



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

# **UJI DIAGNOSTIK PEMERIKSAAN ANTIGEN NONSTRUKTURAL 1 UNTUK DETEKSI DINI INFEKSI VIRUS DENGUE PADA ANAK**

## **TESIS**



**MEGARIANI**

**PROGRAM PASCA SARJANA DAN MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS ILMU KESEHATAN ANAK  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG 2013**



No: 113/KEP/FK/2011

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK**  
***ETHICAL CLEARANCE***

Tim Komite Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang, dalam upaya melindungi hak azazi dan kesejahteraan subjek penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul:

*The Committee of the Research Ethics of the Faculty of Medicine, Andalas University, with regards of the protection of human rights and welfare in medical/health research, has carefully reviewed the research protocol entitled:*

**Pemeriksaan Antigen Nonstruktural 1 Sebagai Deteksi Dini Infeksi Virus Debgue Pada Anak**

Nama Peneliti Utama : dr. Megariani  
*Name of the Investigator*


Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Andalas  
*Name of Institution*


dan telah menyetujui protokol penelitian tersebut diatas.  
*and recommended the above research protocol.*

Padang, 09 Januari 2012

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas  
*Dean of Faculty of Medicine Andalas University*

Ketua  
*Chairperson*

  
Dr. dr. Masrul, MSc, Sp.GK  
NIP. 1956 1226 1987 101 001

  
Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA(K)  
NIP. 1953 1109 1982 112 001

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis yang saya tulis dengan judul :

“Uji diagnostik pemeriksaan antigen nonstruktural 1 untuk deteksi dini infeksi virus dengue pada anak”

Adalah kerja/ karya saya sendiri dan bukan merupakan jiplakan dari hasil kerja/karya orang lain kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan. Jika kemudian hari pernyataan ini tidak benar (berupa jiplakan), maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, Februari 2013

dr. Megariani





## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “ Uji diagnostik pemeriksaan antigen nonstruktural 1 untuk deteksi dini infeksi virus dengue pada anak”. Tesis ini penulis ajukan sebagai sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Spesialis I dalam bidang Ilmu Kesehatan Anak dan Program S2 Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis ucapkan kepada dr.Amrin Alkamar SpA dan dr. Andani Eka Putra,MSc, yang telah banyak memberikan bimbingan, bantuan dan dorongan dalam penyelesaian tesis ini.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada dr. Amrin Alkamar SpA sebagai Kepala Bagian,dr. Gustina Lubis SpA(K) sebagai KPS PPDS, seluruh staf pengajar Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Andalas/ RS dr. M.Djamil Padang dan semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan tesis ini.

Penulis menyadari bahwa tesis ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharapkan kritikan dan saran dari semua pihak untuk kesempurnaan tesis ini. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmatNya kepada kita semua, Amin.

Padang, Februari 2013

Dr. Megariani



## DAFTAR ISI

	Kata pengantar.....	Hal i
	Daftar isi.....	ii
	Daftar tabel.....	iv
	Daftar gambar.....	v
	Daftar singkatan.....	vi
	Abstrak.....	vii
<b>BAB I</b>	<b>PENDAHULUAN</b>	
	1.1. Latar belakang.....	1
	1.2. Identifikasi masalah.....	3
	1.3. Tujuan penelitian.....	3
	1.4. Hipotesis penelitian.....	4
	1.5. Manfaat penelitian.....	4
<b>BAB II</b>	<b>TINJAUAN KEPUSTAKAAN</b>	
	2.1. Infeksi virus dengue.....	5
	2.1.1. Tes torniquet.....	6
	2.2. Virus dengue.....	7
	2.2.1. Struktur genom virus dengue.....	7
	2.2.2. Hospes virus dengue.....	12
	2.2.3. Replikasi virus dengue.....	14
	2.3. Struktur NS1 virus dengue dan peranan NS1 dalam patogenesis dengue.....	17
	2.4. Pemeriksaan laboratorium penunjang.....	21
	2.4.1. Isolasi virus.....	21
	2.4.2. RT-PCR.....	21
	2.4.3. Uji serologi.....	23
	2.4.4. Deteksi antigen NS1.....	26
<b>BAB III</b>	<b>KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....</b>	<b>28</b>
<b>BAB IV</b>	<b>METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>29</b>
	4.1. Disain penelitian.....	29
	4.2. Tempat dan waktu penelitian.....	29
	4.3. Populasi penelitian.....	29
	4.4. Sampel.....	29
	4.5. Besar sampel.....	30
	4.6. Teknik pengambilan sampel.....	30
	4.7. Kriteria inklusi.....	31
	4.8. Kriteria eksklusi.....	31
	4.9. Izin penelitian.....	31
	4.10. Prosedur penelitian.....	31
	4.11. Cara kerja.....	32
	4.12. Alur penelitian.....	33

4.13. Definisi operasional.....	34
4.14. Rencana pengelolaan dan analisis data.....	35
<b>BAB V HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>36</b>
5.1. Karakteristik subjek penelitian.....	36
5.2. Sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif, nilai prediksi negatif dan akurasi NS1 untuk diagnosis infeksi virus dengue .....	39
5.3. Serotipe virus dengue.....	40
5.4. Sensitivitas NS1 berdasarkan serotipe.....	41
<b>BAB VI PEMBAHASAN.....</b>	<b>42</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	
<b>LAMPIRAN</b>	



## DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 2.1. Interpretasi respon antibodi hemaglutinasi inhibisi dengue.....	24
Tabel 5.1. Karakteristik subjek penelitian.....	36
Tabel 5.2. Hasil pemeriksaan NS1 berdasarkan lama demam.....	38
Tabel 5.3. Hasil uji NS1 dengan PCR.....	39
Tabel 5.4. Sensitivitas NS1 berdasarkan serotipe.....	41





## DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 2.1. Struktur virus dengue.....	8
Gambar 2.2. Daerah pengkode protein RNA virus dengue dan organisasi genom	9
Gambar 2.3. Proses replikasi virus dengue.....	16
Gambar 2.4. Struktur tiga dimensi NS1.....	17
Gambar 2. 5. Immunopatogenesis infeksi virus dengue.....	19
Gambar 2.6. Immunopatogenesis demam berdarah dengue berdasarkan autoantibodi.....	20
Gambar 2. 7. Hasil elektroforesis sampel dengan gel agarose memperlihatkan distribusi serotipe virus dengue .....	23
Gambar 2.8.. Respon imun infeksi virus dengue.....	26
Gambar 5.1. Alur pengamatan sampel penelitian.....	37
Gambar 5.2. Distribusi virus dengue berdasarkan serotipe.....	41

## DAFTAR SINGKATAN

AP-61	: Aedes pseudoscutellaris klon 61
C	: Core
DBD	: Demam berdarah dengue
DD	: Demam dengue
DHF	: Dengue Hemorrhagic Fever
DSS	: Dengue syok sindrom
E	: Envelope
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GAGS	: Glycosaminoglicans
HI	: Hemaglutination Inhibition
IFN	: Interferon
IL	: Interleukin
mNS1	: Membrane associated NS1
NASBA	: Nucleic Acid Sequence Based Amplification
NO	: Nitrit Okside
NS1	: Nonstruktural 1
OFR	: Open reading frame
prM	: Premembran
RNA	: Ribonucleic acid
RT-PCR	: Real Time-Polymerase Chain Reaction
SCF	: Soluble Complement Fixing
sNS1	: Secreted form NS1
TRA-284	: Toxorhynchites amboinensis klon 284

# UJI DIAGNOSTIK PEMERIKSAAN ANTIGEN NONSTRUKTURAL 1 UNTUK DETEKSI DINI INFEKSI VIRUS DENGUE PADA ANAK

Megariani, Amrin Alkamar, Andani Eka Putra

## Abstrak

### Latar belakang

Dengue adalah masalah kesehatan utama di negara tropis dan subtropis. Diagnosis dini infeksi virus dengue sangat penting untuk manajemen infeksi dengue. NS1, merupakan pendekatan baru terhadap diagnosis dengue. Pada penelitian ini, dilakukan pemeriksaan *rapid* NS1 untuk deteksi dini infeksi virus dengue pada anak.

### Tujuan

Untuk menentukan nilai diagnostik NS1 mencakup sensitivitas, spesifisitas, nilai duga positif, nilai duga negatif dan keakuratan NS1 untuk deteksi dini infeksi virus dengue.

### Metode

Dilakukan penelitian *cross sectional* dari bulan April sampai Desember 2012 pada 50 orang anak dengan demam hari 1, hari 2 atau hari ke 3 dengan tes *tourniquet* positif. Dilakukan *rapid test* NS1 dibandingkan dengan RT PCR sebagai *gold standard*.

### Hasil

Didapatkan 50 orang anak dengan demam dan tes *tourniquet* positif. NS1 positif pada 25 anak dan RT PCR positif pada 26 orang anak. *Rapid test* NS1 memiliki sensitivitas 92,3%, spesifisitas 95,8%, nilai duga positif 96 %, nilai duga negatif 92 % dan keakuratan 94%.

### Kesimpulan

NS1 *rapid test* mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk deteksi dini infeksi virus dengue pada anak

**Kata kunci :** *diagnostik dini, infeksi virus dengue, antigen NS1, anak*



# DIAGNOSTIC TEST NONSTRUCTURAL 1 ANTIGEN FOR EARLY DETECTION DENGUE VIRUS INFECTION IN CHILDREN

Megariani, Amrin Alkamar, Andani Eka Putra

## Abstract

### Background

Dengue is a major public health problem in tropical and subtropical countries. Early definitive diagnosis of dengue virus infections is essential for the timely management of dengue infections. Detection of the dengue viral protein, NS1, represents a new approach in early dengue diagnosis. In this study, we evaluated rapid test NS1 for the detection of dengue virus NS1 antigen in children.

### Objective

To determine the value of potential diagnostic sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accurate of dengue virus infection early, in order to provide timely information for the management of patients.

### Method

Cross sectional study was conducted from April to December 2012 on 50 children with fever day 1,2, or 3 and tourniquet test was positive. Examination test was performed with rapid test NS1 and RT PCR as gold standard.

### Result

Obtained 50 children with early fever and positive of tourniquet test, 25 children were positive NS1 rapid test and 26 children were positive with RT PCR. NS1 rapid test had sensitivity value 92,3 %, specificity was 95,8 %, positive predictive value was 96 %, negative predictive value was 92 % and accurate was 94%.

### Conclusion

Rapid test NS1 antigen had highly sensitivity and specificity for early detection dengue virus infection in children

**Keyword:** *early diagnostic ,dengue virus infection, NS1 antigen, children*

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1. Latar belakang**

Dengue adalah penyakit arbovirus endemik yang saat ini telah menjangkiti lebih dari 100 negara, baik yang terletak di daerah tropik maupun subtropik (WHO,1997, Dussart P and Labeau B, 2006). WHO memperkirakan sekitar 50-100 juta kasus infeksi virus dengue terjadi setiap tahun, dan 24.000 kematian setiap tahunnya (WHO,1997, Nimmannitya S,2008) Di Indonesia, demam berdarah dengue pertama kali dilaporkan di Jakarta dan Surabaya pada tahun 1968. Tahun-tahun selanjutnya kasus demam berdarah dengue berfluktuasi jumlahnya setiap tahun dan cenderung meningkat dan daerah yang terjangkit semakin luas. Awal tahun 2004, Indonesia kembali diguncang wabah dengue, lebih dari 10.000 kasus terjadi di Jakarta, dengan angka kematian dilaporkan sebanyak 603 orang (Suroso T and Umar AI,2004, Suwandono A and Kosasih H,2004). Kemudian pada tahun 2006 insiden DBD adalah 52,48 per 100.000 penduduk dan pada tahun 2007 insidennya meningkat menjadi 71,78 per 100.000 penduduk (Departemen Kesehatan RI,2007). Di Sumatera Barat, kasus DBD tahun 2006 adalah 23,9 per 100.000 penduduk dan pada tahun 2007 insidennya meningkat tajam menjadi 48,05 per 100.000 penduduk ( Dinkes tk I, 2007).

Kekhawatiran sekarang adalah apabila virus dengue menjadi semakin ganas sehingga menyebabkan pandemi penyakit yang lebih mematikan, sementara vaksin yang efektif belum berhasil dikembangkan. Kekhawatiran



ini sangat beralasan karena virus dengue adalah virus RNA yang berpolaritas positif. Frekuensi mutasi virus RNA sangat tinggi karena tidak memiliki enzim yang diperlukan untuk mengoreksi pemasangan basa selama proses replikasi. Alasan lain adalah masalah sanitasi lingkungan yang buruk, populasi penduduk yang semakin padat dan mobilitas yang semakin tinggi. Semua ini merupakan kondisi ideal bagi virus untuk mempertahankan dan memperluas mata rantai siklusnya melalui perantara vektor (*Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*) sehingga memberikan peluang virus berevolusi menghasilkan varian-varian baru yang semakin ganas (Raekiansyah M and Sudiro TM, 2004).

Gejala awal infeksi virus dengue sering tidak khas sehingga sering terjadi keterlambatan diagnosis. Perjalanan penyakit bisa sangat cepat, dalam beberapa hari bahkan dalam hitungan jam penderita bisa masuk dalam keadaan kritis (Chen K,2000, Setiabusi D,2011, Soegijanto S,2005, Soedarmo SP,2008). Untuk menghindari keterlambatan diagnosis, perlu diketahui deteksi dini terhadap infeksi virus ini. Saat ini telah dikembangkan suatu pemeriksaan baru terhadap antigen non struktural 1 (NS1) yang dapat mendeteksi atau mendiagnosis infeksi virus dengue dengan lebih awal bahkan pada hari pertama onset demam , karena protein NS1 bersirkulasi dalam konsentrasi tinggi dalam darah pasien selama awal fase akut, baik pada infeksi primer maupun sekunder tanpa perlu menunggu terbentuknya antibodi seperti pemeriksaan serologi Ig M atau Ig G yang baru positif setelah melewati hari keempat demam (Lanciotti RS,1992, Sudiro TM,1997, Alcon S,2002, Shu PY,2003, Koraka P, 2003, Kumarasamy V,2007). Adanya pemeriksaan NS1 ini sangat penting karena dapat dilakukan terapi suportif



dan pemantauan pasien segera dan dapat mengurangi risiko komplikasi maupun kematian ( Sekaran D et al,2007, Zainah S et al,2009, Ty Hang V et al,2009).

Libraty, 2002, meneliti 18 orang anak dengan DBD, didapatkan NS1 sudah terdeteksi pada hari ke 2 demam dan kadar tertinggi didapatkan pada hari ke 3 demam, sedangkan kadar terendah didapatkan pada hari ke 8 demam (Libraty DH et al,2002 ). Dussart dkk, 2006, meneliti 299 pasien demam dengue di Perancis. Didapatkan sensitivitas NS1 pada hari 1-4 demam adalah 87,6% dan 43,5% pada hari 5-10 demam (Dussart P et al, 2006).

Penelitian lain dilakukan oleh Kumarasamy dkk, 2007, diperoleh hasil sensitivitas reagen komersial antigen dengue NS1 untuk infeksi virus dengue akut sebesar 93,4 % dan spesifisitas 100%. Nilai ramal positif dan negatif masing-masing sebesar 100% dan 97,3% (Kumarasamy et al, 2007). Lastere, 2010, meneliti 181 pasien DHF di Polinesia, Perancis, didapatkan sensitifitas NS1 sebesar 76,5% dan spesifisitas sebesar 96,2% (Lastere S et al, 2010).

## **1.2 Identifikasi masalah**

Berdasarkan uraian di atas dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut : Bagaimanakah nilai diagnostik pemeriksaan antigen NS1 pada anak yang terinfeksi virus dengue?

### **1.3. Tujuan penelitian**

#### **1.3.1. Tujuan umum**

Mengetahui nilai dignostik pemeriksaan antigen NS1 pada anak yang terinfeksi virus dengue.

#### **1.3.2. Tujuan khusus**

1. Mengetahui sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif, dan nilai prediksi negatif pemeriksaan NS1 untuk deteksi dini infeksi virus dengue pada anak dibandingkan dengan PCR.
2. Mengetahui waktu yang lebih tepat untuk pemeriksaan NS1 berdasarkan lama demam.
3. Mengetahui serotipe virus dengue pada anak yang terinfeksi virus dengue.
4. Mengetahui nilai diagnostik NS1 berdasarkan serotipe virus dengue.

### **1.4. Hipotesis penelitian**

1. Pemeriksaan NS1 memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk deteksi dini infeksi virus dengue pada anak.

### **1.5. Manfaat penelitian**

1. Dapat merekomendasikan pemeriksaan NS1 sebagai deteksi dini adanya infeksi virus dengue pada anak.
2. Dapat mengetahui serotipe virus dengue terbanyak pada anak yang terinfeksi virus dengue.

## **BAB II**

### **TINJAUAN KEPUSTAKAAN**

#### **2.1. Infeksi virus dengue**

Manifestasi klinis akibat infeksi virus dengue dapat menyebabkan keadaan yang beranekaragam, mulai dari tanpa gejala (asimtomatik), demam ringan yang tidak spesifik (*undifferentiated febrile illness*), demam dengue (DD) atau bentuk yang lebih berat yaitu demam berdarah dengue (DBD) dan *dengue syok sindrom* (DSS). Gambaran klinis dari DD sering tergantung pada umur penderita. Pada bayi dan anak biasanya didapatkan demam dengan ruam makulopapular saja. Pada anak yang lebih besar dapat mengalami panas tinggi mendadak, sakit kepala hebat, nyeri di belakang mata, nyeri otot dan sendi, mual dan muntah serta ruam (WHO, 1997, Sutaryo, 2004).

Untuk menegakkan diagnosa demam berdarah dengue, WHO, 1997, telah menetapkan dua kriteria yaitu kriteria klinis dan kriteria laboratorium (WHO,1997).

Kriteria klinis yaitu :

- a. Demam tinggi dengan onset akut selama 2-7 hari
- b. Adanya manifestasi perdarahan termasuk uji torniket positif
- c. Hepatomegali
- d. Syok dengan manifestasi nadi yang cepat dan lemah dengan tekanan nadi yang sempit ( 20 mmHg atau kurang) atau adanya hipotensi, akral dingin dan gelisah.

Kriteria laboratorium adalah:

- a. Trombositopenia ( kurang atau sama dengan  $100.000/mm^3$ )
- b. Hemokonsentrasi ( terdapat kenaikan hematokrit lebih atau sama dengan 20% pada masa akut dibandingkan dengan masa penyembuhan).



Menurut pedoman tersebut diagnosis demam berdarah dengue sudah bisa ditegakkan bila ditemukan dua gejala klinis disertai trombositopenia dan hemokonsentrasi. Bila ditemukan anemia atau perdarahan yang berat, efusi pleura dan atau adanya hipoalbuminemia, menandakan adanya kebocoran plasma.<sup>24</sup>

WHO, 1997, juga membagi empat kategori penderita menurut derajat berat penyakit yaitu (WHO, 1997):

Derajat I : Adanya demam tanpa perdarahan spontan, manifestasi perdarahan hanya berupa tes torniket yang positif.

Derajat II : Gejala demam diikuti dengan perdarahan spontan, biasanya berupa perdarahan di bawah kulit dan atau perdarahan lainnya.

Derajat III : Adanya kegagalan sirkulasi berupa nadi yang cepat dan lemah, penyempitan tekanan nadi atau hipotensi, dengan disertai akral yang dingin dan gelisah.

Derajat IV : Adanya syok yang berat dengan nadi tak teraba dan tekanan darah yang tidak terukur

#### **2.1.1. Tes *tourniquet***

Salah satu variabel yang dapat digunakan untuk definisi secara klinis dari infeksi virus dengue adalah hasil yang positif dari tes *tourniquet*. Tes *tourniquet* menggambarkan fragilitas dari kapiler dan trombositopeni (Aryati et al, 2006). Pada penelitian yang melibatkan 1136 anak di Vietnam yang dicurigai menderita infeksi dengue didapatkan bahwa tes *tourniquet* memiliki sensitifitas 41.6% untuk demam dengue, dan spesifitas 94,4%. Tes ini tidak dapat membedakan antara demam dengue (45% positif) dan demam berdarah dengue (38% positif). Studi ini menyebutkan bahwa tes *tourniquet* mempunyai nilai yang rendah dalam diagnosa

dari infeksi demam dengue di rumah sakit, namun ketika digunakan pada komunitas, hasil positif dari tes *tourniquet* sangat membantu dalam memprediksi adanya infeksi dengue, tetapi hasil yang negatif dari tes *tourniquet* tidak menyingkirkan adanya kemungkinan infeksi dengue (Phuong CXT et al, 2002).

Penelitian yang dilakukan pada 240 anak di India, didapatkan tes *tourniquet* positif pada 40% anak dengan demam dengue, 62% anak dengan demam berdarah dengue dan 64% anak dengan dengue syok sindrom (Kabra SK et al, 1999). Pada penelitian lain yang melibatkan 172 anak di Thailand, tes *tourniquet* positif pada 36% anak dengan demam dengue, 52% anak dengan demam berdarah dengue, dan 21% pada anak dengan infeksi viral selain dengue (Kalayanaroj S et al, 1997).

## **2.2. Virus dengue**

### **2.2.1. Struktur genom virus dengue**

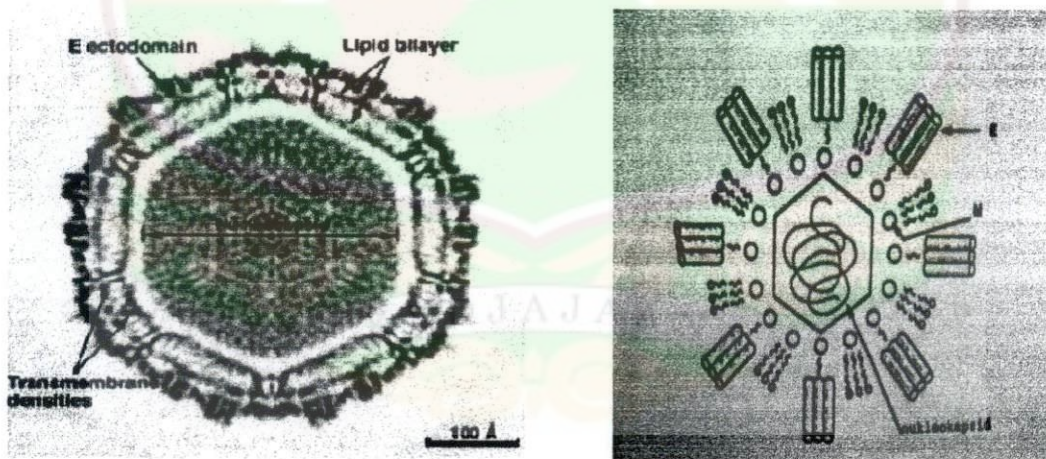
Virus dengue merupakan virus RNA rantai tunggal (*single stranded/ss RNA*) yang termasuk ke dalam famili flaviviridae, genus flavivirus dan terdapat 4 serotipe yang berbeda yaitu DEN 1, DEN 2, DEN 3, dan DEN 4 (Sutaryo, 2004, Dussart P et al, 2006, Nimmannitya, 2008). Struktur antigen keempat serotipe ini sangat mirip satu dengan yang lain, namun antibodi terhadap masing-masing serotipe tidak dapat saling memberikan perlindungan silang. Keempat serotipe tersebut terdapat di Indonesia (Sjahrurrachman A, 1994).

Virion dengue merupakan partikel sferis dengan diameter nukleokapsid 30 nm dan ketebalan selubung 10 nm, sehingga diameter virion kira-kira 40-50 nm. Selubung virion berperan dalam fenomena hemaglutinasi, netralisasi dan interaksi antara virus dengan sel saat awal infeksi. Pada masing-masing segmen kodon, variasi di antara serotipe dapat mencapai 2,6 - 11,0 % pada tingkat nukleotida dan



1,3-7,7 % untuk tingkat protein. Perbedaan urutan nukleotida ini ternyata menyebabkan variasi dalam sifat biologis dan antigenitasnya (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

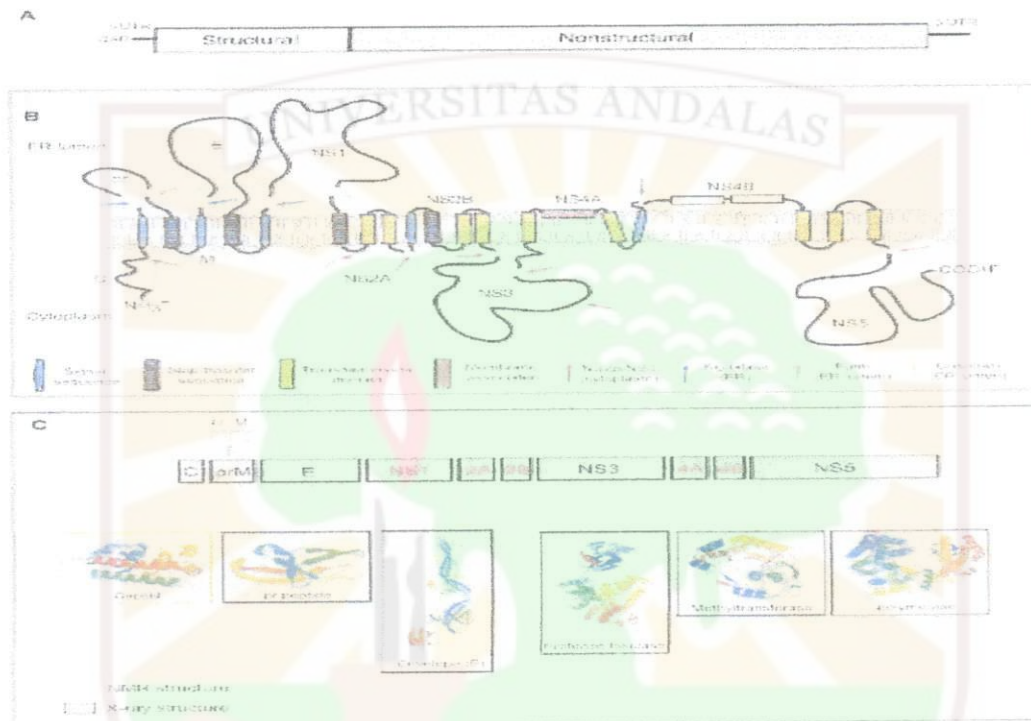
Virus ini mempunyai satu *open reading frame* (OFR) yang menyandi pembentukan sintesis poliprotein yang panjang. Poliprotein ini dibuat oleh virus dan protease-protease sel host. Virus dengue memiliki genom 11 kb, genom tersebut mengkode 10 macam protein virus. Virion dewasa terdiri atas 3 protein struktural yaitu protein core atau nukleokapsid (C), protein struktural yang terdiri dari protein envelope (E), dan protein pre-membran ( prM atau preM ) dan 7 protein non struktural yaitu NS1,NS2a,NS2b,NS3,NS4a,NS4b dan NS5. Protein struktural merupakan 25% dari total protein, sedangkan protein non-struktural merupakan bagian yang terbesar (75%). Dalam merangsang pembentukan antibodi diantara protein struktural, urutan imunogenitas tertinggi adalah protein E, kemudian diikuti protein prM dan C. Sedangkan pada protein nonstruktural yang paling berperan adalah protein NS1 (Halstead SB,1997, Lin S et al,2006).



Gambar 2.1. Struktur virus dengue ((Sjahrurrachman A,1994)



Genom virus dengue merupakan RNA yang berpolaritas positif, yaitu apabila viral RNA yang telanjang masuk ke dalam suatu sel, maka viral protein dan seringkali viral partikel akan segera diproduksi. Hal ini berbeda dengan virus RNA yang berpolaritas negatif, seperti misalnya virus rabies, yang membutuhkan suatu polimerase untuk membentuk protein virus (Raekiansyah M and Sudiro TM,2004).



Gambar 2.2. Daerah pengkode protein RNA virus dengue dan organisasi genom (Perera R and Kuhn RJ,2008).

Gen yang mengatur sintesis protein struktural virus terdapat pada kira-kira seperempat bagian genom keseluruhan dan terletak pada ujung lima *prime*, sedang pada ujung yang lain terletak gen yang mengatur sintesis berbagai protein non struktural (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

Protein C adalah protein pertama yang dibentuk pada waktu translasi genom virus. Berat molekulnya kira-kira 13.500, kaya asam amino lisin dan arginin

sehingga protein C bersifat basa. Karena sifatnya itu protein C mampu berinteraksi dengan RNA virion. Selain itu pada ujung karboksilnya, protein C terdiri dari rangkaian asam amino hidrofobik yang memungkinkan menempel pada membran sebelum dipecah oleh signalase pada ujung protein prM. Pada akhirnya, ujung hirofobik protein C dilepas oleh enzim protease yang dikode gen virus sesaat menjelang morfogenesis virion. Protein C merupakan salah satu protein flavivirus yang *conserved*, walaupun masih kurang *conserved* dibanding protein struktural lain (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

Protein M mempunyai dua bentuk yaitu prM yang terdapat pada virion *immature* intraseluler dan protein M yang terdapat pada virion *mature* ekstraseluler. Protein prM adalah glikoprotein dengan berat molekul 22.000 dan pecah menjadi protein M dan glikoprotein lain menjelang morfogenesis lengkap virion. Pemecahan ini tampaknya merupakan hal kritis bagi morfogenesis karena pemecahannya diikuti segera dengan naiknya titer virus aktif (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

Protein E merupakan protein utama permukaan virus dan berhubungan dengan sifat biologis virus dan imunitas humoral. Protein ini berperanan penting dalam perlekatan virus pada sel sasaran, mempermudah fusi membran spesifik, yang memungkinkan virus menghindari vesikel endositik, dan segera memulai siklus replikasi intraseluler. Protein E di dalam sel terinfeksi dapat berada dalam bentuk heterodimer antara prM-E. Protein E berat molekulnya 51.000-60.000 dan dalam virion berada dalam bentuk homotrimer. Dalam rangkaian asam aminonya, protein E mempunyai 12 gugus sistein yang membentuk enam ikatan disulfida. Melihat konfigurasiya, pada protein E terdapat tiga kelompok epitop yang terpisah yaitu epitop A, B dan C. Kira-kira 60%-74% dari protein E merupakan residu asam amino,



dan berfungsi sebagai pembeda antara serotipe yang satu dengan yang lainnya dan menyebabkan reaksi antibodi. Glikoprotein E merupakan epitop penting karena mampu membangkitkan antibodi spesifik untuk proses netralisasi, mempunyai aktifitas hemaglutinin, berperan dalam proses absorpsi pada permukaan sel, (reseptor binding), dan perakitan virion. Antibodi memiliki aktifitas netralisasi dan mengenali protein E yang berperan sebagai epitop yang memiliki serotip spesifik, serotipe-cross reaktif atau flavivirus-cross reaktif. Antibodi netralisasi ini memberikan proteksi terhadap infeksi virus DEN (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

Adapun protein nonstruktural virus terdiri dari tujuh macam protein yang dikode oleh gen terpisah. NS1 merupakan glikoprotein dengan berat molekul kira-kira 48.000 dan disintesis pada retikulum endoplasmik kasar (*rough endoplasmic reticulum*, RER) sebagai protein monomer yang hidrofilik dan yang kemudian berubah menjadi homodimer yang lebih hidrofobik dibandingkan aslinya. Glikolisasi protein terjadi dengan empat molekul gula manosa, tetapi setelah protein dipindahkan ke kompleks Golgi, dua gula manosa diganti dengan molekul gula lain. NS1 dicirikan sebagai complement fixing antigen yaitu pengikatan komplemen bila berbentuk larutan. Protein NS1 selama proses infeksi dapat berada di dalam sel, di membran plasma maupun disekresikan keluar sel. NS1 berperan dalam morfogenesis virion. Karena terpapar di membran plasma, NS1 juga berperan dalam proses imunopatologi infeksi (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

NS2 terdiri dari dua jenis, yaitu NS2a yang berat molekulnya kira-kira 20.000 dan NS2b berat molekulnya kira-kira 14.500. Kedua protein ini bukan merupakan glikoprotein. NS2a berfungsi sebagai enzim proteolitik bagi pematangan NS1. NS2b



termasuk protein nonstruktural yang pendek, terdiri dari 130-132 asam amino. Protein ini berperan dalam fungsi protease dari kompleks NS2b-NS3 (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

NS3 merupakan protein hidrofilik dengan berat molekul 70.000 dan berfungsi seperti enzim tripsin. Berperan sebagai enzim yang memecah poliprotein prekursor protein virus dan juga sebagai komponen dari RNA polimerase viral. Penelitian dengan teknik Bowman-Birk inhibitor dapat mengetahui lebih detail struktur kristal NS3. Hal ini dapat dikembangkan untuk merancang suatu obat antivirus dengue. Kalau replikasi virus dapat dihambat oleh suatu obat maka harapannya dengue dapat diobati (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

NS4 tidak jelas fungsinya, berat molekulnya adalah 16.000 untuk NS4a dan 27.000 untuk NS4b. Keduanya protein hidrofobik, NS5 merupakan protein terbesar dengan berat molekul mencapai 150.000 dan bertindak sebagai RNA polimerase (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

Protein-protein non struktural virus tersebut diduga bersama-sama dengan protein-protein host yang belum diketahui, membentuk mesin replikasi di dalam sitoplasma sel-sel yang terinfeksi dan mengkatalisis perbanyakan RNA. Sebagai contoh NS3 dan NS5 memiliki aktivitas protease, helicase, polimerase yang sangat berperan pada proses replikasi. NS3 hanya akan aktif bila berikatan dengan NS2b dimana NS2b juga berperan pada *protein folding* (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

### **2.2.2. Hospes virus dengue**

Virus dengue mampu berkembang biak dalam tubuh manusia, binatang seperti monyet, simpanse, kelinci, marmot, tikus, hamster serta serangga. Walaupun binatang primata merupakan hospes alami virus, viremia yang timbulnya biasanya lebih rendah dan lebih pendek masanya. Pada manusia masa viremia berkisar 2-12 hari sementara pada binatang primata 1-2 hari dan titer virus dalam darah manusia dapat mencapai lebih dari seratus kali dibandingkan pada darah binatang primata. Nyamuk dari genus *Aedes* yaitu *A. aegypti* dan *A. albopictus* merupakan dua spesies yang paling penting karena luasnya distribusi nyamuk dan efisiensinya sebagai vektor (Henchal and Erik A, 1990, Sjahrurachman A, 1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

Secara invitro, virus dengue dapat dikembangbiakkan pada berbagai biakan sel, baik biakan sel mamalia maupun biakan sel insekta. Efek sitopatogenik yang timbul bervariasi mulai dari tanpa efek sitopatogenik sampai yang efek sitopatogeniknya nyata. Pembiakan pada sel insekta biasanya kurang menimbulkan efek sitopatogenik dibandingkan dengan pembiakan pada sel mamalia. Biakan sel insekta yang sering dipakai adalah sel AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris* klon 61), sel C6/36 (*Aedes albopictus* klon C6/36), TRA-284 (*Toxorhynchites amboinensis* klon 284). Titer maksimum yang dapat dicapai pada pembiakan pada sel insekta berkisar antara seratus juta sampai satu milyar plaque forming unit per liter. Sedangkan sel mamalia yang sering dipakai adalah sel LLC-MK2 (ginjal monyet), sel BHK-21 (ginjal hamster), sel vero (ginjal monyet), FRhL (paru fetus monyet). Sel LLC-MK2 dan BHK-21 sering dipakai untuk titrasi virus infeksius, sedangkan sel FRhL biasanya dipakai dalam penelitian pengembangan vaksin (Halstead SB, 1997).



Dari berbagai percobaan dan penelitian pada manusia dan binatang, hospes seluler *invivo* untuk virus dengue terutama terdiri dari sel-sel yang termasuk sistem retikuloendotelial diantaranya sel monosit, sel endotel, sel Kupfer, sel limfosit B dan juga makrofag. Infeksi dimulai dengan menempelnya virion pada reseptor di membran plasma. Reseptor ini diketahui dapat dihancurkan oleh enzim tripsin (Halstead SB, 1997, Lin S et al, 2006).

Secara *invitro* perlipatgandaan kembang biak virus di dalam sel retikuloendotelial tidak hanya dirangsang oleh antibodi anti dengue pada kadar rendah, tetapi juga dirangsang oleh berbagai zat aktif lain. Diantara zat aktif tersebut adalah dinding sel bakteri, toksin bakteri, komponen cacing usus, lektin dan sebagainya (Halstead SB, 1997, Lin S et al, 2006).

### **2.2.3. Replikasi virus dengue**

Virus masuk ke sel melalui proses endositosis yang diperantarai reseptor, kemudian di dalam sel ada proses *uncoating* yaitu melepas nukleokapsid dan genom virus yang terdiri dari ssRNA akan dilepaskan ke dalam sitoplasma dan digunakan sebagai cetakan /template untuk proses translasi menjadi prekursor protein yang besar. Pemotongan pada bagian terminal dari poliprotein ini oleh enzim-enzim sel inang /host akan menghasilkan protein-protein struktural yang akan membentuk partikel virus yang berselubung. Poliprotein yang tersisa dibutuhkan untuk menghasilkan lebih banyak virus (Henchal and Erik A, 1990, Sjahrurachman A, 1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

RNA yang baru dihasilkan kemudian digunakan kembali untuk proses translasi dan menghasilkan kembali protein-protein virus, untuk sintesis lebih banyak RNA virus atau untuk enkapsidasi ke dalam partikel virus. Pada akhirnya virion



meninggalkan sel dengan proses eksositosis yang sering menyebabkan kematian sel (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

Virus dengue menempel pada hospesnya melalui dua cara yaitu terikat pada reseptor virus yang ada dipermukaan sel dan melalui antibodi anti dengue yang terikat pada sel. Setelah proses penempelan, virus masuk ke dalam sel dengan dua cara yaitu : endositosis / pinositosis dan fusi antara selubung virus dengan membran plasma yang diikuti pelepasan nukleokapsid ke dalam sitoplasma sel. Fusi ini berlangsung lebih baik pada suasana asam (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

Monosit makrofag merupakan target utama bagi virus dengue. Protein E virus berperan sebagai penghubung utama untuk melekat pada sel, akan tetapi reseptor yang terdapat pada sel hospes justru bersifat menghindar. Molekul reseptor sel hospes tersebut termasuk diantaranya protein, reseptor Fc, glycosaminoglicans (GAGS) dan lipopilosakarida yang berikatan dengan molekul yang berasosiasi dengan CD-14. (Mackenzie JM and Jones MK, 1996)

Tahap pertama setelah terjadinya pelepasan kapsid adalah translasi RNA virion menjadi RNA polimerase yang kemudian digunakan untuk membuat RNA template genom virus. Dalam proses replikasinya, di dalam sel terdapat 3 jenis RNA yaitu (Henchal and Erik A,1990, Sjahrurrachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001):

1. RNA dengan koefisien sedimentasi 20-22S, tahan dengan enzim RNase, merupakan RNA serat ganda dimana serat satunya merupakan genom virus, disebut bentuk replikatif.

2. RNA dengan koefisien sedimentasi 20-28S, relatif tahan RNase, merupakan RNA serat ganda parsial, disebut bentuk replikatif antara.
3. RNA dengan koefisien sedimentasi 42S dan peka RNase yang merupakan genom virion.

Di dalam proses replikasi RNA ini, RNA polimerase difase awal dan fase lanjut siklus, berbeda afinitasnya terhadap serat RNA berpolaritas positif dan negatif, pada fase lanjut siklus replikasi terutama membentuk serat RNA berpolaritas positif. Selanjutnya pada akhir siklus pengikatan protein C pada ujung 3'RNA menghalangi ikatan RNA polimerase dengan molekul RNA dan tetap membiarkan ujung 5' berikatan dengan ribosom sementara sintesis protein tetap berlangsung sebagai persiapan morfogenesis lengkap virion (Henchal and Erik A, 1990, Sjahrurrachman A, 1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

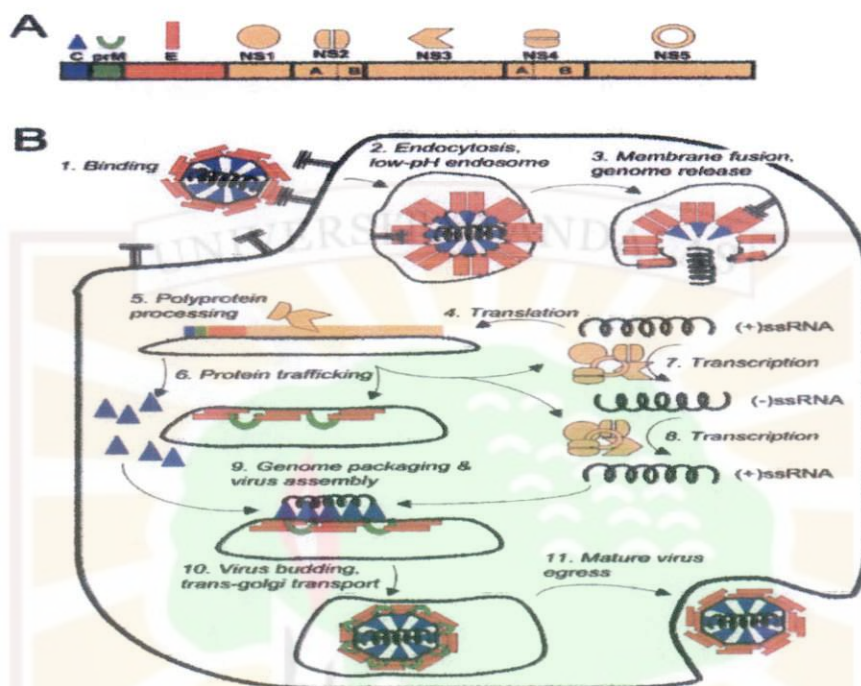
Translasi genom virus dimulai dari kodon AUG gen protein C, prM, E, NS1 sampai gen protein NS5. Pada fase akhir siklus replikasi yaitu menjelang atau bersamaan dengan terbentuknya virion, prM dipecah menjadi M. Setelah semua komponen virus disintesis, morfogenesis lengkap virion berlangsung dan pada dasarnya terdiri dari 4 tahap yaitu (Mackenzie JM and Jones MK, 1996) :

1. Perakitan nukleokapsid dari RNA dan protein C
2. Budding nukleokapsid dari membra intraselular yang telah tersisip oleh prM dan E.
3. Pelepasan virion yang terjadi akibat proses fusi membran plasma dengan vesikel pembawa virion.
4. Pemecahan prM menjadi M.

Virus dengue hanya dapat bertahan pada waktu yang pendek di luar tubuh manusia. Darah dari pasien yang mengandung virus dengue dan disimpan dalam suhu dingin masih dapat digunakan untuk menginfeksi manusia. Dalam beberapa



penelitian, virus dapat bertahan di luar tubuh manusia selama 48 jam (Brooks GF and Butel JS, 2001). Proses replikasi virus dengue dapat dilihat pada gambar berikut



Gambar 2.3 . Proses replikasi virus dengue (Tomlinson SM and Malmstrom RD, 2009)

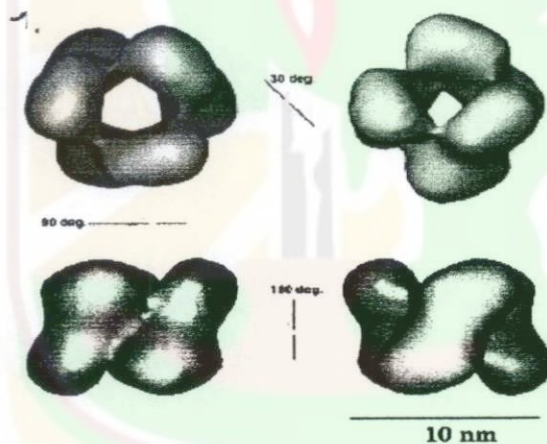
### 2.3. Struktur NS1 virus dengue dan peranan NS1 dalam patogenesis dengue

NS1 adalah glikoprotein non struktural dengan berat molekul 46-50 kD dan merupakan glikoprotein yang sangat *conserved*. NS1 digambarkan sebagai suatu antigen *Soluble Complement Fixing* (SCF) pada kultur sel yang terinfeksi. NS1 diperlukan untuk kelangsungan hidup virus namun tidak diketahui dengan pasti aktivitas biologisnya. Dari bukti yang sudah ada menunjukkan bahwa NS1 terlibat dalam proses replikasi virus. NS1 dihasilkan dalam 2 bentuk yaitu *membrane*



*associated* (mNS1) dan *secreted form* (sNS1) (Lindenbach BD and Rice CM, 1999, Valdes K et al, 2000, McBride WJH, 2009).

NS1 pada mulanya ditranslokasikan ke retikulum endoplasma melalui sekuens signal hidrofobik yang dikode di bagian C terminal E, dan secara cepat didimerisasi di dalam organel-organel intrasel, kemudian ditransfer ke membran sitoplasma. NS1 dilepaskan dalam bentuk hexameric solubilized (sNS1), yang dibentuk dari 3 subunit dimerik yang dihubungkan secara kovalen. Selama infeksi sel, NS1 ditemukan berkaitan dengan organel-organel intrasel atau ditransfer melalui jalur sekresi ke permukaan sel (membrane sitoplasma). Bentuk heksamer yang larut dilepaskan dari sel mamalia yang terinfeksi (Flamand M et al, 1999, Kumarasamy V et al, 2007, Sekaran D et al, 2007, Gutsche I et al, 2011).



Gambar 2.4. Struktur tiga dimensi NS1 (Gutsche I et al, 2011)

NS1 bukan bagian dari struktur virus tetapi diekspresikan pada permukaan sel yang terinfeksi dan memiliki determinan-determinan yang spesifik grup dan tipe. NS1 flavivirus telah dikenal sebagai imunogen yang penting dan perannya dalam imunopatogenesis juga telah dikemukakan berdasarkan temuan *anti-SCF antibodies* dalam serum pasien-pasien dengan infeksi sekunder tetapi tidak pada infeksi primer

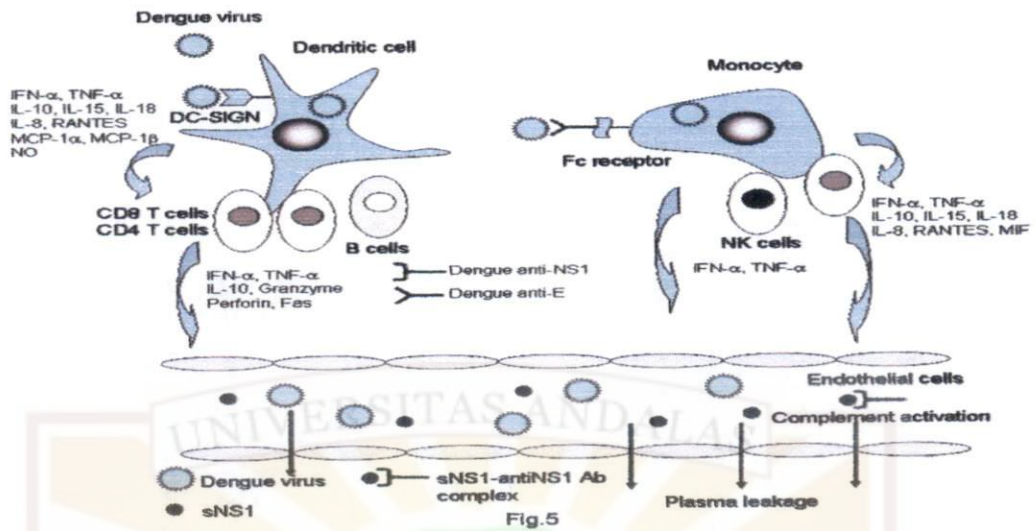
( Mackenzie JM,1996, Lindenbach BD and Rice CM,1999, Flamand M et al,1999, Blacksell SD et al, 2008,Gutsche I et al, 2011).

NS1 merupakan gen esensial di dalam sel yang terinfeksi dimana fungsinya sebagai ko-faktor untuk replikasi virus, dalam bentuk replikasi RNA *double-stranded*. *Immune recognition* dari permukaan sel NS1 pada sel endotel dihipotesiskan berperan dalam aktivasi komplemen dan menyebabkan mekanisme kebocoran plasma yang terjadi selama infeksi virus dengue yang berat. Sampai saat ini, bagaimana NS1 berhubungan dengan membran plasma, yang tidak berisi motif sekuens *membrane-spanning* masih belum jelas (Gutsche I et al, 2011).

NS1 terikat secara langsung pada permukaan berbagai tipe sel epitelial dan sel mesensimal, juga menempel secara kurang lekat terhadap berbagai sel darah tepi. Lebih lanjut, NS1 juga terikat pada biakan sel endotel mikrovaskuler manusia lebih baik daripada sel endotel aorta atau *umbilical cord* (Brooks GF and Butel JS,2001).

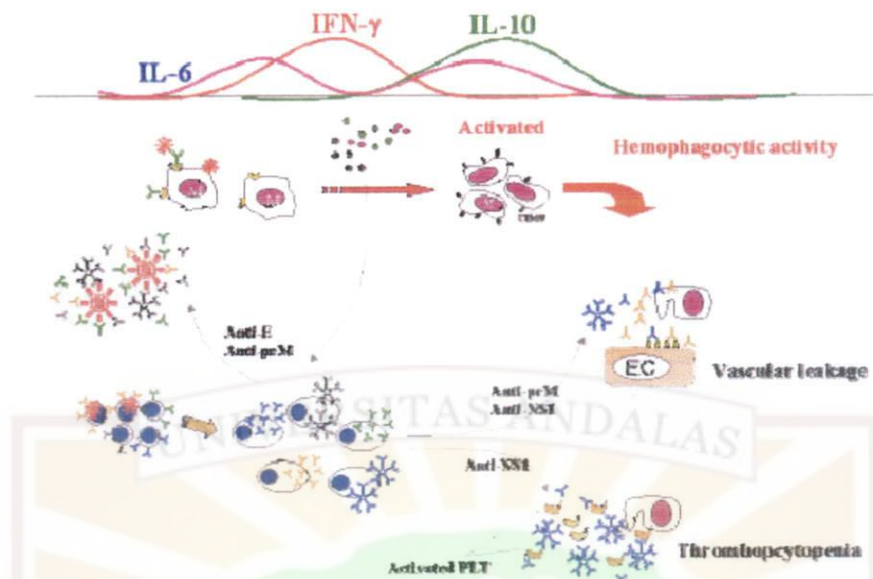
Peranan NS1 dalam DBD terutama disebabkan oleh ikatannya pada sel endotel dan mengaktivasi komplemen sehingga mengakibatkan kebocoran plasma. Sel utama dalam perkembangan virus dengue adalah sel makrofag dan dendritik, yang menangkap virus melalui *antigen presenting cells* (APC), selanjutnya dipresentasikan pada limfosit T CD4 dan T CD8 sehingga terjadi aktivasi limfosit T. Aktivasi limfosit T menghasilkan limfokin dan interferon  $\gamma$  yang akan merangsang monosit dan makrofag mensekresi berbagai mediator inflamasi lainnya seperti TNF  $\alpha$ , IL-1, IL-6, Nitrit Okside (NO) dan histamin sehingga terjadi suatu disfungsi endotel dan kebocoran plasma ( Rothman AL,2007, Noisakran S,2007, Lei HY et al,2008). Mekanisme ini dijelaskan dalam gambar berikut :





Gambar 2.5. Immunopatogenesis infeksi virus dengue (Rothman AL,2007)

Antibodi terhadap protein NS1 virus dengue juga mengakibatkan aktivasi inflamasi sel endotel sehingga terjadi peningkatan kadar IL-6, IL-10, INF  $\gamma$  dari sel endotel dan menyebabkan terjadinya kebocoran vaskuler dan trombositopeni (Lei HY et al, 2008), seperti yang terdapat pada gambar berikut :



Gambar 2.6. Immunopatogenesis demam berdarah dengue berdasarkan autoantibodi (Lei HY et al, 2008)

Penelitian lain menunjukkan bahwa NS1 berikatan dengan sel endotel lewat perantara heparin sulfat dan kondroitin sulfat. Dari hasil kultur sel, dapat disimpulkan bahwa NS1 terutama berikatan dengan sel endotel mikrovaskuler yang terdapat di paru-paru dan hati. Hal ini dapat terlihat adanya efusi pleura dan ascites pada manifestasi klinis DBD ( Alcon S et al,2005, Avirutnan P and Zhang L,2007, Gutsche I et al, 2011).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa terdapat hubungan filogenetik antara NS1 dengan trombosit dan fibrogen manusia. Hubungan ini terutama oleh karena terbentuknya antibodi terhadap NS1 yang bereaksi silang terutama dengan fibrinogen, trombosit dan sel endotel. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa NS1 berkorelasi dengan trombosit, fibrinogen, dan protein seperti integrin dan adhesin yang sangat berperan dalam fungsi trombosit sehingga timbul pemikiran bahwa



terdapat suatu reaksi antibodi silang antara NS1 dengan trombosit dan sel endotel yang berperan dalam mekanisme demam berdarah (Wiwanitkit V, 2004).

#### **2.4. Pemeriksaan laboratorium penunjang**

Secara umum, pada demam berdarah dengue, dapat dilakukan pemeriksaan:

##### **2.4.1. Isolasi virus**

Isolasi virus adalah cara yang paling baik untuk diagnosis laboratorium, oleh karena langsung dapat mengetahui jenis virus penyebab. Pengambilan darah terbaik dalam 3 hari fase awal demam yaitu saat terjadinya viremia, sebelum terbentuknya antibodi anti dengue. Di luar waktu tersebut jumlah virus sudah berkurang atau tidak ada sama sekali. Sampel dapat berupa serum, plasma atau *buffy-coat* darah-*heparinized*. Bahan dapat ditanam pada berbagai kultur jaringan baik yang berasal dari manusia ataupun hewan (Sutaryo, 2004, Guzman M and Kouri G, 2004).

Pemeriksaan yang sering dilakukan menggunakan sel kultur C6/36 (*albopictus cell line*), sampel dari serum disuntikkan pada dada nyamuk, lalu ditunggu selama 10-14 hari. Kemudian kepala nyamuk dipotong untuk mencari glandula salivarius, yang banyak terdapat virus. Setelah tampak tanda ada pertumbuhan sel virus dengue, maka dilanjutkan dengan pemeriksaan ELISA ataupun *indirect immunofluoresence* yang dianggap sebagai baku emas. Pada umumnya, isolasi virus hanya digunakan untuk penelitian, tidak untuk diagnosis laboratorium disebabkan waktu yang lama 1-3 minggu, membutuhkan peralatan mahal dan tenaga terlatih (Henchal and Erik A, 1990, Brooks GF and Butel JS, 2001).

#### **2.4.2. Deteksi asam nukleat dengan teknik *polymerase chain reaction (PCR)* dari serum atau plasma.**

Virus dengue merupakan virus RNA, sehingga untuk melakukan PCR harus dilakukan *reverse transcription* agar terbentuk *cDNA (complementary DNA)* yang kemudian akan diamplifikasi dengan menggunakan alat *DNA Thermal Cycle*. RT-PCR dapat dilakukan dengan cara *one-step* atau *nested RT-PCR* atau dapat berupa *nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)*. Saat ini di luar negeri, telah banyak dilakukan pemeriksaan RT-PCR dengan menggunakan alat *real-time PCR*, dimana hasil yang didapat lebih cepat dan bersifat kuantitatif. Keberhasilan PCR juga tergantung dari fase pengambilan serum dan variabilitas yang luas antar laboratorium dimana masih dibutuhkan standardisasi yang lebih baik. Hasil akan didapatkan lebih banyak positif pada keadaan viremia (Massi MN and Sabran AA, 2006).

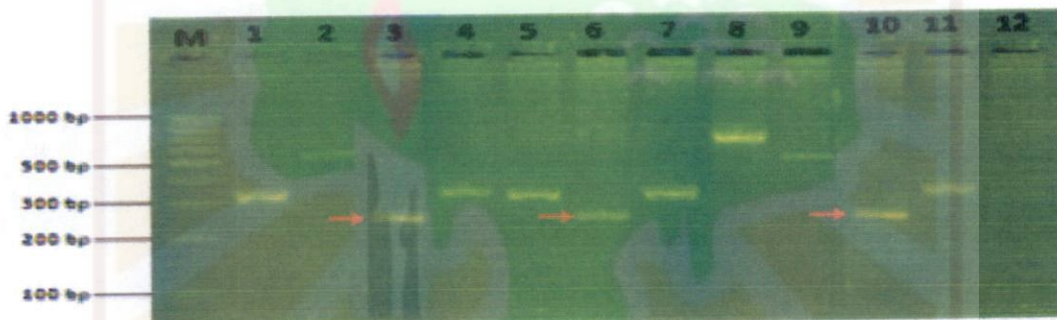
Deteksi adanya virus dengue dengan cara seminested RT-PCR didasarkan amplifikasi suatu fragmen DNA yang spesifik untuk virus dengue. Pemeriksaan virus dengue dengan teknik ini mampu mendeteksi genotip dan serotip dengan tepat (Vorndam V and Kuno G, 1994, Klungthong C et al, 2000, De Paula SO et al, 2002, Conceicao T, 2002).

Prinsip PCR terdiri atas tiga tahap yaitu denaturasi untai ganda DNA, selanjutnya *annealing* (penempelan) primer pada DNA targetnya, terakhir primer *extension* (pemanjangan primer) dengan adanya DNA polimerase. Teknik PCR memerlukan peralatan *thermocycler*, yakni peralatan yang dapat diatur temperatur dan waktunya secara cepat dan berulang (Vorndam V and Kuno G, 1994, De Paula SO et al, 2002, Guzman MG and Kouri G, 2004, Massi MN and Sabran 2006).



Pemeriksaan RT-PCR untuk diagnosis dan identifikasi serotipe dengue memiliki sensitivitas 98,5 % dan spesifisitas 100% dibandingkan dengan isolasi virus. Pemeriksaan PCR dan kultur virus masih sering dipakai sebagai gold standar untuk mendeteksi virus dengue ( Klungthong C et al,2000, De Paula SO et al, 2002, Conceicao T,2002).

Gambar 2.7 memperlihatkan hasil elektroforesis produk PCR menggunakan gel agarosa yang diwarnai dengan SBYR Green memperlihatkan panjang nukleotida yang berbeda untuk setiap serotipe dengue. DEN 1 berukuran 324 bp (line 1), DEN2 538 bp ( line 2), DEN3 251 bp ( line 3) dan DEN 4 754 bp ( line 4) (Lanciotti RS et al,1992).



Gambar 2.7. Hasil elektroforesis sampel dengan gel agarose memperlihatkan distribusi serotipe virus dengue (Lanciotti RS et al,1992).

#### 2.4.3. Uji serologi

Infeksi virus dengue akan mengakibatkan terbentuknya antibodi, antibodi yang pertama dibentuk ialah *neutralizing antibody* (NT) kira-kira pada hari kelima. Titer antibodi ini naik sangat cepat, kemudian menurun secara lambat untuk waktu yang lama sampai seumur hidup. Setelah pembentukan NT, segera timbul *hemagglutination inhibition antibody* (HI). Antibodi ini akan naik mencapai puncak

kemudian turun perlahan-lahan dan akan ada dalam kadar yang rendah seumur hidup juga. Antibodi yang terakhir muncul adalah *complement fixing antibody* (CF), titer naik setelah perjalanan penyakit mencapai maksimum dalam waktu 1-2 bulan dan kemudian turun secara cepat dan menghilang setelah 1-2 tahun (Sutaryo,2004, Henschel and Erik A,1990, Sjahrurachman A,1994, Brooks GF and Butel JS, 2001).

Dasar pemeriksaan serologis ialah membandingkan titer antibodi pada masa akut dan konvalesen. Pemeriksaan dapat berupa *neutralizing test*, *complement fixation test*, atau *haemagglutination inhibition test*, bergantung kebutuhannya. Dari ketiga tes tersebut, uji HI yang paling populer dan paling banyak dipakai dengan alasan sederhana, murah, dan relatif cepat. Kelemahan dari uji ini adalah dibutuhkan dua spesimen darah atau serum yaitu darah yang diambil pada saat penyakitnya masih akut dan darah konvalesen yang diambil 1-2 minggu setelah spesimen pertama. Hal ini menyebabkan hasil uji HI tidak dapat diperoleh segera karena harus menunggu diperolehnya spesimen kedua yaitu 1-2 minggu setelah spesimen pertama, padahal hasil pemeriksaan laboratorium dibutuhkan oleh klinisi dalam waktu singkat agar dapat dilakukan tindakan seperlunya (Sutaryo,2004, Henschel and Erik A,1990).

*Hemagglutination inhibition test* yang dikembangkan oleh Clarke dan Cassals (1958) merupakan dasar pokok diagnosis dengue. Dasar dari uji ini adalah kemampuan antibodi yang ada pada serum penderita untuk menghambat aglutinasi sel darah merah. Nilai yang diambil untuk titer akhir adalah pengenceran yang paling tinggi, semakin tinggi kadar antibodi, semakin tinggi pengencerannya untuk tetap dapat menghambat aglutinasi. Pada infeksi primer, hari-hari pertama masih negatif. Kemudian setelah hari kelima mulai muncul Ig M dan disusul Ig G dengan nilai titer rendah, paling tinggi adalah 1 : 640. Tetapi pada infeksi sekunder titernya sampai



lebih dari 1 : 2560. Kenaikan titer 4 kali dianggap sebagai *recent infection* ( infeksi dengue yang baru terjadi ), sebagai contoh waktu pengambilan pertama titer 1 : 40, lalu titer kedua 1 : 160 (Tesh RB, 1992, Sumarmo PS,1999, Harikushartono et al,2002,Suroso and Umar AI, 2002, Halstead SB,2004, Malavige GN et al,2004).

Tabel 2.1. Interpretasi respon antibodi hemaglutinasi-inhibisi dikutip dari (Sutaryo,2004)

Antibody response	S1-S2 interval <sup>b</sup>	Convalescent titre <sup>c</sup>	Interpretation
≥ 4 fold rise	≥ 7 days	≤ 1 : 1280	Acute flavivirus infection, primary
≥ 4 fold rise	Any specimen	≥ 1 : 2560	Acute flavivirus infection, secondary
≥ 4 fold rise	< 7 days	≤ 1 : 1280	Acute flavivirus infection, either primary or secondary
No change	Any specimen	>1 : 2560	Recent flavivirus infection, secondary
No change	≥ 7 days	≤ 1 : 1280	Not dengue
No change	< 7 days	≤ 1 : 1280	Uninterpretable
Unknown	Single specimen	≤ 1 : 1280	Uninterpretable

<sup>a</sup> These criteria were derived empirically from data collected at the U.S. Armed Forces research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand, Laboratories should assess the sensitivity of their assay with standard sera from WHO Collaborating centres for New Emerging and Re-emerging Disease.

<sup>b</sup> Interval in days between acute (S1) and convalescent (S2) specimens.

<sup>c</sup> Against any dengue antigen

Dekade terakhir telah dikembangkan pula cara pemeriksaan serologi dengan menentukan Ig M dan Ig G di dalam serum secara Elisa, yang terbagi atas :

- Uji Elisa Ig M/Ig G yang dikembangkan laboratorium sendiri

Misalnya Elisa captured dari laboratorium AFRIMS di Bangkok, Kuala Lumpur, Singapura.

- Uji Elisa IgM/Ig G komersial

Misalnya IgM blot dan IgG blot buatan Gene Lab Singapura, Dengue IgG/IgM Elisa dari Panbio Australia, dengue rapid fever IgM/Ig G dari Pan Bio Australia dan sebagainya (Sutaryo,2004).

Prinsip kerja uji Elisa komersial adalah antibodi Ig M/IgG terhadap virus dengue yang berada di dalam serum akan ditangkap secara spesifik oleh antibodi anti human IgM/Ig G yang telah terikat pada membrane nitrocellulose. Zat kebal gold labelled anti dengue monoklonal bereaksi dengan antigen dengue yang diletakkan pada membran terpisah yang kemudian akan membentuk ikatan kompleks. Pada spesimen yang positif kompleks *gold labelled* anti dengue monoklonal yang tertangkap akan membentuk warna ungu sebagai garis (Tesh RB, 1992, Sumarmo PS,1999, Harikushartono et al,2002,Suroso and Umar AI, 2002, Halstead SB,2004, Malavige GN et al,2004).

Pola reaktivitas IgM dan IgG yang ditentukan dengan menggunakan ELISA ini, telah dapat membedakan infeksi primer atau sekunder. Keberadaan antibodi IgM tanpa IgG menunjukkan infeksi primer, sedangkan IgG yang kadarnya meningkat jauh melebihi IgM menunjukkan infeksi sekunder. IgM dan IgG ini dapat dijumpai baik pada semua manifestasi klinis infeksi virus dengue, baik yang asimtomatik, demam dengue, demam berdarah dengue hingga syok sindrom dengue (Tesh RB, 1992, Sumarmo PS,1999, Harikushartono et al,2002,Suroso and Umar AI, 2002, Halstead SB,2004, Malavige GN et al,2004).

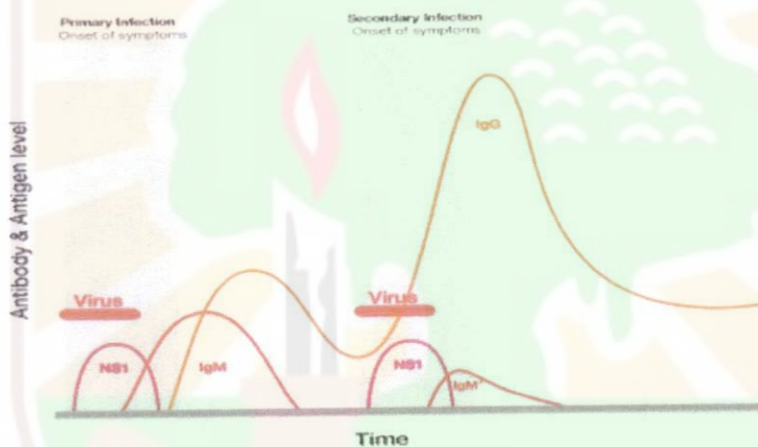
#### **2.4.4. Deteksi antigen NS1 (*nonstructural glycoprotein 1*)**

Pemeriksaan antigen dengue NS1 adalah pemeriksaan terhadap antigen nonstruktural 1 dengue yang dapat mendeteksi infeksi virus dengue dengan lebih awal dibandingkan pemeriksaan antibodi dengue, bahkan pada hari pertama mulai demam. Hal ini tentunya akan mengurangi risiko komplikasi seperti demam berdarah dengue dan *dengue shock syndrome* yang dapat berakibat kematian



(Huang JH,1999, Shu PY,2000,Young PR,2000, Parekh G and Heanue B,2004, Dussart P et al,2006, Tabouret M,2007, Chuansumrit A,2008).

NS1 dengue disekresikan ke dalam sistem pembuluh darah pada individu-individu yang terinfeksi virus dengue. NS1 bersirkulasi pada konsentrasi yang tinggi di dalam serum pasien dengan infeksi primer maupun sekunder selama fase klinis sakit (*clinical phase of illness*) dan hari-hari pertama pemulihan (gambar 5). Antigen NS1 terdapat pada serotipe DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4. Dari penelitian juga didapatkan bahwa deteksi NS1 dapat memberikan diagnosis spesifik infeksi dengue (McBride WJH,2009, Ramirez AH,2009, Datta S and Wattal C,2010).



Gambar 2.8.. Respon imun infeksi virus dengue (Sekaran D et al,2007)

Penelitian yang dilakukan oleh Alcon dkk menyatakan bahwa antigen NS1 ditemukan dalam sirkulasi antara hari 1 sampai hari ke 9 demam pada infeksi primer, sedangkan pada infeksi sekunder antigen NS1 ditemukan antara hari 1 sampai hari ke 7, meskipun pada hari pertama antibodi Ig M belum terbentuk (Alcon S et al,2002). Hasil yang sama didapatkan pada penelitian yang dilakukan oleh Shu dkk (Shu PY et al,2003) dan Dussart dkk(Dussart P et al,2006). Penelitian terbaru

terhadap virus serotipe I, antigen NS1 bisa terdeteksi sampai hari ke 18 setelah onset gejala ( Shu PY et al,2003).

Saat ini telah tersedia reagen-reagen komersial untuk pemeriksaan dengue NS1 antigen. Reagen tersebut ada yang dibuat dalam format ELISA ( Enzyme Linked Immunosorbent Assay) dan ada juga yang dalam format imunokromatografi (*rapid strip test*) dengan sensitivitas dan spesifisitas yang berbeda (Bessof K and Delorey M,2008).

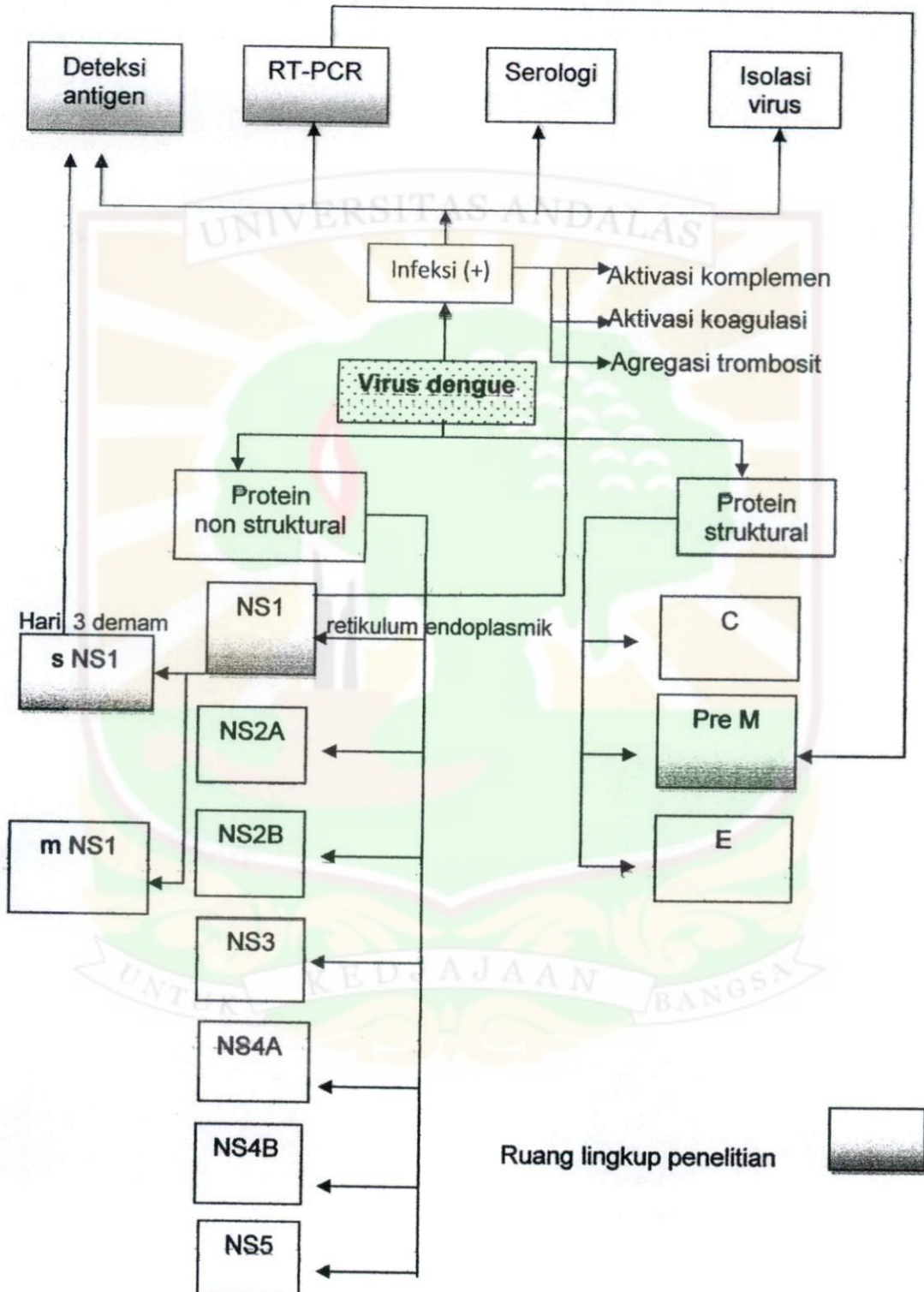
Jenis sampel yang dapat digunakan untuk pemeriksaan dengue NS1 antigen adalah serum atau plasma. Hasil negatif antigen NS1 tidak menyingkirkan adanya infeksi virus dengue, dimana variasi hasil ini diduga berkaitan dengan serotipe virus dengue yang menginfeksi. Beberapa peneliti menyarankan pemeriksaan antigen NS1 tetap disertai dengan pemeriksaan antibodi IgM dan IgG anti dengue sebagai penentu infeksi primer ataupun sekunder, sekaligus untuk mengatasi kemungkinan hasil negatif palsu pada pemeriksaan antigen NS1 (Huang JH and Wei JJ,1999, Young PR,2000, Dussart P,2006, Tabouret M,2007, Chuansumrit A,2008, Bessof K,2008, McBride WJH,2009, Ramirez AH,2009,Datta S,2010).



### BAB III

#### KERANGKA KONSEP PENELITIAN

##### 3.1. Kerangka konsep



## BAB IV

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1. Disain penelitian

Disain penelitian ini adalah *cross sectional study*.

#### 4.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di poliklinik ilmu kesehatan anak RSUP dr M.Djamil , puskesmas di lima kecamatan di kotamadya Padang yang mempunyai prevalensi DHF tertinggi ( Kuranji, Koto Tengah, Padang Utara, Nanggalo, Padang Timur ) serta Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang, dimulai pada bulan April sampai Desember 2012.

#### 4.3. Populasi penelitian

Populasi penelitian ini adalah pasien anak yang dicurigai mengalami infeksi virus dengue dengan klinis demam hari ke 1, 2 atau 3 disertai tes *tourniquet* positif yang berobat ke puskesmas Kuranji, Koto Tengah, Padang Utara, Nanggalo, Padang Timur dan poliklinik ilmu kesehatan anak RSUP dr.M.Djamil Padang.

#### 4.4. Sampel

Sampel penelitian adalah pasien anak yang dicurigai mengalami infeksi virus dengue dengan klinis demam hari ke 1, 2 atau 3 disertai tes *tourniquet*



positif yang berobat ke puskesmas Kuranji, Koto Tengah, Padang Utara, Nanggalo, Padang Timur dan poliklinik ilmu kesehatan anak RSUP dr.M.Djamil Padang.

#### 4.5. Besar sampel

Besarnya sampel dihitung berdasarkan rumus

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 PQ}{d^2}$$

n = Besar Sampel

$Z_{\alpha}$  = Interval kepercayaan = 95% (  $\alpha = 0.05$  ;  $Z_{\alpha} = 1.96$  )

P = Sensitivitas penyakit ( dari pustaka ) = 90% = 0.9

Q = ( 1-P )

D = Tingkat ketepatan absolut yang dikehendaki ( ditetapkan oleh peneliti )  
= penyimpangan yang dapat diterima untuk sensitivitas =  $\pm 10\%$

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.9 \times 0.1}{0.1^2} = 35$$

Perkiraan proporsi DBD 70%, maka jumlah subjek yang diperkirakan adalah  
 $100/70 \times 35 = 50$  pasien

#### 4.6. Teknik pengambilan sampel

Sampel dipilih secara *non probability sampling* dengan teknik konsekutif, sehingga semua populasi yang dicurigai dengan infeksi virus dengue dan memenuhi kriteria inklusi dimasukkan ke dalam penelitian.

#### **4.7. Kriteria inklusi**

1. Pasien demam pada hari ke 1,2 atau hari ke 3 dengan uji *tourniquet* positif
2. Menyetujui ikut penelitian

#### **4.8. Kriteria eksklusi**

1. Pasien yang secara klinis menderita penyakit infeksi lain seperti infeksi saluran nafas, saluran pencernaan atau saluran kemih
2. Menderita penyakit imuno defisiensi

#### **4.9. Izin penelitian**

Penelitian ini dilakukan setelah lulus seleksi etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Orang tua pasien diberikan penjelasan tentang maksud, tujuan, serta manfaat penelitian. Setelah memahami dengan jelas, orang tua diminta untuk menandatangani *informed consent* setuju untuk mengikuti penelitian.

#### **4.10. Prosedur penelitian**

1. Semua penderita yang memenuhi syarat diikutkan dalam penelitian dan diminta persetujuan orang tua secara sukarela.
2. Penderita dicatat identitas meliputi umur, jenis kelamin, dan lama demam
3. Pemeriksaan NS1 dan PCR diambil pada hari ke 1,2 atau 3 demam dan pemeriksaan PCR sebagai *gold standar* dilakukan secara kolektif.



#### **4.11. Cara kerja**

##### **4.11.1. Pemeriksaan antigen dengue NS1 format imunokromatografi (*rapid strip test*)**

Dengan menggunakan pipet sekali pakai yang telah disediakan, teteskan 3 tetes serum, plasma, atau darah ke dalam tempat sampel dan tunggu 20 menit. Jika pada kolom bertanda C (Control) dan T (Test) keluar garis berwarna merah maka dapat dinyatakan positif demam berdarah (dalam masa akut). Jika hanya satu garis saja pada kolom C (Control) saja maka pasien dapat dinyatakan negatif demam berdarah. Perlu diperhatikan, jika dalam kolom C tidak keluar garis maka hasil tes dinyatakan invalid.

##### **4.11.2. Pemeriksaan RT- PCR**

###### ***Ekstraksi RNA***

RNA virus dengue diisolasi menggunakan *PureLink Viral RNA kit* (sesuai dengan prosedur yang sudah direkomendasikan oleh ROCHE).

###### ***Desain primer dan amplifikasi***

Primer universal untuk mengamplifikasi gen prM dan primer spesifik untuk serotype virus dengue didesain sesuai dengan urutan berikut: 5 ul ekstraksi RNA dicampur dengan 25 ul campuran reaksi (disediakan oleh pabrik). Tahapan *Reverse transcription* dilakukan pada 50°C selama 30 menit dan aktivasi *Taq Polimerase* pada 95°C selama 30 menit, yang diikuti dengan 35 siklus amplifikasi yang terdiri dari 94°C selama 30 detik (denaturasi), 60°C selama 40 detik

### ***One-Step RT-PCR***

*One-Step* RT-PCR dikerjakan untuk mengamplifikasi gen prM flavivirus dan juga sebagai template untuk reaksi PCR berikutnya. RT-PCR ini dikerjakan dengan menggunakan sepasang universal primer yang juga berfungsi sebagai outer primer pada reaksi PCR berikutnya. Prosedur disesuaikan dengan protokol pabrik.

### ***Multiplex-nested PCR***

*Multiplex-nested* PCR dikerjakan untuk mengetahui serotipe virus dengue pada sampel klinik. PCR dikerjakan dengan menggunakan pasangan primer spesifik untuk masing-masing jenis serotipe virus dengue.

### ***Agarose gel elektroforesis***

Produk PCR dielektrofresis pada gel agarose 1,5 – 2 %, 100 bp ladder digunakan sebagai marker untuk menganalisa hasil PCR.

#### **4.12. Alur penelitian**





#### **4.13. Definisi operasional**

##### **1. Demam**

Definisi : suhu tubuh diatas  $37,5^{\circ}\text{C}$

Cara ukur : diukur suhu tubuh padapada axila

Alat ukur : termometer

Hasil ukur : 1. demam

2. tidakdemam

Skala ukur : nominal (kategorik)

##### **2. Lama demam**

Definisi : hari keberapa pasien mengalami demam

Cara ukur : anamnesis oleh peneliti

Alat ukur : hari

Hasil ukur : lama demam dalam hari

Skala ukur : nominal (kategorik)

##### **3. Uji tourniquet**

Definisi : terdapat 10 atau lebih ptekie pada seluas 1 inci persegi (2,5 cm x 2,5 cm) di lengan bawah bagian depan (volar) dekat lipat siku (*fossa cubiti*)

Cara ukur : dilakukan pemasangan manset tekanan darah pada titik tengah sistolik dan diastolik selama 5 menit.

Alat ukur : sfignomanometer

Hasil ukur : positif, jika uji tourniquet positif  
negatif, jika uji tourniquet negatif

Skala ukur : nominal (kategorik)

#### 4. **Antigen NS1**

Definisi : protein non struktural yang dimiliki oleh virus dengue yang terdapat pada plasma penderita DBD.

Cara ukur : metode imunokromatografi yang dinilai secara kualitatif oleh peneliti

Alat ukur : *SD Bioline Dengue NS1 Ag kit*

Hasil ukur : positif dan negatif.

Skala ukur : nominal (kategorik)

#### 5. **Hasil RT- PCR**

Definisi : amplifikasi fragmen DNA yang diperoleh dari fragmen mRNA virus dengue untuk mendeteksi adanya virus dengue

Cara ukur : isolasi RNA, desain primer dan amplifikasi, one step RT-PCR, multiplex-nested PCR

Alat ukur : RT- PCR kit

Hasil ukur : positif dan negatif mengandung virus dengue

Skala ukur : nominal (kategorik)

#### 4.14. **Rencana pengelolaan dan analisis data**

Dilakukan analisis hubungan antara beberapa variabel dengan hasil pemeriksaan NS1 dengan uji statistik *Chi square*. Kesamaan metode uji dengan standar baku emas diuji dengan tes kappa. Semua analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 16.0, data ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.



## BAB V

### HASIL PENELITIAN

Penelitian dilakukan antara April – September 2012 terhadap 50 sampel yang dicurigai mengalami infeksi virus dengue dan datang ke puskesmas Kuranji, Koto Tengah, Padang Utara, Nanggalo, Padang Timur dan poliklinik ilmu kesehatan anak RSUP dr.M.Djamil Padang. Sampel penelitian dipilih secara *consecutive sampling*. Analisis dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 16.0

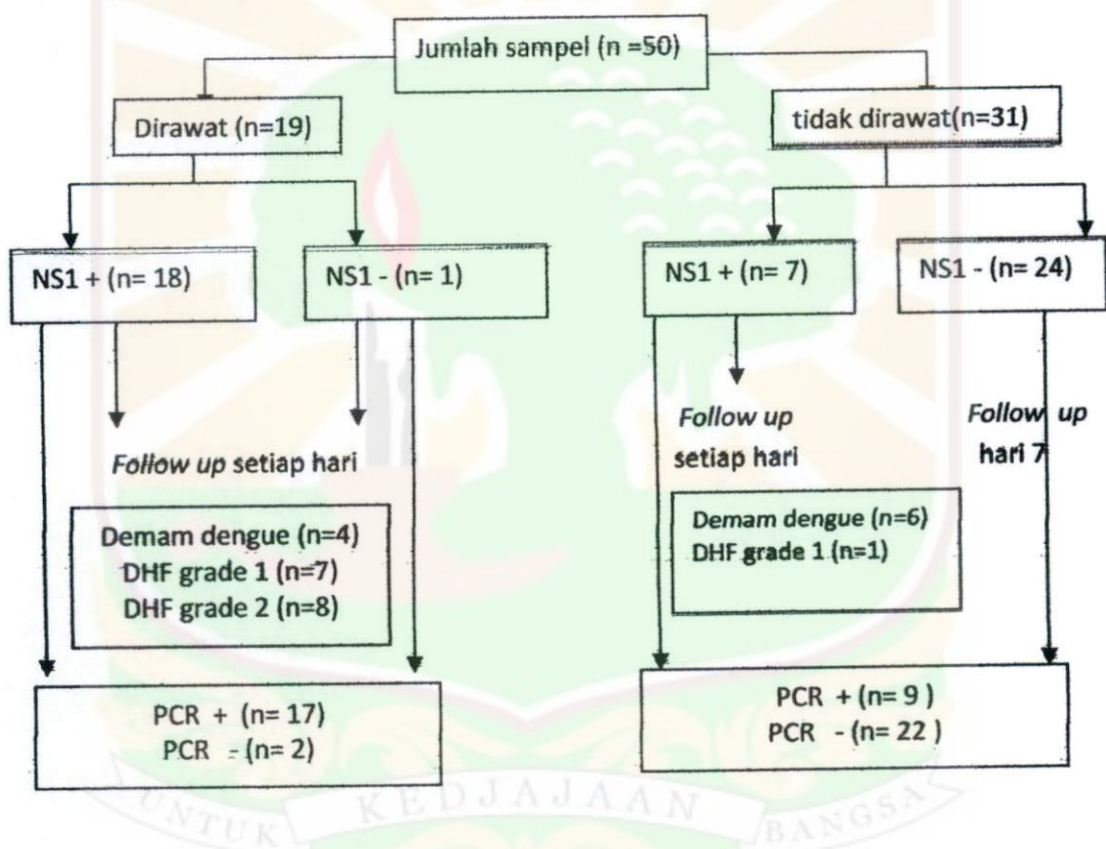
#### 5.1. Karakteristik sampel penelitian

Karakteristik dari sampel penelitian terlihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Karakteristik sampel penelitian

Karakteristik ( n =50 )	Hasil
Umur ( tahun)/mean (SD)	8,98 ( 3,673)
Jenis Kelamin	
Laki-laki (n,%)	27 (54,0)
Perempuan (n,%)	23 (46,0)
Status gizi	
Gizi kurang (n,%)	31 (62,0)
Gizi baik (n,%)	13 (26,0)
Gizi lebih (n,%)	4 ( 8,0)
Obesitas (n,%)	2 ( 4,0)
Lama demam	
Hari ke 1 (n,%)	1 ( 2,0)
Hari ke 2 (n,%)	21 (42,0)
Hari ke 3 (n,%)	28 (56,0)

Pada tabel diatas terlihat umur rata-rata 8,98 ( SD 3,673) tahun dengan rentang umur sampel berkisar antara 6 bulan sampai 17 tahun. Dilihat dari jenis kelamin didapatkan laki-laki lebih banyak dari perempuan yaitu sebanyak 27 orang (54%). Berdasarkan status gizi ditemukan 31 orang (62%) dengan gizi kurang, 13 orang (26%) dengan gizi baik, 4 orang (8%) gizi lebih dan 2 orang (4%) dengan obesitas. Berdasarkan lama demam, 28 orang (56%) datang pada demam hari ke 3, 21 orang (42%) hari ke 2, dan hanya 1 orang (2%) pada hari pertama.



Gambar 5.1. Alur pengamatan sampel penelitian

Dari 50 sampel yang terlibat dalam penelitian ini, sebanyak 19 sampel (38%) dirawat di rumah sakit, meskipun NS1 positif hanya 18 sampel. *Follow up* saat



dirawat, 4 sampel (8%) mengalami demam dengue, DHF grade 1 sebanyak 7 sampel (14%) dan DHF grade 2 sebanyak 8 sampel (16%). Terdapat 7 sampel penelitian (14%) dengan NS1 positif namun tidak dirawat, sampel tetap diamati dan diperiksa laboratorium untuk konfirmasi diagnosis, didapatkan demam dengue sebanyak 6 sampel (12%) dan DHF grade 1 sebanyak 1 sampel (2%). Dari 19 sampel (38%) yang dirawat, PCR positif hanya 17 sampel (34%), sedangkan dari 31 sampel (62%) yang tidak dirawat, sebanyak 9 sampel (18%) positif dengan pemeriksaan PCR.

Tabel 5.2. Hasil pemeriksaan NS1 berdasarkan lama demam

Lama demam	NS 1		p
	positif (n,%)	negatif(n,%)	
Demam hari ke 1	0 (0%)	1 (2%)	0,5
Demam hari ke 2	10 (20%)	11 (22%)	
Demam hari ke 3	15 (30%)	13 (26%)	

\* $p > 0,05$  (tidak bermakna)

Berdasarkan lama demam, hasil NS1 positif lebih banyak pada demam hari ke 3 yaitu 15 sampel (30%), disusul demam hari ke 2 sebanyak 10 sampel (20%). Hasil uji *chi square* didapatkan nilai tidak bermakna dengan  $p = 0,5$ .

## 5.2. Sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif, nilai prediksi negatif dan akurasi NS1 untuk diagnosis infeksi virus dengue

Sensitivitas, spesifisitas, nilai duga dan akurasi di tampilkan dalam bentuk tabel 2x2, untuk membuktikan kemampuan NS1 untuk diagnosis infeksi virus dengue, dibandingkan dengan PCR sebagai *gold standar*.

Tabel 5.3. Hasil uji NS1 dengan PCR

		PCR		Jumlah
		Positif (n)	Negatif(n)	
NS1	Positif (n)	24	1	25
	Negatif (n)	2	23	25
Jumlah		26	24	50
Sensitivitas : 92,3 %				
Spesifisitas : 95,8%				
Nilai duga positif : 96%				
Nilai duga negatif : 92%				
Akurasi : 94%				

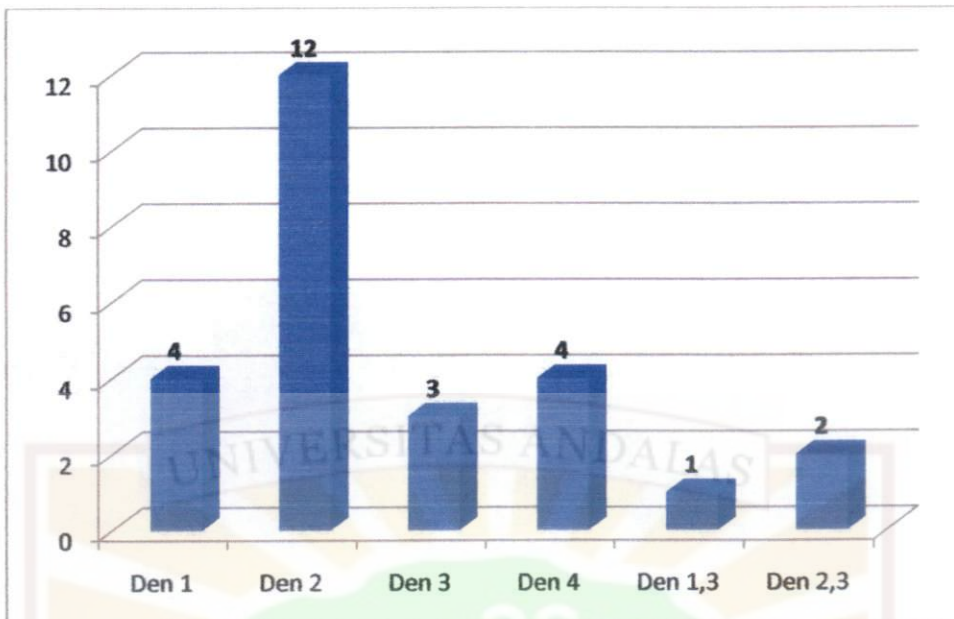
Tabel 5.3 memperlihatkan bahwa dari 50 sampel yang dicurigai mengalami infeksi virus dengue, didapatkan 24 sampel positif benar menderita DBD (a), 1 sampel positif palsu (b), 2 sampel negatif palsu (c), dan 23 sampel negatif benar (d). Sensitivitas NS1 sebesar 92,3%, spesifisitas 95,8, nilai prediksi positif 96 %, nilai prediksi negatif 92% dan akurasi NS1 untuk diagnosis infeksi virus dengue adalah 94%.



Pada tabel terlihat bahwa ada 24 sampel yang menderita infeksi virus dengue baik dengan pemeriksaan PCR maupun dengan NS1. Dengan menggunakan PCR saja didapatkan 26 orang menderita infeksi virus dengue, sedangkan dengan menggunakan NS1 saja didapatkan 25 orang menderita infeksi virus dengue. Hasil uji Kappa didapatkan nilai 0,88 yang memperlihatkan adanya kesesuaian hasil antara PCR dengan *rapid test* NS1 untuk diagnosis infeksi virus dengue ( $p = 0,000$ ).

### 5.3. Serotipe virus dengue

Pada gambar 5.2 terlihat hasil RT-PCR pada penelitian ini. Ditemukan 26 sampel terinfeksi virus dengue dengan proporsi serotipe virus dengue yang berbeda, dimana infeksi oleh DEN-2 merupakan kasus terbanyak, yaitu 12 kasus (46,15%), disusul oleh DEN-1 dan DEN-4, masing-masing 4 kasus (15,38 %). Infeksi oleh DEN-3 ditemukan pada 3 kasus (11,54 %). Dari 26 sampel dengan PCR positif, ditemukan 3 sampel dengan 2 serotipe pada saat bersamaan (*concurrent infection*), yaitu 2 sampel (7,7 %) dengan serotipe 2 dan 3, serta 1 sampel (3,8%) dengan serotipe 1 dan 3.



**Gambar 5.2. Distribusi virus dengue berdasarkan serotipe**

#### **5.4. Sensitivitas NS1 berdasarkan serotipe**

Sensitivitas NS1 berdasarkan serotipe dapat dilihat pada tabel 5.4

**Tabel 5.4. Sensitivitas NS1 berdasarkan serotipe**

Serotipe	Sensitivitas NS1
Den 1	100 %
Den 2	100 %
Den 3	33,3 %
Den 4	100 %

Tabel 5.4 memperlihatkan sensitivitas NS1 berdasarkan serotipe, virus Den 1, Den 2, dan Den 4 mempunyai sensitivitas 100 %, sensitivitas Den-3 paling rendah yaitu 33,3 %.



## BAB VI

### PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian terhadap 50 sampel yang dicurigai mengalami infeksi virus dengue. Sampel penelitian yang memenuhi kriteria inklusi yaitu demam pada hari ke 1,2 atau hari ke 3 dan uji *tourniquet* positif dilakukan *rapid test* NS1, dan PCR. Penelitian dilakukan untuk melihat sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi, dan akurasi NS1 untuk infeksi virus dengue. Analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 16.0

Dari 50 orang sampel yang dicurigai mengalami infeksi virus dengue didapatkan rentang umur sampel berkisar antara 6 bulan sampai 17 tahun dengan rata-rata 8,98 (SD 3,673) tahun. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan yang didapatkan Libraty, dkk (2002) dimana umur rata-rata sampel yang dicurigai mengalami infeksi virus dengue adalah 9,5 tahun (rentang umur 2,9-13,5 tahun) (Libraty DH et al,2002). Kalayanarooj, dkk (2007) di Timor Leste mendapatkan umur rata-rata sampel anak yang dicurigai mengalami infeksi virus dengue adalah 2,5 tahun dengan kelompok umur terbanyak adalah usia 1-4 tahun (Kalayanarooj S et al,2007).

Berdasarkan jenis kelamin, pada penelitian ini didapatkan jumlah sampel laki-laki lebih banyak dari pada pasien perempuan, yaitu 27 orang (54%). Hasil ini sama dengan penelitian Libraty (2002) yang mendapatkan penderita anak laki-laki lebih banyak dibanding anak perempuan dengan rasio 2,2:1 (Libraty DH et al,2002). Berbeda dengan penelitian molekuler yang dilakukan oleh Kalayanarooj, dkk (2007) di Timor Leste, pasien yang dicurigai mengalami infeksi virus dengue lebih banyak anak perempuan (Kalayanarooj S et al,2007). Di Indonesia dan di Filipina tidak

terdapat perbedaan yang statistik bermakna antara anak perempuan dan anak laki-laki yang menderita demam berdarah (Soedarmo SSP,2009).

Rothman, 2007, menyebutkan bahwa rendahnya persentase wanita yang penderita DBD dibanding laki-laki disebabkan sistem imun wanita lebih baik dari laki-laki, produksi sitokin anti inflamasi pada wanita lebih banyak sehingga wanita yang terinfeksi DBD memberikan keluhan klinis yang kurang jelas dan jarang yang dirawat (Rothman AL,2007). Soedarmo SSP, 2009, menyebutkan bahwa kromosom XX pada anak perempuan mempunyai peran dalam mengelola produksi imunoglobulin secara kuantitatif (Soedarmo SSP,2009). Namun penelitian Halstead membuktikan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara respon infeksi anak perempuan dan anak laki-laki (Halstead,2004).

Sebagian besar subjek penelitian memiliki status gizi kurang yaitu 62%, gizi baik 26% , 8% gizi lebih dan 4% dengan obesitas. Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Hadinegoro dkk, 2007 (Hadinegoro SR et al,2007) dan Hartoyo E, 2008, (Hartoyo E,2008) yang mendapatkan sampel penelitian dominan dengan gizi baik. Penelitian terbaru di St. Jude Children's Research Hospital , Salvador, 2010, menemukan bahwa status gizi tidak mempengaruhi keparahan penyakit pada infeksi virus dengue (Maron GM et al,2010). Thisyakorn dan Nimmannitya menyebutkan bahwa malnutrisi kalori dan protein derajat ringan akan terhindar dari DSS (Thisyakorn U and Nimmannitya S,1993). Pichainarong, dkk melaporkan pasien obesitas memiliki risiko menderita DBD derajat berat lebih tinggi (Pichainarong N et al,2006). Status nutrisi mempengaruhi derajat berat ringannya penyakit berdasarkan teori imunologi yaitu gizi baik meningkatkan respon antibodi. Reaksi antigen dan antibodi yang berlebihan menyebabkan infeksi dengue lebih berat. Walaupun demikian, mekanisme peningkatan kejadian DSS pada obesitas masih belum jelas,



apakah hal ini berhubungan dengan pelepasan sitokin pro-inflamasi oleh sel adiposit jaringan lemak. Sel adiposit jaringan lemak mensekresikan dan melepaskan sitokin pro-inflamasi yaitu TNF $\alpha$  (*tumour necrosis factor  $\alpha$* ) dan beberapa interleukin (IL) yaitu IL-1 $\beta$ , IL-6, dan IL-8. Pada obesitas terjadi peningkatan ekspresi TNF  $\alpha$  dan IL-6, salah satu efek TNF  $\alpha$  adalah meningkatkan permeabilitas kapiler sedangkan pada DSS juga terjadi produksi TNF  $\alpha$ , IL-1, IL-6 dan IL-8 (Coppack SW,2001, Sutaryo,2004, Trayhum P and Wood LS,2005).

Didapatkan persentase NS1 positif yang lebih besar pada hari ke 3 demam yaitu sebanyak 30 %, dibandingkan hari ke 2 demam, namun tidak didapatkan nilai yang bermakna secara statistik. Dussart dkk, 2006, meneliti 299 pasien demam dengue di Perancis. Didapatkan sensitivitas NS1 pada hari 0-4 demam 87,6% , dan 43,5% pada hari 5-10 demam (Dussart P et al,2006). Datta di India tahun 2010 membandingkan NS1 pada fase akut dan konvalesen, didapatkan NS1 positif 71,42% pada fase akut, sedangkan pada fase konvalesen NS1 positif hanya 6,38% (Datta S and Wattal C, 2010). Tingginya sensitivitas NS1 pada fase awal demam, karena protein NS1 bersirkulasi dalam konsentrasi tinggi dalam darah pasien selama awal fase akut, baik pada infeksi primer maupun sekunder (Lanciotti RS et al,1992, Sudiro TM et al,1997, Alcon S et al,2002,Shu PY et al,2003, Koraka K et al,2003, Dussart P et al,2006, Kumarasamy V et al,2007). Tingginya kadar NS1 sampai hari ke 5 demam, berhubungan dengan waktu terjadinya viremia karena merupakan periode replikasi virus dan belum terdapatnya antibodi terhadap virus. Kadar viremia dan kadar NS1 juga tergantung pada karakteristik intrinsik dari *strain* virus yang menginfeksi dan status imunitas dari penderita sendiri (Libraty DH et al, 2002, Nimmannitya S,2008).

Dari 50 sampel penelitian didapatkan 24 subjek benar-benar positif dengan (a), 1 pasien positif palsu (b), 2 subjek negatif palsu (c) dan 23 pasien benar negatif (d). Dari hasil tersebut dapat dihitung sensitivitas 92,3 %, spesifisitas 95,8%, nilai duga positif 96%, nilai duga negatif 92%, serta akurasi 94%.

Hasil yang hampir sama didapatkan oleh Zainah dkk, 2009, dengan sensitivitas 90,4 % dan spesifisitas 99,5 % (Zainah S and Wahab A, 2009). Penelitian yang sama dilakukan oleh Bessoff dkk, 2008, dan mendapatkan sensitivitas 83,2%, spesifisitas 100%, nilai duga positif 100% dan nilai duga negatif 62,5% (Bessoff K and Delorey M, 2008). Ty Hang dkk, 2009, melakukan penelitian pada 138 pasien mendapatkan sensitivitas 83,2% , spesifisitas 100% , nilai duga positif 100%, nilai duga negatif 38,2% (Ty Hang V et al, 2009). Sementara itu Osorio L, 2010, mendapatkan sensitivitas lebih rendah yaitu 70,8%, spesifisitas 91,3 %, nilai duga positif 95,5% dan nilai duga negatif 57,5% (Osorio L, et al, 2010).

Perbedaan hasil ini bisa disebabkan oleh perbedaan kit yang dipakai. Kit yang memakai antibodi monoklonal untuk mendeteksi antigen NS1 hasilnya lebih baik dari pada kit dengan antibodi poliklonal karena antibodi monoklonal lebih spesifik dibanding antibodi poliklonal (Datta S and Wattal C, 2010). McBride, 2009, membandingkan kit monoklonal dengan poliklonal, didapatkan sensitivitas kit monoklonal 73,6 % sedangkan sensitivitas kit poliklonal 63,7 % (McBride WJH, 2009). Dussart dkk, 2008, juga membandingkan 2 kit tersebut, didapatkan kit monoklonal lebih sensitif yaitu 87,4% dibanding poliklonal dengan sensitivitas 60,4 % (Dussart P et al, 2008). Antibodi monoklonal sebagai dasar pemeriksaan memiliki keunggulan dibanding poliklonal yaitu lebih mudah untuk distandarisasi pada laboratorium yang berbeda-beda (Osorio L et al, 2010). Penelitian ini menggunakan kit dari *SD Bioline Dengue NS1 Ag* yang menggunakan antibodi monoklonal.



Dilakukan pengamatan terhadap sampel penelitian dengan NS1 positif, dari 25 sampel NS1 positif, 18 sampel dirawat dan 7 sampel tidak dirawat . Setelah dikonfirmasi dengan klinis dan laboratorium, didapatkan demam dengue 9 sampel (36%) , DHF grade 1 dan grade 2 masing-masing 8 sampel (32%). Dari 18 sampel yang dirawat, didapatkan 2 sampel (8%) mengalami syok. Pemeriksaan dengan RT-PCR terhadap sampel yang syok, 1 sampel dengan serotipe Den 2 dan 1 sampel lagi dengan Den 3. Penelitian molekuler yang dilakukan oleh Kalayanaroj dkk, 2007, dari 38 orang anak yang dikonfirmasi mengalami infeksi virus dengue, hanya 2,6% yang mengalami demam dengue (Kalayanaroj S et al,2007). Vaughn,dkk, 2000, menemukan dari 168 pasien yang terinfeksi virus dengue, 52,4 % pasien dengan demam dengue, 13,7 % dengan DHF grade 1, dan 26,2 % dengan DHF grade 2, DHF grade 3 ditemukan pada 7,7 % pasien (Vaughn DW et al,2000). Penelitian oleh Vaughn dkk, 2000, (Vaughn DW et al,2000) dan Libraty dkk, 2002, (Libraty DH et al,2002) menunjukkan manifestasi klinis yang lebih berat pada pasien yang terinfeksi dengan serotipe Den 2.

Pada gambar 5.2 terlihat dari 26 sampel yang positif dengan PCR didapatkan proporsi serotipe virus dengue yang berbeda, dimana infeksi oleh Den 2 merupakan kasus terbesar yaitu 12 kasus ( 46,15 % ), disusul oleh Den 1 dan Den 4 sebanyak 4 kasus ( 15,38 % ) dan Den 3 sebanyak 3 kasus ( 11,54 % ) . Hasil ini sama dengan yang didapatkan Shu PY dkk, 2003, di Taiwan dimana serotipe virus dengue yang terbanyak adalah Den 2 (Shu PY et al,2003). Sedangkan Ty Hang dkk, 2009, di Vietnam mendapatkan serotipe virus dengue yang terbanyak adalah Den 1 dan Den 3 (Ty Hang V et al,2009).

Didapatkan 3 sampel dengan 2 serotipe virus dengue dalam 1 sampel darah setelah dilakukan pemeriksaan RT-PCR (*concurrent infection*). Sebanyak 2 sampel

(7,7%) dengan serotipe Den 2 dan Den 3, dan 1 sampel (3,8%) dengan serotipe Den 1 dan Den 3. Kejadian ini juga dilaporkan oleh Wang WK dkk di Taiwan, 2003, yang melakukan pemeriksaan RT PCR saat terjadi *outbreak* infeksi dengue. Didapatkan 2 sampel terinfeksi virus Den 2 dan Den 3 sekaligus dari 21 sampel yang diperiksa (Wang WK et al,2003). Anoop dkk, 2010, juga menemukan hal yang sama di India dengan angka kejadian yang lebih besar yaitu 21 sampel (56,8 %) dari 37 sampel yang diperiksa. Sebanyak 18 sampel dengan serotipe 2 dan 3, 2 sampel dengan serotipe 1 dan 2, dan 1 sampel ditemukan 3 serotipe sekaligus yaitu Den 1,2 dan 3. Kejadian ini disebabkan vektor terinfeksi lebih dari 1 serotipe virus dengue (Anoop M et al,2010).

Penelitian ini mendapatkan sensitivitas NS1 yang tinggi untuk setiap serotipe, kecuali Den 3. Den 1, Den 2 dan Den 4 mempunyai sensitivitas 100 %, sedangkan Den 3 memiliki sensitivitas terendah yaitu 33,3 %. Penelitian Ramirez dkk, 2009, mendapatkan sensitivitas untuk Den 1 paling tinggi yaitu 90%, selanjutnya Den 3 sebesar 65%, sensitivitas Den 4 30% dan Den 2 adalah 20% (Ramirez AH and Moros Z,2009). Penelitian Ty Hang dkk, 2009, mendapatkan sensitivitas Den 1 paling tinggi 98%, Den 3 sebesar 96%, Den 2, 85% dan Den 4, 40% (Ty Hang V et al,2009). Perbedaan sensitivitas untuk masing-masing serotipe disebabkan adanya perbedaan kombinasi reagen imun yang memiliki kemampuan yang rendah untuk serotipe tertentu. Selain itu bisa juga disebabkan perbedaan geografis dari daerah (Ramirez AH and Moros Z,2009).



## **BAB VII**

### **PENUTUP**

#### **7.1. KESIMPULAN**

1. Protein nonstruktural 1 (NS1) memiliki sensitivitas, spesifisitas, nilai duga positif, nilai duga negatif dan akurasi yang tinggi untuk diagnosis dini infeksi virus dengue.
2. NS1 positif lebih banyak pada demam hari ke 3, namun tidak didapatkan nilai yang bermakna secara statistik.
3. Serotipe infeksi virus dengue yang terbanyak adalah virus Den 2.
4. Sensitivitas NS1 lebih tinggi pada serotipe Den 1, Den 2 dan Den 4.

#### **6.2. Saran**

1. Merekomendasikan pemeriksaan NS1 untuk deteksi dini infeksi virus dengue.

## DAFTAR PUSTAKA

- ALCON S, DROUET MT, ROUX P, ET AL 2005. The secreted of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes : Implications for viral infectivity. *J Virol* , 79, 403-11
- ALCON S, TALARMIN A, DEBRUYNE M, FALCONAR A, DEUBEL V, FLAMAND M 2002 . Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*, 40, 376-81.
- ANOOP M, ISSAC A, MATHEW T, PHILIP S, KAREEM NA, UNNIKRIISHNAN R, SREEKUMAR E 2010 . Genetic characterization of dengue virus serotypes causing concurrent infection in an outbreak in Ernakulam,Kerala,South India. *Indian J Exp Biol*, 48, 849-57.
- ARYATI, SOETJIPTO, HARIADHI, RANTAM F, SOEGIJANTO S 2006 . Profil serotipe virus dengue di Indonesia tahun 2003-2005. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia*, 17, 72-80
- AVIRUTNAN P, ZHANG L, PUNYADEE N 2007. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *Plos Pathog*, 1798-1811.
- BESSOF K, DELOREY M, SUN W 2008. Comparison of two commercially available dengue virus NS1 capture enzyme linked immunosorbent assay using a single clinical sample for diagnosis of acute dengue virus infection. *Clin Vaccine Immunol*, 15,1513-8.
- BLACKSELL SD, MAMMEN MP JR, THONGPASEUTH S, ET AL 2008 . Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. *Diagn Microbiol Infect Dis* , 60, 43-9.



- BROOKS GF, BUTEL JS, MORSE SA 2001 . *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*, Lange.
- CHEN K, POHAN PT, SINTO R 2000. Diagnosis dan terapi cairan pada demam berdarah dengue. *Medicinus*, 22, 3-7.
- CHUANSUMRIT A, CHAIYARATANA W, PONGTHANAPISITH V 2008. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 27, 43-8.
- CONCEICAO T, DA POIAN AT, SORGINE MH 2002. A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1,2, and 3, and their Quantitation in clinincal and laboratory samples. *J clin microbiol* , 55, 480-6.
- COPPACK SW 2001. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proceedings of the nutrition society*, 60, 349-56.
- DATTA S, WATTAL C 2010. Dengue NS1 antigen detection : A useful tool in early diagnosis of dengue virus infection. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 28,107-10.
- DEPARTEMEN KESEHATAN RI 2007.. Peta Kesehatan Indonesia.
- DEPAULA SO, NETO RJ, CORREA JA, ET AL 2002. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 96, 266-9.
- DINKES TK I. PROP. SUMATERA BARAT 2006/2007. Data DBD Propinsi Sumatera Barat.
- DUSSART P, LABEAU B, LAGATHU G, ET AL 2006. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol*, 13, 1185-9.
- DUSSART P, PETIT L, LABEAU B, ET AL 2008. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *Plos Negleted Tropical Disease* , 2,1-8.

- FLAMAND M, MEGRET F, MATHIEU M, LEPAULT J, REY FA, DEUBEL V 1999. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* , 73, 6104-10.
- GUTSCHE I, COULIBALY F, VOSS JE, DKK 2011. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Microbiology*, 4, 1-6.
- GUZMAN MG, KOURI G 2004. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Disease* 8, 69-80.
- HADINEGORO SR, CITARESMI E, AKIB AP 2007. Diagnosis dan tata laksana demam berdarah dengue pada kejadian luar biasa tahun 2004 di enam rumah sakit di Jakarta. *Sari Pediatri*, 8, 8-14.
- HARTOYO E 2008. Spektrum klinis demam berdarah dengue pada anak. *Sari Pediatri*, 10, 145-9.
- HALSTEAD SB 1997. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. Dalam : Gubler DJ, Kuno G, penyunting. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International. 23-44
- HALSTEAD SB 2004 . *Dengue fever and dengue haemorrhagic fever*. Dalam : Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. *Nelson's textbook of pediatrics*. Saunders.
- HARIKUSHARTONO, HIDAYAH N, DARMOWANDOWO W, SOEGIJANTO S 2002. *Ilmu penyakit anak, diagnosa dan penatalaksanaan*. Penerbitan Salemba Medika.
- HENCHAL, ERIK A, PUTNAK JR 1990. The dengue virus. *Clinical microbiology reviews* , 4, 376-96.
- HUANG JH, WEY JJ, SUN YC 1999. Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Journal Med Virologi*, 57, 1-8.



- KABRA SK, JAIN Y, PANDEY RM, ET AL 1999. Dengue haemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93, 294-8.
- KALAYANAROOJ S, VAUGHN DW, NIMMANITYA S, ET AL 1997. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *The Journal of Infectious Diseases* ,176, 313-21
- KALAYANAROOJ S, RIMAL HS, ANDJAPARIDZE A, ET AL 2007. Short report : clinical intervention and molecular characteristics of a dengue hemorrhagic fever outbreak in Timor Leste. *Am J Trop Med Hyg* , 77(3) : 534-7.
- KLUNGTHONG C, GIBBONS RV, THAISOMBOONSUK B, ET AL 2000. Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation. *J clin microbiol* , 45, 2480-5.
- KORAKA P, BURGHOOM CP, FALCONAR A, ET AL 2003. Detection of immune complex dissociated nonstructural 1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol* ,41, 4154-9.
- KUMARASAMY V, CHUA SK, HASSAN Z, WAHAB AH, CHEM YK, MOHAMAD M, AND CHUA KB 2007. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture Elisa for early diagnosis of acute dengue infection. *Singapore Med J*, 48, 669-73.
- LANCIOTTI RS, CALISHER CH, GUBLER DJ, CHANG GJ, VOMDAM AV 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30, 545-51.
- LASTERE S, GOFFARD N,TEISSIER A, ZISOU K, ET AL 2010. Assessment of NS1 antigen detection tests during DEN-4 epidemic in French Polynesia. *Pacific Public Health Surveillance Network*
- LEI HY, HUANG KJ, LIN YS, YEH TM,LIU HS, LIU CC 2008. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Infect Dis*, 1, 1-9

- LIBRATY DH, YOUNG PR, PICKERING D, ET AL 2002. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *JID* ,186, 1165-8
- LINDENBACH BD, RICE CM 1999. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *Journal of Virology*, 73, 4611-21
- LIN S, WAN CF, WAN SW, CHENG HJ, LEI HY 2006. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunology*, 19,127-32.
- MACKENZIE JM, JONES MK, YOUNG PR 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral replication. *J Virology* , 220 , 232-40.
- MARON GM, CLARA AW, DIDDLE JW,ET AL 2010. Association between nutritional status and severity of dengue infection in children in El Salvador. *Am.J.Trop.Med.Hyg* , 8 , 324-9.
- MASSI MN, SABRAN AA 2006. Teknik identifikasi serotipe virus dengue (DEN 1-4) dengan uji reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). *J Med Nus*, 27, 68-72.
- MCBRIDE WJH 2009. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*,64, 31-6.
- MALAVIGE GN, FERNANDO S, FERNANDO DJ, SENEVIRATNE SL 2004. Dengue viral infection. *Postgrad Med J* ,80, 588-601.
- NIMMANNITYA S 2008. Dengue haemorrhagic fever: A scourge of South-East Asian Region. Global innovation to fight dengue. 2<sup>nd</sup> International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. Phuket, Thailand.
- NOISAKRAN S, PERNG GC 2007. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome(DSS) in dengue virus infection. Atlanta: *Society for Experimental Biology and Medicine* .



- PAREKH G, HEANUE B, SEMPLE M 2004 . Evaluation of an improved rapid diagnostic assay for dengue infection. Panbio.
- PERERA R, KUHN RJ 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology* ,11,369-77.
- PHUONG CXT, NHAN NT, WILLS B, ET AL 2002. Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Vietnam. *Tropical Medicine and International Health* ,7,125-32.
- PICHAINARONG N, MONGKALANGOON N, KATAYANAROOJ S, CHAVEEPOJNKAMJORN W 2006. Relationship between body size and severity of dengue hemorrhagic fever among children aged 0-14 years. *Southlast Asian J Trop Med Public Health* , 3, 283-8.
- OSORIO L, RAMIREZ M, BONELO A, ET AL 2010. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1- based diagnostic test for early dengue infection. *Virology Journal*,7,361.
- RAEKIANSYAH M, SUDIRO TM 2004. Genetic variation among dengue virus that possibly correlate with pathogenesis. *Medical Journal of Indonesia* ,13, 190-4 .
- RAMIREZ AH, MOROS Z, COMACH G 2009. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* ,65,247-53.
- ROTHMAN AL 2007. Pathogenesis of dengue virus infection. In : *Up To Date*. Elsvier.
- SUROSO T, UMAR AI 2004. Epidemiologi dan penanggulangan penyakit demam berdarah dengue (DBD) di Indonesia. Dalam: Hadinegoro SR, Satari HI, penyunting. Tata laksana kasus DBD. *Naskah lengkap pelatihan bagi dokter spesialis anak dan dokter spesialis penyakit dalam*. Balai Penerbit FKUI .
- SUWANDONO A, KOSASISH H, NURHAYATI, ET AL 2006 . Four dengue virus serotypes found circulating during an outbreak of dengue fever ang dengue haemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia, during 2004. *Trans R. Soc. Trop. Med* , 100 , 855-62.

- SEKARAN D, LAN EC, MAHESAWARAPPA KB, APPANNA R, SUBRAMANIAM G 2007 .  
Evaluation of a dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of dengue. *J Infect Developing Countries* ,1, 182-8.
- SETIABUDI D 2011. Pemeriksaan dengue NS1 antigen. Dalam : Gunardi H, Tehuteru E, Kurniati N dkk, penyunting. *Kumpulan tips pediatri*. Badan Penerbit Ikatan Dokter Anak Indonesia.
- SOEGIJANTO S 2005. Patogenesis dan perubahan patofisiologi pada infeksi virus dengue. Dalam : Soegijanto S, editor. *Kumpulan makalah penyakit tropis dan infeksi di Indonesia*. Airlangga University Press.
- SOEDARMO SP 2008. Infeksi virus dengue. Dalam : Soedarmo SP, Gama H, Hadinegoro SR, Satari HI, penyunting. *Buku ajar infeksi dan pediatrik tropis*. Badan penerbit FKUI.
- SHU PY, CHEN LK, CHANG SF, ET AL 2003. Comparison of capture IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* , 10,622-30 .
- SHU PY 2000. Dengue NS1 specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *J. Med.Virology* , 62,224-32.
- SOEDARMO SSP 2009. *Demam berdarah dengue pada anak*. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia.
- SUDIRO TM, ISHIKO H, GREEN S, ET AL 1997. Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polimerase chain reaction. *Am J Trop Hyg*, 56,424-9.
- SUMARMO PS 1999. Masalah demam berdarah dengue di Indonesia. Dalam: Sri Rezeki HH, Hindra IS. Demam berdarah dengue. *Naskah lengkap pelatihan bagi pelatih dokter spesialis anak dan dokter spesialis penyakit dalam, dalam tatalaksana kasus DBD*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- SUROSO, ALI IMRAN UMAR 2002. Epidemiologi dan penanggulangan penyakit demam berdarah dengue (DBD) di Indonesia saat ini. Dalam: Sri Rezeki, Hindra Irawan Satari,



penyunting. Demam berdarah dengue. *Naskah lengkap pelatihan bagi pelatih, dokter spesialis anak, dan dokter spesialis penyakit dalam, dalam tatalaksana DBD*. BP FKUI.

SJAHRURRACHMAN A 1994. Flaviviridae. Dalam : Staf Pengajar FKUI. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Bina Rupa Aksara.

SUTARYO 2004. *Dengue*. Medika Fakultas Kedokteran.

TESH RB 1992. Arboviruses of Central Asia and the formert Soviet Union. Dalam : Feigin RD, Cherry JD, penyunting. *Textbook of pediatric infectious deseases*. Saunders

TY HANG V, MIHN NGUYET N, TRUNG TD, ET AL 2009. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *Plos Negl Trop Dis* ,3, 1-7.

TOMLINSON SM, MALMSTROM RD, WATOWICH SJ 2009. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infectious Disorder-Drugs Targets* ,9, 327-43

TABOURET M, SALANON C, SARFATI P 2007. Evaluation of platelia™ dengue NS1 Antigen assay for early diagnosis of acute dengue infection . *Prosiding 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC*; Munich, Germany; 31 Mar - 04 Apr.

THISYAKORN U, NIMMANNITYA S 1993. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis*, 16, 295-7.

TRAYHURN P, WOOD LS 2005. Signalling role of adiposetissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochemical Society Transactions* , 33, 78-81.

VALDES K, ALVAREZ M, PUPO M, VAZQUEZ S, RODRIQUEZ R, GUZMAN MG 2000. Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* ,7, 856-7.

VAUGHN DW, GREEN S, KALAYANAROOJ S, ET AL 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* ,181,2-9.

- VORNDAM V, KUNO G, ROSADO N 1994. A PCR restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *Journal of Virological Methods* ,48, 237-44.
- WANG WK, CHAO DY, LIN SR, KING CC, CHANG SC 2003. Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*, 36,89-95.
- WIWANITKIT V 2004. Dengue virus nonstructural 1 protein and its phylogenetic correlation to human fibrinogen and thrombocytes: A study to explain hemorrhagic complications. *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*, 1, 35-41.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION 1997. *Dengue haemorrhagic fever : Diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION 1997. *Demam berdarah dengue.. EGC*.
- YOUNG PR, HILDITCH PA, BLETCHLY C, HALLORAN W 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high level of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 38,1053-7.
- ZAINAH S, WAHAB A, MARIAM M 2009. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. *Journal of virology methods*,155,157-60.

