

ESIS

**RESPON IMUN HUMORAL DAN SELULER PADA KELINCI
White New Zealand YANG DIIMUNISASI DENGAN
VAKSIN DENGUE MULTIVALEN
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**



LITA RAKHMA YUSTINASARI

090810476M

**PROGRAM STUDI VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA
PROGRAM MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2011**

**RESPON IMUN HUMORAL DAN SELULER PADA KELINCI
White New Zealand YANG DIIMUNISASI DENGAN
VAKSIN DENGUE MULTIVALEN**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya

LITA RAKHMA YUSTINASARI

090810476M

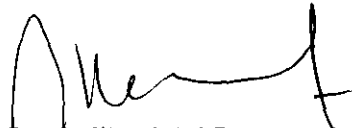
**PROGRAM STUDI VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA
PROGRAM MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2011**

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 10 Februari 2011

Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh
NIP. 195910031987011001

Pembimbing



Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc
NIP. 195010031976032001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc
NIP. 195010031976032001

Telah diuji pada
Tanggal 10 Februari 2011
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.

Anggota : 1. Dr. Anwar Ma'ruf, drh., M.Kes.
2. Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, drh., M.S.
3. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
4. Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc.

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah dan puji syukur kehadiran Allah SWT atas karunia, taufik, rahmat, serta hidayah-Nya, sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis dengan judul **Respon Imun Humoral dan Seluler pada Kelinci *White New Zealand* yang Diimunisasi dengan Vaksin *Dengue Multivalen*.**

Tesis ini dapat terwujud tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran, dan koreksi dari para pembimbing. Dengan segala kerendahan hati, perkenalkan penulis mengucapkan terima kasih serta penghargaan setinggi-tingginya kepada :

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. sebagai Pembimbing Ketua sekaligus Ketua Proyek Penelitian yang dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran selalu memberikan dukungan mental, meluangkan waktu di sela-sela kesibukan beliau untuk berdiskusi dan memberi masukan, serta memperkenalkan penulis pada berbagai metode imunologi.

Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc. sebagai Pembimbing yang telah memberikan bimbingan dalam kemajuan cara berfikir ilmiah, sekaligus sebagai Ketua Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan.

Pada kesempatan ini, penulis juga menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt. selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan.

Prof. Romziah Sidik, PhD., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan para Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan Program Magister pada Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ketua Departemen Anatomi Veteriner, Dr. Soeharsono, drh., M.Si yang telah memberikan izin dan dukungan untuk menyelesaikan pendidikan magister.

Penanggung Jawab Mata Kuliah Histologi Veteriner, Chairul Anwar, drh., M.S., PA. Vet. dan seluruh staf, Eka Pramytha Hestianah, drh., M.Kes., PA. Vet. dan Suryo Kuncorojakti, drh yang telah memberikan semangat yang tiada henti kepada penulis.

Seluruh tim penguji, Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes., Dr. Anwar Ma'ruf, drh. M.Kes., dan Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, drh., M.S. atas masukan saran dan koreksinya untuk perbaikan tesis ini.

Seluruh staf pengajar pada Program Magister Vaksinologi dan Imunoterapetika yang telah memberikan ilmu dasar dan terapan yang sangat bermanfaat.

Seluruh staf Laboratorium *Dengue* Institute Tropical Disease Universitas Airlangga, Helen Susilowati, SKM. dan Erik H., S.Si., atas bantuan teknik pemeriksaan dan pengujian di laboratorium.

Kedua orang tua tercinta, ayahanda Heri Triharyanto S.H., M.Hum (Alm) dan ibunda Dra. Siti Rokhmi Fuadati, M.Si. atas doa yang tiada henti, kasih sayang, serta kesabaran dan keikhlasan dalam mengasuh, mendidik, mengayomi, menafkahi, dan memberi tauladan yang baik hingga saat ini. Adikku Yuristo Ardi Hanggoro, S.Ikom. yang selalu memberi dukungan dan semangat setiap saat.

Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini, Apt., sebagai pengganti ayah terbaik yang selalu memberikan dukungan moral dan spiritual, motivasi, serta wejangan yang sangat berarti, beserta seluruh keluarga besar Zaini Mulyosudarmo dan Prapto Maryono.

Seluruh teman senasib seperjuangan, Maulana Hanief Rachman, drh., Asih Kurnia Srihartini, drh., Suryo Kuncorojakti, drh., Retno Wulan Handayani, drh., Amira Baihani, drh., Aulia Firmawati, drh., Krishna Murti, drh., dan Freshinta Jellia Wibisono, drh., yang telah bahu membahu, bekerjasama dan saling memberi motivasi untuk menyelesaikan pendidikan ini.

Sahabat terbaik, Amanda Wulansari, S.KH., Amira Baihani, drh., Mana Raceka, drh., Nanda Indira, S.KH., dan Frederikha Kusuma, S.KH. atas dukungan semangat yang sangat berarti.

Akhirnya, penulis menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat dan dapat menjadi informasi yang berharga bagi dunia Kedokteran Hewan.

Surabaya, Februari 2011

Penulis

RINGKASAN

Respon Imun Humoral dan Seluler pada Kelinci *White New Zealand* yang Diimunisasi dengan Vaksin *Dengue* Multivalen

Virus *dengue* (DENV) termasuk famili *Flaviviridae*, mempunyai empat serotipe yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4; merupakan penyebab problem kesehatan di daerah tropis dan subtropis diseluruh dunia. Rerata angka kematian pada DBD mencapai 5%, sedangkan angka kematian di beberapa negara di Asia sekitar 0,5-3,5%. Berbagai upaya pemberantasan penyakit Demam Berdarah *Dengue* telah banyak dilakukan. Namun, karena berbagai kendala upaya ini belum memperoleh hasil yang memuaskan. Tingginya *mortality rate* dan kejadian epidemi yang meledak, mendorong upaya pengembangan vaksin *Dengue* yang secara efektif dapat mengatasi resiko yang ada melalui perluasan program imunisasi. Namun, hingga saat ini masih belum tersedia vaksin yang aman dan efektif untuk melindungi infeksi dari penyakit *Dengue*. Maka dari itu, multivalen dari antigen terhadap keempat serotipe menjadi suatu keharusan. Keistimewaan vaksin multivalen diharapkan akan dapat meminimalisasi resiko infeksi *Dengue* berat dan dapat mengurangi *mortality rate* (Liu *et al.*, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk: 1) Menentukan respon imun humoral (*whole immunoglobulin*), membuktikan perbedaan nilai OD antibodi terhadap perlakuan dosis yang berbeda dan waktu pengukuran yang berbeda dengan metode *indirect ELISA*, 2) Menentukan respon imun seluler terhadap aktivitas TLR, sel T CD4+, dan sel T CD8+ dengan metode *immunofluorescent*, 3) Membuktikan antibodi netralisasi berdasarkan *Serum Neutralization Test* secara *invitro* dengan kultur sel vero yang dikonfirmasi dengan RT-PCR, serta menentukan dosis vaksin *dengue* multivalen yang lebih efektif.

Delapan belas ekor kelinci *White new Zealand* diimunisasi dengan vaksin *dengue* multiven dengan dosis berbeda. P1 diinjeksi dengan dosis 0,5 cc, P2 diinjeksi dengan dosis 0,3 cc, dan P0 diinjeksi PBS sebagai perlakuan kontrol. Sampel darah diambil dan dikoleksi pada hari ke- 0, 7, 14, 21, dan 28 post injeksi. Serum darah digunakan untuk uji *indirect ELISA* dan plasma darah yang diisolasi PBMCnya digunakan untuk pemeriksaan *immunofluorescent*. *Indirect ELISA* yang menunjukkan hasil positif berdasarkan *cut of value* (COV) dikultur pada sel vero (2×10^5 sel/*well*) untuk melihat antibodi netralisasi dengan *Serum Neutralization Test* yang dikonfirmasi dengan *One Step RT-PCR*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa: (1) Vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc dan 0,3 cc dapat meningkatkan nilai OD pada kelinci *White new Zealand*, (2) Vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc dan 0,3 cc dapat meningkatkan aktivitas sel TLR, sel T CD4+, dan sel T CD8+ pada kelinci *White new Zealand*, (3) Vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc dapat menginduksi antibodi netralisasi lebih baik daripada vaksin *dengue* multivalen 0,3 cc.

SUMMARY

Humoral and Cellular Immune Responses in Rabbit *White new zealand* that Immunized with Multivalent *Dengue* Vaccines

Dengue fever has become a major public health concern. During past years, it has become major hazard problems to the main kind. *Dengue* virus (DENV), which has four serotype, the DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 is a cause of health problems in tropical and subtropical regions worldwide. The mean mortality rate in DHF reached 5%, whereas mortality in several countries in Asia of about 0.5 to 3.5%. Various efforts to eradicate *Dengue* fever disease has been widely applied. However, due to various constraints of this effort has not obtained satisfactory results. The high mortality rate and incidence of the epidemic that exploded, prompting efforts to develop *Dengue* vaccine that can effectively overcome the risks that exist through the expansion of immunization programs. However, until now still not available safe and effective vaccine to protect against infection from *Dengue* disease. Therefore, multivalen of antigens against the four serotypes is a must. Privileges multivalen vaccines are expected to minimize the risk of severe *Dengue* infection and can reduce the mortality rate (Liu et al., 2008).

This study was aimed to (1) determine the humoral immune response (whole immunoglobulin), proving the existence of differences in antibodies OD values against treatment with different doses and different measurement times based on indirect ELISA, (2) determine the cellular immune response against T cell CD4+, CD8+, and TLR activities based on immunofluorescent, (3) proving neutralization antibodies based on Serum Netralization Test that confirmed by one step RT-PCR.

About 18 experimental rabbits *White new Zealand* were vaccinated using multivalent *Dengue* vaccines in different doses. P1 was injected by 0,5 cc, P2 was injected by 0,3 cc, and P0 was injected by PBS as treatment control. The blood collected and taken on 0, 7, 14, 21, 28 day post injection. The blood serum samples were examined using indirect ELISA and blood plasma samples were PBMCs isolated for immunofluorescent. Indirect ELISA that showed positive results which were counted by cut of value (COV) were cultured in vero cell (2×10^5 cell/well) to proving neutralizing antibodies based on Serum Netralization Test that confirmed by one step RT-PCR.

The results were (1) multivalent *Dengue* vaccines 0,5 cc and 0,3 cc could increased antibodies OD values significantly in rabbit (P1 and P2) than rabbit which were not given vaccines (P0), (2) multivalent *Dengue* vaccines 0,5 cc and 0,3 cc could increase T cell CD4+, CD8+, and TLR activities in rabbit, and (3) multivalent *Dengue* vaccines 0,5 cc was better enough to inducted neutralization antibodies than multivalent *Dengue* vaccines 0,3 cc.

Based on these results it is suggested: (1) Need to continuous researched for challenge test *invivo* to know the protectivity antibodies, (2) Need to be explored in more detail about cut of value (COV) and to count a protective antibody titres.

2.5. <i>Cytokine Network</i>	21
2.6. Epidemiologi DBD	22
2.7. Vaksin	24
2.8. Perkembangan Vaksin <i>Dengue</i>	25
2.8.1. Pengembangan vaksin subunit	25
2.8.1.1. Uji imunogenitas	25
2.8.1.2. Uji netralisasi	26
2.8.1.3. Uji protektivitas	27
2.8.1.4. Jenis imunoglobulin hasil imunisasi	28
2.8.2. Pengembangan vaksin koktail	29
2.8.2.1. Uji imunogenitas	29
2.8.2.2. Uji netralisasi	29
2.8.2.3. Uji protektivitas	30
2.8.3. Pengembangan vaksin klon subunit	30
2.8.3.1. Analisis jenis antibodi	30
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN
3.1. Kerangka Konseptual	33
3.2. Hipotesis Penelitian	35
BAB 4	METERI DAN METODE PENELITIAN
4.1. Jenis/Rancangan Penelitian	36
4.2. Populasi, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel	36
4.3. Variabel Penelitian	37
4.3.1. Variabel bebas	37
4.3.2. Variabel tergantung	37
4.3.3. Variabel kendali	38
4.3.4. Definisi operasional variabel	38
4.4. Bahan Penelitian	39
4.5. Instrumen Penelitian	39
4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian	40

4.7. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	40
4.7.1. Vaksin <i>dengue</i> multivalen	40
4.7.2. Perlakuan pada hewan coba	40
4.7.3. Isolasi <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (PBMCs)..	41
4.7.4. Pengukuran antibodi	42
4.7.4.1. Indirect-ELISA (<i>whole immunoglobulin</i>)	42
4.7.5. Pemeriksaan <i>immunofluorescent</i>	43
4.7.6. <i>Serum netralization test</i> (SNT)	43
4.7.7. <i>One step reverse transcription and polymerase chain reaction</i> (RT-PCR)	45
4.8. Kerangka Operasional	47
4.9. Analisis Data	48
 BAB 5	
ANALISIS HASIL PENELITIAN	49
5.1. Data Penelitian	49
5.1.1. Pengukuran nilai <i>optical density</i> (OD) antibodi (<i>whole immunoglobulin</i>)	49
5.1.2. Hasil pengamatan TLR sebagai perbandingan respon imun seluler <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> terhadap vaksin <i>dengue</i> multivalen dengan dosis yang berbeda	51
5.1.3. Hasil pengamatan sel T CD4 ⁺ sebagai perbandingan respon imun seluler <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> terhadap vaksin <i>dengue</i> multivalen dengan dosis yang berbeda	54
5.1.4. Hasil pengamatan sel T CD8 ⁺ sebagai perbandingan respon imun seluler <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> terhadap vaksin <i>dengue</i> multivalen dengan dosis yang berbeda	56
5.1.5. Hasil pengamatan <i>serum netralization test</i> pada kultur sel vero	59

	5.1.6. Hasil <i>one step</i> RT-PCR	63
BAB 6	PEMBAHASAN	64
	6.1. Respon Imun Humoral	64
	6.2. Respon Imun Seluler	65
	6.3. <i>Serum Netralization Test</i> (SNT)	67
	6.4. Pembuktian dengan PCR	69
	6.5. Vaksin dapat Melakukan Mediasi Perlindungan	70
BAB 7	SIMPULAN DAN SARAN	72
	7.1. Simpulan	72
	7.2. Saran	72
	DAFTAR PUSTAKA	73
	LAMPIRAN	79

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Skema rancangan penelitian	37
Tabel 4.2.	Skema kultur sel vero pada <i>plate 24 well</i>	44
Tabel 5.1.	Nilai rata-rata dan simpangan baku TLR kelinci yang diimunisasi vaksin <i>dengue</i> multivalen	51
Tabel 5.2.	Nilai rata-rata dan simpangan baku sel T CD4+ kelinci yang diimunisasi vaksin <i>dengue</i> multivalen	54
Tabel 5.3.	Nilai rata-rata dan simpangan baku sel T CD8+ kelinci yang diimunisasi vaksin <i>dengue</i> multivalen	57
Tabel 5.4.	<i>Cytophatic effect</i> (CPE) yang diinduksi oleh campuran antigen <i>mix-dengue</i> dan serum antibodi hasil imunisasi vaksin <i>dengue</i> multivalen 0,5 cc pada sel vero yang diinkubasi 37° C	62
Tabel 5.5.	<i>Cytophatic effect</i> (CPE) yang diinduksi oleh campuran antigen <i>mix-dengue</i> dan serum antibodi hasil imunisasi vaksin <i>Dengue</i> multivalen 0,3 cc pada sel vero yang diinkubasi 37° C.....	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Skema diagram dari genom virus <i>dengue</i>	9
Gambar 2.2.	A. Gambaran molekuler virus <i>dengue</i>	10
	B. <i>Crosssection</i> virus <i>dengue</i>	10
Gambar 2.3.	Mekanisme pengenalan limfosit T	19
Gambar 2.4.	Respon imun infeksi virus <i>dengue</i>	21
Gambar 2.5.	Tingkat imunogenitas protein virus <i>dengue</i>	26
Gambar 2.6.	Uji netralisasi antibodi hasil imunisasi	27
Gambar 2.7.	Uji protektivitas mencit yang diinfeksi virus <i>dengue</i>	28
Gambar 2.8.	Analisis titer antibodi berdasarkan jenis imunoglobulin	28
Gambar 2.9.	Uji protektivitas mencit yang ditantang dengan virus DEN-2 dan DEN-3	30
Gambar 2.10.	Titer antibodi tipe dan subtipe antibodi hasil imunisasi protein E rekombinan	31
Gambar 3.7.	Bagan kerangka konseptual penelitian	34
Gambar 4.1.	Kerangka operasional	47
Gambar 5.1.	Rata-rata nilai OD antibodi kelinci yang diimunisasi vaksin <i>dengue</i> multivalen	50
Gambar 5.2.	Ekspresi TLR yang berpendar di bawah mikroskop <i>fluorescent</i> tampak berwarna hijau karena dilabel FITC	54
Gambar 5.3.	Sel T CD4+ yang berpendar di bawah mikroskop <i>fluorescent</i> tampak berwarna hijau karena dilabel FITC	56
Gambar 5.4.	Keadaan sel vero yang diinfeksi dengan antigen virus <i>mix-dengue</i> 1:100 sebagai kontrol positif timbulnya CPE	60
Gambar 5.5.	Keadaan sel vero yang diinfeksi dengan antibodi pengenceran 1:256 (sampel A4-28) dengan antigen virus <i>mix-Dengue</i>	61
Gambar 5.6.	Hasil PCR	63
Gambar 6.1.	Karakteristik CPE	68

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Nilai OD antibodi berdasarkan <i>indirect</i> ELISA pada kelinci <i>White new zealand</i> setelah imunisasi dengan vaksin <i>dengue</i> multivalen.....	79
Lampiran 2.	Hasil perbandingan respon imun seluler <i>peripheral blood mononuclear cell</i> terhadap vaksin <i>dengue</i> multivalen pada kelinci <i>white new zealand</i>	80
Lampiran 3.	Daftar reagen	81
Lampiran 4.	Ekstraksi RNA	83
Lampiran 5.	Dokumentasi kegiatan penelitian	84
Lampiran 6.	<i>Univariate analysis of variance</i> (ANOVA) respon imun humoral kelinci <i>White new zealand</i> pasca imunisasi dengan vaksin <i>dengue</i> multivalen	88
Lampiran 7.	<i>Analysis of variance</i> (ANOVA) respon imun seluler (TLR) kelinci <i>White new zealand</i> pasca imunisasi dengan vaksin <i>dengue</i> multivalen	90
Lampiran 8.	<i>Analysis of variance</i> (ANOVA) respon imun seluler (sel T CD4+) kelinci <i>White new zealand</i> pasca imunisasi dengan vaksin <i>dengue</i> multivalen	95
Lampiran 9.	<i>Analysis of variance</i> (ANOVA) respon imun seluler (sel T CD8+) kelinci <i>White new zealand</i> pasca imunisasi dengan vaksin <i>dengue</i> multivalen	99

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

Ab	= Antibodi
ADCC	= <i>Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity</i>
ADE	= <i>Antibody Dependent Enhancement</i>
APC	= <i>Antigen Presenting Cell</i>
C	= <i>Protein Capsid</i>
c-pRM	= <i>Protein capsid pre-Membran</i>
C3a	= <i>Complement component 3a</i>
C5a	= <i>Complement component 5a</i>
cc	= <i>cubic centimeter</i>
CD	= <i>Cluster of Differentiation</i>
COV	= <i>Cut of Value</i>
CPE	= <i>Cytopathogenic effect</i>
CTL	= <i>Cytotoxic T-Cell Lymphocyte</i>
DBD	= <i>Demam Berdarah Dengue</i>
DD	= <i>Demam Dengue</i>
DEN	= <i>Dengue</i>
DENV	= <i>Dengue Virus</i>
DHF	= <i>Dengue Hemorrhagic Fever</i>
E	= <i>Protein Envelope</i>
EDTA	= <i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
ELISA	= <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	= <i>Fluorescent isothiocyanate</i>
FcγR	= <i>Fragment gamma receptor</i>
HLA	= <i>Human Leukocyte Antigen</i>
IFN	= <i>Interferon</i>
Ig	= <i>Imunoglobulin</i>
IL	= <i>Interleukin</i>
ITD	= <i>Institute Tropical Disease</i>
M	= <i>Protein Membran</i>
MHC	= <i>Major Histocompatibility Complex</i>
Mo	= <i>Makrofag</i>
ml	= <i>mililiter</i>
NK	= <i>Natural Killer</i>
NP	= <i>Nucleoprotein</i>
NS	= <i>Non-structural</i>
prM	= <i>Protein pre-Membran</i>
PAF	= <i>Platelet Activating Factor</i>
PBS	= <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBMC	= <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	= <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	= <i>Ribose Nucleic Acid</i>
RT-PCR	= <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>

rpm	= <i>revolutions per minute</i>
SDS	= <i>Sodium Dodecyl Sulphonat</i>
SNT	= <i>Serum Netralization Test</i>
TLR	= <i>Toll Like-Receptor</i>
TNF	= <i>Tumor Necrotng Factor</i>
WHO	= <i>World Health Organization</i>

BAB 1
PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Virus *dengue* (DENV) termasuk famili *Flaviviridae*, mempunyai empat serotipe yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4; merupakan penyebab problem kesehatan di daerah tropis dan subtropis diseluruh dunia. DENV menimbulkan berbagai gejala mulai dari *mild febrile illness* yang dikenal dengan demam *dengue* (DD) sampai gejala *severe life-threatening illness*, merupakan gejala demam berdarah *dengue* (DBD) dan *dengue shock syndrome* (DSS). Penyakit tersebut bersifat endemis dan ditularkan lewat gigitan nyamuk *Aedes* betina, dengan *Aedes aegypti* sebagai vektor utama pada Kejadian Luar Biasa (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2003; Sumarmo, 2005).

DD dan DBD merupakan permasalahan utama global. Empat puluh persen masyarakat dunia tinggal di daerah yang beresiko terkena DBD (Tirado *et al.*, 1999). Dua setengah sampai tiga milyar orang, terutama yang tinggal di perkotaan daerah tropis dan sub-tropis beresiko terserang infeksi virus *dengue* (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2003; Malavige *et al.*, 2004). Penyebab wabah penyakit sangat komplek dan tidak diketahui dengan pasti, namun diantaranya diduga akibat terjadi perubahan demografi, sosial, di samping sejarah maupun siklus transmisinya (Gubler, 1998).

Di Indonesia, infeksi virus *dengue* masih merupakan suatu masalah penting karena kenaikan jumlah penderita yang terus meningkat, daerah epidemik yang

meluas, serta kasus DBD dan DSS yang semakin gawat (Lawuyan, 1996). DD pertama kali dilaporkan terjadi di Jakarta pada tahun 1789 (Sjahrurachman, 1994), sedangkan DBD pertama kali ditemukan di Surabaya pada tahun 1968, begitu juga di Jakarta, yang sejak saat itu menunjukkan insiden yang meningkat, bervariasi, dan ada kecenderungan ledakan kejadian setiap 5 tahun sekali. Penyakit yang pada awalnya dikenal sebagai penyakit anak ini, kini telah bergeser kepada kelompok remaja dan dewasa (Sustini dan Wirahjanto, 2001; Soewondo, dkk., 2001). Menurut Aryati (2006), di Indonesia, khususnya Surabaya, keempat serotipe virus *dengue* masih endemis, dan pada kurun waktu 2003-2005 serotipe DENV-2 (65%) merupakan serotipe yang dominan diikuti DENV-3 (15%), DENV-4 (12%) dan DENV-1 (8%).

Agen etiologik penyakit DBD, yaitu virus *dengue* memiliki empat serotipe yang serupa, namun berbeda sifat antigeniknya. Infeksi oleh satu serotipe menginduksi proteksi seumur hidup terhadap serotipe yang homolog, sedangkan proteksi terhadap serotipe lain hanya berlangsung singkat (Moi *et.al.*, 2010), tetapi tidak memberikan kekebalan silang (*cross-protective immunity*) untuk serotipe lainnya, hanya memberikan kekebalan parsial yang sifatnya sementara, sehingga di daerah endemik *dengue*, seseorang bisa terinfeksi oleh tiga serotipe yang lain (Soegijanto, 1998).

Berbagai upaya pemberantasan penyakit DBD telah banyak dilakukan. Penggerakan partisipasi masyarakat di Jawa Timur dengan Pemberantasan Sarang Nyamuk Demam Berdarah *Dengue* (PSN-DBD), pemberantasan vektor, baik dengan *fogging*, abatisasi maupun pemeriksaan jentik nyamuk secara berkala telah

diterapkan, namun angka kesakitan maupun angka kematian akibat penyakit DBD masih cukup tinggi (Kuntaryanto, 1998). Idealnya apabila angka bebas jentik telah dapat mencapai 95% (Kuntaryanto, 1998) dan pengendalian vektor berhasil dilaksanakan (Salamun, 1998), suatu daerah akan mudah mengatasi masalah penyakit DBD. Namun, karena berbagai kendala maka untuk saat ini program pengendalian vektor belum bisa memperoleh hasil yang memuaskan.

Diperkirakan terdapat sekitar 100 juta kasus DD per-tahun, sebanyak 500.000 kasus DBD memerlukan perawatan di Rumah Sakit, dan penyakit tersebut setiap tahun menyerang 90% anak berusia di bawah 15 tahun (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2003; Malavige *et al.*, 2004). Rerata angka kematian pada DBD mencapai 5% (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2003), sedangkan angka kematian di beberapa negara di Asia sekitar 0,5-3,5% (Malavige *et al.*, 2004). *Mortality rate* yang tinggi dan kejadian epidemi yang meledak, mendorong upaya pengembangan vaksin *dengue* yang secara efektif dapat mengatasi resiko yang ada melalui perluasan program imunisasi (Sim *et al.*, 2008). Namun, hingga saat ini masih belum tersedia vaksin yang aman dan efektif untuk melindungi infeksi penyakit *dengue*.

Beberapa upaya pengembangan kandidat vaksin *dengue* telah dilakukan, salah satu kendala yang dihadapi adalah virus *dengue* tidak memicu antibodi protektif. Infeksi pertama (*primary infection*) tidak protektif terhadap infeksi berikutnya (*secondary infection*), terutama jika terinfeksi strain yang berbeda. Model vaksin *attenuated* menunjukkan analisis sifat biologik virus yang

memungkinkan akan terjadi reaktivasi, karena itu diperlukan suatu model vaksin yang multipoten dan mempunyai sifat stabil (Rantam, 1999).

Beberapa jenis vaksin telah diteliti, salah satunya dengan *whole* virus inaktif atau virus sub-unit. Masing-masing jenis vaksin tersebut memiliki keuntungan potensial, keduanya tidak dapat kembali pada fenotipe patogenik dan ketika dikombinasikan tidak menimbulkan interferensi/gangguan. Di sisi lain, vaksin sub-unit atau vaksin mati hanya menaikkan antibodi pada bagian protein struktural dan virion normal. Kelemahan lain yaitu memerlukan antigen dengan konsentrasi tinggi dan *multiple doses*. Apakah vaksin inaktif atau sub-unit dapat digunakan sebagai vaksin *dengue* sedang menjadi perdebatan. Jenis vaksin tersebut mungkin hanya dapat digunakan relatif untuk proteksi jangka pendek atau sebagai strategi booster yang baik. Vaksin inaktif yang mengandung satu serotipe (DENV-2) saja ketika dilakukan *challenge* masih menunjukkan viremia. Maka dari itu, multivalen terhadap keempat serotipe menjadi suatu keharusan. Keistimewaan vaksin multivalen diharapkan akan dapat meminimalisasi resiko infeksi *dengue* berat dan dapat mengurangi *mortality rate* (Liu *et al.*, 2008).

Vaksin multivalen yang pernah dikembangkan terdiri dari 80% protein E dari keempat serotipe virus *dengue*. Kemanjuran diduga berdasarkan penelitian yang menunjukkan bahwa satu mikrogram protein E DENV-2 dengan adjuvant SBAS5 dapat memberikan proteksi pada *rhesus macaque* terhadap viremia berdasarkan *challenge* dengan tipe virus ganas (Putnak *et al.*, 2003). Formula yang mengandung protein NS-1 DENV-2 dapat memainkan peran respon imun secara langsung ke arah protektivitas Th1 dengan cara meningkatkan produksi

interferon gamma, dan ketika diujikan pada *rhesus macaque* dapat memproduksi antibodi netralisasi dengan titer tinggi untuk keempat tipe virus *dengue* dan melindungi hewan dari viremia berdasarkan *challenge* terhadap virus *dengue* tipe ganas (Putnak *et al.*, 2005).

Perlu dikaji bagaimana respon imun humoral maupun seluler yang dihasilkan terhadap vaksin *dengue* multivalen dengan menggunakan serangkaian metode untuk menguji potensi netralisasi vaksin sebagai tolak ukur keberhasilan imunisasi. Indikator respon imun humoral dilakukan dengan metode ELISA, sedangkan indikator respon imun seluler dilakukan dengan metode *immunofluorescent*. Potensi netralisasi antibodi dapat diketahui berdasarkan *Serum Neutralization Test* (SNT) pada kultur sel vero yang selanjutnya dikonfirmasi dengan PCR.

Berbagai sifat virus *dengue* secara *invitro* telah dikaji secara mendalam oleh tim DHF *Institute Tropical Disease* Universitas Airlangga dan membuat prototip dengan berbagai macam pendekatan, antara lain rekombinan protein E, protein sub-unit (Soegijanto, 1991) dan semua hasil mengukur prototip suatu antibodi protektif, namun pada penelitian ini menggunakan prototip koktail vaksin *whole virus* inaktif multivalen.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian yang telah diuraikan di atas, rumusan masalah dapat disusun sebagai berikut :

1. Bagaimanakah nilai *optical density* (OD) antibodi pada kelinci *White new zealand* yang dimunisasi vaksin *dengue* multivalen?
2. Bagaimanakah aktivitas TLR, sel T CD4+, dan CD8+ pada kelinci *White new zealand* yang dimunisasi vaksin *dengue* multivalen?
3. Apakah vaksin *dengue* multivalen mempunyai potensi menetralisasi keempat strain virus *dengue* berdasarkan uji *Serum Netralization Test* pada kultur sel *vero* yang dikonfirmasi dengan PCR?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mengkaji potensi vaksin *dengue* multivalen hasil formulasi tim DHF *Institute Tropical Disease* yang bersifat spesifik terhadap keempat strain virus *dengue*.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini mempunyai tujuan khusus sebagai berikut :

1. Menentukan respon imun humoral (*whole immunoglobulin*), membuktikan perbedaan nilai OD antibodi terhadap perlakuan dosis yang berbeda dan waktu pengukuran yang berbeda dengan metode *indirect ELISA*.
2. Menentukan respon imun seluler terhadap aktivitas TLR, sel T CD4+, dan CD8+ dengan metode *immunofluorescent*.
3. Membuktikan antibodi netralisasi berdasarkan *Serum Netralization Test* secara *invitro* dengan kultur sel *vero* yang dikonfirmasi dengan RT-PCR, serta menentukan dosis vaksin *dengue* multivalen yang lebih efektif.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang bisa didapat dari penelitian ini berupa sumbangan informasi ilmiah baru tentang kemungkinan terwujudnya vaksin *dengue* multivalen yang memiliki respon imun yang baik dan mampu menetralsasi virus *dengue*, sehingga dapat menunjang penelitian di bidang bioteknologi dan biologi molekuler di masa mendatang, khususnya dalam pembuatan vaksin *dengue*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

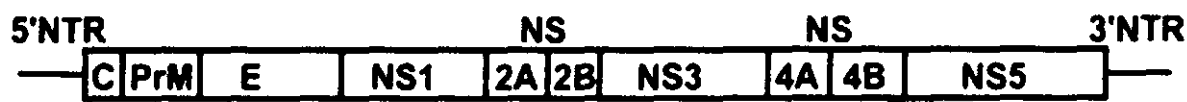
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus *Dengue*

Virus *dengue* adalah anggota genus *Flavivirus* dari famili *Flaviviridae*. *Flavivirus* berbentuk sferis dengan diameter 40-60 nm. Nukleokapsidnya berbentuk helik dengan ukuran sekitar 30 nm dan dikelilingi oleh lipid bilayer. Komposisi virionnya terdiri dari 6% RNA, 66% protein, 9% karbohidrat serta 17% lipid (Teo and Wright, 1997). Infeksi *Flavivirus* secara umum termasuk *arthropodborne disease*, yaitu penyakit yang ditularkan oleh vektor nyamuk atau kutu (Rice, 1996).

Virus *dengue* merupakan virus *Ribonucleic Acid* (RNA) untai tunggal dan mempunyai empat serotipe yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4 (World Health Organization, 1998). Struktur antigen keempat serotipe ini sangat mirip antara satu dengan yang lain, namun antibodi terhadap masing-masing serotipe tidak dapat saling memberikan perlindungan silang. Variasi genetik yang berbeda pada keempat serotipe ini tidak hanya menyangkut antar serotipe, tetapi juga subtipe (genotipe) di dalam serotipe itu sendiri tergantung waktu dan daerah penyebarannya (Massi *et al.*, 2004). Variasi diantara serotipe pada masing-masing segmen codon dapat mencapai 2,6 - 11% pada tingkat nukleotida dan 1,3 - 7,7% pada tingkat protein. Perbedaan urutan nukleotida ini ternyata menyebabkan variasi pada sifat biologis dan antigenitasnya (Leitmeyer, 1999).

Virus *dengue* terdiri dari 10.700 basa di dalam genomnya dan merupakan *single stranded positive sense RNA* (ss RNA sense +). Di dalam genomnya terdapat sebuah *single opening reading* (ORF) yang mengkode dua macam protein, yaitu protein struktural dan protein non-struktural. Protein struktural terdiri dari C (protein inti/*capsid/core*), M (protein membran, termasuk preMembran) dan E (protein *envelope*) serta 7 macam protein non-struktural yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 yang ditandai oleh sebuah 5' dan 3' *nontranslated region* (NTR) pada kedua ujungnya. Jadi, struktur genom virus *dengue* adalah 5' - C - prM - (M) - E - NS1 - NS2a - NS2b - NS3 - NS4a - NS4b - NS5 - 3' (Sjahrurachman, 1994). Protein struktural merupakan 25% dari total protein, sedangkan protein non-struktural merupakan bagian yang terbesar (75%) terdiri dari NS-1 - NS-5. Kemampuan untuk merangsang pembentukan antibodi diantara protein struktural, urutan imunogenitas tertinggi adalah protein E, yang diikuti oleh protein prM dan C, sedangkan pada protein non-struktural yang paling berperan adalah protein NS-1 (Leitmeyer, 1999).



Gambar 2.1: Skema diagram dari genom virus *dengue* (Leitmeyer, 1999).

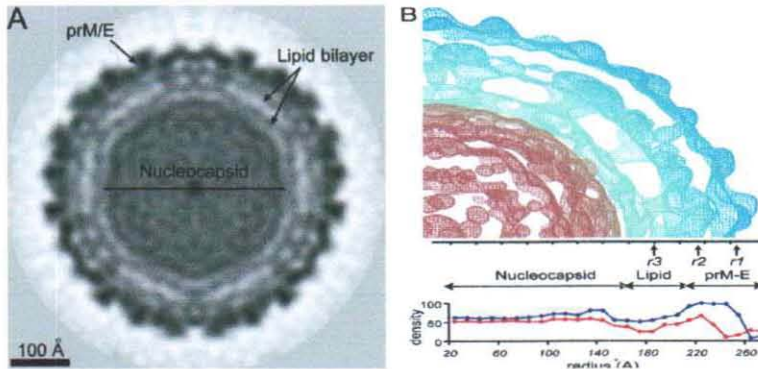
Keterangan : NTR = *nontranslated region*

C = *capsid*

PrM = *precursor membrane*

E = *envelope*

NS = *nonstructural*



Gambar 2.2 A. Gambaran molekuler virus *dengue* (*sciencemag.org*)
 B. *Crosssection* virus *dengue* menunjukkan kepadatan maksimum (biru) dan rata-rata (ungu) (*sciencemag.org*)

Keempat serotipe virus *dengue* bervariasi dalam hal virulensi, namun secara klinik maupun patologik tidak dapat dibedakan dengan jelas, tetapi dengan tes netralisasi menggunakan antibodi monoklonal dan *polymerase chain reaction* (PCR), keempat serotipe tersebut bisa dibedakan. Virus *dengue* memiliki afinitas terhadap monosit, makrofag, dan limfosit B. Virus dapat dibiakkan pada sel mamalia seperti *Baby Hamster Kidney* (BHK21 klon 13), sel ginjal kera (sel vero), *Avian cells* atau sel nyamuk *Aedes albopictus* (C6/36). Virus *dengue* pada biakan sel dapat menyebabkan *cytopathogenic effect* (CPE), namun ada kalanya tidak menunjukkan CPE, misalnya pada sel nyamuk yang hanya akan terjadi infeksi persisten (Rantam, 1998).

2.2 Transmisi Virus *Dengue*

Vektor yang menularkan virus *dengue* adalah nyamuk *Aedes*. Beberapa spesies yang diketahui dapat bertindak sebagai vektor, yaitu *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. satallans* dan *A. polynesiensis* (Soewondo, 2001). Tiga spesies

pertama adalah spesies yang diketahui ada di Indonesia, namun vektor utama adalah *A. aegypti* (Salamun, 1998).

Masa pertumbuhan dan perkembangan nyamuk *A. aegypti* dapat dibagi menjadi 4 tahap yaitu : telur, larva, pupa, dan nyamuk dewasa, sehingga termasuk metamorfosis sempurna (holometabola). Telur, larva, dan pupa *A. aegypti* tumbuh dan berkembang di dalam air. Telur di dalam air akan menetas Pada suhu 20° C - 40° C dalam waktu 1 - 2 hari. Kecepatan pertumbuhan dan perkembangan larva di dalam air dipengaruhi beberapa faktor diantaranya temperatur, tempat, keadaan air dan kandungan zat makanan yang ada di dalam tempat perindukannya. Larva berkembang pada kondisi optimum menjadi pupa dalam 4 - 9 hari, kemudian pupa menjadi nyamuk dewasa dalam waktu 2 - 3 hari. Siklus lengkap dari telur menjadi nyamuk dewasa memakan waktu sekitar 7 - 14 hari (Salamun, 1998).

Virus yang terhisap nyamuk akan mengadakan replikasi di dalam tubuh nyamuk selama 7 - 14 hari yang disebut periode inkubasi ekstrinsik, sebelum kemudian ditularkan kepada manusia (Soewondo dkk., 2001). Sekali virus masuk dan berkembang biak dalam tubuh nyamuk, nyamuk tersebut akan dapat menularkan virus selama hidupnya (infektif). Virus memerlukan waktu 4-6 hari (*intrinsic incubation period*) sebelum menimbulkan sakit pada manusia. Penularan dari manusia kepada nyamuk hanya terjadi bila nyamuk menggigit manusia yang sedang mengalami viremia, yaitu 2 hari sebelum demam sampai 5 hari setelah demam timbul (World Health Organization, 1998; Soegijanto, 2001).

Prinsip pengendalian vektor *A. aegypti* ini dapat dilakukan dengan empat cara yaitu : (1) pengendalian kimiawi dengan menggunakan insektisida kimiawi,

(2) pengendalian genetik dengan memutus siklus reproduksinya, (3) pengelolaan lingkungan dengan menghilangkan tempat-tempat perindukan, dan (4) pengendalian hayati dengan menggunakan musuh-musuh alaminya. Dari keempat cara pengendalian ini ternyata tidak ada yang benar-benar memuaskan hasilnya (Salamun, 1998).

2.3 Patogenesis Infeksi Virus *Dengue*

Patogenesis infeksi virus *dengue* sampai sekarang baru sedikit diketahui dan tidak banyak informasi tentang dasar-dasar molekuler tentang pengikatan virus *dengue* pada target sel. Penginfeksi virus pada beberapa sel dapat terjadi karena adanya perlekatan virus pada FC domain antibodi mediator imun seperti monosit mengekspresikan FC reseptor (Porterfield, 1986). Selain hal diatas juga sulit diterangkan infeksi primer pada pasien tanpa antibodi *dengue* atau penginfeksi sel tanpa FC reseptor (He, 1995). Virus *dengue* yang mempunyai protein struktural dan non-struktural mempunyai fungsi yang berbeda. Jenis protein yang mempunyai peranan penting pada patogenesis virus *dengue* adalah protein E (*envelope*), protein PrM, protein NS1, dan protein NS3. Protein ini mempunyai sifat antigenik terbukti jika direaksikan dengan antibodi pasien melalui imunobloting mempunyai reaktifitas yang cukup tinggi, tetapi yang mempunyai daya netralisasi adalah protein E (Rantam dkk., 2001). Jika virus menginfeksi manusia melalui gigitan nyamuk maka virus tersebut direspon oleh makrofag yang selanjutnya difagositosis dan kemudian terjadi fragmentasi protein menjadi peptide yang diekspresikan melalui MHC I dan selanjutnya mengaktifkan

sel T melalui reseptornya yang diikuti ekspresi IFN gama. Selain itu juga makrofag mensekresi sitokin untuk mengaktifkan makrofag lainnya termasuk sel B, sehingga terjadi respon imun humoral berupa imunoglobulin (antibodi spesifik atau *adaptive immunity*). Pengaktifan ini dipicu oleh protein NS1 yang selanjutnya makrofag mensekresi tromboplastin dan sel platelet atau *tissue factor* sehingga mempengaruhi sistem hemostatik akibatnya terjadi hemorhagi atau *dengue hemorrhagic fever*. Disisi lain, karena terjadi pengaktifan komplemen (C3a) maka mempengaruhi sekresi histamin dan leukotrin sehingga berpengaruh terhadap permeabilitas pembuluh darah yang meningkat akhirnya terjadi *plasma leakage* maka terjadi *shock* atau *dengue shock syndrome* (DSS). Hal ini terjadi diawali adanya kompleks antigen dan antibodi dan komplemen yang bervariasi sifat antigeniknya dalam pembuluh darah maka manifestasinya menjadi beberapa bentuk, selain menyebabkan DHF, DSS, buta sementara maupun strok DHF. Berdasarkan patogenesis tersebut, dikembangkan vaksin sub-unit yang mempunyai peranan dalam patogenesis virus *dengue*. Banyak hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi antara reseptor dengan protein *envelope* virus *dengue* dan sel target merupakan dasar molekuler yang kuat. Hal ini sangat penting untuk mengetahui potensial infektivitas interaksi tersebut (Chen *et.al.*, 1997).

Mekanisme tentang patofisiologi, patogenesis, hemodinamika, dan biokimiawi DBD belum diketahui secara pasti, sedangkan reaksi demam yang ada diduga akibat sitokin pirogenik yang dihasilkan selama infeksi virus berlangsung (Stites *et al.*, 1997).

Pandangan mengenai patogenesis virus dimulai dari identifikasi sel atau tipe sel yang mendukung timbulnya infeksi secara *invitro* (Halstead, 1993) serta mekanisme virus mengikat sel target (Chen *et al.*, 1997). Sel yang merupakan target virus *dengue* pada manusia belum diketahui. Beberapa penelitian mendukung bahwa sel fagosit mononuklear berperan penting pada infeksi virus *dengue* (Halstead, 1993). Berdasarkan penemuan klinik virus *dengue* diduga dapat bereplikasi di kelenjar limfe regional, sel hepar, sumsum tulang, jaringan limfe, otot, jaringan ikat, serta endotel pada vasa epidermis (Halstead, 1989).

Paling sedikit ada delapan hipotesis mengenai patogenesis DBD yang telah dikemukakan (Soegijanto, 1998). Berdasarkan studi epidemiologik dan laboratorik, sebagian besar kasus DBD di Thailand dan Kuba terjadi sebagai akibat infeksi sekunder virus *dengue* dengan serotipe yang berbeda dengan infeksi primernya, bahkan hal ini terjadi pada 99% anak-anak (Kurane *et al.*, 1994).

Penelitian yang dilakukan di Kuba menunjukkan bahwa wabah DBD masih terjadi setelah infeksi primer 20 tahun sebelumnya. Kebanyakan infeksi primer oleh virus DENV-2 dan DENV-4, yang sebagian besar bersifat sub-klinis (Vaughn, 2000). Pada infeksi virus sekunder yang berbeda serotipenya dengan virus pada infeksi primer, antibodi non-neutralisasi akan meningkatkan jumlah monosit yang terinfeksi virus, selanjutnya monosit ini akan mengaktifasi *CD4+ memory T cell* yang diinduksi oleh infeksi primer. *Cross-reactive CD4+ T cell* yang teraktifasi ini akan menghasilkan limfokin seperti $IFN\gamma$ dan IL-2. $IFN\gamma$ akan meningkatkan ekspresi Fc γ R dan molekul HLA kelas I dan kelas II. Meningkatnya jumlah Fc γ R kemudian akan meningkatkan pula jumlah monosit

yang terinfeksi oleh kompleks virus *dengue*-antibodi. Regulasi molekul-molekul HLA memudahkan pengenalan antigen virus *dengue* oleh $CD4+$ dan $CD8+$ CTL. Aktifasi lebih lanjut $CD4+$ T cell bisa meningkatkan kadar IL-2 dalam plasma. Monosit terinfeksi virus *dengue* yang lisis oleh kerja CTL akan melepaskan monokin atau beberapa mediator kimiawi (Kurane *et al.*, 1994). Pernyataan ini diperkuat oleh O'Hanley *et al.* (1992) yang menyebutkan bahwa monosit yang lisis akan melepaskan monokin dan beberapa mediator kimiawi yang bisa menyebabkan kebocoran plasma dan perdarahan. Sistem komplemen bisa diaktifkan oleh kompleks virus-antibodi dan akan diproduksi C3a serta C5a. Peningkatan limfokin, monokin, mediator kimiawi secara cepat dan aktivasi komplemen akan menyebabkan kebocoran plasma, gangguan koagulasi, dan perdarahan (Kurane *et al.*, 1994).

2.4 Respon Imun terhadap Infeksi Virus *Dengue*

Infeksi virus biasanya dimulai dengan invasi setempat pada permukaan epitel, selanjutnya virus masuk ke dalam sirkulasi darah dan menimbulkan fase inkubasi, kemudian virus mengadakan invasi sampai organ sasaran seperti otak, hepar, nodus limfatikus, sumsum tulang serta paru (Goldsby *et al.*, 2000).

Respon imun terhadap virus juga melibatkan respon imun non-spesifik maupun spesifik. Mekanisme utama respon imun non-spesifik terhadap virus, yaitu 1) infeksi virus secara langsung merangsang produksi interferon oleh sel-sel yang terinfeksi, dan interferon tersebut berfungsi menghambat replikasi virus, 2)

transplasenta, neoplasia, atau penyakit autoimun dan reaksi alergi. Virus dapat mengubah permukaan antigenesitas dari produk infeksi seperti sel transformasi sehingga terjadi respon imun seluler yang juga sebagai fungsi kontrol (Rantam, 2005). Respon imun seluler melibatkan sel T sitotoksik, sel NK, ADCC, dan interaksi dengan MHC kelas I. Peran interferon sebagai antivirus cukup besar, khususnya IFN- α dan IFN- β (Hill, 1993 ; Drutz and Mills, 1994; Nash, 1996). Dampak anti virus IFN terjadi melalui, 1) peningkatan ekspresi MHC kelas I, 2) aktivasi sel NK dan makrofag, 3) menghambat replikasi virus. IFN menghambat penetrasi virus ke dalam sel maupun *budding* virus dari sel yang terinfeksi (Drutz and Mills, 1994).

Makrofag juga dapat membunuh virus seperti halnya membunuh bakteri, tetapi dengan infeksi virus tertentu makrofag tidak membunuhnya bahkan sebaliknya virus memperoleh kesempatan untuk replikasi di dalamnya. Virus hanya dapat berkembang biak intraseluler karena memerlukan DNA penjamu untuk replikasi. Akibatnya virus dapat merusak beberapa sel organ tubuh yang lain. Peran MHC kelas I dan sel T sitotoksik sangat penting pada infeksi virus (Abbas *et al.*, 2003).

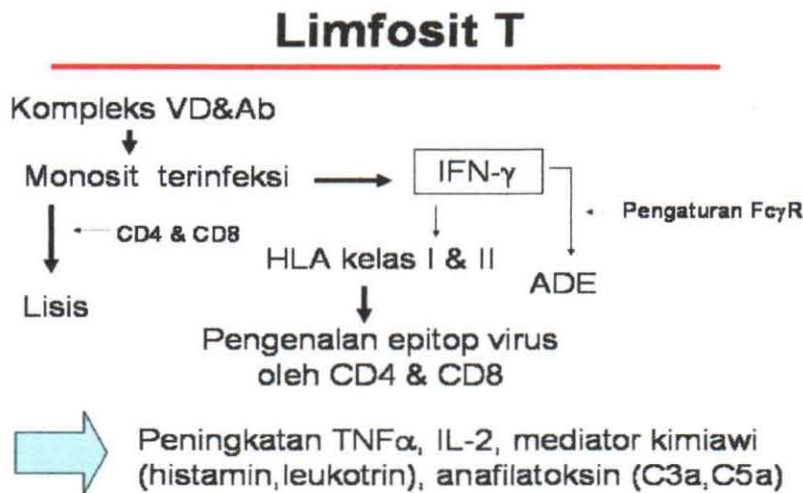
Kurane dan Ennis (1992) menyatakan bahwa respon imun pada infeksi DBD mempunyai dua peranan yang berbeda yaitu, 1) mencegah terjadinya infeksi atau penyembuhan pada infeksi *dengue* dengan serotipe yang sama dari infeksi primer, 2) bertanggung jawab terhadap terjadinya DBD atau pada kejadian SDS pada infeksi dengan serotipe yang berbeda dan infeksi primer.

Hal ini mungkin karena adanya peran antibodi dan sel T memori. Antibodi terhadap *dengue* mempunyai 4 fungsi, yaitu 1) netralisasi virus, 2) *complement mediated cytolysis*, 3) *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC), dan 4) *antibody-dependent enhancement* (ADE) (Morens, 1994).

Virus yang obligat intraseluler berusaha untuk berikatan dengan tubuh host melalui satu reseptor spesifik pada permukaan sel. Spesifisitas ini yang menentukan tropisme virus terhadap host maupun sel tertentu. Tropisme virus *dengue* seperti telah disebutkan di atas adalah pada sel monosit, makrofag dan limfosit B (Kurane *et al.*, 1994). Pertahanan tubuh pertama adalah respon imunitas alami seperti interferon, sel NK, dan monosit, mengingat cara masuk virus melalui gigitan nyamuk langsung ke peredaran darah. IFN- γ yang dihasilkan oleh *cross-reactive CD4+ T cell* meningkatkan efisiensi respon imunitas adaptif dengan merangsang peningkatan ekspresi MHC I dan II serta sebagai aktivator makrofag dan sel NK. Sel NK selain diaktifkan juga difokuskan ke situs infeksi. Sel NK juga berperan sebagai mediator utama ADCC (Abbas, 2003).

Ketika proses infeksi berjalan terus, maka respon imunitas adaptif mulai berperan. Antibodi bekerja menetralkan virus dengan cara mengikat dan mencegah virus menginfeksi sel, dengan demikian terjadi pencegahan terhadap penyebaran dan replikasi virus. Peranan sel T sangat penting dalam hal mengeliminasi sel yang terinfeksi virus serta mengaktifkan komponen-komponen sistem imun yang lain. Virus *dengue* yang masuk dalam tubuh manusia melalui gigitan nyamuk akan berkembang di dalam sel retikuloendotelial. Virus sulit diisolasi pada masa inkubasi karena jumlahnya sangat sedikit di dalam darah, tetapi setelah 2 - 3 hari

kemudian jumlah virus akan meningkat, bahkan bisa terjadi viraemia selama 5 -7 hari (Rantam, 1998). Virus bersirkulasi dalam darah perifer di dalam sel monosit, sel limfosit B, dan sel limfosit T. Tubuh akan membuat antibodi anti-*dengue* sebagai reaksi terhadap infeksi virus, baik berupa antibodi netralisasi, antibodi hambatan hemaglutinasi, maupun antibodi pengikat komplemen (Aryati dan Probahoeso, 2001).

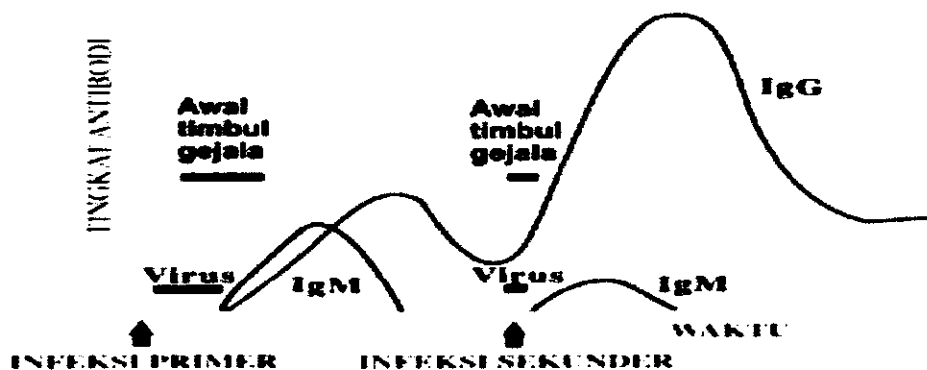


Gambar 2.3 Mekanisme Pengenalan Limfosit T (Abbas *et al.*, 2003)

Antibodi yang dihasilkan umumnya adalah kelas IgG dan IgM. Antibodi ini muncul setelah beberapa hari pasca infeksi, dan IgG bisa bertahan berbulan-bulan bahkan sampai beberapa tahun (Vaughn, 2000). Jika manusia terinfeksi ulang oleh virus yang berbeda serotipenya, maka antibodi yang timbul tidak hanya tertuju pada infeksi yang kedua, namun juga pada infeksi primer, dan khusus pada IgG dapat memberikan *boosting effect* (Rantam, 1998).

Suatu konsekuensi patologik yang tidak umum terjadi pada penyakit DBD, disini terjadi *uptake* atau ingesti kompleks virus dengan antibodi non-neutralisasi diperantarai FcR dari makrofag atau monosit dan selanjutnya terjadi peningkatan infektifitas virus (*antibody dependent enhancement/ADE*) (Roitt, 1996). Terjadi juga hiperaktivasi dari sistem komplemen yang menyebabkan perdarahan serta kebocoran plasma (Kurane, 1994).

Komplek imun yaitu interaksi antara virus *dengue* dengan antibodi akan merangsang sistem komplemen untuk menghasilkan C3a dan C5a, yang nantinya akan menstimulasi basofil untuk mengeluarkan *vasoactive amines* (VAA). Komplek imun tadi juga berpengaruh langsung pada basofil dan platelet dengan VAA sebagai produknya. Amina yang dihasilkan tersebut akan menyebabkan retraksi sel endotel dan meningkatkan permeabilitas vaskuler yang berakibat keluarnya plasma darah bahkan perdarahan *per diapedesis*. Peningkatan permeabilitas ini menyebabkan kompleks imun didepositkan pada dinding endotel sehingga timbul agregasi platelet dan aktivasi komplemen lagi. Agregasi platelet akan membentuk mikrotrombi pada jaringan kolagen selaput basal endotel. Netrofil tertarik menuju situs komplemen, mengeluarkan enzim lisosim yang menyebabkan kerusakan sel endotel, dari sinilah timbul komplikasi perdarahan (Roitt *et al.*, 2001).



Gambar 2.4. Respon imun infeksi virus *dengue* (Soegijanto, 1998)

2.5 Sitokin Network

Di dalam hipotesis infeksi heterolog sekunder disinggung mengenai peranan beberapa sitokin dalam menimbulkan SDS atau DBD. Beberapa di antaranya adalah IL-1, IL-2, TNF- α , dan PAF (Abbas *et al.*, 2003).

IL-1 pada infeksi virus dengue diproduksi oleh monosit. Sitokin ini akan menstimulasi sel T maupun sel B dan menginduksi peradangan yang menghasilkan enzim proteolitik dan kolagenase. Keberadaan enzim tersebut akan dapat menimbulkan kerusakan sel, termasuk sel endotel. Terhadap endotel sendiri IL-1 dapat meningkatkan aktifitas prokoagulan dan merangsang adhesi netrofil ke dinding endotel. Produk netrofil seperti lisosim juga bisa merusak sel endotel.

IL-2 diproduksi oleh sel T CD4⁺ dengan firngsi utama merangsang proliferasi dan diferensiasi sel T. Monosit juga merupakan sel sasaran yang berakibat pada aktivasi monosit. TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) yang dikeluarkan dari monosit yang lisis mempunyai sel target makrofag, granulosit dan sel jaringan. Efek yang dihasilkan oleh sitokin ini berupa aktifasi makrofag,

granulosit dan sel sitotoksik. Selain itu $TNF-\alpha$ menyebabkan adhesi sel endotel. PAF (*platelet activating factor*) yang juga dikeluarkan oleh monosit yang lisis berfungsi meningkatkan aktifitas platelet dan agregasi pada dinding endotel (Abbas *et al.*, 2003).

Kebocoran plasma diantaranya juga disebabkan oleh produksi $TNF-\beta$ dan $IL-1\beta$ (Aryati, 2001). $TNF-\beta$ ($LT-\alpha$ atau *lymphotoxin- α*) yang diproduksi oleh limfosit T dan juga limfosit B bisa mengaktifkan makrofag, menghambat sel B dan bersifat sitotoksik terhadap beberapa jenis sel. $IL-1\beta$ yang dihasilkan oleh makrofag, monosit dan sel epitel selain menyebabkan kebocoran plasma juga dapat menyebabkan demam, serta aktivasi sel limfosit T dan makrofag (Janeway *et al.*, 2001).

2.6 Epidemiologi DBD

Dewasa ini ada tiga hal isu penting yang menyebabkan infeksi virus *dengue* menjadi masalah yang serius di daerah tropis dan subtropics, ketiga isu tersebut adalah perluasan daerah epidemi, peningkatan angka kesakitan dan peningkatan kasus berat dari infeksi 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* (DD), klasik yang dapat sembuh sendiri (*self limited*). Manifestasi berat dari infeksi virus *dengue* pertama kali dilaporkan pada tahun 1954 di Philipina yang dari tahun ke tahun dilaporkan terus

menyebar ke Asia Tenggara dan Pasifik, dan hingga kini terus menyebar ke Amerika, daerah Karibbean, India, dan Afrika (Rodhian *et al.*, 1996).

Indonesia merupakan negara kepulauan memiliki 33 propinsi yang terletak secara geografis di antara dua benua (Asia dan Australia) serta dua samudera (Pasifik dan Hindia). Letak astronomis Indonesia yaitu 6° LU - 11° LS dan 95° BT - 141° BT. Di Indonesia, infeksi virus *dengue* ini telah dilaporkan sejak tahun 1779 oleh David Bylon, namun manifestasi berat dari infeksi virus *dengue* dilaporkan baru terjadi pada tahun 1968 di Jakarta dan Surabaya. Epidemik infeksi virus *dengue* di Indonesia ini dari tahun ke tahun terus meluas ke-27 propinsi, tahun 1994 dilaporkan 217 Dati II terjangkit DBD/SDS dan tahun 1998 dilaporkan meningkat menjadi 288 dari 306 Dati II di Indonesia terjangkit DBD/SDS (Suroso, 2004). Menurut data kasus DBD di Jawa Timur antara tahun 1996-2000 menunjukkan adanya variasi peningkatan kasus dari tahun ke tahun, hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya musim hujan. Jumlah kasus sebanyak 4.224 dilaporkan pada tahun 2000, kasus DBD terbanyak dilaporkan terjadi pada bulan April (404 kasus) dan Mei (449 kasus) (Soegijanto, 2004).

Angka insiden atau *incident rate* (IR) DBD/SDS dari tahun ke tahun juga menunjukkan peningkatan, tahun 1994 sebesar 9,72 per 100.000 penduduk, tahun 1998 menjadi 35,19 per 100.000 penduduk. Ditingkat ASEAN, angka insiden DBD/SDS, Indonesia menempati urutan ke-3 dibawah Vietnam dan Thailand. Sejak tahun 1956 hingga tahun 1995 dilaporkan jumlah kasus di Vietnam mencapai 1.518.808, di Thailand berjumlah 1.123.093 kasus sedangkan di Indonesia dilaporkan sebanyak 331.555 kasus. Angka kematian atau *case fatality*

rate (CFR) justru dilaporkan terjadi penurunan yang signifikan, tahun 1968 CFR tercatat 41,38%, namun pada tahun 1994 menjadi 2,5% sedangkan tahun 1998 menurun lagi menjadi 2,0%. Ditingkat ASEAN, CFR di Indonesia dikelompokkan pada urutan kedua bersama Malaysia, Myanmar, dan Laos, yaitu 2-4 per 100 kasus, sedangkan CFR terendah ditempati oleh Vietnam dan Thailand, yaitu 2 per 100 kasus (Umar, 1999).

2.7 Vaksin

Vaksin merupakan sediaan biologis yang mengandung antigen baik berupa mikroorganisme yang mati maupun yang dilemahkan tanpa merusak potensi antigen itu sendiri. Jika diberikan pada hewan akan merangsang kekebalan untuk membentuk zat kebal atau antibodi dalam jangka waktu tertentu (Tizzard, 1982).

Vaksin terdiri dari dua macam, yaitu vaksin inaktif dan vaksin aktif dimana masing-masing digunakan sesuai dengan kebutuhan. Vaksin aktif (virus hidup) adalah virus di dalam vaksin tersebut dalam keadaan hidup dan telah dilemahkan, yang akan tumbuh dan berbiak dalam tubuh induk semang. Vaksin aktif mengandung mikroorganisme hidup yang telah dilemahkan, tidak memerlukan *adjuvant*, tidak stabil dalam pemanasan, dapat berkembang biak dalam tubuh, dan merangsang respon imun tapi tidak menimbulkan penyakit (Amexis and Young, 2007). Vaksin inaktif (virus mati) adalah agen penyakit (virus) yang terdapat pada vaksin dalam keadaan mati. Biasanya di dalamnya dicampurkan atau ditambahkan *adjuvant*. Vaksin dapat dibuat dari jasad renik yang lain misalnya bakteri, parasit, atau bahan toksin (Bamford, 1980). Vaksin inaktif dihasilkan melalui perusakan

virulensinya, tapi imunogenitasnya masih ada. Vaksin ini aman karena tidak infeksius, tapi diperlukan dalam jumlah yang banyak untuk dapat merangsang respon imun, sehingga *booster* sangat diperlukan supaya imunitasnya cukup (Rantam, 2005).

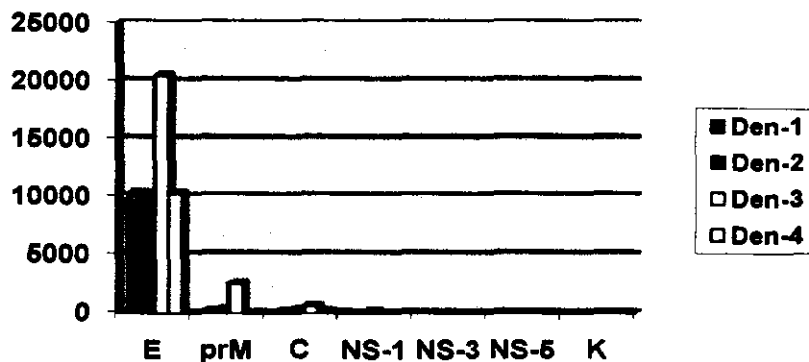
2.8. Perkembangan Vaksin *Dengue*

Beberapa vaksin *dengue* telah diteliti dan dikembangkan, antara lain vaksin sub-unit, koktail, dan klon sub-unit.

2.8.1. Pengembangan vaksin sub-unit

2.8.1.1. Uji imunogenitas

Protein E mempunyai titer paling tinggi pada protein struktural diantara protein lainnya. Titer keempat serotipe berkisar antara 10.240 sampai dengan 20.480. Protein prM keempat serotip antara 80 – 2560 dan protein C antara 160 – 640. Protein E mempunyai fungsi dominan sebagai pemicu pembentukan antibodi. Protein C dalam bentuk virion mempunyai daya imunogenitas paling rendah dibandingkan dengan protein struktural lainnya, tetapi dalam bentuk *anchored* dengan protein prM (C-prM) imunogenitasnya menjadi tinggi, sedangkan protein non-struktural yang mempunyai sifat imunogenitas paling tinggi adalah NS-1 dan diikuti NS3 (Soetjipto dkk., 2000; Rantam dkk., 2003).

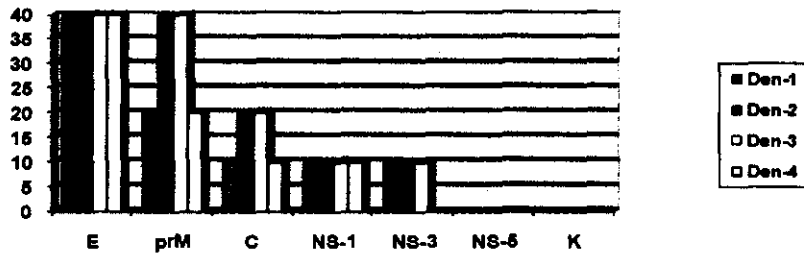


Gambar 2.5 Tingkat imunogenitas protein virus *dengue* (Rantam dkk., 2003)

2.8.1.2. Uji netralisasi

Kemampuan netralisasi protein struktural lebih tinggi dibandingkan dengan protein non-struktural. Hal ini terbukti dengan uji netralisasi bahwa protein E mampu menghambat pertumbuhan virus 50% dengan pengenceran antibodi 40 sedang protein prM lebih 20, protein C lebih dari 10. Hasil penelitian ini sama seperti yang diteliti oleh Chen *et al.* (1997), bahwa antibodi yang diinduksi oleh protein E dapat menghambat pertumbuhan virus DEN-2 sampai 50-100% secara *invitro*.

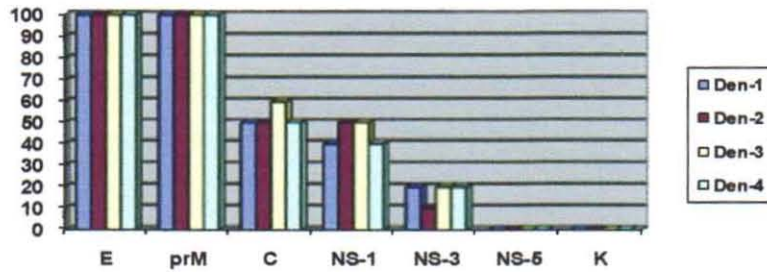
Antibodi yang diinduksi oleh protein non-struktural rata-rata lebih rendah dalam kemampuan untuk menghambat pertumbuhan virus. Antibodi terhadap NS1 dapat menghambat pertumbuhan virus dengan pengenceran lebih dari 10, sedang NS3 lebih kecil atau sama dengan 10. Sementara itu untuk antibodi terhadap NS5 tidak mampu menghambat pertumbuhan virus secara *invitro*. Hal ini terbukti dengan timbulnya CPE pada semua sel (He *et al.*, 1995; Soetjipto dkk., 2000; Rantam dkk., 2003)



Gambar 2.6. Uji netralisasi antibodi hasil imunisasi (Rantam dkk., 2003)

2.8.1.3. Uji protektivitas

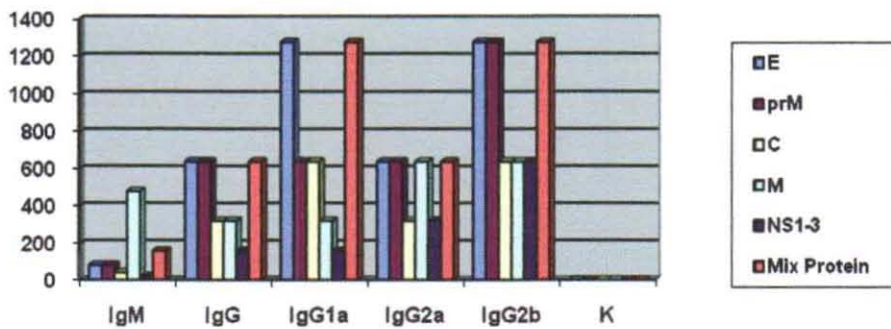
Hasil uji protektivitas pada mencit yang diimunisasi dengan masing-masing protein, selanjutnya ditantang dengan virus *dengue* homolog 105 PFU perlindungan dicapai tertinggi pada mencit yang diimunisasi dengan protein E dan prM dari keempat serotipe virus *dengue* dengan tingkat protektivitasnya 100%. Imunisasi mencit dengan protein C menunjukkan hasil bahwa antibodi yang ditimbulkan hanya dapat melindungi 60%, sementara itu pada mencit yang diimunisasi menggunakan protein E dan prM dapat melindungi mencit yang diinfeksi virus *dengue* ganas melalui *intracerebral*. Begitu juga pada vaksin *dengue* yang didesain dengan menggunakan rekombinan dengan vaccinia menunjukkan hasil yang luar biasa juga dimana dapat melindungi mencit yang ditantang dengan virus *dengue*, sementara itu protein non-struktural (NS-1, NS-3, dan NS-5) dapat melindungi 0-50% (Soetjipto dkk., 2000).



Gambar 2.7. Uji protektivitas mencit yang diinfeksi dengan virus *dengue* (Rantam dkk., 2003)

2.8.1.4. Jenis imunoglobulin hasil imunisasi

Tipe imunoglobulin yang ditimbulkan akibat dari imunisasi protein E yang paling tinggi adalah IgG1a dan IgG2b, sedangkan pada mencit yang diimunisasi dengan protein C titer paling tinggi adalah IgG1a dan IgG2b, sementara protein prM didominasi oleh IgG2b. Imunoglobulin yang berperan penting pada protein virus *dengue* lainnya dalam respon imun humoral adalah IgG1a dan IgG2b. Respons imun seluler sangat aktif yang ditandai dengan ekspresi IFN gama yang signifikan dibandingkan dengan respon imun seluler pada mencit tanpa vaksinasi.



Gambar 2.8. Analisis titer antibodi berdasarkan jenis imunoglobulin (Rantam dkk., 2003)

2.8.2. Pengembangan vaksin koktail

2.8.2.1. Uji imunogenitas

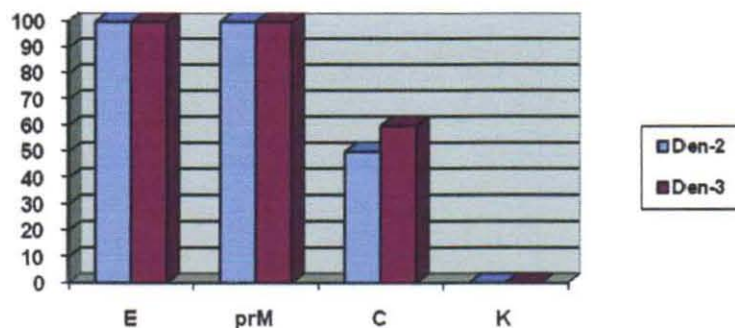
Protein E secara umum mampu menginduksi antibodi lebih tinggi dibandingkan dengan protein lainnya seperti protein C dan prM, tetapi protein struktural lebih antigenik dibandingkan dengan protein non-struktural. Serotipe virus *dengue* setelah protein struktural dimurnikan kemudian diimunisasikan menunjukkan hasil protein mampu menimbulkan antibodi 5120 sampai 10240 sedang protein prM titer antibodinya 160-640 dan protein C mempunyai titer 80-320. Protein E virus DENV-3 mampu menginduksi antibodi dengan titer 5120-20480, protein prM 160-2560 sedang protein C mampu menginduksi antibodi dengan titer 80-320 (Suwarno dkk., 2001).

2.8.2.2. Uji netralisasi

Uji netralisasi serotipe DENV-2 dan DENV-3 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam menunjukkan kemampuan untuk netralisasi pertumbuhan virus pada sel C6/36. Protein E mempunyai daya netralisasi lebih tinggi dibandingkan dengan jenis antibodi yang diinduksi oleh protein prM dan protein C. Hal ini sama seperti protein yang dimiliki oleh virus *dengue* serotipe DENV-3. Kemampuan netralisasi tertinggi dengan pengenceran antibodi 32-128 pada DENV-1, sedangkan pengenceran 16-64 adalah pengenceran antibodi yang diinduksi oleh DENV-2. Kemampuan netralisasi paling rendah adalah antibodi yang ditimbulkan oleh protein C (Suwarno, dkk. 2001)

2.8.2.3. Uji protektivitas

Uji protektivitas menunjukkan hasil pada mencit yang diimunisasi dengan protein E mempunyai daya protektivitas 100% seperti pada mencit yang diimunisasi dengan protein prM, sedangkan protein C DENV-2 mempunyai daya protektivitas 50%, dan DENV-3 60%. Walaupun demikian tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Jadi, protein E dan protein prM mempunyai daya imunogenitas tinggi (Suwarno dkk., 2001)



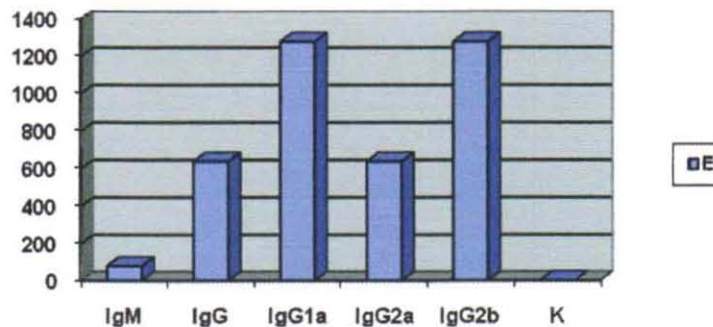
Gambar 2.9. Uji protektivitas mencit yang ditantang dengan DENV-2 dan DENV-3 (Rantam dkk., 2003)

2.8.3. Pengembangan vaksin klon subunit

2.8.3.1. Analisis jenis antibodi

Antibodi yang diinduksi oleh protein E mempunyai variasi subtipe. Masing-masing tipe mempunyai karakteristik titer yang berbeda. IgM merupakan imunoglobulin yang dipresentasikan pertama yang selanjutnya terjadi *switching* imunoglobulin G. Imunoglobulin G pada netralisasi virus mempunyai peranan penting dalam mengikat antigen sehingga terjadi

komplek antigen dan antibodi dan komplemen. Subtipe imunoglobulin yang dominan adalah IgG1a dan IgG2a, selain itu juga IgG dan IgG2a. Variasi ini sangat tergantung dari asam amino yang membentuk peptida, sehingga protein yang terbentuk berfungsi sesuai dengan sifat peptida yang akhirnya antibodi yang ditimbulkan juga bervariasi. Hal ini tampak pada Gambar 2.10, tipe dan subtipe imunoglobulin yang disekresi oleh sel plasma kera yang diimunisasi dengan protein E rekombinan.



Gambar 2.10. Titer antribodi tipe dan subtipe antibodi hasil imunisasi protein E rekombinan (Rantam dkk., 2003)

Band yang ditemukan pada sel endotel yang dipapar dengan virus *dengue* mix menunjukkan adanya variasi reseptor. Variasi resptor ini kemungkinan dipengaruhi oleh strain virus *dengue* yang berbeda. Antara virus *dengue* mempunyai sifat kinetik molekul yang sedikit berbeda, oleh karena itu induksi reseptorpun berbeda terutama dalam induksi pembentukan reseptor yang mempunyai komposisi molekulnya seperti asam amino, jenis peptide, serta susunan nukleotidanya, sehingga sangat mempengaruhi sifat hidrofobik pada permukaan dan hidrofilik pada residu.

Hal ini sangat berperan dalam pembentukan bentuk reseptor seperti linear, diskontinue atau dispers. Model bentuk reseptor ini juga sangat menentukan jenis ikatan diantara epitop dan antibodi. Semakin linear biasanya ikatan mudah lepas, sedang diskontinue mempunyai ikatan yang kuat dan lebih spesifik (Andreas *et al.*, 2000; Depres *et al.*, 1993, 1996; Wimmer, 1994).

Secara kimiawi reseptor spesifik sel endotel yang dipapar virus *dengue* apakah merupakan peranan dari *glycosamine glycans* (GAGS) pada permukaan sel, sampai sekarang masih belum jelas. Begitu juga heparin sulfat pada infeksi virus memegang peranan penting oleh karena itu dengan menggunakan *blocking agent* pensulfatan heparin sulfat dan polysulfonate sangat efektif untuk mencegah infeksi virus *dengue* pada sel target. Untuk itu hasil dari penelitian ini masih perlu dilakukan kajian molekuler lebih lanjut karena interaksi protein envelop dan sel target adalah benar-benar merupakan *critical determinant of infectivity* (Chen *et al.*, 1997).

Berdasarkan literatur dari penelitian-penelitian yang sudah ada, maka penelitian ini berupaya untuk mengembangkan vaksin *dengue* inaktif multivalen yang mengandung strain DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 yang diharapkan mampu menginduksi antibodi yang bersifat spesifik serta protektif terhadap keempat strain virus *dengue* di Indonesia.

BAB 3

**KERANGKA KONSEPTUAL DAN
HIPOTESIS PENELITIAN**

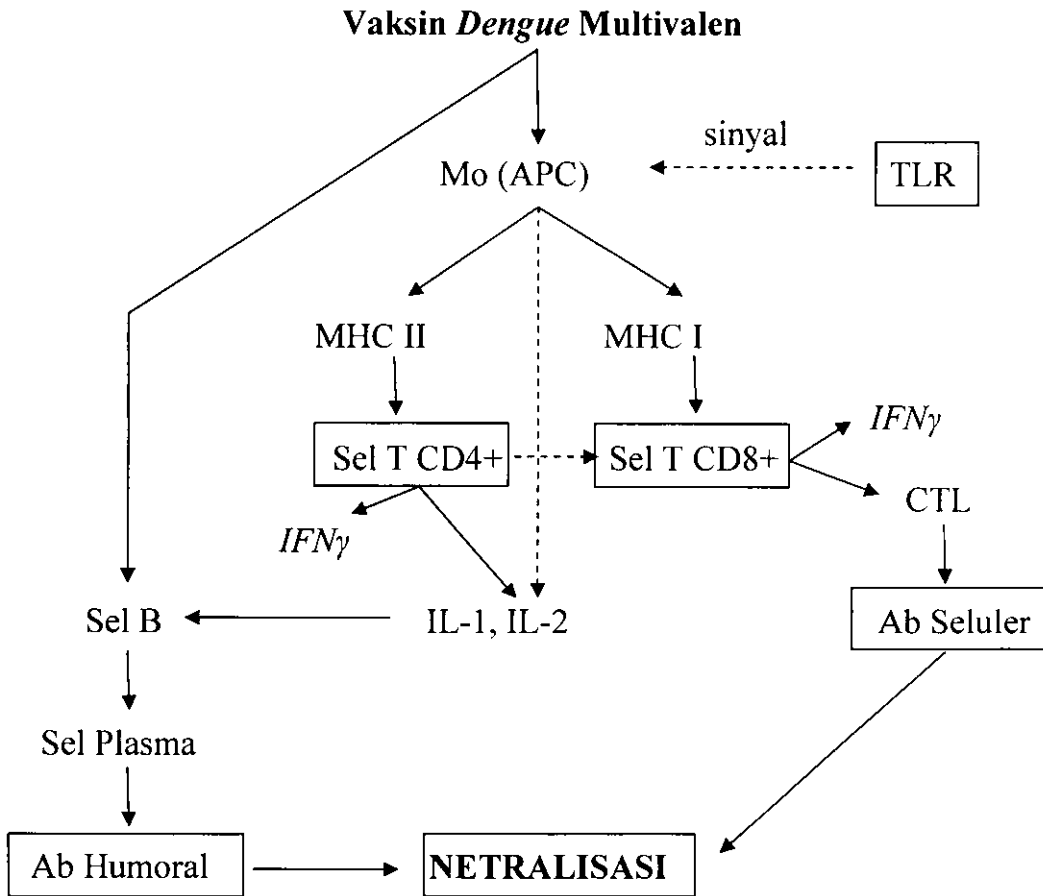
BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Vaksin *dengue* multivalen hasil formulasi tim DHF *Institute Tropical Disease* Universitas Airlangga diinjeksikan sebagai antigen pada kelinci secara *intramuscular*. Antigen akan dikenali dan berikatan dengan sel fagosit mononuklear makrofag yang berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC). Antigen yang berikatan pada molekul MHC kelas II akan mempresentasikan dan mengaktifkan sel T CD4+, sementara yang berikatan dengan MHC kelas I akan mengaktifkan sel T CD8+. Aktifasi sel T CD4+ dan sel T CD8+ ini akan menghasilkan IFN- γ yang sering dipakai sebagai indikator untuk mengetahui peningkatan imunitas seluler dan humoral atau aktivitas sel T CD4+ dan sel T CD8+. Sel T CD4+ juga akan mengaktifkan interleukin (yang juga diproduksi oleh monosit atau makrofag). Interleukin tersebut akan merangsang proliferasi dan diferensiasi sel limfosit B menjadi sel plasma. Antigen secara langsung juga dapat mengaktifkan sel B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma. Sel plasma akan menghasilkan antibodi humoral. Sel T CD8+ akan berdiferensiasi menjadi *cytotoxic cell T lymphocyte* (CTL) yang mampu melisis sel yang terinfeksi virus (intraseluler) dan berperan sebagai antibodi seluler. Antibodi humoral dan seluler diharapkan mampu menetralisasi virus *dengue*. TLR diduga merupakan reseptor terpenting, dimana sinyal TLR mampu mengaktivasi protein yang berperan dalam mengaktifkan makrofag.

BAGAN KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN



Gambar 3.1. Bagan Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan :

————> : secara langsung

- - - - -> : secara tidak langsung

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis/Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik menggunakan rancangan acak lengkap (RAL).

4.2 Populasi, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba sebanyak 18 ekor kelinci jenis *White new zealand*, dengan umur rata-rata 2,5 bulan dan berat kurang lebih 1 kg yang diperoleh dari Kecamatan Ngetes, Nganjuk. Sebelum diberi perlakuan, semua hewan coba diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu pada kondisi kandang, pakan, minum dan lingkungan yang sama. Pakan yang diberikan adalah jagung, kangkung, dan pellet untuk selingan, sedangkan minum diberi air minum dalam kemasan (AMDK) yang disediakan secara *ad libitum*.

Sampel yang digunakan berupa serum dan plasma darah. Kelinci dibagi tiga kelompok secara *random*, masing-masing diberi perlakuan yang berbeda. P0 diimunisasi dengan PBS sebagai kontrol, P1 diimunisasi vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc, dan P2 diimunisasi vaksin *dengue* multivalen 0,3 cc. Pengambilan darah dilakukan pada hari ke-0, 7, 14, 21, 28, berturut-turut yaitu T1, T2, T3, T4, T5 untuk mengukur nilai *optical density* (OD) antibodi. Secara skematis rancangan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Jenis Perlakuan (P)	Lama Waktu Pengukuran (T)				
	T1	T2	T3	T4	T5
P0	T1P0	T2P0	T3P0	T4P0	T5P0
P1	T1P1	T2P1	T3P1	T4P1	T5P1
P2	T1P2	T2P2	T3P2	T4P2	T5P2

Keterangan :

P0 = kontrol / PBS

P1 = vaksin *Dengue* multivalent 0,5 cc

P2 = vaksin *Dengue* multivalent 0,3 cc

Dari rancangan acak lengkap ini dapat diteliti tiga macam efek yaitu:

1. Efek utama (*main effect*), yaitu perbedaan efek dari T1, T2, T3, T4, T5, T6 terlepas dari perlakuan P yang digunakan, atau perbedaan efek dari P0, P1, P2 terlepas dari T yang digunakan
2. Efek sederhana (*simple effect*), yaitu perbedaan antar P pada tiap T, atau perbedaan antar T pada tiap P
3. Efek interaksi (*interaction effect*), yaitu apakah perlakuan P memberikan efek yang seiring atau tidak dengan T.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Konsentrasi vaksin *dengue* multivalen yang diimunisasikan pada kelinci *White new zealand*.

4.3.2 Variabel Tergantung

Nilai OD antibodi, aktivitas TLR, sel T CD4+, dan CD8+ pada kelinci *White new zealand* setelah imunisasi dengan vaksin *dengue* multivalen.

4.3.3 Variabel Kendali

- a. Jenis hewan coba, berat badan, umur, diet, dan konsentrasi vaksin
- b. Cara pemeriksaan dan pengukuran nilai OD antibodi dengan *indirect ELISA*
- c. Cara pemeriksaan dan pengukuran aktifitas TLR, sel T CD4+, dan CD8+ dengan *immunofluorescent* (imunositokimia)
- d. Cara pemeriksaan *Serum Neutralization Test* (SNT) dengan kultur sel menggunakan sel vero
- e. Cara pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan *One Step Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

4.3.4 Definisi Operasional Variabel

- a. Vaksin *dengue* multivalen : Jenis vaksin yang dapat menginduksi antibodi yang mampu mengenali strain DENV-1, DEN-V2, DENV-3, dan DENV-4
- b. Kadar vaksin *dengue* multivalen : Konsentrasi protein imunogenik yang diperoleh dari virus *dengue* serotipe DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4
- c. Immunoglobulin : Hasil proliferasi dan diferensiasi sel B yang berfungsi untuk melawan antigen
- d. Nilai OD antibodi : Meningkat atau menurunnya nilai OD antibodi pada kelinci setelah imunisasi dengan vaksin *dengue* multivalen

4.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi PBS, Aquadestilate, krimer, *mix-antigen dengue virus*, konjugat *a-rabbit Ig* yang dilabel enzim alkalin fosfat, H₂SO₄ IN, aluminium foil, *stopping reagent*, *phosphatase substrate p-Nitrophenyl Phosphatase Hexahydrate Disodium Salt Tablets 5 mg (p-NPP)*, anti-CD4+ (*monoclonal mouse anti-human CD4+/FITC clone MT 310*), anti-CD8+ (*monoclonal mouse anti-human CD8+/FITC MT 310*), anti-TLR yang telah dilabel FITC, anti koagulan EDTA, *fikoll histopaque*, alkohol, etanol, *Eagle's MEM*, FBS, PBS 1x, NaHCO₃, amphoterin B, *penicillin-streptomycin solution*, trypsin, sel vero P169, trizol, *buffer*, *enzyme superscript III*, *nuclease free water*, *primer dengue (TS1, TS2, TS3, TS4, D1)*, *blue cap loading gel*, marker PCR *dengue* (keterangan reagen dapat dilihat pada lampiran 3).

4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan untuk penelitian ini adalah *ice box*, *ice pack*, tabung *blue cap*, kapas, spidol permanen, *microtube*, objek glass, *disposable spuit 3 cc*, *spuit tuberculin*, *glove*, masker, *ependorf tube*, *culture cell plate 24 well*, *microplate ELISA*, dan kelengkapan laboratorium lain seperti *vortex*, *ELISA reader*, *freezer*, *centrifuge*, *multi channel pipet*, pipet *dropper 10µl*, *200µl*, dan *1000 ml* beserta tipnya, pipet hisap *5 ml* dan *10 ml*, mikroskop *fluorescent*, serta mesin PCR.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Farmasi Universitas Airlangga sebagai tempat pemeliharaan kelinci, Laboratorium *Dengue Institute Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga sebagai tempat pengujian *indirect* ELISA, *immunofluorescent*, dan PCR, serta Laboratorium *Stem Cell* ITD Universitas Airlangga sebagai tempat uji netralisasi menggunakan kultur sel vero. Penelitian dilaksanakan dalam waktu 5 bulan, yang dimulai pada bulan Juli sampai dengan Desember 2010.

4.7 Prosedur pengambilan dan pengumpulan data

4.7.1 Vaksin *dengue* multivalen

Vaksin *dengue* multivalen diperoleh dari hasil formulasi Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. dari laboratorium *Dengue Institute Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga yang isolatnya berasal dari sampel pasien *dengue* seluruh Indonesia.

4.7.2 Perlakuan pada hewan coba

Delapan belas ekor kelinci yang telah dibagi menjadi tiga kelompok kemudian divaksinasi. Vaksinasi awal dilakukan pada hari ke-0 dan booster dilakukan pada hari ke-14, karena titer mulai turun pada minggu kedua (Widyatno, 2003). Pengambilan sampel darah sebanyak 3 ml melalui vena telinga dilakukan pada hari ke-0, 7, 14, 21 dan 28 untuk isolasi PBMCs dan pemeriksaan *indirect* ELISA. Sebelum darah diambil, untuk mempermudah prosesnya maka kelinci dikeluarkan satu persatu dan diolahragakan terlebih dahulu untuk memacu

memompa darah lebih cepat, kemudian bagian luar daun telinga disemprot etanol dan disentil untuk melebarkan pembuluh darah. Sampel darah dibagi menjadi dua, setengah bagian diberi EDTA agar darah tidak mengalami koagulasi untuk mendapatkan plasma darah, dan sisanya tanpa EDTA untuk mendapatkan serum darah.

4.7.3 Isolasi *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs)

Prosedur isolasi PBMCs adalah menyiapkan tabung *blue cap* sesuai dengan jumlah sampel yang diperoleh, kemudian mengisi tabung tersebut dengan *fikoll histopaque* masing-masing sama banyak dengan jumlah sampel darah yang akan diisolasi. Darah yang telah diisolasi dicuci hingga bersih dengan penambahan PBS sama banyak dengan jumlah sampel darah, supernatan dibuang dan filtrat ditambah PBS lagi, kemudian di resuspensi dan dipindahkan pada tabung yang telah berisi *fikoll histopaque* secara perlahan melalui dinding tabung. Proses selanjutnya yaitu sentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit, kemudian ditambahkan fikoll lagi serta disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Selanjutnya *buffy coat* yang berupa cincin berwarna putih diisolasi dan disimpan pada *eppendorf tube*, kemudian tambahkan *freezing medium* dan disimpan pada suhu -80°C . Teknik ini telah digunakan secara umum dengan tujuan mengkoleksi dan mempelajari limfosit serta monosit dari berbagai jenis penyakit yang muncul (Hokland *et al.*, 1980; Kaplan *et al.*, 1982; Hirvonen *et al.*, 1991).

Pengamatan respon imun seluler melalui metode isolasi PBMCs dilanjutkan dengan metode *imunofluorescent* menggunakan mikroskop *fluorescent* dan

dilanjutkan dengan menghitung jumlah sel T CD8+, CD4+, dan TLR pada masing-masing sampel.

4.7.4 Pengukuran antibodi

Sebelum *indirect* ELISA, dilakukan *chequer board* terlebih dahulu untuk mengetahui pengenceran terkecil yang menunjukkan hasil positif. Uji *chequer board* menunjukkan bahwa pengenceran untuk *mix antigen dengue* adalah 1:100 dan pengenceran untuk antibodi adalah 1:64.

4.7.4.1 Indirect-ELISA (*whole* imunoglobulin)

Coating antigen dengan pengenceran 1:100 masing-masing 50 μ l per *well*, kemudian diinkubasi *over night* pada suhu 4°C. Setelah inkubasi, dilakukan *washing* sebanyak 6 kali dengan *washing buffer* PBS-Tween 0,05%. Langkah berikutnya yaitu *blocking* dengan krimer 4% masing-masing 50 μ l per *well*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah inkubasi, dilakukan *washing* sebanyak 6 kali. Masukkan sampel serum dengan pengenceran 1:64, masing-masing sebanyak 50 μ l per *well*, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah itu dilakukan *washing* sebanyak 6 kali. Tahap selanjutnya yaitu masukkan *α -rabbit Ig* (konjugate 1 : 2500) sebanyak 50 μ l per *well*, inkubasi lagi pada suhu 37°C selama 60 menit. *Washing* dilakukan sebanyak 6 kali sebelum dimasukkan substrat p-NPP, kemudian diinkubasi di tempat gelap selama 30 menit hingga terjadi perubahan warna. *Stopping reagent* ditambahkan dan hasilnya dibaca pada *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

4.7.5 Pemeriksaan *immunofluorescent*

Sampel PBMCs disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit kemudian ditambahkan PBS 300 μ l. Tambahkan methanol -20°C hingga penuh dan disentrifuse lagi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Buang supernatan, kemudian tambahkan PBS \pm 900 μ l dan disentrifuse kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Hal lain yang perlu disiapkan adalah anti-CD4+ FITC/anti-CD8+ FITC/anti-TLR FITC, lalu tambahkan 200 μ l anti-CD4+/CD8+/TLR pada masing-masing sampel. Bungkus dengan aluminium foil untuk tiap sampel tersebut dan diinkubasikan pada suhu 39°C selama 45 menit agar Ag dan Ab dapat berikatan. Kemudian menyiapkan objek glass, lalu teteskan 10-20 μ l di atasnya dan selanjutnya dapat ditutup dengan *cover glass* kemudian amati di bawah mikroskop *fluorescent* (Rantam, 2003).

4.7.6. *Serum Netralization Test* (SNT)

Setelah diketahui sampel positif berdasarkan uji ELISA, dimana sampel positif dihitung berdasarkan *cut of value* (COV), selanjutnya dilakukan SNT untuk mengetahui sejauh mana antibodi mampu menetralsasi virus *dengue*. Langkah awal adalah menyiapkan sel vero (ginjal kera hijau Afrika) yang akan dipakai sebagai sel kultur. Media yang dipakai adalah *Eagle's minimum essential medium* (EMEM). Sel vero ditumbuhkan dalam *microplate 24 well* kemudian diinkubasi *overnight* 37° C pada CO₂ 5% hingga *confluent* 80%.

Antigen yang digunakan yaitu *mix-antigen* DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 dengan pengenceran 1:100 (25 μ l antigen : 2500 μ l EMEM yang mengandung 25 μ l *bovine albumin* serta *penicillin-streptomycin*).

Dua puluh sampel serum yang digunakan berasal dari hewan coba kelinci yang diimunisasi dengan vaksin *dengue* multivalen dan menunjukkan hasil positif berdasarkan uji ELISA dengan $OD \leq 1$ (kel. I) dan $OD > 1$ (kel. II) (lampiran 6). Sampel serum dinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit. Kemudian serum diencerkan dengan pengenceran serial 1:32, 1:64, 1:128, 1: 256 dalam medium yang mengandung 1% *bovine albumin* serta ditambah *penicillin-streptomycin*. Antigen dan serum yang telah diencerkan dicampur dengan perbandingan 1:1 dalam *ependorf tube* dan diinkubasi 37°C pada 5% CO_2 selama 1 jam. Setelah diinkubasi, campuran antigen dan serum diinfeksi pada sel vero yang telah *confluent* pada *microplate 24 well* (2×10^5 sel/well), masing-masing sebanyak $50\mu\text{l}$ dan diinkubasi 37°C pada 5% CO_2 selama 5 hari. Pengamatan CPE dilakukan setiap dua belas jam sekali.

Tabel 4.2. Skema kultur sel vero pada plate 24 well

A	A1 7	A2 7	A5 7	B1 7	B2 7	A1 14	B2 14	A6 21	A6 28	B1 28	B1 0	1:32
B											K5 0	1:64
C											A4 7	1:128
D											A6 7	1:256
E	B3 7	B4 7	A6 14	B5 14	A4 21	B4 21	B5 21	A2 28	A4 28	B2 28	K3 21	1:32
F											K5 21	1:64
G											K1 28	1:128
H											K5 28	1:256
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

4.7.7. *One Step Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Setelah 5 hari, sel vero yang menunjukkan hasil SNT positif (sel vero yang tidak timbul CPE) segera dipanen dan dilanjutkan dengan PCR untuk membuktikan ada tidaknya virus *dengue* yang menginfeksi sel. Sebelum PCR, sampel sel vero perlu diekstraksi RNA (lampiran 4).

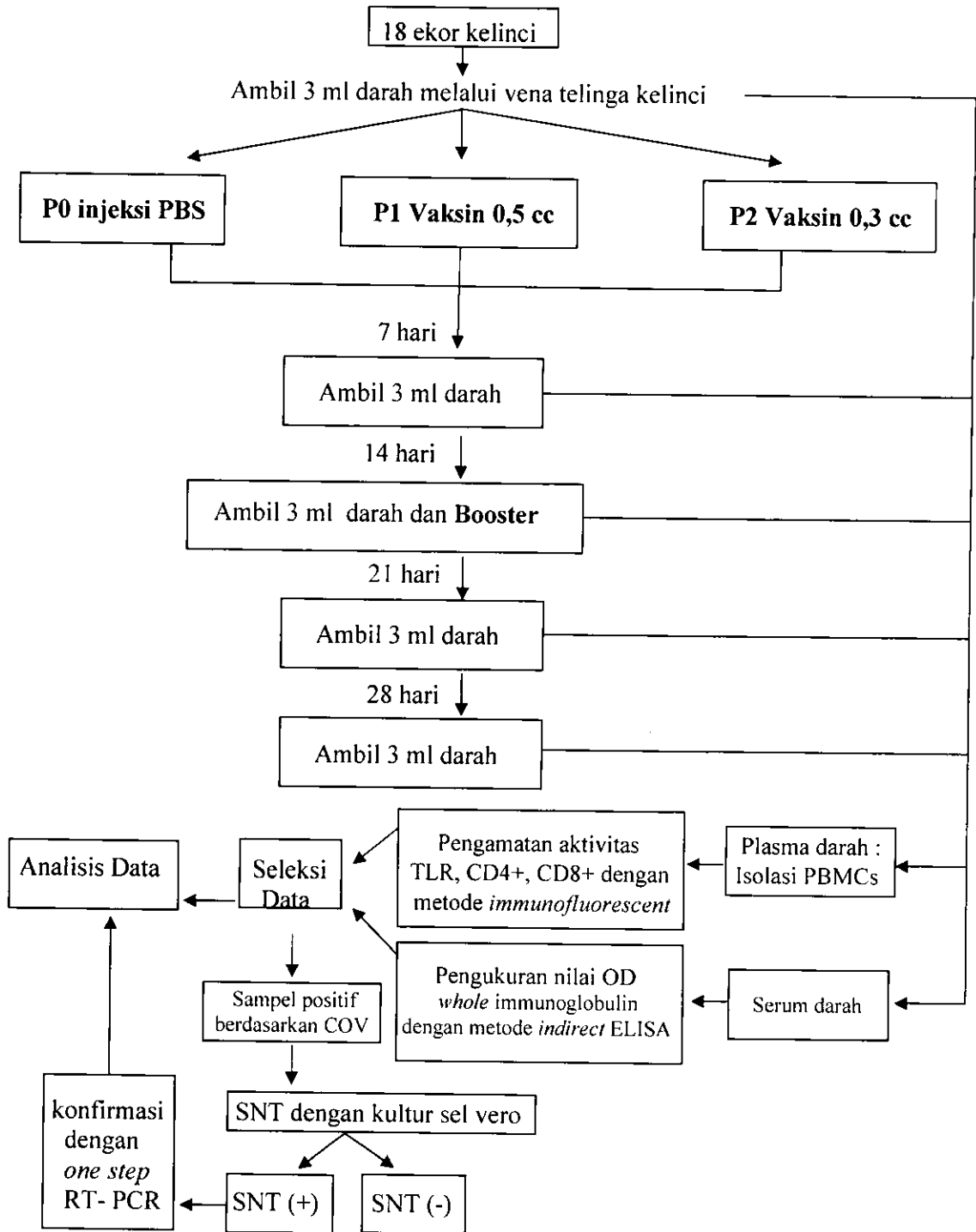
Reverse Transcription and PCR amplifikasi (RT-PCR) adalah teknik yang digunakan untuk mendeteksi RNA virus DEN dengan menggunakan primer spesifik serotipe. Total PCR mix adalah 25 μ l, terdiri dari 5 μ l RNA *product*, primer TS-1, TS-2, TS-3 TS-4 (*forward*), primer D1 (*reverse*) masing-masing sebanyak 1 μ l, PCR buffer 12,5 μ l, *Superscript III* 1 μ l, dan RNAase free water sebanyak 1,5 μ l.

Satu siklus untuk reaksi reverse transcriptase yaitu 55°C selama 30 menit, kemudian diikuti reaksi *first denaturing* selama 2 menit untuk 94°C. Sedangkan untuk PCR amplifikasinya ada 40 siklus, dimana tiap siklusnya terdiri dari 94°C untuk 30 detik (*denaturing*); 47°C untuk 40 detik (*annealing*) dan 72°C untuk 1 menit (*extention*), sedangkan untuk *fase last extention* akhir yaitu 72°C selama 10 menit.

Ukuran pita yang diharapkan dari hasil amplifikasi untuk *dengue* tipe 1 adalah 486 base-pair (bp), tipe 2 adalah 119 bp, tipe 3 *dengue* adalah 290 bp dan tipe 4 *dengue* adalah 389bp (Eva *et al.*, 1998). Sepuluh mikroliter dari total 25 μ l PCR mix yang akan dijalankan di dalam elektroforesis pada 2% *agarose gel* dalam 0,5x TBE sebanyak 100 ml dengan standar marker sebagai patokan untuk melihat ukuran berat molekul sampel.

Pita DNA yang jelas dan pada ukuran yang tepat pada gel agarosa dianggap sebagai hasil yang positif. Sementara pita DNA yang kurang jelas pada gel agarosa tapi berada pada ukuran yang tepat, mesti dipertimbangkan lebih lanjut karena dianggap sebagai hasil yang tidak jelas. (Massi dan Sabran, 2006).

4.8 Bagan Kerangka Operasional



Gambar 4.1. Bagan Kerangka Operasional Penelitian

4.9 Analisis Data

Evaluasi hasil respon imun seluler didapat dengan melakukan pengamatan mikroskopis terhadap terangnya warna hijau fluorescent saat pemeriksaan dan penghitungan jumlah sel T CD4+, CD8+, dan TLR yang nampak berpendar. Hasil respon imun humoral berupa nilai OD antibodi berdasarkan *indirect* ELISA. Data tersebut dianalisis menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji Duncan dengan taraf signifikansi 5% (Kusriningrum, 2008).

Sampel yang dinyatakan positif pada uji *indirect* ELISA dikelompokkan menjadi 2, yaitu kelompok I ($OD < 1$) dan kelompok II ($OD > 1$), selanjutnya dilakukan uji *Serum Neutralization Test* (SNT) selama 5 hari untuk melihat terbentuknya CPE. Bila uji SNT positif (memperlihatkan hasil CPE negatif), maka dikonfirmasi dengan PCR. Hasil PCR yang negatif membuktikan bahwa vaksin *dengue* multivalen bersifat netralisasi.

BAB 5
ANALISIS HASIL PENELITIAN

BAB 5

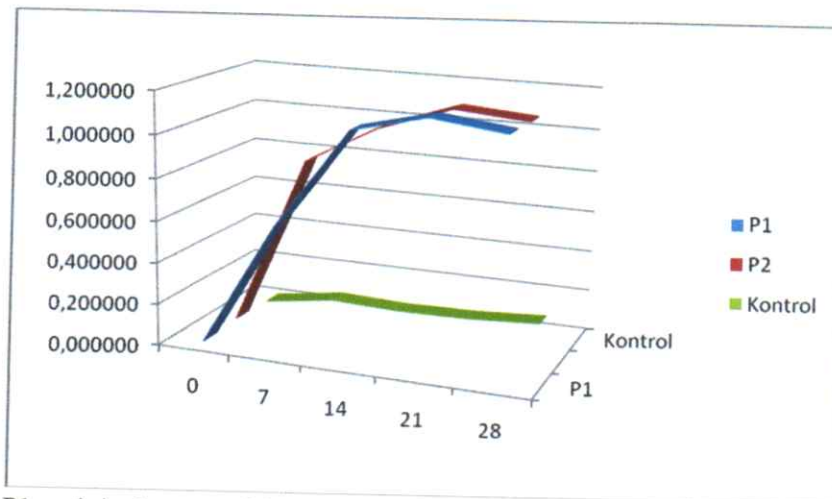
ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Data Penelitian

5.1.1 Pengukuran nilai *optical density* (OD) antibodi (*whole immunoglobulin*)

Data penelitian berupa nilai OD antibodi pada perlakuan P0 (kontrol), P1 (imunisasi dengan vaksin dengue multivalen 0,5 cc) dan P2 (imunisasi dengan vaksin dengue multivalen 0,3 cc) berdasarkan *indirect ELISA*, serta waktu pengukuran pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28 pasca imunisasi disajikan dalam bentuk grafik.

Rata-rata nilai OD antibodi pada perlakuan kelompok P1 dan P2 mulai meningkat bersamaan hampir sejajar pada minggu pertama. Pada hari ke-7, nilai OD antibodi kelompok P2 meningkat lebih tinggi dibanding kelompok P1, namun pada hari ke-14 nilai OD antibodi P1 meningkat melebihi P2, dan kemudian nilai OD antibodi kedua kelompok baik P1 dan P2 cenderung terus meningkat dan mencapai nilai yang hampir sejajar pada hari ke-21, yaitu seminggu setelah booster dan mengalami sedikit penurunan pada hari ke-28, walaupun grafiknya masih cukup stabil seperti pada hari ke-21. Hal ini sangat berbeda nyata bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (P0) yang laju grafiknya tidak mengalami peningkatan yang berarti, bahkan dapat dibilang stabil sejak hari ke-0 hingga hari ke-28. Untuk lebih jelasnya, grafik rata-rata nilai OD antibodi ketiga perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.1.



P1 : vaksin *dengue* multivalent 0,05 cc
 P2 : vaksin *dengue* multivalent 0,03 cc

Gambar 5.1 Rata-rata nilai OD antibodi kelinci yang diimunisasi vaksin *dengue* multivalen.

Hasil analisis nilai OD antibodi menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada perlakuan yang berbeda dilihat dari waktu pengambilan serum (hari ke-), dosis imunisasi (P), dan kombinasi keduanya (hari ke-*P).

Perbedaan rata-rata nilai OD antibodi berdasarkan waktu pengambilan serum terlihat bahwa F hitung adalah 114,38 dengan probabilitas 0,000 ($p < 0,05$), maka rata-rata nilai OD antibodi dari masing-masing hari memang berbeda nyata.

Perbedaan rata-rata nilai OD antibodi berdasarkan dosis imunisasi terlihat bahwa F hitung adalah 347,76 dengan probabilitas 0,000 ($p < 0,05$), maka rata-rata nilai OD antibodi dari masing-masing dosis imunisasi memang berbeda nyata.

Perbedaan rata-rata nilai OD antibodi berdasarkan kombinasi kedua jenis kelompok (waktu pengambilan serum dan dosis imunisasi) terlihat bahwa F hitung adalah 26,03 dengan probabilitas 0,000 ($p < 0,05$), maka rata-rata nilai OD antibodi baik dari dari masing-masing hari maupun dari dosis imunisasi tersebut memang berbeda nyata.

Bila dilanjutkan dengan uji Duncan terhadap waktu pengambilan serum,, terlihat bahwa tidak ada perbedaan yang nyata antara pengambilan serum pada hari ke-14, 21, dan 28. Uji Duncan terhadap dosis imunisasi terlihat bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara kelompok kontrol (P0) dengan kelompok perlakuan (P1 dan P2), tetapi tidak ada perbedaan yang nyata antara kelompok P1 dengan P2.

5.1.2 Hasil pengamatan TLR sebagai perbandingan respon imun seluler *Peripheral Blood Monocuclear Cells* (PBMCs) terhadap vaksin *dengue* multivalen dengan dosis yang berbeda

Analisis statistik respon imun seluler menggunakan ANOVA terhadap jumlah TLR yang berpendar setelah pemberian vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc dan 0,3 cc menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kontrol. Data disajikan pada lampiran 2. Perbedaan antar perlakuan dilakukan dengan uji Tukey HSD 5% dan hasilnya dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1. Nilai rata-rata dan simpangan baku TLR kelinci yang diimunisasi vaksin *dengue* multivalen

Hari ke-	0	7	14	21	28
P0	35,67a ± 4,72	37,67a ± 6,03	34,67a ± 1,53	32,67a ± 3,78	38a ± 2,65
P1	42,67b ± 6,02	99,67b ± 7,64	178,67b ± 12,34	163,67b ± 10,97	205,33b ± 26,76
P2	37b ± 6,56	96,33b ± 10,26	159,33b ± 19,65	126,67b ± 38,44	152,67b ± 33,65

a,b : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Keterangan :

P0 : Kontrol

P1 : Vaksin *Dengue* Multivalent 0,05 cc

P2 : Vaksin *Dengue* Multivalent 0,03 cc

Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-0 (sebelum perlakuan) menunjukkan bahwa kelompok kontrol (P0) tidak berbeda nyata ($p>0,05$) dengan kelompok perlakuan vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc (P1) dan kelompok perlakuan vaksin *dengue* multivalen 0,3 cc (P2). Ekspresi TLR yang berpendar pada kelompok P1 dengan mikroskop *fluorescent* sejumlah $42,67 \pm 6,03$, sedangkan kelompok P2 ekspresi TLR yang berpendar sejumlah $37 \pm 6,56$. Hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke-0, kelinci yang belum diimunisasi dengan vaksin *dengue* multivalen tidak memiliki perbedaan yang nyata jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-7 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kelompok P1 dan P2, sedangkan kelompok P1 dan P2 tidak berbeda nyata. Pada kelompok P1 jumlah TLR yang berpendar sejumlah $99,67 \pm 7,63$, sedangkan kelompok P2 sejumlah $96,33 \pm 10,26$.

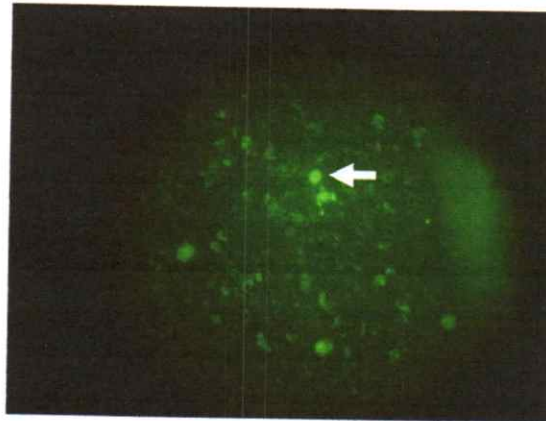
Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-14 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kelompok P1 dan P2, sedangkan kelompok P1 dan P2 tidak berbeda nyata. Ekspresi TLR yang berpendar pada kelompok P1 sejumlah $178,67 \pm 12,34$, sedangkan kelompok P2 sejumlah $159,33 \pm 19,65$.

Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-21 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kelompok P1 dan P2, sedangkan kelompok P1 dan P2 tidak berbeda nyata. Ekspresi TLR yang berpendar pada kelompok P1 sejumlah $163,67 \pm 10,97$, sedangkan pada kelompok P2 sejumlah $126,67 \pm 38,44$.

Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-28 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kelompok P1 dan P2, sedangkan kelompok P1

dan P2 tidak berbeda nyata. Ekspresi TLR yang berpendar pada kelompok P1 sejumlah $205,33 \pm 26,76$, sedangkan kelompok P2 sejumlah $152,67 \pm 33,65$.

Berdasarkan ekspresi TLR yang berpendar setelah dilakukan vaksinasi pertama, kelompok P1 dan P2 selalu menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan kelompok kontrol, walaupun antara perlakuan P1 dan P2 tidak ada yang menunjukkan hasil berbeda nyata. Berdasarkan pengamatan *immunofluorescent* terhadap TLR, kelompok P1 selalu menunjukkan ekspresi TLR yang berpendar lebih banyak dibandingkan dengan kelompok P2. Hal ini dapat membuktikan bahwa imunisasi kelinci dengan vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc lebih efektif jika dibandingkan dengan kelinci yang diimunisasi dengan vaksin *dengue* multivalen 0,3 cc, bila dilihat hanya dari kuantitas ekspresi TLR. Kedua perlakuan ini, baik P1 maupun P2, mengalami kenaikan jumlah ekspresi TLR dengan prosentase peningkatan tertinggi pada hari ke-14, yaitu dua minggu setelah vaksinasi pertama. Seminggu setelah dilakukan booster, yaitu pada hari ke-21, jumlah TLR yang berpendar dari kedua kelompok perlakuan ini mengalami penurunan, namun meningkat lagi pada hari ke-28. Ekspresi TLR tertinggi pada kelompok perlakuan P1 dicapai pada hari ke-28, sedangkan pada kelompok perlakuan P2, ekspresi TLR tertinggi yang berpendar dicapai pada hari ke-14.



Gambar 5.2. Ekspresi TLR yang berpendar dibawah mikroskop *fluorescent* tampak berwarna hijau karena dilabel FITC

5.1.3. Hasil pengamatan sel T CD4⁺ sebagai perbandingan respon imun seluler *Peripheral Blood Monocuclear Cells* (PBMCs) terhadap vaksin *dengue* multivalen dengan dosis yang berbeda

Analisis statistik respon imun seluler menggunakan ANOVA terhadap jumlah sel T CD4⁺ yang berpendar setelah pemberian vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc dan 0,3 cc (lampiran 2). Perbedaan antar perlakuan dapat dilakukan dengan uji Tukey HSD 5% dan hasilnya dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.2. Nilai rata-rata dan simpangan baku sel T CD4⁺ kelinci yang diimunisasi vaksin *dengue* multivalen dengan dosis yang berbeda

Hari ke-	7	14	21	28
P0	60,5a ± 10,6	62a ± 4,24	61,5a ± 3,78	59a ± 2,83
P1	120b ± 11,31	140b ± 1,41	180,5b ± 31,82	295,5b ± 9,19
P2	100ab ± 8,48	122,5c ± 4,95	176,5b ± 30,4	222c ± 9,9

a,b : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Keterangan :

P0 : Kontrol

P1 : Vaksin *Dengue* Multivalent 0,05 cc

P2 : Vaksin *Dengue* Multivalent 0,03 cc

Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-7 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok P1, kelompok P1 tidak berbeda nyata dengan kelompok P2, dan kelompok P2 tidak berbeda nyata dengan kelompok P0. Pada kelompok P1 jumlah sel T CD4+ yang berpendar sejumlah $120 \pm 11,31$ sedangkan kelompok P2 sejumlah $100 \pm 8,48$.

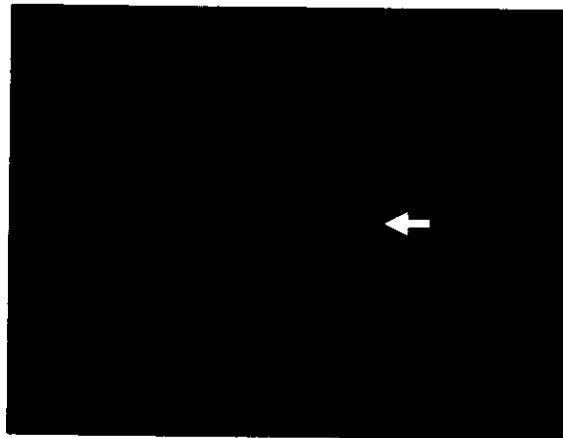
Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-14 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok P1 dan P2, kelompok P1 berbeda nyata dengan kelompok P0 dan P2, dan kelompok P2 berbeda nyata dengan kelompok P0 dan P1. Pada kelompok P1 jumlah sel T CD4+ yang berpendar sejumlah $140 \pm 1,41$, sedangkan kelompok P2 sejumlah $122,5 \pm 4,95$.

Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-21 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan P1 dan P2, tetapi antara P1 dan P2 tidak berbeda nyata. P1 Jumlah sel T CD4+ yang berpendar pada kelompok sejumlah $180,5 \pm 31,82$, sedangkan kelompok P2 sejumlah $176,5 \pm 30,4$.

Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-28 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok P1 dan P2, kelompok P1 berbeda nyata dengan kelompok P0 dan P2, dan kelompok P2 berbeda nyata dengan kelompok P0 dan P1. Pada kelompok P1 jumlah sel T CD4+ yang berpendar sejumlah $295,5 \pm 9,19$, sedangkan kelompok P2 sejumlah $222 \pm 9,9$.

Berdasarkan pengamatan sel T CD4+ yang berpendar setelah dilakukan vaksinasi, jumlah sel T CD4 tiap harinya selalu mengalami peningkatan. Hanya pada kelompok P1 hari ke-7 yang menunjukkan hasil tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol P0. Pada hari 14 dan 28, kelompok P1

menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan kelompok P2, sedangkan pada hari ke-21 kelompok P1 dan P2 tidak berbeda nyata. Berdasarkan pengamatan *immunofluorescent* terhadap sel T CD4+, kelompok P1 menunjukkan rata-rata jumlah sel T CD4+ yang berpendar lebih banyak dibandingkan dengan kelompok P2. Hal ini dapat membuktikan bahwa imunisasi kelinci dengan vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc lebih efektif jika dibandingkan dengan kelinci yang diimunisasi dengan vaksin *dengue* multivalen 0,3 cc, bila dilihat hanya dari kuantitas sel T CD4+ yang aktif. Kedua perlakuan ini, baik P1 maupun P2, mempunyai jumlah terbanyak sekaligus kenaikan jumlah sel T CD4+ dengan prosentase peningkatan tertinggi terjadi pada hari ke-28, yaitu dua minggu setelah booster.



Gambar 5.3. Sel T CD4+ yang berpendar dibawah mikroskop *fluorescent* tampak berwarna hijau karena dilabel FITC

5.1.4. Hasil pengamatan sel T CD8+ sebagai perbandingan respon imun seluler *Peripheral Blood Monocuclear Cells* (PBMCs) terhadap vaksin *dengue* multivalen dengan dosis yang berbeda

Analisis statistik respon imun seluler menggunakan ANOVA terhadap jumlah sel T CD8+ yang berpendar setelah pemberian vaksin *dengue* multivalen

0,5 cc dan 0,3 cc disajikan pada lampiran 2. Perbedaan antar perlakuan dapat dilihat dengan uji Tukey HSD 5% dan hasilnya dapat diamati pada tabel berikut.

Tabel 5.3. Nilai rata-rata dan simpangan baku sel T CD8+ kelinci yang diimunisasi vaksin *dengue* multivalen dengan dosis yang berbeda

Hari ke-	7	14	21	28
P0	109a ± 5,66	112a ± 5,66	120a ± 1,41	116a ± 2,83
P1	217a ± 22,63	259b ± 7,07	326,5b ± 7,78	366,5b ± 17,68
P2	151b ± 8,49	201,5c ± 6,36	287,5b ± 14,85	313,5c ± 10,61

a,b : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Keterangan :

P0 : Kontrol

P1 : Vaksin *Dengue* Multivalent 0,05 cc

P2 : Vaksin *Dengue* Multivalent 0,03 cc

Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-7 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok P1, kelompok P1 berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok P2, dan kelompok P2 berbeda nyata dengan kelompok ($p < 0,05$). Pada kelompok P1 jumlah sel T CD8+ yang berpendar sejumlah $217 \pm 22,63$, sedangkan kelompok P2 sejumlah $151 \pm 8,49$.

Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-14 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok P1 dan P2, kelompok P1 berbeda nyata dengan kelompok P0 dan P2, dan kelompok P2 berbeda nyata dengan kelompok P0 dan P1. Pada kelompok P1 jumlah sel T CD8+ yang berpendar sejumlah $259b \pm 7,07$, sedangkan kelompok P2 sejumlah $201,5c \pm 6,36$.

Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-21 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok P1 dan P2, sedangkan antara P1 dan

P2 tidak berbeda nyata. Pada kelompok P1 jumlah sel T CD8+ yang berpendar sejumlah $326,5b \pm 7,78$, sedangkan kelompok P2 sejumlah $287,5b \pm 14,85$.

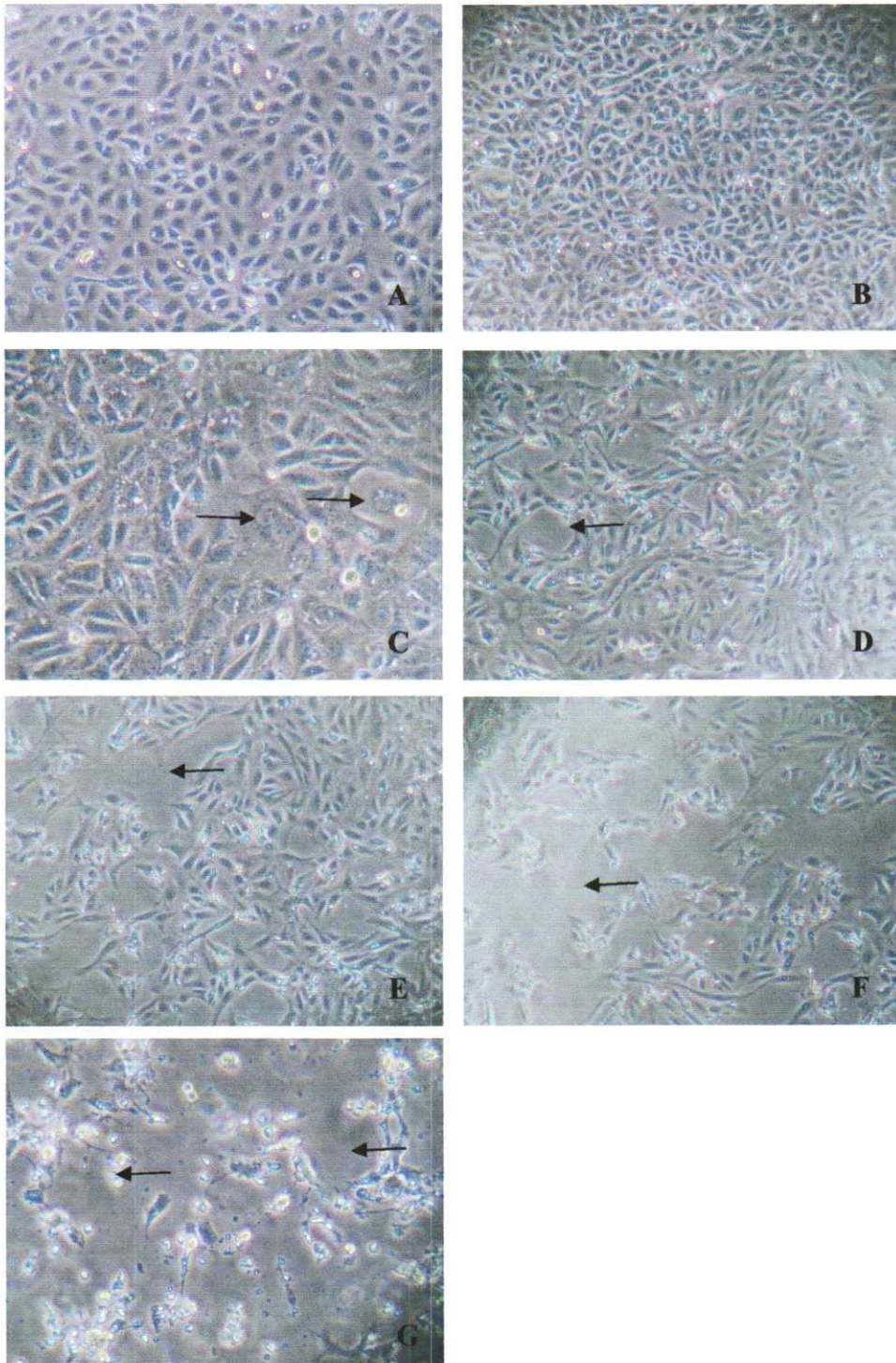
Hasil uji Tukey HSD 5% hari ke-28 menunjukkan bahwa kelompok kontrol P0 berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok P1 dan P2, kelompok P1 berbeda nyata dengan kelompok P2, dan kelompok P2 berbeda nyata dengan kelompok P0. Pada kelompok P1 jumlah sel T CD8+ yang berpendar sejumlah $366,5b \pm 17,68$, sedangkan kelompok P2 sejumlah $313,5c \pm 10,61$.

Berdasarkan pengamatan sel T CD8+ yang berpendar setelah dilakukan vaksinasi, jumlah sel T CD8+ tiap harinya selalu mengalami peningkatan. Hanya pada kelompok P1 hari ke-7 yang menunjukkan hasil tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol P0. Kelompok P1 menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan kelompok P2 pada hari 14 dan 28, sedangkan pada hari ke-21 kelompok P1 dan P2 tidak berbeda nyata. Berdasarkan pengamatan *immunofluorescent* terhadap sel T CD8+, kelompok P1 menunjukkan rata-rata jumlah sel T CD8+ yang berpendar lebih banyak dibandingkan dengan kelompok P2. Hal ini dapat membuktikan bahwa imunisasi kelinci dengan vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc lebih efektif jika dibandingkan dengan kelinci yang diimunisasi dengan vaksin *dengue* multivalen 0,3 cc, bila dilihat hanya dari kuantitas sel T CD8+ yang aktif. Kedua perlakuan ini, baik P1 maupun P2, mempunyai jumlah CD8+ tertinggi yaitu pada hari ke-28. Sedangkan kenaikan jumlah sel T CD4+ dengan prosentase peningkatan tertinggi terjadi pada hari ke-21, yaitu satu minggu setelah booster.

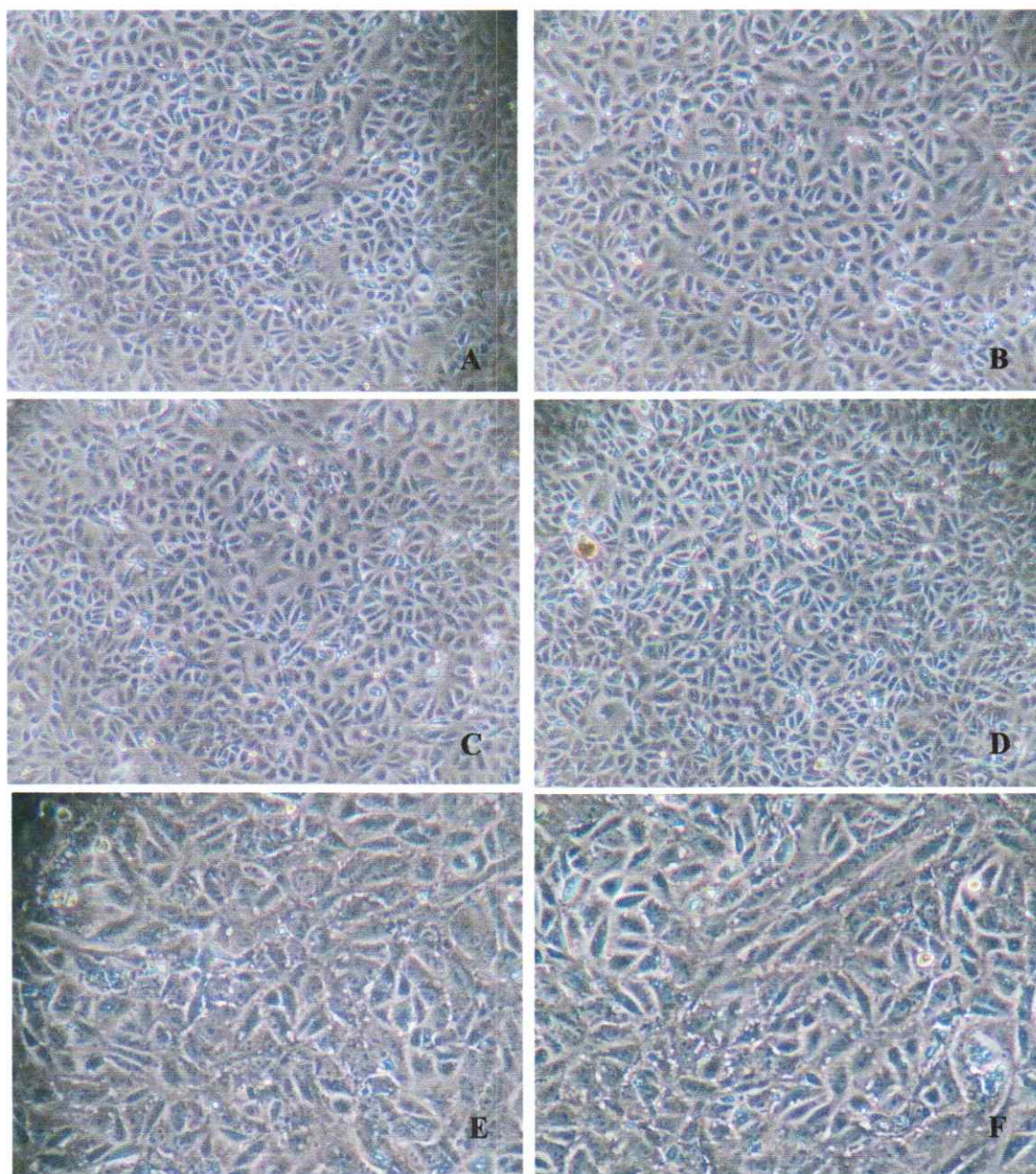
5.1.5. Hasil pengamatan *Serum Neutralization Test* pada kultur sel vero

African green-monkey kidney (sel vero) digunakan untuk mengevaluasi *cytopathogenicity* virus karena dapat menunjukkan derajat *cytopathic effect* (CPE) dengan jelas (John *et al.*, 1990). Secara umum, sel vero yang diinfeksi oleh virus akan menimbulkan CPE. Derajat kerusakan sel akibat infeksi virus tergantung dari tipe virus, tipe sel host, *multiplicity of infection* (MOI), dan faktor lainnya (Fenner *et al.*, 1973). Uji SNT dilakukan untuk mengamati apakah terjadi CPE pada sel vero bila diinfeksi dengan campuran antigen *mix-dengue* dan antibodi hasil imunisasi vaksin *dengue* multivalen. Kontrol negatif adalah sel vero tanpa perlakuan, sedangkan kontrol positif adalah sel vero yang diinfeksi antigen *mix-dengue*.

Gambar 5.4 di bawah ini menunjukkan adanya perubahan keadaan sel vero kontrol positif dari hari ke hari. Karakteristik CPE mulai dapat diamati setelah 36 jam post infeksi, dimana terlihat sel-sel membengkak, adanya sel giant, dan terbentuknya foci yang semakin meluas, kemudian kerusakan sel semakin bertambah parah. Waktu yang dibutuhkan virus *dengue* untuk menghancurkan sel monolayer tergantung pada rasio pengenceran serum/antibodi yang dihasilkan dari imunisasi vaksin *dengue* multivalen. Semakin tinggi pengenceran antibodi, semakin rendah jumlah antibodi yang menetralsasi antigen.



Gambar 5.4 Keadaan sel vero yang diinfeksi dengan antigen virus *mix-dengue* 1:100 sebagai kontrol positif terhadap timbulnya CPE
 A) 12 jam B) 24 jam C) 36 jam D) 48 jam E) 60 jam F) 72 jam
 G) 84 jam post infeksi.



Gambar 5.5 Keadaan sel vero yang diinfeksi dengan antibodi pengenceran 1:256 (sampel A4-28) dengan antigen virus *mix-dengue*; A) 1 hari B) 2 hari C) 3 hari D) 4 hari E) 5 hari post infeksi dan (F) sebagai kontrol negatif sel vero hari ke-5.

Gambar di atas menunjukkan perkembangan sel vero dari hari ke hari, dimana A-E tidak memperlihatkan CPE. Keadaan ini juga terjadi pada F yang merupakan kontrol negatif (sel vero tanpa perlakuan). Hal ini berarti bahwa

dengan pengenceran terbesar yaitu 1:256, antibodi mampu menetralsasi virus *dengue*. Sehingga, pengenceran antibodi di bawahnya pun (32-128) juga mampu menetralsasi virus *dengue* dan menunjukkan hasil CPE negatif. Hasil selengkapnya dari ke-20 sampel dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.4. *Cytopathic effect* (CPE) yang diinduksi oleh campuran antigen *mix-dengue* dan serum antibodi hasil imunisasi vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc pada sel vero yang diinkubasi 37°C

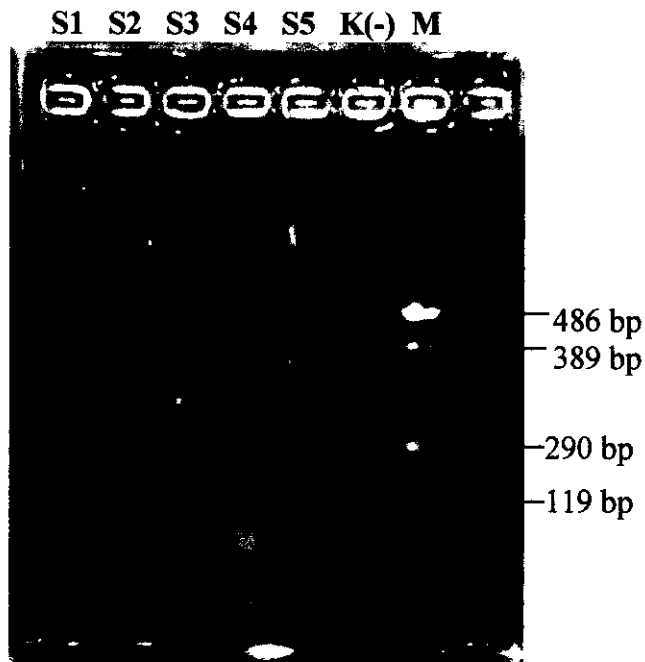
Sampel Serum	Kerusakan sel monolayer (hari)			
	Pengenceran serum (antigen 1:100)			
	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
A1-7	-	-	-	-
A2-7	-	-	-	-
A5-7	-	-	-	-
A1-14	-	-	-	-
A6-21	5	5	5	5
A6-28	5	5	5	5
A6-14*	-	-	-	5
A4-21*	-	-	-	-
A2-28*	-	-	-	-
A4-28*	-	-	-	-

*nilai OD>1

Tabel 5.5. *Cytopathic effect* (CPE) yang diinduksi oleh campuran antigen *mix-dengue* dan serum antibodi hasil imunisasi vaksin *dengue* multivalen 0,3 cc pada sel vero yang diinkubasi 37°C

Sampel Serum	Kerusakan sel monolayer (hari)			
	Pengenceran serum (antigen 1:100)			
	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
B1-7	-	5	4	4
B2-7	-	-	-	-
B2-14	5	5	5	5
B1-28	5	5	5	5
B3-7*	-	-	-	5
B4-7*	-	5	5	5
B5-14*	-	5	5	5
B4-21*	-	-	-	5
B5-21*	-	-	-	-
B2-28*	-	-	-	-

*nilai OD>1

5.1.6. Hasil *one step* RT-PCRGambar 5.6 Hasil *one step* RT-PCR

Keterangan : S1=Ab 1:32, S2=Ab 1:64, S3=Ab 1:128, S4=Ab 1:256,
S5=Ab PBS, K(-)=kontrol negatif, M=marker

Tidak terdapat pita DNA yang jelas pada ukuran gel agarosa, sehingga hasil PCR pada Gambar 5.6 dianggap sebagai hasil negatif. Ukuran pita yang diharapkan dari hasil amplifikasi untuk *dengue* tipe 1 adalah 486 base-pair (bp), *dengue* tipe 2 adalah 119 bp, *dengue* tipe 3 adalah 290 bp dan *dengue* tipe 4 adalah 389bp (Eva *et al.*, 1998).

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Respon Imun Humoral

Respon imun humoral akibat infeksi virus *dengue* ditandai dengan dihasilkannya antibodi terhadap virus *dengue*. Fungsi utama antibodi adalah mengikat antigen dan menghantarkannya ke sistem efektor pemusnahan. Immunoglobulin (Ig) yang dibentuk oleh sel plasma berasal dari proliferasi sel B yang terjadi setelah kontak dengan antigen (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Respon imun humoral mempunyai peran penting melalui antibodi atau immunoglobulin yang dihasilkannya. Dikenal lima macam kelas antibodi atau immunoglobulin dengan struktur kimia dan peran biologi spesifik yang berbeda, yaitu IgG, IgA, IgM, IgD, dan IgE.

IgG dan IgM berperan besar dalam membantu imunitas melawan beberapa agen infeksi seperti bakteri, virus, parasit, dan jamur. Terjadi perubahan imunologik pada DBD, baik respon imun humoral maupun seluler. Perubahan humoral dapat dibuktikan dengan terbentuknya antibodi IgG dan IgM, yang dapat diketahui melalui pemeriksaan serologi, selain itu juga terbentuk antibodi IgA dan IgE (Soegijanto, 2004). Titer IgM pada infeksi primer cukup tinggi pada awalnya, kemudian akan menurun pada hari ke 30 - 60 (Beasley, 1994), dan timbulnya IgG selalu didahului oleh IgM (Soegijanto, 2004), dimana titer IgG yang pada awalnya meningkat, kemudian akan menurun secara lambat namun bertahan cukup lama

bahkan bisa seumur hidup (Aryati, 2001), sedangkan grafik titer antibodi total selalu berada di atas titer IgM dan IgG (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Penelitian ini hanya memeriksa nilai OD antibodi yang ditujukan pada *whole immunoglobulin* yang dihasilkan setelah pemberian vaksin *dengue multivalen*. Nilai OD antibodi terus mengalami peningkatan hingga hari ke-28, baik pada perlakuan P1 maupun P2.

Respon imun terhadap imunisasi tergantung pada dosis, bentuk dan *route* pemberian. Dosis yang terlalu kecil tidak akan menginduksi respon imun sama sekali, dosis yang lebih tinggi sedikit mungkin akan menghambat produksi antibodi spesifik (*low-zone tolerance*), sebaliknya dosis yang berlebihan juga akan menghambat respon imun. Fenomena ini dikenal dengan nama *high-zone tolerance* (Janeway, 1999).

Percobaan imunisasi vaksin *dengue multivalen* dengan dosis 0,5cc dan 0,3cc yang dianalogikan sebagai infeksi primer tampaknya memberikan respon yang positif, namun perlu diteliti lebih mendalam sehingga terhindar dari masalah *low-zone* dan *high-zone tolerance* serta menghasilkan kekebalan yang optimal.

6.2 Respon Imun Seluler

Pemeriksaan *immunofluorescent* menunjukkan adanya peningkatan aktivitas sel T CD4+ dan CD8+. Vaksin multivalen yang diimunisasikan pada kelinci akan ditangkap oleh reseptor monosit, lalu monosit akan mengeluarkan interferon gamma dan alfa.

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

Peningkatan aktivitas sel T CD4⁺ sesuai dengan peningkatan kadar imunoglobulin yang diproduksi oleh kelinci setelah imunisasi dengan vaksin *dengue* multivalen. Hal ini disebabkan karena sel T CD4⁺ akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mempunyai kemampuan untuk memproduksi imunoglobulin. Sel T 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.

Virus bersifat intraseluler sehingga akan mengaktifkan sel T CD8⁺ terlebih dahulu melalui pengenalan reseptor sel fagosit. Kemudian sel T CD4⁺ baru aktif dengan tujuan memproduksi imunoglobulin (Stites, 1987). Pernyataan tersebut menjelaskan tentang kadar sel T CD8⁺ lebih tinggi dari sel T CD4⁺.

TLR terutama mengenal sejumlah besar patogen yang berhubungan dengan PAMP seperti yang ditemukan pada sejumlah besar komponen patogen virus, bakteri, jamur, bahkan protozoa seperti DNA, LPS bakteri gram-negatif, lipoprotein, dan polisakarida zimosan jamur. Dewasa ini diketahui ada sembilan jenis TLR. Jenis TLR yang memiliki mikroba sasaran berupa virus adalah TLR3,

TLR 7, dan TLR8, dimana TLR 3 untuk ligan dsRNA, sedangkan TLR7 dan TLR8 untuk ligan ssRNA (Baratawidjaya dan Rengganis, 2009).

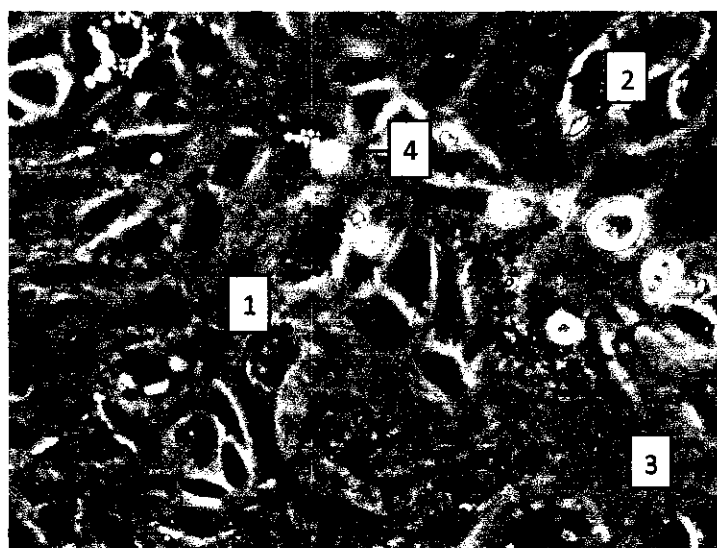
Penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan ekspresi TLR dari hari ke hari setelah imunisasi dengan vaksin *dengue* multivalen, meskipun terjadi penurunan jumlah TLR pada hari ke-21, yaitu seminggu setelah dilakukan booster, namun jumlah TLR meningkat lagi pada hari ke-28. TLR diduga merupakan reseptor terpenting. TLR terutama ditemukan pada makrofag, sel dendrit, neutrofilik, eosinofil, sel epitel, dan keratinosit. Aktivasi TLR terbanyak memacu mediator yang berperan dalam program pengalihan sel Th kearah respons Th1 nonatopik. Makrofag dapat diaktifkan oleh sinyal dari TLR (Baratawidjaya dan Rengganis, 2009). Peningkatan jumlah TLR dapat mengaktifasi makrofag lebih efektif dalam mengenal dan menangkap antigen, mengolah dan selanjutnya mempresentasikannya ke sel T. Reseptor untuk komponen patogen virus memberikan sinyal transduksi melalui TLR dan reseptor untuk IFN-gamma (sitokin makrofag terpenting). Sinyal TLR mengaktifkan respon imun non-spesifik, merangsang produksi faktor transkripsi yang menghasilkan produksi berbagai protein dan sejumlah sitokin yang berperan dalam sistem imun (Baratawidjaya dan Rengganis, 2009).

6.3. *Serum Neutralization Test* (SNT)

Munculnya CPE merupakan penilaian yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi virus. Karakteristik CPE dapat diamati secara jelas dengan pengamatan yang rutin setiap hari pada kultur sel yang diinfeksi dengan MOI

(<0,1). Virus dianggap berjalan lambat jika CPE muncul setelah 4-5 hari dan dianggap menyebar cepat jika CPE muncul setelah 1-2 hari post infeksi pada kultur. Kontrol sel negatif harus selalu ada untuk membedakan perubahan sel normal dengan *cytopathic effect* (Knipes *et al.*, 2001).

CPE mulai terlihat 36 jam post infeksi (<2 hari) pada kontrol positif. Sel yang terinfeksi membengkak dan dapat terdefinisi. Sel membulat, membentuk syncytia, sel giant, dan sel yang mengelompok juga dapat diamati. Sel tersebut menunjukkan granularitas dan mengalami derajat penyusutan yang berubah-ubah, memperlihatkan foci yang membulat dan sel refraktif. Foci ini secara cepat membesar dan akhirnya pecah, kemudian sel akan mengelupas dari permukaan well dan mengapung bebas pada media kultur sel (Meenambigai *et al.*, 2006).



Gambar 6.1. Karakteristik CPE (1) Sel membulat; (2) sel giant; (3) foci yang melebar; (4) sel terlepas dan melayang

Sampel sel vero pada penelitian ini menunjukkan sensitifitas yang rendah terhadap infeksi *dengue*, yaitu pada P1 (dosis 0,5 cc) untuk pengenceran antibodi 1:32, 1:64, dan 1:128, sebanyak 20% sampel memperlihatkan CPE pada hari ke-5

post infeksi, selebihnya hingga hari ke-5 belum ada yang membentuk CPE, sedangkan pada pengenceran antibodi 1:256 sebanyak 30% memperlihatkan CPE (tabel 5.4). Bila dibandingkan dengan P2 (dosis 0,3cc), untuk pengenceran 1:32 (20%), 1:64 (50%), 1:128 (50%) pada hari ke-4 sudah menunjukkan CPE, dan 1:256 (70%) pada hari ke-4 sudah menunjukkan CPE (tabel 5.5).

Uji netralisasi dimaksudkan untuk melihat netralisasi antibodi hasil imunisasi terhadap virus *dengue*. Prosentase CPE pada uji netralisasi berbanding terbalik dengan daya netralisasi. Semakin rendah prosentase terbentuknya CPE, semakin tinggi daya netralisasinya. Prosentase di atas menunjukkan bahwa kelompok P1 lebih mampu menetralsasi dibandingkan dengan P2. Hal ini membuktikan bahwa pemberian vaksin *dengue* multivalen dengan dosis 0,5 cc dapat menghasilkan antibodi yang mampu menetralsasi virus *dengue*. Pemberian dosis 0,3 cc hanya mampu menetralsasi pada pengenceran 1:32.

6.4. Pembuktian dengan PCR

Setelah mengetahui hasil uji netralisasi, sebagai pembuktian tidak terinfeksi sel oleh virus maka dikonfirmasi dengan PCR. Sampel PCR yang diuji adalah A4-28 (kelinci kelompok P1 (dosis 0,5cc) yang serumnya diambil pada hari ke-28). Pemilihan sampel berdasarkan uji netralisasi yang menunjukkan CPE negatif, dengan kata lain hasil SNT positif pada semua pengenceran antibodi hingga hari ke-5 post infeksi.

PCR menunjukkan hasil negatif, karena tidak ada band yang terlihat pada masing-masing pengenceran. Hal ini berarti bahwa sel vero yang di infeksi

dengan antibodi-antigen mengalami netralisasi. Vaksin multivalen dengan dosis 0,5 cc dapat menghasilkan antibodi yang mampu menetralkan virus *dengue*. Berdasarkan uji netralisasi dan PCR, maka vaksin *dengue* multivalen dengan dosis 0,5 cc terbukti mampu menetralkan keempat strain virus *dengue*.

6.5. Vaksin dapat Melakukan Mediasi Perlindungan

Pengontrolan/pengurangan penyakit membutuhkan induksi kekebalan proteksi dalam proporsi yang cukup dari suatu populasi. Hal ini dapat terwujud melalui program imunisasi yang dapat mempengaruhi proteksi jangka panjang, atau tanda kekebalan adaptif yang sangat kontras namun dapat menimbulkan respon kebal berjangka pendek. Kekebalan jangka panjang terbentuk dari pemeliharaan efektor antigen-imun yang spesifik dan atau dengan induksi sel-sel imun yang memang cukup efisien dan secara berulang mengaktifkan efektor imun dalam hal *pathogen exposure*. Induksi vaksin dari efektor imun adalah antibodi utama yang diproduksi limfosit B dan secara spesifik mampu mengikat toksin/patogen. Efektor lain yang potensial adalah sel T CD8⁺ yang mampu membatasi penyebaran agen-agen menular, mengenali dan mematikan sel-sel yang terinfeksi/sitokin spesifik antiviral yang tersembunyi. Penggenerasian dan pemeliharaan respon B dan sel T CD8⁺ didukung oleh faktor pertumbuhan dan tanda-tanda yang diberikan limfosit sel T helper (Th) yang biasanya terbagi menjadi Th1 dan Th2. Efektor-efektor ini dikontrol oleh sel Tregulator (Treg) yang terlibat dalam proses pemeliharaan toleransi imun. Kebanyakan antigen dan vaksin memicu kedua respon sel B dan sel T, seperti tidak adanya dasar pemikiran

perentangan produksi antibodi (imunitas humoral) dan respon sel T (imunitas selular). Sebagai tambahan, sel T CD4+ dibutuhkan untuk kebanyakan respon antibodi, sementara antibodi berpengaruh signifikan pada respon sel T terhadap intraselular pathogen (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Berdasarkan studi literatur dan penelitian tentang vaksin yang telah disebutkan sebelumnya, protein struktural mempunyai peranan penting dalam induksi antibodi netralisasi terhadap infeksi virus *dengue*. Hal ini terbukti dengan indeks infektifitas virus secara *invitro* dengan cara mereaksikan antigen dan antibodi menunjukkan hasil yang signifikan. Terutama ditunjukkan oleh protein E kemudian protein prM dan disusul dengan protein C, sedang protein nonstruktural (NS1, NS3) relatif lebih rendah jika dibandingkan dengan protein structural (Rantam dkk., 2003). Protein E sangat penting untuk dikembangkan menjadi model vaksin *dengue* untuk semua serotipe. Terlebih lagi bila protein E dari keempat tipe virus *dengue* dipakai untuk pembuatan vaksin *dengue* multivalen.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

- (1) Vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc dan 0,3 cc dapat meningkatkan nilai OD pada kelinci *White new zealand*.
- (2) Vaksin *dengue* multivalen 0,5 cc dan 0,3 cc dapat meningkatkan aktivitas sel TLR, sel T CD4+, dan sel T CD8+ pada kelinci *White new zealand*.
- (3) Vaksin *Dengue* multivalen 0,5 cc dapat menginduksi antibodi netralisasi lebih baik daripada vaksin *dengue* multivalen 0,3 cc.

7.2 Saran

- (1) Perlu dilakukan uji *challenge* pada hewan coba dengan menggunakan virus *dengue* yang lebih ganas untuk mengetahui daya protektivitas antibodi.
- (2) Perlu ditelaah lebih detail mengenai *cut of value* untuk mengetahui titer antibodi yang protektif.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 2003. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Philadelphia: Saunders, pp 314-316.
- Amexis G, Young NS, 2007. Multiple antigenic peptides as vaccine platform for the induction of humoral responses against dengue-2 virus. *Viral Immunol* 20: 65746.
- Andreas, 2000. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol* 71: 4226-4232.
- Aryati, Probahoedodo Y, 2001. Manfaat test dengue stick Ig M dan Ig G pada demam berdarah dengue. Seminar Penatalaksanaan Demam Berdarah Dengue 2001. TDC Unair, hlm 62-68.
- Aryati, 2006. Epidemiologi molekuler virus dengue di Indonesia. Disertasi, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Aryati, Soetjipto, Hariadhi S, Rantam FA, Soegijanto S, 2006. Profil serotipe virus dengue di Indonesia tahun 2003-2005. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia (MKTI)*, Maret 17(1): 72-80.
- Bamford DH, Mindich L, 1980. Electron microscopy of cells infected with nonsense mutants of bacteriophage. *Virology* 107: 222-8.
- Baratawidjaja KG, Rengganis I, 2009. *Imunologi dasar*, 8th ed. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hlm 27-197.
- Brinton MA, Kurane I, Mathew A, 1998. Immune mediated and inherited defences against flaviviruses. *Clin Diagn Virol* 10(2-3): 129-139.
- Chen Y, Maguire T, Marks RM, 1996. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *American Society for Microbiology. J Virol* vol 70, no. 12, pp 8765-8772.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 1997, 3: 866-71.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2003. Pencegahan dan penanggulangan penyakit demam dengue dan demam berdarah dengue. Kerjasama WHO dan Dep.Kes. RI Jakarta.

- Knipes DM, Samuel CE, Palese P, 2001. Virus-host cell interactions. In (Knipes DM, Howley PM, ed). *Fields virology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, pp 134-136.
- Kuntarjanto, 1998. Epidemiologi dan penanggulangan penyakit demam berdarah dengue di Jawa Timur tahun 1993 s.d 1997. Seminar DBD. TDC Unair. 19 Sep, hlm 23-28.
- Kurane I, Ennis FA, 1992. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Seminar in Immunology* 4, pp 121-127.
- Kurane I, Rothman AL, Livingstone PG, Green S, Gagnon SJ, Janus J, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Ennis FA, 1994. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrom. *Arch Virol [Suppl]* 9: 59-64.
- Kusriningrum, 2008. Rancangan percobaan. Surabaya: Airlangga University Press, hlm 45-55.
- Lawuyan S, 1996. DBD di kotamadya Surabaya. Diajukan pada seminar sehari DBD di TDRK FK Unair Surabaya, 28 Oktober.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R, 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of Virology* 73(6): 4738-4747.
- Liu CC, Lei, Yeh, 2008. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* 8: 377-388.
- Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL, 2004. Dengue viral infection. *Med J* 80: 588.
- Massi MN, Sabran AA, 2004. Teknik identifikasi serotipe virus dengue (Den 1-4) dengan uji reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). *Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin*, hlm 1-6.
- Meenambigai TV, Prabhakar TG, Govindarajan R, Nachimuthu K, Koteeswaran A, 2006. A comparative study of the inclusion bodies in BHK 21 and vero cells infected with blue tongue virus. *Tamilnadu J Vet and Animal Sci* 2(6): 248-250.
- Morens DM, 1994. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* 19: 500-12.
- Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane L, 2010. Discrepancy in dengue virus neutralizing antibody titers between plaque reduction neutralizing test

- with Fc γ receptor (FC γ R)-negative and FC γ R-expressing BHK-21 cells. *Clin Vaccine Immunol*, March 17(3): 402-407.
- Nash, 1996. Immunity to virus. In (Roitt R, Brostoff, Male D). *Immunology* 3rd ed. London: Mosby Co, 16.1-16.6.
- Noisakran S, Perng GC, 2008. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF) / Dengue Shock Syndrome (DSS). In *Dengue Virus Infection. Exp Biol Med* 233: 401-408.
- O'Hanley P, Jennings GB, Larasati R, Diegagunarsa S, Pudjoprawoto N, Ma'roef C, Punjabi N, Wulur H, Samsi TK, 1992. Potential pathogenesis roles of acute inflammatory cytokines and HLA status in DHF. *Cermin Dunia Kedokteran*, edisi khusus, hlm 81:71.
- Porterfield LS, 1986. Antibody-dependent enhancement of viral infectivity. *Advances in Virus Research* 31: 335-355.
- Putnak R, Fuller A, Vanderzanden L, 2003. Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with plasmid DNA vaccine encoding the viral prM and E genes. *Am J Trop Med Hyg* 68(4): 469-476.
- Putnak R, Collier BA, Voss G, 2005. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine* 23(35): 4442-4452.
- Rantam FA, 1998. Aspek virologi demam berdarah dengue. Seminar DBD. TDC Unair, hlm 23-38.
- Rantam FA, Soetjipto, Dachlan YP, 1999. Envelope (E) protein is one alternative of a new generation of vaccine of dengue virus. In *Proceeding of International Seminar on Dengue Fever*, pp 139-144.
- Rantam FA, Soetjipto, Sudiana IK, 2000. Model pembakuan protein E rekombinan virus dengue dengan baculovirus sebagai kandidat vaksin klon subunit isolat Indonesia. Laporan Pelaksanaan RUT VII tahun 2000. Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi. Dewan Riset Nasional, hlm 30-54.
- Rantam FA, Soetjipto, Suwarno, 2001. Karakterisasi protein antigenik dan imunogenik virus dengue isolat Indonesia sebagai bahan vaksin subunit. Laporan Hibah Bersaing tahun 2001, Direktorat Pendidikan Nasional, hlm 12-24.
- Rantam FA, 2003. Metode imunologi. Surabaya: Airlangga University Press, hlm 65-98.

- Rantam FA, 2005. Virologi. Surabaya: Airlangga University Press, hlm 203-214.
- Rice CM, 1996. Flaviviridae: The viruses and their replication. Field Virology, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, pp 931-954.
- Rodhain F, 1996. The situation of dengue in the world. Bull Soc Pathol Exot 89: 87-90.
- Roitt L, Brostoff J, Male D, 2001. Immunology, 6th ed. St Louis: Mosby, pp 16.1-16.8.
- Salamun, 1998. Aspek entomologi demam berdarah dengue. Seminar DBD. TDC Unair, hlm 39-50.
- Sim ACN, Lin W, Tan GKX, Sim MST, Chow VTK, Alonso S, 2008. Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type-2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. Vaccine 26(9): 1145-54.
- Sjahrurachman A, 1994. Flavivirus. Dalam : Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Soedarmo, 1995. Demam berdarah dengue. Medika 10(XXI): 456-460.
- Soegijanto S, 1998. Penatalaksanaan dan sistem rujukan penderita demam berdarah dengue pada anak. Seminar DBD. Surabaya: TDC Unair, 19 Sep, hlm 67-68.
- Soegijanto S, 2000. Pola klinis setiap serotipe virus dengue. Seminar Demam Berdarah Dengue. Surabaya: TDC Unair, hlm 32-41.
- Soegijanto S, 2001. Prospek pemanfaatan vaksin dengue untuk menurunkan prevalensi di masyarakat. Dipresentasikan pada Peringatan 90 tahun Pendidikan Dokter di FK Unair Surabaya.
- Soegijanto S, 2004. Demam berdarah dengue, tinjauan dan temuan baru di era 2003, cetakan I. Surabaya: Airlangga University Press, hlm 1-10.
- Soewondo ES, Nasronudin, Suharto, Hadi U, 2001. Tata laksana demam berdarah dengue pada orang dewasa. Seminar DBD. Surabaya: TDC Unair, 12 Mei, hlm 27-44.
- Stites DP, Terr AI, Parslow TG, 1977. Medical immunology, 9th ed. London : Prentice Hall International Inc, pp 280.


- Sumarmo, 2005. Dengue haemorrhagic fever in Indonesia. *South East Asian J Trop Med Public* 18(3): 45-51.
- Suroso, 2004. Viremia dan respon antibodi. Informasi produk panbio dengue duo Ig M dan Ig G rapid strip test, hlm 11.
- Sustini F, Wirahjanto A, 2001. Epidemiologi dan dampak ekonomi akibat sakit demam berdarah dengue. Seminar DBD. Surabaya: TDC Unair, 12 Mei, hlm 1-11.
- Suwarno, Rantam FA, Prijatna Y, 2001. Identifikasi karakter protein PRM virus dengue-3 isolat Surabaya sebagai bahan diagnostik. Ditjen Dikti Depdiknas Universitas Airlangga tahun 2001. Surabaya: Tropical Disease Centre, hlm 23-35.
- Teo KF, Wright PJ, 1997. Internal proteolysis of NS3 protein specified by dengue virus 2. *J Gen Virol* 78: 337-341.
- Tirado G, Flores K, Gonzales B. 1999. Emergence of dengue hemorrhagic fever in Americas. Reemergence of dengue. *Rev Cubana Med Trop* 51(1): 5-13.
- Tizzard I, 1982. Pengantar imunologi veteriner, edisi kedua. Penerjemah S Hardjosworo. Surabaya: Airlangga University Press, hlm 44-47.
- Umaar AL, 1999. Epidemiologi dan penanggulangan penyakit DBD di Indonesia saat ini. Naskah Lengkap Pelatihan. Jakarta: Badan Penerbit FKUI.
- Vaughn DW, 2000. Invited commentary: dengue lessons from Cuba. *Am J Epidemiol* 152(9): 800-803.
- Widiyatno WV, 2003. Respon imun humoral dan seluler pada kelinci yang diimunisasi protein E virus dengue. Tesis, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Wimmer E, 1994. Introduction in cellular receptors for animal viruses. Cold New York: Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp 1-13.
- World Health Organization, 1998. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control, 2nd ed, pp 12-47.

LAMPIRAN

Lampiran 1 : Nilai OD antibodi berdasarkan *indirect* ELISA pada kelinci *White new zealand* setelah imunisasi dengan vaksin *dengue* multivalen

Hari	0	7	14	21	28
Perlakuan P1 (0,5 cc)	-0,001	0,96	0,979	1,23	1,1
	0,012	0,945	1,046	1,161	1,255
	0,004	0,472	1,103	1,149	1,125
	0,01	0,264	1,016	1,232	1,176
	0,024	0,801	1,114	1,211	1,174
	-0,004	0,224	1,235	1,01	0,926
P2 (0,3 cc)	-0,014	0,919	1,044	1,141	0,99
	-0,012	0,916	0,774	1,137	1,161
	0,044	1,151	1,084	1,036	1,223
	0,021	1,032	1,042	1,178	1,192
	0,005	0,366	1,16	1,224	1,037
	0,003	0,689	1,071	1,163	1,116
P0 (PBS)	0,007	0,009	0,084	0,025	0,093
	0,002	0,02	0,017	0,035	0,082
	0,001	0,05	0,045	0,062	0,074
	-0,003	0,193	0,025	0,048	0,064
	0,011	0,032	0,078	0,082	0,099
	0,003	0,036	0,018	0,055	0,026

Keterangan:

 : sampel yang menunjukkan hasil ELISA positif berdasarkan COV

Lampiran 2 : Hasil perbandingan respon imun seluler *peripheral blood mononuclear cell* terhadap vaksin *dengue* multivalen pada kelinci *White new zealand*

Hasil Penelitian Kadar TLR

PERBANDINGAN RESPON IMUN SELULER *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
TERHADAP VAKSIN *DENGUE* MULTIVALEN PADA KELINCI

Perlakuan Ulangan	P1			P2			P0		
	Hari ke-0	37	49	42	43	30	38	32	41
Hari ke-7	98	108	93	105	99	85	37	44	32
Hari ke-14	165	189	182	147	149	182	35	36	33
Hari ke-21	160	176	155	120	92	168	31	37	30
Hari ke-28	183	198	235	128	139	191	39	40	35

Hasil Penelitian Kadar CD4+

PERBANDINGAN RESPON IMUN SELULER *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
TERHADAP VAKSIN *DENGUE* MULTIVALEN PADA KELINCI

Perlakuan Ulangan	P1		P2		P0	
	Hari ke-7	139	142	106	94	68
Hari ke-14	141	139	126	119	65	59
Hari ke-21	158	203	155	198	69	54
Hari ke-28	289	302	215	229	61	57

Hasil Penelitian Kadar CD8+

PERBANDINGAN RESPON IMUN SELULER *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
TERHADAP VAKSIN *DENGUE* MULTIVALEN PADA KELINCI

Perlakuan Ulangan	P1		P2		P0	
	Hari ke-7	201	233	145	157	113
Hari ke-14	264	254	197	206	108	116
Hari ke-21	321	332	298	277	119	121
Hari ke-28	379	354	321	306	114	118

Lampiran 3. Daftar reagen

1. Sigma-Aldrich Histopaque-1077
Densitas $1,077 \pm 0,001$, Lot No. 038K6170
S. Ald Chemie GmbH P.O 1120, 89552 Steinheim, Germany 49-7329-970
2. *p*NPP Microwell Substrate Tablets (KPL) Catalog No. 50-80-01
contains 100 (5mg) tablets of *p*-Nitrophenylphosphatase (*p*-NPP)
Gaithersburg, Maryland, 20879-4174 USA, www.kpl.com
3. SIGMA Anti-Rabbit Ig (whole molecule)
Alkaline Phosphatase Conjugate, Product No. A 9919
Saint Louis, Missouri 63103 USA
4. Monoclonal mouse anti-human CD4/FITC clone MT310
for Flow Cytometry, Code No. F0766
5. Monoclonal mouse anti-human CD8/FITC clone DK25
for Flow Cytometry, Code No. F0765
6. Monoclonal mouse anti-human TLR/FITC clone TR19
for Flow Cytometry, Code No. F0768
7. Autoclavable Tissue Culture Medium Powdered
with Kanamycin without Sodium Bicarbonate L-Glutamine
Eagle's MEM "Nissui" 1 code 05900, Lot No. 591807
Nissui Pharmaceutical co., Ltd. 3-23-, Taito-ku, Tokyo, 110-8736 Japan.
8. Pennicillin-Streptomycin GIBCO – Invitrogen Corporation
Prepared with 10.000 units/ml pennicillin sodium and 10.000 $\mu\text{g/ml}$
streptomycin sulfat in 0,85% saline, Catalog No. 15140-148, Lot no. 6221
9. SIGMA Fetal Bovine Serum, Catalog No. 45-12306C
Ald Chemie GmbH P.O 1120, 89552 Steinheim, Germany 49-7329-970
10. Amphotericin B – Biowest
Catalog No. L0009-100, Lot No. S07714L0009
Rue de la Caille – 49340 NUAILLE
11. Trizol Reagent - Invitrogen
Catalog No. 15596-026, Lot No. 51049001
Auckland 1135, New Zealand 64-9-579-3024
12. Buffer 2x reaction mix – Invitrogen
Lot No. 408531
Auckland 1135, New Zealand 64-9-579-3024

13. Enzyme Superscript III RT/Platinum Taq mix – Invitrogen
Lot No. 510875
Auckland 1135, New Zealand 64-9-579-3024

14. Gel Loading 10x Bluecap – Invitrogen
Lot No. 551237
Auckland 1135, New Zealand 64-9-579-3024

Lampiran 4. Ekstraksi RNA

1. Tambahkan Trizol Reagen sebanyak 1ml ke dalam tube yang berisi sel
2. Resuspensi/kocok dengan tangan selama 15 detik
3. Inkubasi 5 menit di suhu ruang
4. Tambahkan 200 μ l chloroform
5. Resuspensi/kocok dengan tangan selama 15 detik
6. Inkubasi 2-3 detik di suhu ruang
7. Sentrifuge 12.000rpm 4°C selama 15 menit
8. Pindahkan supernatan yang berwarna jernih ke dalam tube baru
9. Tambahkan isopropyl alkohol sebanyak 500 μ l
10. Resuspensi/kocok dengan tangan selama 15 detik
11. Inkubasi selama 10 menit di suhu ruang
12. Sentrifuge selama 12.000 rpm 4°C selama 10 menit,
13. Buang supernatan
14. Cuci pellet dengan 1ml ethanol 75%
15. Vortex dan sentrifuge 9000 rpm 4°C selama 5 menit
16. Keringkan RNA selama 5-10 menit
17. Tambahkan RNase Free Water 10-20
18. Simpan di -80°C/langsung di PCR μ l

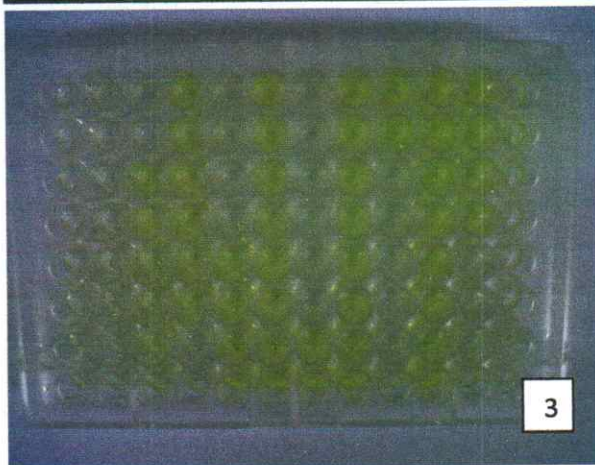
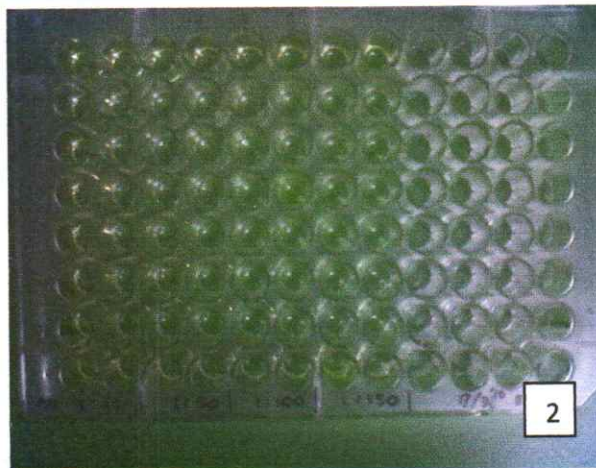
Lampiran 5. Dokumentasi Kegiatan Penelitian



Keterangan :

- (1) Kandang hewan coba Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- (2) Kelinci *White new zealand*
- (3) Pengambilan darah melalui vena pada telinga kelinci

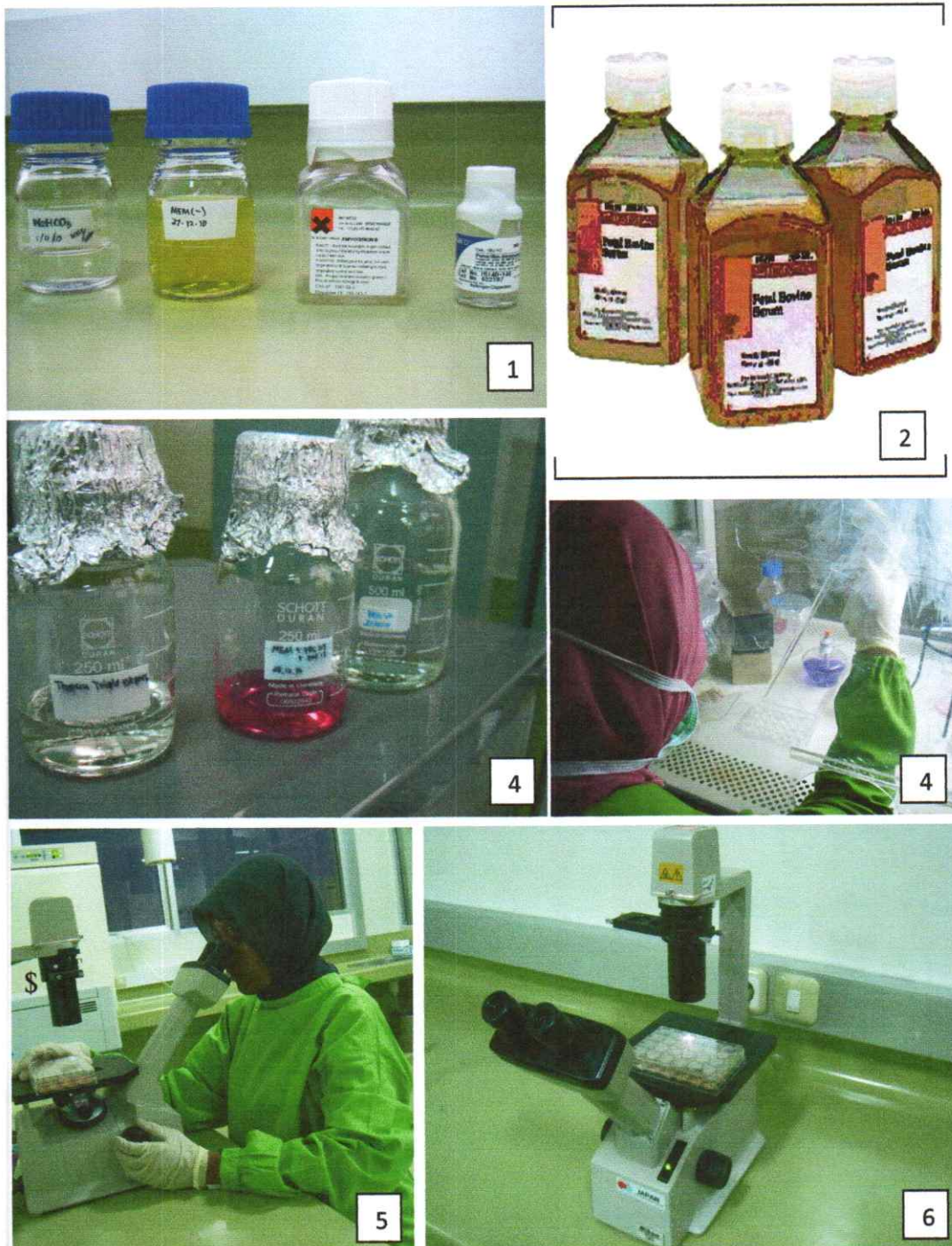
Lanjutan lampiran 5.



Keterangan :

- (1) Buffer coating dan buffer washing
- (2) Plate hasil Chequer Board, warna kuning menunjukkan pengenceran terkecil yang menunjukkan hasil positif (Ag = 1:100; Ab = 1:64)
- (3) Plate hasil Elisa, warna kuning menunjukkan titer tinggi
- (4) Elisa reader

Lanjutan lampiran 5.

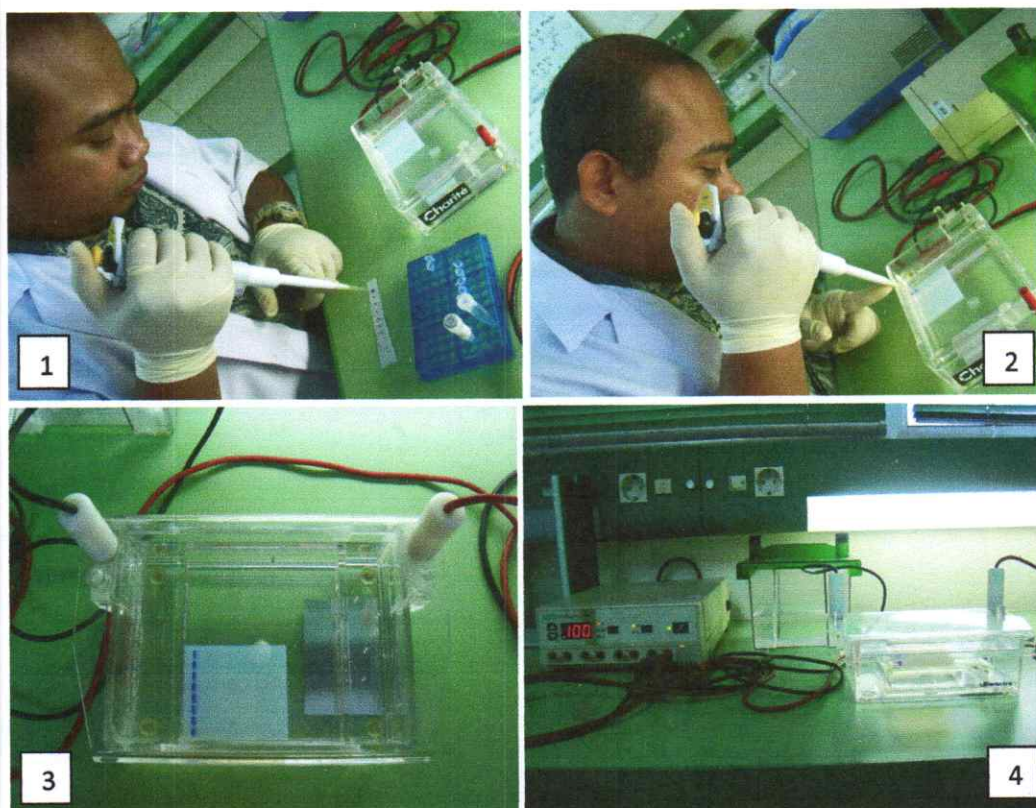


Keterangan : (1) Bahan untuk membuat media kultur sel (MEM+) dari kiri : NaHCO_3 , MEM (-), Amphoterin, Pennicillin dan Streptomycin; (2) Fetal Bovine Serum (FBS); (3) Bahan untuk splitting, dari kiri : Trypsin, MEM (+), PBS steril 1x; (4) Kultur sel vero pada plate 24 well; (5) Pengamatan CPE tiap 12 jam sekali; (6) Mikroskop

Lanjutan lampiran 5.



Keterangan : Langkah PCR; (1) Ekstraksi RNA; (2) Bahan untuk ekstraksi RNA; dari kiri : Trizol, Chloroform, Isopropanol, Ethanol 70% (3) Mix RNA dengan reagen invitrogen One Step RT-PCR dalam tube PCR, kemudian running dalam mesin PCR.



Keterangan : Langkah Elektroforesis; (1) Suspensi PCR mix dengan Bluecap gel loading; (2) Masukkan masing-masing sampel pada lubang agarosa elektroforesis yang tersedia, begitu juga dengan marker; (3&4) Running Elektroforesis 100V, 40 MA, 45 menit.

**Lampiran 6. Univariate Analysis of Variance (ANOVA) Respon Imun Humoral
Kelinci *White new zealand* Pasca Imunisasi dengan Vaksin Dengue
Multivalen**

**Univariate Analysis of Variance
Between-Subjects Factors**

	Value Label	N	
Waktu Pengambilan Serum	1,000	hari ke-0	18
	2,000	hari ke-7	18
	3,000	hari ke-14	18
	4,000	hari ke-21	18
	5,000	hari ke-28	18
Perlakuan	1,000	P1 (0,5 cc)	30
	2,000	P2 (0,3 cc)	30
	3,000	P0	30
		(kontrol/ PBS)	

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Ig

Waktu Pengambilan	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
hari ke-0	P1 (0,5 cc)	,00750	,010154	6
	P2 (0,3 cc)	,00783	,021830	6
	P0 (kontrol/PBS)	,00350	,004889	6
	Total	,00628	,013477	18
hari ke-7	P1 (0,5 cc)	,61100	,334352	6
	P2 (0,3 cc)	,84550	,280320	6
	P0 (kontrol/PBS)	,05667	,068240	6
	Total	,50439	,416159	18
hari ke-14	P1 (0,5 cc)	1,08217	,090703	6
	P2 (0,3 cc)	1,02917	,132188	6
	P0 (kontrol/PBS)	,04450	,030072	6
	Total	,71861	,498898	18
hari ke-21	P1 (0,5 cc)	1,16550	,083816	6
	P2 (0,3 cc)	1,14650	,062612	6
	P0 (kontrol/PBS)	,05117	,020193	6
	Total	,78772	,539088	18
hari ke-28	P1 (0,5 cc)	1,12600	,111465	6
	P2 (0,3 cc)	1,11983	,090861	6
	P0 (kontrol/PBS)	,07300	,026260	6
	Total	,77294	,515425	18
Total	P1 (0,5 cc)	,79843	,476964	30
	P2 (0,3 cc)	,82977	,452723	30
	P0 (kontrol/PBS)	,04577	,041305	30
	Total	,55799	,523730	90

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ig

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	23,137 ^a	14	1,653	97,231	,000
Intercept	28,022	1	28,022	1648,598	,000
VAR00002	7,777	4	1,944	114,382	,000
VAR00001	11,821	2	5,911	347,746	,000
VAR00002 *	3,539	8	,442	26,027	,000
VAR00001					
Error	1,275	75	,017		
Total	52,434	90			
Corrected Total	24,412	89			

a. R Squared = ,948 (Adjusted R Squared = ,938)

Post Hoc Tests
Waktu Pengambilan Serum

Ig

Duncan^{a,b}

Waktu Pengambilan Serum	N	Subset		
		1	2	3
hari ke-0	18	,00628		
hari ke-7	18		,50439	
hari ke-14	18			,71861
hari ke-28	18			,77294
hari ke-21	18			,78772
Sig.		1,000	1,000	,138

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,017.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

b. Alpha = ,05.

Perlakuan

Ig

Duncan^{a,b}

Perlakuan	N	Subset	
		1	2
P0 (kontrol/PBS)	30	,04577	
P1 (0,5 cc)	30		,79843
P2 (0,3 cc)	30		,82977
Sig.		1,000	,355

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,017.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30,000.

b. Alpha = ,05.

TLR Hari ke-0

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	3	42,6667	6,02771	3,48010	27,6930	57,6403
0,3 cc	3	37,0000	6,55744	3,78594	20,7104	53,2896
Kontrol	3	35,6667	4,72582	2,72845	23,9271	47,4062
Total	9	38,4444	5,98145	1,99382	33,8467	43,0422

Descriptives

TLR Hari ke-0

	Minimum	Maximum
0,5 cc	37,00	49,00
0,3 cc	30,00	43,00
Kontrol	32,00	41,00
Total	30,00	49,00

ANOVA

TLR Hari ke-0

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	82,889	2	41,444	1,223	,359
Within Groups	203,333	6	33,889		
Total	286,222	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TLR Hari ke-0

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	5,66667	4,75317	,499	-8,9174	20,2507
	Kontrol	7,00000	4,75317	,367	-7,5840	21,5840
0,3 cc	0,5 cc	-5,66667	4,75317	,499	-20,2507	8,9174
	Kontrol	1,33333	4,75317	,958	-13,2507	15,9174
Kontrol	0,5 cc	-7,00000	4,75317	,367	-21,5840	7,5840
	0,3 cc	-1,33333	4,75317	,958	-15,9174	13,2507

Homogeneous Subsets

TLR Hari ke-0

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05
		1
Kontrol	3	35,6667
0,3 cc	3	37,0000
0,5 cc	3	42,6667
Sig.		,367

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Oneway

Descriptives

TLR hari ke-7

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	3	99,6667	7,63763	4,40959	80,6938	118,6396
0,3 cc	3	96,3333	10,26320	5,92546	70,8381	121,8285
Kontrol	3	37,6667	6,02771	3,48010	22,6930	52,6403
Total	9	77,8889	31,01792	10,33931	54,0464	101,7314

Descriptives

TLR hari ke-7

	Minimum	Maximum
0,5 cc	93,00	108,00
0,3 cc	85,00	105,00
Kontrol	32,00	44,00
Total	32,00	108,00

ANOVA

TLR hari ke-7

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7296,889	2	3648,444	54,727	,000
Within Groups	400,000	6	66,667		
Total	7696,889	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TLR hari ke-7

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	3,33333	6,66667	,874	-17,1218	23,7885
	Kontrol	62,00000*	6,66667	,000	41,5448	82,4552
0,3 cc	0,5 cc	-3,33333	6,66667	,874	-23,7885	17,1218
	Kontrol	58,66667*	6,66667	,000	38,2115	79,1218
Kontrol	0,5 cc	-62,00000*	6,66667	,000	-82,4552	-41,5448
	0,3 cc	-58,66667*	6,66667	,000	-79,1218	-38,2115

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

Homogeneous Subsets

TLR hari ke-7

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kontrol	3	37,6667	
0,3 cc	3		96,3333
0,5 cc	3		99,6667
Sig.		1,000	,874

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Descriptives

TLR hari ke-14

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	3	178,6667	12,34234	7,12585	148,0066	209,3267
0,3 cc	3	159,3333	19,65536	11,34803	110,5067	208,1600
Kontrol	3	34,6667	1,52753	,88192	30,8721	38,4612
Total	9	124,2222	68,67819	22,89273	71,4315	177,0130

Descriptives

TLR hari ke-14

	Minimum	Maximum
0,5 cc	165,00	189,00
0,3 cc	147,00	182,00
Kontrol	33,00	36,00
Total	33,00	189,00

ANOVA

TLR hari ke-14

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36651,556	2	18325,778	101,622	,000
Within Groups	1082,000	6	180,333		
Total	37733,556	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TLR hari ke-14

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	19,33333	10,96459	,259	-14,3090	52,9757
	Kontrol	144,00000*	10,96459	,000	110,3576	177,6424
0,3 cc	0,5 cc	-19,33333	10,96459	,259	-52,9757	14,3090
	Kontrol	124,66667*	10,96459	,000	91,0243	158,3090
Kontrol	0,5 cc	-144,00000*	10,96459	,000	-177,6424	-110,3576
	0,3 cc	-124,66667*	10,96459	,000	-158,3090	-91,0243

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

Homogeneous Subsets

TLR hari ke-14

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kontrol	3	34,6667	
0,3 cc	3		159,3333
0,5 cc	3		178,6667
Sig.		1,000	,259

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Oneway

93

Descriptives

TLR hari ke-21

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	3	163,6667	10,96966	6,33333	136,4165	190,9168
0,3 cc	3	126,6667	38,43609	22,19109	31,1861	222,1472
Kontrol	3	32,6667	3,78594	2,18581	23,2619	42,0715
Total	9	107,6667	61,83648	20,61216	60,1349	155,1984

Descriptives

TLR hari ke-21

	Minimum	Maximum
0,5 cc	155,00	176,00
0,3 cc	92,00	168,00
Kontrol	30,00	37,00
Total	30,00	176,00

ANOVA

TLR hari ke-21

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27366,000	2	13683,000	25,465	,001
Within Groups	3224,000	6	537,333		
Total	30590,000	8			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: TLR hari ke-21

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	37,00000	18,92676	,204	-21,0725	95,0725
	Kontrol	131,00000*	18,92676	,001	72,9275	189,0725
0,3 cc	0,5 cc	-37,00000	18,92676	,204	-95,0725	21,0725
	Kontrol	94,00000*	18,92676	,006	35,9275	152,0725
Kontrol	0,5 cc	-131,00000*	18,92676	,001	-189,0725	-72,9275
	0,3 cc	-94,00000*	18,92676	,006	-152,0725	-35,9275

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

Homogeneous Subsets

TLR hari ke-21

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kontrol	3	32,6667	
0,3 cc	3		126,6667
0,5 cc	3		163,6667
Sig.		1,000	,204

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Oneway

Descriptives

TLR hari ke-28

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	3	205,3333	26,76440	15,45244	138,8469	271,8198
0,3 cc	3	152,6667	33,65016	19,42793	69,0750	236,2583
Kontrol	3	38,0000	2,64575	1,52753	31,4276	44,5724
Total	9	132,0000	77,16379	25,72126	72,6867	191,3133

Descriptives

TLR hari ke-28

	Minimum	Maximum
0,5 cc	183,00	235,00
0,3 cc	128,00	191,00
Kontrol	35,00	40,00
Total	35,00	235,00

ANOVA

TLR hari ke-28

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	43922,667	2	21961,333	35,504	,000
Within Groups	3711,333	6	618,556		
Total	47634,000	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TLR hari ke-28

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	52,66667	20,30690	,091	-9,6405	114,9738
	Kontrol	167,33333*	20,30690	,000	105,0262	229,6405
0,3 cc	0,5 cc	-52,66667	20,30690	,091	-114,9738	9,6405
	Kontrol	114,66667*	20,30690	,003	52,3595	176,9738
Kontrol	0,5 cc	-167,33333*	20,30690	,000	-229,6405	-105,0262
	0,3 cc	-114,66667*	20,30690	,003	-176,9738	-52,3595

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

Homogeneous Subsets

TLR hari ke-28

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kontrol	3	38,0000	
0,3 cc	3		152,6667
0,5 cc	3		205,3333
Sig.		1,000	,091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

CD4+ hari ke-7

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	2	120,0000	11,31371	8,00000	18,3504	221,6496
0,3 cc	2	100,0000	8,48528	6,00000	23,7628	176,2372
Kontrol	2	60,5000	10,60660	7,50000	-34,7965	155,7965
Total	6	93,5000	28,21170	11,51738	63,8936	123,1064

Descriptives

CD4+ hari ke-7

	Minimum	Maximum
0,5 cc	112,00	128,00
0,3 cc	94,00	106,00
Kontrol	53,00	68,00
Total	53,00	128,00

ANOVA

CD4+ hari ke-7

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3667,000	2	1833,500	17,602	,022
Within Groups	312,500	3	104,167		
Total	3979,500	5			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD4+ hari ke-7

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	20,00000	10,20621	,268	-22,6489	62,6489
	Kontrol	59,50000*	10,20621	,020	16,8511	102,1489
0,3 cc	0,5 cc	-20,00000	10,20621	,268	-62,6489	22,6489
	Kontrol	39,50000	10,20621	,061	-3,1489	82,1489
Kontrol	0,5 cc	-59,50000*	10,20621	,020	-102,1489	-16,8511
	0,3 cc	-39,50000	10,20621	,061	-82,1489	3,1489

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

Homogeneous Subsets

CD4+ hari ke-7

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kontrol	2	60,5000	
0,3 cc	2	100,0000	100,0000
0,5 cc	2		120,0000
Sig.		,061	,268

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Descriptives

CD4+ hari ke-14

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	2	140,0000	1,41421	1,00000	127,2938	152,7062
0,3 cc	2	122,5000	4,94975	3,50000	78,0283	166,9717
Kontrol	2	62,0000	4,24264	3,00000	23,8814	100,1186
Total	6	108,1667	36,72828	14,99426	69,6227	146,7106

Descriptives

CD4+ hari ke-14

	Minimum	Maximum
0,5 cc	139,00	141,00
0,3 cc	119,00	126,00
Kontrol	59,00	65,00
Total	59,00	141,00

ANOVA

CD4+ hari ke-14

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6700,333	2	3350,167	225,854	,001
Within Groups	44,500	3	14,833		
Total	6744,833	5			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD4+ hari ke-14

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	17,50000*	3,85141	,040	1,4061	33,5939
	Kontrol	78,00000*	3,85141	,001	61,9061	94,0939
0,3 cc	0,5 cc	-17,50000*	3,85141	,040	-33,5939	-1,4061
	Kontrol	60,50000*	3,85141	,001	44,4061	76,5939
Kontrol	0,5 cc	-78,00000*	3,85141	,001	-94,0939	-61,9061
	0,3 cc	-60,50000*	3,85141	,001	-76,5939	-44,4061

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

Homogeneous Subsets

CD4+ hari ke-14

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol	2	62,0000		
0,3 cc	2		122,5000	
0,5 cc	2			140,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Oneway

Descriptives

CD4 hari ke-21

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5	2	180,5000	31,81981	22,50000	-105,3896	466,3896
0,3	2	176,5000	30,40559	21,50000	-96,6834	449,6834
Kontrol	2	61,5000	10,60660	7,50000	-33,7965	156,7965
Total	6	139,5000	63,74559	26,02403	72,6031	206,3969

Descriptives

CD4 hari ke-21

	Minimum	Maximum
0,5	158,00	203,00
0,3	155,00	198,00
Kontrol	54,00	69,00
Total	54,00	203,00

ANOVA

CD4 hari ke-21

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18268,000	2	9134,000	13,370	,032
Within Groups	2049,500	3	683,167		
Total	20317,500	5			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD4 hari ke-21

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5	0,3	4,00000	26,13746	,987	-105,2211	113,2211
	Kontrol	119,00000*	26,13746	,040	9,7789	228,2211
0,3	0,5	-4,00000	26,13746	,987	-113,2211	105,2211
	Kontrol	115,00000*	26,13746	,044	5,7789	224,2211
Kontrol	0,5	-119,00000*	26,13746	,040	-228,2211	-9,7789
	0,3	-115,00000*	26,13746	,044	-224,2211	-5,7789

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

Homogeneous Subsets

CD4 hari ke-21

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kontrol	2	61,5000	
0,3	2		176,5000
0,5	2		180,5000
Sig.		1,000	,987

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Oneway

Descriptives

CD4 hari ke-28

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	2	295,5000	9,19239	6,50000	212,9097	378,0903
0,3 cc	2	222,0000	9,89949	7,00000	133,0566	310,9434
Kontrol	2	59,0000	2,82843	2,00000	33,5876	84,4124
Total	6	192,1667	108,43692	44,26919	78,3691	305,9642

Descriptives

CD4 hari ke-28

	Minimum	Maximum
0,5 cc	289,00	302,00
0,3 cc	215,00	229,00
Kontrol	57,00	61,00
Total	57,00	302,00

ANOVA

CD4 hari ke-28

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	58602,333	2	29301,167	461,436	,000
Within Groups	190,500	3	63,500		
Total	58792,833	5			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD4 hari ke-28

Tukey HSD

(i) Perlakuan	(j) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	73,50000*	7,96869	,006	40,2011	106,7989
	Kontrol	236,50000*	7,96869	,000	203,2011	269,7989
0,3 cc	0,5 cc	-73,50000*	7,96869	,006	-106,7989	-40,2011
	Kontrol	163,00000*	7,96869	,001	129,7011	196,2989
Kontrol	0,5 cc	-236,50000*	7,96869	,000	-269,7989	-203,2011
	0,3 cc	-163,00000*	7,96869	,001	-196,2989	-129,7011

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

Homogeneous Subsets

CD4 hari ke-28

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol	2	59,0000		
0,3 cc	2		222,0000	
0,5 cc	2			295,5000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Lampiran 9. Analysis of Variance (ANOVA) Respon Imun Seluler (CD8) Kelinci *White new Zealand* Pasca Imunisasi dengan Vaksin *Dengue* Multivalen

CD8 hari ke-7

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	2	217,0000	22,62742	16,00000	13,7007	420,2993
0,3 cc	2	151,0000	8,48528	6,00000	74,7628	227,2372
Kontrol	2	109,0000	5,65685	4,00000	58,1752	159,8248
Total	6	159,0000	49,94397	20,38954	106,5870	211,4130

Descriptives

CD8 hari ke-7

	Minimum	Maximum
0,5 cc	201,00	233,00
0,3 cc	145,00	157,00
Kontrol	105,00	113,00
Total	105,00	233,00

ANOVA

CD8 hari ke-7

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11856,000	2	5928,000	28,870	,011
Within Groups	616,000	3	205,333		
Total	12472,000	5			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD8 hari ke-7

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	66,00000*	14,32946	,039	6,1212	125,8788
	Kontrol	108,00000*	14,32946	,010	48,1212	167,8788
0,3 cc	0,5 cc	-66,00000*	14,32946	,039	-125,8788	-6,1212
	Kontrol	42,00000	14,32946	,119	-17,8788	101,8788
Kontrol	0,5 cc	-108,00000*	14,32946	,010	-167,8788	-48,1212
	0,3 cc	-42,00000	14,32946	,119	-101,8788	17,8788

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

Homogeneous Subsets

CD8 hari ke-7

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kontrol	2	109,0000	
0,3 cc	2	151,0000	
0,5 cc	2		217,0000
Sig.		,119	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Descriptives

CD8 hari ke-14

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	2	259,0000	7,07107	5,00000	195,4690	322,5310
0,3 cc	2	201,5000	6,36396	4,50000	144,3221	258,6779
Kontrol	2	112,0000	5,65685	4,00000	61,1752	162,8248
Total	6	190,8333	66,44221	27,12492	121,1065	260,5602

Descriptives

CD8 hari ke-14

	Minimum	Maximum
0,5 cc	254,00	264,00
0,3 cc	197,00	206,00
Kontrol	108,00	116,00
Total	108,00	264,00

ANOVA

CD8 hari ke-14

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21950,333	2	10975,167	268,780	,000
Within Groups	122,500	3	40,833		
Total	22072,833	5			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD8 hari ke-14

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	57,50000*	6,39010	,006	30,7976	84,2024
	Kontrol	147,00000*	6,39010	,000	120,2976	173,7024
0,3 cc	0,5 cc	-57,50000*	6,39010	,006	-84,2024	-30,7976
	Kontrol	89,50000*	6,39010	,002	62,7976	116,2024
Kontrol	0,5 cc	-147,00000*	6,39010	,000	-173,7024	-120,2976
	0,3 cc	-89,50000*	6,39010	,002	-116,2024	-62,7976

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

Homogeneous Subsets

CD8 hari ke-14

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol	2	112,0000		
0,3 cc	2		201,5000	
0,5 cc	2			259,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Descriptives

CD8 hari ke-21

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	2	326,5000	7,77817	5,50000	256,6159	396,3841
0,3 cc	2	287,5000	14,84924	10,50000	154,0849	420,9151
Kontrol	2	120,0000	1,41421	1,00000	107,2938	132,7062
Total	6	244,6667	98,41680	40,17849	141,3846	347,9488

Descriptives

CD8 hari ke-21

	Minimum	Maximum
0,5 cc	321,00	332,00
0,3 cc	277,00	298,00
Kontrol	119,00	121,00
Total	119,00	332,00

ANOVA

CD8 hari ke-21

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	48146,333	2	24073,167	255,193	,000
Within Groups	283,000	3	94,333		
Total	48429,333	5			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD8 hari ke-21

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	39,00000	9,71253	,055	-1,5859	79,5859
	Kontrol	206,50000*	9,71253	,000	165,9141	247,0859
0,3 cc	0,5 cc	-39,00000	9,71253	,055	-79,5859	1,5859
	Kontrol	167,50000*	9,71253	,001	126,9141	208,0859
Kontrol	0,5 cc	-206,50000*	9,71253	,000	-247,0859	-165,9141
	0,3 cc	-167,50000*	9,71253	,001	-208,0859	-126,9141

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

Homogeneous Subsets

CD8 hari ke-21

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kontrol	2	120,0000	
0,3 cc	2		287,5000
0,5 cc	2		326,5000
Sig.		1,000	,055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Descriptives

CD8 hari ke-28

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	2	366,5000	17,67767	12,50000	207,6724	525,3276
0,3 cc	2	313,5000	10,60660	7,50000	218,2035	408,7965
Kontrol	2	116,0000	2,82843	2,00000	90,5876	141,4124
Total	6	265,3333	118,44267	48,35402	141,0354	389,6313

Descriptives

CD8 hari ke-28

	Minimum	Maximum
0,5 cc	354,00	379,00
0,3 cc	306,00	321,00
Kontrol	114,00	118,00
Total	114,00	379,00

ANOVA

CD8 hari ke-28

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	69710,333	2	34855,167	241,491	,000
Within Groups	433,000	3	144,333		
Total	70143,333	5			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CD8 hari ke-28

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0,5 cc	0,3 cc	53,00000*	12,01388	,043	2,7974	103,2026
	Kontrol	250,50000*	12,01388	,000	200,2974	300,7026
0,3 cc	0,5 cc	-53,00000*	12,01388	,043	-103,2026	-2,7974
	Kontrol	197,50000*	12,01388	,001	147,2974	247,7026
Kontrol	0,5 cc	-250,50000*	12,01388	,000	-300,7026	-200,2974
	0,3 cc	-197,50000*	12,01388	,001	-247,7026	-147,2974

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

Homogeneous Subsets

CD8 hari ke-28

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol	2	116,0000		
0,3 cc	2		313,5000	
0,5 cc	2			366,5000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.