.951	0.037
0.071	0.054	0.198	0.327	0.413	1.102	0.026
0.097	0.109	0.312	0.286	0.517	0.979	0.040
0.083	0.111	0.371	0.312	0.492	1.115	0.043
0.090	0.057	0.199	0.393	0.499	1.116	
0.060	0.083	0.198	0.412	0.491	1.098	
0.068	0.099	0.210	0.487	0.427	1.099	
0.083	0.091	0.213	0.489	0.525	1.130	
0.081	0.123	0.227	0.495	0.513	1.097	
0.098	0.063	0.197	0.416	0.413	0.978	
0.067	0.054	0.198	0.439	0.359	0.879	
0.056	0.071	0.175	0.488	0.269	0.852	
0.990	0.083	0.259	0.499	0.435	1.098	
0.092	0.186	0.285	0.517	0.490	1.116	

Lampiran 2a: Hasil Perhitungan Regresi Model Kurva Imunoglobulin dengan Dosis 500 mg/ekor

Case Summaries^a

	Case Number	TIME	IGM	IGG	IGG1	IGG2A	IGG2B
1	1	1	.590	.112	.133	.073	.074
2	2	2	.568	.133	.092	.083	.084
3	3	3	.281	.195	.174	.167	.192
4	4	4	.200	.435	.384	.455	.396
5	5	5	.114	.746	.641	.517	.436
6	6	6	.082	1.226	1.036	.971	.868
Total	N	6	6	6	6	6	6

a. Limited to first 100 cases.

Dependent variable.. IGM Method.. EXPONENT
Listwise Deletion of Missing Data
Multiple R .98624
R Square .97267
Adjusted R Square .96584
Standard Error .15073

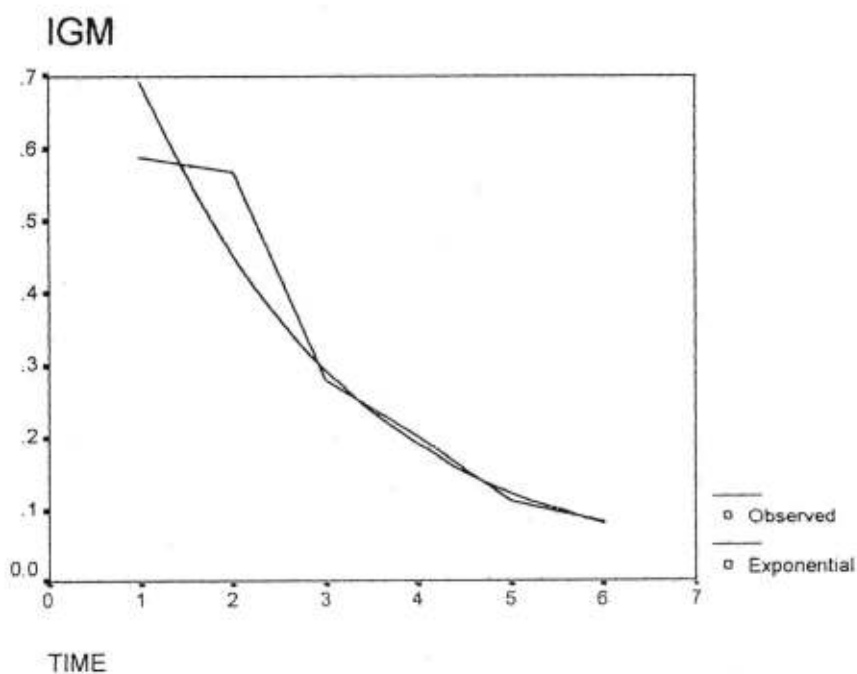
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	3.2348148	3.2348148
Residuals	4	.0908824	.0227206

F = 142.37359 Signif F = .0003

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TIME	-.429938	.036032	-.986242	-11.932	.0003
(Constant)	1.064455	.149370		7.126	.0020



Dependent variable.. IGG
 Listwise Deletion of Missing Data
 Method.. GROWTH
 Multiple R .98544
 R Square .97109
 Adjusted R Square .96387
 Standard Error .18483

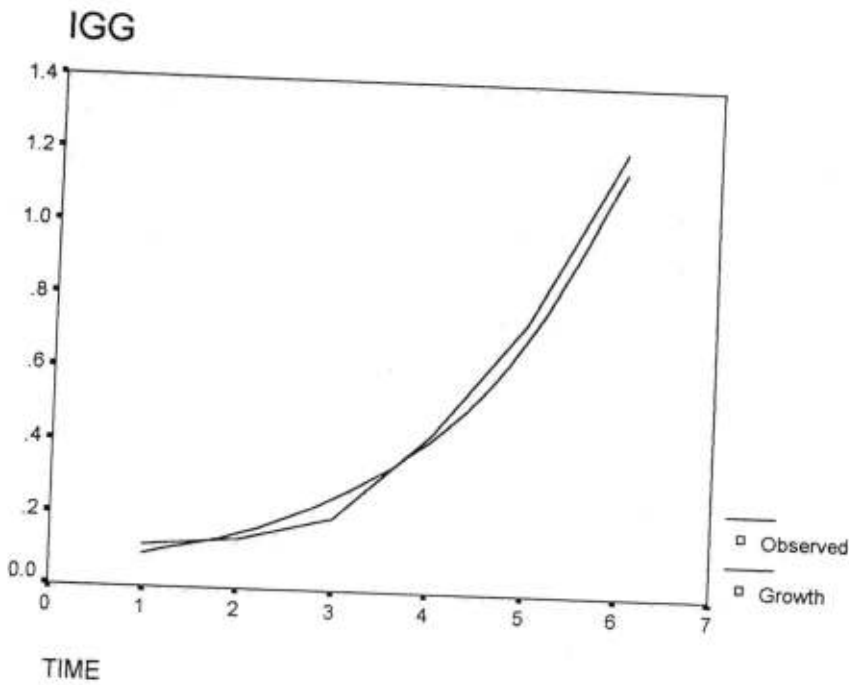
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	4.5903555	4.5903555
Residuals	4	.1366475	.0341619

 F = 134.37070 Signif F = .0003

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TIME	.512158	.044183	.985440	11.592	.0003
(Constant)	-2.919452	.172067		-16.967	.0001

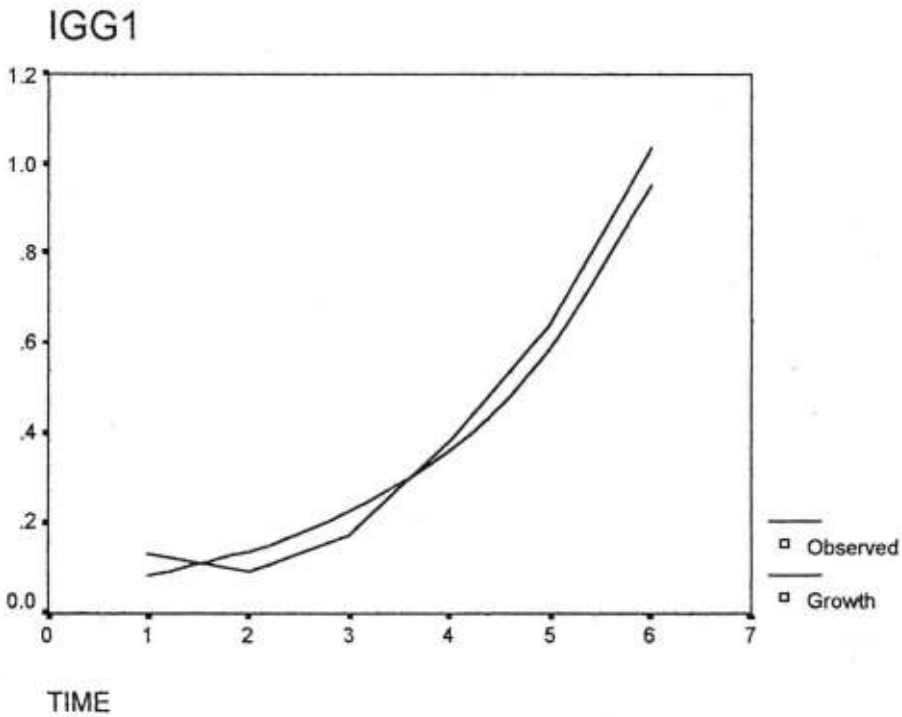


Dependent variable.. IGG1 Method.. GROWTH
Listwise Deletion of Missing Data
Multiple R .94938
R Square .90133
Adjusted R Square .87666
Standard Error .33437

Analysis of Variance:
 DF Sum of Squares Mean Square
Regression 1 4.0852536 4.0852536
Residuals 4 .4472132 .1118033

F = 36.53965 Sig F = .0038

----- Variables in the Equation -----
Variable B SE B Beta T Sig T
TIME .483159 .079930 .949385 6.045 .0038
(Constant) -2.945508 .311282 -9.463 .0007



Dependent variable.. IGG2A

Method.. GROWTH

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .97917
 R Square .95878
 Adjusted R Square .94847
 Standard Error .24080

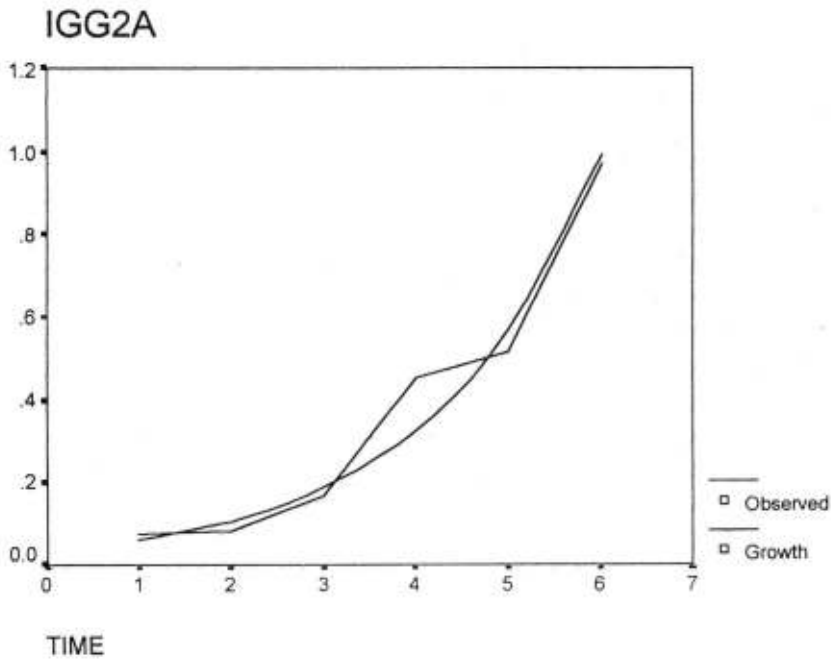
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	5.3947912	5.3947912
Residuals	4	.2319425	.0579856

F = 93.03672 Signif F = .0006

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TIME	.555224	.057563	.979172	9.646	.0006
(Constant)	-3.339422	.224174		-14.897	.0001



Dependent variable.. IGG2B
 Method.. GROWTH
 Listwise Deletion of Missing Data
 Multiple R .98115
 R Square .96265
 Adjusted R Square .95331
 Standard Error .21162

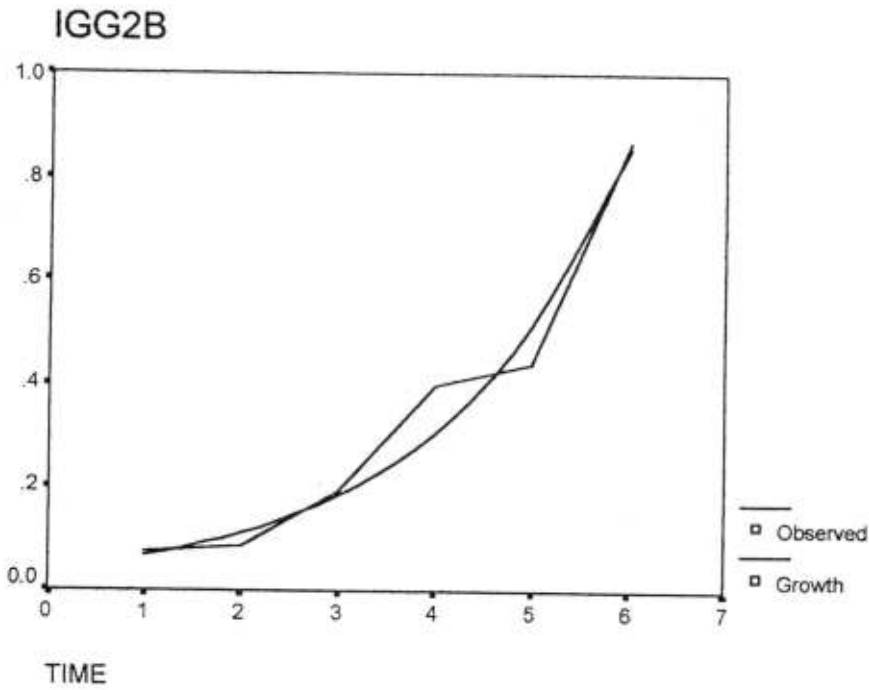
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	4.6161376	4.6161376
Residuals	4	.1791243	.0447811

F = 103.08234 Signif F = .0005

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TIME	.513594	.050586	.981145	10.153	.0005
(Constant)	-3.235899	.197003		-16.426	.0001



Lampiran 2b: Hasil Perhitungan Regresi Model Kurva Imunoglobulin dengan Dosis 1gr/ekor

Case Summaries^a

	Case Number	TIME	IGM	IGG1	IGG	IGG2A	IGG2B
1	1	1	.605	.104	.126	.075	.138
2	2	2	.574	.109	.168	.093	.090
3	3	3	.264	.187	.207	.176	.226
4	4	4	.198	.390	.620	.478	.417
5	5	5	.122	.786	1.045	.664	.443
6	6	6	.098	1.169	1.367	1.090	1.037
Total	N	6	6	6	6	6	6

a. Limited to first 100 cases.

Dependent variable.: IGM Method.: EXPONENT

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .98173

R Square .96379

Adjusted R Square .95474

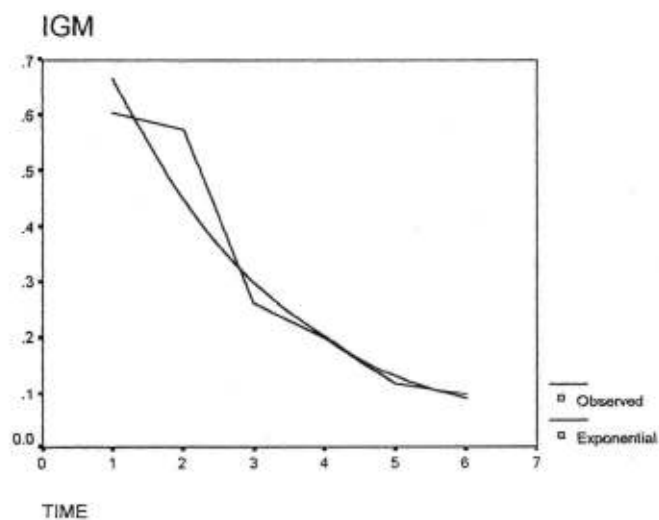
Standard Error .16251

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	2.8118295	2.8118295
Residuals	4	.1056421	.0264105
F =	106.46620	Signif F =	.0005

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TIME	-.400844	.038848	-.981728	-10.318	.0005
(Constant)	.996904	.150823		6.610	.0027



Dependent variable.. IGG Method.. GROWTH

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .97509
 R Square .95080
 Adjusted R Square .93850
 Standard Error .25162

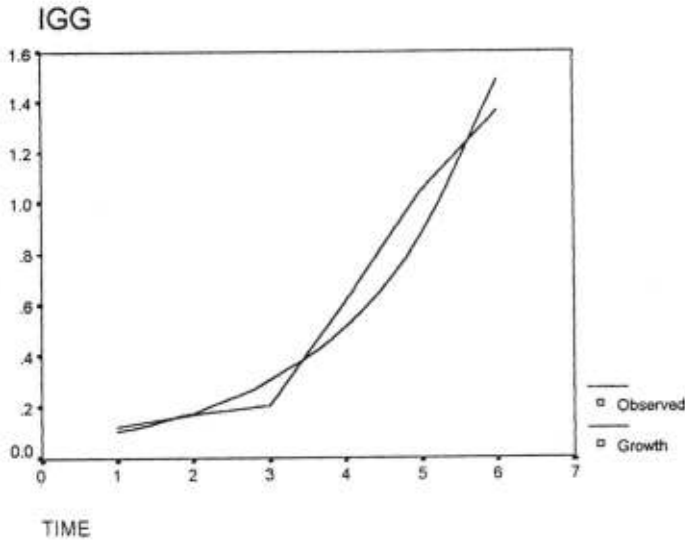
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	4.8943725	4.8943725
Residuals	4	.2532451	.0633113

F = 77.30649 Signif F = .0009

Variables in the Equation

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TIME	.528846	.060148	.975091	8.792	.0009
(Constant)	-2.776172	.234243		-11.852	.0003



Dependent variable.. IGG1 Method.. GROWTH

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .98185
 R Square .96403
 Adjusted R Square .95504
 Standard Error .21692

Analysis of Variance:

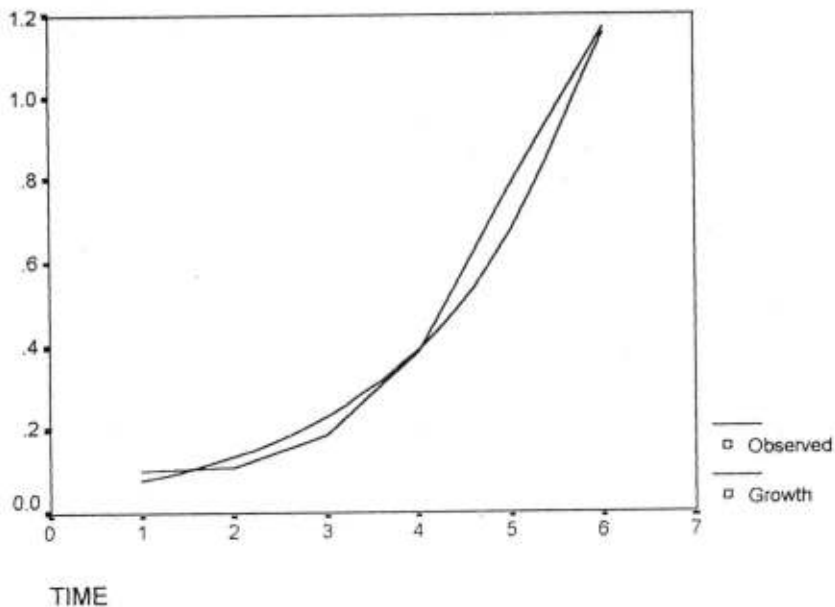
	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	5.0446912	5.0446912
Residuals	4	.1882136	.0470534

F = 107.21204 Signif F = .0005

Variables in the Equation

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TIME	.536906	.051853	.981852	10.354	.0005
(Constant)	-3.077553	.201940		-15.240	.0001

IGG1



Dependent variable: IGG2A Method: GROWTH
 Listwise Deletion of Missing Data
 Multiple R .98618
 R Square .97254
 Adjusted R Square .96568
 Standard Error .20377

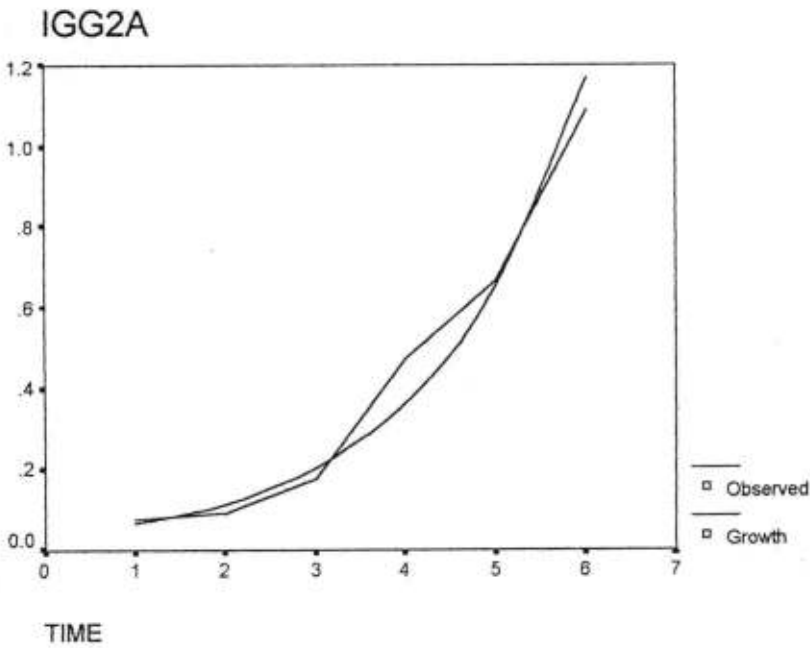
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	5.8827347	5.8827347
Residuals	4	.1660809	.0415202

F = 141.68358 Signif F = .0003

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TIME	.579790	.048709	.986176	11.903	.0003
(Constant)	-3.323735	.189695		-17.521	.0001



Dependent variable.. IGG2B Method.. GROWTH
 Listwise Deletion of Missing Data
 Multiple R .93453
 R Square .87334
 Adjusted R Square .84168
 Standard Error .35218

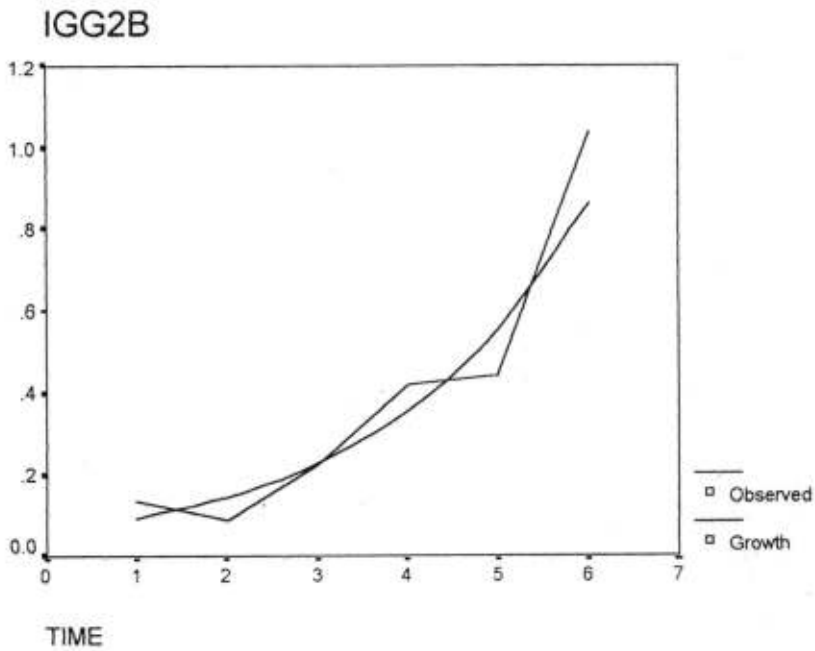
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	3.4209532	3.4209532
Residuals	4	.4961293	.1240323

F = 27.58114 Signif F = .0063

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TIME	.442135	.084188	.934528	5.252	.0063
(Constant)	-2.801990	.327864		-8.546	.0010



Lampiran 3a: Hasil Perhitungan Perbandingan Imunoglobulin pada Dosis 500 mg/ekor Dengan Metode Anova.

```

----- O N E W A Y -----
Variable DATA4H
By Variable JENIS Jenis antibodi
Analysis of Variance
Sum of Mean
Source D.F. Squares Squares F Ratio F Prob.
Between Groups 3 .0391 .0130 1.0793 .3654
Within Groups 56 .6763 .0121
Total 59 .7154

```

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
3.7248	3	56	.016

```

----- O N E W A Y -----
Variable DATA4H
By Variable JENIS Jenis antibodi
Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05

```

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .0777 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.83
 - No two groups are significantly different at the .050 level
 Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1	Grp 3	Grp 4	Grp 2	Grp 1
Group				
Mean	.0731	.0739	.1124	.1327

```

----- O N E W A Y -----
Variable DATA4H
By Variable JENIS Jenis antibodi
Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05
The difference between two means is significant if
MEAN(J) - MEAN(I) >= .0777 * RANGE * SQRT(1/N(I) + 1/N(J))
with the following value(s) for RANGE:
Step 2 3 4
RANGE 2.83 2.98 3.08
- No two groups are significantly different at the .050 level

```

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1	Grp 3	Grp 4	Grp 2	Grp 1
Group				
Mean	.0731	.0739	.1124	.1327

```

----- O N E W A Y -----
Variable DATA7H
By Variable JENIS Jenis antibodi
Analysis of Variance
Sum of Mean
Source D.F. Squares Squares F Ratio F Prob.
Between Groups 3 .0254 .0085 6.0388 .0012
Within Groups 56 .0786 .0014
Total 59 .1040

```

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.

.3474 3 56 .791

----- O N E W A Y -----

Variable DATA7H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq .0265 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.83

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G
 r r r r
 p p p p
 3 4 1 2

Mean	JENIS
.0827	Grp 3
.0841	Grp 4
.0916	Grp 1
.1330	Grp 2

* * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1
 Group Grp 3 Grp 4 Grp 1
 Mean .0827 .0841 .0916

Subset 2
 Group Grp 2
 Mean .1330

----- O N E W A Y -----

Variable DATA7H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq .0265 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4
RANGE	2.83	2.98	3.08

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G
 r r r r
 p p p p
 3 4 1 2

Mean	JENIS
.0827	Grp 3
.0841	Grp 4
.0916	Grp 1
.1330	Grp 2

* * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1
 Group Grp 3 Grp 4 Grp 1
 Mean .0827 .0841 .0916

Subset 2
 Group Grp 2
 Mean .1330

----- O N E W A Y -----

Variable	DATA10H	Jenis antibodi		Analysis of Variance		F	F
By Variable	JENIS			Sum of	Mean	Ratio	Prob.
Source		D.F.	Squares	Squares			
Between Groups		3	.0084		.0028	1.6625	.1855
Within Groups		56	.0946		.0017		
Total		59	.1030				

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
7.7350	3	56	.000

----- O N E W A Y -----

Variable DATA10H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq .0291 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.83
 - No two groups are significantly different at the .050 level
 Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 1	Grp 4	Grp 2
Mean	.1667	.1735	.1917	.1947

----- O N E W A Y -----

Variable DATA10H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq .0291 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:
 Step 2 3 4
 RANGE 2.83 2.98 3.08
 - No two groups are significantly different at the .050 level
 Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 1	Grp 4	Grp 2
Mean	.1667	.1735	.1917	.1947

----- O N E W A Y -----

Variable	DATA15H	Jenis antibodi		Analysis of Variance		F	F
By Variable	JENIS			Sum of	Mean	Ratio	Prob.
Source		D.F.	Squares	Squares			
Between Groups		3	.0492		.0164	2.8537	.0453
Within Groups		56	.3216		.0057		
Total		59	.3707				

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
1.7951	3	56	.159

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable DATA15H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq .0536 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.83

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G
 r r r r
 p p p p
 1 4 2 3

Mean	JENIS	
.3843	Grp 1	
.3961	Grp 4	
.4347	Grp 2	
.4553	Grp 3	* *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 1	Grp 4	Grp 2
Mean	.3843	.3961	.4347

Subset 2

Group	Grp 2	Grp 3
Mean	.4347	.4553

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable DATA15H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq .0536 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4
RANGE	2.83	2.98	3.08

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G
 r r r r
 p p p p
 1 4 2 3

Mean	JENIS	
.3843	Grp 1	
.3961	Grp 4	
.4347	Grp 2	
.4553	Grp 3	* *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 1	Grp 4	Grp 2
Mean	.3843	.3961	.4347

Subset 2

Group	Grp 2	Grp 3
Mean	.4347	.4553

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable	DATA22H	Jenis antibodi		Analysis of Variance		F	F
By Variable	JENIS			Sum of	Mean	Ratio	Prob.
Source		D.F.	Squares	Squares			
Between Groups		3	.8417		.2806	39.1267	.0000
Within Groups		56	.4016		.0072		
Total		59	1.2432				

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
.2952	3	56	.829

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable DATA22H
 By Variable JENIS Jenis antibodi

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .0599 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.83

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

		G G G G
		r r r r
		p p p p
		4 3 1 2
Mean	JENIS	
.4359	Grp 4	
.5167	Grp 3	*
.6411	Grp 1	* *
.7465	Grp 2	* * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1	
Group	Grp 4
Mean	.4359

Subset 2	
Group	Grp 3
Mean	.5167

Subset 3	
Group	Grp 1
Mean	.6411

Subset 4	
Group	Grp 2
Mean	.7465

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable DATA22H
 By Variable JENIS Jenis antibodi

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .0599 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4
------	---	---	---

RANGE 2.83 2.98 3.08

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G
r r r r
p p p p
4 3 1 2

Mean	JENIS	
.4359	Grp 4	
.5167	Grp 3	*
.6411	Grp 1	* *
.7465	Grp 2	* * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 4
Mean	.4359

Subset 2

Group	Grp 3
Mean	.5167

Subset 3

Group	Grp 1
Mean	.6411

Subset 4

Group	Grp 2
Mean	.7465

----- O N E W A Y -----

Variable	DATA30H	Jenis antibodi				
By Variable	JENIS	Analysis of Variance				
Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.	
Between Groups	3	1.0230	.3410	10.2053	.0000	
Within Groups	56	1.8712	.0334			
Total	59	2.8941				

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
5.2948	3	56	.003

----- O N E W A Y -----

Variable DATA30H
By Variable JENIS Jenis antibodi

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .1293 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
with the following value(s) for RANGE: 2.83

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G
r r r r
p p p p
4 3 1 2

Mean	JENIS	
.8677	Grp 4	
.9710	Grp 3	
1.0363	Grp 1	*

1.2260 Grp 2 * * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

```

Subset 1
Group      Grp 4      Grp 3
Mean      .8677      .9710
-----
Subset 2
Group      Grp 3      Grp 1
Mean      .9710      1.0363
-----
Subset 3
Group      Grp 2
Mean      1.2260
-----
    
```

----- O N E W A Y -----

Variable DATA30H

By Variable JENIS Jenis antibodi

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$MEAN(J) - MEAN(I) \geq .1293 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4
RANGE	2.83	2.98	3.08

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

```

G G G G
r r r r
P P P P
4 3 1 2
    
```

Mean	JENIS	
.8677	Grp 4	
.9710	Grp 3	
1.0363	Grp 1	*
1.2260	Grp 2	* * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

```

Subset 1
Group      Grp 4      Grp 3
Mean      .8677      .9710
-----
Subset 2
Group      Grp 3      Grp 1
Mean      .9710      1.0363
-----
Subset 3
Group      Grp 2
Mean      1.2260
-----
    
```

Lampiran 3b: Hasil Perhitungan Perbandingan Imunoglobulin pada Dosis 1 gr/ekor Dengan Metode Anova.

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable	DATA4H	Jenis antibodi		Analysis of Variance		F	F
By Variable	JENIS			Sum of	Mean	Ratio	Prob.
Source		D.F.	Squares	Squares			
Between Groups		3	.0350		.0117	.7694	.5160
Within Groups		56	.8483		.0151		
Total		59	.8833				

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
2.7424	3	56	.052

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable DATA4H
By Variable JENIS Jenis antibodi

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .0870 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
with the following value(s) for RANGE: 2.83

- No two groups are significantly different at the .050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 1	Grp 2	Grp 4
Mean	.0747	.1035	.1259	.1382

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable DATA4H
By Variable JENIS Jenis antibodi

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05
The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .0870 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4
RANGE	2.83	2.98	3.08

- No two groups are significantly different at the .050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 1	Grp 2	Grp 4
Mean	.0747	.1035	.1259	.1382

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable	DATA7H	Jenis antibodi		Analysis of Variance		F	F
By Variable	JENIS			Sum of	Mean	Ratio	Prob.
Source		D.F.	Squares	Squares			

Between Groups	3	.0591	.0197	10.4499	.0000
Within Groups	56	.1055	.0019		
Total	59	.1646			

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
2.0153	3	56	.122

----- O N E W A Y -----

Variable DATA7H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .0307 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.83
 (*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	JENIS	
.0899	Grp 4	
.0931	Grp 3	
.1086	Grp 1	
.1678	Grp 2	* * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 4	Grp 3	Grp 1
Mean	.0899	.0931	.1086

Subset 2

Group	Grp 2
Mean	.1678

----- O N E W A Y -----

Variable DATA7H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .0307 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4
RANGE	2.83	2.98	3.08

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	JENIS	
.0899	Grp 4	
.0931	Grp 3	
.1086	Grp 1	
.1678	Grp 2	* * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1
 Group Grp 4 Grp 3 Grp 1
 Mean .0899 .0931 .1086

Subset 2
 Group Grp 2
 Mean .1678

----- O N E W A Y -----

Variable	DATA10H		Jenis antibodi		Analysis of Variance	
By Variable	JENIS		Sum of	Mean	F	F
Source	D.F.	Squares	Squares	Ratio	Prob.	
Between Groups	3	.0222	.0074	2.6995	.0543	
Within Groups	56	.1537	.0027			
Total	59	.1760				

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
4.3696	3	56	.008

----- O N E W A Y -----

Variable DATA10H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .0370 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.83
 (*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G
 r r r r
 p p p p
 3 1 2 4

Mean JENIS
 .1759 Grp 3
 .1872 Grp 1
 .2075 Grp 2
 .2261 Grp 4

**

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1
 Group Grp 3 Grp 1 Grp 2
 Mean .1759 .1872 .2075

Subset 2
 Group Grp 2 Grp 4
 Mean .2075 .2261

----- O N E W A Y -----

Variable DATA10H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .0370 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$

with the following value(s) for RANGE:

Step 2 3 4
 RANGE 2.83 2.98 3.08

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

```

                G G G G
                r r r r
                p p p p
                3 1 2 4

    Mean        JENIS
    .1759        Grp 3
    .1872        Grp 1
    .2075        Grp 2
    .2261        Grp 4        *
    
```

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

```

Subset 1
Group            Grp 3            Grp 1            Grp 2
Mean            .1759            .1872            .2075
-----
Subset 2
Group            Grp 1            Grp 2            Grp 4
Mean            .1872            .2075            .2261
-----
    
```

----- O N E W A Y -----

```

Variable    DATA15H
By Variable    JENIS            Jenis antibodi

Analysis of Variance
Source            D.F.            Sum of            Mean            F            F
                                         Squares            Squares            Ratio    Prob.
Between Groups            3            .4741            .1580            23.9181    .0000
Within Groups            56            .3700            .0066
Total                    59            .8442

Levene Test for Homogeneity of Variances
Statistic    df1    df2            2-tail Sig.
.7786        3        56            .511
    
```

----- O N E W A Y -----

```

Variable    DATA15H
By Variable    JENIS            Jenis antibodi

Multiple Range Tests:    LSD test with significance level .05
The difference between two means is significant if
MEAN(J)-MEAN(I) >= .0575 * RANGE * SQRT(1/N(I) + 1/N(J))
with the following value(s) for RANGE: 2.83
(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle
    
```

```

                G G G G
                r r r r
                P P P P
                1 4 3 2

    Mean        JENIS
    .3898        Grp 1
    .4172        Grp 4
    .4780        Grp 3        * *
    .6199        Grp 2        * * *
    
```

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group Grp 1 Grp 4
 Mean .3898 .4172

 Subset 2

Group Grp 3
 Mean .4780

 Subset 3

Group Grp 2
 Mean .6199

----- O N E W A Y -----

Variable DATA15H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .0575 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:

Step 2 3 4
 RANGE 2.83 2.98 3.08

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

 G G G G
 r r r r
 p p p p
 1 4 3 2

Mean JENIS
 .3898 Grp 1
 .4172 Grp 4
 .4780 Grp 3
 .6199 Grp 2

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group Grp 1 Grp 4
 Mean .3898 .4172

 Subset 2

Group Grp 3
 Mean .4780

 Subset 3

Group Grp 2
 Mean .6199



----- O N E W A Y -----

Variable DATA22H
 By Variable JENIS Jenis antibodi

Source	D.F.	Analysis of Variance		F Ratio	F Prob.
		Sum of Squares	Mean Squares		
Between Groups	3	2.8355	.9452	77.8433	.0000
Within Groups	56	.6799	.0121		
Total	59	3.5154			

Levene Test for Homogeneity of Variances
 Statistic df1 df2 2-tail Sig.
 5.1755 3 56 .003

----- O N E W A Y -----

Variable DATA22H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq .0779 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.83

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G
 r r r r
 p p p p
 4 3 1 2

Mean	JENIS	
.4431	Grp 4	
.6643	Grp 3	*
.7859	Grp 1	**
1.0453	Grp 2	***

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

- Subset 1
 Group Grp 4
 Mean .4431

- Subset 2
 Group Grp 3
 Mean .6643

- Subset 3
 Group Grp 1
 Mean .7859

- Subset 4
 Group Grp 2
 Mean 1.0453

----- O N E W A Y -----

Variable DATA22H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq .0779 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4
RANGE	2.83	2.98	3.08

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G
 r r r r
 p p p p
 4 3 1 2

Mean	JENIS	
.4431	Grp 4	
.6643	Grp 3	*
.7859	Grp 1	**

1.0453 Grp 2 * * *
 Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

```
Subset 1
Group      Grp 4
Mean       .4431
-----
Subset 2
Group      Grp 3
Mean       .6643
-----
Subset 3
Group      Grp 1
Mean       .7859
-----
Subset 4
Group      Grp 2
Mean       1.0453
-----
```

----- O N E W A Y -----

Variable	DATA30H	Jenis antibodi		Analysis of Variance		F	F
By Variable	JENIS			Sum of	Mean	Ratio	Prob.
Source		D.F.	Squares	Squares			
Between Groups		3	.9466		.3155	11.2539	.0000
Within Groups		56	1.5702		.0280		
Total		59	2.5168				

Levene Test for Homogeneity of Variances
 Statistic dfl df2 2-tail Sig.
 4.2336 3 56 .009

----- O N E W A Y -----

Variable DATA30H
 By Variable JENIS Jenis antibodi
 Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
 The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq .1184 * RANGE * SQRT(1/N(I) + 1/N(J))$
 with the following value(s) for RANGE: 2.83
 (*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

```

G G G G
r r r r
p p p p
4 3 1 2
```

Mean	JENIS	
1.0367	Grp 4	
1.0897	Grp 3	
1.1692	Grp 1	*
1.3674	Grp 2	* * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

```
Subset 1
Group      Grp 4      Grp 3
Mean       1.0367     1.0897
-----
```

```

Subset 2
Group      Grp 3      Grp 1
Mean      1.0897     1.1692
-----

```

```

Subset 3
Group      Grp 2
Mean      1.3674
-----

```

----- O N E W A Y -----

Variable DATA30H

By Variable JENIS Jenis antibodi

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$\text{MEAN}(J) - \text{MEAN}(I) \geq .1184 * \text{RANGE} * \text{SQRT}(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

```

Step      2      3      4
RANGE    2.83  2.98  3.08

```

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

```

G G G G
r r r r
p p p p
4 3 1 2

```

```

Mean      JENIS
1.0367    Grp 4
1.0897    Grp 3
1.1692    Grp 1
1.3674    Grp 2
          *
          * * *

```

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

```

Subset 1
Group      Grp 4      Grp 3
Mean      1.0367     1.0897
-----

```

```

Subset 2
Group      Grp 3      Grp 1
Mean      1.0897     1.1692
-----

```

```

Subset 3
Group      Grp 2
Mean      1.3674
-----

```