

TESIS

RESPON IMUN IMUNOGLOBULIN M DAN IMUNOGLOBULIN G PADA MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIIMUNISASI PROTEIN PrM VIRUS DENGUE

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Darmawati

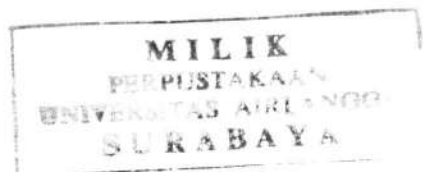
PROGRAM STUDI IMUNOLOGI
PASCASARJANA UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001

RESPON IMUN IMUNOGLOBULIN M DAN IMUNOGLOBULIN G
PADA MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIIMUNISASI
PROTEIN PrM VIRUS DENGUE

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Immunologi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Oleh :

DARMAWATI
NIM. 099913411/M

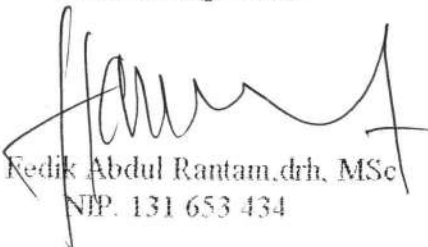
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Tanggal 16 Juli 2001

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 16 JULI 2001


Oleh

Pembimbing Ketua



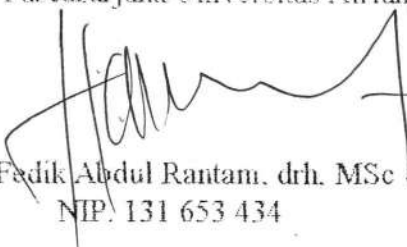
Dr. Fedik Abdul Rantam, drh, MSc
NIP. 131 653 434

Pembimbing



dr. Soetjipto, MS, PhD
NIP. 130 687 606

Mengetahui
Ketua Program Studi Imunologi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



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

Telah diuji pada

Tanggal 16 Juli 2001

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Sri Subekti, DEA, drh

Anggota : 1. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh, MSc

2. Soetjipto, dr, MS, PhD

3. Dr. Anita Yuliati, MS, drg

4. Dr. Setiawan Koedarto, drh, MSc

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadiran Allah yang maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr. Fedik Abdul Rantam, drh, MSc, sebagai pembimbing ketua dan sebagai Ketua Program Studi Imunologi yang dari awal hingga akhir pendidikan dengan penuh kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, saran, kemudahan-kemudahan dan kesempatan yang baik untuk menyelesaikan studi saya sehingga terselesainya tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Soetjipto, dr, MS, PhD, sebagai pembimbing yang dengan penuh kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, dan saran sehingga terselesainya tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof. H. Soedarto, dr, DTMH, PhD atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Moh. Amin, dr, Ip P, atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Direktur TDC Universitas Airlangga Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, MSc, dr., atas ijin untuk menggunakan fasilitas serta peralatan di Lab. DHF dan Tissue culture yang telah membantu di TDC Universitas Airlangga dan kepada rekan-rekan Imunologi Husna, yayuk, Ira 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 ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada orang tua dan suami yang telah memberikan dorongan moril dan doa restunya demi terselesainya tesis ini.

RINGKASAN

RESPON IMUN IMUNOGLOBULIN M DAN IMUNOGLOBULIN G PADA MENCIT (*Mus Musculus*) YANG DIIMUNISASI PROTEIN PrM 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 *Aedes aegypti* dan *Aedes 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 PrM 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 PrM virus Dengue pada mencit.

Telah dilakukan penelitian terhadap 40 ekor mencit *strain* BALB/c yang terbagi dalam tiga kelompok, terdiri dari 10 ekor mencit yang diberi PBS sebagai kontrol, 15 ekor mencit yang diberi fraksi protein PrM dengan dosis 500 µg/ekor, dan 15 ekor mencit yang diberi fraksi protein PrM dengan dosis 1000 µg/ekor. Selanjutnya serum mencit diambil pada hari ke 4, 7, 10, 15, 22, 30 kemudian dianalisa dengan ELISA untuk mengukur kadar imunoglobulin yang terbentuk.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna kadar imunoglobulin antara IgM dan IgG, juga antara IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b baik pada dosis 500 µg/ekor atau pada dosis 1000 µg/ekor.

SUMMARY

THE IMUN RESPON IMUNOGLOBULIN M AND IMUNOGLOBULIN G TO MICE (*Mus musculus*) AFTER IMMUNIZATION PrM PROTEIN DENGUE VIRUS

Dengue virus (DEN) is an RNA of *Flavivirus* from *Flaviviridae* family, which is very pathogenic for human beings and spread rapidly through the bites of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes, particularly in tropical countries including Indonesia. More than 100 countries are seriously at risk for Dengue virus infection, and at least 20 million peoples a year are infected with the Dengue virus.

The effort to control this disease has been done but not succeeded. To date there is no tetravalent vaccine that can protect human from four virus strain that caused the disease. PrM protein is one of Dengue virus protein that can enhance to monocyte receptor which can stimulate B cell to produce antibody.

This research intends to identify produce of eithe M and G antibody profile after immunization with PrM protein fraction of Dengue virus to mice.

This research use 40 mice (*Mus musculus*) strain BALB/c which divided into three groups. Each group consist of 10 mice immunization with PBS as control, 15 mice immunization with PrM protein fraction dosage 500 µg each, and 15 mice immunization with PrM protein fraction dosage 1000 µg each. Mice serum was taking on 4, 7, 10, 22, and 30 days to analysis with ELISA to measure immunoglobulin concentration.

The results showed that there was the real different about the M and G immunoglobulin concentration, and also between IgG, IgG1, IgG2a, and IgG2b either 500 µg and 1000 µg dosage.

Key words : PrM protein, Immunoglobulin, and ELISA.

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Lembar Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan	vii
Abstrak.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Epidemiologi Virus Dengue.....	5
2.2 Klasifikasi Virus Dengue.....	6
2.3 Virologi.....	6
2.4 Virus Dengue.....	11
2.4.1 Peranan <i>Antibody Dependent Enhancement</i> (ADE).....	12
2.4.2 Peranan Makrofag.....	14
2.4.3 Peranan IgM dan IgG.....	14
2.5 Patogenesis dan patofisiologi Demam Berdarah Dengue.....	14
2.6 Respon Imun Infeksi Virus Dengue.....	16
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	19
3.1 Kerangka Konseptual.....	19
3.2 Hipotesis Penelitian.....	20
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	21
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
4.2 Materi Penelitian.....	21
4.2.1 Hewan Percobaan.....	21
4.2.2 Fraksi Protein PrM Virus Dengue.....	21
4.3 Bahan dan Alat Penelitian.....	22
4.3.1 Bahan Penelitian.....	22
4.3.2 Alat Penelitian.....	22

4.4 Identifikasi Variabel.....	22
4.4.1 Variabel Bebas.....	22
4.4.2 Variabel Tergantung.....	22
4.4.3 Variabel terkendali.....	23
4.5 Definisi Operasional Variabel.....	23
4.6 Rancangan Penelitian.....	23
4.7 Isolasi Protein PrM Virus Dengue.....	24
4.8 Perlakuan pada Hewan Percobaan.....	24
4.9 SDS-PAGE.....	24
4.10 Elusi.....	27
4.11 ELISA.....	27
4.11.1 ELISA IgM.....	27
4.11.2 ELISA IgG.....	28
4.12 Skema Penelitian.....	29
4.13 Analisis Data	30
 BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	 31
5.1 Karakterisasi Protein Immunogen.....	31
5.2 Purifikasi Protein PrM spesifik.....	32
5.3 Kadar Immunoglobulin.....	33
5.3.1 Kadar Immunoglobulin dengan Dosis Fraksi Protein PrM Virus Dengue 500 µg/ekor.....	33
5.3.2 Kadar Immunoglobulin dengan Dosis Fraksi Protein PrM Virus Dengue 1000 mg/ekor.....	35
 BAB 6 PEMBAHASAN.....	 37
6.1 Karakterisasi dan Isolasi Protein PrM Virus Dengue.....	37
6.2 Kadar Immunoglobulin.....	37
 BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	 40
7.1 Kesimpulan.....	40
7.2 Saran.....	40
 DAFTAR PUSTAKA.....	 41

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Struktur Genom Virus Dengue	9
Gambar 5.1	Analisis Protein Virus Dengue dengan SDS-PAGE.....	31
Gambar 5.2	Analisis Protein PrM dengan Western Blott.....	32
Gambar 5.3	Hasil Pengamatan Fraksi Protein PrM dari Elusi dengan Metode SDS-PAGE.....	33
Gambar 5.4	Grafik Kadar Imunoglobulin Setelah Imunisasi Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan Dosis 500 μ g/ekor...	34
Gambar 5.5	Grafik Kadar Imunoglobulin Setelah Imunisasi Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan Dosis 1000 μ g/ekor.	35

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1a	Hasil Pemeriksaan ELISA Kadar IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b pada Mencit Setelah Diimunisasi Protein PrM Dosis 500 µg/ekor	45
Lampiran 1b	Hasil Pemeriksaan ELISA Kadar IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b pada Mencit Setelah Diimunisasi Protein PrM Dosis 1000 µg/ekor	48
Lampiran 2a	Hasil Perhitungan Regresi Model Kurva Imunoglobulin dengan Dosis 500 µg/ekor	51
Lampiran 2b	Hasil Perhitungan Regresi Model Kurva imunoglobulin dengan Dosis 1000 µg/ekor	56
Lampiran 3a	Hasil Perhitungan Perbandingan Imunoglobulin pada Dosis 500 µg/ekor dengan Metode Anova	61
Lampiran 3b	Hasil perhitungan Perbandingan Imunoglobulin pada Dosis 1000 µg/ekor dengan Metode Anova	67

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Infeksi virus Dengue masih merupakan suatu masalah penting di daerah tropis, khususnya di Indonesia. Di Surabaya semenjak terjadinya wabah pada tahun 1968, setiap tahun kasus ini semakin meningkat yang mencapai puncaknya pada tahun 1986, dimana 4,6% dari jumlah kasus tersebut meninggal dunia. Dari tahun 1970-1990 lebih dari 90 % kasus *Demam Berdarah Dengue* (DBD) terjadi pada anak berumur di bawah 15 tahun yang sebagian besar berumur 6-7 tahun , tetapi sebaliknya pada tahun 1995, 60% dari semua kasus terjadi pada orang dewasa yang berumur lebih dari 15 tahun (Lawuyan, 1996 unpublished). Pada semester pertama (bulan Januari – April 1998) kejadian wabah DBD di Indonesia yang meninggal sudah mencapai 2,6% dari semua kasus dari anak sampai orang dewasa. Dengue menjadi masalah kesehatan yang penting karena kenaikan jumlah penderita yang terus meningkat, meluasnya daerah epidemik dan semakin gawatnya kasus *Dengue Haemorrhagic Fever* (DHF) atau *Dengue Shock Syndrome* (DSS) (Lawuyan, 1997).

Infeksi oleh virus Dengue dapat mengakibatkan manifestasi klinis yang sangat beragam, mulai yang bersifat asimtomatik, *Undifferentiated Fever*, *Dengue Fever* (DF), *Dengue Haemorrhagic Fever* (DHF) dan dapat berlanjut menjadi *Dengue Shock Syndrome* (DSS). Penegakan diagnosis berdasarkan kriteria WHO agak sulit diterapkan, karena beragamnya gejala klinik dan dari hasil pemeriksaan laboratorium seringkali lewat dari pengawasan (Soegijanto, 1997).

Sebagai tindakan preventif penyakit DBD sampai saat ini hanya ditujukan pada vektornya dan tempat bertelur dari vektor dengan hasil yang kurang memuaskan dengan bukti terjadi wabah berulang-ulang. Alternatif lain yang perlu didukung adalah penciptaan vaksin virus Dengue (Soegijanto,1997). Tetapi masalahnya sekarang adalah virus Dengue secara serologis mempunyai 4 *strain* yaitu Den-1, -2, -3, -4 dan virus ini sangat patogen dan mempunyai reaksi silang yang kuat satu sama lain dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi (Pardue and Ward, 1999).

Usaha untuk menciptakan vaksin sudah pernah dicoba di beberapa pusat penelitian penyakit tropis baik vaksin aktif maupun inaktif, tetapi masih belum bisa melindungi dari serangan virus ini. Hal tersebut karena virus ini memiliki sifat-sifat sebagai berikut :

- 1) Virus ini memiliki sifat yang tidak stabil sehingga dapat terjadi reaktivasi.
- 2) Adanya intervensi diantara *strain*.
- 3) Adanya infeksi yang heterotipik.

Sehingga konsekuensinya adalah diperlukan induksi antibodi tetravalent yang panjang dan tipe spesifik. Untuk menjawab hal tersebut diperlukan vaksin yang spesifik yang tidak terjadi intervensi satu sama lain serta mampu melindungi dari semua *strain* dan dapat menginduksi dalam waktu yang cukup lama (Beasly Deds, 1994).

Sampai sekarang belum ada terapi yang spesifik untuk berbagai macam patogenik dan masih sangat sedikit vaksin yang dapat digunakan. Oleh Rantam, dkk (1999) ditemukan bahwa protein E dapat menginduksi respon antibodi pada

mencit. Hubungan antara protein E dan protein PrM ditunjukkan oleh pemetaan peptida dua dimensi yang merupakan peptida identik dan dapat terjadi tumpang tindih diantara keduanya. Hal ini menyebabkan terjadinya reaksi silang. Identifikasi dan karakterisasi imunoglobulin terhadap protein PrM diharapkan dapat menunjukkan kemampuan protein PrM dalam menginduksi sistem imun untuk menghasilkan antibodi yang tetraavalen dan berjangka lama. Sehingga protein PrM dapat digunakan sebagai bahan untuk membuat vaksin sub unit dan dapat mencegah terjadinya morbiditas dan mortalitas akibat infeksi Dengue.

1.2 Rumusan Masalah

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

- 1.2.1. Bagaimana profil imunoglobulin M dan G setelah pemberian protein prM virus Dengue pada mencit.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk membuat bahan vaksin sub unit protein PrM yang diisolasi dari virus Dengue.

1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini mempunyai tujuan khusus untuk ;

- 1.3.2.1 Untuk mengetahui kemampuan protein PrM virus Dengue dalam menginduksi imunoglobulin M dan G pada mencit.

1.3.2.2. Untuk mengetahui tingkat respon imun pada mencit yang diimunisasi dengan protein PrM.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah secara teoritik dapat menyumbangkan ilmu pengetahuan dan teknologi dalam pengembangan pembuatan vaksin pada bidang bioteknologi, sehingga diharapkan metode ini mudah diadopsi dalam memproduksi bahan vaksin khususnya untuk virus Dengue.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Epidemiologi virus Dengue

Infeksi virus Dengue sudah dikenal sejak akhir abad 18 sebagaimana dilaporkan di Batavia, Philadelphia, North Queensland dan lainnya. Manifestasi klinik infeksi virus Dengue saat itu masih dalam bentuk yang ringan yang dikenal dengan Demam Dengue Klasik yang dapat sembuh sendiri (*self limited*). Manifestasi berat dari infeksi virus Dengue pertama kali dilaporkan pada tahun 1954 di Filipina yang dari tahun ke tahun dilaporkan terus menyebar ke Asia tenggara dan Pasifik, dan hingga kini terus menyebar ke Amerika dan daerah Karibia, India, dan Afrika (Sutaryo, 1997).

Infeksi virus Dengue di Indonesia pertama kali dilaporkan pada tahun 1968 (Surabaya dan Jakarta) dengan *case fatality rate* (CFR) 41,5%. Pada tahun 1997 *Dengue Fever/ Dengue Haemorrhagic Fever* (DF/DHF) telah menyerang semua propinsi di Indonesia. Selama 5 tahun terakhir (1994-1998) kasus kejadian DHF cenderung meningkat, meskipun angka CFR berhasil diturunkan dari 2,5% pada tahun 1994 menjadi 2% pada tahun 1998 (Suroso, 1999).

Peningkatan jumlah kasus terjadi akibat peningkatan jumlah penduduk, arus urbanisasi yang tidak terkontrol dan kontrol terhadap nyamuk yang kurang efektif serta peningkatan transportasi. Sedangkan penurunan angka kematian atau CFR disebabkan adanya peningkatan dan perbaikan manajemen penatalaksanaan terhadap penyakit DBD, hal ini menunjukkan bahwa pengenalan atau diagnosis dini dan penanganan secara dini terhadap kasus DBD cukup efektif untuk

menurunkan angka kematian yang disebabkan oleh infeksi virus Dengue (Umar I A, 1999).

2.2. Klasifikasi Virus Dengue

Virus Dengue merupakan anggota famili *Flaviviridae* dan genus *Flavivirus*. Genus *Flavivirus* termasuk didalamnya terdapat lebih 68 anggota yang dipisah ke dalam grup berdasarkan perbedaan dan persamaan serologis. Yang terakhir didasarkan pada perbandingan urutan nukleotida genom *Flavivirus* (McBride *et al* 1997). Pada umumnya *Flavivirus* termasuk *arthropod-borne disease* yaitu ditularkan melalui vektor nyamuk dan kutu. Ditemukan juga isolat yang berasal 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 (Rice, 1996).

2.3. Virologi

Virus Dengue berbentuk bulat, halus, pada permukaannya terdapat tonjolan (*surface projection*) kecil-kecil, mempunyai selubung luar (*envelope*)

yang tipis dan (sebagian berasal dari membran sel hospes, pada bagian intinya padat disebut “*nucleocapsid*”. Virion terdiri dari *single linier*, positif (+) RNA dengan panjang nucleotida 10.200, mempunyai tiga protein struktural dan tujuh protein non struktural (NS). Ketiga protein struktural tersebut adalah protein E (*envelope*), protein membran, dan protein C (*core*). Protein membran ini mempunyai dua bentuk yaitu bentuk protein PrM (*precursor M*) yang terdapat pada virus *immatur* dan protein M yang terdapat pada virus *matur*, dan protein C (*capsid*). Sedangkan ketujuh protein non struktural tersebut adalah NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, dan NS5 (Winarto, 1997; Rantam, 1998). Struktur virus Dengue dapat dilihat pada gambar 2.1.

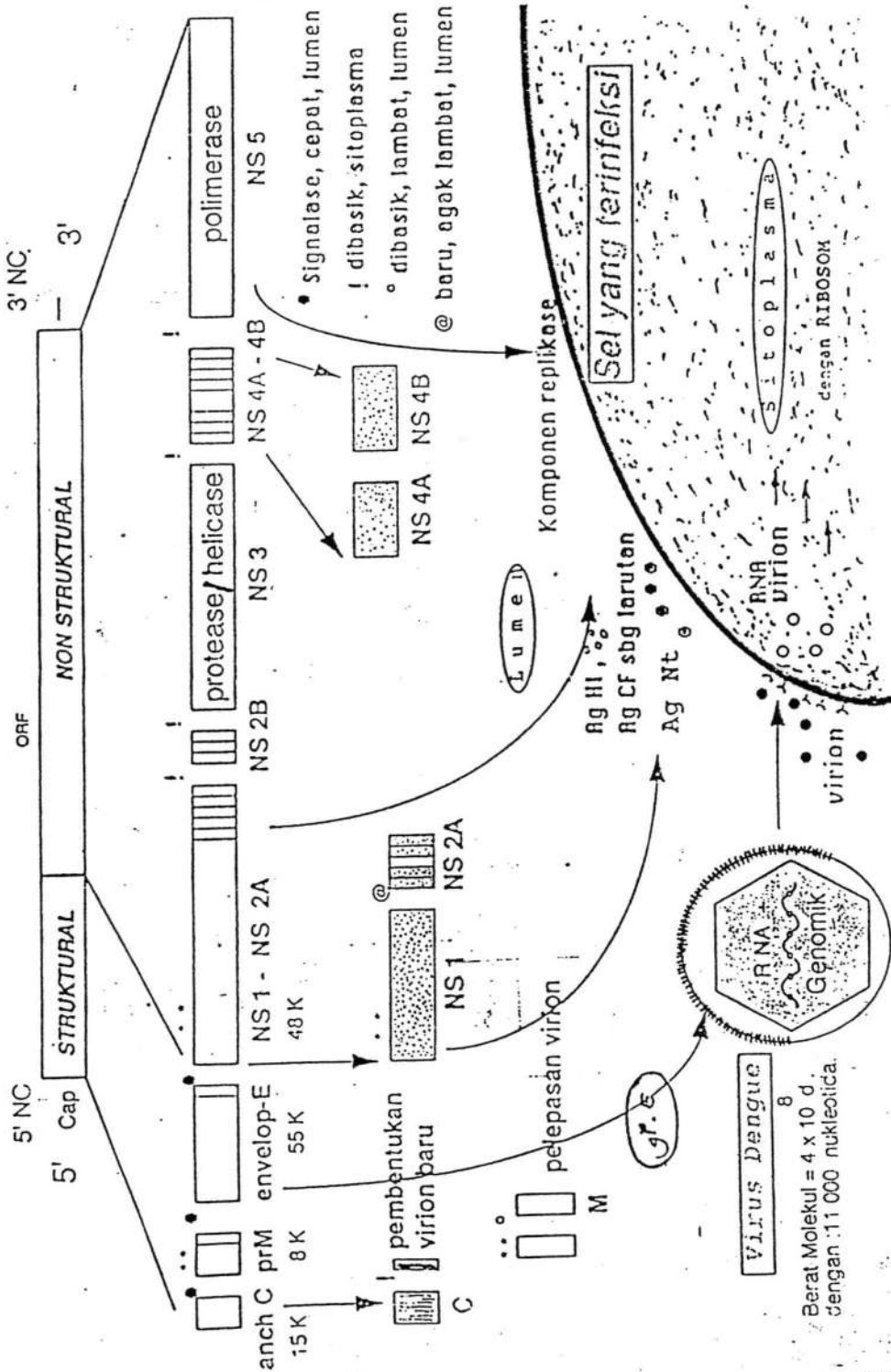
Secara morfologis genom Dengue mempunyai panjang 10,5 kb dan merupakan *single stranded RNA, positive strand* (ssRNA, +) yang terorganisasi didalam *single open reading frame* (ORF) dengan gen yang mengkode protein struktural C, prM, E dan protein non struktural. Tak ada hubungan antara berat ringannya 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 55 – 50 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 diatas diidentifikasi dengan celah proteolitik dari poliprotein yang dikode oleh ORF. Protein struktural dikode oleh 5' sepertiga dari ORF dan sisanya mengkode protein non struktural 5'.

Protein C adalah kecil kira-kira 11 kDa dan kalau dibandingkan masih lebih besar protein yang membentuk komponen dari nukleokapsid (Swittisombut, 1994).

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

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).

Struktur virus Dengue steril dan nukleokapsidnya helikal. Komposisi virionnya terdiri dari 6% RNA, 66% protein, 9% karbohidrat dan 17% lipid. Komposisi *nukleokapsid* adalah protein kapsid (C-protein) dan genomik dengan densitas 1,30 – 1,31 g/ml, bahan-bahan ini dapat diisolasi setelah pengrusakan dari envelop dengan detergen non-ionik. Partikel virus yang *immatur* mengandung PrM dan sedikit infeksius daripada virion (Rantam, 1998).



Gambar 1. Struktur Genom Virus Dengue (Hanel, 1990 dalam Rantam, 1998)

Virus Dengue terdiri dari empat serotipe yang secara antigenik berbeda. Infeksi dengan salah satu serotipe hanya akan memberi kekebalan seumur hidup untuk serotipe tersebut, tetapi tidak memberikan kekebalan silang (*cross-protective immunity*) total untuk serotipe lainnya (hanya memberikan kekebalan partial yang bersifat sementara), sehingga di daerah endemis Dengue, seseorang dapat terinfeksi dengan keempat serotipe tersebut. Tiap-tiap serotipe dapat terdiri dari beberapa *strain* yang berbeda-beda sifatnya. Infeksi pertama kali (*primary infection*) dengan salah satu serotipe akan menimbulkan sindroma *Dengue Fever*, sedangkan infeksi kedua (*secondary infection*) dengan serotipe yang lainnya (*heterotypic serotype*) akan menimbulkan sindroma DHF (Soewondo, 1998).

Isolasi dari semua serotipe virus Dengue dapat ditemukan di Indonesia. Virus Dengue-3 paling sering menimbulkan wabah di beberapa daerah, diikuti Dengue-2, Dengue-1 dan Dengue-4. Virulensi dari serotipe virus Dengue ini juga berbeda-beda, di Indonesia dilaporkan bahwa manifestasi berat dari infeksi virus Dengue ini lebih banyak disebabkan oleh serotipe Den-3, sedangkan di Thailand lebih banyak disebabkan oleh serotipe Den-2. Virus Dengue serotipe Den-1 dan Den-4 dilaporkan merupakan serotipe yang menyebabkan infeksi virus Dengue dengan manifestasi yang ringan (Suroso, 1999).

Menurut Suroso (1990) sebagai vektor DHF adalah nyamuk *Aedes*, terutama *Aedes aegypti*. Nyamuk ini hidup di dalam dan disekitar rumah dan mempunyai kebiasaan menggigit pada siang hari. Vektor lain adalah *Ae. albopictus* dan *Ae. scutellaris*. Virus Dengue yang terhisap nyamuk akan

mengadakan replikasi di dalam tubuh nyamuk selama 7 – 14 hari sebelum dapat ditularkan kepada manusia.

2.4. Virus Dengue

Akhir-akhir ini kasus demam berdarah disertai adanya kejang-kejang karena virus ini mempunyai tendensi yang sangat kuat terhadap patogenitasnya yaitu *neurovirulence* dengan target selnya adalah sistem syaraf pusat. Hal ini terbukti dengan menginfeksi mencit secara intracerebral akan terjadi neurolisis dengan manifestasi encefalitis setelah 12 hari di infeksi (Depres. *et al*, 1996).

Virus Dengue menyerang permukaan sel hospes melalui reseptor sel yang dapat terinfeksi. Virus mungkin masuk ke dalam sel melalui fusi membran atau dengan invaginasi dan pembentukan vesikel endositik. Penyerangan ini dipengaruhi dari *host-range virus* dan *tropisme jaringan*, dan keadaan molekul permukaan sel yang diidentifikasi sebagai reseptor virus. Protein prM adalah prekursor glikosilasi dari protein M (Hanel *et al*, 1990). Protein permukaan pada monosit mempunyai beberapa glikoprotein dan glikosaminoglikan, telah menjadi spekulasi yang mempunyai peran sebagai virus reseptor dalam penelitian terdahulu dan dinyatakan juga bahwa sejumlah ikatan virus Dengue pada bermacam-macam permukaan sel membran antara tipe sel juga tidak jelas bagaimana molekul ikatan virus Dengue berhubungan dengan sejumlah ikatan virus Dengue (Bielefeldt-Ohmann, 1990 dalam Rantam, 1998).

Protein ikatan virus mempunyai afinitas yang berbeda untuk keempat serotipe virus Dengue. Fisiologi pH, dimer protein E pada permukaan virion kemudian paparan terhadap pH dibawah 6,5 terjadi perpindahan konformasi yang

mengakibatkan pengaturan kembali E form ke bentuk trimer, adalah peristiwa yang mengakibatkan penggabungan antara virion dan membran sel hospes. RNA Dengue secara langsung dibaca oleh ribosom dari sel hospes, berfungsi seperti mRNA normal yang berada di dalam sel. Hal ini merangsang sel hospes 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 hospes 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 reseptor seluler spesifik 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).

2.4.1 Peranan Antibody Dependent Enhancement (ADE)

Virus Dengue termasuk *Flavivirus*. Pada *Flavivirus* ada kejadian, suatu peningkatan pembiakan virus kalau sebelumnya sudah ada antibodi sebelumnya, tetapi dengan syarat antibodi ini tidak menetralkan infeksi *Flavivirus* yang datang.

belakangan. Antibodi tersebut bersifat *subneutralizing*. Karena antibodi yang *subneutralizing* tersebut malahan memacu pertumbuhan virus dan ini disebut *Antibody Dependent Enhancement* (ADE). Teori itu memperkirakan proses terjadinya kenaikan replikasi virus adalah sebagai berikut : Pada infeksi sekunder akan terjadi kompleks imun yang dibentuk oleh virus dengan antibodi kadar rendah yang bersifat *subneutralizing* dari infeksi primer. Kompleks imun itu lalu melekat pada reseptor Fc pada mononuklear fagosit (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 (Sutaryo, 1992).

Penemuan pada *Flavivirus* tersebut kemudian diteliti pada Dengue dan ternyata memang hasilnya serupa. Pada kera yang sudah pernah mendapat infeksi sebelumnya, kejadian viremia lebih hebat daripada yang tidak terinfeksi sebelumnya. Untuk menjawab adanya kasus berat pada anak dibawah umur 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 *subneutralizing* disitulah dapat timbul serangan DHF. Dan hal itu menerangkan infeksi primer pada bayi sebetulnya seperti infeksi sekunder. Peranan ADE tidak dapat dipisahkan dengan peranan makrofag (Sutaryo, 1992).

2.4.2. Peranan Makrofag

Makrofag adalah salah satu sel target pada infeksi Dengue. Pembiakan virus terjadi di dalam sel ini, semakin banyak makrofag yang diinfeksi virus makin berat penyakit yang timbul. Berat ringan penyakit dapat diduga dipengaruhi secara genetik, yaitu dengan cara membantu atau menghambat pertumbuhan virus dalam monosit (Sutaryo, 1992).

2.4.3. Peranan IgM dan IgG

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 DHF yang dipastikan secara virologis, IgM terdapat pada 77,5% kasus. IgM akan muncul pada fase awal penyakit yang dimulai pada hari keempat. 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 menetralisasi infeksi sekunder sehingga mencegah timbulnya sakit yang berat. Bila IgM tidak cukup, akan timbul peningkatan IgG yang akan menghasilkan Dengue bentuk yang berat (Sutaryo, 1992).

2.5. Patogenesis dan Patofisiologi Demam Berdarah Dengue

Patofisiologi dan patogenesis *Demam Berdarah Dengue* (DBD) atau *Dengue Haemorrhagic Fever / Dengue Shock Syndrome* (DHF/DSS) menjadi subyek yang utama dalam bidang penelitian Dengue, dalam upaya untuk

menjelaskan manifestasi klinis Dengue yang sangat luas, dari ringan sampai berat. Tetapi hasil penelitian yang sudah hampir satu abad belum dapat menerangkan mekanisme yang sesungguhnya tentang patofisiologi dan patogenesis dari DHF/DSS (Sutaryo, 1992)

Perubahan pokok patofisiologi yang terjadi pada DHF/DSS adalah pertama vaskulopati, kedua trombopati, ketiga koagulopati, keempat perubahan imunologi humoral dan seluler. Diperkirakan perubahan patofisiologi tersebut disebabkan oleh tidak hanya satu faktor tetapi disebabkan oleh multifaktorial. Vaskulopati ditandai dengan terjadinya kerapuhan pembuluh darah dan peninggian permeabilitas kapiler (Sutaryo, 1992).

Patogenesis DHF/DSS merupakan proses imunopatologik. Ada empat teori mengenai DHF/DSS yaitu, *the secondary heterologous infection*, *the virus virulence*, *the virus-antibody complex* dan *the immune enhancement* (Soewondo, 1998).

Menurut teori pertama, kejadian DHF akan muncul apabila seseorang telah terinfeksi virus Dengue untuk pertama kali, kemudian mendapatkan infeksi kedua dengan serotipe lain dalam waktu 6 bulan sampai 5 tahun. Berbeda dengan teori pertama, maka teori kedua menyatakan bahwa kasus DHF dapat timbul apabila seseorang terinfeksi pertama kali dengan strain serotipe yang paling ganas. Teori ketiga menerangkan adanya reaksi kompleks antigen-antibodi. Adanya *virus-antibody complex* yang terbentuk akan mengaktifkan komplemen, yang kemudian akan mengeluarkan bahan mediator C3a dan C5a anafilatoksin yang mempunyai efek farmakologis cepat dan pendek. bahan ini bersifat vasoaktif dan

antikoagulan, sehingga menimbulkan kebocoran plasma dan perdarahan. Teori keempat merupakan kelanjutan dari teori ketiga, dimana adanya kompleks antibodi virus akan menancap pada Fc reseptor pada permukaan monosit/makrofag yang merupakan target dari virus Dengue. Akibat proses ini, maka monosit/makrofag akan melepaskan bahan mediator (monokin) yang memiliki sifat vasoaktif atau prokoagulan, sehingga akan mengakibatkan kebocoran plasma dan perdarahan (soewondo, 1998).

Menurut Kurane *et al* (1994) timbulnya DHF/DSS justru dipicu oleh sel T sitotoksik CD4+ dan CD8+. Adanya virus Dengue yang menginfeksi monosit akan merangsang sel T sitotoksik untuk menghasilkan interferon gamma, interleukin-dua (IL-2) dan limfokin lainnya. Interferon gamma akan meningkatkan *Antibody dependent enhancement (ADE)* melalui reseptor Fc pada monosit, sekaligus memunculkan molekul MHC I dan II. Akibatnya monosit akan dilisis oleh sel T sitotoksik CD4+ dan CD8+ dan dilepaskan berbagai monokin. Pada kasus DHF/DSS dapat ditunjukkan bahwa level soluble IL-2 receptor (sIL - -R) dan soluble CD4 (sCD4) dalam darah lebih tinggi daripada kasus DF, sedangkan sCD8 hanya ditemukan pada penderita DHF/DSS.

2.6. Respon Imun Infeksi Virus Dengue

Pada respon imun infeksi virus Dengue, virus Dengue masuk dalam tubuh manusia melalui gigitan vektor infeksi, 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 antinetralisasi, antihemaglutinin, antikomplemen. Antibodi ini pada umumnya adalah kelas IgG disamping 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 klas 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) B-1 dapat sebagai faktor prediktif dari beratnya Dengue yang sitokin ini secara signifikan tinggi selama 3 hari setelah panas pada anak dengan DBD.

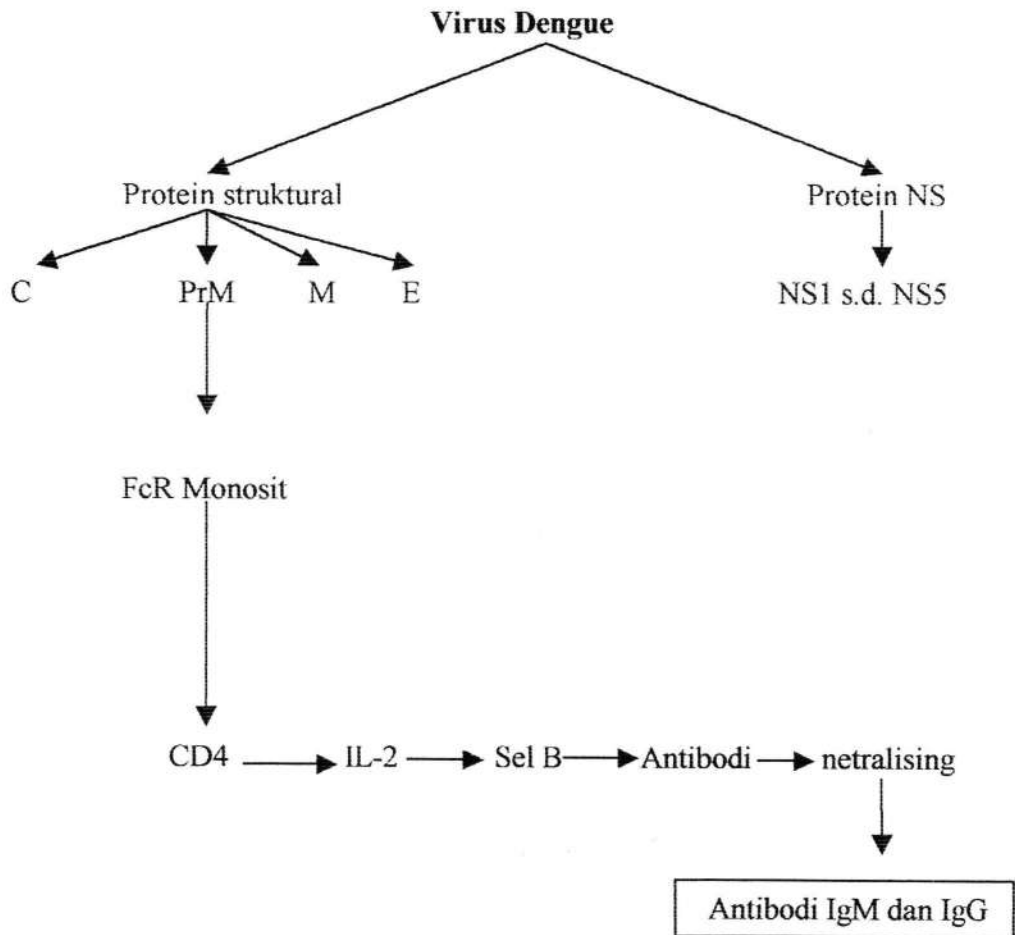
Kadar C3 pada pasien Dengue tertekan selama fase akut dari penyakit dan penekanan yang terbesar diamati pada DSS. Kadar C3a secara signifikan lebih tinggi pada DSS daripada penderita DF. Faktor B dan C4 tidak tertekan dan mempunyai peranan penting dalam pemecahan C3 pada jalur klasik dan alternatif.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

(C reaktif protein) meningkat lebih tinggi pada fase akut daripada fase penyembuhan. TNF alfa meningkat pada fase akut dari pasien DS (Wood and Yusuf,1997).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual



Virus Dengue Mempunyai dua protein, yaitu protein struktural dan protein non struktural. Protein struktural terdiri dari protein E, PrM, M, dan C, sedangkan protein non struktural terdiri dari NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, dan NS5. Dalam penelitian ini yang diteliti adalah protein PrM. Protein

PrM akan mengikat reseptor pada monosit dan merangsang sel T sitotoksik CD4 untuk menghasilkan IL-2 yang akan merangsang sel B untuk membentuk Antibodi. Antibodi disini yaitu antibodi netralising (Antibodi IgM dan IgG).

3.2. Hipotesis Penelitian

Pada penelitian ini dapat disusun hipotesis yaitu :

1. Terdapat perbedaan tingkat respon imun pada imunoglobulin M dan G setelah pemberian protein PrM virus Dengue pada mencit.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa tempat yaitu :

- Kandang hewan percobaan Fakultas Kedokteran Hewan Unair.
- Laboratorium DHF *Tropical Disease Centre* (TDC) Unair.
- Waktu penelitian selama 4 bulan, mulai Januari - April tahun 2001.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit *strain* BALB/c, umur rata-rata dua bulan, dengan berat badan 30 gram. Jumlah mencit yang digunakan sebanyak 40 ekor. Hewan percobaan tersebut diperoleh dari pengembangbiakan hewan percobaan Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma). Hewan percobaan diaklimatisasi pada kondisi kandang, pakan, dan minum, yang sama. Pemberian pakan dan minum secara adlibitum.

4.2.2 Fraksi Protein PrM Virus Dengue

Isolat virus Dengue diperoleh dari lab. DHF *Tropical Disease Centre* (TDC) Unair. Virus Dengue tersebut terdiri dari empat serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4. Dari ke empat serotipe tersebut dicampur ke dalam satu

ependorf yang nantinya protein PrM akan diisolasi dengan menggunakan SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

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%, Glutaraldehyde 10%, NaOH 0,36%, AgNO₃, Formaldehyde 3,7%, Asam sitrun 5%, PBS, Etanol, Coating buffer, Anti human IgM, Krimer, Substrat OPD, Goat anti 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 elektroforesis, alat blotting, dan ELISA reader.

4.4. Identifikasi Variabel

4.4.1. Variabel Bebas

Dosis protein PrM virus Dengue yang diimunisasikan pada mencit untuk menimbulkan respon imun.

4.4.2. Variabel Tergantung

Profil IgM dan IgG pada mencit setelah diimunisasi dengan protein PrM virus Dengue.

4.4.3. Variabel Kendali

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

4.5. Definisi Operasional Variabel

- a. Kadar protein PrM adalah jumlah protein PrM yang diperoleh dari virus Dengue serotipe DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4.
- b. Profil IgM dan IgG adalah gambaran kadar IgM dan IgG pada mencit setelah diimunisasi dengan protein PrM.
- c. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate–PolyAcrylamid Gel Electrophoresis) adalah suatu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi fraksi protein berdasarkan berat molekulnya.
- d. ELISA adalah suatu metode yang dapat digunakan untuk mengukur kadar imunoglobulin.

4.6. 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 40 sampel serum yang diambil dari 40 ekor mencit yang telah diimunisasi dengan protein PrM virus Dengue. Pengukuran kadar IgM dan IgG dari 40 sampel tersebut dilakukan pada hari ke 4,7,10,15,21,30.

4.7. Isolasi Protein PrM Virus Dengue

Serum virus Dengue yang mengandung keempat serotipe dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE untuk mendapatkan fraksi protein berdasarkan berat molekulnya. Fraksi protein tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam selopan yang diberi PBS 1 kali. Kemudian dilakukan Elusi selama 3 – 4 jam sehingga protein PrM larut di dalam PBS. Protein PrM yang telah larut diberi etanol dengan didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar sehingga terbentuk endapan yang merupakan protein PrM yang siap diimunisasikan pada mencit.

4.8. Perlakuan Pada Hewan Percobaan

Empat puluh ekor mencit *strain* BALB/c dipersiapkan dengan melakukan aklimatisasi selama 4 minggu. Masing-masing mencit diimunisasi dengan protein PrM sebanyak 0,05 ml intramuskuler. Kemudian setelah hari ke 4, 7, 10, 15, 21, 30 diambil darah secukupnya untuk dilakukan pemeriksaan ELISA.

4.9. SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamid Gel Electrophoresis) 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 berdasarkan berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu.

Prosedurnya adalah sebagai berikut : Semua bahan dipersiapkan lebih dahulu sebelum melakukan pekerjaan, kemudian dibuat *running gel* dengan bahan sebagai berikut : Acrylamid 2,5 ml, Tris HCL PH 8,8 1,2 ml, SDS 0,8 % 1,2 ml, H₂O 1,1 ml, TEMED 5,0 μ l, APS 10% 4 °C 3,0 μ l.

Kemudian bahan *running gel* tersebut dimasukkan lewat dinding kaca sampai kira-kira kurang dari 1 cm dan ditambahkan dengan butanol sampai penuh setelah itu diinkubasi selama 25 menit sampai beku. Sementara itu disiapkan bahan untuk *stacking gel* dengan bahan-bahan sebagai berikut : Acrylamid 0,66 ml, Tris HCL PH 6,8 0,8 ml, SDS 0,5% 0,8 ml, H₂O 0,8 ml, TEMED 5,0 μ l, APS 10% 20 μ l.

Kemudian bahan – bahan *stacking gel* tersebut dimasukkan ke dalam cetakan *running gel* sampai penuh dan dimasukkan *comb* ke dalam *stacking gel* tadi, setelah itu diinkubasi selama 25 menit. Setelah dilakukan penyiapan sampel , sampel tersebut dimasukkan ke dalam eppendorf (1 bagian buffer dan 1 bagian serum sampel) kemudian direbus 100 °C selama 5 menit. Setelah proses inkubasi selesai, *comb* dilepaskan dan *stacking gel* dibuang, selanjutnya dicuci dengan E-buffer yang sudah diencerkan sebanyak 10 kali kemudian cetakan dimasukkan ke dalam alat elektrophorese dan dituangi dengan E-buffer secukupnya kira-kira 800 ml, setelah itu gelembung udara yang ada di bawah *cetakan gel* dihilangkan dan sampel yang telah direbus tadi dimasukkan ke dalam lubang *comb*. Selanjutnya baru disambungkan ke listrik dan ditunggu sampai sampel turun kira-kira 1 jam setelah selesai maka voltase dimatikan kemudian diangkat dan agarnya dilepas untuk kemudian dimasukkan ke dalam petridish. Setelah itu diadakan tahap

pencucian dan pewarnaan dengan bahan-bahan sebagai berikut : I. (Methanol 50% 25 ml, Aquades 25 ml, Asam asetat 7,5% 3,75 ml, Aquades 46,25 ml). Kemudian bahan-bahan tersebut digoyang dengan kecepatan 42/menit, selama 30 menit kemudian larutan pencuci dibuang. II. Bahan-bahan (Methanol 50% 2,5 ml, Aquades 47,5 ml, Asam asetat 7,5% 3,75 ml, Aquades 46,25 ml) kemudian bahan-bahan tersebut digoyang dengan kecepatan 42/menit, selama 30 menit kemudian larutan pencuci dibuang. III. Bahan-bahan (Glutaraldehyde 10% 10 ml dan Aquades 90 ml) bahan-bahan tersebut digoyang dengan kecepatan 42/menit, selama 30 menit lalu larutan pencuci dibuang. Kemudian dicuci dengan aquades selama 30 menit (3x) dengan tetap digoyang dengan kecepatan 42/menit. Selanjutnya dilakukan tahap pewarnaan dengan bahan-bahan sebagai berikut : (NaOH 0,36% 21,00 ml, NH₃ 1,4 ml, Aquades 73,5 ml) Setelah itu dicampur dengan AgNO₃ 0,8 g + 4 ml DW, kemudian disaring dan dimasukkan ke dalam petridis tadi selama 15 menit, dibuang dan tetap digoyang dengan kecepatan 42/menit. Dan kemudian dilakukan pencucian dengan aquades 100 ml selama 2 menit (2x) dengan kecepatan 42/menit. Setelah itu diberi pengembang warna dengan bahan-bahan sebagai berikut : (Formaldehyde 3,7% , Asam sitrun 5%, dan Aquades) Kemudian bahan-bahan tersebut ditunggu selama 5 menit, tetapi tetap digoyang dengan kecepatan 42/menit. Setelah itu pewarnaan dihentikan dengan penambahan asam asetat 10% 10 ml kemudian dicuci dengan aquades 100 ml selama 2 menit (2X) dan digoyang dengan kecepatan 42/menit setelah itu asam asetat 10% ditambahkan sebanyak 100 ml.

4.10 Elusi

Hasil gel yang sudah dilakukan SDS-PAGE tanpa tahap pencucian langsung dipotong pada daerah yang berisi protein PrM virus Dengue. Hasil potongan gel tersebut dimasukkan ke dalam selopan yang sudah diberi PBS 1 kali sebanyak 2 ml. Lalu selopan tadi dimasukkan ke dalam larutan E-buffer 1 kali kemudian di running dengan tegangan 125 V dan 40 mA. kemudian hasilnya diberi ethanol dan didiamkan selama 24 jam sampai timbul endapan.

4.11. ELISA

4.11.1. ELISA IgM

Coating buffer ditambah anti human IgM dengan perbandingan 1:100. Kemudian masukkan 50 μ l per well, inkubasi 24 jam pada suhu 4 °C dan diblok dengan krimer 4% yang diencerkan dengan PBS 1 kali kemudian dilakukan pencucian sebanyak 6 kali lalu sampel dimasukkan (1:100), kemudian baru diblok dan diinkubasi 37 °C selama 60 menit. Kemudian dilakukan pencucian sebanyak 6 kali dan antigen 50 ml per well dimasukkan dan diinkubasi 37 °C selama 60 menit lalu dilakukan pencucian sebanyak 6 kali dan konjugat (1:100) 50 ml tiap lubang dimasukkan kemudian diinkubasi 37 °C selama 60 menit. Setelah itu dilakukan pencucian sebanyak 6 kali lalu substrat OPD 5 ml tiap lubang dimasukkan, setelah itu diinkubasi di ruangan gelap dan ditunggu sampai 20 – 30 menit, setiap 10 menit dilihat adanya perubahan warna. Bila ada perubahan reaksi di stop dengan H₂SO₄ 1 N 50 ml tiap lubang kemudian setelah selesai dibaca dengan ELISA reader dengan OD 450.

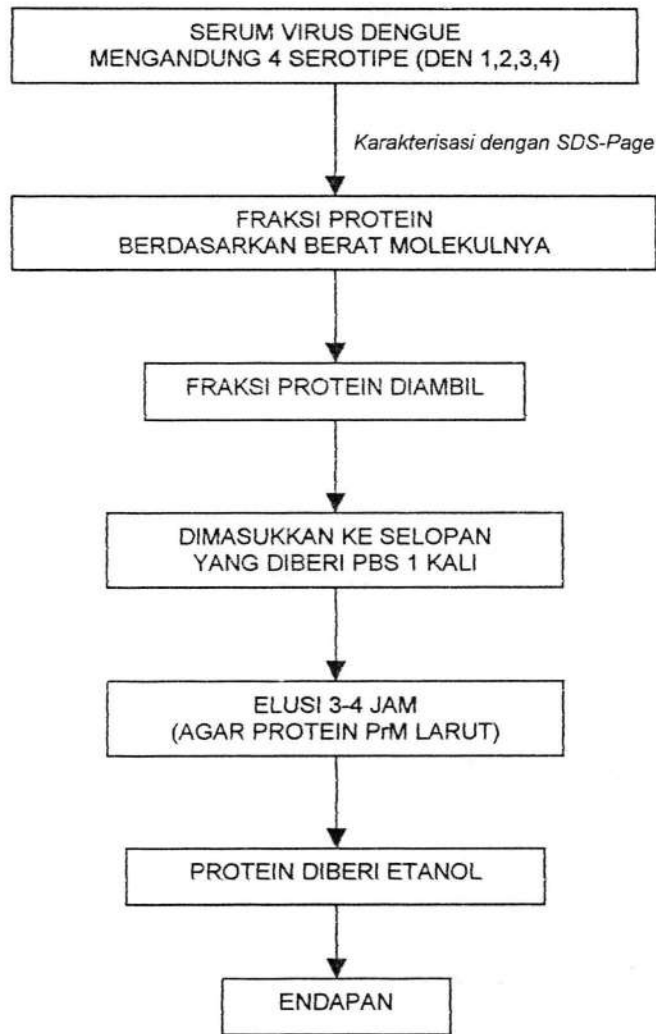
4.11.2. ELISA IgG

Coating dilakukan dengan antigen mix 50 ml tiap lubang lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4 °C dengan ditutup aluminium foil. Kemudian dilakukan pencucian 6 kali. Diadakan pengenceran sampel (1:100), plate diambil dan diblok dengan krimer 4%. 50 ml/100 ml tiap lubang dan diinkubasi 37 °C selama 60 menit kemudian dilakukan pencucian sebanyak 6 kali. lalu sampel dimasukkan sebanyak 50 ml : 100 ml tiap lubang. Kemudian diinkubasi 37 °C selama 60 menit. Lalu dilakukan pencucian sebanyak 6 kali. Selanjutnya goat anti human IgG (konjugat 1 : 1600) 12,5 ml/20 ml PBS dimasukkan sebanyak 1 kali, kemudian diinkubasi 37 °C selama 60 menit lalu dilakukan pencucian 6 kali dan substrat dimasukkan lalu didiamkan di tempat gelap selama 10 menit sampai terjadi perubahan warna kemudian dilakukan stop reaksi dengan H₂SO₄ 1N dan setelah selesai, dibaca di ELISA reader dengan OD 450.

4.12. Skema Penelitian

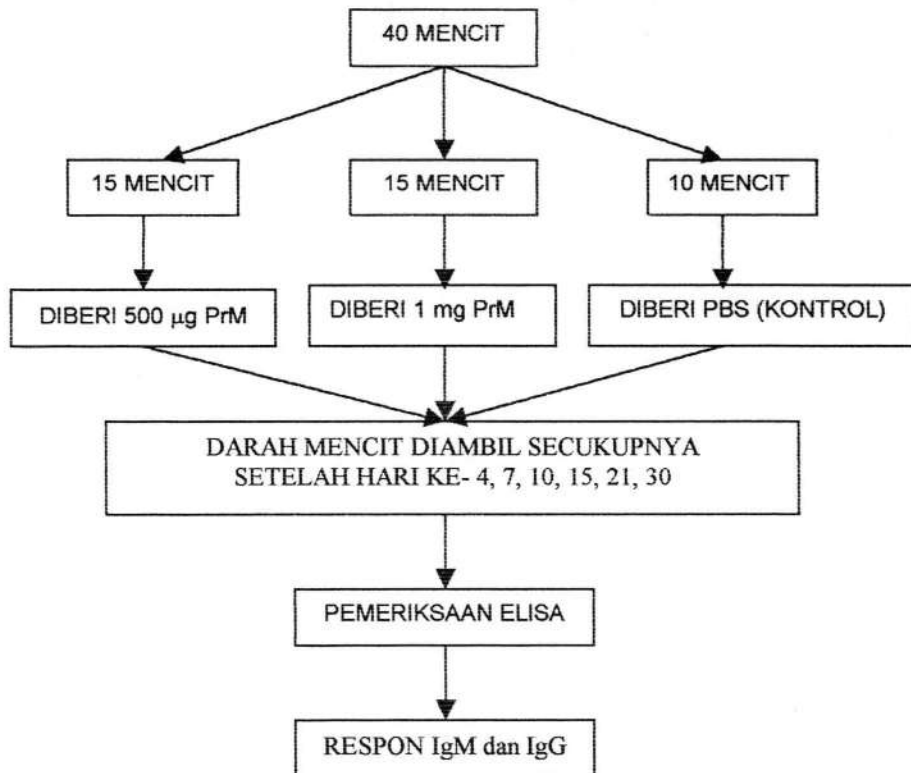
Skema Penelitian ini terdiri dari 2 tahap, yaitu sebagai berikut :

I. Isolasi protein PrM virus Dengue



Keterangan : Endapan tersebut merupakan protein PrM yang diimunitasikan ke mencit

II. Imunisasi Protein PrM Pada Mencit



4.13 Analisis Data

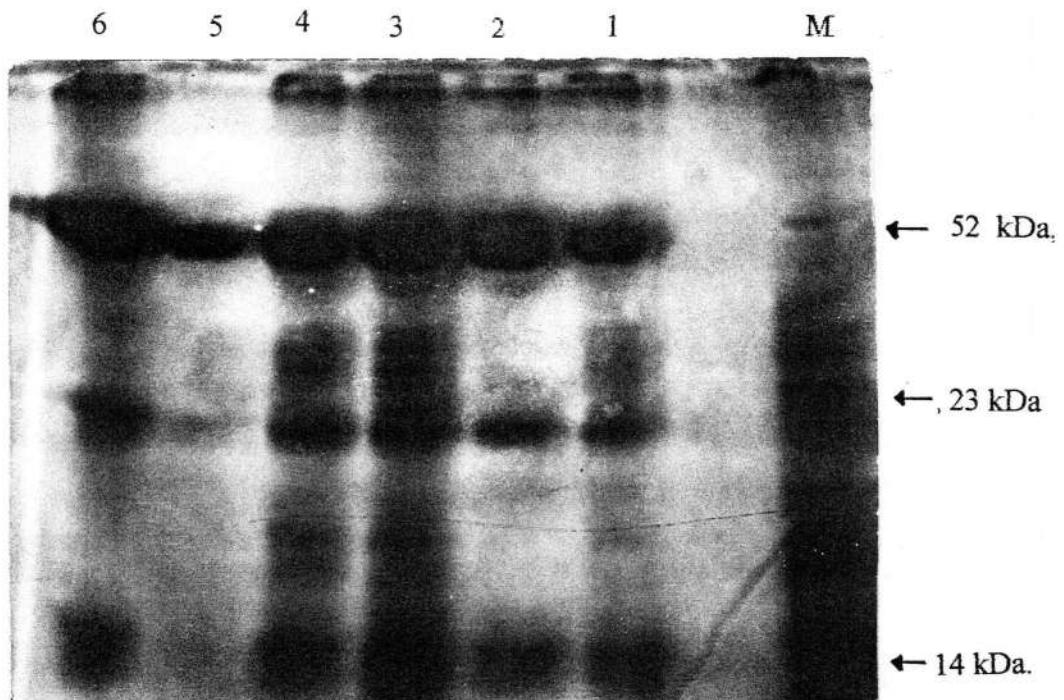
Analisa statistik terhadap data menggunakan Anova satu arah dan regresi dengan metode growth dan eksponensial.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

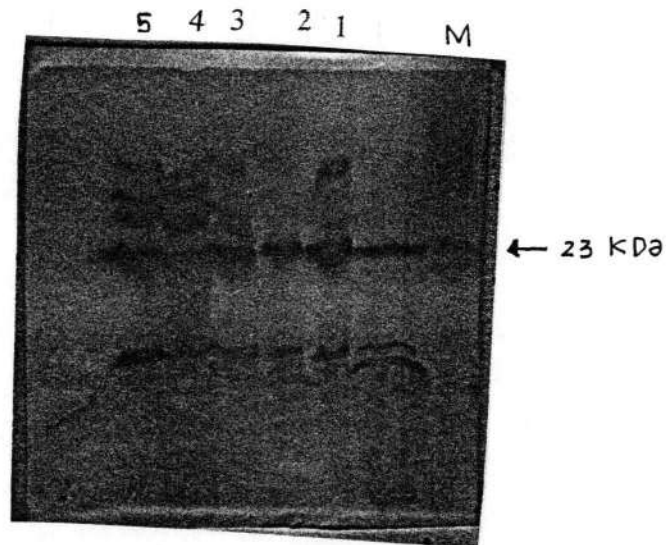
5.1. Karakterisasi Protein Imunogen

Karakterisasi protein imunogen dilakukan SDS-PAGE 12% dan divisualisasikan dengan pewarnaan perak nitrat (AgNO_3), hasilnya menunjukkan terdapat tiga macam protein yang mempunyai berat molekul berbeda antara lain 52 kDa, 23 kDa dan 14 kDa.



Gambar 5.1. Analisis protein Virus Dengue dengan SDS-PAGE 12% : M= marker, pengenceran sampel 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.

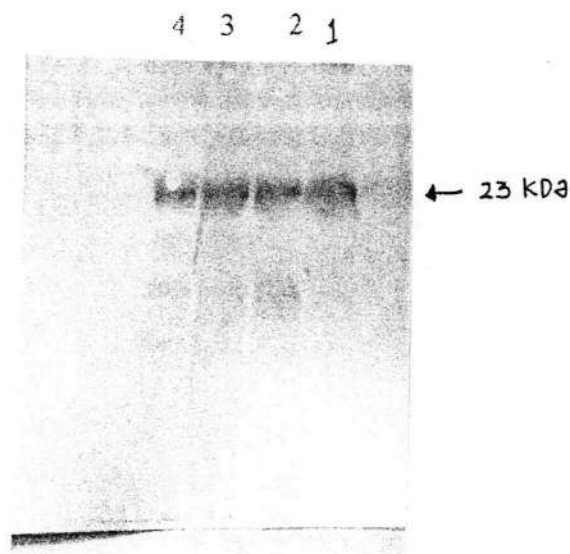
Berdasarkan hasil pengamatan di atas agar dapat ditentukan protein PrM yang spesifik, maka dilakukan analisis reaktivitas antara antigen dan antibodi dengan imunoblotting. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.2 dibawah ini.



Gambar 5.2. Analisis Protein PrM 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.

5.2. Purifikasi Protein PrM Spesifik

Berdasarkan gambar 5.2 di atas untuk pemurnian protein PrM dilakukan dengan preparatif gel elektroforesis dan telah didapatkan hasil yang murni seperti terlihat pada gambar 5.3 dibawah ini.

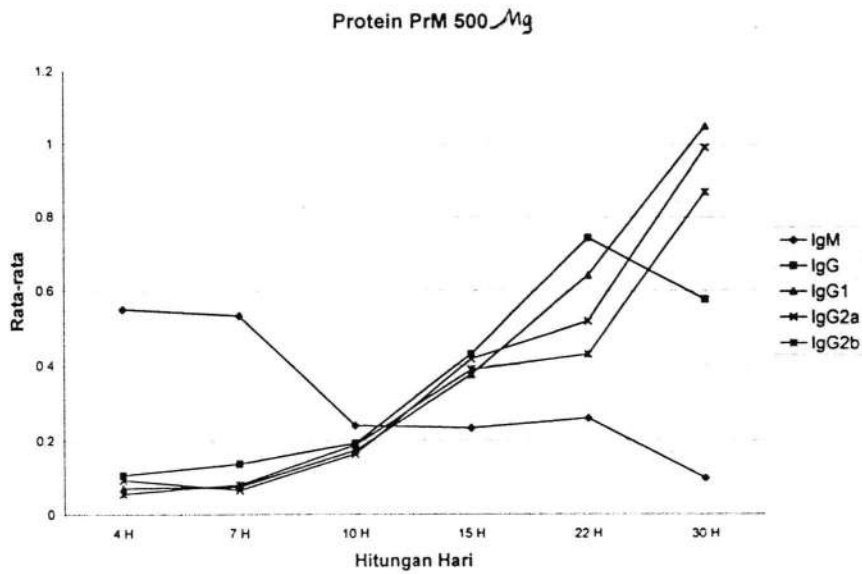


Gambar 5.3. Hasil Pengamatan Fraksi Protein PrM dari elusi dengan Metode Western Blot : M = marker, pengenceran serum kolom 1 = 1 : 14, kolom 2 = 1 : 12, kolom 3 = 1 : 10, kolom 4 = 1 : 8.

5.3. Kadar Immunoglobulin

5.3.1. Kadar Immunoglobulin M dan G Setelah Pemberian Fraksi Protein PrM dengan Dosis 500 μg

Kadar Immunoglobulin setelah pemberian fraksi protein PrM dengan dosis 500 μg setelah diukur dengan ELISA memberikan hasil seperti yang disajikan dalam grafik dibawah ini.



Gambar 5.4. Grafik Kadar Immunoglobulin M dan G Setelah Pemberian Fraksi Protein PrM dengan Dosis 500 μ g / ekor.

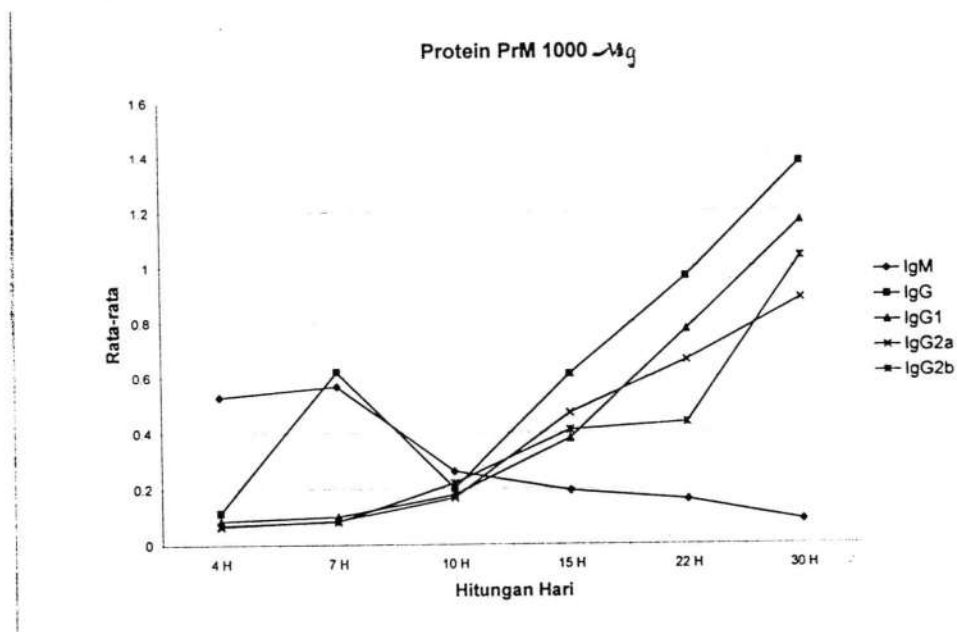
Berdasarkan grafik di atas menunjukkan bahwa IgM memperlihatkan suatu bentuk model kurva *eksponensial*, sedangkan IgG, IgG1, IgG2a, dan IgG2b memperlihatkan bentuk model sebaliknya yaitu model kurva *growth*, begitupun seperti yang terlihat pada hasil analisis regresi (Lampiran 2a). Hal tersebut disebabkan kadar IgM yang menurun sedangkan kadar IgG yang terus meningkat.

Hasil penelitian ini, setelah dilakukan uji Anova satu arah terdapat perbedaan yang bermakna antara IgM, IgG, IgG1, IgG2a, dan IgG2b yang kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yang hasilnya menunjukkan, bahwa pada hari ke-4 tak ada perbedaan yang bermakna antara IgG, IgG1, IgG2a, dan IgG2b. Pada hari ke-7 tampak perbedaan yang bermakna antara IgG dengan IgG1, IgG2a, dan IgG2b. Pada hari ke-10 dan ke-15 tak ada

perbedaan yang bermakna diantara 4 imunoglobulin tersebut, sedangkan pada hari ke-22 terdapat perbedaan yang bermakna antara IgG dengan IgG2a dan IgG2b. Juga antara IgG1 dengan IgG2a dan IgG2b. Kemudian pada hari ke-30 terdapat perbedaan yang bermakna antara IgG dengan IgG1, IgG2a dan IgG2b, juga antara IgG1 dengan IgG2b. Sedangkan pada IgM terdapat perbedaan yang jelas untuk 4 imunoglobulin tersebut.

5.3.2. Kadar Imunoglobulin M dan G Setelah Pemberian Fraksi Protein PrM dengan Dosis 1000 μg .

Untuk imunisasi fraksi protein PrM dengan dosis 1 mg setelah kadar imunoglobulin diukur dengan ELISA memberikan hasil seperti yang disajikan dalam grafik dibawah ini.



Gambar 5.5. Grafik Kadar Imunoglobulin M dan G Setelah Pemberian Fraksi Protein PrM dengan Dosis 1000 μg /ekor.

Berdasarkan grafik di atas, IgM dan IgG serta subtipeanya memperlihatkan bentuk model kurva yang sama dengan bentuk model kurva pada kadar imunoglobulin setelah pemberian fraksi protein PrM dengan dosis 500 µg/ekor yaitu IgM memperlihatkan bentuk model kurva *eksponensial*, sedangkan IgG dan subtipeanya memperlihatkan bentuk model kurva *growth*, begitupun seperti yang terlihat pada hasil analisis regresi (Lampiran 2b).

Hasil penelitian ini, setelah dilakukan uji Anova satu arah terdapat perbedaan yang bermakna antara IgM, IgG, IgG1, IgG2a, dan IgG2b yang kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yang hasilnya menunjukkan, bahwa pada hari ke-4 terdapat perbedaan yang bermakna antara IgG dengan IgG2a dan IgG2b. Pada hari ke-7 tampak perbedaan yang bermakna antara IgG dengan IgG1, IgG2a, dan IgG2b. Pada hari ke-10 tak ada perbedaan yang bermakna antara 4 imunoglobulin tersebut. Sedangkan pada hari ke-15 terdapat perbedaan yang bermakna antara IgG dengan IgG1, IgG2a, dan IgG2b. Juga antara IgG1 dengan IgG2a serta IgG2a dengan IgG2b. Pada hari ke-22 terdapat perbedaan yang bermakna antara IgG dengan IgG1, IgG2a, dan IgG2b. Juga antara IgG1 dengan IgG2b, serta antara IgG2a dengan IgG2b. Kemudian pada hari ke-30 tampak perbedaan yang bermakna antara IgG dengan IgG1, IgG2a, dan IgG2b. Juga antara IgG1 dengan IgG2a.

Pada protein PrM dosis 500 µg dan protein PrM dosis 1000 µg, kalau dilihat pola kenaikan imunoglobulin menunjukkan gambaran yang hampir sama. Pola tersebut tampak pada gambar 5.4 dan gambar 5.5 yaitu kadar IgG>IgG1>IgG2a>IgG2b.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Karakterisasi dan Isolasi Protein PrM

Untuk karakterisasi dan isolasi protein PrM sebelumnya dilakukan SDS-PAGE 12% dan divisualisasikan dengan pewarnaan perak nitrat ditemukan beberapa macam protein dengan berat molekul 52 kDa, 23 kDa, 14 kDa. Selanjutnya untuk karakterisasi dan isolasi protein PrM virus Dengue, maka dilakukan imunobloting dan menunjukkan bahwa protein PrM spesifik virus Dengue mempunyai berat molekul 23 kDa. Berdasarkan penelitian ini ditunjukkan bahwa protein PrM mempunyai sifat imunogenik sehingga dapat digunakan sebagai bahan vaksin. Hasil ini juga didukung oleh penelitian dari Rantam (1998).

6.2. Kadar Imunoglobulin

Pada waktu protein PrM diimunisasikan pada mencit menunjukkan bahwa berdasarkan analisis regresi, imunoglobulin M menunjukkan bentuk model kurva eksponensial sedangkan IgG dan subtipeanya menunjukkan bentuk model kurva growth. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Russel (1986) yang melaporkan bahwa IgM anti Dengue menurun sampai tidak dapat dideteksi kadarnya setelah 30 – 60 hari, sedangkan kadar IgG meninggi.

Kadar IgM pada hari ke- 4 ditemukan lebih tinggi dibandingkan dengan IgG dan sub tipenya dan selanjutnya kadarnya terus menurun sampai pada titik yang hampir sama dengan kadar IgG dan sub tipenya pada hari ke-10.

Adanya titik pertemuan ini yang mengakibatkan terjadinya viremia. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Bhamarapravati (2000). Kadar IgG dan IgM sama pada saat terjadi viremia. Pada manusia viremia terjadi 2 hari sebelum dan sesudah panas (Sugianto, 1998).

Pada penelitian ini protein PrM yang diimunisasikan pada mencit telah menginduksi IgM dan IgG. Hal ini seperti yang terlihat pada analisis regresi dengan ditunjukkan bahwa protein PrM dengan IgG dan IgM kadarnya meningkat secara signifikan. Hal tersebut berarti protein PrM telah dapat menginduksi IgG dan IgM. Selain itu pada penelitian ini juga ditemukan sub tipe 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, hal ini kemungkinan disebabkan oleh terlambatnya masing-masing imunoglobulin yang diinduksi oleh protein PrM dengan komposisi asam amino yang berbeda.

Berdasarkan grafik dari protein PrM 500 µg pada IgG hari ke 22 mengalami penurunan padahal pada IgG1, IgG2a, dan IgG2b dosis 500 µg maupun dosis 1000 µg terlihat mengalami peningkatan, hal tersebut berarti bahwa pada hari ke 22 pada IgG sudah mengalami titik optimalisasi, jadi mengalami penurunan dan untuk imunoglobulin lainnya pada hari ke 30 belum mengalami titik optimalisasi jadi masih terlihat mengalami peningkatan.

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 dibandingkan dengan IgG yaitu 1:8:1 (Innis *et al*, 1989). Dan menurut penelitian dari Thein *et al*, 1994., dilaporkan bahwa tingkat kadar dari IgG1 dari serum yang dikumpulkan pada tahun 1990, 1991, 1992 tidak berhubungan dengan berat ringannya penyakit.

Perbedaan dosis pada waktu pemberian protein PrM juga berpengaruh terhadap tingkat kadar dari imunoglobulin terutama IgG. Imunisasi protein dipengaruhi oleh cara pemberian, dosis pemberian, lokasi pemberian (Stites, 1987). Pada penelitian ini yang berbeda adalah dosis pemberian, semakin lama harinya maka makin tampak perbedaan kadar antibodi yang dibentuk.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada mencit setelah diimunisasi dengan protein PrM virus Dengue, maka disusun kesimpulan sebagai berikut :

1. IgM menunjukkan model kurva *eksponensial*, sedangkan IgG menunjukkan model kurva *growth*.
2. Pola kenaikan imunoglobulin menunjukkan gambaran yaitu kadar IgG>IgG1>IgG2a>IgG2b. Terjadi perbedaan yang bermakna antara imunisasi dengan dosis 500 µg/ekor dan dosis 1000 µg/ekor pada IgM dan IgG beserta sub tipenya.

7.2. Saran

Berdasarkan penelitian ini dengan diketahuinya perbedaan induksi protein PrM terhadap IgM dan IgG serta sub tipenya pada mencit, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimum protein PrM yang diimunisasikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Beasley D, 1994. Dengue Haemorrhagic fever. Internet Yahoo.com.
- Bhamarapavati N, Sutee Y, 2000. Live Attenuated tetravalent Dengue Vaccine. Mahidol University. Thailand. Vaccine. May. Suppl 2 : 44 – 7.
- Hanel E.R, Hengeveld N, Hunter A.O, and Sultz V, 1990. Dengue Virus. Clin. Microbiol. Rev.3:376-396.
- Innis B, Nisilak A, Nimmanitya 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 Haemorrhagic fever/ Dengue Shock Syndrome in Thailand.I. Epidemiology During the Last 5 Years. In Mosquito Borne Disease Bulletin. Mar. 11(1):1-5.
- Kurane I and Francis E E, 1992. Immunity and Immunopathology in Dengue virus infection. Seminar in Immunology 4 : 121-27.
- Lawuyan S, 1997. Dengue Haemorrhagic Fever in Surabaya. In Proceeding Seminar on Tropical Disease in Asia. TDC Unair. Feb.26.
- McBride WJH. GW, Burgess, and Sultz V, 1997. Studies of Dengue Infection : Diagnostic Methods and Epidemiology in North Queensland. Department of Microbiology and Immunology. James Cook University of North Queensland. 1 – 5.
- O’Hanley P, Jennings, Larasati S, Diegagunarsa N, Pudjoprawoto C.M, Punjabi H, Wulur, and Samsi, 1992. Potential Pathogenics Roles of Acute Inflammatory Cytokines and HLA Status in DHF. Cermin Dunia Kedokteran Edisi Khusus. 81. Hal. 71 - 78.
- Pardue S, and Ward, 1999. Viral Haemorrhagic Fevers: Assessing the Global Health Risk. Emerging and Reemerging Disease. ALS 398H.
- Rantam F.A., 1998. Aspek Virologi Demam Berdarah Dengue. Seminar Demam Berdarah Dengue. Surabaya. TDC Unair. 19 September : . 23 – 31.
- Rantam FA, Soetjipto, and Dachlan Y.P, 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 Haemorrhagic Fever. Oct. 139 – 144.
- Rice C.M, 1996. Flaviviridae. The Viruses and Their Replication. Field Virology 3 th. Philadelpia. 931-954.
- Sangkawibha N, 1994. Current Status of the Knowledge on Dengue / Dengue Haemorrhagic Fever / Dengue Shock Syndrom in thailand. II. Actiology. Virological Studies. Mosq. Borne Dis. Bull. 11 (1) 20 – 27.
- Sittisombut N, 1994. Current Status of the Knowledge on Dengue / Dengue Haemorrhagic Fever / Dengue Shock Syndrom in Thailand II. Actinology. Molecular Biology of Dengue Virus. Mosq. Borne Dis. Bull. 11(1). 6 – 19.
- Soegijanto S, 1997. The Role of Biomolecular Study in Control of DHF. In Proceeding Seminar on Tropical Disease in Asia. TDC Unair. 27 - 30.
- Soegijanto S, 1998 . Hubungan Manifestasi Klinik dengan serotipe virus dengue. Dalam Handout kursus singkat biologi molekular : Penerapan teknik polymerase chain reaction (PCR) untuk diagnosis penyakit demam berdarah. Surabaya, TDC Unair : hal 29 – 42.
- Soewondo E.S, 1998. Demam Berdarah Dengue pada orang Dewasa Gejala Klinik dan Penatalaksanaannya. Seminar Demam Berdarah Dengue. Surabaya. TDC Unair. 19 Sep : hal : 51 – 54.
- Stites P, Stobo Dj, Wells JV, 1987. Basic and Clinical Immunologi. Ed. 6th. Appleton and Lange. Connecticut New York. 669 – 689.
- 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 Haemorrhagic Fever and it's Control in Indonesia. In Proceeding International Seminar on Dengue Fever / Dengue Haemorrhagic fever. Oct. 15 – 25.
- Sutaryo, 1992. Patogenesis dan Patofisiologi Demam Berdarah Dengue. Cermin Dunia Kedokteran Edisi Khusus. No. 81. Jakarta. Hal. 35 –39.
- Sutaryo S, Rahmah D, Wahyono, and Wildan A, 1997. Dengue Monoclonal Antibody Production. In Proceeding Seminar on Tropical Disease in Asia. TDC Unair. Feb. 29.

- 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.
- Umar I.A, 1999. Situasi DBD di Indonesia Tahun 1998 dan Kebijakan Teknik Program Pemberantasan DBD. Dalam TOT Tatalaksana DBD 1999. Yogyakarta.
- Winarto, 1997. Perkembangan Terkini Strain Virus Penyebab DBD. Dalam Simposium Regional Tinjauan Mutakhir DBD. Semarang FK Unissula : hal 21 – 29.
- Wood R, and Yusuf. 1997. Dengue Haemorrhagic Fever or Dengue Shock Syndrome Causes. School of Public Health. University of Texas. 1-2.

LAMPIRAN

Lampiran 1a : Hasil pemeriksaan ELISA kadar IgM, IgG, IgG1, IgG2a, dan IgG2b pada Mencit Setelah Diimunisasi Protein PrM Virus Dengue Dosis 500 µg/ekor.

1. Kadar Imunoglobulin M setelah pemberian Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan dosis 500 µg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.501	0.600	0.450	0.244	0.110	0.069	0.021
0.465	0.554	0.217	0.199	0.071	0.077	0.045
0.508	0.520	0.401	0.120	0.067	0.056	0.006
0.713	0.571	0.391	0.230	0.099	0.59	0.024
0.590	0.575	0.330	0.210	0.102	0.077	0.027
0.550	0.535	0.220	0.197	0.97	0.073	
0.401	0.391	0.180	0.160	0.98	0.057	
0.550	0.527	0.112	0.110	0.78	0.055	
0.550	0.485	0.222	0.200	0.102	0.070	
0.590	0.572	0.099	0.98	0.077	0.037	
0.403	0.459	0.190	0.170	0.102	0.052	
0.501	0.470	0.101	0.110	0.072	0.055	
0.567	0.475	0.140	0.125	0.107	0.060	
0.699	0.667	0.321	0.217	0.136	0.080	
0.670	0.601	0.226	0.221	0.120	0.047	

2. Kadar Imunoglobulin G setelah pemberian Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan dosis 500 µg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.088	0.117	0.198	0.390	0.670	0.980	0.023
0.077	0.098	0.142	0.342	0.670	0.989	0.041
0.087	0.121	0.159	0.361	0.750	1.130	0.016
0.241	0.250	0.270	0.471	0.782	1.330	0.022
0.109	0.240	0.260	0.480	0.772	1.230	0.033
0.087	0.119	0.180	0.369	0.750	1.130	
0.092	0.123	0.187	0.392	0.756	1.200	
0.091	0.126	0.179	0.400	0.875	1.607	
0.087	0.119	0.201	0.412	0.853	1.500	
0.102	0.125	0.206	0.430	0.800	1.620	
0.099	0.110	0.169	0.498	0.702	0.980	
0.110	0.123	0.187	0.488	0.630	0.997	
0.081	0.120	0.205	0.489	0.630	0.990	
0.142	0.150	0.192	0.480	0.745	1.370	
0.089	0.098	0.150	0.450	0.789	1.610	

3. Kadar Imunoglobulin G1 setelah pemberian Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan dosis 500 µg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.024	0.055	0.078	0.279	0.560	0.890	0.020
0.065	0.045	0.088	0.291	0.578	0.899	0.043
0.020	0.067	0.262	0.325	0.675	0.971	0.008
0.199	0.090	0.240	0.430	0.720	0.999	0.023
0.078	0.099	0.230	0.419	0.725	1.120	0.029
0.071	0.053	0.112	0.321	0.679	0.987	
0.069	0.060	0.125	0.330	0.672	0.987	
0.061	0.071	0.130	0.347	0.655	0.978	
0.060	0.075	0.135	0.332	0.717	0.999	
0.074	0.091	0.210	0.417	0.730	1.650	
0.080	0.059	0.132	0.317	0.541	0.899	
0.030	0.063	0.210	0.470	0.429	0.870	
0.038	0.079	0.220	0.460	0.502	0.971	
0.099	0.099	0.237	0.477	0.675	1.010	
0.088	0.098	0.205	0.411	0.790	1.540	

4. Kadar Imunoglobulin G2a setelah pemberian Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan dosis 500 µg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.035	0.065	0.127	0.377	0.499	0.890	0.023
0.030	0.071	0.149	0.378	0.470	0.955	0.036
0.050	0.043	0.167	0.368	0.507	0.979	0.021
0.091	0.131	0.132	0.360	0.580	0.997	0.033
0.064	0.099	0.110	0.325	0.505	0.995	0.037
0.062	0.041	0.135	0.386	0.580	1.120	
0.048	0.069	0.159	0.407	0.524	0.989	
0.050	0.081	0.168	0.439	0.540	0.987	
0.052	0.092	0.167	0.488	0.626	1.150	
0.068	0.0111	0.221	0.511	0.617	1.135	
0.061	0.055	0.176	0.540	0.427	0.869	
0.030	0.047	0.172	0.502	0.367	0.820	
0.040	0.058	0.162	0.550	0.381	0.799	
0.068	0.098	0.180	0.570	0.578	0.995	
0.063	0.099	0.220	0.598	0.590	1.200	

5. Kadar Imunoglobulin G2b setelah pemberian Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan dosis 500 µg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.061	0.037	0.168	0.322	0.470	0.887	0.020
0.038	0.068	0.153	0.331	0.413	0.869	0.036
0.050	0.047	0.169	0.230	0.330	0.790	0.018
0.079	0.110	0.210	0.213	0.450	0.910	0.034
0.065	0.105	0.210	0.301	0.487	0.997	0.038
0.064	0.053	0.176	0.376	0.488	0.898	
0.034	0.070	0.180	0.397	0.487	0.897	
0.049	0.089	0.192	0.399	0.490	0.897	
0.050	0.089	0.190	0.465	0.540	0.992	
0.061	0.117	0.215	0.498	0.540	0.980	
0.064	0.059	0.176	0.425	0.340	0.780	
0.028	0.056	0.172	0.390	0.279	0.689	
0.028	0.061	0.150	0.475	0.280	0.687	
0.071	0.115	0.225	0.490	0.410	0.873	
0.079	0.110	0.220	0.499	0.450	0.895	

Lampiran 1b : Hasil Pemeriksaan ELISA Kadar IgM, IgG, IgG1, IgG2a, dan IgG2b pada Mencit Setelah Diimunisasi Protein PrM Virus Dengue Dosis 1000 $\mu\text{g/ekor}$.

1. Kadar Imunoglobulin M setelah pemberian Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan dosis 1000 $\mu\text{g/ekor}$.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.587	0.677	0.561	0.333	0.101	0.111	0.021
0.490	0.568	0.301	0.201	0.099	0.086	0.033
0.518	0.590	0.388	0.202	0.084	0.99	0.013
0.615	0.746	0.376	0.255	0.114	0.089	0.028
0.612	0.610	0.305	0.203	0.117	0.98	0.033
0.530	0.548	0.121	0.207	0.122	0.101	
0.325	0.461	0.178	0.179	0.099	0.089	
0.550	0.566	0.240	0.111	0.098	0.075	
0.530	0.486	0.215	0.215	0.121	0.101	
0.601	0.521	0.110	0.120	0.89	0.065	
0.425	0.475	0.220	0.179	0.099	0.112	
0.462	0.486	0.115	0.123	0.112	0.077	
0.482	0.492	0.125	0.129	0.107	0.062	
0.631	0.665	0.377	0.213	0.126	0.069	
0.590	0.619	0.301	0.215	0.120	0.081	

2. Kadar Imunoglobulin G setelah pemberian fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan dosis 1000 $\mu\text{g/ekor}$.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.089	0.125	0.186	0.488	0.879	1.122	0.023
0.075	0.098	0.138	0.467	0.877	1.148	0.032
0.088	0.120	0.149	0.512	0.963	1.347	0.010
0.257	0.271	0.286	0.667	0.125	1.421	0.026
0.125	0.255	0.281	0.665	0.999	1.328	0.033
0.108	0.171	0.177	0.557	1.088	1.249	
0.107	0.115	0.188	0.562	1.120	1.310	
0.099	0.125	0.185	0.552	1.247	1.658	
0.088	0.130	0.200	0.632	1.130	1.612	
0.118	0.151	0.210	0.621	1.087	1.675	
0.111	0.210	0.188	0.633	0.878	1.329	
0.117	0.220	0.189	0.672	0.887	1.161	
0.101	0.147	0.168	0.661	0.866	1.201	
0.156	0.179	0.231	0.773	1.065	1.415	
0.099	0.113	0.237	0.686	1.235	1.669	

3. Kadar Imunoglobulin G1 setelah pemberian Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan dosis 1000 µg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.049	0.065	0.082	0.287	0.678	0.972	0.022
0.086	0.057	0.083	0.305	0.668	0.977	0.035
0.053	0.080	0.167	0.323	0.771	1.112	0.007
0.215	0.231	0.275	0.445	0.805	1.322	0.026
0.089	0.122	0.266	0.413	0.816	1.217	0.031
0.079	0.065	0.127	0.321	0.767	1.122	
0.082	0.081	0.128	0.368	0.778	1.112	
0.075	0.078	0.138	0.356	0.759	1.111	
0.072	0.066	0.128	0.321	0.823	1.317	
0.080	0.078	0.210	0.415	0.855	1.671	
0.087	0.118	0.122	0.318	0.922	0.987	
0.059	0.119	0.211	0.464	0.617	0.895	
0.071	0.145	0.248	0.471	0.687	0.968	
0.115	0.140	0.234	0.487	0.721	1.115	
0.089	0.075	0.261	0.401	0.919	1.565	

4. Kadar Imunoglobulin G2a setelah pemberian Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan dosis 1000 µg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.049	0.086	0.127	0.378	0.558	0.989	0.023
0.050	0.086	0.158	0.376	0.562	0.975	0.037
0.071	0.067	0.161	0.389	0.583	0.108	0.016
0.099	0.175	0.121	0.387	0.773	0.101	0.027
0.069	0.110	0.110	0.333	0.583	0.111	0.032
0.071	0.47	0.167	0.409	0.785	1.241	
0.055	0.071	0.157	0.412	0.719	1.123	
0.059	0.081	0.178	0.467	0.742	1.121	
0.061	0.080	0.261	0.495	0.831	1.231	
0.079	0.115	0.210	0.577	0.801	1.114	
0.079	0.054	0.159	0.567	0.527	0.978	
0.038	0.042	0.166	0.517	0.432	0.981	
0.049	0.058	0.170	0.557	0.451	0.868	
0.079	0.087	0.172	0.583	0.765	1.115	
0.085	0.132	0.210	0.615	0.786	1.210	

5. Kadar Imunoglobulin G2b setelah pemberian Fraksi Protein PrM Virus Dengue dengan dosis 1000 µg/ekor.

Hari ke 4	Hari ke 7	Hari ke 10	Hari ke 15	Hari ke 22	Hari ke 30	Kontrol
0.078	0.078	0.165	0.325	0.442	0.937	0.021
0.045	0.071	0.162	0.354	0.341	0.948	0.033
0.064	0.053	0.187	0.317	0.411	1.108	0.016
0.085	0.102	0.311	0.277	0.507	0.975	0.032
0.077	0.110	0.357	0.307	0.483	1.114	0.030
0.087	0.048	0.188	0.387	0.489	1.117	
0.053	0.075	0.192	0.407	0.487	1.097	
0.057	0.087	0.209	0.478	0.421	1.098	
0.074	0.090	0.211	0.479	0.524	1.126	
0.079	0.120	0.221	0.485	0.511	1.111	
0.090	0.053	0.188	0.413	0.412	0.968	
0.057	0.045	0.197	0.429	0.349	0.869	
0.055	0.062	0.167	0.481	0.259	0.851	
0.084	0.081	0.248	0.495	0.425	1.099	
0.086	0.177	0.287	0.511	0.480	1.118	

Lampiran 2a Hasil Perhitungan Regresi Model Kurva Imunoglobulin dengan Dosis 500 $\mu\text{g}/\text{ekor}$

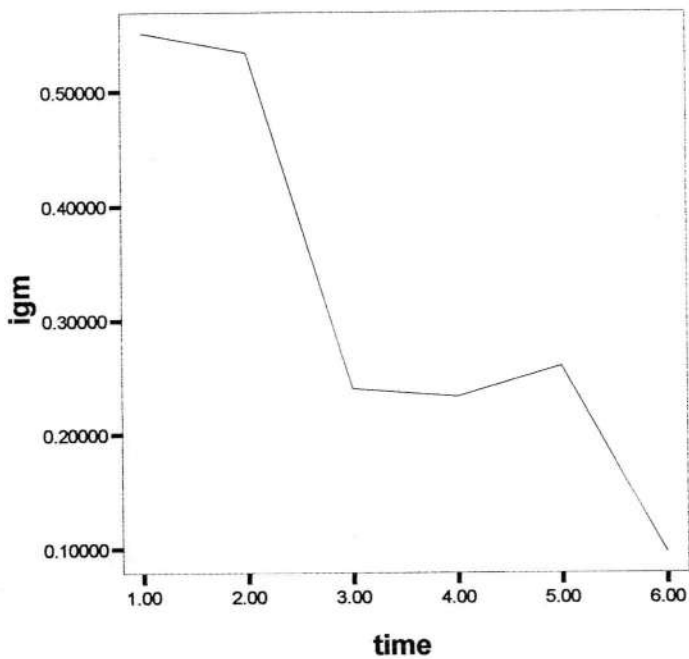
Regression

Coefficients^a

Model		95% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	.408	.849
	TIME	-.145	-.032

a. Dependent Variable: IGM

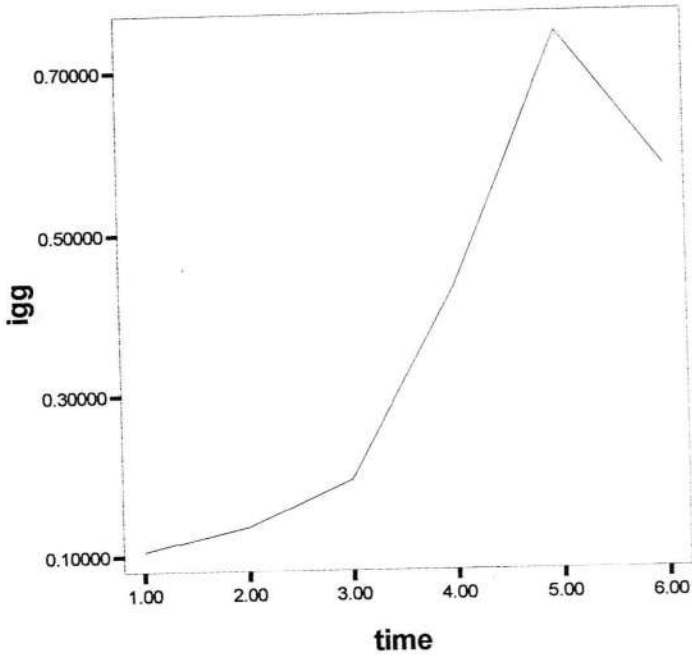
Interactive Graph



Model		95% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	-.403	.247
	TIME	.043	.210

a. Dependent Variable: IGG

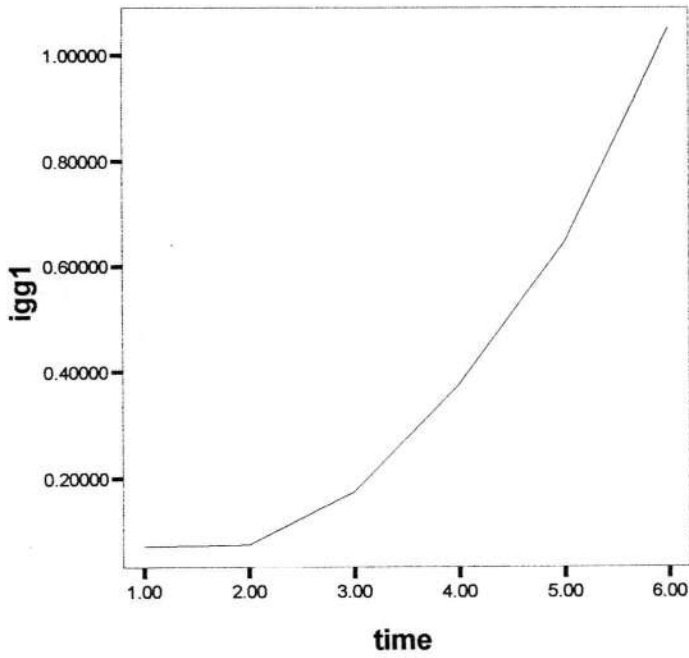
Interactive Graph



Model		95% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	-.664	.097
	TIME	.097	.292

a. Dependent Variable: IGG1

Interactive Graph

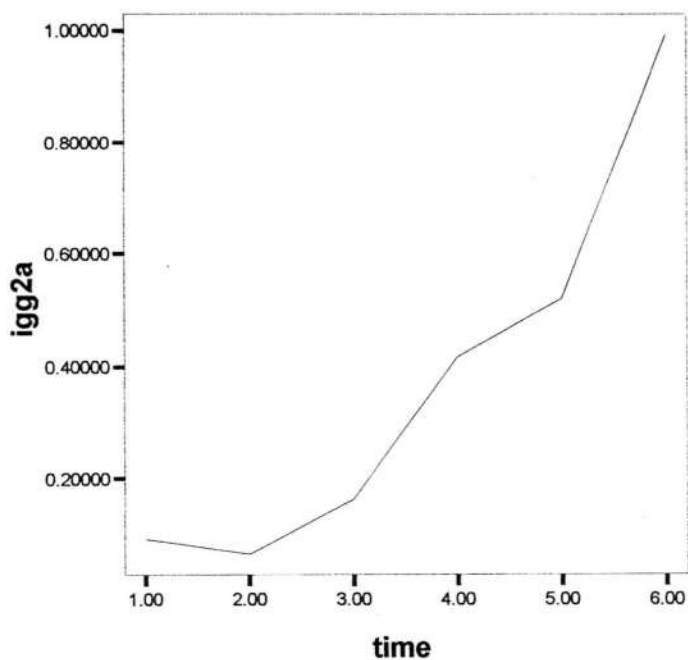


Dot/Lines show Means

Model		95% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	-.624	.150
	TIME	.075	.274

a. Dependent Variable: IGG2A

Interactive Graph



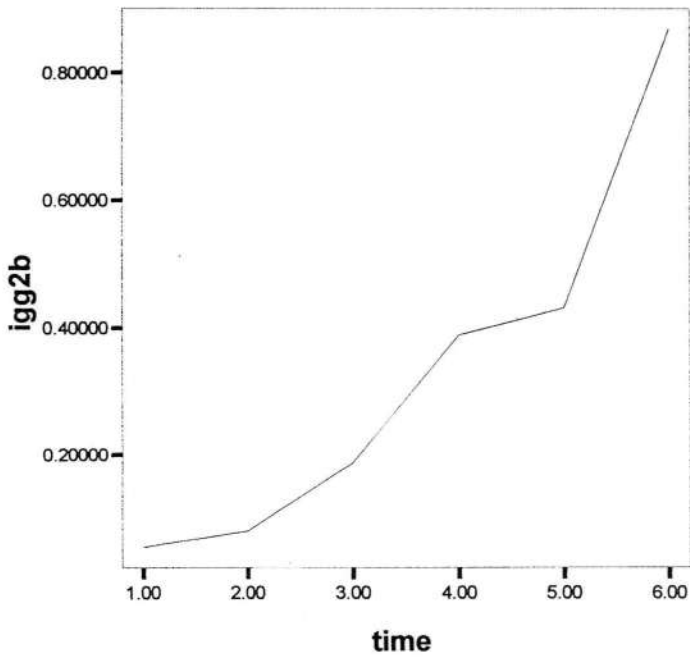
Dot/Lines show Means

Coefficients^a

Model		95% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	-.509	.113
	TIME	.072	.232

a. Dependent Variable: IGG2B

Interactive Graph



Dot/Lines show Means

Lampiran 2b

Hasil Perhitungan Regresi Model Kurva imunoglobulin dengan Dosis 1000 $\mu\text{g/ekor}$

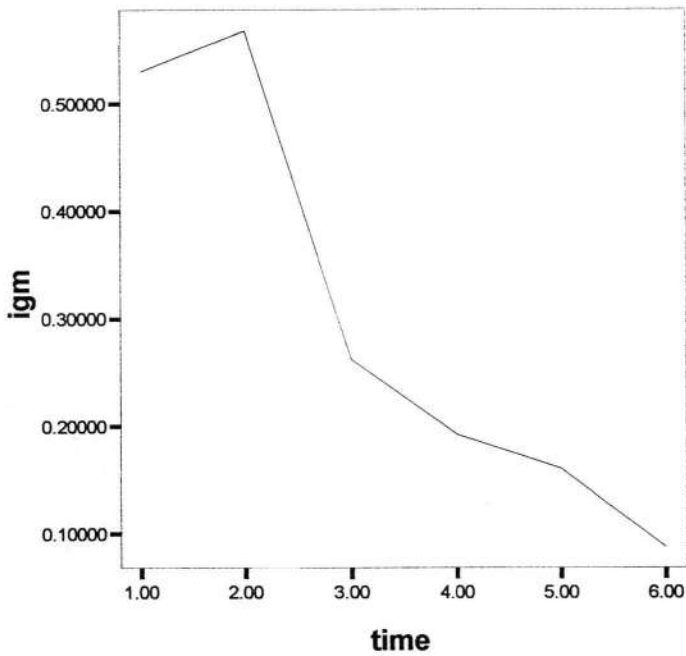
Regression

Coefficients^a

Model		95% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	.439	.861
	TIME	-.154	-.046

a. Dependent Variable: IGM

Interactive Graph

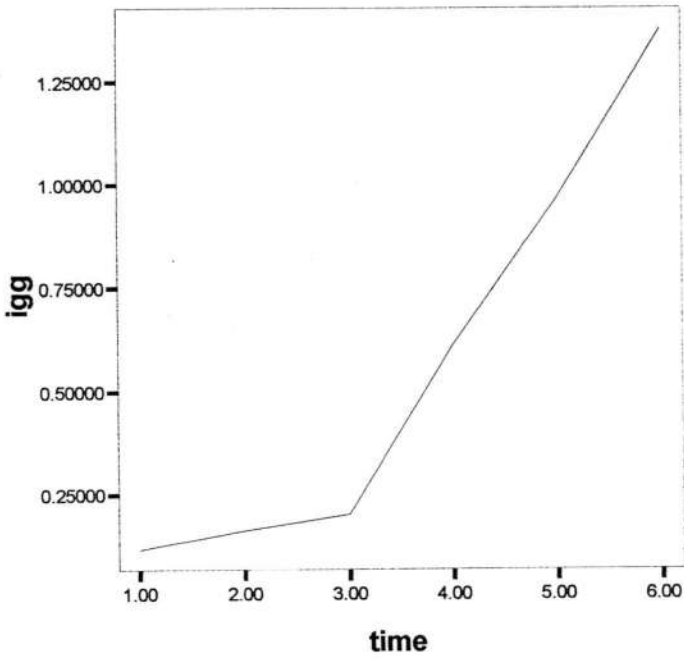


Dot/Lines show Means

Model		95% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	-.803	.123
	TIME	.142	.379

a. Dependent Variable: IGG

Interactive Graph

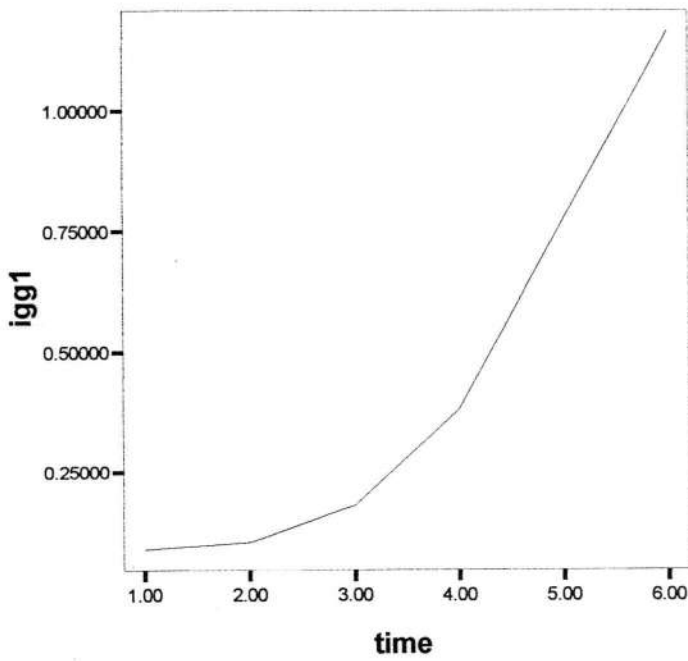


Dot/Lines show Means

Model		95% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	-.762	.136
	TIME	.102	.332

a. Dependent Variable: IGG1

Interactive Graph



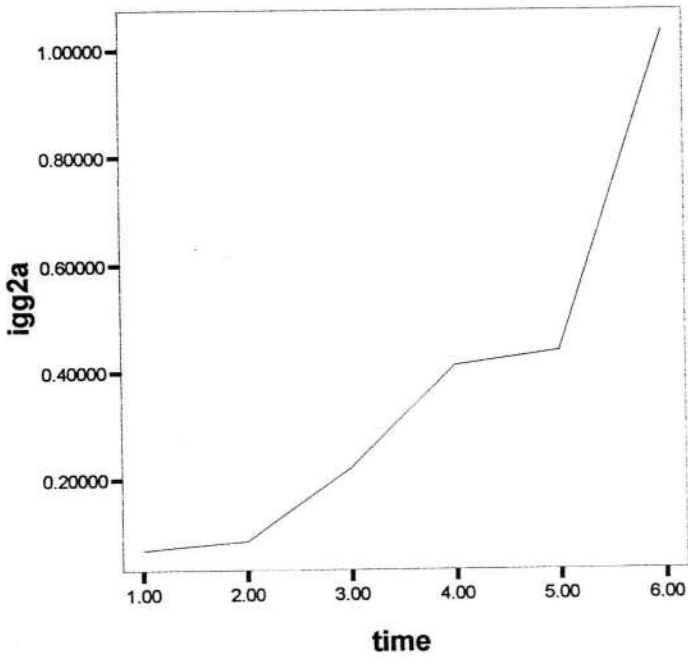
Dot/Lines show Means

Coefficients

Model		95% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	-.673	.205
	TIME	.061	.287

a. Dependent Variable: IGG2A

Interactive Graph

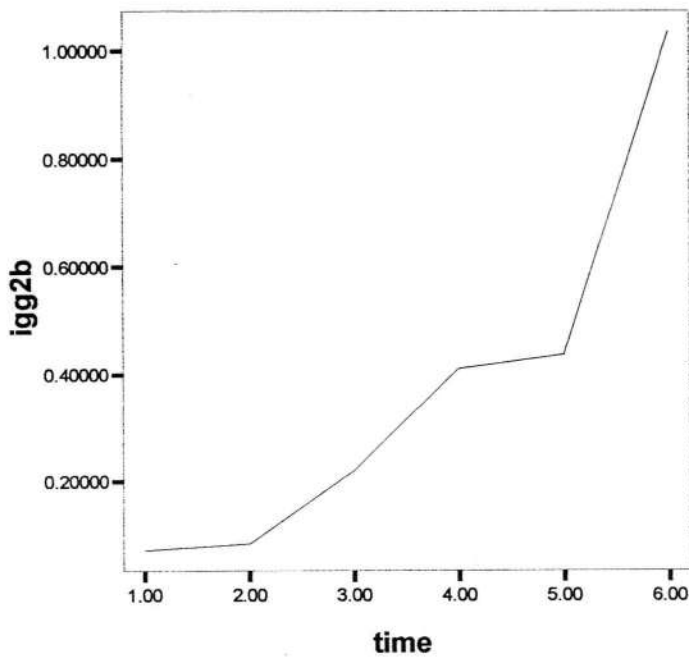


Dot/Lines show Means

Model		95% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	-.672	.210
	TIME	.060	.287

a. Dependent Variable: IGG2B

Interactive Graph



Dot/Lines show Means

Lampiran 3a

Hasil Perhitungan Perbandingan Imunoglobulin pada
Dosis 500 µg/ekor dengan Metode Anova

Oneway

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DATA4H

LSD

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	.44507*	3.058E-02	.000	.38408	.50605
	3.0	.48013*	3.058E-02	.000	.41915	.54112
	4.0	.45860*	3.058E-02	.000	.39762	.51958
	5.0	.49580*	3.058E-02	.000	.43482	.55678
2.0	1.0	-.44507*	3.058E-02	.000	-.50605	-.38408
	3.0	3.5067E-02	3.058E-02	.255	-2.59165E-02	9.6050E-02
	4.0	1.3533E-02	3.058E-02	.659	-4.74499E-02	7.4517E-02
	5.0	5.0733E-02	3.058E-02	.102	-1.02499E-02	.11172
3.0	1.0	-.48013*	3.058E-02	.000	-.54112	-.41915
	2.0	-3.5067E-02	3.058E-02	.255	-9.60499E-02	2.5917E-02
	4.0	-2.1533E-02	3.058E-02	.484	-8.25165E-02	3.9450E-02
	5.0	1.5667E-02	3.058E-02	.610	-4.53165E-02	7.6650E-02
4.0	1.0	-.45860*	3.058E-02	.000	-.51958	-.39762
	2.0	-1.3533E-02	3.058E-02	.659	-7.45165E-02	4.7450E-02
	3.0	2.1533E-02	3.058E-02	.484	-3.94499E-02	8.2517E-02
	5.0	3.7200E-02	3.058E-02	.228	-2.37832E-02	9.8183E-02
5.0	1.0	-.49580*	3.058E-02	.000	-.55678	-.43482
	2.0	-5.0733E-02	3.058E-02	.102	-.11172	1.0250E-02
	3.0	-1.5667E-02	3.058E-02	.610	-7.66499E-02	4.5317E-02
	4.0	-3.7200E-02	3.058E-02	.228	-9.81832E-02	2.3783E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Dependent Variable: DATA7H

LSD

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	.39753*	1.558E-02	.000	.36646	.42861
	3.0	.45987*	1.558E-02	.000	.42879	.49094
	4.0	.46853*	1.558E-02	.000	.43745	.49960
	5.0	.45373*	1.558E-02	.000	.42266	.48481
2.0	1.0	-.39753*	1.558E-02	.000	-.42861	-.36646
	3.0	6.2333E-02*	1.558E-02	.000	3.1260E-02	9.3407E-02
	4.0	7.0993E-02*	1.558E-02	.000	3.9920E-02	.10207
	5.0	5.6200E-02*	1.558E-02	.001	2.5126E-02	8.7274E-02
3.0	1.0	-.45987*	1.558E-02	.000	-.49094	-.42879
	2.0	-6.2333E-02*	1.558E-02	.000	-9.34070E-02	-3.12596E-02
	4.0	8.6600E-03	1.558E-02	.580	-2.24137E-02	3.9734E-02
	5.0	-6.1333E-03	1.558E-02	.695	-3.72070E-02	2.4940E-02
4.0	1.0	-.46853*	1.558E-02	.000	-.49960	-.43745
	2.0	-7.0993E-02*	1.558E-02	.000	-.10207	-3.99196E-02
	3.0	-8.6600E-03	1.558E-02	.580	-3.97337E-02	2.2414E-02
	5.0	-1.4793E-02	1.558E-02	.346	-4.58670E-02	1.6280E-02
5.0	1.0	-.45373*	1.558E-02	.000	-.48481	-.42266
	2.0	-5.6200E-02*	1.558E-02	.001	-8.72737E-02	-2.51263E-02
	3.0	6.1333E-03	1.558E-02	.695	-2.49404E-02	3.7207E-02
	4.0	1.4793E-02	1.558E-02	.346	-1.62804E-02	4.5867E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Dependent Variable: DATA10H
 LSD

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	4.7667E-02*	2.278E-02	.040	2.2357E-03	9.3098E-02
	3.0	6.5733E-02*	2.278E-02	.005	2.0302E-02	.11116
	4.0	7.7000E-02*	2.278E-02	.001	3.1569E-02	.12243
	5.0	5.2933E-02*	2.278E-02	.023	7.5024E-03	9.8364E-02
2.0	1.0	-4.7667E-02*	2.278E-02	.040	-9.30976E-02	-2.23574E-03
	3.0	1.8067E-02	2.278E-02	.430	-2.73643E-02	6.3498E-02
	4.0	2.9333E-02	2.278E-02	.202	-1.60976E-02	7.4764E-02
	5.0	5.2667E-03	2.278E-02	.818	-4.01643E-02	5.0698E-02
3.0	1.0	-6.5733E-02*	2.278E-02	.005	-.11116	-2.03024E-02
	2.0	-1.8067E-02	2.278E-02	.430	-6.34976E-02	2.7364E-02
	4.0	1.1267E-02	2.278E-02	.622	-3.41643E-02	5.6698E-02
	5.0	-1.2800E-02	2.278E-02	.576	-5.82309E-02	3.2631E-02
4.0	1.0	-7.7000E-02*	2.278E-02	.001	-.12243	-3.15691E-02
	2.0	-2.9333E-02	2.278E-02	.202	-7.47643E-02	1.6098E-02
	3.0	-1.1267E-02	2.278E-02	.622	-5.66976E-02	3.4164E-02
	5.0	-2.4067E-02	2.278E-02	.294	-6.94976E-02	2.1364E-02
5.0	1.0	-5.2933E-02*	2.278E-02	.023	-9.83643E-02	-7.50241E-03
	2.0	-5.2667E-03	2.278E-02	.818	-5.06976E-02	4.0164E-02
	3.0	1.2800E-02	2.278E-02	.576	-3.26309E-02	5.8231E-02
	4.0	2.4067E-02	2.278E-02	.294	-2.13643E-02	6.9498E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Dependent Variable: DATA15H
 LSD

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	-.19727*	4.613E-02	.000	-.28927	-.10527
	3.0	-.14220*	4.613E-02	.003	-.23420	-5.02016E-02
	4.0	-.18407*	4.613E-02	.000	-.27607	-9.20683E-02
	5.0	-.15520*	4.613E-02	.001	-.24720	-6.32016E-02
2.0	1.0	.19727*	4.613E-02	.000	.10527	.28927
	3.0	5.5067E-02	4.613E-02	.237	-3.69317E-02	.14707
	4.0	1.3200E-02	4.613E-02	.776	-7.87984E-02	.10520
	5.0	4.2067E-02	4.613E-02	.365	-4.99317E-02	.13407
3.0	1.0	.14220*	4.613E-02	.003	5.0202E-02	.23420
	2.0	-5.5067E-02	4.613E-02	.237	-.14707	3.6932E-02
	4.0	-4.1867E-02	4.613E-02	.367	-.13387	5.0132E-02
	5.0	-1.3000E-02	4.613E-02	.779	-.10500	7.8998E-02
4.0	1.0	.18407*	4.613E-02	.000	9.2068E-02	.27607
	2.0	-1.3200E-02	4.613E-02	.776	-.10520	7.8798E-02
	3.0	4.1867E-02	4.613E-02	.367	-5.01317E-02	.13387
	5.0	2.8867E-02	4.613E-02	.533	-6.31317E-02	.12087
5.0	1.0	.15520*	4.613E-02	.001	6.3202E-02	.24720
	2.0	-4.2067E-02	4.613E-02	.365	-.13407	4.9932E-02
	3.0	1.3000E-02	4.613E-02	.779	-7.89984E-02	.10500
	4.0	-2.8867E-02	4.613E-02	.533	-.12087	6.3132E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Dependent Variable: DATA22H

LSD

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	-.48407*	6.207E-02	.000	-.60785	-.36028
	3.0	-.38353*	6.207E-02	.000	-.50732	-.25975
	4.0	-.25973*	6.207E-02	.000	-.38352	-.13595
	5.0	-.17060*	6.207E-02	.008	-.29439	-4.68142E-02
2.0	1.0	.48407*	6.207E-02	.000	.36028	.60785
	3.0	.10053	6.207E-02	.110	-2.32525E-02	.22432
	4.0	.22433*	6.207E-02	.001	.10055	.34812
	5.0	.31347*	6.207E-02	.000	.18968	.43725
3.0	1.0	.38353*	6.207E-02	.000	.25975	.50732
	2.0	-.10053	6.207E-02	.110	-.22432	2.32525E-02
	4.0	.12380*	6.207E-02	.050	1.4175E-05	.24759
	5.0	.21293*	6.207E-02	.001	8.9148E-02	.33672
4.0	1.0	.25973*	6.207E-02	.000	.13595	.38352
	2.0	-.22433*	6.207E-02	.001	-.34812	-.10055
	3.0	-.12380*	6.207E-02	.050	-.24759	-1.41748E-05
	5.0	8.9133E-02	6.207E-02	.155	-3.46525E-02	.21292
5.0	1.0	.17060*	6.207E-02	.008	4.6814E-02	.29439
	2.0	-.31347*	6.207E-02	.000	-.43725	-.18968
	3.0	-.21293*	6.207E-02	.001	-.33672	-8.91475E-02
	4.0	-8.9133E-02	6.207E-02	.155	-.21292	3.4652E-02

* . The mean difference is significant at the .05 level.

Dependent Variable: DATA30H
 LSD

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	-.48053*	7.494E-02	.000	-.62999	-.33107
	3.0	-.95433*	7.494E-02	.000	-1.10379	-.80487
	4.0	-.89500*	7.494E-02	.000	-1.04446	-.74554
	5.0	-.77247*	7.494E-02	.000	-.92193	-.62301
2.0	1.0	.48053*	7.494E-02	.000	.33107	.62999
	3.0	-.47380*	7.494E-02	.000	-.62326	-.32434
	4.0	-.41447*	7.494E-02	.000	-.56393	-.26501
	5.0	-.29193*	7.494E-02	.000	-.44139	-.14247
3.0	1.0	.95433*	7.494E-02	.000	.80487	1.10379
	2.0	.47380*	7.494E-02	.000	.32434	.62326
	4.0	5.9333E-02	7.494E-02	.431	-9.01274E-02	.20879
	5.0	.18187*	7.494E-02	.018	3.2406E-02	.33133
4.0	1.0	.89500*	7.494E-02	.000	.74554	1.04446
	2.0	.41447*	7.494E-02	.000	.26501	.56393
	3.0	-5.9333E-02	7.494E-02	.431	-.20879	9.0127E-02
	5.0	.12253	7.494E-02	.107	-2.69274E-02	.27199
5.0	1.0	.77247*	7.494E-02	.000	.62301	.92193
	2.0	.29193*	7.494E-02	.000	.14247	.44139
	3.0	-.18187*	7.494E-02	.018	-.33133	-3.24060E-02
	4.0	-.12253	7.494E-02	.107	-.27199	2.6927E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 3b

Hasil perhitungan Perbandingan Imunoglobulin pada
Dosis 1000 µg/ekor dengan Metode Anova

Oneway

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DATA4H

LSD

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	.41407*	1.705E-02	.000	.38005	.44808
	3.0	.44313*	1.705E-02	.000	.40912	.47715
	4.0	.46307*	1.705E-02	.000	.42905	.49708
	5.0	.45847*	1.705E-02	.000	.42445	.49248
2.0	1.0	-.41407*	1.705E-02	.000	-.44808	-.38005
	3.0	2.9067E-02	1.705E-02	.093	-4.94587E-03	6.3079E-02
	4.0	4.9000E-02*	1.705E-02	.005	1.4987E-02	8.3013E-02
	5.0	4.4400E-02*	1.705E-02	.011	1.0387E-02	7.8413E-02
3.0	1.0	-.44313*	1.705E-02	.000	-.47715	-.40912
	2.0	-2.9067E-02	1.705E-02	.093	-6.30792E-02	4.9459E-03
	4.0	1.9933E-02	1.705E-02	.246	-1.40792E-02	5.3946E-02
	5.0	1.5333E-02	1.705E-02	.372	-1.86792E-02	4.9346E-02
4.0	1.0	-.46307*	1.705E-02	.000	-.49708	-.42905
	2.0	-4.9000E-02*	1.705E-02	.005	-8.30125E-02	-1.49875E-02
	3.0	-1.9933E-02	1.705E-02	.246	-5.39459E-02	1.4079E-02
	5.0	-4.6000E-03	1.705E-02	.788	-3.86125E-02	2.9413E-02
5.0	1.0	-.45847*	1.705E-02	.000	-.49248	-.42445
	2.0	-4.4400E-02*	1.705E-02	.011	-7.84125E-02	-1.03875E-02
	3.0	-1.5333E-02	1.705E-02	.372	-4.93459E-02	1.8679E-02
	4.0	4.6000E-03	1.705E-02	.788	-2.94125E-02	3.8613E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Dependent Variable: DATA7H
 LSD

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	.40533*	1.974E-02	.000	.36597	.44470
	3.0	.46600*	1.974E-02	.000	.42664	.50536
	4.0	.48127*	1.974E-02	.000	.44190	.52063
	5.0	.48387*	1.974E-02	.000	.44450	.52323
2.0	1.0	-.40533*	1.974E-02	.000	-.44470	-.36597
	3.0	6.0667E-02*	1.974E-02	.003	2.1303E-02	.10003
	4.0	7.5933E-02*	1.974E-02	.000	3.6570E-02	.11530
	5.0	7.8533E-02*	1.974E-02	.000	3.9170E-02	.11790
3.0	1.0	-.46600*	1.974E-02	.000	-.50536	-.42664
	2.0	-6.0667E-02*	1.974E-02	.003	-.10003	-2.13032E-02
	4.0	1.5267E-02	1.974E-02	.442	-2.40968E-02	5.4630E-02
	5.0	1.7867E-02	1.974E-02	.368	-2.14968E-02	5.7230E-02
4.0	1.0	-.48127*	1.974E-02	.000	-.52063	-.44190
	2.0	-7.5933E-02*	1.974E-02	.000	-.11530	-3.65699E-02
	3.0	-1.5267E-02	1.974E-02	.442	-5.46301E-02	2.4097E-02
	5.0	2.6000E-03	1.974E-02	.896	-3.67634E-02	4.1963E-02
5.0	1.0	-.48387*	1.974E-02	.000	-.52323	-.44450
	2.0	-7.8533E-02*	1.974E-02	.000	-.11790	-3.91699E-02
	3.0	-1.7867E-02	1.974E-02	.368	-5.72301E-02	2.1497E-02
	4.0	-2.6000E-03	1.974E-02	.896	-4.19634E-02	3.6763E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Dependent Variable: DATA10H

LSD

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	6.1333E-02*	2.717E-02	.027	7.1541E-03	.11551
	3.0	8.3533E-02*	2.717E-02	.003	2.9354E-02	.13771
	4.0	9.3733E-02*	2.717E-02	.001	3.9554E-02	.14791
	5.0	4.2867E-02	2.717E-02	.119	-1.13126E-02	9.7046E-02
2.0	1.0	-6.1333E-02*	2.717E-02	.027	-.11551	-7.15407E-03
	3.0	2.2200E-02	2.717E-02	.417	-3.19793E-02	7.6379E-02
	4.0	3.2400E-02	2.717E-02	.237	-2.17793E-02	8.6579E-02
	5.0	-1.8467E-02	2.717E-02	.499	-7.26459E-02	3.5713E-02
3.0	1.0	-8.3533E-02*	2.717E-02	.003	-.13771	-2.93541E-02
	2.0	-2.2200E-02	2.717E-02	.417	-7.63793E-02	3.1979E-02
	4.0	1.0200E-02	2.717E-02	.708	-4.39793E-02	6.4379E-02
	5.0	-4.0667E-02	2.717E-02	.139	-9.48459E-02	1.3513E-02
4.0	1.0	-9.3733E-02*	2.717E-02	.001	-.14791	-3.95541E-02
	2.0	-3.2400E-02	2.717E-02	.237	-8.65793E-02	2.1779E-02
	3.0	-1.0200E-02	2.717E-02	.708	-6.43793E-02	4.3979E-02
	5.0	-5.0867E-02	2.717E-02	.065	-.10505	3.3126E-03
5.0	1.0	-4.2867E-02	2.717E-02	.119	-9.70459E-02	1.1313E-02
	2.0	1.8467E-02	2.717E-02	.499	-3.57126E-02	7.2646E-02
	3.0	4.0667E-02	2.717E-02	.139	-1.35126E-02	9.4846E-02
	4.0	5.0867E-02	2.717E-02	.065	-3.31260E-03	.10505

*. The mean difference is significant at the .05 level.

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	-.41753*	2.816E-02	.000	-.47371	-.36136
	3.0	-.18733*	2.816E-02	.000	-.24351	-.13116
	4.0	-.27847*	2.816E-02	.000	-.33464	-.22229
	5.0	-.21733*	2.816E-02	.000	-.27351	-.16116
2.0	1.0	.41753*	2.816E-02	.000	.36136	.47371
	3.0	.23020*	2.816E-02	.000	.17403	.28637
	4.0	.13907*	2.816E-02	.000	8.2894E-02	.19524
	5.0	.20020*	2.816E-02	.000	.14403	.25637
3.0	1.0	.18733*	2.816E-02	.000	.13116	.24351
	2.0	-.23020*	2.816E-02	.000	-.28637	-.17403
	4.0	-9.1133E-02*	2.816E-02	.002	-.14731	-3.49602E-02
	5.0	-3.0000E-02	2.816E-02	.290	-8.61731E-02	2.6173E-02
4.0	1.0	.27847*	2.816E-02	.000	.22229	.33464
	2.0	-.13907*	2.816E-02	.000	-.19524	-8.28936E-02
	3.0	9.1133E-02*	2.816E-02	.002	3.4960E-02	.14731
	5.0	6.1133E-02*	2.816E-02	.033	4.9602E-03	.11731
5.0	1.0	.21733*	2.816E-02	.000	.16116	.27351
	2.0	-.20020*	2.816E-02	.000	-.25637	-.14403
	3.0	3.0000E-02	2.816E-02	.290	-2.61731E-02	8.6173E-02
	4.0	-6.1133E-02*	2.816E-02	.033	-.11731	-4.96023E-03

*. The mean difference is significant at the .05 level.

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	-.80247*	6.185E-02	.000	-.92583	-.67910
	3.0	-.61180*	6.185E-02	.000	-.73516	-.48844
	4.0	-.49927*	6.185E-02	.000	-.62263	-.37590
	5.0	-.27547*	6.185E-02	.000	-.39883	-.15210
2.0	1.0	.80247*	6.185E-02	.000	.67910	.92583
	3.0	.19067*	6.185E-02	.003	6.7303E-02	.31403
	4.0	.30320*	6.185E-02	.000	.17984	.42656
	5.0	.52700*	6.185E-02	.000	.40364	.65036
3.0	1.0	.61180*	6.185E-02	.000	.48844	.73516
	2.0	-.19067*	6.185E-02	.003	-.31403	-6.73026E-02
	4.0	.11253	6.185E-02	.073	-1.08307E-02	.23590
	5.0	.33633*	6.185E-02	.000	.21297	.45970
4.0	1.0	.49927*	6.185E-02	.000	.37590	.62263
	2.0	-.30320*	6.185E-02	.000	-.42656	-.17984
	3.0	-.11253	6.185E-02	.073	-.23590	1.0831E-02
	5.0	.22380*	6.185E-02	.001	.10044	.34716
5.0	1.0	.27547*	6.185E-02	.000	.15210	.39883
	2.0	-.52700*	6.185E-02	.000	-.65036	-.40364
	3.0	-.33633*	6.185E-02	.000	-.45970	-.21297
	4.0	-.22380*	6.185E-02	.001	-.34716	-.10044

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dependent Variable: DATA30H

LSD

(I) JENISAB	(J) JENISAB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.0	2.0	-1.28867*	8.501E-02	.000	-1.45822	-1.11911
	3.0	-1.07653*	8.501E-02	.000	-1.24609	-.90698
	4.0	-.79673*	8.501E-02	.000	-.96629	-.62718
	5.0	-.94807*	8.501E-02	.000	-1.11762	-.77851
2.0	1.0	1.28867*	8.501E-02	.000	1.11911	1.45822
	3.0	.21213*	8.501E-02	.015	4.2582E-02	.38169
	4.0	.49193*	8.501E-02	.000	.32238	.66149
	5.0	.34060*	8.501E-02	.000	.17105	.51015
3.0	1.0	1.07653*	8.501E-02	.000	.90698	1.24609
	2.0	-.21213*	8.501E-02	.015	-.38169	-4.25815E-02
	4.0	.27980*	8.501E-02	.002	.11025	.44935
	5.0	.12847	8.501E-02	.135	-4.10851E-02	.29802
4.0	1.0	.79673*	8.501E-02	.000	.62718	.96629
	2.0	-.49193*	8.501E-02	.000	-.66149	-.32238
	3.0	-.27980*	8.501E-02	.002	-.44935	-.11025
	5.0	-.15133	8.501E-02	.079	-.32089	1.8218E-02
5.0	1.0	.94807*	8.501E-02	.000	.77851	1.11762
	2.0	-.34060*	8.501E-02	.000	-.51015	-.17105
	3.0	-.12847	8.501E-02	.135	-.29802	4.1085E-02
	4.0	.15133	8.501E-02	.079	-1.82185E-02	.32089

*. The mean difference is significant at the .05 level.