

Surabaya, 12 Desember 2005

Wd
Dip. 12/12/05
Wd
d

DISERTASI

DETEKSI ANTIGEN VIRUS DENGUE PADA MONOSIT SEBAGAI SARANA PENUNJANG DIAGNOSIS DINI DEMAM BERDARAH DENGUE

**(Suatu pendekatan baru menggunakan Uji Immunositokimia
dengan streptavidin-biotin)**



Y NINING SRI WURYANINGSIH

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**DETEKSI ANTIGEN VIRUS DENGUE PADA MONOSIT
SEBAGAI SARANA PENUNJANG DIAGNOSIS BINTI
DEMAM BERDARAH DENGUE**

DISERTASI

Untuk mendapatkan Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Jember
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbatas
Pada Hari : Selasa

Tanggal : 31 Mei 2005
Pukul 10.00 WIB

Oleh :

Y NINING SRI WURYANINGSIH
NIM. 400 712 386

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

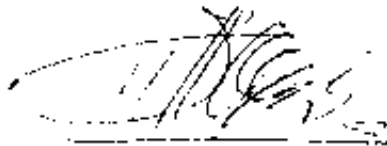
Tanggal 12 Mei 2005

OLEH
PROMOTOR



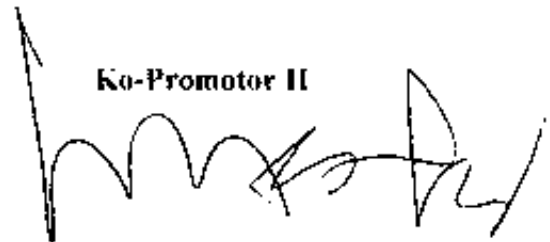
Prof. Eddy Soewandoyo dr SpPD

Ko - Promotor I



Prof. Dr Soegeng Soegiyanto dr SpA(K)

Ko-Promotor II



Prof. H R Wasito DVM MSc PhD

Telah diuji pada

Tanggal . 30 Maret 2005

PANTIA PENGUJI DISERTASI TAHAP I

Ketua **Prof. Dr Marsetio Donoseputro dr Sp PK (K)**

- Anggota :
- 1 **Prof. Edy Swandoyo dr Sp.PD**
 2. **Prof.Dr.Soegeng Sugiyanto dr SpA (K)**
 3. **Prof. H.R.Wasito DVM MSc. Ph.D**
 4. **Dr. Widodo J. Pudjirahardjo ,MPH. Dr PH**
 - 5 **DR. F M Yudayana, dr Sp . PK (K)**
 - 6.**dr Marsetyawan HNES ,MSc PhD**
 7. **Sitarina Widyarini Mp Ph.D**

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan mengucapkan puji syukur yang tiada terhingga saya panjatkan ke hadirat Allah yang Maha Kasih atas segala rahmat dan karunia Nya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Selama menjalankan pendidikan Doktor, sungguh banyak bantuan dan dorongan moril dari berbagai pihak. Untuk itu dengan selesainya disertasi ini, perkenankanlah saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

Prof. Eddy Soewandoyo dr, Sp.PD, atas kesediaannya menjadi promotor, telah membimbing dengan penuh perhatian dan kasih sayang, memberikan wawasan tidak hanya dalam bidang imunologi, juga telah mengarahkan hal yang menyangkut tentang ilmu pengetahuan juga memberikan semangat dan dorongan dari awal hingga selesainya disertasi ini.

Prof. Dr. Soegeng Soegiyanto, dr, Sp.A (K), atas kesediaannya menjadi ko-promotor I dan atas bimbingannya yang banyak memberikan inspirasi dan menambah wawasan saya tentang penyakit Demam Berdarah Dengue, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.

Prof. H.R. Wasito, DVM, MSc. PhD, yang telah bersedia menjadi ko-promotor II meskipun dalam kesibukan beliau saat ini sebagai Dirjen Bina Produksi Peternakan Departemen Pertanian, namun dari jauh selalu memotivasi saya untuk tetap tegar melewati masa masa sulit dalam penelitian dan dengan penuh kesabaran membimbing untuk menyelesaikan disertasi ini.

Sitarina Widyarini drh Mp PhD penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga atas kesediaan beliau yang mau bertindak selaku ko Promotor II, karena alih tugas ko Promotor II ke Jakarta, sehingga dengan penuh kelembutan, kesabaran dan dengan penuh dedikasi beliau mau membimbing saya dalam hal imunologi pada umumnya dan immunositokimia pada khususnya, terutama kami haturkan beribu terima kasih karena beliau dengan sabar membantu saya dalam melakukan penelitian meskipun diluar hari kerja sehingga harus kehilangan hari liburnya untuk membantu saya dalam melakukan penelitian sehingga selesainya disertasi saya ini

Rektor Universitas Airlangga **Prof. Dr. Med H Puruhito, dr. Sp.B.TKV (K)** serta mantan Rektor Universitas Airlangga **Prof. Soedarto dr,Sp PAR (K) DTMH Ph.D** atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Univrsitas Airlangga **Prof. Dr .H Muhammad Amin dr, Sp.P(K)** dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga **Prof. H Soedijono Tirtowidardjo , dr. Sp THT (K)**, serta asisten Direktur I Program Pascasarjana **Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh, M.Sc** yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk tetap mengikuti pendidikan Program Doktor pada Pascasarjana Universitas Airlangga .

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga **Prof. Dr. Mandojo Rukmo , drg MSc Sp. KG** serta mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga **Prof.**

Dr. Juliati Hood A.dr MS Sp.PA. FIAC yang telah memberikan semangat serta membimbing penulis sehingga disertasi ini dapat diselesaikan .

Rektor Universitas Sebelas Maret **Prof. Dr.H. Much. Syamsulhadi dr.Sp. KJ** serta mantan rektor Universitas Sebelas Maret **Prof. Dr.H.Haris Mudjiman, Drs MA,Ph.D** yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Prof. Dr Putu Gede Konthen, dr Sp.PD. KAI selaku guru besar dan sekaligus bersedia mejadi dosen pengampu Mata Kuliah imunologi , dengan penuh kesabaran dan ketelitian dalam menularkan ilmunya , sehingga penulis mendapatkan bekal pengertian ilmu sebagai penunjang untuk dapat menyelesaikan disertasi ini .

Widodo J. Pudjirahardjo dr ,MPH. Dr PH , yang telah dengan sabar dan penuh pengertian memberikan bimbingan , saran dan petunjuk yang sangat berharga khususnya tentang Metodologi Penelitian serta Analisis Statistik sehingga disertasi dapat terselesaikan.

Prof.Dr. Marsetyo Donoseputro, dr, Sp. PK (K) yang telah mendorong dan memberikan semangat kepada saya serta mengarahkan dan membimbing penulis dalam bidang patologi klinik khususnya tentang penelitian sehingga disertasi ini dapat terselesaikan.

Prof. Marsetyawan HENS, dr, MSc, Ph.D yang telah mendorong dan memberikan semangat kepada saya serta mengarahkan dan selalu siap membimbing penulis dalam bidang imunologi khususnya tentang penelitian sehingga disertasi ini dapat terselesaikan

Dr F M Yudayana dr Sp PK (K) yang telah mendorong dan membimbing saya dalam ilmu patologi klinik khususnya dalam bidang diagnosis laboratorium untuk penyakit infeksi sehingga disertasi ini dapat terselesaikan .

Prof.Dr.Y B Suparyatno dr Sp PK (K) selaku Kepala Bagian Patologi Klinik Universitas Sebelas Maret Surakarta beserta Staf dan karyawan, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas ijin dan dorongan semangat sehingga dapat terselesainya pendidikan S3 ini.

Ndaru Pangesti dr SpPD yang telah membantu penulis di dalam pengumpulan sampel penelitian sehingga disertasi ini dapat terselesaikan.

Seluruh staf pengajar di Program Pascasarjana Universitas Airlangga : **Prof. Fuad Amsyari, dr. MPH. Ph.D; Prof. Dr. M Zainuddin, Apt.; Prof. Dr. Suhartono Taat Putro, dr. MS.; Prof. Kuntoro, dr. MPH, Dr. PH, Prof. Dr. Habel Josef Glinka, SVD.; Siti Pariani, dr Ph.D, Prof. Soetandyo Wignyosoebroto, MPA, Prof. Dr. Koento Wibisono Siswomiharjo, Prof. Dr Thomas Kardjito, dr. SpP,(K)** dan masih banyak lagi staf pengajar lainnya yang tidak dapat penulis sebut satu persatu yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan Program Doktor Di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Semua guru-guru saya sejak dari Sekolah Dasar hingga Perguruan Tinggi yang telah memberikan bimbingan bekal ilmu pengetahuan serta penalaran kepada saya . sehingga dapat menyelesaikan pendidikan Program Doktor Di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Direktur Rumah Sakit Umum Kasih Ibu Surakarta **Hendrik D Manueke dr M Kes** beserta mantan direktur **Lo Siauwing dr MARS**, beserta seluruh stafnya yang telah memberikan izin penelitian, dan sebagai ketua Komite Etik, Kepala laboratorium RSUD Kasih Ibu Surakarta, **Irvetta dr**, yang telah membantu kelancaran pemeriksaan kasus-kasus penderita Demam Berdarah Dengue

Laboratorium Medis Sarana Medika cabang Surakarta dengan seluruh stafnya yang telah membantu saya mulai dari pemesanan reagensia sampai dengan pemeriksaan yang dengan keramahan dan kesabarannya sehingga disertasi dapat terselesaikan.

Seluruh pasien-pasien yang telah menyediakan dirinya dengan sukarela untuk menjadi subyek penelitian yang dengan kesabaran dan pengertian telah membantu penelitian saya.

Suami saya **DR. J. Priyambodo.dr. MS. SpMK**, yang telah mendampingi saya selama ini dalam suka dan duka, selalu setia dan ikhlas mendorong dan memberikan semangat terlebih dalam tahun-tahun terakhir ini selalu membimbing dan membantu dalam penulisan disertasi ini sehingga tugas yang berat itu terasa lebih ringan. Ketiga anak-anakku, **Ricardus Iwah Wahyu Utomo dr** beserta menantu **Elisabeth Afrita Kishariyadani SE**, **Theresia Avila Diah Lestari Widiasih SH, MKn** dan **Antonius Andi Kumiawan dr**, yang dengan penuh pengertian menyadari kesibukan ibu sehingga ibu kurang memperhatikan kebutuhanmu serta dorongan dan doamu semua dapat menjadi penghibur bagi ibu sepanjang waktu, sehingga beban berat yang ibu pikul terasa lebih ringan sehingga pendidikan Program Doktor ini dapat ibu selesaikan. Program pendidikan ini selain tuntutan sebagai seorang

pendidik juga agar dapat memberikan contoh kepada anak-anakku agar selalu berusaha untuk mendapatkan pendidikan yang setinggi-tingginya.

Kedua orang tua saya ibu Sujirah almarhum yang selalu mendoakan aku dan Bp Darmosuwiryo yang selalu rela menderita demi kebahagiaan anak-anaknya dan senantiasa mendidik dan selalu menekankan pentingnya pendidikan agar kelak dapat menjadi orang yang berbudi luhur, berguna untuk nusa , bangsa dan agama. Hanya karena doa merekalah saya nantinya dapat menjadi orang yang seperti diharapkannya, semoga dengan ini bapak mendapat karunia kasih yang melimpah dan kebahagiaan dari Nya, serta arwah ibu mendapatkan kasih karunia dan memperoleh tempat yang layak disisinya. Kedua mertua saya Bp Sri Wismo Hadipranoto almarhum dan Ibu Suharti almarhum, atas doanya sehingga saya dapat menyelesaikan studi ini, semoga Allah Maha Kasih berkenan melimpahkan kasih karunianya dan mereka memperoleh tempat yang layak disisinya .

Akhirnya kepada semua pihak dan teman sejawat yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu yang dengan sukarela memberikan bantuan dan semangat selama masa pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga, penulis mengucapkan terima kasih tak terhingga.. Semoga Tuhan selalu memberikan Berkah dan Rahmat Nya.

RINGKASAN

DETEKSI ANTIGEN VIRUS DENGUE PADA MONOSIT SEBAGAI SARANA PENUNJANG DIAGNOSIS DEMAM BERDARAH DENGUE

Infeksi virus dengue merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas di negara-negara tropis dan sub-tropis. Infeksi virus ini menyebabkan terjadinya *dengue fever* (DF), *dengue haemorrhagic fever* (DHF) dan *dengue shock syndrome* (DSS). Meskipun demikian belum diketahui secara jelas mengenai mekanisme imunopatologi dari komplikasi tersebut diatas. Telah dilaporkan sebelumnya bahwa infeksi primer dan infeksi sekunder dari virus dengue mempunyai peran penting didalam patogenesis dari penyakit tersebut. Infeksi primer dengan virus dengue akan memicu terjadinya kekebalan seumur hidup terhadap serotipe yang homolog, tetapi hanya akan memberikan kekebalan yang bersifat sementara terhadap infeksi virus yang berasal dari serotipe yang lain. Infeksi sekunder dengan virus dengue secara umum telah diterima sebagai resiko utama untuk DHF dan DSS disebabkan oleh adanya *antibody-dependent enhancement*. Faktor-faktor lain yang juga penting dalam patogenesis dari DHF adalah virulensi dari virus, latar belakang genetik dari penderita dan aktivasi sel limfosit T.

Diagnosis dari infeksi virus dengue mempunyai sumbangan yang besar untuk penanganan dari penyakit tersebut, terutama untuk prognosis dari pasien. Diagnosa laboratotium dari infeksi virus dengue dapat dilakukan dengan cara mendeteksi virus, antigen virus, sekuensing dari genom dan antibodi. Pada saat ini, ada tiga metoda dasar yang dipergunakan di laboratorium untuk mendeteksi infeksi virus dengue yaitu: isolasi dan karakterisasi dari virus, deteksi sekuensing dari genom dengan cara amplifikasi asam nukleat dan deteksi antibodi spesifik dari virus dengue. Metoda tersebut diatas sangat sensitif dan akurat untuk mendeteksi infeksi virus dengue, tetapi memerlukan peralatan khusus, biaya mahal dan membutuhkan waktu lama untuk proses deteksi. Berdasar kepada alasan diatas, maka diperlukan untuk mengembangkan suatu metoda deteksi infeksi virus dengue yang bersifat cepat, sensitif dan tidak memerlukan biaya yang mahal.

Selanjutnya penulis melakukan penelitian untuk deteksi infeksi virus dengue yang bersifat cepat, sensitif dan tidak memerlukan biaya yang mahal dengan menggunakan metoda imunositokimia dengan *streptavidin-biotin complex*. Metoda tersebut didasarkan kepada pengenalan/rekognisi spesifik dari antigen virus dengue oleh monoklonal antibodi anti-dengue kompleks. Selajutnya sinyal rekognisi tersebut akan diperkuat dengan penambahan enzim dan substrat yang akan

menghasilkan warna coklat pada akhir proses pengecatan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi antigen dari virus dengue dalam monosit dari pasien yang diduga terinfeksi DHF. Hasil dari studi imunositokimia memperlihatkan bahwa dari 32 serum pasien yang diduga terinfeksi DHF 78,1% menunjukkan positif dan 21,9% menunjukkan negatif. Hasil tersebut konsisten dengan hasil pemeriksaan dengan kriteria WHO. Analisa data dengan *Chi-Square* memperlihatkan bahwa metoda imunositokimia tersebut diatas mempunyai sensitivitas dan spesifisitas masing-masing 88% dan 87,7%.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metoda imunositokimia dengan *streptavidin-biotin complex* dapat dipergunakan untuk mendeteksi antigen virus dengue dalam monosit dari pasien yang diduga terinfeksi DHF dengan cepat, mempunyai sensitivitas dan spesifitas tinggi dan konsisten dengan hasil kriteria WHO.

Kata kunci: *Dengue Haemorrhagic Fever* , Imunositokimia, Streptavidin-Biotin

SUMMARY

DETECTION OF DENGUE VIRUS DENGUE ON MONOCYTES AS A SUPPORTING TOOL FOR THE DIAGNOSIS OF DENGUE HAEMORRHAGIC FEVER

Dengue virus infection is the main cause of morbidity and mortality in the tropical and sub-tropical countries of the world. This virus infection resulted in dengue fever (DF), dengue haemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). The mechanisms underlying the disease with severe complications is not clear yet, however. It has been previously reported that primary and secondary infections of dengue virus play an important role in the pathogenesis of this disease. Primary dengue infection induces protective immunity to the homologous serotype but confers only partial and transient protection against subsequent infections by other serotype. Instead, it has generally been accepted that secondary infection or multiple infections by different virus serotypes is a major risk for DHF and DSS. This is due to antibody-dependent enhancement mechanism. Other factors, such as viral virulence, host genetic background, and T-cell activation, have been postulated to be important in the pathogenesis of DHF.

Early diagnosis of dengue virus infection has a great contribution for appropriate management of the disease, especially for the prognosis of the patient. Laboratory diagnosis of dengue virus infection could be made by detection of specific virus, viral antigen, genomic sequence and / or antibodies. At present, the three basic methods used by most laboratories for diagnosis of dengue virus infection are viral isolation and characterisation, detection of the genomic sequence by nucleic acid amplification technology assay, and detection of dengue virus specific antibody. These methods are sensitive and precise for detecting dengue virus infection, but they need special equipment, costly, and time consuming. Ideally, a rapid, sensitive, and inexpensive method is needed to be developed for the detection of dengue virus infection.

We have performed a rapid, sensitive, and inexpensive immunocytochemistry method using streptavidin-biotin complex. This method based on specific recognition of dengue virus antigen by anti-dengue complex monoclonal antibody and then the reaction will be amplified using a labeled enzyme and substrate to produce brown colour. The aim of this study was to detect the antigen of dengue virus on monocytes in the serum of patient suspected with DHF. The result of immunocytochemistry study demonstrated that 32 sera from patient

suspected with DHF 78.1% were positive DHF and 21.9% were negative DHF. These results were consistent with the results from WHO criteria as standard. The *Chi-Square* analysis showed that the percentage of sensitivity and specificity of immunocytochemistry method were 88% and 87.7%, respectively.

In conclusion, immunocytochemistry using streptavidin-biotin complex could be used as a supporting tool to detect dengue virus antigen on monocytes in the serum of patient suspected with DHF.

Key words: Dengue Haemorrhagic Fever, Immunocytochemistry, Streptavidin-Biotin.

ABSTRACT

DETECTION OF DENGUE VIRUS ON MONOCYTES AS A SUPPORTING TOOL FOR THE DIAGNOSIS OF DENGUE HAEMORRHAGIC FEVER

It has been known that dengue virus infection is the main cause of morbidity and mortality in the tropical and sub-tropical countries of the world. Therefore, this study was performed in order to develop a method to detect dengue virus antigen on the monocytes using immunocytochemistry technique.

Thirty two sera from patients suspected with DHF(they have already been confirmed with the clinical WHO criteria for DHF), were used for serological study to detect the level of IgM and IgG. Monocytes were obtained from the same sera above and were used for immunocytochemistry using streptavidin – biotin.

The result of immunocytochemistry study demonstrated that 32 sera from patient suspected with DHF 78,1% were positive DHF and 21,9% were negative DHF. This result are consistent with the result from WHO criteria as a standard. The *Chi-Square* analysis showed that the percentage of sensitivity and specificity of immunocytochemistry method were 88% and 87,7% , respectively.

In conclusions, immunocytochemistry using streptavidin – biotin complex could be used as a method to detect antigen dengue virus on monocytes in the serum patient suspected with DHF. This technique has high sensitivity and spesificity and consistent with the clinical WHO criteria for DHF.

Key words:Dengue Haemorrhagic Fever, Immunocytochemistry, Streptavidin-biotin.

DAFTAR ISI

	Halaman
BAB. 1 PENDAHULUAN	1
A Latar Belakang Masalah	1
B Permasalahan	9
B.1 Identifikasi Masalah.	9
B.2 Rumusan Masalah	12
B.3 Tujuan Penelitian	12
B.4 Manfaat Penelitian.	13
BAB. 2 TINJAUAN PUSTAKA	15
2.1 Definisi Demam Berdarah Dengue	15
2.2 Epidemiologi	15
2.3 Etiologi Demam Berdarah Dengue	16
2.4 Respon imun pada penderita DBD	18
2.5 Patofisiologi Demam Berdarah Dengue	19
2.6 Patogenesis	21
2.7 Immunopatologi pada DBD atau DSS	22
2.8 Diagnosis DBD	30
2.9 Dasar pemilihan pemeriksaan immunositokimia untuk menegakkan diagnosis DBD	38
2.10 Pemeriksaan immunositokimia	41
2.10.1. Immunositokimia dengan Peroksidase Anti Peroksidase (PAP)	42
2.10.2 Immunositokimia dengan Alkaline Phosphatase Anti Alkaline Phosphatase (APAAP)	43
2.10.3 Immunositokimia dengan Avidin Biotin Complex (ABC)	44
2.10.4 Immunositokimia dengan Streptavidin-Biotin (SBI).	44
2.11 Cara pemeriksaan Immunositokimia dengan Streptavidin-Biotin	44
2.12 Prinsip dasar pemeriksaan virus dengue dengan immunositokimia dengan Streptavidin-Biotin	46

BAB. 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	49
3.1 Kerangka Konseptual	49
3.1.1 Landasan Konsep dan Teori mengenai keberadaan virus tubuh penderita DBD untuk infeksi virus dengue pertama kali (infeksi primer) maupun infeksi yang kedua kali (infeksi sekunder)	50
3.1.2 Landasan Konsep dan Teori mengenai permasalahan diagnosis pada penyakit DBD dan pendekatan baru menggunakan pemeriksaan immunositokimia sebagai usaha mencegah timbulnya penyakit yang berkelanjutan (syock dan perdarahan)	51
3.1.3 Landasan Konsep dan Teori penggunaan pendekatan baru teknik immunositokimia dengan streptavidin biotin sebagai sarana penunjang alternatif untuk diagnosis DBD	52
3.2 Bagan Kerangka Konseptual Penelitian	54
3.3 Keaslian Penelitian	55
3.4 Hipotesis Penelitian	55
BAB.4 METODE PENELITIAN	56
4.1 Rancangan penelitian	56
4.2 Lokasi dan waktu penelitian	56
4.2.1 Lokasi penelitian	56
4.2.2 Waktu penelitian	56
4.3 Populasi Penelitian	57
4.3.1 Jenis sampel penelitian	57
4.3.2 Cara Pengambilan Sample Penelitian	58
4.3.3 Estimasi Besar Sampel	58
4.4 Standar Perbandingan	59
4.5 Identifikasi Variabel Penelitian	59
4.5.1 Variabel penelitian	59

6.1.	Diagnosis penyakit Demam Berdarah Dengue dan permasalahannya	80
6.2.	Hubungan umur dan jenis kelamin dengan gejala klinis DBD untuk digunakan untuk menunjang diagnosis DBD	85
6.3.	Hubungan hasil uji serologi IgM dan IgG anti - dengue dengan uji Immunositokimia dengan streptavidin biotin dalam menegakkan diagnosis DBD	86
6.4.	Karakteristik hasil deteksi antigen virus pada monosit penderita DBD dengan pemeriksaan immunositokimia dengan Streptavidin - biotin	87
6.4.1.	Aseptabilitas uji immunositokimia menggunakan Streptavidin -Biotin.	87
6.4.2.	Detektabilitas uji immunositokimia menggunakan Streptavidin Biotin.	88
6.4.3.	Akurasi dari uji immunositokimia menggunakan Streptavidin -Biotin.	88
6.4.4.	Validitas Uji immunositokimia untuk mendeteksi antigen virus dengue pada monosit menggunakan Streptavidin -Biotin.	88
6.5.	Hasil deteksi antigen virus pada monosit dengan immunositokimia menggunakan Streptavidin-Biotin dibandingkan dengan hasil peneliti lain dalam rangka mencari suatu uji diagnosis untuk penyakit DBD.	89
6.6.	Keunggulan dan hambatan dari uji immunositokimia dengan Streptavidin-Biotin beserta aplikasinya di lapangan.	93
BAB. 7 PENUTUP		93
7.1.	Kesimpulan	94
7.2.	Saran	94
DAFTAR PUSTAKA		96
Lampiran-lampiran		103

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Distribusi penderita DBD berdasarkan umur dan jenis kelamin.	70
Tabel 2. Distribusi penderita menurut gejala klinis	72
Tabel 3. Hasil serologi antibodi IgM dan IgG anti-dengue pada penderita tersangka DBD.	73
Tabel 4. Hasil pemeriksaan uji immunositokimia dengan streptavidinbiotin pada penderita DBD dan hasil uji serologis IgM dan IgG anti-dengue	74
Tabel 5. Hasil pemeriksaan uji Immunositokimia pada penderita klinis dibandingkan dengan standar pembanding	76

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Klasifikasi Arbo Virus	17
Gambar 2. Proses ADE	30
Gambar 3. Skematis pemeriksaan virus DEN di dalam monosit dengan Uji Immunositokimi dengan Streptavidin - biotin	48
Gambar 4. Grafik distribusi penderita DBD berdasarkan umur dan jenis kelamin	70
Gambar 5. Grafik distribusi penderita DBD menurut gejala klinis	72
Gambar 6. Grafik hasil serologis antibodi IgM dan IgG anti-dengue pada penderita tersangka DBD	73
Gambar 7. Grafik Hasil Pemerriksaan Uji Immunositokimia pada penderita klinis DBD dengan hasil serologi IgM dan IgG anti-dengue	74
Gambar 8. Hasil positif deteksi antigen virus DEN dengan uji immunositokimia dengan streptavidin biotin (Streptavidin biotin 1000x)	78
Gambar 9. Hasil positif deteksi antigen virus Den dengan uji immunositokimia dengan streptavidin biotin (Streptavidinbiotin 2500 x)	78
Gambar 10. Hasil negatif deteksi antogen virus DEN dengan uji immunositokimia dengan streptavidin biotin (Streptavidin biotin 1000x)	79

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Distribusi penderita DBD berdasarkan umur dan jenis kelamin.	63
Tabel 2. Distribusi penderita menurut gejala klinis	66
Tabel 3. Hasil serologi antibodi IgM dan IgG anti-dengue pada penderita tersangka DBD	67
Tabel 4. Hasil pemeriksaan uji immunositokimia dengan streptavidinbiotin pada penderita DBD dan hasil uji serologis IgM dan IgG anti-dengue	68
Tabel 5. Hasil pemeriksaan uji Immunositokimia pada penderita klinis dibandingkan dengan standar pembanding	69

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran. 1 Hasil Penelitian	103
Lampiran. 2 Hasil Uji Statistika	105
Lampiran. 3 Surat Rekomendasi Komite Etik	119
Lampiran. 4 Surat Keterangan Persetujuan Penelitian	120

BAB I

PENDAHULUAN



A. LATAR BELAKANG MASALAH

Demam berdarah dengue (DBD) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus dengue (DEN) yang ditandai dengan demam mendadak tinggi terus menerus berlangsung selama 2 - 7 hari disertai dengan perdarahan spontan dan kecenderungan terjadi *syock* atau renjatan yang dapat berakibat fatal (WHO, 1996; Soewardoyo, 1997).

Infeksi virus dengue ini menyebabkan morbiditas dan mortalitas meningkat pada penduduk diberbagai dunia, terutama di daerah tropis, termasuk Asia Tenggara, Amerika Tengah dan Selatan. Menurut WHO saat ini diperkirakan ada 2500 juta penduduk dunia yang menetap di daerah endemis dengue, dengan 50-100 juta penduduk setiap tahun yang terserang demam dengue, dan 500.000 orang menderita DBD 25.000 ribu diantaranya meninggal (Halstead, 1988; Syahrurahman, 1995; WHO, 1996; Gubler, 1998). Lebih dari 2-5 juta penduduk di dunia mempunyai risiko terkena infeksi dengue (Monath, 1991).

Indonesia menduduki peringkat I sebagai negara dengan predikat endemis tinggi untuk DBD di Asia Tenggara (Sutaryo, 1997), dan DBD merupakan penyebab tertinggi perawatan penderita di Rumah Sakit dan kematian anak-anak di Asia Tenggara (Gubler, 1998; Sumarmo, 1998). Di Indonesia DBD pertama kali dicurigai di Surabaya pada tahun 1968, tetapi konfirmasi virologis baru diperoleh pada tahun 1970. Di Jakarta kasus pertama dilaporkan terjadi pada tahun 1969.

kemudian berturut-turut terjadi di Yogyakarta dan Bandung pada tahun 1973. Di luar Jawa DBD dilaporkan pertama kali di Sumatera Barat dan Lampung, kemudian disusul Riau, Sulawesi Utara dan Bali pada tahun 1973. Tahun 1993 epidemi DBD telah menyebar ke seluruh pelosok Indonesia (Sumarmo . 1998).

Penyakit dengue berat; DBD atau *Dengue Shock Syndrome* (DSS) jarang terjadi pada individu dengan seronegatif pada infeksi dengue yang pertama, tetapi sering terjadi pada individu yang telah memiliki antibodi terhadap virus dengue, baik yang diperoleh dari infeksi sebelumnya maupun dari transfer antibodi secara pasif, misalnya melalui transfer antibodi dari maternal ke fetus. Diperkirakan 99% anak yang menderita DBD atau DSS telah memiliki imunitas dari infeksi dengue sebelumnya (Wang *et al.*, 1995)

Manusia yang berada di daerah endemis dapat terinfeksi dengan keempat tipe virus penyebab (virus DEN-1, DEN-2, DEN-3 ataupun DEN-4), sehingga pada seseorang yang pernah mendapat infeksi dengan virus DEN tertentu, masih mungkin mendapat infeksi kedua dengan virus DEN yang lain. Pada umumnya gejalanya lebih berat dari infeksi pertama (kemungkinan dapat berupa DBD atau DSS) Hal ini disebabkan karena adanya "*enhancing antibody*" pada penderita infeksi DEN pertama, yang menyebabkan sel mononuklear penderita tersebut lebih mudah terinfeksi dengan virus DEN kedua (Kurane & Enis , 1992; Syahrurahman, 1997)

Pada infeksi virus DEN yang pertama, sebagai reaksi terhadap infeksi, tubuh akan membuat antibodi anti dengue, baik berupa antibodi netralisasi (yang pertama timbul) yang merupakan antibodi yang paling spesifik untuk virus

penyerang (*type-specific antibody*), maupun antibodi penghambat hemaglutinasi yang dapat bereaksi silang dengan tipe virus DEN lain serta anggota flavivirus yang lain, dan terakhir antibodi pengikat komplemen yang juga dapat bereaksi silang dengan flavivirus yang lain (Syahrurahman, 1993). Antibodi netralisasi akan memberikan kekebalan seumur hidup untuk serotipe virus DEN yang bersangkutan, tetapi tidak memberikan kekebalan silang (*cross-protective immunity*) untuk serotipe DEN yang lainnya. Sel target untuk replikasi virus DEN adalah sel fagosit mononuklear (monosit atau makrofag) yang membawa Fc reseptor di permukaannya (Juffrie *et al*, 2000; Yun-Chi Chen, 2002)

Pada infeksi kedua oleh virus DEN serotipe yang berbeda atau oleh flavivirus yang lain, maka virus DEN atau flavivirus tersebut akan dikenali oleh monosit atau makrofag dan antibodi non-netralisasi dari virus DEN penyebab infeksi pertama akan berinteraksi dengan Fc reseptor di permukaan sel monosit atau makrofag melalui bagian Fc bebas immunoglobulin di permukaannya. Sasaran dari proses ini adalah virus DEN yang ada di permukaan sel dan akan meningkatkan ikatan virus dengan sel tersebut, serta meningkatkan infeksi sel mononuklear oleh virus DEN spesies ini, yang dikenal sebagai "Antibody - Dependent Enhancement" (ADE) (Susatyo , 1997; Gubler, 1998; Soewandoyo, 1998; Juffrie *et al*, 2000; Yun-Chin Chen , 2002)

Oleh karena virus DEN penyebab infeksi kedua heterolog, dan terjadi reaksi silang, maka virus DEN penyebab infeksi kedua tidak dinetralisir dan bebas berkembang biak di dalam monosit, dan akan membentuk "*antibody virus kompleks*" yang akan meliputi monosit, dan antibodi tersebut bersifat opsonisasi,

internalisasi menyebabkan monosit mudah terinfeksi dan akan teraktifasi sehingga akan memproduksi mediator inflamasi, yaitu Tumor Necrotic Factor alfa (TNF alfa), Interleukin -1 (IL-1) dan IL-6 dan juga " *Platelet Activating Factor*" (PAF) yang memiliki sifat vasoaktif dan prokoagulasi. Bahan mediator tersebut akan mempengaruhi sel endotel dinding pembuluh darah dan sistem hemostatik yang akan mengakibatkan kebocoran plasma dan perdarahan (Soewandoyo, 1998; Jufrie *et al*, 2000; Sugianto, 2004).

Proses replikasi virus dalam monosit juga akan merangsang sel T memori yang telah teraktifasi, dan berproliferasi menjadi sel TCD-4 + dan sel TCD-8 + sitotoksik. Kedua tipe sel tersebut akan mengenal dan menghancurkan virus DEN yang ada dalam sel fagositik mononuklear sehingga terjadi proses pembersihan secara imunologis (Suwandojo, 1998).

Di Indonesia penyakit DBD makin meluas penyebarannya sejalan dengan meningkatnya mobilitas dan kepadatan penduduk. Seluruh wilayah Indonesia mempunyai risiko untuk terjangkit penyakit DBD karena keempat jenis virus DEN dan nyamuk penularnya (*Aedes aegypti*) tersebar luas, baik di rumah maupun di tempat umum (Suroso , 1997)

Manifestasi klinis infeksi virus DEN sangat bervariasi dari asimptomatik, demam ringan yang tidak spesifik, DBD hingga DSS (Nimmanitya, 1993; Nimmanitya, 1996; WHO, 1997, Wuryadi 1999; Sutaryo, 1999). DBD dan DSS merupakan bentuk yang lebih berat di banding bentuk lainnya, ditandai dengan demam akut, adanya manifestasi perdarahan, peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan kebocoran plasma yang seringkali menimbulkan *syock* dan kematian

(Halstead, 1990; Nimmanitya, 1993; Nimmanitya, 1996, Malavige *et al.* 2004). Namun demikian, pada stadium awal dimana gejalanya kurang begitu khas; bentuk-bentuk demam diatas sulit dibedakan. Hal inilah yang seringkali menimbulkan kesulitan bagi para klinisi dalam upaya menegakkan diagnosis secara dini, juga dalam hal penatalaksanaannya (Faizi, 1998)

Untuk mengurangi angka kejadian DBD atau DSS, yang berarti juga akan menurunkan angka kematian, kiranya perlu dicari sarana diagnostik yang cepat yang dapat membedakan antara DBD atau DSS dengan bentuk-bentuk demam lain yang lebih ringan pada stadium awal.

Selama ini diagnosis DBD didasarkan pada kriteria WHO (adanya demam mendadak tinggi sekitar 2 sampai 7 hari, manifestasi perdarahan: (uji RL (+), petechiae, ekhimose, perdarahan hidung, perdarahan gusi) serta didukung hasil pemeriksaan laboratorik antara lain : trombositopeni dan hemokonsentrasi. Pada stadium awal, diagnosis pasti DBD atau DSS berdasarkan pemeriksaan laboratorik, yaitu isolasi virus atau memeriksa serologi sistem imun (tanggap kebal) penderita dengan melacak antibodinya, antara lain IgM, IgG penderita terhadap antigen spesifik penyakit DBD, yaitu dengan pemeriksaan hemaglutinasi - test (HI - test), komplemen fixasi - test (CF - test), Netralisasi - test (NT-test), Immunoglobulin M (IgM) *Capture enzyme linked immunosorbent assay* (MAC-ELISA) serta indirect immunoglobulin G Ehsa (Suwardji, 1996; Syahrurahman, 1999)

Diagnosis pasti DBD dengan menggunakan pemeriksaan serologi masih banyak kendalanya. Sebagai contoh pada HI - test selain masih banyak terjadi

reaksi silang terhadap serotipe- spesifik virus DEN 1, 2, 3, 4 atau bahkan terhadap jenis *Arbo virus* yang lain, test ini memerlukan waktu yang lama, (paling cepat 7-10 hari bahkan kadang- kadang sampai satu bulan lebih). Selain itu juga butuh sepasang spesimen yang kadang sulit didapat. Pada pemerikaan CF-test dan NT-test terdapat kendala berupa sensitifitas dan spesifisitasnya yang rendah (Suwardji, 1996; Gubler, 1998; Syahrurahman, 1999). Uji MAC-ELISA mempunyai spesifisitas hampir sama dengan HI – test tetapi juga terjadi cross reaksi terhadap flavivirus lain. Uji MAC – ELISA positif berarti orang yang diperiksa mengalami infeksi dengue sekitar 2 – 3 bulan sebelumnya (Gubler, 1998). Ini berarti hasil positif dari sampel tunggal; hanya bersifat sementara dan bukan berarti infeksi dengue sedang berlangsung, mengingat antibodi IgM bertahan selama 2 – 3 bulan. Uji indirek IgG-ELISA sebanding dengan uji HI dan dapat digunakan untuk membedakan infeksi primer dan skunder, tetapi tidak spesifik dan menimbulkan reaksi silang dengan flavivirus yang lain. Oleh karena itu tidak dapat digunakan untuk identifikasi serotipe virus dengue penyebab infeksi (Gubler, 1998). Pemeriksaan serologi IgM dan IgG pada hari pertama panas belum dapat mendeteksi adanya infeksi dengue, waktu terbaik untuk memeriksa IgM adalah setelah demam hari kelima, sehingga isolasi virus merupakan pilihan utama didalam menegakkan diagnosis dini DBD.

Selama ini untuk menentukan diagnosa pasti DBD digunakan 2 cara yaitu isolasi virus dengan menggunakan kultur pada sel nyamuk dan inokulasi pada nyamuk. dan dengan teknik hibridisasi RNA virus yang disebut “ *reverse transkriptase polymerase chain reaction RT-PCR*”. Namun demikian keduanya

sampai saat ini masih sulit diterapkan secara luas, karena biaya yang mahal dan teknik pelaksanaan yang rumit (Pangkalila, 1997; Faizi 1998).

Isolasi virus dengue dengan kultur pada sel nyamuk atau inokulasi pada nyamuk, membutuhkan waktu yang lama antara 5 - 7 hari (Ling , 1992; Kushartono, 2000) dan dari pengalaman lapangan pada penderita kliris DBD hanya memberikan angka yang positif 14% - 25% (Samsi dkk, 1990; Fujita *et al*, 1997; Faizi 1998). Sedangkan deteksi RNA virus DEN dengan tehnik RT-PCR dalam perkembangannya saat ini dapat dilakukan dengan lebih sederhana dan lebih cepat (Yenchisomanus *et al*, 1996; Faizi 1998) , disertai sensitivitas yang tinggi (91,4% - 100%) dengan spesivitas sebesar 95,4 % (Lanciotti *et al*,1992, Sudiro dkk, 1997; Faizi 1998). Dalam penerapan di lapangan teknik ini selain beayanya mahal, juga memerlukan alat khusus dengan angka positivitas bervariasi berkisar 12% - 100 % (Miagotovich *et al*, 1997; Faizi 1998)

Angka positivitas yang bervariasi pada penggunaan kedua metode tersebut diatas di lapangan, sangat tergantung pada saat pengambilan spesimen pada waktu penderita datang, mengingat masa viremia infeksi dengue begitu pendek dengan puncak 2 hari menjelang panas sampai 2 hari pertama panas (Sutaryo, 1997). Untuk itu perlu dicari cara pemeriksaan laboratorik lain yang cepat sederhana, mudah dan murah namun hasilnya dapat diandalkan. Gubler (1998) melaporkan bahwa untuk mendeteksi infeksi dengue immunositokimia dengan streptavidin - biotin dapat mendeteksi antigen virus dengue pada berbagai jaringan.

Uji immunositokimia dengan streptavidin – biotin merupakan salah satu uji diagnosis yang handal, dan berdasarkan berbagai hasil laporan penelitian uji tersebut dapat digunakan untuk uji diagnostik berbagai penyakit infeksi, dengan validitas cukup tinggi dibandingkan dengan jenis pemeriksaan immunositokimia lainnya (Heines, 1991; Wasito, 1991). Di bidang imunologi uji streptavidin – biotin dapat diaplikasikan untuk diagnosis terhadap berbagai mikroorganisme penyebab penyakit infeksi yang sulit dilakukan dengan pemeriksaan kultur, termasuk mampu mendeteksi antigen yang berada dalam larutan atau cairan tubuh yang terinfeksi (Larson, 1991; Wasito, 1991).

Berdasarkan hasil penelitian terdahulu (Wasito, 1989) uji immunositokimia dengan streptavidin – biotin juga dapat digunakan untuk mendeteksi adanya virus penyebab penyakit “ *Transmissible Gastro Enteritis (TGE)*” pada babi, dimana virus penyebab TGE adalah virus RNA. Sehingga diharapkan uji immunositokimia dengan streptavidin – biotin dapat digunakan untuk mendeteksi antigen virus yang ada di permukaan monosit mengingat virus DEN juga termasuk virus RNA.

Hastari dan Wasito (1996) telah berhasil mendeteksi *in vitro* “ *Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)*” yang termasuk famili *Flaviviridae* pada susu dengan teknik immunositokimia dengan metode *Immuno- Peroksidase Monolayer Assay (IPMA)*” dengan cara membiakkan darah yang mengandung virus BVDV pada monolayer sel dari turbinata sapi. Berdasarkan hasil penelitian tersebut diatas, peneliti mengharapkan virus DEN yang juga termasuk famili *Flaviviridae* dapat dilihat dengan cara immunositokimia. Hasil penelitian yang dilakukan oleh

Malergue, Clungue, 1995 telah mendeteksi adanya virus DEN dengan metode *Fluorogenic enzyme linked immunosorbent assay (F-EIISA)* dengan streptavidin – biotin pada serum dengan sensitivitas dan spesivitas yang tinggi. Hasil tersebut sangat memperkuat hipotesis penulis bahwa virus DEN dapat dideteksi dengan immunositokimia

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut diatas peneliti mencoba untuk mendeteksi antigen virus DEN yang ada di permukaan monosit (isolasi monosit dari *buffy coat*) dengan metode immunisitokimia dengan aplikasi streptavidin biotin. Deteksi antigen virus DEN dipermukaan monosit dengan teknik immunositokimia metode streptavidin – biotin diharapkan dapat sebagai alat diagnosis yang handal untuk menegakkan diagnosis DBD. Sebagai standar pembanding dalam penelitian ini adalah klinis DBD menurut standar WHO ditinjau hasil pemeriksaan serologi IgM anti – dengue (+) dan IgG anti – dengue (-) atau IgM anti – dengue (+) dan IgG anti – dengue (+).

B. PERMASALAHAN

B.1. Identifikasi masalah.

Dari latar belakang masalah yang telah dikemukakan diatas, maka dapat diidentifikasi permasalahan sebagai berikut :

B.1.1 Penyakit Demam Berdarah dengue merupakan masalah kesehatan utama untuk penyakit infeksi karena virus, di negara negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia, mempunyai angka morbiditas dan mortalitas yang cukup tinggi. Di Indonesia

menduduki peringkat 1 sebagai negara dengan predikat endemis tinggi untuk DBD di Asia Tenggara, dan merupakan penyebab utama perawatan penderita di Rumah Sakit dan kematian anak-anak di Asia Tenggara.

- B.1.2. Indonesia sebagai daerah endemis dengue, dengan keempat jenis virus penyebab dengue dan nyamuk penyebarannya (*Aedes Aegypti*) tersebar luas, sehingga kemungkinan terjadi infeksi yang lebih berat (DBD atau DSS) akan lebih mudah, karena seseorang yang pernah mendapat infeksi dengan virus DEN tertentu masih mungkin mendapat infeksi kedua dengan virus DEN yang lain sehingga kemungkinan terjadi infeksi yang lebih berat berupa DBD atau DSS.
- B.1.3. Manifestasi klinis infeksi virus DEN sangat bervariasi dari asimtomatik, demam ringan yang tidak spesifik, DBD hingga DSS dimana DBD atau DSS mempunyai bentuk yang lebih berat dibanding bentuk lainnya, ditandai dengan demam akut, adanya peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan kebocoran plasma, manifestasi perdarahan dan seringkali menimbulkan renjatan dan berakibat fatal. Namun demikian, terutama pada stadium awal dimana gejala kurang begitu khas, bentuk-bentuk diatas sulit dibedakan sehingga menyulitkan para klinisi di dalam menegakkan diagnose secara dini serta dalam hal penatalaksanaannya.

- B.1.4. Diagnosis DBD stadium awal menurut kriteria WHO berdasarkan hasil pemeriksaan klinis dan laboratorik, namun diagnosis dengan pemeriksaan laboratorik yang konvensional hasilnya tidak bisa diandalkan, kecuali pemeriksaan untuk mendeteksi adanya virus penyebab.
- B.1.5. Pemeriksaan laboratorium penunjang diagnose DBD adalah penentuan antibodi dengan uji hemaglutinasi inhibisi atau deteksi IgM dan IgG anti dengue, tetapi hasil positif dibutuhkan interval waktu karena IgM baru positif setelah panas hari ke 5 juga hasil positif dapat dideteksi sampai beberapa bulan disamping terjadi reaksi silang dengan golongan flavivirus yang lain.
- B.1.6. Saat ini cara terbaru untuk deteksi virus penyebab dengan “*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction/ RT-PCR*” dimana cara ini selain mahal membutuhkan alat khusus juga membutuhkan ketrampilan tertentu.
- B.1.7. Hasil deteksi TGE virus yang termasuk RNA virus oleh Wasito (1989) dan hasil deteksi virus BVDV yang termasuk famili *Flaviviridae* oleh Hastari dan Wasito (1996) dengan uji immunositokima.
- B.1.8. Perlu pemeriksaan laboratorik yang sederhana, mudah, murah dan cepat, yaitu pemeriksaan antigen virus yang ada di permukaan monosit, pemeriksaan immunositokimia dengan streptavidin biotin



B. 2 Rumusan Masalah :

Berdasarkan atas identifikasi masalah tersebut di atas, maka dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut :

- B.2.1. Apakah pemeriksaan adanya virus di permukaan monosit dengan pemeriksaan immunositokimia dengan *streptavidin - biotin*, dapat dipakai sebagai sarana diagnostik untuk diagnosis dini DBD?
- B.2.2. Apakah pemeriksaan immunositokimia dengan *streptavidin - biotin* merupakan suatu uji laboratorik dengan tingkat sensitivitas dan spesivitas yang tinggi, bila dibandingkan dengan standar pembanding sesuai kriteria WHO dan uji serologi IgM dan IgG anti - dengue sehingga mempunyai nilai diagnostik yang handal serta dapat digunakan untuk menentukan diagnosis DBD ?

B. 3 Tujuan Penelitian.

- B.3.1 Untuk memecahkan masalah dalam mendapatkan sarana diagnosis DBD, yang sederhana, mudah, murah dan cepat dengan mengembangkan model pemeriksaan immunosim, melalui immunositokimia.
- B.3.2 Menguji sensitivitas dan spesivitas uji immunositokimia dengan *streptavidin - biotin* untuk mengetahui adanya virus yang ada di permukaan monosit untuk menentukan diagnosis DBD dengan standar pembanding sesuai kriteria WHO dan uji serologis IgM dan IgG anti - dengue, mengingat dengan *gold standar* PCR

hasilnya dilapangan sangat bervariasi selain juga pekerjaannya butuh ketrampilan dan peralatan yang khusus untuk melakukan uji tersebut. Selain itu kadang sequens yang diambil tidak sesuai dengan primer yang dipakai.

B.4 Manfaat penelitian

B.4.1 Sumbangan teoritis pada keilmuan.

Apabila uji immunositokimia dengan streptavidin - biotin , dapat digunakan untuk mendeteksi antigen virus yang ada di permukaan monosit pada penderita DBD, diharapkan dapat membuka wawasan penelitian penelitian lain yang sejenis misalnya deteksi antigen virus dengan cara ELISA sehingga titer antigen tersebut dapat diketahui sehingga dapat membantu mengembangkan diagnosis DBD yang lebih cepat dan tepat.

B.4.2 Sumbangan praktis pada klinisi.

Immunositokimia dengan streptavidin - biotin dapat digunakan untuk mendeteksi antigen virus yang ada di permukaan monosit, maka dapat merupakan suatu uji diagnostik yang handal namun praktis, untuk dikerjakan di setiap laboratorium yang mempunyai sarana dan pra sarana terbatas.

Immunositokimia dengan streptavidin - biotin dapat dipakai sebagai sarana untuk menegakkan diagnosis dini DBD sehingga penatalaksanaannya bisa terarah untuk mencegah terjadinya DSS sehingga akan menurunkan angka kematian

B.4.3 Manfaat bagi masyarakat.

Apabila metode immunositokimia dengan streptavidin biotin dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis DBD, maka secara tidak langsung diharapkan dapat menurunkan angka kematian akibat DBD pada masyarakat yang saat ini masih cukup tinggi, terutama pada daerah endemis.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Definisi Demam Berdarah Dengue

Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus Dengue yang ditandai dengan demam mendadak tinggi, terus menerus yang berlangsung selama 2 - 7 hari disertai dengan perdarahan spontan (haemorrhagic diathesis) dan kecenderungan terjadi syock yang dapat berakibat fatal (WHO, 1986; Soewandjo, 1997). Diagnosis DBD berdasarkan kriteria WHO 1986 yang menitik beratkan pada gejala klinis, meliputi demam, perdarahan, pembesaran hati dan gangguan sirkulasi ringan sampai terjadi renjatan, dan ditunjang dua hasil pemeriksaan laboratorium yang menunjukkan kenaikan hematokrit lebih dari 20% dan ditemukan trombositopeni kurang dari 100.000 /ml (WHO, 1986; Soewandjo, 1997; Soegiyanto, 2004).

2.2. Epidemiologi

Sampai saat ini masih belum jelas sejak kapan demam dengue pertama kali dikenal di dunia (Thongcharoen *et al*, 1993). Namun tiga orang sarjana, pada umumnya dianggap sebagai perintis penguraian gejala klinis demam dengue, yaitu David Bylon tahun 1979 di Batavia. Al Jabarti di Kairo tahun 1979 dan Benyamin Rush di Philadelphia tahun 1980.

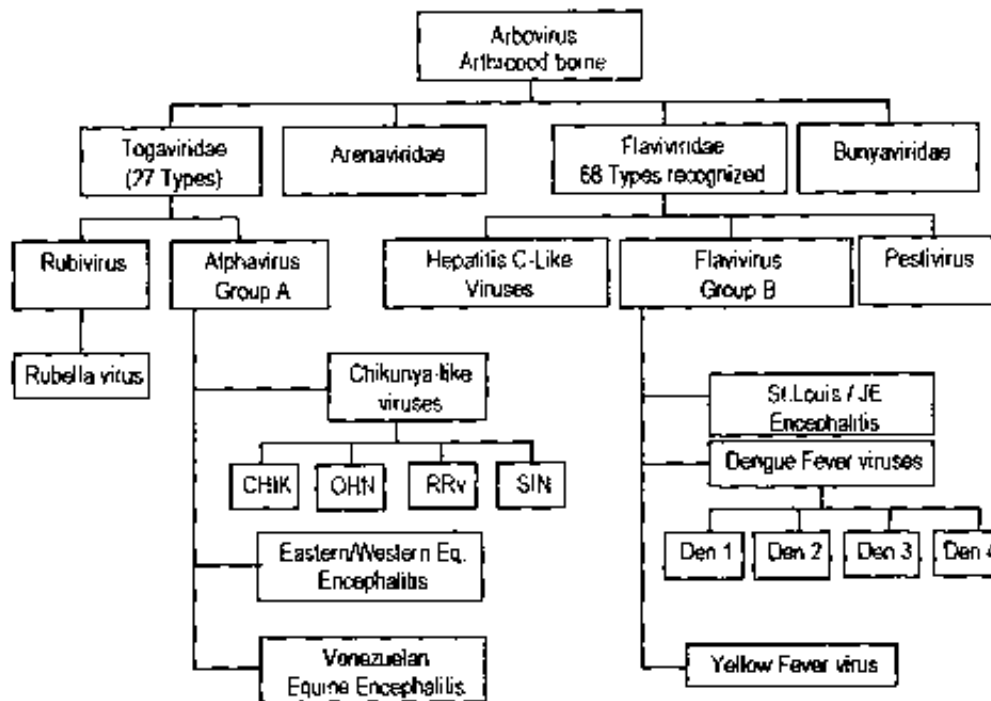
Di Indonesia DBD pertama kali dicurigai di Surabaya pada tahun 1968, tetapi konfirmasi virologis baru diperoleh pada tahun 1970. Di Jakarta kasus

Di Indonesia DBD pertama kali dicurigai di Surabaya pada tahun 1968, tetapi konfirmasi virologis baru diperoleh pada tahun 1970. Di Jakarta kasus pertama dilaporkan terjadi pada tahun 1969, kemudian berturut-turut terjadi di Yogya dan Bandung pada tahun 1973. Epideminya di luar Jawa dilaporkan pertama kali di Sumatra Barat dan Lampung, kemudian menyusul Riau, Sulawesi Utara dan Bali pada tahun 1973. Tahun 1993 epidemi DBD telah menyebar ke seluruh pelosok Indonesia (Sumarno, 1998).

2.3. Etiologi Demam Berdarah Dengue

Penyakit DBD disebabkan oleh infeksi virus dengue. Virus dengue ini berasal dari kelompok *Arbovirus* (*Arthropod-borne virus*, dari famili *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, dan bila kelompok virus ini menyerang manusia maka gejala klinisnya mirip dengan gejala klinis penderita DBD.

Virus dengue, terdiri dari 4 serotip: DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Keempat serotip virus terdapat di Indonesia dan dilaporkan bahwa serotip virus DEN-3 sering menimbulkan wabah (Sumarno, 1987; Syahrurahman, 1988), sedang di Thailand penyebab wabah yang dominan adalah virus DEN-2 (Syahrurahman, 1988). Klasifikasi virus dengue dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar.1 Klasifikasi Arbo Virus

Dikutip dari: Erlin Lystyaningsih US NAMRU 2001

Virus DEN termasuk dalam kelompok virus yang relatif labil terhadap suhu dan faktor kimiawi lain, serta masa viremianya yang pendek, sehingga keberhasilan isolasi dan indentifikasi virus sangat bergantung kepada kecepatan dan ketepatan pengambilan bahan dan pemeriksaannya.

Virus DEN virionnya tersusun oleh suatu untaian genom RNA, dikelilingi oleh nukleokapsid dan ditutupi oleh suatu envelope (amplop) dari lipid yang mengandung 2 protein yaitu protein amplop (E) dan protein membran (M). Genom RNA virus dengue mengkode tiga protein struktural, yaitu kapsid (C), membran (M) dan amplop (E) dan yang intraseluler mempunyai protein Pre-M

(Kurane, 1992; Soesatyo, 1997; Rantam, 1997). Glikoprotein E (BM 53 kd) mengandung epitop untuk sel T (Kurane, 1994; Rantam, 1997) dan merupakan epitop penting karena mampu menimbulkan antibodi, juga mempunyai aktivitas hemaglutinin, berperan dalam proses adsorpsi pada permukaan sel (reseptor binding) serta mempunyai fungsi biologis antara lain untuk fusi membran dan perakitan virion.

Selain ketiga jenis protein struktural (C, M dan E), juga mempunyai beberapa jenis protein non struktural yaitu: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b dan NS5 (Kurane & Enis, 1992). Protein NS1 (BM 39-41 kd) disamping mengandung epitop untuk sel T (Kurane, 1992), juga berperan penting dalam fiksasi komplemen dan dengan modifikasi tambahan adanya glikolasi-N dapat menginduksi antibodi spesifik yang bersifat protektif (Soesatya, 1997). Protein NS3 mengandung epitop yang multipel dominan terhadap CD4 dan CD8 sel T (Kurane, 1992).

2.4. Respon imun pada penderita DBD.

Menurut Kurane dan Ennis (1992) respon imun pada infeksi DBD mempunyai dua peranan yang berbeda yaitu :

- a. Mencegah terjadinya infeksi atau penyembuhan pada infeksi DEN dengan serotipe yang sama dari infeksi primer.
- b. Bertanggung jawab terjadinya gejala klinis demam berdarah dengue atau pada kejadian sindrom kejutan dengue pada infeksi dengan serotipe yang berbeda dari infeksi primer.

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

2.5. Patofisiologi Demam Berdarah Dengue

Dua hal yang mendasari perubahan patofisiologi pada penyakit demam berdarah dengue adalah : Pertama terjadi peningkatan akut permeabilitas vaskuler yang mengakibatkan kebocoran plasma ke dalam ruang ekstravaskuler, sehingga menyebabkan hemokonsentrasi dan penurunan tekanan darah serta tanda-tanda syok bila kebocoran plasmanya cukup besar. Volume plasma menurun lebih dari 20% ditemukan pada kasus-kasus DBD yang berat. Hal ini didukung dengan penemuan *post mortem* berupa efusi serosa, efusi pleura (Gubler, 1998).

Pada infeksi DBD kebocoran plasma tidak terjadi akibat adanya lesi destruktif yang nyata pada vaskuler, tetapi akibat dari perubahan sementara fungsi vaskuler yang diakibatkan oleh suatu mediator yang bekerja cepat dan singkat. Hal ini terbukti jika kondisi penderita sudah stabil dan mulai sembuh, cairan ekstrasvasasi akan diabsorpsi kembali dengan cepat, sehingga menimbulkan penurunan hematokrit.

Perubahan kedua pada infeksi virus dengue adalah perubahan hemostasis. Pada penderita DBD atau DSS telah melibatkan 3 faktor yaitu : perubahan vaskuler, trombositopeni dan kelambatan koagulasi. Hampir semua penderita DBD

mengalami peningkatan fragilitas vaskuler dan trombositopeni, dan banyak diantaranya menderita kelainan koagulogram. Adanya koagulopati telah dibuktikan dengan pemanjangan PTT pada 54,6 % kasus dan PT pada 33,3% kasus demam berdarah dengue (Leangpibul *et al*,1993). Terjadinya penurunan faktor-faktor koagulasi yakni:II, V, VII, VIII, IX, dan X (Halstead,1990; Halstead, 1993; Bhamarapavati, 1993; Leangpibul *et al*, 1993). Namun hanya fibrinogen dan trombosit saja yang hampir selalu menurun dan berkorelasi dengan derajat penyakit (Halstead 1987; Leangpibul *et al*, 1993) Kejadian trombositopeni 80% terjadi pada saat fase panas dan mencapai nilai paling rendah saat terjadinya syock. Semula kejadian trombositopeni ini diduga akibat gangguan pembentukan megakariosit dan peningkatan kerusakan trombosit, tetapi ternyata pada waktu jumlah trombosit dalam titik terendah, justru pada pemeriksaan megakariosit jumlahnya dalam keadaan normal dan bahkan cenderung jumlah megakariositnya meningkat (Leangpibul *et al*, 1993) . Halstead (1993), telah membuktikan bahwa trombositopenia ini terjadi karena ada dua mekanisme, pertama adalah akibat telah terjadi penekanan fungsi megakariosit dan kedua adalah akibat meningkatnya kerusakan trombosit yang matang. Gangguan trombositopeni dapat disebabkan oleh virus itu sendiri, adanya antibodi terhadap trombosit, kompleks imun, aktivasi komplemen, kerusakan sel endotel, dan akibat adanya aktivasi pada sistem pembekuan darah, ataupun adanya DIC (Halstead, 1993; Leangpibul *et al*, 1993)

2.6 Patogenesis

Sampai saat ini teori patogenesis yang mendasari gejala klinis demam berdarah dengue masih belum dapat dipahami secara jelas, salah satu faktornya adalah tidak adanya model binatang percobaan yang baik untuk dipergunakan (Kurane *et al*, 1994). Berbagai teori telah banyak diajukan, namun demikian hampir semuanya didasarkan pada respon imun penderita terhadap infeksi dengue (Halstead, 1993; Kurane *et al*, 1994).

Virus Den masuk ke dalam tubuh manusia lewat gigitan nyamuk *Aedes aegypti*. Organ sasaran dari virus adalah organ RES antara lain: hepar, nodus limfaticus, sumsum tulang serta paru-paru. Data dari berbagai penelitian menunjukkan bahwa sel-sel monosit dan makrofag mempunyai peranan besar pada infeksi ini. Dalam peredaran darah, virus tersebut akan difagosit oleh sel monosit perifer. Virus DEN mampu bertahan hidup dan mengadakan multiplikasi di dalam sel tersebut.

Infeksi virus dengue dimulai dengan menempelnya virus pada reseptor yang spesifik yang terdapat pada permukaan sel target antara lain pada monosit. Kemudian genomnya masuk ke dalam sel dengan bantuan organel-organel sel. Di dalam sel target genom virus membentuk komponen-komponennya, baik komponen antara maupun komponen struktural virus. Setelah komponen struktural dirakit, virus dilepaskan dari dalam sel target. Proses perkembangbiakan virus DEN terjadi di dalam sitoplasma sel target.

Semua flavivirus memiliki kelompok epitop pada protein amplop yang menimbulkan "*cross reaction*" atau reaksi silang pada uji serologis. Hal ini menyebabkan diagnosis pasti dengan uji serologi untuk demam berdarah dengue sering sulit ditegakkan dan dapat terjadi diantara ke empat serotipe virus DEN. Infeksi oleh suatu serotip virus DEN menimbulkan imunitas protektif terhadap serotip virus tersebut, tetapi tidak ada "*cross protektif*" terhadap serotip virus yang lain (Sabri, 1952; Kurane & Enis, 1992 ; Gubler, 1998)

2.7. Immunopatologi pada DBD atau DSS.

Teori mengenai terjadinya DBD atau DSS seperti disebutkan dibawah ini :

2.7.1 Teori antigen antibodi

Virus Dengue dianggap sebagai antigen yang akan bereaksi dengan antibodi, membentuk "*virus-anti body kompleks*" (kompleks imun) yang akan mengaktifasi komplemen, aktifasi ini akan menghasilkan anafilatoxin C3a dan C5a yang merupakan mediator yang mempunyai efek farmakologis cepat dan pendek. Bahan ini bersifat vasoaktif dan prokoagulan sehingga menimbulkan kebocoran plasma (syock hyovolemik) dan perdarahan. (Sutaryo, 1998, Soewandjo, 1998; Jufrie *et al.* 2004; Sugiyanto, 2004; Malavige *et al.* 2004).

2.7.2 Teori Immunopatologi

Infeksi virus dengue dari salah satu serotipe akan menimbulkan kekebalan terhadap virus tersebut seumur hidup, tetapi tidak melindungi

terhadap infeksi dengan serotip virus yang lain (Sabin, 1952). Teori ini berkembang menjadi Teori Infeksi Sekunder oleh virus "*heterologus*" yang berturutan. Kalau seseorang mendapat infeksi primer dengan satu jenis virus kemudian lain kah mendapat infeksi sekunder dengan jenis virus lain, maka risiko besar akan terjadi infeksi berat (Halstead, 1964; Sutaryo, 1998; Malavige *et al*, 2004).

2.7.3. Teori "Infection Enhancing Antibody"

Antibodi yang spesifik untuk satu jenis virus DEN mencegah terjadinya penyakit, tetapi kalau antibodi yang terbentuk tidak dapat menetralsisir virus tersebut, justru keadaan ini akan sangat berbahaya (Russel, 1980). Menurut Russel ada dua macam antibodi yaitu : antibodi non netralisasi yang dapat memacu replikasi virus, dan antibodi netralisasi yang dapat menetralsisir virus secara spesifik.

Teori "*Infection Enhancing Antibody*" ini berdasarkan pada peran sel fagosit mononuclear dan terbentuknya antibodi non netralisasi. Antigen dengue lebih banyak di dapat pada sel makrofag yang tinggal menetap di jaringan, sedang antibodi non netralisasi didapatkan melingkupi sel makrofag yang ada di dalam peredaran darah (monosit), dan tidak melingkupi sel makrofag yang menetap di jaringan (Anderson , 1997).

Pada monosit yang dilingkupi antibodi non-netralisasi akan mudah terinfeksi virus DEN, karena antibodi tersebut bersifat opsonisasi dan internalisasi. Monosit yang terinfeksi akan menjadi aktif dan akan melepaskan sitokin yang memiliki sifat vasoaktif dan prokoagulasi.

diantara IL-1, IL-6, TNF alpha dan "Platelet Activating Factor" (PAF) Bahan-bahan mediator tersebut akan mempengaruhi sel-sel endothel dinding pembuluh darah sistem hemostatik yang akan mengakibatkan kebocoran plasma dan perdarahan (Wang S *et al.*, 1995; Soesatyo M, 1997; Soetaryo, 1998; Soewandoyo, 1998; Jufrie *et al.*, 2004).

2.7.4. Teori mediator

Teori mediator didasarkan pada beberapa hal, salah satunya adalah :

Suatu kelanjutan dari teori *antibodi enhancing*, bahwa makrofag yang terinfeksi virus mengeluarkan mediator atau sitokin. Fungsi dan mekanisme kerja sitokin adalah sebagai mediator pada imunitas alami yang disebabkan oleh rangsangan zat yang infeksius, sebagai regulator yang mengatur aktivasi, proliferasi, dan diferensiasi limfosit, sebagai aktivator sel inflamasi non spesifik, dan sebagai stimulator pertumbuhan dan diferensiasi leukosit matur (Khana M *et al.*, 1990; Kurane & Enis , 1992; Hadinegoro , 1996; Sutaryo, 1998).

Sitokin diproduksi oleh banyak sel terutama makrofag mononuklear dimana dalam keadaan normal sitokin tidak terbentuk sehingga tidak dijumpai di dalam plasma. Kejadian masa krisis pada DBD selama 48-72 jam, berlangsung sangat pendek. Kemudian disusul masa penyembuhan yang juga berjalan cepat, dan praktis tidak ada gejala sisa. Kejadian tersebut menimbulkan pemikiran bahwa yang dapat berperilaku seperti itu adalah mediator. Dari kalangan ahli *syock* bakterial, mengambil

perbandingan bahwa pada syock septik hanya berhubungan dengan mediator

2.7.5. Peran limfosit

Secara umum infeksi virus yang masuk ke makrofag akan mendapat tanggapan sel tersebut, peptida serotip spesifik virus akan dibawa oleh MHC kelas 3 lalu dipajang dipermukaan virus. Pajangan peptida tersebut menyebabkan sel limfosit T.CD8+ mengenal bahwa di dalam makrofag tersebut terdapat virus. Kemudian limfosit T akan teraktivasi yang bersifat sitolitik, sehingga semua sel yang mengandung virus dihancurkan dan juga mensekresi IFN gama dan TNF alpha (Kurane & Emis, 1992; Sutaryo, 1997; Susatyo, 1998).

2.7.6. Teori Apoptosis

Teori ini berdasarkan pada hasil penelitian apoptosis yang banyak dikerjakan di pelbagai penyakit. Apoptosis adalah proses kematian sel secara fisiologik yang merupakan reaksi terhadap berbagai stimulan. Proses tersebut dapat dibagi menjadi dua tahap yaitu kerusakan inti sel, kemudian perubahan bentuk sel dan perubahan permeabilitas membran sel. Akibat adanya apoptosis ini akan terjadi fragmentasi DNA sel, vakuolisasi sitoplasma, blebbing dan pengikat granulasi membran plasma menjadi DNA sub selluler yang berisi badan-badan apoptotik (Sutaryo, 1998).

Limfosit T sitotoksik mengisyaratkan protease (gransyme, fragmentin) yang menginduksi apoptosis sel target. juga limfosit T yang

teraktifasi akibat infeksi virus DEN menunjukkan ekspresi Fas dalam kadar tinggi dan sangat *suseptibel* terhadap apoptosis.

Pada kasus DBD yang berat terdapat kerusakan hepar, terdapat "*councilman bodies*". Kemungkinan hal tersebut merupakan proses apoptosis pada sel hepar (Marrienne *et al.*, 1997).

Dari semua teori yang mendukung terjadinya DBD atau DSS; teori yang mendukung adanya virus di permukaan monosit adalah teori "*Infection Enhancing Antibody*" karena:

- a. Pada infeksi virus DEN yang pertama virus akan menyebar ke sirkulasi darah dan terjadilah viremia di dalam tubuh penderita. Selanjutnya tubuh akan membentuk antibodi yang memiliki aktifitas netralisasi mengenali protein E, juga antibodi monoklonal terhadap NS1, pre M dan NS3 dari virus penyebab infeksi, akan mengakibatkan lisis sel yang terinfeksi virus tersebut melalui aktifitas netralisasi atau aktifasi komplemen. Sehingga terjadi kekebalan seumur hidup terhadap virus penyebab infeksi pertama tersebut, tetapi tidak terjadi kekebalan silang terhadap serotip yang lain. Selain itu juga akan terjadi antibodi yang non netralisasi akibat adanya epitope yang tidak sesuai dengan antibodi dari virus tersebut. Pada infeksi primer ini virus DEN juga akan menginduksi sel T CD4+ (tipe memori) yang bersifat *cross reactive* dan akan terus berproliferasi sehingga menghasilkan IFN gama setelah distimulasi oleh strain virus serotipe lain. Selanjutnya sel ini mampu melakukan aktivitas sitotoksik

terhadap sel autologus setelah diinfeksi dengan virus heterologus (Susatyo, 1997)

- b. Pada infeksi kedua yang heterolog (virus serotip lain atau flavivirus) karena adanya non netralising antibodi, maka partikel virus DEN dan molekul antibodi – anti dengue akan membentuk “ *antibody - virus kompleks*” dan menempel pada bagian Fc reseptor dipermukaan monosit melalui bagian Fc bebas dari IgG.

Antibodi – virus kompleks tersebut akan meliputi monosit yang beredar dan antibodi tersebut akan bersifat opsonisasi, internalisasi sehingga monosit mudah terinfeksi (Sutaryo, 1998) dan akan teraktifasi sehingga memproduksi IL-1, IL-6, TNF alpha, dan “ *Platelet Activating Factor*”.

Antibodi virus kompleks tersebut juga akan memacu komplemen baik jalur klasik maupun alternatif (Susatyo, 1997) sehingga akan mengeluarkan mediator anafilatoxin C3a dan C5a. C5a akan berefek meningkatkan permeabilitas kapiler, meningkatkan efek kemotaktik dari netrofil dan monosit, juga memacu monosit untuk melepaskan TNF alfa, IL-1, IL-6 serta menyebabkan degranulasi sel mast yang diikuti dengan pelepasan histamin serta menstimuli prostaglandin dan radikal bebas (Malasit *et al*, 1992; Hadinegoro, 1999).

Bahan ini bersifat vasoaktif dan prokoagulan sehingga menimbulkan kebocoran plasma (syock hypovolemik) dan perdarahan (Soewandoyo, 1998)

Monosit yang teraktifasi ini akan memacu limfosit CD4⁺ serotipe *cross-reactive* yang kemudian limfosit CD4⁺ yang teraktifasi akan memproduksi IFN gama dan IL-2 dan CSF yang berfungsi sebagai imunomodulator, kemudian IFN gama akan memacu monosit untuk mengeluarkan IL-1 dan TNF alfa.

Monosit yang teraktifasi tersebut juga akan memacu limfosit CD8⁺ sehingga limfosit Tc akan teraktifasi yang bersifat sitolitik sehingga semua sel yang mengandung virus dihancurkan, dan juga mensekresi IFN gama dan TNF alfa, dimana IFN gama akan memacu monosit untuk mengeluarkan IL-1 dan TNF alfa.

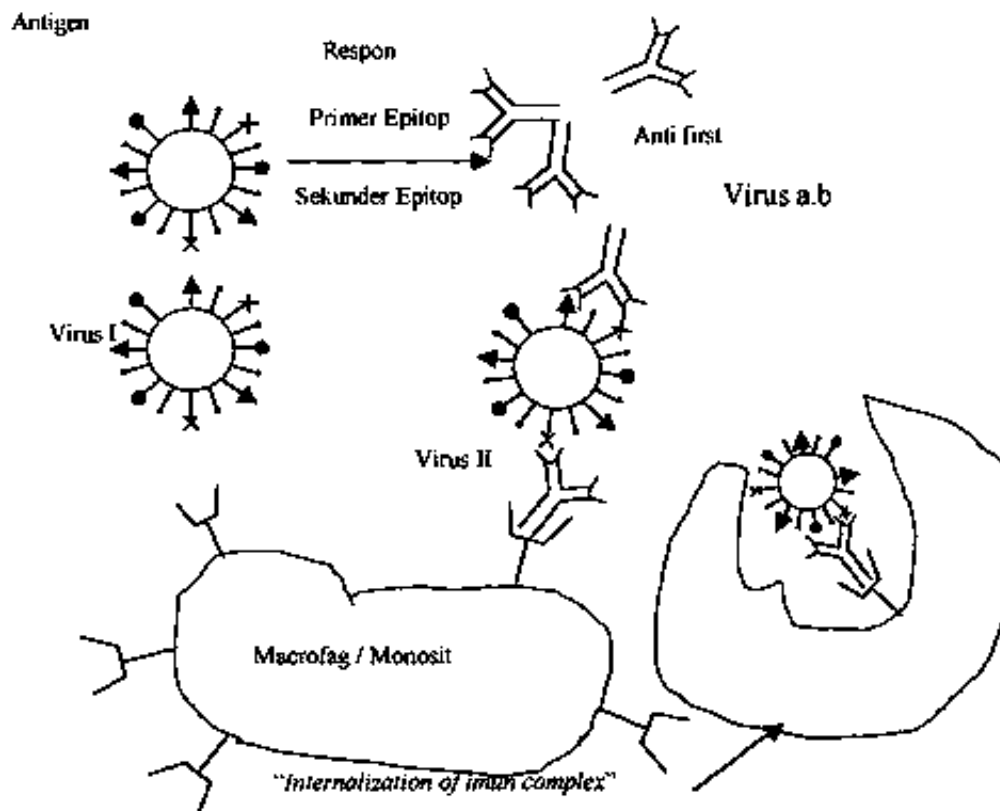
TNF alfa baik yang berasal dari monosit yang terangsang IFN gama maupun dari monosit yang teraktifasi " *antibody - virus kompleks*" dan juga karena aktifitas komplemen akan mengakibatkan dikeluarkannya mediator anafilatoxin yang akan mengaktifasi endothel pembuluh darah sehingga menghasilkan *ICAM-1* dan *nitrogen okside* serta meningkatkan permeabilitas kapiler sehingga terjadi kebocoran dinding pembuluh darah, merembesnya cairan plasma ke jaringan tubuh akibat kerusakan endothel yang mekanismenya sampai saat ini belum jelas (Cohen Sisson, 1996; Hadinegoro, 1999) dimana hal ini akan mengakibatkan *syock*. IL-1 sebagai imunomodulator juga mempunyai efek pada endothel sel, termasuk di dalamnya pembentukan prostaglandin dan merangsang ekspresi *ICAM-1*, sedangkan CSF akan merangsang netrofil, oleh

pengaruh ICAM-1 netrofil akan mudah mengadakan adesi. Netrophil yang beradesi dengan endothel akan mengeluarkan lisosim yang akan menyebabkan dinding endothel lisis, akibatnya endothel terbuka

Netrophil juga membawa *superoksid* yang termasuk dalam *radikal bebas* yang akan mempengaruhi oksigenasi pada *mitochondria* dan *siklus GMPs*, Yang menyebabkan terjadinya nekrosis pada endotel (Unanue, 1994). Kerusakan pada endothel pembuluh darah dapat mengakibatkan terjadi gangguan vaskuler sehingga terjadi *stroke*.

- c. Antigen yang bermuatan peptida MHC I akan dipajang dipermukaan virus sehingga dikenali oleh limfosit T CD8+, limfosit T akan beraktivasi yang bersifat sitolitik, sehingga semua sel yang mengandung virus dihancurkan dan juga mensekresi IFN gama dan TNF alpha.

Proses ADE dari virus dengue dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2 .Proses Antibody Dependent Enhancement dari virus dengue

Dikutip dari: Suwardji 1996

2.8. Diagnosis DBD

Sampai saat ini diagnosis klinik DBD berpedoman pada kriteria WHO 1986 yang belum tentu cocok untuk DBD dewasa karena disusun berdasarkan hasil penelitian pada DBD anak di Asia Tenggara dan Pasific Barat (Soewandjo, 1997).

Kriteria Diagnosis Klinik DBD menurut WHO 1986 adalah :

Klinis :

- a. Demam mendadak tinggi, terus-menerus dan berlangsung 2 – 7 hari
- b. Manifestasi perdarahan spontan, paling ringan adalah uji toniquest positif, dan terjadi petekhae, ekhumose, perdarahan hidung, perdarahan gusi, hematemesis, melena dan hematuri.
- c. Manifestasi renjatan berupa : nadi cepat, lemah, kecil sampai tak teraba dengan penurunan tekanan nadi (< 20 mm Hg) atau hipotensi, kulit dingin, berkeringat dan gelisah

Laboratoris :

- a. Trombositopeni (thrombosit $< 100.000/ml$)
- b. Hemokonsentrasi (kenaikan HCT 20%)

Diagnosis klinik DBD dapat ditegakkan bila ada : demam, manifestasi perdarahan, thrombosit $< 100.000/ml$ dan peningkatan hematokrit 20%.

Sedang diagnosis DSS dapat ditegakkan apabila ditemukan beberapa gejala tersebut ditambah dengan adanya hipotensi dan tekanan nadi yang menurun (< 20 mm Hg) (WHO, 1986; Soewandjo, 1997).

Pada dasarnya ada 2 metode pemeriksaan laboratorium untuk menegakkan diagnosis pasti infeksi virus dengue, yaitu deteksi antibodi -- anti dengue (serologi) (WHO, 1997) dan deteksi virus atau antigen virus (kultur atau PCR).

A. Deteksi antibodi anti – dengue atau uji serologi.

Uji serologi didasarkan atas timbulnya antibodi pada penderita yang terjadi setelah infeksi (Wuryadi, 1994)

Uji serologi untuk menegakkan diagnose infeksi virus DEN ada 5 yaitu :

a. *Uji Hambatan Hemaglutinasi. Hemagglutination Inhibition Test*

Sampai sekarang uji ini masih menjadi patokan baku WHO untuk konfirmasi dan klasifikasi serologis dari infeksi dengue (WHO, 1997). Dilakukan berdasarkan metode Clark & Cassal 1958, yang memerlukan bahan sera sepasang yaitu saat akut waktu penderita datang dan saat konvalescen atau 2 – 3 minggu dari onset sakit (dengan interval minimal 7 hari). Tetapi sering kali sukar mendapatkan sample fase konvalescen, terutama dalam kasus fatal atau penderita yang telah pulang dari rumah sakit (Samsi dkk, 1992; Wuryadi, 1999; Kusriatono , 2000).

Prinsip metode ini adalah mengukur campuran titer IgM dan IgG berdasarkan pada kemampuan antibodi anti-dengue yang dapat menghambat reaksi hemaglutinasi darah angsa oleh virus dengue yang disebut reaksi *hemagglutination-inhibition test (HI-test)*

Sampel darah berasal dari darah vena yang dapat diambil semunya atau dengan menggunakan kertas saring *filter paper disc method* Laana . sulu, serta penyimpanan bahan sampel sebelum pemeriksaan akan mempengaruhi stabilitas IgM dan IgG yang

terkandung di dalam sampel, sehingga kemungkinan akan dapat mempengaruhi titer HI secara keseluruhan (Ruangturachit *et al.* 1994; Kushartono, 2000). Jenis antibodi HI akan muncul bersamaan terdeteksinya IgM (Soesatyo, 1997). Pada infeksi primer, titer antibodi HI sebelum hari ke - 4 adalah 1:20 dan meningkat lebih dari 4 kali saat penyembuhan (1 - 4 minggu setelah onset) mencapai 1 : 1280. Sedangkan pada infeksi sekunder titer antibodi HI akan meningkat dengan cepat dan dapat mencapai titer 1: 2560 (Sumarmo, 1988; Faizi, 1998). Antibodi HI bersifat spesifik terhadap golongan, tetapi tidak spesifik terhadap tipe virus, sehingga dapat terjadi reaksi silang antara masing – masing tipe virus (WHO, 1986).

b. *Uji Fiksasi Komplemen.*

Uji ini kurang sensitive dibanding uji hambatan hemaglutinasi maupun uji netralisasi, titer antibodinya baru meningkat saat konvalescen. Kurang disukai karena tidak dapat mempergunakan kertas saring untuk pengambilan spesimennya (Wuryadi, 1994; Pangabla, 1997; Kushartono, 2000)

Uji ini berguna jika IgG anti – dengue terfiksir komplemen dengan antigen dengue, peningkatan 4 kali atau lebih dengan interval serum akut dan konvalescens kurang dari dua minggu menunjukkan respon imun sekunder (WHO, 1986).

c. *Uji Netralisasi.*

Uji netralisasi dianggap lebih spesifik dibandingkan uji fiksasi komplemen maupun uji hambatan hemaglutinasi terutama untuk kasus-kasus infeksi primer, hanya saja caranya lebih sulit, lama dan lebih mahal (Wuryadi, 1999). Disini juga dibutuhkan sepasang serum, akut dan konvalescen dengan menggunakan kertas saring sebagai alat pengumpul spesimennya dan menggunakan metode "*Plaque reduction neutralization test*" (*PRNT*). *Plaque* adalah daerah tempat virus menginfeksi sel dan batas yang jelas akan dilihat terhadap sel di sekitarnya yang tidak terkena infeksi. Aktivitas netralisasi serum ditentukan oleh kemampuannya untuk menurunkan atau mengurangi jumlah *plaque* virus yang terjadi dibandingkan dengan jumlah *plaque* yang terjadi apabila biakan jaringan hanya ditanami virus (Sumarmo, 1988).

d. *Uji ELISA Anti dengue.*

Uji ini sensitivitasnya sama dengan uji HI (Innis, 1989; Samsi, 1992) bahkan menurut Lam (1987) lebih sensitive daripada uji HI

Prinsip dari metode ini : mendeteksi adanya antibodi IgM dan IgG di dalam serum penderita dengan cara menangkap antibodi yang beredar dalam darah penderita.

Teknik yang biasa digunakan adalah teknik indirek (Crowther, 1995; Tio dkk, 1995; Handoyo, 1996). Pada metode indirek , antigen dilekatkan pada fase padat dinding sumuran *polystyrene plate* dengan

dasar data (*flat bottom*). Selanjutnya ditambahkan serum penderita yang diharapkan mengandung antibodi spesifik dan diinkubasi. Setelah itu dicuci, antibodi yang spesifik akan tetap melekat pada antigen yang terikat pada fase padat, kemudian ditambahkan anti immunoglobulin berlabel enzim dan diinkubasi. Sisa reagen dibuang dan sumuran dicuci kembali, selanjutnya ditambahkan substrat yang mengandung kromogen dan diinkubasi. Penambahan substrat akan menyebabkan proses degradasi substrat oleh enzim yang ditunjukkan oleh perubahan warna dari kromogen. Selanjutnya ditambahkan *stopping solution* untuk menghentikan reaksi, kadar antibodi sebanding dengan warna yang timbul dan dibaca dengan fotometer (Voller dkk, 1976; Crowther, 1995; Tio dkk, 1995).

Uji indirek IgG ELISA sebanding dengan uji HI dan dapat digunakan untuk membedakan infeksi primer dan sekunder, uji ini sederhana dan mudah dikerjakan, karenanya berguna untuk pengujian jumlah besar. IgG ELISA. Sangat tidak spesifik dan menimbulkan reaksi silang diantara flavivirus seperti uji HI. Selain uji indirek IgG - ELISA ada lagi pemeriksaan *Immunoglobulin M (IgM) capture enzyme linked immunosorbent assay (MAC) ELISA*.

Perbedaan prinsip dan teknik indirek dengan "capture" adalah penggunaan anti human - antibodi tertentu (monoklonal) pada teknik "capture" sebagai pengganti pelapis antigen atau konjugat pada teknik indirek, sehingga antibodi yang ditangkap pada metode ini lebih spesifik

dan tidak terganggu oleh adanya antibodi lain yang tidak diharapkan (Crowther, 1995; Handoyo, 1996).

Uji MAC-ELISA mempunyai spesifitas hampir sama dengan uji HI, tetapi juga terjadi reaksi silang terhadap flavivirus lain. Uji MAC-ELISA positif berarti orang yang diperiksa mengalami infeksi dengue sekitar 2 - 3 bulan sebelumnya, sehingga hasil positif dari sampel tunggal hanya bersifat sementara dan bukan berarti infeksi dengue sedang berlangsung. mengingat antibodi- IgM bertahan selama 2 - 3 bulan (Gubler, 1998)

Agar didapatkan hasil Uji ELISA yang optimal sangat tergantung pada ketelitian mengoptimalisasi kondisi saat itu. Hasil sangat dipengaruhi oleh waktu inkubasi, efek pH dari larutan buffer, pelapis antigen, dan kadar dari pelbagai detektor yang digunakan (Handoyo, 1996). Selain itu lama, suhu dan bentuk penyimpanan bahan sampel sebelum pemeriksaan akan berpengaruh pada stabilitas IgM dan IgG yang ada (Ruangturakit *et al*, 1994)

B. Deteksi virus atau antigen virus

Terdapat 2 cara untuk deteksi virus atau antigen virus, yaitu isolasi virus dengan menggunakan kultur dan tehnik hibridisasi RNA virus yang disebut sebagai "*Polymerase Chain Reaction*" (*PCR*), (WHO, 1997)

- a. Isolasi virus dengue dengan kultur merupakan sarana diagnosis pasti (WHO, 1997) tetapi peleksanaannya memerlukan waktu yang cukup lama, untuk inkubasi memerlukan waktu 5-7 hari (Link, 1992; Virus

Laboratory Singapore, 1993), keberhasilan metode ini tergantung saat pengambilan spesimen pada waktu penderita datang, mengingat masa viremia infeksi dengue begitu pendek dengan puncak 2 hari menjelang panas sampai 2 hari pertama panas (Sutaryo, 1997) atau pada saat 3 – 5 hari pertama sakit (Link, 1992; Virus Laboratory Singapore, 1993).

- b. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu cara atau metode untuk memperbanyak untai ganda DNA pada daerah tertentu yang kita inginkan, secara invitro.

Ada 3 tahap dalam PCR yaitu:

- i. Tahap pertama tahap denaturasi, yaitu tahapan dalam suhu tinggi (93-950C) dimana untai ganda DNA (ds DNA) terpisah menjadi untai tunggal (ss DNA), sehingga akan memungkinkan terjadinya proses *annealing*.
- ii. Tahap kedua tahap penempelan/*annealing* dari pasangan primer pada DNA target pada posisi komplementnya yaitu pada dua daerah yang berbeda yang mengapit bagian yang akan digandakan, proses ini berlangsung pada suhu antara 50 – 68^o C disesuaikan dengan ukuran dan kandungan nukleotida dari primer
- iii. Tahap ketiga adalah *extension* yang terjadi pada suhu 70 –72^o C, yaitu proses sintesis yang dimulai dari posisi primer dan diteruskan sepanjang DNA target dengan terjadi penambahan nukleotida satu demi satu sesuai dengan (komplementeri) dengan urutan nukleotida pada template hingga selesai mensintesa satu untai DNA yang

komplementer dengan DNA template. Karena proses penggandaan ini hanya terjadi pada daerah yang telah ditentukan, maka proses ini juga memberikan spesifitas yang tinggi.

Namun demikian kedua metode diatas sampai saat ini masih sulit diterapkan secara luas, karena selain faktor tehnik yang cukup rumit juga perlu biaya yang cukup mahal. (WHO, 1997).

Suatu cara pemeriksaan yang baru, yang diharapkan dapat dipakai untuk mendeteksi DEN berdasarkan imunoensim adalah pemeriksaan imunositokimia, ialah salah satu tehnik pemeriksaan imunologik. menggunakan metode imunohistokimia enzim yang sifatnya spesifik, dan bertujuan untuk membantu diagnosis atau deteksi adanya antigen dalam jaringan biopsi, sediaan sitologi atau cairan spesimen klinik yang terinfeksi oleh kuman patogen (Wasito, 1991).

Prinsip dasar pemeriksaan imunositokimia, adanya antigen antibodi kompleks yang dapat dideteksi, apabila antibodi yang mengikatnya telah dilakukan labelisasi menggunakan aktifitas enzim, selanjutnya dengan penambahan substrat dan kromogen akan terlihat warna dan dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop.

2.9. Dasar Pemilihan Pemeriksaan Imunositokimia Untuk Menegakkan Diagnosis DBD

Manifestasi klinis infeksi virus DEN sangat bervariasi dari asimtomatik, demam ringan yang tidak spesifik, DBD hingga DSS dimana DBD atau DSS mempunyai bentuk yang lebih berat dibanding bentuk lainnya, yang ditandai dengan demam akut, adanya manifestasi perdarahan, peningkatan permeabilitas

pembuluh darah, kebocoran plasma yang seringkali menimbulkan syock dan kematian. (Halstead, 1990; Nimmanitya, 1993; Nimmanitya, 1996). Namun demikian terutama pada stadium awal dimana gejalanya kurang begitu khas, bentuk-bentuk demam diatas suht dibedakan sehingga menyulitkan para klinisi untuk menegakkan diagnose secara dini, juga dalam hal penatalaksanaannya (Fatzi, 1998).

Untuk mengurangi angka kejadian DBD atau DSS, yang berarti juga akan menurunkan angka kematian, kiranya perlu dicari sarana diagnostik yang cepat yang dapat membedakan antara DBD atau DSS dengan bentuk-bentuk demam lain yang lebih ringan, pada stadium awal.

Selama ini diagnosis DBD didasarkan pada kriteria WHO : adanya demam mendadak tinggi sekitar 2 –7 hari, manifestasi perdarahan : (uji RI, (+), *petechiae*, *echymose*, perdarahan hidung, perdarahan gusi) serta didukung hasil pemeriksaan laboratorik antara lain trombositopeni dan hemokonsentrasi.

Pada stadium awal, diagnosis pasti DBD atau DSS ditegakkan berdasarkan pemeriksaan laboratorik yaitu isolasi virus atau memeriksa serologi sistem imun (tanggap kebal) penderita dengan melacak antibodinya, antara lain IgM, IgG penderita terhadap antigen virus DEN yaitu dengan pemeriksaan HI-test (hemaglutinasi test) , CF test (Complemen fiksasi test), NT-test (Netralisasi test), *Immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA)* serta *Indirect immunoglobulin Gi-Elisa*

Tetapi untuk membuat diagnosis pasti DBD, pemeriksaan serologi masih banyak kendalanya. Untuk HI-test selain masih banyak terjadi reaksi silang

terhadap serotipe - spesifik virus DEN 1,2,3,4 atau bahkan terhadap jenis arbo virus lain seperti *Javanese Encephalitis*, *Cikungunya virus*, *Kedah virus* atau *Ross River virus*, juga pemeriksaan HI-test hasilnya lama, paling cepat 7-10 hari, bahkan kadang-kadang sampai satu bulan lebih, juga perlu 2 macam sampel. Sedangkan pemeriksaan CF-test dan NT test terdapat kendala berupa sensitifitas dan spesifitasnya yang rendah (Suwardji, 1996; Gubler, 1998). Uji MAC-ELISA positif berarti orang yang diperiksa mengalami infeksi dengue sekitar 2 – 3 bulan sebelumnya, sehingga hasil positif dari sampel tunggal, hanya bersifat sementara dan bukan berarti infeksi dengue sedang berlangsung, mengingat antibodi IgM bertahan selama 2 – 3 bulan.

Uji indirek IgG-Elisa sebanding dengan uji HI dan dapat digunakan untuk membedakan infeksi primer dan sekunder. Uji ini sederhana dan mudah dikerjakan, karenanya berguna untuk pengujian jumlah besar. IgG-Elisa sangat tidak spesifik dan menimbulkan reaksi silang diantara flavivirus seperti uji HI. Oleh karena itu tidak dapat digunakan untuk identifikasi serotipe virus dengue penyebab infeksi (Gubler, 1998). Sehingga isolasi virus merupakan pilihan utama didalam menegakkan diagnose DBD.

Isolasi virus dapat dikerjakan dengan kultur pada sel nyamuk atau inokulasi pada nyamuk, tetapi cara ini selain membutuhkan waktu yang lama, biayanya mahal, membutuhkan peralatan khusus, juga membutuhkan ketrampilan tertentu. Cara terbaru untuk deteksi virus adalah dengan cara "*Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction RT-PCR*" namun cara ini selain

Teknik immunositokimia dalam diagnosis penyakit terdiri dari 4 jenis amplifikasi pemeriksaan :

- (a) Dengan Peroksidase anti Peroksidase (PAP)
- (b) Dengan Alkaline Phosphatase Anti Alkaline Phosphatase (APAAP)
- (c) Dengan Avidin-Biotin Kompleks (ABC)
- (d) Dengan Streptavidin-Biotin (SB)

2.10.1. Immunositokimia dengan Peroksidase Anti Peroksidase (PAP)

Metode PAP merupakan varian dari metode uji imunoperoxidase dimana prinsip kerjanya mendeteksi adanya antigen atau mencari lokalisasi antigen dalam jaringan atau sel dan spesimen klinik, dengan mereaksikan antigen yang dicari dengan antibodi spesifik yang sebelumnya telah dilabel enzim, tanpa merusak daya reaksi dan spesifitas imunologisnya.

Dalam teknik PAP diperlukan 3 tahapan antara lain: sediaan jaringan diinkubasikan dengan antibodi kelinci (*rabbit antibody*) yang akan bereaksi dengan antigen jaringan. Selanjutnya, sediaan jaringan diberi *antirabbit globulin* dan dilanjutkan diberi imun kompleks yang terdiri dari dari *rabbit* antiperoxidase yang terikat pada *peroksidase*. Imun kompleks tersebut terikat pada bagian-bagian ikatan bebas antiglobulin yang kemudian dapat terdeteksi dengan menggunakan substrat yang telah tersedia.

2.10.2. Immunositokimia dengan Alkaline Phosphatase Anti Alkaline Phosphatase (APAAP)

Prinsip dasar kerja APAAP adalah adanya *cryl amines primer* yang jika direaksikan dengan *alkyl nitrets* dalam media asam akan membentuk senyawa-senyawa *ozo*. Senyawa tersebut dapat bereaksi dengan *substitued naphthol* menghasilkan pengecatan yang tidak larut dan bersifat kromogenik.

Pada prosedur imunositokimia alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase tersebut *phosphat ester 6-bromo-2-3-naphthoic acid* (larutan bufer substrat) digunakan sebagai *substrat*. Hidrolisis ensimatik terjadi dengan adanya *diazotized amino-2 diethoxybenzanilide*.

2.10.3. Immunositokimia dengan Avidin Biotin Kompleks (ABC)

Avidin adalah suatu glikoprotein dengan berat molekul 68.000, yang berasal dari putih telur yang mempunyai afinitas tinggi terhadap *biotin*. Sedangkan *biotin* merupakan vitamin yang larut dalam air dan mempunyai berat molekul rendah yaitu 244, namun dapat bergabung dengan berbagai macam protein dan asam nukleat termasuk reseptor immunoglobulin.

Pada *avidin* mempunyai 4 bagian ikatan untuk molekul *biotin*, sedangkan *biotin* sendiri dengan mudah dapat bergabung dengan protein termasuk antibodi dan kemudian bereaksi dengan *fluorochrome-coupled avidin*. Sesudah reaksi antigen dengan *antabeled antibody*, maka

ditambahkan *biotin-labeled second antibody*. Karena banyak molekul-molekul biotin dapat bergabung dengan avidin, maka penambahan selanjutnya *fluorochrom labeled avidin* akan menghasilkan suatu ikatan kuat dengan membentuk suatu pewarnaan yang jelas. (Hsu *et al.*, 1981; Wasito 1991).

2.10.4. Immunositokimia dengan Streptavidin – Biotin (SB)

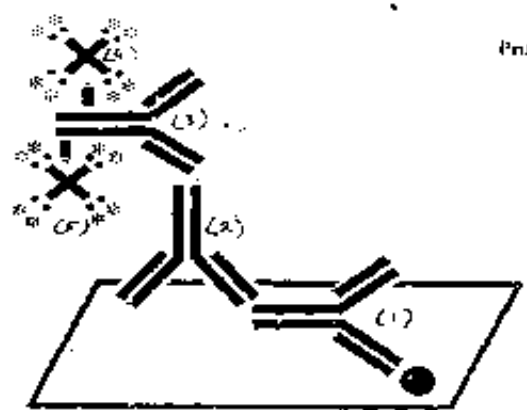
Streptavidin-biotin merupakan suatu metode immunositokimia, yang saat ini banyak digunakan dalam bidang imunologis. Prinsip dasar tehnik immunositokimia menurut metode *streptavidin-biotin*, adalah adanya antigen target diinkubasi dengan antibodi primer selanjutnya ditambah antibodi sekunder-biotin, penghubung antibodi primer dan streptavidin enzim. Pemberian *streptavidin* akan mengikat residu biotin pada antibodi penghubung dan adanya enzim terlihat dengan penambahan substrat kromogen. Enzim akan mengkatalisis substrat dan mengubah kromogen menjadi endapan berwarna kecoklatan.

2.11. Cara Pemeriksaan Immunositokimia dengan Streptavidin-Biotin

Prinsip dasar tehnik pemeriksaan *streptavidin-biotin* adalah sebagai berikut :

1. Sediaan yang mengandung antigen dari spesimen klinik, sebelumnya dilakukan fiksasi terlebih dahulu misalnya dengan formalin atau acetou.
- 2 Antibodi primer, spesifik yang dapat mengikat antigen-antigen target diteteskan pada sediaan.

Prinsip dasar immunositokimia dengan streptavidin –biotin untuk pemeriksaan virus DEN dapat dilihat pada gambar 3



1. *Antigen* : Virus dengue pada monosit.
2. *Antibodi primer* : Mouse anti dengue kompleks antibodi monoklonal
3. *Antibodi sekunder* : "Biotinylated Goat Anti Polyaleni"
4. *Labelisasi enzim* : Streptavidin peroksidase.
5. *Pewarna* : Substrat chromogen

Gambar 3. Skematis pemeriksaan virus DEN di permukaan monosit dengan Uji immunositokimia dengan Streptavidin Biotin.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep

Landasan konsep dan teori yang digunakan untuk memecahkan permasalahan mengenai diagnosis DBD dengan menggunakan pendekatan baru melalui pemeriksaan immunositokimia dengan Streptavidin-biotin adalah sebagai berikut :

- 3.1.1. Landasan konsep dan teori mengenai keberadaan virus dengue di dalam monosit pada penderita DBD untuk infeksi virus dengue pertama kali (infeksi primer) maupun infeksi yang kedua kali (infeksi sekunder).
- 3.1.2. Landasan konsep dan teori mengenai permasalahan diagnosis dini pada penyakit DBD dan pendekatan baru menggunakan pemeriksaan immunositokimia sebagai usaha mencegah timbulnya penyakit yang berkelanjutan (*syock*).
- 3.1.3. Landasan konsep dan teori mengenai penggunaan pendekatan baru pemeriksaan immunositokimia dengan streptavidin biotin sebagai sarana penunjang diagnosis dini DBD.

3.1.1. Konsep 1 : Landasan konsep dan teori mengenai keberadaan virus di dalam monosit penderita DBD untuk infeksi virus dengue pertama kali (infeksi primer) maupun infeksi yang kedua kalinya (infeksi sekunder).

Pada infeksi virus DEN yang pertama kali, setelah mengalami masa inkubasi akan terjadi viremia yaitu adanya virus di dalam darah. Viremia ini berjalan singkat mulai 2 hari sebelum gejala panas dan mencapai puncaknya setelah 2 hari pertama panas dan akan menghilang pada hari ke 6 – 7 sesudah panas bersamaan dengan timbulnya antibodi. Selama terjadi viremia maka target utama yang diserang virus adalah monosit yang beredar di dalam tubuh penderita. Namun tubuh akan membentuk antibodi yang memiliki aktifitas netralisasi yang akan mengenali protein E juga antibodi monoklonal terhadap NS1, Pre M dan NS3 dari virus penyebab, dan akan menyebabkan lisis sel yang terinfeksi virus tersebut melalui aktifitas netralisasi atau aktivasi komplemen.

Apabila terjadi infeksi virus dengue kedua, apabila infeksi oleh virus yang homolog maka akan segera dinetralisir sedang bila virusnya heterolog (virus serotipe lain) maka akan terjadi reaksi silang, virus DEN penyebab infeksi kedua tidak dinetralisir dan bebas berkembang biak didalam monosit dan akan membentuk "*antibodi virus kompleks*" yang akan menempel pada bagian Fc reseptor dipermukaan monosit melalui bagian Fc bebas dari IgG. "*Antibodi virus kompleks*" tersebut akan meliputi monosit yang beredar dan antibodi tersebut akan bersifat opsonisasi, internalisasi sehingga monosit mudah terinfeksi. Kemudian monosit akan teraktifasi dan akan memproduksi IL-1, IL-6, TNF alfa dan

"*Platelet Activating factor*" *Antibodi virus kompleks*" tersebut juga akan memacu koplemen sehingga akan mengeluarkan mediator anafilatoxin C3a dan C5a. C3a akan berefek meningkatkan permeabilitas kapiler, meningkatkan efek kemotaktik dari netrofil dan juga mengeluarkan TNF α , Interferon gamma, IL-1, IL-2 serta menyebabkan degranulasi sel mast yang diikuti dengan pelepasan histamin serta menstimuli prostaglandin dan radikal bebas yang bersifat vaso aktif dan prokoagulan sehingga menimbulkan kebocoran plasma (*Syock hipovolemik*) dan perdarahan..

Oleh karena itu dengan mengetahui keberadaan virus dipertukaran monosit penderita secara dini, kemungkinan terjadinya *syock* dan perdarahan akan dapat dicegah.

3.1.2. Landasan konsep dan teori mengenai permasalahan diagnosis pada penyakit DBD dan pendekatan baru menggunakan pemeriksaan immunositokimia sebagai usaha mencegah terjadinya infeksi yang berkelanjutan (*Syock dan perdarahan*)

Diagnosis DBD pada umumnya ditegakkan berdasarkan kriteria WHO yaitu adanya demam mendadak yang terus menerus berlangsung selama 2-7 hari . ditunjang dengan pemeriksaan laboratorium adanya trombositopenia dan peningkatan hematokrit serta adanya tanda perdarahan dalam hal ini adanya tonket positif

Karena gejala klinis yang tidak patognomonik serta adanya kemiripan gejala dengan penyakit demam yang lain, maka diagnosis DBD perlu ditunjang dengan pemeriksaan laboratorium yang lain antara lain uji serologi melalui uji hemaglutinasi inhibisi atau dengan menentukan IgM

dan IgG anti - dengue. Namun cara-cara diatas sering terjadi kesulitan dalam pelaksanaannya. Pada uji HI dibutuhkan 2 seri darah yaitu darah akut dan darahkonvalescen , sedangkan deteksi antibodi spesifik IgMdan IgG perlu waktu untuk menunggu terjadinya antibodi, serta kemungkinan terjadinya hasil positif palsu akibat infeksi dengue yang lalu.

Saat ini cara yang terbaik untuk menentukan diagnosis pasti DBD dengan mendeteksi virus penyebabnya berdasarkan isolasi virus dengan isolasi virus atau dengan teknik hibridisasi RNA dengan PCR. Kedua cara tersebut meskipun dapat dipakai untuk alat diagnosis pasti namun untuk diagnosis dini masih banyak kendalanya, antara lain faktor teknis yang cukup rumit, hasilnya butuh waktu lama , beayanya mahal juga angka positvitas di lapangan sangat bervariasi. Hal tersebut disebabkan karena pengambilan sampel yang relatif sulit, perlu waktu yang tepat mengingat nasa viremia yang sangat pendek dan kondisi penderita yang kadang datang sudah terlambat.

Maka perlu dicari jenis pemeriksaan laboratorium lain yang lebih handal, lebih spesifik relatif lebih murah, cepat namun tepat untuk menegakkan diagnosis DBD yaitu dengan pemeriksaan immunositokimia dengan streptavidin - biotin.

3.1.3 Landasan konsep dan teori mengenai penggunaan pendekatan baru pemeriksaan immunositokimia dengan streptavidin biotin sebagai sarana penunjang diagnosis DBD

Pemeriksaan immunositokimia dengan streptavidin biotin, adalah suatu jenis pemeriksaan untuk mendeteksi adanya antigen diberbagai

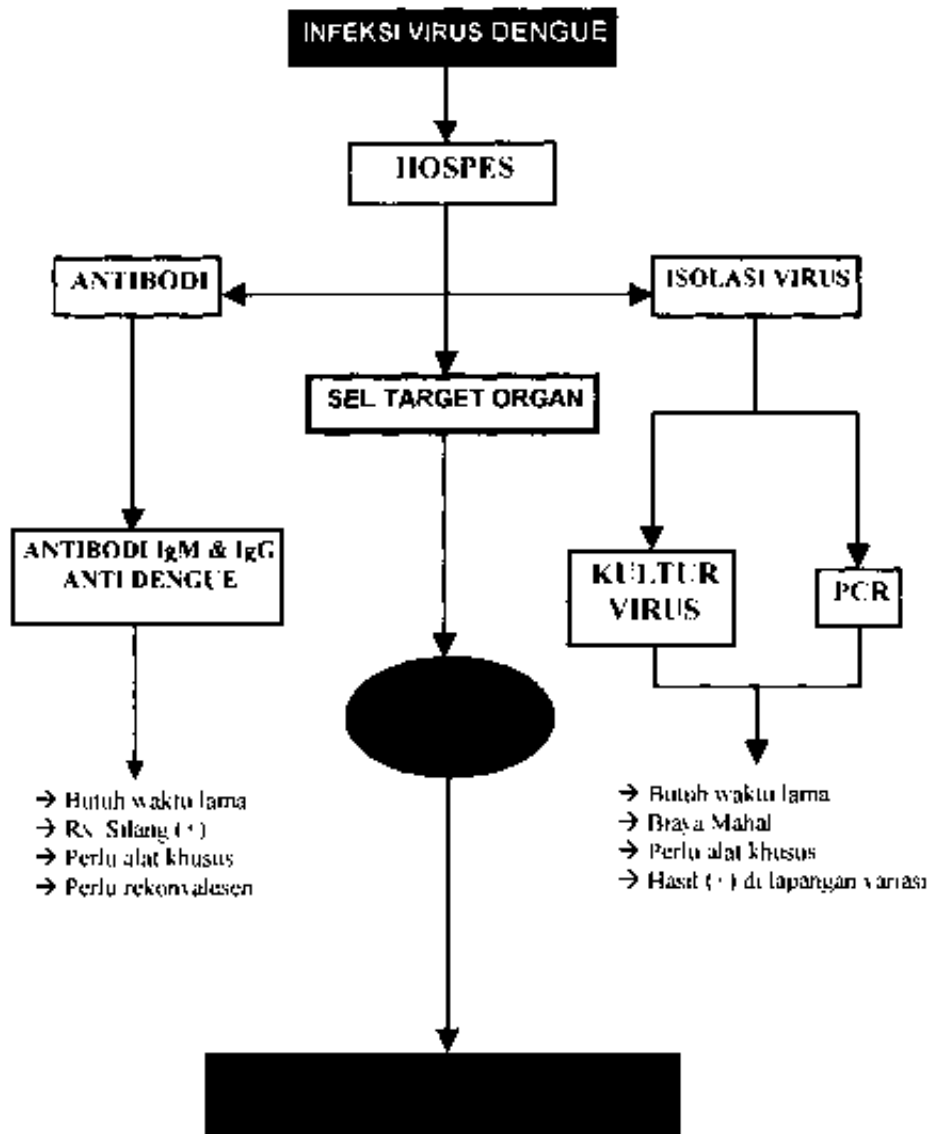
jaringan yang terinfeksi. Oleh karena itu dengan pemeriksaan immunositokimia dimungkinkan dapat melakukan deteksi antigen virus DEN yang ada di dalam monosit yang beredar pada penderita DBD baik pada infeksi primer maupun sekunder.

Dipilih metode streptavidin-biotin karena teknik pemeriksaan ini merupakan salah satu uji diagnostik yang handal dan berdasarkan berbagai hasil laporan penelitian, uji streptavidin - biotin dapat digunakan sebagai uji diagnosis berbagai penyakit infeksi, validitasnya cukup tinggi bila dibandingkan dengan jenis pemeriksaan immunositokimia lainnya.

Dasar reaksi uji streptavidin - biotin adalah terjadinya ikatan antara antigen (virus DEN pada monosit) dengan antibodi (antibodi primer yang mengandung anti - dengue monoklonal kompleks). Agar ikatan lebih kuat dilakukan ikatan lain dengan "*biotynilated secondary antibody*" selanjutnya agar dapat dilihat dengan mata secara mikroskopis maka diperlukan labelisasi dengan enzim streptavidin peroksidase dan ditambah pewarna substrat kromogen.

Hasil yang positif, secara mikroskopis akan terlihat warna kecoklatan pada preparat *PBMK* yang telah dilakukan uji immunositokimia dengan streptavidin biotin. Hasil yang positif berarti ditemukan antigen virus yang berarti diagnosis DBD dapat ditegakkan.

3.2. BAGAN KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN



*Lebih mudah, sederhana, cepat dan tepat oleh karena menggunakan
ANTIBODY ANTI DENGUE MONOKLONAL KOMPLEKS
Untuk mendeteksi virus DEN pada permukaan monosit*

3.3. Keaslian Penelitian.

Deteksi virus (Flavivirus) dengan metode immunositokimia dan IPMA (*Immuno Peroxidase Monolayer Assay*) pernah dilaporkan oleh Wasito dan Hastari (1996). Sedangkan deteksi virus DEN dengan metode *Fluorogenic enzyme-linked immunosorbent assay (F-Elisa)* dengan streptavidin - biotin telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya (Malergue, Cungue,1995).

Penelitian untuk deteksi antigen virus dengue pada permukaan monosit yang diisolasi dari *buffy coat* dengan metode streptavidin - biotin belum dikerjakan. Sehingga penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi antigen virus DEN pada permukaan monosit dengan metode streptavidin - biotin

3.4. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan landasan teori dan latar belakang masalah tersebut di atas maka hipotesis yang diajukan :

- 3.3.1 Pemeriksaan immunositokimia metode *streptavidin-biotin* dapat digunakan untuk mendeteksi antigen virus DEN dipermukaan monosit dan dapat digunakan sebagai sarana diagnostik untuk diagnosis DBD.
- 3.3.2 Pemeriksaan immunositokimia dengan *streptavidin-biotin* merupakan uji laboratorium dengan tingkat sensitivitas dan spesivitas yang tinggi, sehingga mempunyai nilai diagnostik yang handal serta dapat digunakan untuk menentukan diagnosis DBD.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah suatu jenis penelitian eksperimental laboratorium, untuk menilai suatu uji diagnostik yang dilaksanakan dengan pendekatan sesaat (*Cross Sectional*) dan bersifat komparatif.

4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.2.1 Lokasi Penelitian

Rumah Sakit Umum Kasih Ibu Surakarta, Laboratorium Sarana Medika Surakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada Yogyakarta

4.2.2 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan selama 1 tahun dengan tahap-tahap sebagai berikut

Tahap 1 Tahap persiapan, dilakukan selama 6 bulan, meliputi perjinan dan persiapan laboratorium antara lain menyiapkan reagen penelitian baik untuk pemeriksaan darah rutin, serologi maupun untuk pemeriksaan immunositokimia. Persiapan alat-alat meliputi jarum injeksi, tabung reaksi, obyek glas dan juga cover glass

Tahap 2 Tahap penelitian dilakukan selama 6 bulan meliputi pengambilan sampel, identifikasi sampel penelitian sesuai kriteria, dan penelitian (pemeriksaan klinis tersangka, pemeriksaan darah, pemeriksaan immunositokimia) dan penulisan disertasi.

4.3. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah penderita tersangka DBD yang datang berobat ke RSUD Kasih Ibu Surakarta. Diagnosis didasarkan kriteria WHO dari hasil pemeriksaan klinis melalui anamnesis, pemeriksaan laboratorium dengan pemeriksaan darah meliputi pemeriksaan jumlah trombosit dan nilai hematokrit.

4.3.1 Jenis Sampel Penelitian

Jenis sampel penelitian berupa darah vena dan penderita tersangka DBD sebanyak 10 cc

Kriteria Sampel :

4.3.1.1 Kriteria penerimaan sampel penderita DBD

Sampel yang diterima sebagai sampel penelitian (kriteria inklusi) adalah: darah vena dari penderita tersangka DBD baik pria maupun wanita dewasa. Kriteria diagnosis berdasarkan kriteria WHO baik klinis maupun laboratoris berdasarkan hasil pemeriksaan klinis yaitu panas 2-7 hari dan disertai hasil pemeriksaan laboratorium dengan trombositopenia dan peningkatan nilai hematokrit.

4.3.1.2 Kriteria penolakan sampel

Sampel yang tidak diterima sebagai sampel penelitian (kriteria eksklusif) adalah :

Febris lebih 7 hari atau febris kurang 7 hari dengan gejala ISPA, jumlah trombosit normal dan nilai hematokrit dalam batas normal

4.3.2 Cara pengambilan sampel penelitian

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara " *proporsif random sampling* " yaitu dengan memilih kelompok subyek penelitian penderita DBD, sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan.

4.3.3 Estimasi besar sampel

Besar sampel ditetapkan dengan menggunakan rumus statistik yang sesuai untuk penelitian uji diagnostik dengan pendekatan *cross sectional* adalah dengan jumlah populasi (N) yang tidak diketahui (Pudjrahardjo, 1993).

$$\text{Rumus } n : \frac{\{z\alpha \sqrt{2p(1-p)} + z\beta \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}\}^2}{(p_1-p_2)^2}$$

$$= \frac{\{1,96\sqrt{2(0,5)(1-0,5)} + 1,89\sqrt{0,98(1-0,98) + 0,02(1-0,02)}\}^2}{(0,98-0,02)^2}$$

$$= 3.316$$

Keterangan :

- n : besar sampel,
- $z\alpha$: nilai standar normal yang besarnya tergantung derajat kemaknaan (alfa). bila harga alfa = 0,01, maka harga $z = 2,57$, bila harga alfa = 0,05, maka harga $z = 1,96$

- beta* : nilainya tergantung yang ditentukan
: 0,10 maka harga $z = 0,97$.
- p* : besarnya kemungkinan kejadian (probabilitas)
- p1* : probabilitas kelompok 1 (dengan streptavidin-biotin positif) 98%.
- p2* : probabilitas kelompok 2 (dengan streptavidin-biotin negatif) 2%.
- N jumlah sampel didapat* : 3.316 dibulatkan menjadi 6 sampel.

4.4 Standar Perbandingan

Sebagai standar perbandingan dalam penelitian ini adalah sesuai dengan kriteria WHO baik klinis maupun laboratoris yaitu klinis adanya demam mendadak tinggi 2-7 hari diikuti dengan tanda-tanda perdarahan adanya petechie, epistaxis dan RI. (+) serta laboratoris adanya trombositopenia dan peningkatan nilai hematokrit, ditunjang dengan hasil uji serologi berupa IgM anti -dengue (+) dan IgG anti- dengue (-) atau IgM anti - dengue (-) dan IgG anti - dengue (+).

4.5 Identifikasi Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Penelitian

Variabel Bebas :

Adalah penderita DBD yaitu penderita dengan demam mendadak tinggi terus menerus selama 2- 7 hari.

Variabel terikat :

Adalah hasil pemeriksaan antigen virus DEN yang ada di permukaan monosit dengan menggunakan teknik immunositokimia dengan streptavidin - biotin

4.5.2. Definisi operasional variabel

Untuk pengukuran variabel maka secara operasional variabel didefinisikan sebagai berikut :

a. Penderita tersangka DBD

Adalah penderita dengan demam mendadak tinggi terus menerus selama 2- 7 hari.

b. Virus DEN

Ternasuk genus flavivirus dari family flaviviridae berdasar sifat antigenitasnya terdapat 4 serotipe yaitu DEN-1; DEN-2; DEN-3 dan DEN-4.

c. Teknik pemeriksaan imunositokimia dengan streptavidin - biotin.

Adalah suatu jenis pemeriksaan imunositokimia dengan streptavidin biotin yang berguna untuk mendeteksi adanya antigen atau mencari lokalisasi antigen dari spesimen klinik. Pemeriksaan ini berdasarkan atas reaksi ikatan antigen – antibodi kompleks. Antigen pada penelitian ini adalah virus yang berada di permukaan monosit, sedang anti terhadap virus ini untuk dapat mengikatnya digunakan antibodi terhadap immunoglobulin manusia dari fraksi *immunoglobulin G*. Anti immunoglobulin G ini sebelumnya di labelisasi dengan menggunakan aktifitas enzim berupa enzim *streptavidin peroksidase*. Hasil pemeriksaan positif bila akan terlihat warna kecoklatan dan pembacaan dengan menggunakan mikroskop cahaya biasa. Pengukuran dilakukan secara skala nominal, untuk mengetahui

spesivitas antibodi maka kontrol negatif selalu disertakan di dalam penelitian ini dengan cara menggantikan antibodi primer dengan PBS.

4.6 Bahan dan Peralatan Penelitian.

4.6.1 Reagen dan bahan habis pakai.

Reagen : Larutan EDTA , *Dengue fever rapid test* dari PANBIO DENGUE FEVER RAPID STRIP IgG & IgM (PT Pacific Biotekindo Intralab) , *Ercoll Hepaque* (cat. 2886346 , Aceton untuk fiksasi; Buffer Sulfat ; *mouse anti dengue kompleks, byotinylated Goat Anti Polyvalent* , *Streptavidin peroxidase*, cairan *substrat chromogen* , *counter stain (mayer's Hematoxylin)*.

4.6.2 Instrumen Penelitian

Hematology automatic analyzer untuk pemeriksaan hitung trombosit dan hematokrit, lemari es untuk menyimpan sediaan atau sampel dan reagensia, pemusing yang mempunyai kecepatan putaran sebesar 3000 rpm, mikroskop cahaya untuk membaca hasil pemeriksaan teknik immunositokimia dengan streptavidin - biotin dan pipet automatic untuk pengenceran dan penetesan reagen

4.7 Prosedur Kerja Laboratorium

4.7.1. Pemilihan kasus penderita.

Semua penderita yang datang berobat ke Rumah Sakit , dipilih penderita yang berumur diatas 10 tahun baik pria maupun wanita, dan dari hasil pemeriksaan secara klinis maupun laboratoris penderita tersebut memenuhi kriteria WHO sebagai tersangka menderita DBD. Kemudian dilakukan pemeriksaan serologi dengan memeriksa Ig M – anti dengue dan Ig G – anti dengue sebagai penguat diagnosis sesuai standar pembandingan.

4.7.2 Pengambilan sampel penelitian

Sampel penelitian berupa darah vena, kemudian dibagi 2 yaitu satu bagian untuk pemeriksaan hematokrit , hitung thrombosit dan serologi , dan sebagian untuk isolasi *PBMC* (*Peripheral Blood Monosit Cell*) dimana semua darah dicampur dengan EDTA.

4.7.3 Pemeriksaan laboratorium untuk penderita DBD

4.7.3.1 Pemeriksaan Darah

4.7.3.1.1 Menghitung jumlah thrombosit dan kadar hematokrit.

Pemeriksaan hitung thrombosit dan kadar hematokrit memakai alat *hematology automatic analyzer* yang bertumpu pada prinsip *impedance*.

4.7.3.1.2 Pemeriksaan IgM dan Ig G anti - dengue

Pemeriksaan IgM dan Ig G anti dengue menggunakan Pan Bio Dengue Duo IgM & IgG Rapid Strip menggunakan metode *Rapid Captured Immunochromatographic* IgM dan IgG dengan bahan antigen protein rekombinan murni yang berasal dari 80% *N-terminal Viral Envelope Glycoprotein* yang diekspresikan dalam *Drosophila Melanogaster* strain *Schneider 2 (S2) cells* dari ke-4 serotipe virus Dengue.

4.7.3.2 Pemeriksaan immunositokimia dengan Streptavidin - Biotin.

Sebelum pemeriksaan immunositokimia terlebih dulu kita lakukan isolasi monosit dengan jalan :

1. Ambil 10 cc darah EDTA dan pusang selama 3 menit buang plasmanya, ulang lagi sampai darah tersisa 5-6 cc.
2. Kemudian dicuci dengan PBS 3 sampai 4 kali sehingga bersih dan darah tersisa sekitar 1- 2 cc
3. Kedalam tabung yang berisi 1-2 cc darah bersih dialirkan ficol lepaque (cat. 788346, Amersham Pharmacia Biotech AB SE-751.84 Uppsala Sweden) sebanyak 3 cc melewati dinding tabung, kemudian ditambah PBS dan kemudian dipusing dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit atau kecepatan 2.500 selama 10 menit

4. Ambil Butyl coattaya (PBMC) menggunakan pipet pasteur dan buat preparat hapus tipis diatas cover glas seperti membuat preparat darah tepi dan fixasi preparat tersebut dengan acetan dan keringkan dalam udara terbuka

Pemeriksaan immunositokimia dengan streptavidin biotin :

1. Sediaan yang sudah difiksasi dengan acetan dan sudah kering ditetesi dengan ultra V Block dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit
2. *Tap off* ultra V Block dan dengan kertas tissue bersihkan area di luar area pengecatan.
3. Kemudian ditetesi dengan antibodi primer (*Mouse anti dengue Complex*) dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 30 menit
4. Diteuci dengan PBS , sebanyak 4 kali dengan mengalirkan PBS dengan spuit steril atau pipet.
5. Kemudian ditetesi dengan antibodi sekunder (*Biotinylated Goat Anti Polyvalent*) dan diinkubasikan selama 5 menit, kemudian dilakukan peneueran yang sama dengan PBS juga
6. Kemudian ditetesi dengan *Streptavidin Peroxidase* dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 5 menit dan dilakukan peneueran yang sama
7. Kemudian tetesi dengan *substrat chromogen* dan diinkubasikan selama 15 menit pada suhu ruangan

8. Setelah 15 menit dicuci 4 kali dengan aquades kemudian ditetesi hematoxylin selama 30 detik , kemudian dicuci lagi dengan aquades dan setelah kering ditutup dengan *cover glass* dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 X
9. Hasil positif apabila dalam sediaan yang telah dilakukan pewarnaan dengan menggunakan streptavidin biotin akan terlihat warna merah kecoklatan

4.8 Analisis Statistik

Untuk menguji hipotesis penelitian (hipotesis pertama) dengan membuktikan ada atau tidak ada perbedaan yang bermakna antara hasil pemeriksaan adanya virus yang ada dipermukaan monosit dengan menggunakan uji immunositokimia dengan streptavidin - biotin dibandingkan dengan standar WHO baik klinis maupun laboratoris dan hasil pemeriksaan serologi pada penderita DBD melalui uji statistik "*Chi Square*" karena data yang digunakan adalah data nominal. Selanjutnya untuk menilai ketepatan diagnosis DBD melalui uji immunositokimia dengan streptavidin biotin (hipotesis kedua), ditentukan karakteristik uji immunositokimia dengan streptavidin - biotin berupa sensitivitas, spesivitas dan nilai ramal positif maupun negatif serta efisiensinya.

1. Sensitivitas diagnostik uji immunositokimia dengan streptavidin biotin.

Rumus :

$$\frac{\text{Jumlah penderita standar pembanding (+) uji immunositokimia (+)}}{\text{Jumlah semua penderita standar pembanding (+)}} \times 100\%$$

2. Spesifisitas diagnostik uji SB ditentukan dengan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah penderita standar pembandingan (+) uji immunositokimia (-)}}{\text{Jumlah semua penderita standar pembandingan (-)}} \times 100\%$$

3. Nilai ramal positif diagnostik uji immunositokimia :

$$\frac{\text{Jumlah penderita standar pembandingan (+) uji immunositokimia (+)}}{\text{Jumlah semua penderita dengan uji immunositokimia (+)}} \times 100\%$$

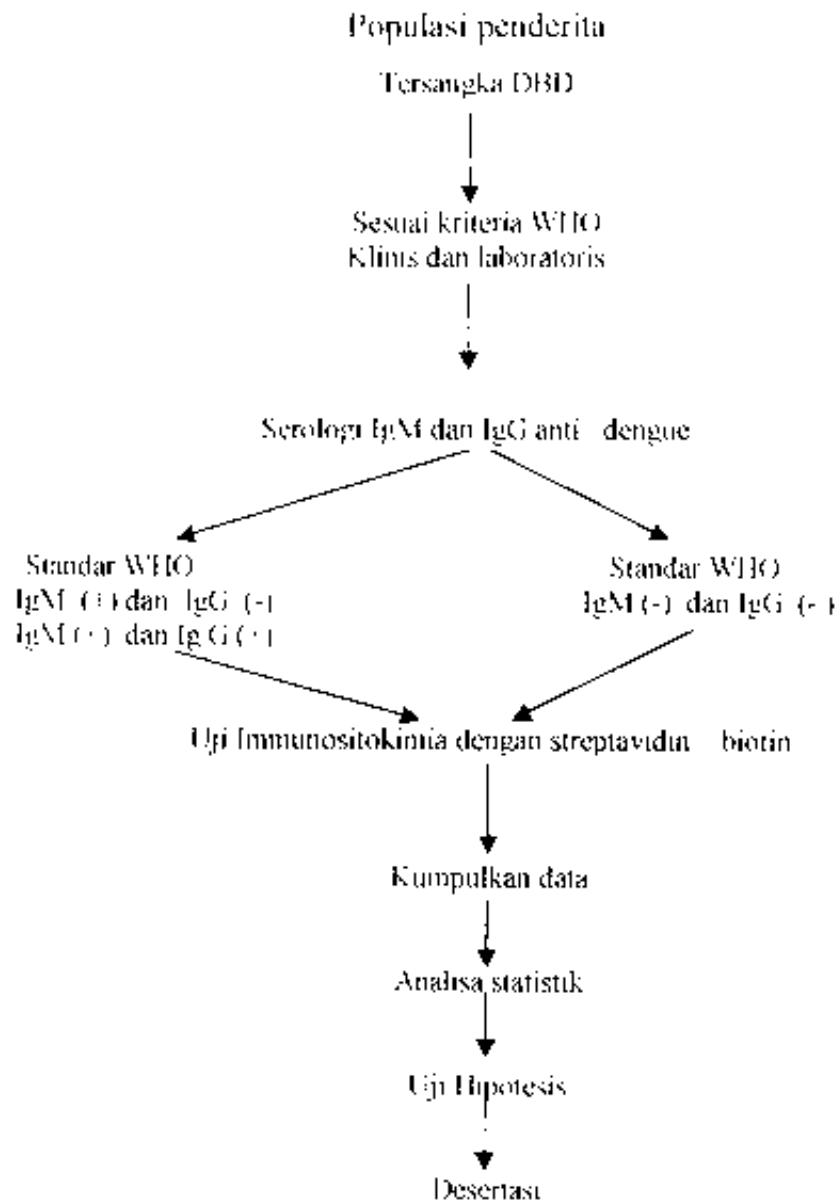
4. Nilai ramal negatif diagnostik uji immunositokimia :

$$\frac{\text{Jumlah penderita standar pembandingan (-) uji immunositokimia (-)}}{\text{Jumlah semua penderita dengan uji immunositokimia (-)}} \times 100\%$$

5. Efisiensi diagnostik uji immunositokimia:

$$\frac{\text{Jumlah penderita standar pembandingan (+)}}{\text{Jumlah seluruh penderita dalam penelitian ini}} \times 100\%$$

PROTOKOL PENELITIAN



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Diagnosis penyakit Demam Berdarah Dengue.

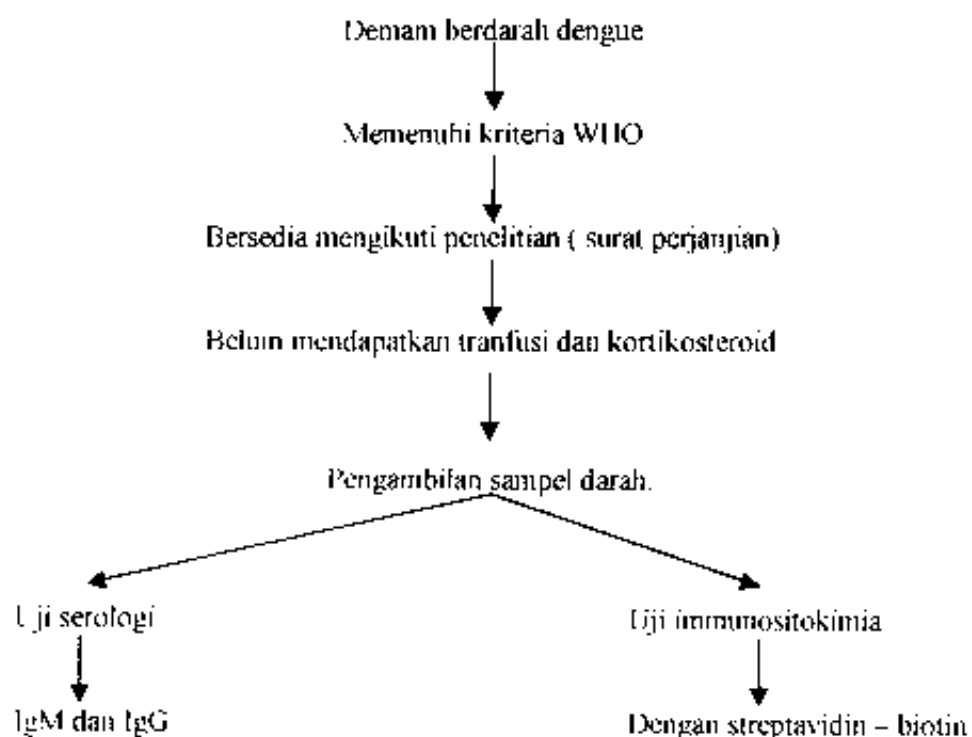
Selama kurun waktu 6 bulan yaitu bulan bulan Januari sampai Juni 2004 sesuai dengan kriteria penelitian, telah berhasil dikumpulkan sebanyak 32 penderita dengan persangkaan klinis dan laboratoris menderita DBD.

Sampel penelitian didapat dari penderita yang dirawat inap di RSUD Kasih Ibu Surakarta yang sebelumnya telah bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani surat persetujuan dan belum mendapatkan pengobatan baik transfusi maupun pemberian kortikosteroid..

Penderita yang diperiksa adalah penderita DBD baik jenis wanita maupun pria, yang berumur lebih 10 tahun. Pemilihan penderita yang berumur 10 tahun keatas ini untuk mempermudah pengambilan sampel darah mengingat pada penelitian ini dibutuhkan jumlah sampel darah 10 ml lebih, sehingga pada penderita yang berumur kurang 10 tahun mengalami kesulitan dalam pengambilan sampel. Hal ini disebabkan selain karena penderita takut diambil darahnya juga karena orang tua penderita biasanya tidak kooperatif. Selanjutnya dari 32 penderita klinis DBD diambil spesimen darahnya, darah vena yang dicampur dengan EDTA dan dibagi 2 bagian, satu bagian untuk pemeriksaan IgM dan IgG anti dengue. Sebagian untuk pemeriksaan immunositokima dengan streptavidin - biotin untuk mendeteksi antigen virus dari *PBMC*' nya.

Dari 32 penderita khnis tersangka DBD setelah diketahui hasil pemeriksaan uji serologinya, maka untuk memudahkan analisa statistik dibagi 3 kelompok: pertama terdiri dari 18 penderita DBD dengan hasil pemeriksaan IgM anti dengue (+) dan IgG anti - dengue (+) dan kelompok kedua terdiri dari 7 penderita DBD dengan hasil pemeriksaan IgM anti - dengue (+) dan IgG anti - dengue (-) serta kelompok ketiga terdiri dari 7 penderita hasil pemerksaan IgM anti-dengue (-) dan IgG anti - dengue (-).

Tahapan-tahapan prosedur yang telah dilakukan pada penelitian ini serta hasilnya seperti diperlihatkan pada bagan dibawah ini.

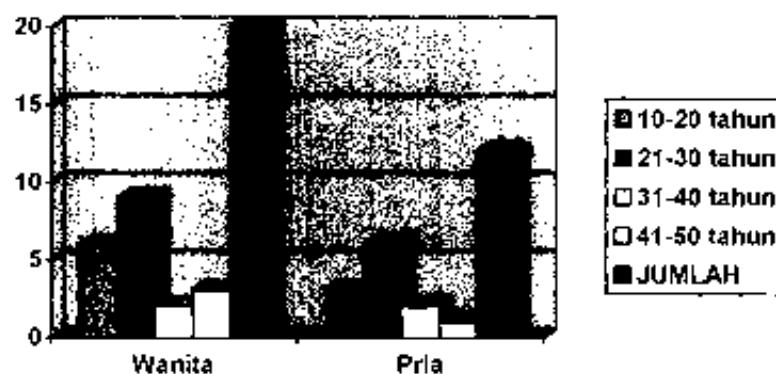


5.2 Distribusi Penderita Berdasarkan Umur dan Jenis Kelamin

Dari tabel 1 dibawah ini, dilaporkan distribusi penderita menurut umur dan jenis kelamin. Dari 32 penderita, penderita wanita yang berumur antara 10-30 th sebanyak 6 atau (18,75%), yang berumur 31-40 tahun sebanyak 9 (28,125%), yang berumur antara 41-50 th sebanyak 2 (6,25 %) dan yang berumur 41-50 tahun sebanyak 3 orang (9,375 %). Penderita pria yang berumur antara 10-20 th sebanyak 3 (9,375 %), yang berumur 21-30 th sebanyak 6 (18,75 %), yang umur antara 31-40 th sebanyak 2 (6,25 %) dan berumur antara 41-50 th sebanyak 1 (3,125 %).

Tabel 1. Distribusi penderita DBD berdasarkan umur dan jenis kelamin

Umur	Wanita	Pria
10-20 tahun	6 (18,75%)	3 (9,375%)
21-30 tahun	9 (28,125%)	6 (18,75%)
31-40 tahun	2 (6,25%)	2 (6,25%)
41-50 tahun	3 (9,375%)	1(3,125%)
Jumlah	20 (62,50%)	12 (37,50%)



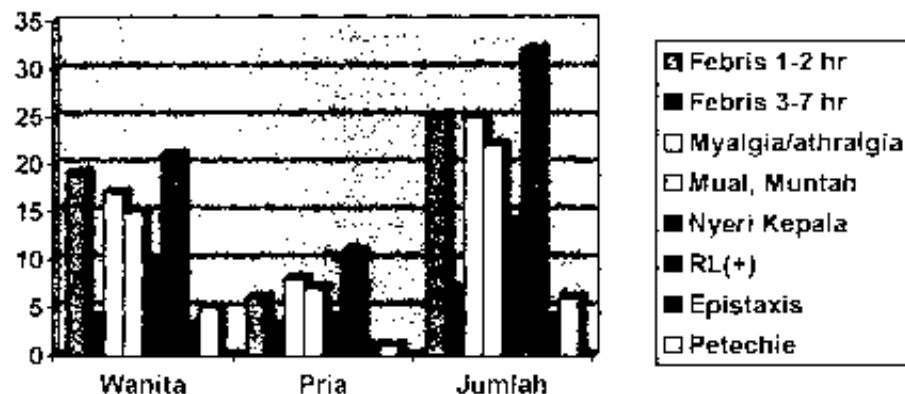
Gambar 4. Grafik distribusi penderita DBD berdasarkan umur dan jenis kelamin.

Dari hasil distribusi DBD berdasarkan umur dan jenis kelamin terlihat disini penderita umur 21-30 th menunjukkan angka terbanyak hal ini sesuai dengan kepustakaan (Sugiyanto, 2004) yang menyebutkan distribusi penderita DBD yang berumur 15 keatas jumlahnya meningkat. Dari tabel 1 juga dapat dilihat bahwa distribusi penderita dengan jenis kelamin ternyata wanita lebih banyak dari pada pria, hal ini berbeda dengan beberapa kepustakaan yang menyebutkan pada umumnya pria dan wanita mempunyai perbandingan yang sama. Chan (1987) menyebutkan bahwa penderita wanita dan pria di Filipina berbanding 1:1, Nimmanitya (1987) di Thailand menyebutkan meskipun kasus berat lebih banyak pada wanita, tetapi secara statistik tidak banyak berbeda, Sutaryo (2004) menyebutkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara jumlah kasus pria dan wanita di Indonesia

Dari tabel 2, terlihat distribusi penderita menurut gejala klinis terlihat bahwa gejala klinis penderita yang menonjol adalah adanya panas yang terus menerus kurang dari 7 hari, gangguan gastrointestinal berupa mual muntah dan gangguan perdarahan yang berupa RL (+), hal ini sesuai dengan kepustakaan yang ada. WHO (1997) menyebutkan bahwa fenomena perdarahan paling umum adalah tes torniket positif, menurut Sutaryo (2004) manifestasi perdarahan yang minimal adalah tes torniket (+), sedangkan perdarahan yang berupa epistaxis hanya ditemukan pada beberapa kasus.

Tabel 2. Distribusi penderita menurut gejala klinis

Gejala klinis	Wanita	Pria	Jumlah
Febris 1-2 hari	19	6	25
Febris 3-7 hari	4	3	7
Myalgia/athralgia	17	8	25
Mual, muntah	15	7	22
Nyeri kepala	10	4	14
RL (+)	21	11	32
Epistaxis	5	1	6
Peteklie	5	1	6



Gambar 5. Grafik distribusi penderita DBD menurut gejala klinis

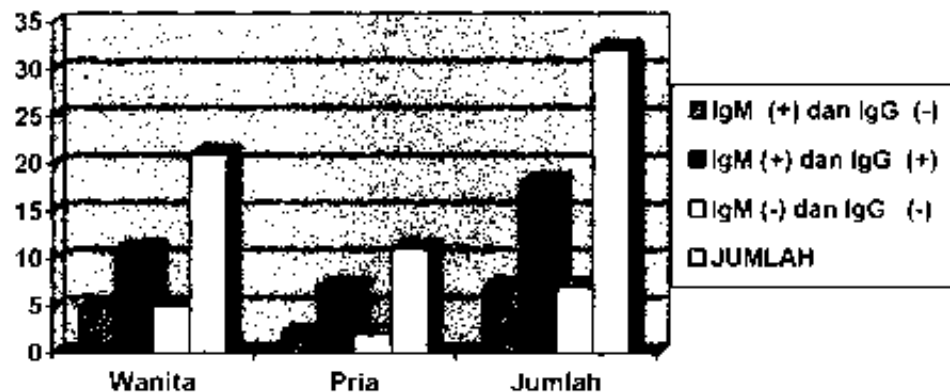
5.3. Gambaran Serologis hasil deteksi Antibodi Ig M dan Ig G anti dengue pada penderita DBD.

Secara keseluruhan hasil uji serologi untuk mendeteksi adanya antibodi Ig M dan Ig G anti-dengue pada penderita tersangka DBD dengan menggunakan metode *rapid test diagnostik* telah menunjukkan hasil sebagai berikut :

Dari 32 penderita tersangka DBD didapatkan hasil IgM (-) dan IgG(-) sebanyak 7 orang (21,875%), IgM(+) dan IgG (-) sebanyak 18 orang (56,25%) sedang sisanya 7 orang (21,875%) hasilnya IgM anti - dengue(-) dan IgG anti dengue(-)

Tabel 3. Hasil serologis antibodi Ig M dan Ig G anti dengue pada penderita tersangka DBD

Hasil pemeriksaan serologi kekebalan tubuh	Wanita		Pria		Jumlah	
	N	%	N	%	N	%
Antibodi Ig M dan Ig G anti dengue						
IgM (+) dan IgG (-)	5	15,6	2	6,2	7	21,9
IgM (+) dan IgG (+)	11	34,4	7	21,9	18	56,2
IgM (-) dan IgG (-)	5	15,6	2	6,2	7	21,9
Jumlah	21	65,6	11	34,4	32	100



Gambar 6. Grafik hasil serologis antibodi IgM dan IgG anti dengue pada penderita tersangka DBD

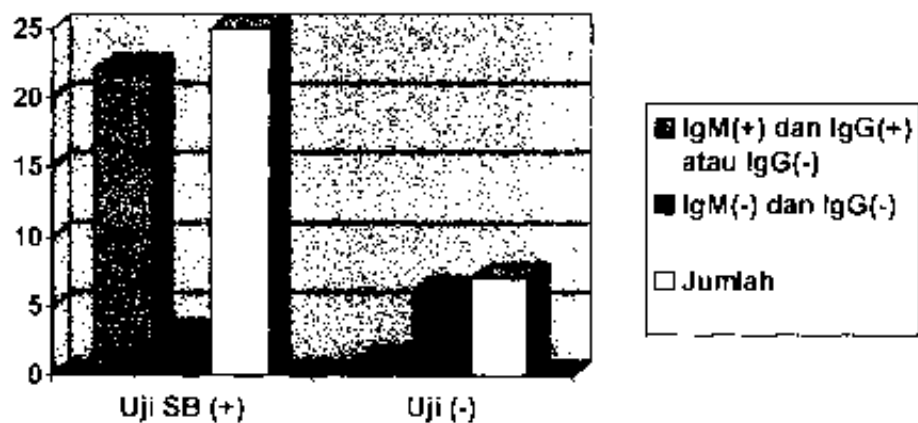
5.4. Gambaran hasil uji Immunositokimia dengan streptavidin - biotin pada ketiga kelompok penderita tersangka DBD berdasarkan hasil uji serologi IgM dan IgG sebagai uji diagnostik.

Pada tabel 4 terlihat hasil uji serologi IgM dan IgG anti - dengue dan hasil uji immunositokimia dengan streptavidin - biotin. Untuk mengetahui apakah hasil uji immunositokimia ini dapat digunakan secara bermakna sebagai uji diagnostik untuk penderita tersangka DBD maka hasil uji immunositokimia ini dilakukan

uji statistik terhadap ketiga kelompok diatas. Uji statistik yang digunakan *uji chi square* dengan harga sebesar $p < 0,01$ (Lampiran 2.)

Tabel 4. Hasil pemeriksaan Uji immunositokimia dengan streptavidin biotin pada penderita klinis DBD dengan hasil uji serologis Ig M dan IgG anti dengue

Deteksi antigen virus	Penderita IgM(+)/IgG(-)		Penderita IgM(-) dan IgG (-)	Jumlah
	IgM(+) IgG(+)			
Uji Immuno SB (+)	22		1	23
Uji Immuno SB (-)	3		6	9
	25		7	32



Gambar 7. Grafik Hasil Pemeriksaan Uji Immunositokimia pada penderita klinis DBD dengan hasil serologis IgM dan IgG anti dengue

Untuk mengetahui apakah hasil uji SB ini dapat digunakan secara bermakna sebagai uji diagnostik untuk penderita tersangka DBD maka hasil uji SB ini dilakukan uji statistik terhadap ketiga kelompok diatas. Uji statistik yang digunakan dengan berdasarkan uji *chi square* dengan harga sebesar $p < 0,01$ (Lampiran 2).

Pada tabel 4 juga terlihat bahwa dari 25 penderita DBD yang dilakukan pemeriksaan immunositokimia terlihat 3 penderita DBD dengan hasil pemeriksaan immunositokimia yang negatif. Hal ini disebabkan karena fiksasi yang kurang baik sehingga antigen rusak atau sewaktu pembuatan preparat apus monosit tergeser keluar atau pada saat meneteskan *buffy coat* monosit tidak ikut tertambal. Hasil immunositokimia yang positif didapatkan pada 1 penderita non - DBD, ini menunjukkan bahwa penderita tersebut menderita infeksi dengue tetapi masih dalam masa inkubasi sehingga antibodinya belum terbentuk, tetapi antigennya sudah terdeteksi.

Pada penelitian ini sangat tidak mungkin terjadi hasil positif atau negatif palsu karena pada penelitian ini kami juga memakai 2 kontrol yaitu "*non healthy control*" yaitu penderita febris yang memenuhi kriteria WHO ditunjang dengan hasil pemeriksaan serologi yaitu IgM dan IgG anti dengue (-) dan kontrol reagen dimana pada kontrol reagen antibodi primer diganti dengan PBS dan hasil pengecatan memperlihatkan tidak adanya warna kecoklatan.

5.5 Gambaran hasil uji immunositokimia dengan streptavidin - biotin pada dua kelompok penderita tersangka DBD berdasarkan hasil uji serologi IgM dan IgG anti dengue untuk mengetahui validitasnya sebagai uji diagnostik DBD.

Untuk mengetahui apakah uji immunositokimia dengan streptavidin - biotin untuk mendeteksi antigen virus dengue pada permukaan monosit dapat digunakan sebagai fasilitas penunjang untuk diagnosis penyakit DBD, maka perlu dilakukan uji sensitivitas dan spesivitasnya dengan standar pembanding menggunakan hasil diagnosis klinis sesuai kriteria WHO yang ditunjang dengan

pemeriksaan serologis Ig M dan Ig G anti - dengue Hasil pengujian sensitivitas dan spesivitas dapat dilihat pada tabel 5

Tabel 5. Hasil pemeriksaan Uji immunositokimia pada penderita klinis DBD dengan hasil serologis Ig M dan IgG anti dengue.

Uji immunositokimia	Penderita DBD Sesuai standar pembanding	Febris tidak sesuai standar pembanding	Jumlah
UJI IMMUNO (+)	22	1(2)	23
Uji IMMUNO (-)	3	6(12)	9
JUMLAH	25	7(14)	32

Positif benar = 22, Positif palsu = 1, Negatif benar = 6, Negatif palsu = 3

() = Faktor koreksi

Sensitivitas dan spesivitas sebagai uji diagnostik menggunakan rumus 2 x 2 yang dapat dilihat pada tabel 5 dengan penghitungan seperti berikut:

Sensitifitas : $22/25 \times 100\% = 88\%$ artinya dari 100 penderita DBD bila dilakukan pemeriksaan immunositokimia maka 88 diantaranya akan menghasilkan hasil yang positif

Spesifisitas : $12/14 \times 100\% = 85,71\%$ artinya dari 100 penderita sebat bila dilakukan pemeriksaan immunositokimia maka 85 - 86 orang akan menghasilkan hasil yang negatif

Nilai ranaal positif : $23/24 \times 100\% = 95,83\%$, artinya probabilitas orang menderita DBD sebanyak 95,83 bila hasil pemeriksaan immunositokimianya menunjukkan hasil yang positif

Nilai ramal negatif : $12/18 \times 100\% = 66,66\%$, artinya probabilitas orang untuk tidak menderita DBD sebanyak 66,66% bila hasil pemeriksaan immunositokimianya menunjukkan hasil yang negatif.

Efisiensi : $28/32 \times 100\% = 86,50\%$.

Dari hasil penghitungan di atas, uji immunositokimia dengan streptavidin–biotin, mempunyai spesivisitas dan spesivisitas yang tinggi sebagai fasilitas penunjang diagnosis DIF.



Gambar 8. Hasil negatif Deteksi Antigen Virus Den di dalam Monosit dengan pemeriksaan Immunositokimia dengan Streptavidin Biotin (Pembesaran 1000 kali)



Gambar 9. Hasil Negatif Deteksi Antigen Virus DEN di dalam Monosit dengan pemeriksaan Immunositokimia dengan Streptavidin Biotin (Pembesaran 3000 kali)



Gambar 10. Hasil Positif Deteksi Antigen Virus Den di dalam monosit dengan pemeriksaan Immunositokimia dengan Streptavidin Biotin (Pembesaran 1000 kali)



Gambar 11. Hasil Positif Deteksi Antigen Virus Den di dalam monosit dengan pemeriksaan Immunositokimia dengan Streptavidin Biotin (Pembesaran 3000 kali)

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Diagnosis penyakit Demam Berdarah Dengue dan permasalahannya.

Untuk membahas penelitian ini terlebih dulu disampaikan tentang diagnosis DBD dan permasalahannya di klinik terutama apa bila terjadi kejadian luar biasa /KLB Demam Berdarah Dengue. Penderita banyak yang datang di Rumah Sakit maupun di tempat-tempat pelayanan kesehatan umum atau puskesmas. Diantara penderita yang datang tidak selalu tersangka DBD, kemungkinan penyakit demam lain yang disebabkan oleh virus lain atau oleh mikroba. Hal ini peranan diagnosis pasti yang awal untuk penderita DBD sangat menentukan keberhasilan terapi.

Penyakit DBD sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang cukup besar di Indonesia, karena walaupun jumlah angka kematian sudah dapat ditekan, tetapi jumlah kasus secara keseluruhan cenderung meningkat dari tahun ke tahun. (Suroso , 1991)

Manifestasi penyakit ini sangat bervariasi mulai dari yang paling ringan sampai gejala yang paling berat yang dapat disertai dengan renjatan (WHO, 1986; Soewandoyo, 1977). Kelompok penderita yang tidak menunjukkan gejala khas DBD menduduki jumlah yang paling besar dan kelompok ini epidemiologis sangat penting artinya karena dapat bertindak sebagai sumber penularan bagi orang lain disekitarnya (Syahrulman dkk, 1993). Demikian juga kelompok lain yaitu penderita klinis tersangka DBD apabila diagnosis tidak segera

ditegakkan secara dini maka dapat menuju kearah lebih berat, mudah terjadi renjatan dan akhirnya dapat berakibat fatal karena terjadinya DSS

Berkaitan dengan hal tersebut diatas, maka diagnosis pasti DBD penting sekali artinya, karena selain membantu pelaksanaan dan pengelolaan penderita DBD juga membantu program pencegahannya di masyarakat. (Syahriurrahman dkk, 1993)

Seperti diketahui bahwa gejala klinis penderita DBD tidak khas, pada stadium awal gejala klinisnya sangat mirip dengan penyakit demam yang lain sehingga menyebabkan kesalahan diagnosis. Maka untuk menghindari terjadinya kesalahan diagnosis, WHO menentukan kriteria untuk membedakan antara DBD dengan demam yang lain yang memadukan antara manifestasi klinis dengan hasil laboratoris (WHO, 1986)

Kriteria WHO tersebut adalah adanya demam yang mendadak tinggi terus menerus berlangsung 2-7 hari, hepatomegali, adanya manifestasi perdarahan yang dapat ditunjukkan dengan pemeriksaan tromket positif, gejala *shock* dengan ditunjukkan adanya manifestasi nadi cepat dan lemah, akral dingin dan gelisah serta hasil laboratoris diketemukan adanya trombositopenia kurang dari 100 000/ml, peningkatan nilai hematokrit $>20\%$. Namun gejala ini juga dapat diketemukan pada penyakit demam oleh infeksi virus flavi lainnya atau disebabkan oleh jenis mikroba lain seperti kuman salmonella atau leptospira. Oleh karena itu untuk konfirmasi penyakit DBD perlu diperkuat dengan deteksi antibodi terhadap dengue dengan uji hemaglutinasi inhibisi yang positif atau deteksi antibodi spesifik Ig M dan IgG anti - dengue

Secara teoritis apabila semua hasil pemeriksaan tersebut diatas telah didapatkan, maka diagnosis DBD dapat ditegakkan, namun dalam kenyataannya hasil inipun tidak segera didapat secara lengkap, kadangkala sampai berhari-hari dan spesivitas serta sensitivitasnya untuk deteksi IgM dan IgG anti dengue sering tidak memadai di lapangan. Hal ini tergantung dari derajat penyakitnya, kondisi penderita, type serotype virusnya maupun virulensinya (Wuryadi, 1999). Yang penting lagi apakah hasil pemeriksaan tersebut cukup memberikan gambaran untuk memperkirakan bagaimana perjalanan penyakitnya, kemungkinan terjadi kesembuhan atau akan terjadi renjatan akibat perdarahan yang hebat. Oleh karena itu diagnosis DBD sebelum terjadinya renjatan memang perlu segera ditegakkan.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mencari upaya baru untuk menegakkan diagnosis pasti DBD antara lain pemeriksaan kultur untuk mengisolasi virus penyebabnya atau melalui teknik hibridisasi PCR, namun kedua metode ini meskipun dapat untuk menentukan diagnosis pasti masih banyak kendalanya, selain hasilnya terlalu lama diperoleh juga memerlukan peralatan canggih sehingga biayanya cukup mahal dan angka positivitasya sangat bervariasi (Magostovich dkk, 1997). Demikian juga saat ini bila di suatu daerah terjadi KLB (kejadian luar biasa) dari DBD, umumnya diagnosis ditegakkan hanya berdasarkan gejala klinis dan serologis (deteksi IgM dan IgG anti dengue) dan hasilnya sering tidak bisa diharapkan. Hal ini disebabkan pada saat penderita datang di Rumah Sakit kemungkinan belum terbentuk

antibodi, atau hasil positif mungkin berasal dari penyakit yang terdahulu atau dapat disebabkan oleh infeksi flavivirus yang lain.

Untuk mengatasi permasalahan diatas dicoba suatu uji diagnostik baru yaitu pemeriksaan immunositokimia dengan menggunakan streptavidin - biotin Uji immunositokimia dengan streptavidin - biotin ini diharapkan merupakan uji diagnostik yang lebih sederhana, lebih mudah pelaksanaannya, karena hanya mengambil darah vena yang diberi anticoagulan kemudian dipusing untuk mengisolasi monosit, lebih cepat mendapatkan hasil karena hasilnya bisa didapat dalam satu hari setelah pengambilan sampel Hasilnya tepat karena dengan uji ini hasil positif maupun negatif palsu tidak mungkin terjadi karena pada uji ini dipakai antibodi spesifik disamping memakai 2 kontrol yaitu kontrol reagen dimana pada kontrol tidak diberi antibodi primer tetapi diganti dengan PBS dan terlihat hasil negatif tanpa ada warna kecoklatan dan kontrol kedua adalah *Non Healthy Control* yaitu penderita demam dengan IgM dan IgG anti dengue (-) dan hasilnya juga tidak terlihat warna kecoklatan. Karena prosedurnya sederhana sehingga diharapkan dapat digunakan di setiap laboratorium di Indonesia meskipun sarana dan prasarannya terbatas dalam rangka membantu menurunkan angka mortalitas dan morbiditas penderita DBD

Prinsip dasar penelitian ini adalah adanya virus yang masuk pertama kali ke dalam tubuh manusia melalui gigitan nyamuk *aedes aegypti*, maka selama inkubasi virus akan masuk ke peredaran darah dan terjadi viremia. Kejadian viremia pada infeksi dengue sangat pendek, dan target utama virus dengue adalah monosit dan virus dengue akan ditangkap oleh monosit karena monosit

mempunyai reseptor pada permukaannya (Jufrie *et al*, 2000; Yun-Chi Chen, 2002).

Selanjutnya dengan cara mendeteksi antigen virus yang terdapat pada monosit secara *in vitro* dengan antibodi anti - dengue monoklonal kompleks, maka hasilnya diharapkan dapat digunakan sebagai uji diagnostik pengganti isolasi virus dengan kultur atau deteksi antigen virus melalui tehnik hibridisasi PCR

Untuk mengetahui keterandalan suatu uji diagnostik maka perlu dilakukan uji validitas sebagai uji diagnostik. Sebagai uji diagnostik maka uji immunositokimia dengan streptavidin - biotin perlu dibandingkan dengan uji diagnostik yang lain yang dianggap sebagai baku emas untuk penyakit DBD dengan menggunakan tabel 2 x 2, artinya baik hasil uji yang diteliti maupun dengan baku emas yang digunakan harus dapat memisahkan subyek menjadi sakit atau tidak sakit (Sudigdo dan Sofyan, 1995)

Baku emas atau sebagai standar pembanding pada penelitian ini menggunakan kriteria WHO yang ditunjang dengan hasil serologi Ig M anti dengue (+) dan Ig G anti - dengue(-) atau Ig M anti - dengue (+) dan Ig G anti - dengue (-) Pada penelitian ini digunakan standar pembanding kriteria WHO dengan disertai hasil serologis IgM dan IgG anti - dengue karena cara ini sejak lama dipakai sebagai dasar diagnosis oleh para klinisi yang terbaik didalam menangani penderita DBD

Penelitian ini tidak menggunakan baku emas *gold standar* dengan menggunakan hasil isoalsi virus atau dengan menggunakan tehnik hibridisasi PCR.

karena isolasi virus sangat sulit dikerjakan karena virus sulit ditemukan akibat kejadian viremia penderita DBD sangat pendek, sedang bila menggunakan PCR, hasil PCR di lapangan ternyata angka positifitasnya bervariasi sekitar 12% - 100% (Magostovice dkk,1997, Faizi, 1998). Pada teknik PCR cara pengerjaannya juga membutuhkan ketrampilan dan perawatan yang khusus, selain kadang sequens yang diambil tidak sesuai dengan primer yang dipakai

Pada penelitian ini, selama 6 bulan telah berhasil dikumpulkan sesuai dengan kriteria penelitian (kriteria inklusi) sebanyak 32 orang penderita dewasa dengan dugaan klinis DBD. Selanjutnya untuk memastikan diagnosis DBD, masing masing penderita tersebut dilakukan pemeriksaan serologis dengan cara mendeteksi antibodi spesifik Ig M dan Ig G anti- dengue masing masing 2 kali untuk mengurangi kemungkinan hasil positif maupun negatif palsu kemudian dilakukan pemeriksaan immunositokimia.

6.2. Hubungan umur dan jenis kelamin dengan gejala klinis DBD untuk digunakan sebagai penunjang diagnosis DBD.

Pada tabel 1 berdasarkan umur dan jenis kelamin ternyata penderita DBD dapat mengenai semua kelompok umur, jenis kelamin dan secara uji statistik tidak ada perbedaan secara bermakna (lampiran 2). Pada penelitian ini dipilih penderita DBD umur 10 tahun keatas karena ada kaitannya dengan pengambilan sampel darah yang memerlukan jumlah darah sebanyak 10 cc sehingga untuk penderita anak-anak sulit selain orang tuanya biasanya non kooperatif. Namun dari hasil penelitian ini ternyata sesuai beberapa kepustakaan (Thongcharoen dkk, 1993, Gubler dkk, 1992, Sumarmo, 1992) yang menyebutkan penderita

DBD pada orang dewasa cenderung telah meningkat, bahkan pada penelitian ini ditemukan juga empat penderita pada orang tua (umur lebih 40 tahun).

Selanjutnya berdasarkan jenis kelamin pada penelitian ini, kelompok wanita cenderung lebih banyak, menurut Sugianto (2004) jenis kelamin pernah ditemukan perbedaan nyata diantara anak pria dan wanita. Juga menurut Sugianto (2004) beberapa negara melaporkan banyak kelompok wanita dengan DSS menunjukkan angka kematian yang lebih tinggi dari pada pria. Demikian juga berdasarkan gejala klinis yang ditemukan adanya gejala demam sebesar 32 orang (100 %) muntah 22 orang (68,75%), uji torniket positif 32 orang (100%), mialgia 25 orang (78,125 %) nyeri kepala 14 orang (43,75 %). Gejala ini merupakan gejala yang sering ditemukan pada penderita DBD dan berdasarkan uji statistik didapatkan hasil tidak bermakna sehingga gejala klinis tidak dapat dipakai sebagai sarana pembantu untuk menegakkan diagnosis DBD. Oleh karena itu perlu diperkuat dengan sarana diagnosis penunjang lainnya.

6.3. Hubungan hasil uji serologi antibodi anti virus dengue Ig M dan IgG dengan hasil deteksi antigen virus pada monosit dengan immunosiotokimia menggunakan streptavidin - biotin dalam menegakkan diagnosis DBD.

Untuk menentukan diagnosis DBD berdasarkan pemeriksaan klinis dan kemudian dilanjutkan dengan uji serologis untuk konfirmasi, (pemeriksaan antibodi anti - dengue yaitu Ig M dan Ig G) merupakan uji serologis rutin yang sering dilakukan oleh para klinisi di rumah sakit. Bila hasil Ig M anti - dengue positif dan Ig G anti - dengue positif menunjukkan penderita DBD primer maupun sekunder, bila hanya IgM anti - dengue saja yang positif dan Ig G anti - dengue negatif menunjukkan penyakit DBD primer. sedang bila IgM anti

dengue maupun IgG anti - dengue negatif berasal dari penyakit demam lainnya atau non-DBD.

Berdasarkan data-data diatas, maka dilakukan uji hipotesis dengan uji immunositokimia menggunakan streptavidin - biotin kepada masing masing kasus penderita tersangka DBD diatas. Hasil penelitian pada 32 penderita tersangka DBD menunjukkan bahwa 23 serum penderita DBD (71,88%) memberikan hasil uji streptavidin - biotin positif dan 9 serum penderita DBD (28,12 %) menunjukkan hasil uji streptavidin - biotin negatif. Hasil uji streptavidin - biotin terhadap 7 serum penderita non DBD didapatkan bahwa 5 serum (71,43 %) menunjukkan hasil negatif dan 2 serum (28,57 %) menunjukkan hasil positif.

Selanjutnya dari 25 sampel serum penderita DBD dengan 7 serum penderita non DBD ternyata secara statistik dengan menggunakan uji *chi square* ditemukan ada perbedaan secara bermakna (lampiran 2). Artinya dengan pemeriksaan immunositokimia dengan streptavidin – biotin dapat membedakan antara penderita DBD dengan penderita non - DBD.

Untuk mengetahui apakah uji immunositokimia dengan streptavidin - biotin merupakan uji yang handal untuk dapat digunakan sebagai diagnosis DBD maka uji streptavidin - biotin ini perlu diketahui validitasnya sebagai uji diagnostik

6.4. Karakteristik hasil deteksi antigen virus pada monosit penderita DBD dengan pemeriksaan Immunositokimia dengan Streptavidin – biotin .

Menurut Handoyo (1989) suatu uji diagnostik juga perlu diketahui aseptabilitasnya. Aseptabilitas suatu uji diagnostik ditentukan oleh beberapa

faktor antara lain adalah pertama dari segi kepraktisan dalam menggunakan uji diagnostik dan kedua dari segi validitasnya baik validitas internal maupun validitas eksternal. Validitas internal meliputi detektabilitas, akurasi, sedang validitas eksternal meliputi sensitivitas dan spesivisitas, nilai ramal positif, nilai ramal negatif dan efisiensi suatu uji diagnostik.

6.4.1. Aseptabilitas uji imunositokimia menggunakan streptavidin - biotin

. Apabila ditinjau dari segi aseptabilitasnya uji streptavidin - biotin adalah baik. Kepraktisan dari uji streptavidin biotin ini ditunjukkan dengan didapatkan penyediaan reagensya secara mudah, stabilitasnya cukup tinggi, cara dan waktu pelaksanaannya mudah, peralatan yang dipakai tidak mahal cukup menggunakan alat centrifuge dan mikroskop cahaya, demikian juga bila dihitung biaya pemeriksaan imunositokimia relatif tidak mahal dibandingkan dengan cara pemeriksaan yang lainnya.

6.4.2. Detektabilitas uji imunositokimia menggunakan streptavidin - biotin.

Uji streptavidin - biotin untuk mendeteksi antigen virus pada permukaan monosit penderita DBD merupakan suatu uji yang murni kualitatif. Meskipun amat sukar untuk mengukur derajat detektabilitasnya, namun demikian pada uji ini telah menggunakan kontrol dari "*non healthy*" dari penderita febris yang non - DBD disamping itu dilakukan juga kontrol reagensya.

6.4.3. Akurasi dari uji imunositokimia menggunakan streptavidin biotin.

Sebagai uji diagnostik untuk pemeriksaan imunositokimia dengan streptavidin - biotin, telah diusahakan menjaga akurasi uji diagnostik ini dengan

reagen murni, menggunakan antibodi anti virus dengue monoklonal kompleks sehingga akurasiya baik, karena hanya melacak antigen dari flavivirus golongan virus dengue.

6.4.4. Validitas Uji imunositokimia untuk mendeteksi antigen virus dengue pada monosit menggunakan streptavidin - biotin.

Pada penelitian ini, untuk mengetahui validitas uji diagnostik dari hasil deteksi antigen virus pada permukaan monosit dengan pemeriksaan imunositokimia menggunakan streptavidin - biotin maka berdasarkan tabel 2X2, hasilnya akan dibandingkan terhadap kelompok sampel dari penderita DBD sesuai dengan kriteria WHO ditunjang dengan hasil pemeriksaan serologi antibodi anti- dengue Ig M dan Ig G. dengan penderita demam lain non DBD sebagai "*non healthy control* ", (hasil Ig M dan Ig G negatif), disini didapatkan bahwa hasil sensitivitasnya sebesar 88% dengan hasil spesifisitas sebesar 85,71%. Nilai ramal positif sebesar 95,83% dan nilai ramal negatif sebesar 66,66% dengan tingkat efisiensinya sebesar 86,50%

Menurut Handoyo (1989) untuk menentukan hasil sensitifitas dan spesifisitas suatu uji diagnostik maka perlu uji diagnostik tersebut ditentukan besarnya persentase dari karakteristik tes sebagai berikut.

- 1 Hasilnya amat tinggi, bila besarnya suatu sifat uji laboratoris adalah sama atau lebih dari 95%
- 2 Hasilnya tinggi, bila besarnya sifat uji laboratorium tersebut sebesar 80-94%
- 3 Hasilnya sedang, bila besarnya sifat uji laboratorium tersebut antara 65-75%

4. Hasilnya rendah, bila besarnya sifat uji laboratorium tersebut antara 50-64% dan,

5. Hasilnya amat rendah, bila besarnya sifat uji laboratorium tersebut kurang dari 50%.

Dengan demikian berdasarkan kriteria diatas maka hipotesis pada penelitian ini telah terbukti yaitu bahwa uji immunositokimia dengan menggunakan streptavidin - biotin untuk mendeteksi antigen virus pada permukaan monosit penderita tersangka DBD hasil sensitifitas dan spesifitasnya tinggi dan berarti cukup reliabel dapat digunakan dalam menegakkan diagnosis penyakit DBD.

Hasil penelitian pada 25 serum penderita DBD pada pengujian dengan immunositokimia menggunakan streptavidin didapatkan hasil negatif sebesar 3 orang (12%) dan hal ini kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor antara lain karena fiksasi yang kurang, atau sewaktu pembuatan preparat apus, monosit tergeser keluar atau pada saat meneteskan *buffycoat* monosit tidak ikut terambil. Cara fiksasi yang kurang baik menyebabkan antigennya rusak atau waktu menggores yang tidak tepat sehingga monosit berada di pinggir. Juga bisa disebabkan karena dalam penelitian ini dipakai standard pembanding berupa hasil pemeriksaan IgM dan IgG anti dengue dan tidak menggunakan standard baku isolasi virus atau deteksi antigen dengan PCR yang sensitivitas maupun spesivitasnya bisa 100%. Secara teoritis hasil false negatif maupun false positif kiranya tidak mungkin terjadi pada uji immunositokimia ini, karena pada uji immunositokimia ini dipergunakan antibodi yang spesifik dan sudah dilakukan

kontrol reagen, selain kontrol dengan serum yang berasal dari " *non healthy*" kontrol. Untuk kontrol reagen kami tidak memberikan antibodi primer, dan ternyata hasilnya negatif dengan tidak terlihatnya warna kecoklatan pada monosit. Sehingga hasil negatif yang diperoleh dengan tidak terlihatnya warna kecoklatan betul – betul hasil yang negatif bukan negatif palsu.

Demikian sebaliknya pada 7 kasus penderita non - DBD hasil pengujian imunositokimia menggunakan streptavidin - biotin ditemukan hasil positif sebanyak 1 orang (14,2 %). Hasil positif kemungkinan disebabkan karena pada masa inkubasi sebelumnya virus dengue telah menyerang sel target monosit penderita, namun belum terbentuk IgM maupun IgG dalam serumnya. Hal ini dapat membuktikan bahwa uji imunositokimia akan lebih cepat memberikan hasil untuk mengetahui adanya infeksi virus dengue, karena pada cara-cara pemeriksaan yang sekarang dipakai untuk menegakkan diagnosis masih mendasarkan adanya antibodi, sehingga hasilnya kadang negatif karena butuh waktu untuk menunggu munculnya antibodi anti - dengue tersebut.

6.5 Hasil deteksi antigen virus pada monosit dengan imunositokimia menggunakan streptavidin biotin dibandingkan dengan hasil peneliti lain dalam rangka mencari suatu uji diagnosis untuk penyakit DBD.

Berdasarkan penelitian dari Nuryati dkk, tahun 2001 mengenai hasil deteksi antibodi anti - dengue Ig M dan Ig G pada penderita DBD dengan menggunakan Dengue Rapid Test ditemukan hasil positif sebesar 97,36% sedang untuk pada penderita non - DBD ditemukan hasil positif sebesar (15,62%). Tingginya hasil penelitian diatas dapat berarti positif semu, sesuai

apa yang telah dilaporkan Gubler (1998) dari uji deteksi antibodi anti - dengue misalnya ditemukan hasil positif seruni pada penderita demam yang pernah terinfeksi oleh virus dengue atau flavi lainnya atau seseorang berada di daerah endemis dengue.

Berdasarkan penelitian Malergue & Cungue (1995), disebutkan bahwa hasil pemeriksaan dengan "*Rapid and sensitive streptavidin biotin amplified Fluorogenic enzyme linked immunosorbent assay for direct detection and identification of dengue viral antigen in serum*" sensitivitas F-ELISA 90% dan spesivitasnya 99%. Penelitian tersebut diatas mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi sekali. Mengingat masa viremia sangat pendek sehingga meski hasil yang diperoleh sangat baik tetapi pengambilan sampel sangat sulit dan sangat menentukan positifitas hasil pemeriksaan tersebut

Bhoopat-I. *et al* (1996), dalam penelitiannya melaporkan bahwa hasil pemeriksaan immunohistokimia dengan monoklonal antibodi virus DEN pada jaringan yang berasal dari hasil nekropsis ataupun autopsi dengan tehnik immunoperoksidase menunjukkan hasil positif kuat pada hemopoitik sel termasuk immunoblast, limfosit, plasma sel dan makrofag dari lien

Hasil deteksi antigen virus DEN pada permukaan monosit dengan tehnik immunositokimia dengan streptavidin biotin memperlihatkan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi yaitu 88% dan 85,71% ternyata sesuai dengan hasil penelitian Bhoopat-L *et al* (1996).

6.6. Keunggulan dan hambatan dari uji immunositokimia dengan streptavidin – biotin, beserta aplikasinya di lapangan.

Karena pada uji immunositokimia dengan streptavidin -biotin ini yang dideteksi adalah antigen dimana antigen sudah ditemukan saat virus masuk, maka uji immunositokimia dapat dikerjakan seawal mungkin begitu gejala panas nampak (tidak usah menunggu waktu), seperti uji laboratorium yang dipakai saat ini dimana uji tersebut didasarkan atas munculnya antibodi anti - dengue sehingga perlu menunggu waktu sampai panas hari kelima. Disamping itu uji laboratorium yang berdasarkan adanya antibodi anti dengue hasil yang positif bisa disebabkan oleh infeksi sebelumnya atau oleh flavivirus lain. Pada uji immunositokimia dengan streptavidin biotin karena memakai antibodi spesifik disamping memakai 2 kontrol baik kontrol maupun non healthy control sehingga hasil positif maupun negatif palsu tidak mungkin terjadi.

Keterbatasan di dalam penelitian ini adalah kebutuhan sampel darah yang cukup banyak (10 cc) sehingga pengambilan sampel pada penderita anak-anak sulit, lebih-lebih pada saat *pre shock* pengambilan sample akan lebih sulit lagi, sehingga perlu dipikirkan cara lain yang hanya membutuhkan sampel darah yang sedikit

Aplikasi dari cara pemeriksaan ini dapat disebar luaskan ke daerah-daerah yang mempunyai sarana dan prasarana laboratorium sederhana. Metode ini dapat dipakai untuk alat diagnosis awal pada saat kejadian KLB, sehingga diagnosis DBD segera dapat ditegakkan

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis dan pembahasan penelitian, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Deteksi antigen virus dengue pada permukaan monosit yang menggunakan pemeriksaan imunositokimia dengan streptavidin - biotin , dapat digunakan sebagai uji diagnostik penderita demam dengue dan akan memberikan hasil positif lebih cepat dari cara pemeriksaan yang saat ini beredar yang mendasarkan munculnya anti bodi anti - dengue .
2. Pemeriksaan Imunositokimia dengan Streptavidin - biotin merupakan uji diagnostik dengan tingkat sensitivitas dan spesivitas yang tinggi (88% dan 87%) sehingga mempunyai nilai diagnostik yang handal serta dapat digunakan sebagai sarana diagnosis DBD.

7.2. Saran

Memperhatikan hasil penelitian ini, maka sebagai tindak lanjut dapat di sarankan beberapa hal sebagai berikut.

1. Uji imunositokimia dengan streptavidin - biotin perlu disosialisasikan agar dapat digunakan sebagai sarana diagnosis dini penderita DBD di Indonesia dalam rangka menurunkan angka kematian penderita

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson R, Wang S, C Osiowy , and AC Issekutz** 1997; *Aktivasi Of Endothelial Cells Via Antibody-enhanced Dengue Virus Infection Of Peripheral Blood Monocytes*. Journal of Virology.
- Bhamarapravati N** 1993; *Pathology of Dengue Haemorrhagic Fever in: Monograph on Dengue dengue Haemorrhagic Fever* (Thongcharoen P.com) pp 72-79 World Health Organization.
- Cohen J,1996**; *Sepsis Syndrome*, Journal of Medical Int.355.10.31.
- Crowther J R** , 1995 ; *ELISA theory and practice* (Walker J.M ed) 42nd vol. Humana Press, Totawa, Nem Jersey.
- Faizi M, 1998** *Validitas Rasio IgM IgG Sebagai Pembeda Infeksi Primer dan Sekunder Pada Penderita Demam Berdarah Dengue*.PENELITIAN Karya Ilmiah Akhir Untuk Dokter Spesialis I Ilmu Kesehatan Anak. Fakultas Kedokteran UNAIR/RSUD Dr Sutomo Surabaya
- Fujita N, Hotta S, Konishi E, Esaki H, Sumarno and Suyudi** , 1997; *Dengue Haemorrhagic Fever in Jakarta, Indonesia in 1988; isolation of dengue virus from patient whole blood using cell cultures*. Am J Trop Med Hyg. 56,318 – 321.
- Gubler D J**, 1998; *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*.Clinical Microbiology Reviews July 1998 p. 480-496.
- Goh KT**, 1997; *Dengue a Re-Emerging Infectious Disease In Singapore*. Annual Acad. Med. Singapore

- Hadinegoro SR, Soegiyanto S dkk, 1999:** *Tatalaksana Demam Dengue Demam Berdarah Dengue pada anak*. Naskah Lengkap Pelatihan bagi pelatih Dokter Spesialis Anak & Dokter Spesialis Penyakit Dalam dalam Tatalaksana Kasus DBD Balai Penerbit Universitas Indonesia hal.82 - 137
- Haines DM, Brian J C:**1991 : *Technical consideration for developing enzyme. Immunohistochemical Staining Procedures on Formalin Fixed Paraffin-Embedded Tissues for Diagnostic Patologi, J. Vet Diagn Invest 3: 1101-1102.*
- Halstead S B** 1988; *Pathogenesis of Dengue . Challenges to Molecular Biology Science 239:476-481.*
- Halstead S B,** 1990; *Dengue. In: Tropical and Geographical Medicine (Warren K S, Mahmoud Adel A F, eds) 2nd ed Pp 675-685. Mc Graw - Hill, New York*
- Halstead S B,** 1993 , *Pathophysiology and Pathogenesis of Dengue Haemorrhagic fever. Monograph on Dengue Dengue Haemorrhagic Fever. New Delhi. World health Organization Regional Office for South East Asia Regional Publication ; 22. 35-46.*
- Handoyo I.** 1989. *Uji PAP pada Penyakit Tuberkulosis Paru: Disertasi Universitas Airlangga Surabaya*
- Howarth MC, Miyajima A, Coffman R.**1994 *Cytokines , Paul Fundamental Immunology, Third Edition, 763-790.*

- Hsu S.M, Raine C and Fanger HA, 1981** *Comparative study of peroksidase-antiperoksidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies.* *J Clin Chem* 29: 76 : 734
- Jufrie, M et al. 2000:** *Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation* *Infect. Immun.*68:702-707
- Khana M, Chaturvedi UC, Sharma MC, Pandey VC, Mathur A, 1990:** *Increased capillary permeability mediated by a dengue virus-induced lymphokine.* *Immunology* Mar 69.33 449-53.
- Kurane I, Enis E Francis. 1992:** *Immunity and immunopathology in dengue virus infections.* *Seminars in Immunology* Vol.4 pp 121-127.
- Kushartono, H.2000:** *Studi Komparasi Uji HI dan Elisa (IgM& IgG) Pada Penderita Klinis DBD.* Penelitian Karya Ilmiah Akhir untuk memenuhi persyaratan dalam menyelesaikan pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Kesehatan Anak.
- Lam Sk, Devi and Pang T, 1987.** *Detection of specific IgM in dengue Infection* *Southeast Asian J Trop Med, Pub Hlth.*18.532-538
- Lanciotti R.S, Calisher C.H, Gubler D.J, Chang G.J and Vorndam A.V 1992.** *Rapid detection and typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction* *J Clin Microbiol.* 30, 545 - 551

- Ling AE** . 1992 ; *Laboratory diagnosis of dengue virus infection Seminar dengue hemorrhagic fever* . Virus Laboratory , Department of Pathology , Singapore General Hospital
- Leangpibul P and Thongcharoen P** . 1993, *Clinical laboratory investigations In Monograph on Dengue Dengue Haemorrhagic Fever* (Thongcharoen P, com) pp 62 - 71 World Health Organization.
- Malasit P** . 1987. *Complement and Dengue Haemorrhagic Fever Shock Syndrome Southeast Asian J Trop Med Health Public Health* . 18 . 316-320
- Mariannau P, Flanand M, Deubel V, Despres P** . 1998; *Apoptotic cell death in response to dengue virus infection: The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever revisited Clinical and Diagnosis Virology* 10 (1998) 113-119
- Mathew A, Kurane I, Rothman AI et all** . 1996. *Dominant recognition by human CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus non structural proteins NS3 and NS1.2a*. J Clin. Invest 1996 Oct 198 7 1684 - 91.
- Miagostovich M.P , Dos Santos F , B , de Araujo E.S.M , Dias J , Schatzmayr HG and Nogueira R.M.R** . 1997 . *Diagnosis of Dengue by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* Memorias do Instituto Oswaldo Cruz . 92 . 595-600 .
- Monath T.P** . 1991 *Viral Febrile Illnesses* . In : *Honier 's Tropical Medicine* (Strickland GI . ed 1 - 3rd ed. pp 200-206- WB Saunders Company . Philadelphia

- Nimmannitya S,** 1993 . *Clinical Manifestations of Dengue Dengue Haemorrhagic Fever* . In : *Monograph on Dengue Dengue Haemorrhagic Fever* (Thongchroen P , com). pp 43-54 . World Health Organization
- Nimmannitya S,**1996. *Clinical Management of Dengue Fever Dengue Haemorrhagic Fever Dengue Shock Syndrome*, Dengue Bulletin, 20 . 13-19
- Oppenheim J.J et all** 1995; *Cytokines Basic and Clinical Immunology*, Seven Edition,78-98.
- Pangkalila PEA,** 1998 . *Dengue Hemorrhagic Fever pada Remaja dan Dewasa (Demam Berdarah)*. Antibiotic News January 1998.
- Pudjiraharjo Widodo J,**1993; *Penentuan sampel, dalam Metode Penelitian dan Statistik Terapan*, Airlangga University Press edisi 1 49-59.
- Roitt I,** 1987; *Essential immunology*, 5th ed. Oxford: Blacwell Scientific Publications.
- Ruangturakit S et all,** 1994 . *Storage stability of dengue IgM and IgG antibodies in whole blood and serum dried on filter paper strips detected by ELISA* . Southeast Asian J Trop Med Public Health , 25. 560-564
- Rudnick,** 1983. *The ecology of dengue virus complex in Peninsular Malaysia Proc.Int.Cont.On Dengue Dengue Haemorrhagic Fever* Pang. I Pathmanathan R Eds.University of Kualalumpur

- Sabin AB**, 1952.: *Research on dengue during World War II* .AM.J Trop.Med Hyg 1 30-50.
- Samsi TK et all**, 1990; *Some clinical and epidemiological observation on virologically confirmed dengue hemorrhagic fever*.Paediatrica Indonesia , 30: 293-303
- Samsi TK et all** 1992 ; *Immunoglobulin M and G in virologically confirmed dengue hemorrhagic fever* . Paediatrica Indonesia , 32:65-74
- Soegiyanto**, 2004. *Demam Berdarah Dengue. Tinjauan dan Temuan Baru*. Airlangga University Press.
- Sternberger I A**, 1979: *The unlabeled antibody peroksidase antiperoksidase (PAP) method in: Immunochimistry* 2nd ed.John Wiley and Son, New York: 104 –169.
- Sudigdo Sastroasmoro, Sofyan Ismail**,1995.*Dasar-dasar metodologi Penelitian Klinis*.Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta.
- Sumarno P**, 1998; *Demam Berdarah Dengue Di Indonesia Dan Dunia Situasi Sekarang Dan Harapan Di Masa Mendatang*. Antibiotics News Januari 1998.
- Suroso T**. 1997 *A Review of Dengue Hemorrhagic Fever and Its Control in Indonesia*. Seminar Recent Advances in Molecular Diagnostics.
- Soesatyo MHNE**, 1997. *Imunopatologi Infeksi Dengue* Workshop on Molecular Biology of Dengue Virus, Pusat Kedokteran Tropis Univ. Gajahmada Yogyakarta 9-19 September
- SoewandoyoE**, 1998: *Demam Berdarah Dengue pada orang dewasa, gejala klinik dan penatalaksanaannya*,Seminar Demam Berdarah Dengue, TTD Cianjur Surabaya. 19 September.

- Soewandoyo E.** 1997 : *Demam Berdarah dengue pada orang dewasa, gejala klinik dan penatalaksanaannya* Seminar Demam Berdarah Dengue, Folia Medika Indonesiana XXXIII. Juli - September
- Sutaryo.** 1997 *An Overview of Dengue Hemorrhagic Fever in Indonesia: Workshop on Molecular Biology of Dengue Virus.* Pusat Kedokteran Tropis Univ. Gajahmada Yogyakarta 9-19 September 1997.
- Sutaryo.** 1998. *Perkembangan patogenesis Demam Berdarah Dengue.* . Antibiotics News Januari 1998
- Syahrurahman A.** 1988 *Beberapa Lahan Penelitian Untuk Penanggulangan Demam Berdarah Dengue* Mikrobiologi Klinik Indonesia Vol.3 no 3 hal 87-89
- Syahrurahman A. dkk.** 1995: *Penemuan virus dengue untuk deteksi Ig M anti-dengue* Jurnal PAMKI Edisi Desember .
- Syahrurahman A.** 1997: *Patogenesis Demam Berdarah Dengue: Faktor Yang Berpengaruh Pada Replikasi Virus.* Kumpulan Abstrak. Konas VII PERMI Den Pasar Bali 8-10 Des 1997
- Tio P.H and Malasit P.** 1995. *Anti dengue IgG detection by an indirect ELISA* Southeast Asian J.Trop Med Public Health 26: 673-676
- Unanue ER.** 1993 *Macrophages, Antigen Presenting Cells, and the Phenomena of Antigen Handling and Presentation* Fundamental Immunology 3 th Ed Raven Press 111-118
- Virus Laboratory.** 1993. *Departement of Pathology, Singapore General Hospital Laboratory diagnosis of dengue virus infection* . Epidemiological News Buletin . 1993 19: 37-40

- Voller A, Bidwell D E and Bartlett A . 1976 .** *Enzyme immunoassays in diagnostic medicine , theory and practice .* Bull World Health Organization , 53: 55-65.
- Wang S, et al 1995:** *Antibody-enhanced binding of dengue virus to human platelets* J Virology 1995 Oct.20 213:1254-1257
- Wasito R,** 1991.*Penggunaan Imunositokimia untuk diagnosis Penyakit Infeksi, Kursus Singkat Imunositokimia di PAU Universitas Gajah Mada , Yogyakarta*
- WHO,**1986;*Dengue Haemorrhagic Fever: diagnosis, treatment, prevention and control* Geneva
- WHO,**1997; *Dengue Haemorrhagic Fever, diagnosis, treatment, prevention and control.* Geneva.
- Wuryadi S,** 1999 : *Diagnosis laboratorium infeksi virus dengue .* Naskah lengkap pelatihan bagi pelatih dokter spesialis anak dan dokter spesialis penyakit dalam dalam tatalaksana kasus DBD . Jakarta : Balai Penerbit FK UI : 55-64.
- Yenchitsontanus P.T, et al ,1996;** *Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR) .* Southeast Asian J Trop Med Public Health 27.228-236
- Yun-Chi Chen and Sheng – Yuan Wang,** 2002 *Activation of Terminally Differentiated Human Monocytes – Macrophages by Dengue Virus: Productive Infection, Hierarchical Production of Innate Cytokines and Chemokines, and the Synergistic Effect of Lipopolysaccharide.* Journal of Virology, October, p 9877-9887, Vol. 76, No. 19

	umur	jns_klm	febris1	febris2	myalgia	muat_mth	nyeri_kp
1	41	Perempu	Negatif(-)	Negatif(-)	Negatif(-)	Negatif(-)	Negatif(-)
2	26	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
3	20	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
4	23	Laki-laki	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)
5	21	Laki-laki	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)
6	32	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
7	18	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)
8	27	Laki-laki	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)
9	25	Laki-laki	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)
10	42	Perempu	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
11	32	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)
12	22	Laki-laki	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)
13	15	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)	Negatif(-)
14	19	Laki-laki	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)
15	13	Perempu	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)
16	27	Laki-laki	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
17	20	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
18	18	Laki-laki	Negatif(-)	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Negatif(-)
19	17	Laki-laki	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)
20	20	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
21	23	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Negatif(-)
22	29	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
23	42	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)
24	28	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
25	47	Laki-laki	Negatif(-)	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)
26	24	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)
27	21	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
28	22	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)
29	38	Laki-laki	Negatif(-)	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)
30	27	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)
31	35	Laki-laki	Negatif(-)	Negatif(-)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)
32	25	Perempu	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)

	ri	epistax	petekhe	febris	trombosi	hemokon
1	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
2	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
3	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
4	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
5	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
6	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
7	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
8	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
9	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
10	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
11	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
12	Positif(+)	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
13	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
14	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
15	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
16	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
17	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
18	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
19	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
20	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
21	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
22	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
23	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
24	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
25	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
26	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
27	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
28	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
29	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
30	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
31	Positif(+)	Negatif(-)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)
32	Positif(+)	Negatif(-)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)	Positif(+)

dmng

	ujiserlg	ujisvb	ujisero1
1	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
2	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
3	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
4	IgG(-)_igM(+)	Negatif(-)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
5	IgG(-)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
6	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
7	IgG(-)_igM(-)	Negatif(-)	igG(-)_igM(-)
8	IgG(+)_igM(+)	Negatif(-)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
9	IgG(-)_igM(-)	Positif(+)	igG(-)_igM(-)
10	IgG(-)_igM(-)	Negatif(-)	igG(-)_igM(-)
11	IgG(-)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
12	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
13	IgG(-)_igM(-)	Negatif(-)	igG(-)_igM(-)
14	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
15	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
16	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
17	IgG(-)_igM(+)	Negatif(-)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
18	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
19	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
20	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
21	IgG(-)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
22	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
23	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
24	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
25	IgG(+)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
26	IgG(-)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
27	IgG(-)_igM(-)	Negatif(-)	igG(-)_igM(-)
28	IgG(+)_igM(-)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
29	IgG(-)_igM(-)	Negatif(-)	igG(-)_igM(-)
30	IgG(-)_igM(+)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)
31	IgG(-)_igM(-)	Negatif(-)	igG(-)_igM(-)
32	IgG(+)_igM(-)	Positif(+)	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)

Descriptives

Usia responden

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
IgG(-)_IgM(+)	7	24.29	4.071	20	32
IgG(+)_IgM(+)	18	26.39	9.198	13	47
IgG(-)_IgM(-)	7	27.71	10.579	15	42
Total	32	26.22	8.522	13	47

ANOVA

Usia responden

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42.334	2	21.167	.278	.759
Within Groups	2209.135	29	76.177		
Total	2251.469	31			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Usia responden

.95

(i) Usi serologik: anti dengue	(j) Usi serologik: anti dengue	Mean Difference (i-j)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
IgG(-)_IgM(+)	IgG(+)_IgM(+)	-2.10	3.888	.593	-10.05	5.85
	IgG(-)_IgM(-)	-3.43	4.665	.464	12.97	6.11
IgG(+)_IgM(-)	IgG(-)_IgM(+)	2.10	3.888	.593	-5.85	-10.05
	IgG(+)_IgM(-)	1.33	3.888	.735	-9.28	6.63
IgG(-)_IgM(-)	IgG(+)_IgM(+)	3.43	4.665	.465	-12.97	6.11
	IgG(+)_IgM(+)	1.33	3.888	.735	-6.63	9.28

Crosstabs

Group Statistics

	Uji serologi anti dengue br	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Usia responden	igG(-)_igM(+) atau igG(+)_igM(+)	25	25.80	8.062	1.612
	igG(-)_igM(-)	7	27.71	10.579	3.998

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Usia responden	Equal variances assumed	2.134	.154	-.519	30	.608
	Equal variances not assumed			-.444	8.057	.669

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Uji serologi anti dengue * Kelompok Umur	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Uji serologi anti dengue * Jenis kelamin	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%

Uji serologi anti dengue * Kelompok Umur

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Uji serologi anti dengue * Kelompok Umur	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Uji serologi anti dengue * Jenis kelamin	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Uji serologi anti dengue * Gejala klinis febris 1-3 hari	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Uji serologi anti dengue * Gejala klinis febris 3-7 hari	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Uji serologi anti dengue * Gejala klinis myalgia/arthralgia	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Uji serologi anti dengue * Gejala klinis mual/muntah	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Uji serologi anti dengue * Gejala klinis nyeri kepala	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Uji serologi anti dengue * Gejala klinis opistax	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Uji serologi anti dengue * Gejala klinis petekhie	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Uji serologi anti dengue * Uji streptavidin-biotin	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%

Uji serologi anti dengue * Kelompok Umur

			Kelompok Umur			Total
			11 - 20 tahun	21 - 30 tahun	31 - 40 tahun	
Uji serologi anti dengue	IgG(-)_igM(+)	Count	1	5	1	7
		% within Uji serologi anti dengue	14.3%	71.4%	14.3%	100.0%
		% within Kelompok Umur	7.7%	33.3%	25.0%	21.9%
		% of Total	3.1%	15.6%	3.1%	21.9%
	IgG(+)_igM(+)	Count	9	8	1	18
		% within Uji serologi anti dengue	50.0%	44.4%	5.6%	100.0%
		% within Kelompok Umur	69.2%	53.3%	25.0%	56.3%
		% of Total	28.1%	25.0%	3.1%	56.3%
	IgG(-)_igM(-)	Count	3	2	2	7
% within Uji serologi anti dengue		42.9%	28.6%	28.6%	100.0%	
% within Kelompok Umur		23.1%	13.3%	50.0%	21.9%	
	% of Total	9.4%	6.3%	6.3%	21.9%	
Total	Count	13	15	4	32	
	% within Uji serologi anti dengue	40.6%	46.9%	12.5%	100.0%	
	% within Kelompok Umur	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	40.6%	46.9%	12.5%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5.175 ^a	4	.270
Likelihood Ratio	5.300	4	.258
Linear-by-Linear Association	1.53	1	.696
N of Valid Cases	32		

a. 7 cells (77.8%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .88.

Uji serologi anti dengue * Jenis kelamin

			Jenis kelamin		Total
			Laki-laki	Perempuan	
Uji serologi anti dengue	IgG(-)_IgM(+)	Count	2	5	7
		% within Uji serologi anti dengue	28.6%	71.4%	100.0%
		% within Jenis kelamin	16.7%	25.0%	21.9%
		% of Total	6.3%	15.6%	21.9%
	IgG(+)_IgM(+)	Count	7	11	18
		% within Uji serologi anti dengue	38.9%	61.1%	100.0%
		% within Jenis kelamin	58.3%	55.0%	56.3%
		% of Total	21.9%	34.4%	56.3%
	IgG(-)_IgM(-)	Count	3	4	7
		% within Uji serologi anti dengue	42.9%	57.1%	100.0%
		% within Jenis kelamin	25.0%	20.0%	21.9%
		% of Total	9.4%	12.5%	21.9%
Total	Count	12	20	32	
	% within Uji serologi anti dengue	37.5%	62.5%	100.0%	
	% within Jenis kelamin	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	37.5%	62.5%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig (2-sided)
Pearson Chi-Square	3.39 ^a	2	.844
Likelihood Ratio	3.47	2	.841
Linear-by-Linear Association	.285	1	.587
N of Valid Cases	32		

a. 4 cells (66.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.63.

Uji serologi anti dengue * Gejala klinis febris 1-3 hari

			Gejala klinis febris 1-3 hari		Total
			Positif(+)	Negatif(-)	
Uji serologi anti dengue	IgG(-)_igM(+)	Count	1	6	7
		% within Uji serologi anti dengue	14.3%	85.7%	100.0%
		% within Gejala klinis febris 1-3 hari	33.3%	20.7%	21.9%
		% of Total	3.1%	18.8%	21.9%
	IgG(+)_igM(+)	Count	1	17	18
		% within Uji serologi anti dengue	5.6%	94.4%	100.0%
		% within Gejala klinis febris 1-3 hari	33.3%	58.8%	56.3%
		% of Total	3.1%	53.1%	56.3%
	IgG(-)_igM(-)	Count	1	6	7
		% within Uji serologi anti dengue	14.3%	85.7%	100.0%
		% within Gejala klinis febris 1-3 hari	33.3%	20.7%	21.9%
		% of Total	3.1%	18.8%	21.9%
Total		Count	3	29	32
		% within Uji serologi anti dengue	9.4%	90.6%	100.0%
		% within Gejala klinis febris 1-3 hari	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	9.4%	90.6%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	.706 ^a	2	.702
Likelihood Ratio	.705	2	.703
Linear-by-Linear Association	.000	1	1.000
N of Valid Cases	32		

a. 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .66.

Uji serologi anti dengue * Gejala klinis febris 3-7 hari

Crosstab

			Gejala klinis febris 3-7 hari		Total
			Positif(+)	Negatif(-)	
Uji serologi anti dengue	IgG(-)_IgM(+)	Count	6	1	7
		% within Uji serologi anti dengue	85.7%	14.3%	100.0%
		% within Gejala klinis febris 3-7 hari	24.0%	14.3%	21.9%
		% of Total	18.8%	3.1%	21.9%
	IgG(+)_IgM(+)	Count	13	5	18
		% within Uji serologi anti dengue	72.2%	27.8%	100.0%
		% within Gejala klinis febris 3-7 hari	52.0%	71.4%	56.3%
		% of Total	40.6%	15.6%	56.3%
	IgG(-)_IgM(-)	Count	6	1	7
		% within Uji serologi anti dengue	85.7%	14.3%	100.0%
		% within Gejala klinis febris 3-7 hari	24.0%	14.3%	21.9%
		% of Total	18.8%	3.1%	21.9%
Total	Count	25	7	32	
	% within Uji serologi anti dengue	78.1%	21.9%	100.0%	
	% within Gejala klinis febris 3-7 hari	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	78.1%	21.9%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	.839 ^a	2	.657
Likelihood Ratio	.867	2	.648
Linear by-Linear Association	.000	1	1.000
N of Valid Cases	32		

a. 3 cells (.938%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.53

Uji serologi anti dengue * Gejala klinis myalgia/athralgia

			Gejala klinis myalgia/athralgia		Total
			Positif(+)	Negatif(-)	
Uji serologi anti dengue	IgG(-)_IgM(+)	Count	6	1	7
		% within Uji serologi anti dengue	85.7%	14.3%	100.0%
		% within Gejala klinis myalgia/athralgia	24.0%	14.3%	21.9%
		% of Total	18.8%	3.1%	21.9%
	IgG(+)_IgM(+)	Count	15	3	18
		% within Uji serologi anti dengue	83.3%	16.7%	100.0%
		% within Gejala klinis myalgia/athralgia	60.0%	42.9%	56.3%
		% of Total	46.9%	9.4%	56.3%
	IgG(-)_IgM(-)	Count	4	3	7
		% within Uji serologi anti dengue	57.1%	42.9%	100.0%
		% within Gejala klinis myalgia/athralgia	16.0%	42.9%	21.9%
		% of Total	12.5%	9.4%	21.9%
Total	Count	25	7	32	
	% within Uji serologi anti dengue	78.1%	21.9%	100.0%	
	% within Gejala klinis myalgia/athralgia	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	78.1%	21.9%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2.325 ^a	2	.313
Likelihood Ratio	2.098	2	.350
Linear-by-Linear Association	1.620	1	.203
N of Valid Cases	32		

a. 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.53.

Uji serologi anti dengue * Gejala klinis mual/muntah

			Gejala klinis mual/muntah		Total
			Positif(+)	Negatif(-)	
Uji serologi anti dengue	IgG(-)_IgM(+)	Count	5	2	7
		% within Uji serologi anti dengue	71.4%	28.6%	100.0%
		% within Gejala klinis mual/muntah	22.7%	20.0%	21.9%
		% of Total	15.6%	6.3%	21.9%
	IgG(+)_IgM(+)	Count	14	4	18
		% within Uji serologi anti dengue	77.8%	22.2%	100.0%
		% within Gejala klinis mual/muntah	63.6%	40.0%	56.3%
		% of Total	43.8%	12.5%	56.3%
	IgG(-)_IgM(-)	Count	3	4	7
		% within Uji serologi anti dengue	42.9%	57.1%	100.0%
		% within Gejala klinis mual/muntah	13.6%	40.0%	21.9%
		% of Total	9.4%	12.5%	21.9%
Total	Count	22	10	32	
	% within Uji serologi anti dengue	68.8%	31.3%	100.0%	
	% within Gejala klinis mual/muntah	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	68.8%	31.3%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2.891 ^a	2	.236
Likelihood Ratio	2.744	2	.254
Linear-by-Linear Association	1.288	1	.256
N of Valid Cases	32		

a. 4 cells (66.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.19.

Uji serologi anti dengue * Gejala klinis nyeri kepala

Crosstab

115

			Gejala klinis nyeri kepala		Total
			Positif(+)	Negatif(-)	
Uji serologi anti dengue	IgG(-)_igM(+)	Count	2	5	7
		% within Uji serologi anti dengue	28.6%	71.4%	100.0%
		% within Gejala klinis nyeri kepala	14.3%	27.8%	21.9%
		% of Total	6.3%	15.6%	21.9%
	IgG(+)_igM(+)	Count	8	10	18
		% within Uji serologi anti dengue	44.4%	55.6%	100.0%
		% within Gejala klinis nyeri kepala	57.1%	55.6%	56.3%
		% of Total	25.0%	31.3%	56.3%
	IgG(-)_igM(-)	Count	4	3	7
		% within Uji serologi anti dengue	57.1%	42.9%	100.0%
		% within Gejala klinis nyeri kepala	28.6%	16.7%	21.9%
		% of Total	12.5%	9.4%	21.9%
Total	Count	14	18	32	
	% within Uji serologi anti dengue	43.8%	56.3%	100.0%	
	% within Gejala klinis nyeri kepala	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	43.8%	56.3%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.169 ^a	2	.557
Likelihood Ratio	1.193	2	.551
Linear-by-Linear Association	1.125	1	.289
N of Valid Cases	32		

a. 4 cells (56.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.06.

Uji serologi anti dengue * Gejala klinis epistax

			Gejala klinis epistax		Total
			Positif(+)	Negatif(-)	
Uji serologi anti dengue	IgG(-)_IgM(+)	Count		7	7
		% within Uji serologi anti dengue		100.0%	100.0%
		% within Gejala klinis epistax		25.0%	21.9%
		% of Total		21.9%	21.9%
	IgG(+)_IgM(+)	Count	3	15	18
		% within Uji serologi anti dengue	16.7%	83.3%	100.0%
		% within Gejala klinis epistax	75.0%	53.6%	56.3%
		% of Total	9.4%	46.9%	56.3%
	IgG(-)_IgM(-)	Count	1	6	7
% within Uji serologi anti dengue		14.3%	85.7%	100.0%	
% within Gejala klinis epistax		25.0%	21.4%	21.9%	
	% of Total	3.1%	18.8%	21.9%	
Total	Count	4	28	32	
	% within Uji serologi anti dengue	12.5%	87.5%	100.0%	
	% within Gejala klinis epistax	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	12.5%	87.5%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.306 ^a	2	.520
Likelihood Ratio	2.151	2	.341
Linear-by-Linear Association	.633	1	.426
N of valid cases	32		

a. 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .86

Uji serologi anti dengue * Gejala klinis petekchie

			Uji streptavidin-biotin		Total
			Positif(+)	Negatif(-)	
Uji serologi anti dengue	IgG(-)_IgM(+)	Count	5	2	7
		% within Uji serologi anti dengue	71.4%	28.6%	100.0%
		% within Uji streptavidin-biotin	21.7%	22.2%	21.9%
		% of Total	15.6%	6.3%	21.9%
	IgG(+)_IgM(+)	Count	17	1	18
		% within Uji serologi anti dengue	94.4%	5.6%	100.0%
		% within Uji streptavidin-biotin	73.9%	11.1%	56.3%
		% of Total	53.1%	3.1%	56.3%
	IgG(-)_IgM(-)	Count	1	6	7
% within Uji serologi anti dengue		14.3%	85.7%	100.0%	
% within Uji streptavidin-biotin		4.3%	66.7%	21.9%	
% of Total		3.1%	18.6%	21.9%	
Total	Count	23	9	32	
	% within Uji serologi anti dengue	71.9%	28.1%	100.0%	
	% within Uji streptavidin-biotin	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	71.9%	28.1%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	16.021 ^a	2	.000
Likelihood Ratio	16.183	2	.000
Linear-by-Linear Association	5.477	1	.019
N of Valid Cases	32		

a. 2 cells (.33%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.97.



Rumah Sakit Umum "KASIH IBU"¹¹⁹

Jl. Brigjen. Slamet Riyadi 404 * SURAKARTA 57142
Telp. (0271) 714422 (5 lines) * Fax. (0271) 717722

SURAT KETERANGAN

/ / IX /2003

Berdasarkan surat permohonan ijin penelitian Mahasiswa Program Pasca Sarjana
S3 Program Studi Ilmu Kedokteran FK Universitas Airlangga Surabaya
an Y Nining Sri Wuryaningsih NIM 699 712 386 D tanggal 23 Maret 2003,
dengan judul **DETEKSI ANTIGEN VIRUS DENGUE PADA MONOSIT
SEBAGAI SARANA DIAGNOSIS DINI DEMAM BERDARAH DENGUE**

Dengan ini menerangkan bahwa pada prinsipnya kami menyetujui penelitian
tersebut dilaksanakan di **Rumah Sakit Umum Kasih Ibu Surakarta**

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana
mestinya

Surakarta, 30 Maret 2003

Rumah Sakit Umum Kasih Ibu Surakarta

Direktur,



R. S. U. KASIH IBU
Jl. Brigjen. Slamet Riyadi 404 * 714422 SUR.

dr Lo Stauw-Ging MARS



Rumah Sakit Umum "KASIH IBU" ¹²⁰

Jl. Brigjen. Slamet Riyadi 404 * S U R A K A R T A 5 7 1 4 2

Telp. (0271) 714422 (5 lines) * Fax. (0271) 717722

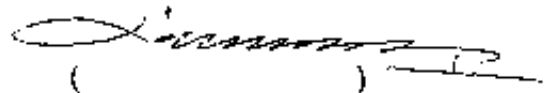
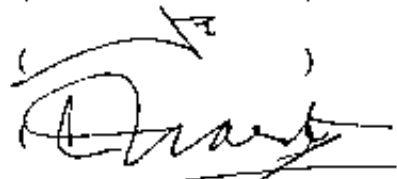

SURAT REKOMENDASI KOMITE ETIK

NO. / KM / 16 / IX / 2003

Bersama ini Komite Etik Rumah Sakit Kasih Ibu Surakarta memberikan rekomendasi kepada dr Y Nining Sri Wuryaningsih untuk melakukan penelitian dengan judul : **DETEKSI ANTIGEN VIRUS DENGUE PADA MONOSIT SEBAGAI SARANA PENUNJANG DIAGNOSIS DINI DEMAM BERDARAH DENGUE**

Surakarta, 19 September 2003

Ketua : dr Lo Siauw Ging MARS.
Sekretaris : dr Isdaryanto MARS
Anggota : 1 dr H Budi Karto SpB
2. dr Bambang Purwanto SpPD


()

()

()