



ANTIBODI NS1 PADA DEMAM BERDARAH DENGUE
Kajian Aspek Klinis, Antibodi NS1 sebagai Fungsi
Prediktor dan Protektif



Soroy Lardo

Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta
2016

Ringkasan Disertasi

ANTIBODI NS1 PADA DEMAM BERDARAH DENGUE

**Kajian Aspek Klinis, Antibodi NS1 sebagai Fungsi
Prediktor dan Protektif**

Soroy Lardo



Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta
2016

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Disertasi yang berjudul *Antibodi NS1 pada Demam Berdarah Dengue*. Antibodi NS1 penting untuk diteliti karena memiliki peran penting terkait dengan tugas dan fungsi protein NS1 dalam perjalanan klinis dan imunopatogenesis demam berdarah dengue. Peran sentral dari protein NS1 dalam fungsi sekresi dan proses yang ditimbulkannya, yaitu membawa dua pandangan tentang keuntungan dan resiko, disatu sisi berperan dalam mendukung proses replikasi virus dengan meningkatnya viremia dengan substansi sitokin yang dihasilkan. Disisi lain adanya peran sebagai antivirus dan kandidat vaksin dikaitkan fungsi protektifnya. Sedangkan Antibodi NS1 menjadi tumpuan dalam proses respon imun yang berkembang dari replikasi virus yang didukung oleh aktivasi protein NS1. Antibodi NS1 memiliki peran *molecular mimicry* dan *bystander activation* sebagai mekanisme autoimun yang justru dalam penelitian sebelumnya sebagai mekanisme yang menimbulkan beratnya suatu demam berdarah dengue. Menghadapi kondisi yang melatarbelakangi diatas, suatu model prediktor yang melibatkan peran Antibodi NS1 menjadi penting.

Disertasi ini merupakan salah satu persyaratan untuk menyelesaikan Program Doktor (S3) di Universitas Gadjah Mada. Penulis menyadari bahwa disertasi ini dapat selesai berkat bantuan, bimbingan, dan arahan dari semua pihak. Pada kesempatan ini dengan rendah hati penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada:

1. Prof. dr. Marsetyawan HNES, Msc Ph.D, sebagai Promotor yang memberikan bimbingan, motivasi dan nasihat kepada kami

selama menjalani studi, penelitian dan penulisan sampai selesainya disertasi ini.

2. Prof dr. Mohammad Juffrie, SpA (K), PhD, sebagai Ko Promotor yang dengan sabar, tekun, teliti, penuh perhatian memberikan bimbingan kepada penulis selama pendidikan, penelitian sampai selesai disertasi ini.
3. Dr drh. Siti Rahmah Umniyati, SU, sebagai Ko Promotor yang dengan ketulusannya memberikan arahan serta mencari jalan keluar dalam proses penelitian yang dijalani sampai selesainya disertasi ini.
4. Pengelola Program Doktor FK UGM : Prof. dr. Mohammad Juffrie, SpA(K)., Ph.D, dr. Yodi Mahendrata, M.Sc., Ph.D, Prof. dr. Sofia Mubarika, M.Med.Sc, Ph.D, Dr.Med, dr. Indwiani Astuti beserta seluruh staf administrasi dan jajarannya (Mbak Nur, Mbak Fida, Mas Nanang, Mas Danang, dan Mas Puji). Terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala bimbingan, kesempatan belajar, bantuan administrasi, fasilitas dan sarana prasarana yang diberikan selama menempuh pendidikan, hanya Allah SWT yang bisa membalasnya.
5. dr. Eggi Arguni Msc, SpA, PhD, sebagai anggota penguji yang penuh perhatian, sabar dalam memberikan bimbingan, asupan dan perbaikan untuk penulisan dan menyelesaikan program ini.
6. Dr. drg. Dibyo Pramono, SU, MdSc, sebagai anggota penguji yang penuh perhatian, sabar serta memberikan bimbingan, asupan sangat berharga dalam pengolahan data untuk penulisan dan menyelesaikan program ini.
7. dr. Yanri Wijayanti Subronto, PhD.,SpPD KPTI, sebagai anggota penguji yang dengan sabar memberikan masukan dan bimbingan dalam meningkatkan kualitas penulisan disertasi.

8. Dr. dr. Sri Poeranto, M.Kes, Sp Park, sebagai penguji luar yang dengan sabar, penuh perhatian, teliti selalu memberikan masukan dan penyempurnaan dalam penulisan serta menyelesaikan program ini.
9. dr. Riris Andono Ahmad MPH, PhD, sebagai anggota penguji yang dengan sabar memberikan masukan dan bimbingan dalam meningkatkan kualitas penulisan disertasi.
10. Bagian Parasitologi FK UGM, dr. Tri Baskoro, M.Sc., Ph.D, Dr. dr. Sitti Rahmah Umniyati, SU dan seluruh jajarannya (Ibu Atin, Pak Purwono, Ibu Rumbi, Bapak Radi dan seluruh teknisi dan administrasi Lab. Parasitologi) yang tidak bisa disebutkan satu persatu. Terima kasih atas bantuan, arahan dan bimbingan serta fasilitas laboratorium selama pelaksanaan penyimpanan sampel, pengerjaan laboratorium sejak optimasi sampai dengan penghitungan hasil.
11. Orang tua beserta keluarga peneliti, Sofyan Rasid dan Suryati, Said Syamsudin dan Marina beserta seluruh keluarga besar H. Rasidin dan H. Khatib yang telah memberikan doa dan dorongan moral terus menerus selama peneliti menempuh pendidikan.
12. Kepada Istri tercinta dr. Febria Asterina, SpPK, ananda Mohamad Afdha yang banyak membantu dalam kompilasi data penyusunan disertasi disela-sela kesibukannya menyusun skripsi di Universitas Padjadjaran, ananda Naifa Rizani dan ananda Aisya Puti Rahmani yang dengan ketulusan doa dan pengorbanan untuk mendukung penyelesaian pendidikan ini.
13. Kepada Pimpinan kami rasa hormat dan ucapan terima kasih kepada Ka Puskes TNI, Ka Puskesad, Kepala Rumah Sakit Pusat Angkatan Darat (RSPAD) Gatot Soebroto dan Kepala Departemen Penyakit Dalam RSPAD Gatot Soebroto, atas

perkenan beliau penulis diberikan kesempatan mengambil Program Doktor di Universitas Gadjah Mada.

14. Ucapan terima kasih dan rasa hormat kepada Guru-guru kami, Konsulen Senior dan sejawat di Departemen Penyakit Dalam RSPAD Gatot Soebroto yang telah mendorong, memberikan waktu, kesempatan dan semangat kepada penulis untuk menempuh pendidikan Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.
15. Instalasi Rawat Inap, Ka Urusan Lantai I sampai dengan VI Perawatan dan jajarannya yang setiap hari selain bertugas dalam pelayanan pasien, juga harus membantu dalam penelitian ini.
16. Kepada pasien-pasien kami yang telah rela menyumbangkan dan mendukung penelitian ini. Tanpa peran dan sumbangan para pasien kami, maka tidak akan terlaksana penelitian ini. Sumbangan yang diberikan sangat berarti untuk kemajuan penelitian tentang Antibodi NS1 pada Demam Berdarah Dengue.
17. Sub Instalasi Patologi Klinik, terutama para analis yang telah membantu dengan sangat luar biasa pengumpulan dan verifikasi sampel yang masuk dan mengatur pengiriman ke Yogyakarta.
18. Sejawat dan rekan rekan yang menjalani Pendidikan Doktor FK UGM, terima kasih atas saling mendukung dan kebersamaan dalam menyelesaikan studi.
19. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah memberikan bimbingan, motivasi, semangat dan perhatian dalam menyelesaikan studi ini.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
ABSTRAK	xvii
ABSTRACT	xxi
BAB I	1
PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Permasalahan.....	1
B. Perumusan Masalah.....	5
C. Tujuan Penelitian	7
1. Tujuan Umum.....	7
2. Tujuan Khusus.....	7
D. Manfaat Penelitian	7
1. Manfaat Teoritis.....	7
2. Manfaat klinis.....	7
E. Keaslian Penelitian	9
BAB II	15
TINJAUAN PUSTAKA	
A. Karakteristik Virus Dengue.....	15
B. Immunogenesitas Peranan dan Mekanisme kerja Antibodi NS1	21
C. Patomekanisme Autoimun Demam Berdarah Dengue.....	28
1. Molecular Mimicry dan Bystander Activation.....	28
2. Reaksi Autoimun Tingkat Endotel.....	30
D. Landasan Teori/Kerangka Teori.....	36
E. Kerangka Konsep	38
F. Hipotesis.....	39
BAB III	41
METODE PENELITIAN	
A. Disain Penelitian	41
B. Kriteria Inklusi, Kriteria Eksklusi dan Kriteria Drop out	42
C. Kerangka Sampel	43
D. Variabel-variabel penelitian.....	46
E. Definisi operasional varibel penelitian	50
F. Analisis Data.....	51

G.	Bagan Alur Penelitian	52
H.	Deteksi anti-NS1 VD dengan teknik ELISA	54
I.	Tempat Pemeriksaan Laboratorium	55

BAB IV57

HASIL DAN PEMBAHASAN

A.	Karakteristik subjek penelitian.....	57
B.	Karakteristik Antibodi NS1 dan TNF α	61
C.	Karakteristik Antibodi NS1 dan keberadaan antigen viral dengue pada leukosit	70
D.	Analisis Hubungan Faktor Prediktor Memberatnya DBD.....	82
E.	Analisis Hubungan DBD memberat dengan Trombositopenia	85
F.	Analisis Hubungan Antibodi NS1 dengan Trombositopenia	87
G.	Model Prediktor Memberatnya DBD.....	92
H.	Rekonstruksi peran protein NS1 sebagai fungsi protektif	98
I.	Keterbatasan Penelitian	105

BAB V107

KESIMPULAN DAN SARAN

A.	Kesimpulan	107
B.	Saran	107
C.	SUMMARY	108

DAFTAR PUSTAKA.....117

CURRICULUM VITAE.....130

DAFTAR TABEL

Tabel 1	: Keaslian penelitian.....	13
Tabel 2	: Variabel, definisi operasional dan skala pengukurannya	47
Tabel 3	: Hubungan IgG Anti NS1, IgM anti NS1, dan TNF α dengan status DBD.....	62
Tabel 4	: Hubungan IgM anti NS1 dengan lama demam, lekosit, trombosit,	63
	jenis infeksi, albumin, natrium, dan kalium	
Tabel 5	: Hubungan IgG anti NS1 dengan lama demam, lekosit, trombosit, jenis infeksi, albumin, natrium, dan kalium	64
Tabel 6	: Hubungan TNF α dengan lama demam, lekosit, trombosit, jenis infeksi,albumin, natrium, dan kalium.....	65
Tabel 7	: Prediksi DBD memberat pada berbagai skenario subjek.....	68
Tabel 8	: Hubungan antara keberadaan antibodi terhadap virus dengue dan hasil imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex pada sediaan apusan darah	71
Tabel 9	: Performance (prestasi) metode ELISA untuk mendeteksi keberadaan IgM anti NS1 pada darah dibandingkan dengan metode imunositokimia SBPC pada sediaan apusan darah untuk mendeteksi keberadaan antigen viral dengue pada leukosit dengan antibodi monoklonal produksi UGM yang disekresikan oleh hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer.....	74
Tabel 10 :	Hubungan status infeksi (primer, sekunder), dan keberadaan antibodi NS1 (IgM anti NS1) dengan hasil imunositokimia SBPC pada apusan darah untuk mendeteksi keberadaan antigen viral dengue pada leukosit dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10	79
Tabel 11	: Karakteristik Trombosit DBD Pemberatan dan DBD Derajat I	87
Tabel 12	: Dalil Mekanisme Patologik Virus Dengue – respon imun reaktif pada perkembangan DBD	96

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	: Virus Dengue Matur dengan Pemeriksaan <i>Cryoelectron Microscopy</i> (Kuhn <i>et al.</i> , 2002).....	16
Gambar 2	: Struktur Genom Virus dengue. Protein Struktural Terdiri dari C, prM, dan E. Protein Non Struktural terdiri dari 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, dan 5 (Noisakarn and Perng, 2008).	16
Gambar 3	: Potensi – protein penentu imunogenisitas virus dengue (Nasronudin, 2007).....	19
Gambar 4	: Penentu sifat biologis, antigenisitas dan variasi antarserotipe virus dengue (Nasronudin, 2007).	20
Gambar 5	: Mekanisme Protein NS1 dan Antibodi NS1 (Halstead, 2008B).	21
Gambar 9	: Immunopatogenesis Mekanisme Autoimun DBD (Lei <i>et al.</i> , 2008).....	29
Gambar 10	: Flow Penelitian	57
Gambar 11	: Perbedaan kadar albumin pada DBD Derajat I dan DBD Derajat III.....	59
Gambar 12	: Perbedaan kadar hematokrit pada DBD Derajat I dan DBD Derajat III.....	59
Gambar 13	: Perbedaan kadar elektrolit Natrium DBD Derajat I dan DBD Derajat III yang mengalami pemberatan.....	59
Gambar 14	: Perbedaan Karakteristik Penderita Infeksi Dengue DBD Derajat I dan DBD Derajat III yang mengalami pemberatan berdasarkan SGOT awal	60
Gambar 15	: Perbedaan Kadar SGPT Penderita DBD Derajat I dan DBD Derajat III yang mengalami pemberatan	60
Gambar 16	: Karakteristik <i>Petechiace</i> diantara pasien DBD Derajat I dan DBD Derajat III.....	60
Gambar 17	: Karakteristik Jumlah Trombosit Infeksi Dengue DBD Derajat I dengan DBD Derajat III yang mengalami pemberatan.....	61
Gambar 18	: Gambaran Leukosit pada DBD Derajat I dan DBD Derajat III yang mengalami pemberatan	61

Gambar.19 :	Grafik ROC. Nilai AUC(IK95%) 0,865 (0,781 – 0,950).....	67
Gambar 20 :	Titik potong optimal pada probabilitas 0,285 dengan sensitivitas 0,727 dan spesifisitas 0,773.	69
Gambar 21 :	Gambaran mikroskopis imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex apusan darah tipis penderita demam dengue yang dirawat di RSPAD Gatot Subroto, Jakarta pada tahun 2013 memperlihatkan titik-titik coklat pada perbesaran 10x10, dan leukosit berwarna coklat (positif antigen viral dengue) pada perbesaran 40x10 dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer . Keterangan: foto diambil dengan kamera Optilab pada dimensi 1600x1200.....	72
Gambar 22 :	Gambaran mikroskopis imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex apusan darah tipis orang sehat yang pernah menderita DBD (positif IgG anti dengue) memperlihatkan titik-titik biru pada perbesaran 10x10, dan leukosit (limfosit) berwarna biru (negatif antigen viral dengue) pada perbesaran 40x10 dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer. Keterangan: foto diambil dengan kamera Optilab pada dimensi 1600x1200.....	73
Gambar 23 :	Gambaran mikroskopis imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex apusan darah tebal pasien dengan infeksi sekunder (positif IgM an IgG) yang belum memiliki IgM anti NS1 memperlihatkan 5 monosit dan 1 limfosit berwarna coklat (positif antigen viral dengue), sedangkan pasien dengan infeksi sekunder (positif IgM dan IgG) yang telah memiliki antibodi NS1 (IgM anti NS1) memperlihatkan limfosit berwarna biru (negatif antigen viral dengue) pada perbesaran 40x10 dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer. Keterangan: foto diambil dengan kamera Optilab pada dimensi 1600x1200.....	76
Gambar 24 :	Imunopatogenesis DBD/DSS (Pang <i>et al.</i> , 2006 <i>cit.</i> Halstead, 2007)	77

Gambar 25 : Gambaran mikroskopis pada perbesaran 10x10 sediaan imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex apusan darah tipis penderita yang terinfeksi dengue primer yang telah memiliki antibodi NS1 (kiri) yang dirawat di RSPAD Gatot Subroto, Jakarta pada 2013 memperlihatkan satu leukosit berwarna coklat , sedangkan yang belum memiliki antibodi memperlihatkan lebih banyak leukosit berwarna coklat (positif antigen viral dengue) dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer . Keterangan: foto diambil dengan kamera Optilab pada dimensi 1600x1200.....80

Gambar 26 : Gambaran mikroskopis pada perbesaran 40x10 sediaan imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex apusan darah tipis penderita yang pernah terinfeksi dengue (positif IgG) yang telah memiliki antibodi NS1 yang dirawat di RSPAD Gatot Subroto, Jakarta pada 2013 memperlihatkan tiga leukosit berwarna coklat (positif antigen viral dengue) dan 1 limfosit berwarna biru dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer . Keterangan: foto diambil dengan kamera Optilab pada dimensi 1600x1200.....80

Gambar 27 : Protein DEN V NS1 adalah target respon imun diinduksi oleh pendekatan vaksin. Sel sel terinfeksi memperlihatkan rantai panjang protein NS1 pada membran sitoplasmik yang mungkin menjadi target antibodi spesifik. Antibodi ini mungkin merekrut sistem komplemen atau sel efektor yang mungkin menginduksi *complement-dependent cell lysis atau ADCC*. Sebagai tambahan, epitop protein NS1 mungkin diproses dan dipresentasikan oleh molekul reseptor MHC I pada permukaan sel terinfeksi, mempresentasikan target dari sel T sitotoksik.99

DAFTAR SINGKATAN

ADCC	: <i>Antibody-Dependent Cell Mediated Cytotoxicity</i>
ADE	: <i>Antibody Dependent Enhancement</i>
AER	: <i>Antibody Enhance Replication</i>
ADP	: <i>Adenosin Difosfat</i>
ALT	: <i>Alanin Transaminase</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
APTT	: <i>Activated Partial Thromboplastin Time</i>
AST	: <i>Aspartate Transaminase</i>
AUC	: <i>Area Under Curve</i>
BHK	: <i>Baby Hamster Kidney</i>
BM 8-4000D	: Berat molekul 8-4000 dalton
C3	: <i>Complement 3</i>
C4	: <i>Complement 4</i>
C5	: <i>Complement 5</i>
CD	: <i>Cluster Differentiation</i>
CD4	: <i>Cluster Differentiation 4</i>
CD8	: <i>Cluster Differentiation 8</i>
CNS	: <i>Central Nervous System</i>
CHO	: <i>Chinnese Hamster Ovarian</i>
CRP	: <i>C Reactive Protein</i>
CSE	: <i>Chondrotin Sulfate</i>
CTL	: <i>Clone Cytotoxic T limfosit</i>
DALYs	: <i>Disability-Adjusted Life Years</i>
DBD	: <i>Demam Berdarah Dengue</i>
DC-SIGN	: <i>DC –specific ICAM-3 grabbing non integrin</i>
Dcs	: <i>Dendritic cells</i>
DEA-HCl	: <i>dietanolamin-HCl</i>
DENV-NS1	: <i>Dengue Virus – Non Structural 1</i>
DEN V	: <i>Dengue Virus</i>
DIC	: <i>Disseminated Intravascular Coagulation</i>
DSS	: <i>Dengue Shock Syndrome</i>
EBV	: <i>Epstein Barr Virus</i>
EDEN	: <i>Early Dengue Infection and outcome</i>
ELISA	: <i>Enzym – linked immunosorbent assay</i>
Fn	: <i>Fibronectin</i>
Fc γ R	: <i>Factor Gama Receptor</i>
GAD	: <i>Glutamate Acid Decarboxylase</i>
GAG	: <i>Gycosaminoglycans</i>
GPI	: <i>Glycosylphosphatidylinositol</i>

HCMV	: <i>Human Cytomegalo Virus</i>
HCT	: <i>Hematocrite</i>
HDL	: <i>High Density Lipoprotein</i>
HLA	: <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HS	: <i>Heparan Sulfate</i>
HUVEC	: <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM	: <i>Intracellular Adhesion molecule</i>
IFN γ	: <i>Interferon gamma</i>
Ig A	: <i>Imunoglobulin A</i>
Ig G	: <i>Imunoglobulin G</i>
Ig G1	: <i>Imunoglobulin G1</i>
Ig G4	: <i>Imunoglobulin G4</i>
Ig M	: <i>Imunoglobulin M</i>
IL-2	: <i>Interleukin-2</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-8	: <i>Interleukin-8</i>
JEV	: <i>Javanese Encephalitis Virus</i>
LBPA	: <i>lysobisphosphatidic acid</i>
LDH	: <i>Lactate dehydrogenase</i>
LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
L-SIGN	: <i>liver/lymph node spesific ICAM-3 grabbing non integrin</i>
LT	: <i>limfotoxin</i>
MHC	: <i>Major histocompatibility complex</i>
MOI	: <i>Multiplicity of Infection</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NPP	: <i>Nitrofenilfosfat</i>
NS1 Ag	: <i>NS1 Antigen</i>
NS1EC	: <i>NS1 Escherichia coli</i>
NS1 Protein	: <i>Non Structural 1 Protein</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
OR	: <i>Odd Ratio</i>
PAF	: <i>Platelet Activated Factor</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Solution</i>
PDI	: <i>Protein Disulfide Isomerase</i>
RANTES	: <i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted.</i>
RGD	: <i>arginine-glycine-aspartic acid</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RR	: <i>Resiko Relatif</i>
RT PCR	: <i>Reverse Transverase Polimerase Chain Reaction</i>
SGOT	: <i>Serum Glutamic Oxalo Transferase</i>
SGPT	: <i>Serum Glutamic Pyruvate Transferase</i>

SLE : *Systemic Lupus Erythematosus*
TNF α : *Tumor Necrosis Factor alpha*
tPA : *tissue tipe plasminogen activator*
VCAM : *Vascular celuller adhesion molecule*
WHO : *World Health Organization*
WNV : *West Nile Virus*

ABSTRAK

Latar Belakang: Demam Dengue/Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan “*reemerging disease*” penyakit tropik di dunia. Penyakit ini disebabkan oleh empat macam virus yang ditransmisikan oleh nyamuk *aedes aegypti*. DBD dan *Dengue Shock Syndrome* (DSS) mempresentasikan beratnya spektrum penyakit ini. Kondisi tersebut jika tidak dikelola dengan tepat akan menyebabkan suatu kematian. Mekanisme yang melibatkan patogenesis DBD/DSS masih belum jelas. Pada saat ini terdapat beberapa mekanisme yang menerangkan respon autoimun terhadap infeksi virus. Mekanisme terbaru untuk menjelaskan respon autoimun oleh infeksi virus termasuk diantaranya *molecular mimicry*, *bystander activation* dan *viral persistence*. Selama ini secara klinis WHO telah merumuskan penurunan trombosit dan peningkatan hematokrit sebagai diagnostik pada DBD. Beberapa penelitian terbaru membuktikan bahwa DBD disebabkan oleh fenomena autoimun yang dicetuskan infeksi virus dengue. Berdasarkan hal yang dikemukakan diatas dapat diajukan suatu pertanyaan bahwa proses autoimun khususnya antibodi NS 1, apakah turut berperan terhadap memberatnya DBD.

Metode Penelitian: Penelitian *nested case control* terhadap pasien DBD derajat I dan II berdasarkan kriteria WHO 1997, yang menjalani rawat inap di RSPAD Gatot Soebroto dalam kurun waktu Januari 2012 – Desember 2014. Pengambilan sampel yang dilakukan dengan metode konsektif sampling. Untuk kelompok kasus (DBD derajat III/DSS) dilakukan secara total sampling, sedangkan untuk kelompok kontrol (DBD derajat I/II) dilakukan secara random dengan menggunakan perangkat lunak *Epicalc*

2000. Data dianalisis terhadap perbandingan kadar antibodi IgM dan IgG anti NS1 antara pasien DBD yang memberat dan tidak memberat dengan uji t tidak berpasangan dengan alternatif uji Mann-Whitney. Korelasi kadar NS1 dengan kadar trombosit diuji dengan korelasi Pearson. Kemudian dilakukan uji probabilitas melalui uji multivariat beberapa parameter memberatnya DBD.

Hasil: Dari hasil penelitian ini pada kelompok kasus didapatkan karakteristik pemberatan DBD dengan rerata trombosit awal 59.500 U/L dan rerata trombosit hari ke 4-5 perawatan 28.500 U/L. Didapatkan hubungan yang bermakna antara memberatnya demam berdarah dengan tanda dan gejala sebagai berikut: adanya nafsu makan menurun ($p < 0,007$), Hepatomegali ($p < 0,009$), penurunan tekanan darah sistolik ($p < 0,037$). Analisis hubungan Antibodi NS1 dengan trombositopenia dan kadar TNF α pada DBD berat, dilakukan secara proporsional. Didapatkan proporsi Ig M Anti NS1 (+) terhadap trombosit > 50.000 sebesar 33,3% dibandingkan terhadap trombosit < 50.000 sebesar 27,3%. Proporsi TNF α (+) terhadap trombosit > 50.000 sebesar 33,3% dibandingkan terhadap trombosit < 50.000 sebesar 20,0%. Proporsi Ig M Anti NS1 (+) lebih banyak pada kelompok kontrol (DBD Derajat I) sebesar 78,7% dibandingkan kelompok kasus (DBD Derajat III/DSS) sebesar 30,4% ($p < 0,001$, OR 0,12). Setelah dilakukan analisis multivariat dan uji probabilitas, ditemukan proporsi yang bermakna diantara parameter parameter memberatnya DBD yaitu trombosit $< 50.000 \mu\text{L}$, SGPT >40 U/L, Leukosit $< 4.500 \mu\text{L}$ dengan Ig M Anti NS1 positif dan Ig G Anti NS1.

Simpulan: Antibodi Ig M Anti NS1 positif secara proporsional ditemukan lebih besar pada kelompok kontrol (DBD derajat I/II) dengan ($p < 0,001$,

OR 0,12). Berdasarkan analisis multivariat, hal ini berkaitan juga pada parameter-parameter yang menandakan memberatnya DBD seperti nilai trombosit, SGPT dan nilai leukosit. Ig M Anti NS1 positif tidak dapat menjadi prediktor memberatnya DBD, namun dapat merupakan faktor proteksi terhadap memburuknya klinis DBD.

Kata Kunci : Antibodi NS1 – DBD – Trombositopenia

ABSTRACT

Background: Dengue Hemorrhagic Fever is a “*reemerging disease*” found in the tropics. It is caused by 4 types of viruses transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito. Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (DSS) are the true spectrum of the disease. When a patient with either DHF or DSS is not handled well, death may result. The mechanism of the DBD/DSS pathogenesis is still unclear. Currently, there are several mechanisms that explain the auto-immune response of the viral infection, such as: molecular mimicry, bystander activation dan viral persistence. So far, clinically, according to the WHO, the decrease of thrombocyte and the increase of hematocrite may be diagnosed as DHF. Several new researches prove that DHF is caused by an auto-immune phenomena sparked off by a dengue viral infection. Based on the above, does NS1 auto-immune antibody play a significant role in the severity of DHF.

Method: The *nested case control* study on DHF derajat I and II based on the WHO 1997 creteria, was made at Indonesia Army Central Hospital Gatot Soebroto from January 2012 - December 2014. The method of sampling was based on consecutive sample. For DHF Grade III/DSS group it was total sampling, whereas for DHF Grade I/II group, it was at random using Epicalc 2000 Software. An analysis of the antibody of IgM and IgG anti NS-1 between severe and non-severe DHF patients was made, unpaired with allternative Mann-Whitney. The correlation between NS1 and thrombocyte content is tested again using Pearson. It is followed by a probability test via a multivariate test of DHF severity.

Results: The investigation shows that there is a severe DHF with an average thrombocyte of 59.500 U/L at the early of treatment and an average of 28.500 U/L for day 4-5 of treatment. The severity of demam dengue is very much related to its signs and symptoms as follows : decrease in appetite (p 0,007), hepatomegaly (p 0,009), decrease in systolic blood pressure (p 0,037). A proportional analysis was made of the NS1 antibody and thrombocytopenia and the TNF α content on severe DHF. Obtained proportion of Ig M Anti NS1 (+) to platelets > 50,000 33.3% compared to platelets < 50,000 27.3%. Proportion of TNF α (+) to platelets > 50,000 33.3% compared to platelets < 50,000 for 20.0%. Proportion Ig M Anti NS1 (+) more in the control group (DHF Grade I) amounted to 78.7% compared to the case group (Grade III DHF/DSS) of 30.4 % (p < 0.001, OR 0, 12) . After multivariate analysis and probability test, it was found that a significant proportion among DHF parameters namely platelet count < 50,000 μ L, ALT > 40 U/L , Leucocyte < 4,500 μ L with positive results of Ig M Anti NS1 and Ig G Anti- NS1.

Conclusion: IgM antibody positive Anti NS1 proportionally found to be greater in the control group (DHF Grade I/II) with (p < 0.001 , OR 0.12). Based on multivariate analysis it also related to the parameters that indicate worsened DHF like decreased platelets value, ALT and decreased leucocyte. Ig M Anti NS-1 could not be a positive predictor of severe DHF, but it can be a protective factor against clinical worsening of DHF.

Key Words: NS I Antibody – DHF – Thrombocytopenia

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Permasalahan

Demam Dengue (DD) atau Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan “reemerging disease” penyakit tropik di dunia. Penyakit ini disebabkan oleh empat jenis virus yang disebarkan oleh nyamuk betina *Aedes aegypti*. DBD dan Dengue Shock Syndrome (DSS) telah menunjukkan beratnya perkembangan penyakit. Kondisi tersebut jika tidak dikelola dengan tepat akan menyebabkan kematian. Demam Dengue sulit untuk dibedakan dengan demam karena virus lain, serta dapat mengacaukan dalam tatalaksana dan pengamatan penyebaran untuk mencegah transmisi virus (Birnbauer, 2007). Menurut laporan WHO, secara global dengue meningkat sampai tiga puluh kali lipat dalam lima dekade terakhir. Dari 2,5 milyar penduduk dunia diperkirakan terdapat 50-100 juta kasus setiap tahunnya lebih dari 100 negara endemis. Setiap tahun, 100 ribu kasus meningkat dengan 20.000 kematian (Dash et al., 2009; Villar et al., 2008; Nathan et al., 2009).

DBD menimbulkan beban terhadap masalah kesehatan, sosial dan ekonomi di daerah endemik. Secara global jumlah *Disability-Adjusted Life Years* (DALYs) yang hilang tahun 2001 sebesar 528. Penelitian di Puerto Rico (1984 dan 1994), perkiraan tahunan dari 580 DALYs per satu juta penduduk hilang akibat dengue, sama dengan total kumulatif DALYs lost malaria, tuberkulosis, penyakit cacing dan penyakit anak di Amerika Latin dan Karibia. Di Asia Tenggara berdasarkan studi prospektif terhadap anak sekolah, rata-rata annual burden dengue periodik 5 tahun didapatkan 465,3 DALYs per satu juta, dengan pasien yang tidak dirawat berkontribusi sebesar 44-73% (Nathan et al., 2009).

Virus dengue adalah virus RNA untai tunggal yang tergolong famili Flaviridea, genus Flavivirus dan secara antigenik dibedakan menjadi DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. Infeksi virus dengue berhubungan dengan variasi beratnya penyakit, dari demam ringan sebagai demam dengue hingga yang mengancam nyawa sebagai demam berdarah dengue dan dengue shock síndrome (Feng et al., 2001). Kesulitan utama diagnosis adalah pada saat awal penyakit, yakni tidak ada manifestasi penyakit yang jelas atau asimtomatik. Gejala yang umum terjadi seperti nyeri retro orbital dan petechiae tidak muncul hingga tahap akhir penyakit. Diagnosis awal, memerlukan uji laboratorium untuk menyesuaikan deteksi setiap tingkatan DBD yang cukup mahal seperti *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, isolasi virus, dan NS1 protein virus dengue (Birnbaumer, 2007; Villar et al., 2008).

Demam berdarah dengue mempunyai gejala trombositopenia, pendarahan spontan dan kebocoran plasma yang gradual sehingga dapat menyebabkan syok (Villar et al., 2008). Mekanisme patogenesis DBD/DSS masih belum jelas, salah satu hipotesis adalah pada pasien terbentuk Ig G terhadap dengue. Antibodi ini berkembang menjadi antibodi yang berfungsi menghambat replikasi virus (neutralizing antibody) dan antibodi yang memicu replikasi virus dalam monosit (infection enhancing antibody). Aktivasi imun meliputi komplemen, monosit/makrofag, limfosit serta produksi sitokin, merupakan faktor penting dalam patogenesis DBD. Hipotesis lain adalah variasi virus yaitu virulensi dan dinamikanya yang dapat menyebabkan dengue berat (Feng et al., 2001; Nasronudin, 2008).

Hipotesis *antibody dependent enhancement* (ADE) dianggap berperan penting terhadap infeksi DBD. Hipotesis ADE menerangkan manifestasi berat DBD/DD yang terjadi pada anak setelah infeksi sekunder virus dengue dengan serotipe berbeda dari yang pertama.

Terdapat antibodi dari virus sebelumnya yang tidak dapat menetralisasi, tetapi meningkatkan infeksi secara *in vitro*. Serum pada anak yang berkembang DBD/DSS, ADE lebih tinggi secara *in vitro* dibandingkan DD (Lei et al., 2008). Hipotesis alternatif lainnya adalah virulensi virus dengan berbagai varian virus dan derajat virulensi berbeda yang menyebabkan manifestasi berbeda terhadap DD, DBD, dan DSS, dikaitkan dengan serotipe dengue dan perbedaan struktural serotipe lain. Hal ini didapatkan dengan tingginya titer viremia dihubungkan dengan meningkatnya berat penyakit. Penelitian pada anak-anak di Thailand didapatkan titer puncak diantara 10-100 kali lipat pada pasien DSS dibandingkan DBD (Lei et al., 2008).

Beberapa faktor lain yang berperan adalah *viral load* dan *host factor* dalam perkembangan penyakit dengue. *Viral load* menggambarkan virulensi, pertumbuhan tinggi (*in vivo*) atau berkonsekuensi terhadap respon imun pejamu. Variasinya berbeda secara individual bahkan hari demi hari post infeksi, yang dapat meningkat dengan cepat sejak hari pertama demam (Lei et al., 2008). Beratnya manifestasi klinis penyakit dengue dipengaruhi oleh berbagai faktor internal yaitu ras, HLA, usia, produksi serta sekresi sitokin monosit dan sel T. Faktor eksternal yaitu virulensi virus dengue, kepadatan vektor, tingkat penyebaran virus dengue, prevalensi serotipe virus dengue dan kondisi neurologis (Nasronudin, 2008).

Virus dengue menginduksi makrofag untuk memproduksi enzim *Fosfolipase A2* (PLA2). PLA2 merupakan enzim super familia menghidrolisis membran fosfolipid sel endotel menjadi Lisofosfolipid (LysoPL) dan asam lemak bebas. PLA2 merupakan baik enzim sekretori maupun intraseluler. PLA2 setelah berikatan dengan protein, mengaktifasi metabolisme asam arakhidonat, menginduksi biosintesis eikosanoid: prostaksilin, tromboksan, prostaglandin dan leukotrin. Kondisi

ini berakibat kebocoran endotel dan potensi perembesan plasma yang mendorong terjadinya DSS. Dasar patogenesis DBD adalah perembesan plasma dari dinding kapiler yang terjadi pada fase penurunan suhu (fase a-febris, fase kritis, fase syok) (Nasronudin, 2008). Dalam infeksi DBD, yang perlu mendapatkan perhatian adalah perpindahan plasma dan trombositopenia serta berbagai penyulit dari keduanya. Beberapa penyulit yang dapat mendorong kematian penderita adalah pendarahan otak, pendarahan saluran cerna, kelumpuhan otot serta saraf jantung dan syok akibat perpindahan plasma (Nasronudin, 2008).

NS1 merupakan protein virus nonstruktural-1, sebagai glikoprotein yang *highly conserved*, merupakan regio penting dalam viabilitas virus namun tidak memiliki aktivitas biologis. Tidak seperti glikoprotein yang lain, NS1 diproduksi baik dalam bentuk yang berhubungan dengan membran sel maupun dalam bentuk yang disekresikan. Antigen NS1 terdapat baik pada infeksi primer maupun infeksi sekunder. Antigen NS1 dapat dideteksi dalam 5-6 hari pertama demam, yang terdapat baik pada serotipe DEN-1 (terbanyak) maupun DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Antigen NS1 dideteksi dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Dussart and Labeau, 2006; Aryati, 2008). Antigen NS1 dapat pula dideteksi pada sediaan apusan darah tebal dan tipis di sitoplasma monosit dan limfosit penderita demam hari ke-1 sampai hari ke-7 yang terinfeksi DEN V-1 (terbanyak), DEN V-3, dan DEN V-4 dengan metode imunositokimia *streptavidin biotin peroxidase complex* (SBPC) menggunakan antibodi monoklonal anti-dengue (DSSC7) produksi UGM (Umniyati *et al.*, 2007; Umniyati *et al.*, 2010). Dengan baku emas metoda RT-PCR sensitivitas dan spesifisitas metode imunositokimia pada apusan darah tersebut adalah sebesar 94% dan 90% (Mulyaningrum, 2010).

Pendekatan imunopatogenesis DBD terdiri dari: 1) Serotipe *antibodi cross reactive* dari ikatan infeksi sebelumnya tanpa netralisasi

yang meningkatkan masuknya virus ke dalam monosit; 2) Tahap berikutnya terjadi peningkatan aktivasi sel T *cross reactive* yang memproduksi sitokin (IFN γ , IL-2 dan TNF α (juga dari monosit); 3) Kaskade komplemen diantara antibodi virus kompleks dan beberapa sitokin, melepaskan C3a dan C5a yang berefek langsung terhadap permeabilitas kapiler; dan 4) Efek sinergistik IFN γ , TNF α dan aktivasi komplemen protein mencetuskan kebocoran plasma pada sel endotel pada infeksi sekunder dengue (Lei *et al.*, 2008).

B. Perumusan Masalah

Pada saat ini terdapat beberapa mekanisme yang menerangkan respon autoimun terhadap infeksi virus. Mekanisme terbaru untuk menjelaskan respon autoimun oleh infeksi virus antara lain *molecular mimicry*, *bystander activation* dan *viral persistence*. Antibodi terhadap peptida plasminogen dapat dideteksi pada 70% sera fase akut dari pasien di Thailand. Adapun antibodi yang serupa berkorelasi dengan infeksi sekunder dan pendarahan. Pada penelitian di Thailand sera fase konvalesen selama 1-4 bulan dari 16 pasien dengan *demam dengue*, ternyata bereaksi dengan peptida 759-779 plasminogen manusia dan menghasilkan penurunan aktivitas plasmin serum. Falconar (1997), mengobservasi pada tikus bahwa antibodi-antibodi DENV-NS1 yang dihasilkan, menimbulkan reaksi silang dengan protein-protein pembekuan darah pada manusia, protein-protein integrin/adhesi, sel-sel endotel dan trombosit. Selanjutnya reaksi silang antibodi monoklonal DENV-NS1 menimbulkan pendarahan (Halstead, 2008A; Morens, 2008; Halstead, 2008B). Selama ini secara klinis WHO telah merumuskan penurunan trombosit dan peningkatan hematokrit sebagai metode diagnosis DBD. Beberapa penelitian terbaru membuktikan bahwa DBD disebabkan oleh

fenomena autoimun yang dicetuskan infeksi virus dengue (Nasronudin, 2008).

Berdasarkan hal yang dikemukakan diatas, dapat diajukan suatu pertanyaan bahwa dalam proses autoimun, apakah antibodi NS1 turut berperan terhadap terjadinya sindroma DBD. Sindroma DBD adalah suatu kondisi perburukan infeksi virus dengue dengan terjadinya trombositopenia dan peningkatan permeabilitas vaskular menunjukkan variasi autoimun yang berkaitan dengan proses patofisiologi dan respon imun DBD. Oleh karena itu, menjadi penting untuk diteliti peranan antibodi NS1 yang berkaitan dengan memberatnya pasien DBD. Berdasarkan uraian yang diungkapkan diatas, rumusan masalah dan hipotesis yang akan dijawab pada penelitian ini adalah sebagai berikut: Huruf Lebih kecil

1. Apakah antibodi NS1 merupakan prediktor memberatnya perjalanan penyakit DBD?
2. Bagaimanakah model prediktor memberatnya DBD dengan menggunakan prediktor klinis (usia, jenis kelamin, status gizi, diatesis hemoragik, hepatomegali) dan prediktor laboratorium sederhana (leukosit, trombosit, hematokrit, albumin, SGPT dan SGOT)?
3. Bagaimanakah model prediktor memberatnya DBD dengan menggunakan prediktor klinis (usia, jenis kelamin, status gizi, diatesis hemoragik, hepatomegali) dan prediktor laboratorium sederhana (leukosit, trombosit, hematokrit, limfosit, albumin, SGPT dan SGOT) ditambah dengan prediktor antibodi NS1?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui Antibodi NS1 berperan sebagai prediktor dan faktor faktor yang berhubungan dengan memberatnya DBD.

2. Tujuan Khusus

Membuktikan Antibodi NS1 menjadi prediktor DBD dengan adanya peranan autoimun terhadap penurunan trombosit:

a. Tujuan khusus utama:

- 1) Membuktikan apakah Antibodi NS1 merupakan prediktor memberatnya DBD.
- 2) Membuktikan korelasi antara Antibodi NS1 dengan kadar trombosit.
- 3) Membuat model prediksi memberatnya DBD dengan menggunakan model klinis dan laboratorium dari parameter yang diperiksa ditambah dengan variabel Antibodi NS1.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Dengan diketahuinya korelasi antibodi NS1 dengan penurunan trombosit, dapat memberikan penjelasan patofisiologi memberatnya DBD berdasarkan teori autoimun.

2. Manfaat klinis

Korelasi tingkat viremia dan protein NS1 di dalam sirkulasi darah pada penelitian anak di Thailand berhubungan dengan prediksi beratnya

dengue. Peran *Antibody Enhancement Replication* (AER) dalam proses ini, ditandai dengan terdapatnya faktor imunologi melalui peran antibodi. Antibodi dengue akan termodulasi pada infeksi berikutnya dengan ditemukannya antibodi pada konsentrasi non netralisasi meningkatkan pertumbuhan virus. *Antibody dependent enhancement* ditandai dengan peran aferen dengan *up* atau *down regulates* infeksi dengue pada fagosit mononuklear. Pada peran eferen (eliminasi sel terinfeksi) diperankan oleh *T cell mediated immunity*. Proses ini memproduksi sitokin yang memediasi permeabilitas vaskuler dan hemostasis abnormal. Fagosit mononuklear secara spesifik didukung adanya replikasi virus dengue secara *in vitro* dan peningkatan infeksi ditandai dengan adanya kompleks imun yang menggambarkan kondisi yang optimal AER (Halstead, 2008C).

Menurut Falconar *et al.* (2011) dalam penelitiannya pada tikus, AER terjadi karena adanya reaksi silang poliklonal antibodi yang mengandung *subclass IgG2a* bereaksi silang dengan envelop virion glikoprotein dari strain DENV-2 NSX melalui semua kelas faktor reseptor. Terjadinya AER disebabkan oleh DENV E dan glikoprotein NS1 tampaknya terlibat bersama secara antigenik variasi antigenesitasnya, dan keduanya memiliki potensi menghasilkan AER/AED melalui mutasi atau peristiwa rekombinasi genetik. Rekombinasi telah diidentifikasi dalam gen yang mengkode *envelope* dan NS1 glikoprotein dari sejumlah strain DENV yang sama, serta genotipe yang berbeda (Falconar *et al.*, 2011).

Berdasarkan uraian diatas, diharapkan Antibodi NS1 memiliki akurasi penilaian cukup baik sebagai prediktor DBD sehingga dapat menjadi salah satu acuan bagi klinisi dalam memprediksi memberatnya DBD dan dapat melakukan langkah-langkah untuk mencegah memberatnya DBD.

E. Keaslian Penelitian

Keaslian penelitian ini adalah didasarkan penelitian sebelumnya tentang konsep dan hipotesis mekanisme autoimun yang mencetuskan sindrom DBD oleh karena adanya protein NS1 pada virus dengue. Penelitian tentang faktor yang berperan terhadap memberatnya DBD dan Antibodi NS1 sebagai prediktor DBD hubungannya dengan trombositopenia, merupakan penelitian yang memiliki nilai bermakna jika ditinjau dari sudut kemanfaatan penelitian. Karena selain menilai efikasi dan kegunaannya, maka diharapkan juga memiliki suatu nilai lebih dalam menentukan perjalanan klinis DBD.

Sebelum penelitian ini dilakukan, penelitian lain tentang parameter prediktor untuk DBD sudah dilakukan. Penelitian *Balmaseda et al.* (2005) di Nikaragua, dari Januari 1999 sampai dengan Desember 2001 di tiga rumah sakit utama di Nikaragua. Penelitian dilakukan terhadap 1671 kasus dengue untuk melihat efektivitas skema klasifikasi WHO DBD dikaitkan dengan tingkat memberatnya penyakit. Klasifikasi WHO DBD dan DSS dibandingkan dengan adanya manifestasi perdarahan, meningkatnya permeabilitas vaskular, trombositopenia dan syok pada 114 bayi, 1211 anak dan 346 orang dewasa. Penelitian tersebut menemukan bahwa kriteria WHO gagal dalam mendeteksi jumlah pasien yang bermakna dengan manifestasi berat, khususnya pada dewasa. Keempat serotipe virus dengue (DEN 1-4) menyebabkan spektrum penyakit dari demam dengue, dan bentuk yang mengancam kehidupan dari DBD dan DSS (*Balmaseda et al.*, 2005).

WHO dan *Pan American Health Organization* menggunakan kriteria WHO 1997 untuk mengklasifikasi beratnya dengue. Demam dengue dan DBD dibandingkan dengan penyakit DD ringan dan DBD dan DSS dipertimbangkan sebagai sindrom penyakit berat. Penelitian tersebut

mengungkapkan lebih dari setengah pasien semua tingkatan usia dengan syok tidak memenuhi kriteria DBD/DSS dan klasifikasi DBD/DSS tidak dapat menangkap kasus dewasa dengan satu atau lebih manifestasi berat. Dari kasus dengue yang diklasifikasikan Demam Dengue/DBD ringan, 39 (49%) bayi, 419 (44%) anak dan 102 (32%) dewasa muncul dengan sedikitnya manifestasi klinik berat. Selanjutnya lebih dari 50% bayi dengan syok, lebih dari 50% anak dengan pendarahan internal, syok dan trombositopenia berat dan lebih dari 60% dewasa dengan beberapa atau empat manifestasi berat yaitu pendarahan internal 80%, kebocoran plasma 60%, syok 77%, trombositopenia berat < 50.000 (73%) yang tidak diklasifikasikan sebagai DBD/DSS. Berdasarkan penelitian diatas, klasifikasi DBD/DSS yang digunakan secara efektif untuk mengenal dengue berat terutama di Asia ternyata tidak dapat digunakan secara universal untuk manajemen klinik dan klasifikasi kasus. Hal ini dapat disebabkan oleh kelemahan teknologi atau sumber daya dalam frekuensi monitoring dan menangkap data yang diperlukan untuk memenuhi kebutuhan kasus. Jika kriteria WHO diikuti secara kaku akan banyak kasus syok dan fatal yang tidak terdeteksi. Penelitian kasus dengue di Nikaragua dengan klasifikasi demam dengue/DBD ringan, 32-49% sedikitnya memiliki satu manifestasi klinis. Untuk itu diperlukan standarisasi dan petunjuk terhadap kemungkinan terjadinya pemberatan DBD berdasarkan geografis. Salah satu yang menjadi perhatian adalah trombosit dibawah 50.000 (Balmaseda *et al.*, 2005).

Penelitian lain dilakukan oleh Tanner (2008) dan Low (2006) yang mencari strategi *triage* mengidentifikasi individu dengan infeksi dengue pada stadium awal terutama pada saat 72 jam demam. Studi ini hendak memperlihatkan konsep sederhana dalam memutuskan algoritma untuk memprediksi diagnosis dengue dan dapat digunakan dalam manajemen transmisi viral. Metoda yang digunakan adalah mengikuti protokol EDEN

(*early dengue infection and outcome*) pada pasien dengan usia >18 tahun dan demam dalam 72 jam. Data dikumpulkan dalam tiga kejadian: 1-3 hari, 4-7 hari dan minggu ke 3-4 *post onset* demam. Dilakukan pemeriksaan laboratorium lengkap, IgM dan Ig G anti Dengue, RT, PCR, dan RNA. Dari hasil penelitian kohort tersebut didapatkan bahwa trombosit < 50.000 pada hari ke 5-7 penyakit, merupakan marker beratnya penyakit dan dihubungkan dengan berkembangnya komplikasi perdarahan dan syok (Tanner, 2008; Low, 2006).

Selain itu sudah banyak penelitian yang mengungkapkan berbagai prediktor memberatnya DBD dengan tujuan untuk mengetahui patofisiologi renjatan maupun secara spesifik untuk mengetahui prediktor terjadinya renjatan (Sopiyudin, 2007). Faktor yang diteliti mencakup data demografis (usia, jenis kelamin, ras), klinis (status gizi, lama sakit, suhu, nyeri perut, hepatomegali), hematologi (leukosit, trombosit, hematokrit), kimia darah (SGOT, SGPT, kolesterol total, HDL, LDL, trigliserida), sitokin (IL-2, IL-6, IL-8, TNF α), endotoksin, imunologis (IgA, IgG1 dan IgG4), virologis (protein plasma, serotipe virus dan *viral load*). Di Indonesia, penelitian tentang faktor prediktor tersebut sudah dilakukan di Bali, Yogyakarta dan Semarang (Harun, 1996; Gayatri, 1997; Suparyana, 2002; Pujiati, 2003; Dewi, 2004; Triono, 2004).

Penelitian Purba *et al.* (2012) terhadap 20 subyek penderita dengue sekunder, dilakukan pemeriksaan Ig G anti NS1 setiap hari mulai demam hari ketiga hingga hari ketujuh. Hasil penelitian tersebut didapatkan kadar Ig G anti NS1 pada hari ketiga dengan nilai mean 0,7383 (SD 0,2904). Pada hari kelima didapatkan nilai mean sebesar 0,7161 (SD 0,2820) dan pada hari ketujuh nilai mean sebesar 0,7109 (SD 0,2904). Pengertian Antibodi NS1 adalah jumlah relatif aktivitas antibodi dalam sampel yang diperiksa dan dinyatakan dalam OD (*Optical Density*). Berdasarkan kinetika IgG anti NS1 pada hari ketiga, hari kelima dan hari ketujuh,

puncak kadar IgG anti NS1 terjadi pada hari ketiga yang kemudian menurun pada hari kelima dan mencapai titik terendah pada hari ketujuh (Purba *et al.*, 2012).

Mengkaji penelitian yang dikemukakan diatas, fokus terhadap mencari parameter yang tepat dan akurat memberatnya DBD menjadi sangat penting. Namun parameter trombosit, IgM dan Ig G anti Dengue, RT PCR RNA sudah diuji untuk menjadi marker prediktor sehingga dapat menentukan prognostik dari pasien DBD. Mekanisme patogenesis yang perlu diperhatikan adalah apakah proses autoimun juga berperan terhadap kejadian memberatnya DBD? Karena sampai saat ini para pakar masih memperdebatkannya sebagai suatu kontroversi.

Penelitian lain mengungkapkan antibodi pada sera pasien dengue bereaksi silang dengan sel endotel. Kadar sera antiplatelet dan autoantibodi antiendotelial sel dari pasien DBD/DSS lebih tinggi dibandingkan sera pasien demam dengue. Hasil penelitian eksperimen tersebut, mengungkapkan antibodi anti DENV NS1 sebagian bereaksi silang dan menyebabkan apoptosis pada sel endotel. Berkaitan dengan autoantibodi trombosit, anti DEN V NS1 menyebabkan aktivasi inflamasi pada sel endotel. Dalam hal ini *molecular mimicry* terjadi diantara komponen virus dengue dan elemen terhadap trombosit dan sistem endotelial (Morens, 2008).

Penelitian lain yang mengungkapkan hipotesis tentang mekanisme autoimun menyebabkan gejala DBD, bahwa protein NS1 mengeluarkan *molecular structural mimicry* dengan trombosit manusia, sel endotel dan protein pembekuan darah. Antibodi meningkat pada tikus model DENV NS1 bereaksi dengan *epitops mimetic* pada trombosit manusia dan sel endotel, menyebabkan masa hidup trombosit lebih pendek dan meningkatnya permeabilitas vaskuler pada sistem *in vitro* (Halstead, 2008B). Hipotesis penelitian tersebut mengungkapkan kontribusi

autoimun pada infeksi virus dengue terhadap trombositopenia dan permeabilitas vaskuler adalah varian dengan kinetiknya terhadap patofisiologi dan respons imun.

Faktor utama yang terkait dengan objek penelitian adalah, selektifitas pemilihan pasien DD dan DBD harus mengikuti petunjuk diagnosis demam dengue dan demam berdarah dengue berdasarkan kriteria WHO. Pemilihan pasien adalah yang masuk ke instalasi rawat inap. Faktor yang terkait dengan penelitian ini adalah pasien yang masuk dengan DBD/DD berdasarkan hasil pemeriksaan klinis dan laboratorium yang kemudian dilakukan pemeriksaan antibodi NS1 sebagai marker prediktor.

Secara ringkas penelitian – penelitian sebelumnya dapat diuraikan dari tabel dibawah ini :

Tabel 1. Keaslian penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil
Balmased <i>a et al.</i> (2005)	Short Report Assesment Of The World Health Organization Scheme for Classification of Dengue Severity in Nicaragua. <i>Am. J Trop. Hyg</i>	1. Field Survey 2. Laboratoriu. 3. Lokasi penelitian di tiga jejaring RS Nikaragua	Menguji beberapa parameter prediksi memberatnya dengue berdasarkan kriteria WHO 1997 dengan Trombositopeni $a < 50.000$ sebagai faktor pemberat utama.
Lin <i>et al.</i> (2003)	Antibodies From Dengue Patient Sera	1. Field Survey 2. Laboratoriu m	Antibodi <i>cross reactive</i> terhadap sel

Peneliti	Judul	Metode	Hasil
	Cross-React With Endothelial Cells and Induce Damage. <i>Journal of Medical Serology</i>	3. Lokasi Penelitian Taiwan	endotel menunjukkan adanya disfungsi yang mungkin berperan dalam patogenesis infeksi dengue
Purba <i>et al.</i> (2012)	Kinetika Ig – G Anti NS1 Virus Dengue Serta Hubungannya Dengan Hitung Trombosit dan Kebocoran Plasma pada Infeksi Dengue	1. Cross Sectional 2. FKUI RSCM Indonesia	1. Cross Sectional 2. FKUI RSCM Indonesia

Penelitian disertasi ini berbeda dari penelitian-penelitian sebelumnya, karena dilakukan secara kohort untuk melihat parameter klinis dan laboratorium sebagai faktor prediksi memberatnya dengue dan dalam kerangka *nested case control* untuk membuktikan Antibodi NS1 sebagai prediktor memberatnya DBD. Diharapkan dengan penelitian ini dapat dibuat model prediksi memberatnya DBD dengan menggunakan model klinis dan laboratorium dari parameter yang diperiksa ditambah dengan variabel Antibodi NS1.

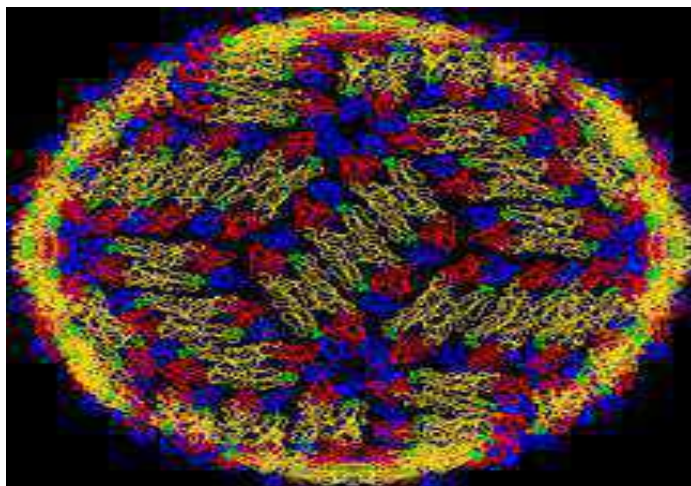
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Karakteristik Virus Dengue

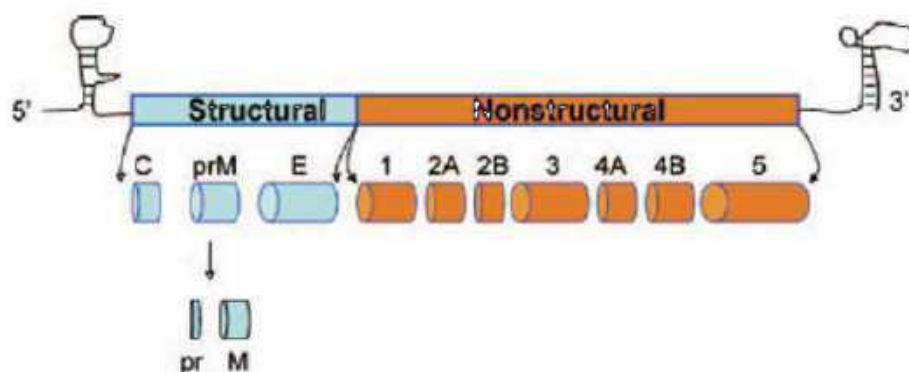
Virus dengue yang termasuk group B *Antropod Borne Virus* (Arboviruses) adalah virus RNA, genus *Flavivirus*, famili *Flaviridae*. Sampai saat ini dikenal ada 4 serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4. Infeksi dengan salah satu serotipe akan menimbulkan antibodi protektif seumur hidup untuk serotipe yang bersangkutan, tetapi tidak untuk serotipe yang lain. Keempat serotipe virus tersebut ditemukan di berbagai daerah di Indonesia. Serotipe DEN-3 merupakan serotipe yang dominan di Indonesia dan ada hubungannya dengan kasus-kasus berat pada saat terjadi kejadian luar biasa (Monath , 1991; Soegijanto, 2006).

Virus dengue mempunyai diameter *envelope* 40-60 nm, mengandung RNA untai tunggal (ssRNA) positif sense. Ukuran genom 10,7 kb. Virion matur mengumpul di dalam *cisternae retikulum endoplasma*. Genom untai tunggal, tidak bersegmen. Klasifikasi famili virus terutama tergantung pada jenis asam nukleat dari untaian maupun ukuran (Nasronudin, 2007; Noisakran and Perng, 2008). Virus DEN termasuk dalam kelompok virus yang relatif labil terhadap suhu dan faktor kimiawi lain serta masa viremia yang pendek, sehingga keberhasilan isolasi dan identifikasi virus sangat bergantung kepada kecepatan dan ketetapan pengambilan (Soegijanto, 2006). Pada virus dengue terdapat sekitar 10.700 basa di dalam genomnya. Di dalam genom terdapat sebuah *single open reading frame* yang mengkode 2 macam protein yaitu protein struktural dan nonstruktural. Protein struktural terdiri atas C (*core*), M (*membrane*), Prm (*premembrane*) dan E (*envelope*). Protein nonstruktural terdiri atas 7

macam yaitu NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, dan NS5. Struktur protein virus dengue mempunyai beberapa fungsi penting. Fungsi utama adalah mempermudah perpindahan asam nukleat virus dari sel inang satu ke sel inang yang lain. Protein ini juga berperan melindungi gen virus terhadap inaktivasi oleh nukleus, juga berperan melengkapi partikel virus untuk intervensi sel yang rentan. Respons imunitas host secara langsung akan melawan faktor antigen protein atau glikoprotein virus yang tidak terlindungi di permukaan partikel virus (Nasronuddin, 2007).



Gambar 1:
Virus Dengue Matur dengan Pemeriksaan *Cryoelectron Microscopy* (Kuhn *et al.*, 2002).

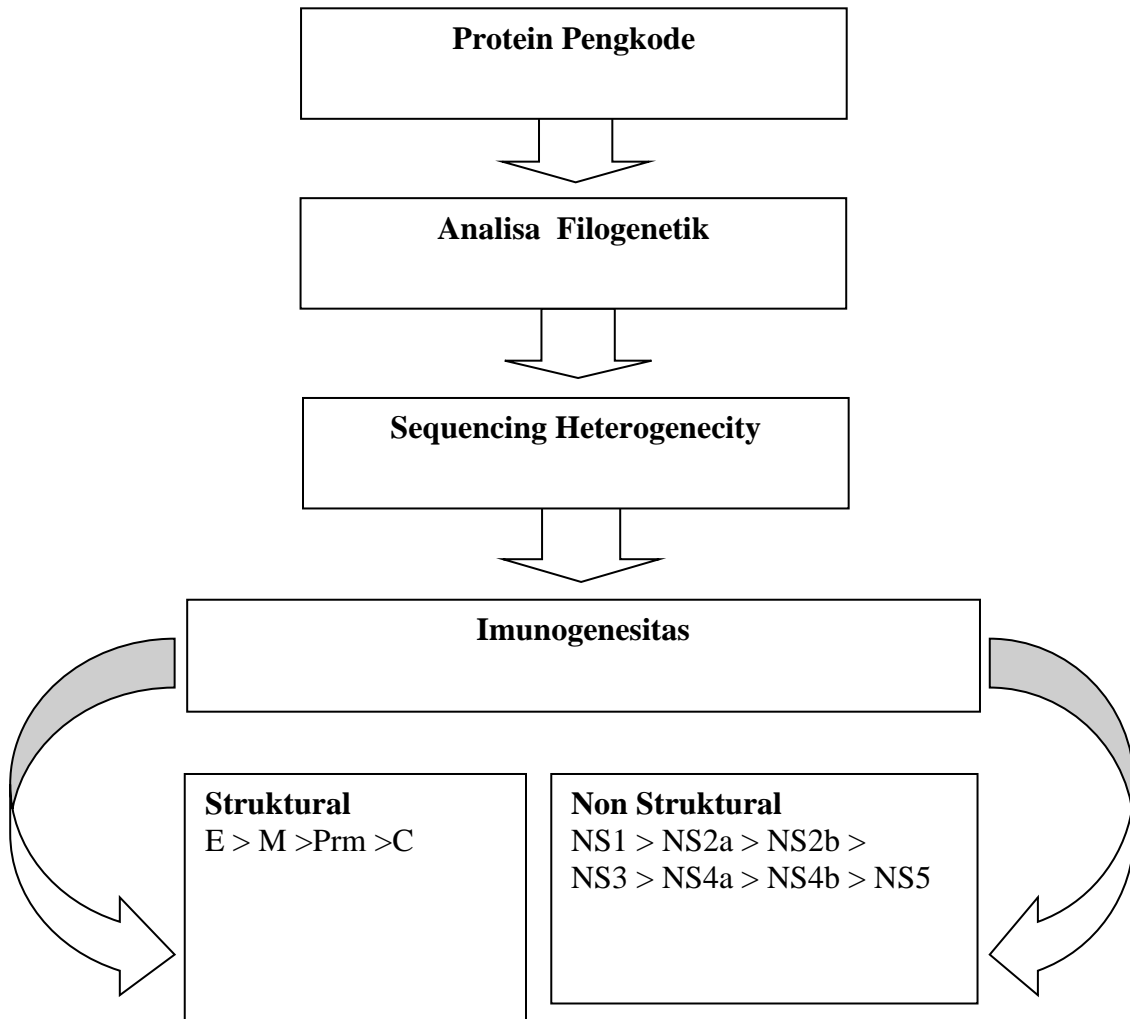


Gambar 2:
Struktur Genom Virus dengue. Protein Struktural Terdiri dari C, prM, dan E. Protein Non Struktural terdiri dari 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, dan 5 (Noisakarn and Perng, 2008).

Protein NS1 bukan bagian dari struktur virion, tapi diekspresikan pada permukaan sel yang terinfeksi. NS1 adalah protein nonstruktur berupa glikoprotein yang fungsinya belum jelas diketahui. Meskipun demikian, beberapa penelitian menunjukkan bahwa glikoprotein non struktural ini berperan dalam replikasi virus RNA. Protein NS2 memiliki 2 protein (NS₂A dan NS₂B) yang berperan pada proses pemecahan poliprotein sedangkan NS 2 B berperan sebagai *serineproteinase*. Gen NS4 memiliki 2 protein hidrofob yang berperan pada kompleks replikasi membran RNA. NS5 memiliki berat molekul 105.000 dan merupakan petanda protein *Flavivirus*. Protein ini berperan penting dalam pembentukan *RNAcap Structure* protease dan helicase sebagai pemecahan poliprotein menjadi protein struktural dan non struktural yang selanjutnya dalam perakitan dan pelepasan virus dengan lebih lanjut terjadi maturasi virion dan reorganisasi permukaan virion dengan cara pemotongan Pre M dan pembentukan trimer protein E. Proses pemotongan protein Pre M-E menjadikan virus matang (Nasronuddin, 2007; Noisakarn and Perng, 2008; Fanani MZ (2011)).

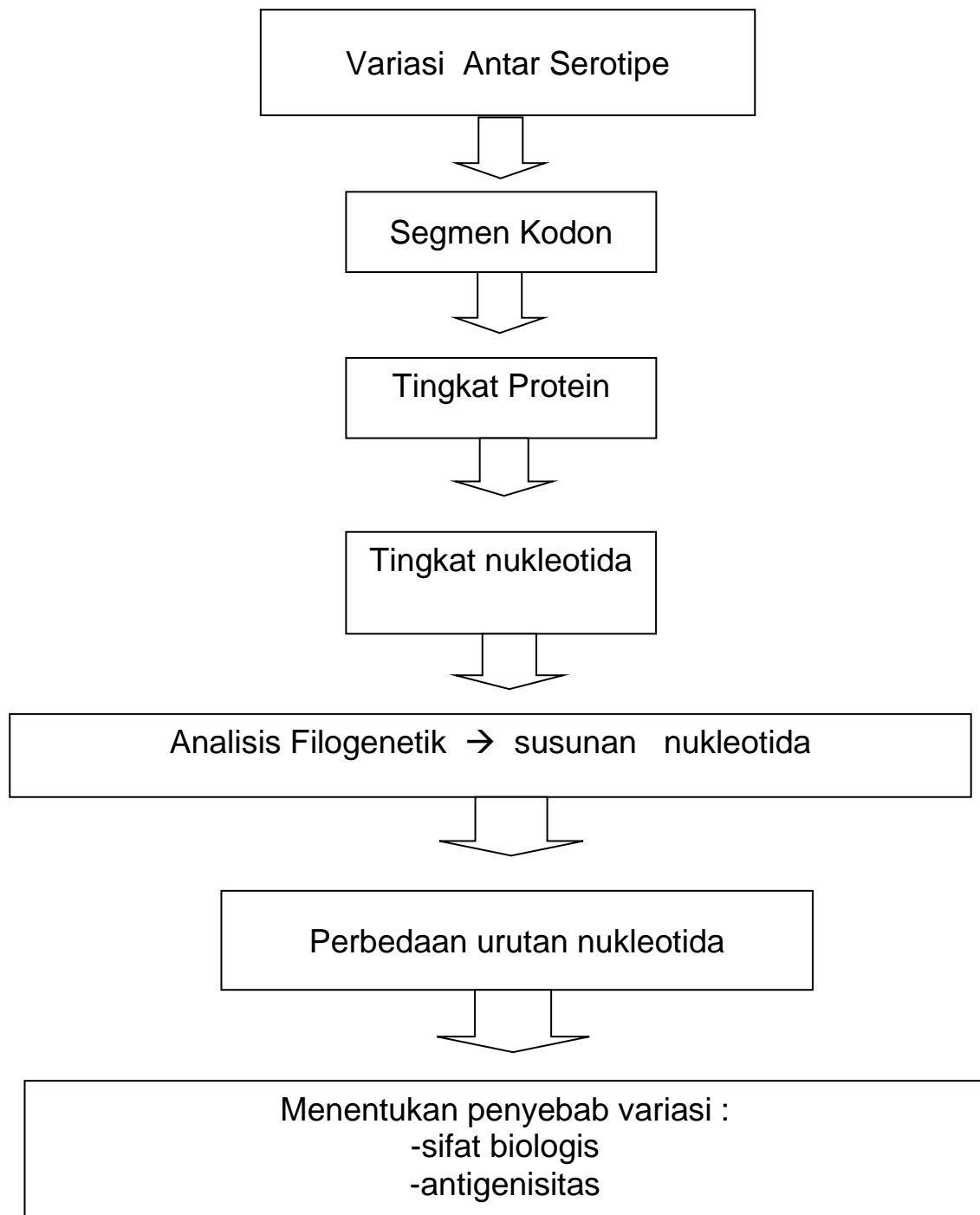
Ko processing dan postranslational terhadap seluler poliprotein dari seluler dan protease virus memberikan peningkatan terhadap tiga protein virus, penanda C (core), M (membrane), dan E (*envelope*) serta beberapa protein non struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5). Dua protein sitosol NS3 dan NS5, diidentifikasi masing-masing sebagai *protease viral/helikase* dan *polimerase*. Glikoprotein non struktural NS1 adalah esensial untuk viabilitas virus tetapi tidak dapat ditetapkan aktivitas biologisnya. Saat infeksi *in vitro*, NS1 ditranslokasi kedalam retikulum endoplasmik melalui sekuensi signal hidrofobik terlokalisasi pada *carboxyl terminus* dari protein E. Pada retikulum endoplasmik, NS1 dihubungkan sebagai homodimer yang berinteraksi dengan komponen

membran. Fraksi dari NS1 tetap dihubungkan dengan organel intraseluler dimana muncul dan terlibat dalam tahap awal replikasi virus. Secara alternatif, protein dikeluarkan sepanjang jalur sekresi ke membran plasma pada protein tersebut melalui kelompok *glycosylphosphatidylinositol* atau dilepaskan sebagai heksamer soluble (sNS1) dari sel mamalia terinfeksi. Pada *in vivo*, protein sNS1 didapatkan dari sirkulasi serum virus dengue yang menginfeksi pasien melalui fase klinis penyakit. Konsentrasi dari sNS1 pada serum melampaui 1-10 g/ml tergantung dari serotipe virus, waktu terjadinya infeksi dan pejamu individu dan muncul lebih tinggi pada pasien DBD dibandingkan DD. Antibodi yang dikeluarkan oleh NS1 saat infeksi memiliki peran dalam patogenesis reaksi silang dengan permukaan antigen sel endotel atau trombosit, menimbulkan aktivitas atau menyebabkan kematian dengan apoptosis atau *complement mediated lysis*. Untuk mendapatkan beberapa pengetahuan peran sNS1 DEN saat bersirkulasi dalam darah, diinvestigasi peran protein *in vivo* dalam injeksi intravena pada model tikus (Alcons, 2015). Jika ditinjau dari penentuan patogenitas virus dengue dapat digambarkan dari skema dibawah ini:



Gambar 3:Potensi – protein penentu imunogenisitas virus dengue (Nasronudin, 2007).

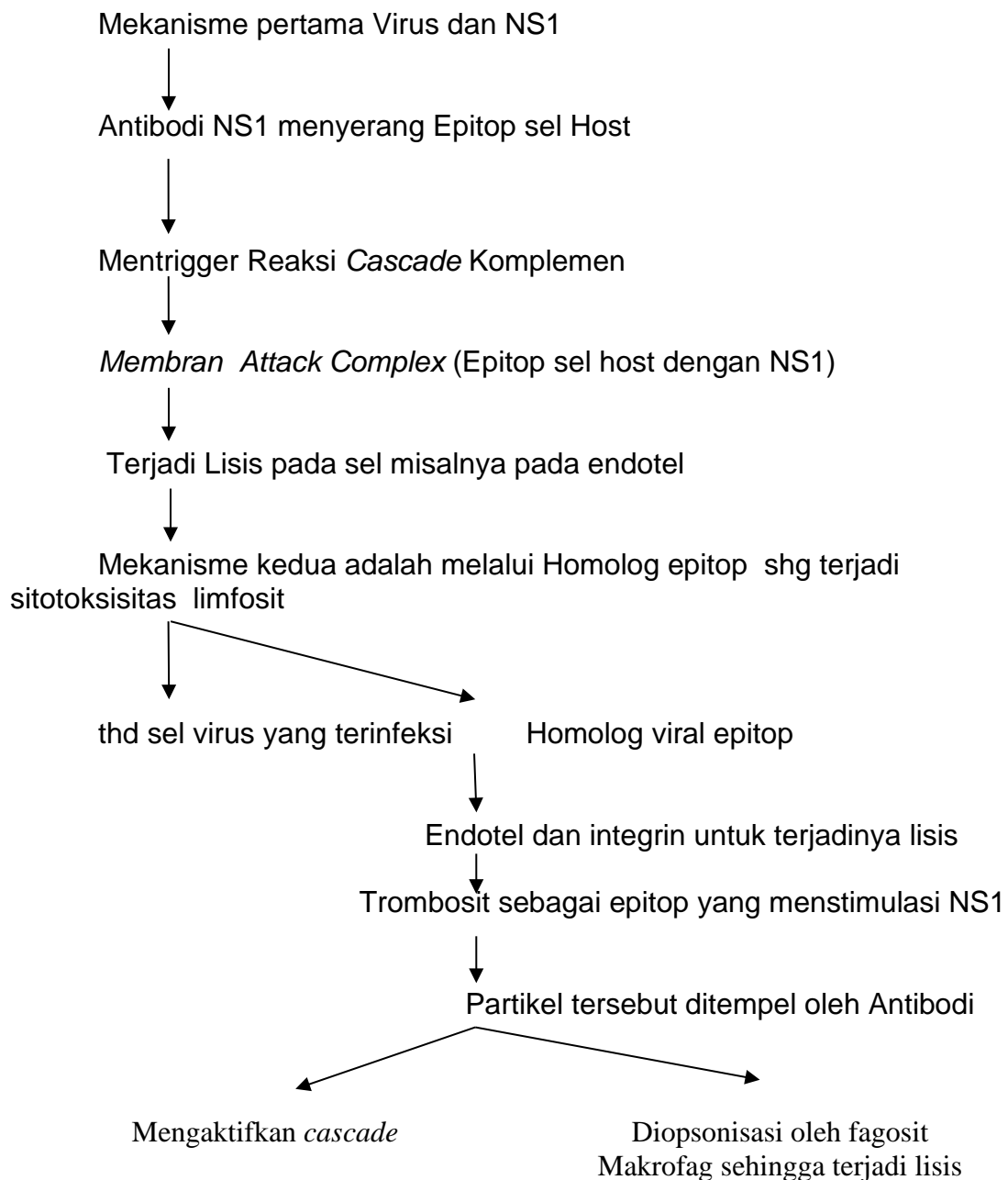
Penentuan variasi antigenisitas serotipe dapat dilihat dari skema dibawah ini:



Gambar 4:
Penentu sifat biologis, antigenisitas dan variasi antarserotipe virus dengue
(Nasronudin, 2007).

B. Immunogenesitas Peranan dan Mekanisme kerja Antibodi NS1

Mengkaji imunogenesitas Antibodi NS1, maka secara sederhana mekanisme protein NS1 dan antibodi NS1 dapat diringkas dalam skema berikut:



Gambar 5. Mekanisme Protein NS1 dan Antibodi NS1 (Halstead, 2008B).

Masuknya virus dengue akan membangkitkan respons imun melalui sistem imun bawaan (*innate immune system*). Pada sistem ini komplemen

yang merupakan salah satu kelas protein darah, memegang peranan utama. Aktivasi komplemen tersebut dapat melalui *mannosa binding protein* maupun antibodi. Antibodi yang terbentuk akan mengaktifkan C1q dan mengaktifkan molekul komplemen yang lain dan melisis virus atau menimbulkan fagositosis. Pada sistem imun didapat (*adaptive immune system*), antibodi mempunyai peranan penting. Bila sistem pertahanan tubuh alamiah tidak berhasil mengeliminir virus dengue, maka tubuh mengerahkan sistem imun didapat melalui aktivasi sinyal. Aktivasi sel khusus tersebut memproduksi sitokin dengan BM 8-4000Da (Nasronudin, 2008; Chatarina, 2001). Virus dengue saat memasuki sel target akan tumbuh dalam bagian sitosol dari sel yang terinfeksi dan menggunakan DNA sel host untuk mensintesis protein atau asam amino yang diperlukan untuk replikasi. Replikasi virus dengue terjadi di fagosit mononuklear (Halstead, 2008A). Protein yang diproduksi virus tersebut akan dipecah oleh enzim di dalam sel menjadi peptida dan terikat pada molekul MHC kelas I yang dibentuk retikulum endoplasma. Adanya peptida asing yang terikat pada celah molekul MHC tersebut merupakan sinyal pada sistem imun bahwa sel tersebut terinfeksi. Kompleks antigen dan molekul MHC tersebut bergerak ke permukaan sel inang, dikenal dan diikat oleh reseptor limfosit TCD8 yang lewat. Sebelumnya limfosit TCD8 tersebut diaktifkan oleh sinyal kedua yang muncul bila molekul CD28 pada molekul pasangannya B7. Limfosit TCD8 akan mengeluarkan sitokin yang menghancurkan sel yang terinfeksi maka disebut sel T killer (Nasronudin, 2008).

Antibodi Ig G yang terbentuk pada infeksi dengue terdiri dari antibodi yang menghambat replikasi virus (*neutralizing antibody*) dan antibodi yang memacu replikasi virus dalam monosit (*infection enhancing antibody*). Antibodi non netralisasi yang dibentuk pada infeksi primer menyebabkan kompleks imun pada infeksi sekunder. Hal inilah yang

mendasari bahwa infeksi sekunder virus dengue oleh serotipe yang berlainan akan cenderung menyebabkan manifestasi berat. Kerusakan sel oleh virus dengue terjadi secara langsung maupun tidak langsung melalui respons imun atau keduanya (Nasronudin, 2008).

Respon imun tersebut merupakan respon pertahanan tubuh yang terjadi sebagai akibat infeksi dengue, meliputi pembentukan kompleks imun, aktivasi limfosit T, aktivasi sistem komplemen dan produksi sitokin. Perubahan imunologi yang telah dibuktikan ialah peningkatan imunoglobulin G, M, A, dan E, aktivasi komplemen, pembentukan kompleks imun dan penurunan jumlah limfosit T. Imunitas proteksi terhadap infeksi virus, terjadi melalui dua fase, yaitu fase awal sebelum virus memasuki sel target dan fase selanjutnya setelah virus masuk ke dalam sel target jika virus lolos dari antibodi dan fagosit (Nasronudin, 2008).

Respon imun yang terjadi pada pasien DBD adalah respon imun non spesifik dan respon imun spesifik. Respon imun non spesifik (alami) melalui pembentukan interferon tipe I oleh sel virus terinfeksi, yang berfungsi menghambat replikasi virus, kemudian sel natural killer menandai mekanisme awal untuk melawan infeksi virus sebelum respon imun spesifik terbentuk. Selanjutnya respon imun spesifik dari humoral dan seluler merupakan respon imun terpenting pada infeksi virus. Pada tahap berikutnya eliminasi infeksi dilakukan oleh antibodi dan *cytolytic T lymphocytes* (CD8). Antibodi dalam hal ini berfungsi memblokir ikatan virus dan menghalangi masuknya virus ke dalam sel, sedangkan CTLs menghancurkan sel yang terinfeksi dan mencegah replikasi virus selanjutnya (Litchman, 2005; Nasronudin, 2008).

Dalam penelitian respon imun terhadap infeksi virus dengue pada manusia, terdapat dua jenis respon imun yang berlawanan. Pertama respon imun yang berfungsi untuk pencegahan dan penyembuhan infeksi

virus dengue. Kedua respon imunopatologi yang menyebabkan terjadinya manifestasi klinis DBD. Pada respon imun non spesifik terhadap virus dengue akan merangsang sel monosit untuk menghasilkan IFN γ dan memacu IFN γ dari limfosit (HLADR+, CD3) non imun autologus. Induksi IFN γ memerlukan kontak diantara monosit yang terinfeksi virus dengue dan limfosit tersebut. Monosit yang tidak terinfeksi tidak merangsang limfosit autologus untuk memproduksi IFN γ . IFN γ yang terbentuk, berguna untuk melindungi monosit yang belum terinfeksi dari virus dengue (Nasronudin, 2008).

Respon mononuklear merupakan respon imun spesifik terhadap antigen Den-1, 2, 3, dan 4 untuk menghasilkan interferon akibat rangsangan limfosit B. Pada masing-masing serotipe tersebut terdapat respons silang. Sebagai akibat respons imun tersebut, terjadi pembentukan kompleks virus dengue dan antibodi, aktivasi sel limfosit, aktivasi sistem komplemen dan produksi sitokin proinflamatori dan anti inflamatori (Nasronudin, 2008).

Kompleks imun yang terbentuk antara ikatan virus dengan antibodi spesifik IgG terjadi pada 48-72% pasien DBD. Kompleks imun terdapat pada permukaan trombosit, limfosit B dinding kapiler dan glomeruli ginjal. Kompleks imun yang melekat pada permukaan trombosit akan mempermudah penghancuran trombosit oleh sel retikuloendotelial hati dan limpa sehingga terjadi trombositopenia. Adenosin Difosfat (ADP) menginduksi agregasi trombosit terhadap trombosit yang sudah melekat pada dinding pembuluh darah yang rusak, membuktikan adanya gangguan fungsi trombosit, sedangkan aktivasi endotel oleh kompleks imun akan mengakibatkan aktivasi koagulasi sehingga terjadi defek koagulasi dan bersama trombositopenia menyebabkan pendarahan pada DBD (Nasronudin, 2008; Nisalak *et al.*, 2003; Suwandojo, 2002). Limfosit

T memegang peranan penting pada patogenesis DBD. Dari aktivasi limfosit akan dikeluarkan mediator yang berperan pada perubahan permeabilitas kapiler dan *cascade* pembuluh darah. membuktikan limfosit T menurun pada fase akut dan kembali normal pada fase penyembuhan penyakit (Nasronudin, 2008).

Siklus yang melibatkan antibodi terhadap infeksi virus dengue pada sel monosit adalah dengan membentuk kompleks virus dengue antibodi selama infeksi sekunder oleh serotipe virus dengue yang berbeda dari serotipe penyebab infeksi primer. Monosit yang terinfeksi virus akan merangsang memproduksi IFN γ , IL-2 dan sitokin lainnya. Selanjutnya IFN γ meningkatkan *antibodi-dependent enhancement* infeksi virus dengue dengan pengaturan Fc γ R pada monosit. Interferon γ juga mengaktivasi monosit dan mengatur molekul MHC kelas I dan II. Regulasi MHC kelas I dan kelas II memfasilitasi pengenalan epitop virus dengue oleh limfosit TCD8+ dan CD4+ akan mengaktivasi sel limfosit T lebih lanjut sehingga menyebabkan peningkatan kadar limfokin. Monosit yang teraktivasi oleh virus akan lisis oleh limfosit T sitotoksik CD4+ dan CD8+ (CTL) sehingga bahan intraseluler akan keluar. Siklus ini menyebabkan peningkatan limfokin (IL-2), monokin (TNF), mediator kimiawi (leukotrin dan histamin), anafilatoksin (C3a dan C5a) dalam waktu singkat. Peningkatan kadar mediator ini sebagai akibat respon imun yang dapat memacu perembesan plasma, syok, gangguan koagulasi dan manifestasi pendarahan. (Nasronudin, 2008; Hadinegoro, 2001; Cardoso, 1991).

Sedangkan penelitian Chiou (2005), mengkaji bahwa disfungsi vaskular merupakan tanda penting onset penyakit DBD dan DSS. Hal tersebut, dihubungkan dengan adanya kerusakan vaskular dan adanya respon imun terhadap infeksi virus dengue. Mekanisme *molecular mimicry*, dimana antibodi melawan NS1 protein non struktural melalui reaksi silang menyebabkan kerusakan sel-sel endotel. Dalam penelitian

ini, aktivasi inflamasi sel endotel disebabkan oleh anti DV NS1 melalui jalur regulasi faktor transkripsi NF κ B. Fosforilasi Protein dan aktivasi NF κ B diamati sesudah stimulasi anti DV NS1 pada sel mikrovaskuler manusia. Produksi sitokin dan kemokin termasuk IL-6, IL8 dan MCP-1 tetapi bukan RANTES, pada sel endotel meningkat setelah pengobatan dengan ab anti DV NS1. Ekspresi dari IL-6, IL-8 dan MCP -1 diabsorpsi oleh anti NS1 DV atau inhibisi oleh aktivasi NF κ B. Selain itu, peningkatan baik ekspresi ICAM-1 dan kemampuan PBMC manusia untuk mengikat sel endotel juga di amati. Efek ini dihambat oleh pretreatment dengan anti ICAM-1 atau abs anti MCP-1. Apoptosis sel endotel ditandai aktivasi inflamasi, terjadi pada sel endotel sesudah stimulasi oleh anti DV NS1 Abs. Hasil ini mengesankan keterlibatan anti DV NS1 abs pada vaskulopati pada infeksi (Fenglin *et al.*, 2005).

Menurut penelitian Hanley, kompleks imun yang terbentuk pada infeksi sekunder virus dengue akan merangsang makrofag memproduksi sitokin diantaranya interferon, TNF α , IL-1 β dan IL-6 . Penelitian Kurane, dalam hipotesisnya mengungkapkan adanya peningkatan permeabilitas kapiler pembuluh darah pada DBD. Hal ini melalui aktivasi sel T dan pengeluaran sitokin yang menyebabkan perembesan plasma dan mengakibatkan syok pada pasien DBD yaitu TNF α , IL-1 dan IL-2. Monosit/makrofag dan sel T memproduksi TNF α , secara langsung merusak endotel dan meningkatkan permeabilitas kapiler (Nasronudin, 2008).

Trombositopenia terjadi akibat gangguan produksi maupun peningkatan destruksi trombosit. Jejas trombosit dapat terjadi akibat kerusakan endotel, *platelet-specific antibodies*, kompleks imun, koagulasi intravaskuler diseminata (KID) dan potensial mendorong terjadinya pendarahan (Nasronudin, 2008; Halstead, 2008A; Chatarina, 2001).

Pendarahan pada DBD disebabkan oleh tiga kelainan hemostasis utama: yaitu vaskulopati, kelainan trombosit dan penurunan kadar faktor pembekuan. Pada fase awal demam, pendarahan disebabkan oleh vaskulopati dan trombositopenia, sedangkan pada fase syok dan syok lama, pendarahan disebabkan oleh trombositopenia kemudian diikuti oleh koagulopati, terutama akibat koagulasi intravaskular diseminata (KID) dan peningkatan fibrinolisis. Secara klinik vaskulopati bermanifestasi sebagai petekhia, uji bendung positif, perembesan plasma dan elektrolit serta protein dalam rongga ekstrasvaskular. Penyebab utama vaskulopati adalah dikeluarkannya zat anafilatoksin C3a dan C5a (Nasronudin, 2008; Halstead, 2008; Hadinegoro, 2001).

Pada fase awal penyakit (hari ke-1 sampai dengan ke-4) penurunan produksi trombosit merupakan penyebab trombositopenia. Pada saat itu sumsum tulang tampak hiposeluler ringan dan megakariosit meningkat dalam berbagai bentuk fase maturasi. Virus secara langsung menyerang mieloid dan megakariosit. Trombosit pada saat itu dapat mencapai 20.000-50.000/mm³. Pada hari ke-5 sampai ke-8, terjadi trombositopenia terutama disebabkan oleh penghancuran trombosit dalam sirkulasi. Kompleks imun yang melekat pada permukaan trombosit mempermudah penghancuran trombosit oleh sistem retikulo endotelial di dalam hati dan limpa yang mengakibatkan trombositopenia pada fase syok. Penghancuran trombosit dapat juga disebabkan oleh kerusakan endotel, reaksi oleh kompleks imun, antibodi trombosit spesifik atau KID yang disebabkan oleh syok lama. Pada fase ini terjadi peningkatan jumlah megakariosit pada sumsum tulang (Nasronudin, 2008; Halstead, 2008B; Hadinegoro, 2001).

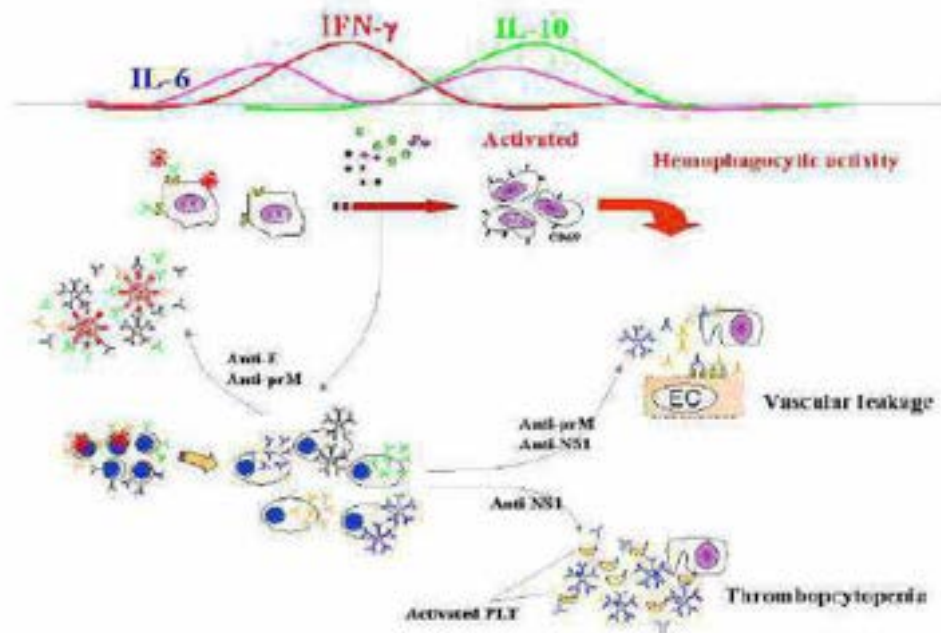
Pada DBD, pengeluaran PAF kemungkinan disebabkan oleh aktivasi platelet dan monokin. Secara bersamaan, peningkatan kadar PAF serta TNF α , IL-1, IL-6, L-8, C3a, C5a, dan histamin menyebabkan

malfungsi endotel pembuluh darah kapiler sehingga terjadi perembesan plasma dan syok hipovolemik serta pendarahan.

C. Patomekanisme Autoimun Demam Berdarah Dengue

1. Molecular Mimicry dan Bystander Activation

Dalam perkembangan imunopatogenesis DBD terjadi aktivasi imun dan produksi sitokin berlebihan yang mempengaruhi monosit, sel endotel, dan hepatosit, produksi abnormal dari autoantibodi terhadap sel endotel dan trombosit. Hal ini menyebabkan terganggunya respon imun dalam membersihkan virus termasuk perubahan rasio CD4/CD8. Selain itu, *molecular mimicry* terjadi diantara sel-sel endotel/trombosit dan antigen-antigen virus dengue trombosit dan sel-sel endotel diikat oleh reaksi silang antibodi anti dengue virus seperti anti NS1 atau antibodi anti prM. IFN γ mengaktivasi makrofag untuk fagositosis target opsonin. Autoantibodi ini lebih lanjut akan mengawali terjadinya disfungsi sel. IFN γ mengaktivasi makrofag memfagosit autoantibodi yang melapisi trombosit dan sel endotel yang menyebabkan trombositopenia dan kerusakan sel endotel. Aktivitas hemofagositik singkat tersebut disebabkan infeksi post akut virus dengue (Lei *et al.*, 2008)



Gambar 9 : Immunopatogenesis Mekanisme Autoimun DBD (Lei *et al.*, 2008)

Pada saat ini terdapat beberapa mekanisme yang menerangkan respon autoimun terhadap infeksi virus. Mekanisme terbaru untuk menjelaskan respon autoimun oleh infeksi virus termasuk diantaranya *molecular mimicry*, *bystander activation* dan *viral persistence*. Antibodi terhadap peptida plasminogen dapat dideteksi pada 70% sera fase akut dari pasien di Thailand. Hal yang sama dijumpai di Tahiti dimana terdeteksi antibodi yang serupa yang berkorelasi dengan infeksi sekunder dan pendarahan. Pada penelitian di Thailand sera fase konvalesen selama 1-4 bulan dari 16 pasien dengan demam dengue ternyata bereaksi dengan peptida 759-779 plasminogen manusia dan menghasilkan penurunan sedang aktivitas plasmin serum. Falconar mengobservasi pada tikus bahwa antibodi DENV-NS1 yang dihasilkan menimbulkan reaksi silang dengan protein pembekuan darah pada manusia, protein integrin/adhesi, sel endotel, dan trombosit. Selanjutnya reaksi silang antibodi monoklonal DENV-NS1 menimbulkan pendarahan (Morens, 2008). Hal ini dapat dilihat dari gambar dibawah atas.

Penelitian lain mengungkapkan antibodi pada sera pasien dengue bereaksi silang dengan sel endotel. Kadar sera antiplatelet dan autoantibodi antiendotelial sel dari pasien DBD/DSS lebih tinggi dari sera pasien Demam Dengue. Penelitian eksperimen tersebut mendapatkan antibodi anti DENV NS1 sebagian bereaksi silang dan terjadi apoptosis sel endotel. Berkaitan dengan autoantibodi trombosit, anti DEN V NS1 menyebabkan aktivasi inflamasi pada sel endotel. Dalam hal ini *molecular mimicry* terjadi diantara komponen virus dengue dan elemen terhadap trombosit dan sistem endotelial (Morens, 2008). Penelitian lain mengungkapkan hipotesis tentang mekanisme autoimun yang menyebabkan gejala DBD. Protein NS1 mengeluarkan *molecular structural mimicry* pada trombosit manusia, sel endotel dan protein pembekuan darah. Antibodi meningkat pada tikus DENV NS1 yang bereaksi dengan *epitops mimetic* pada trombosit manusia dan sel endotel, menyebabkan masa hidup trombosit lebih pendek dan meningkatnya permeabilitas vaskuler pada sistem in vitro (Halstead, 2008B). Hipotesis penelitian tersebut mengungkapkan kontribusi autoimun pada infeksi virus dengue terhadap trombositopenia dan permeabilitas vaskuler adalah varian dengan kinetiknya terhadap patofisiologi dan respon imun (Harun,1996).

2. Reaksi Autoimun Tingkat Endotel

Penelitian yang dikemukakan oleh Chiou *et al.* (2002), menemukan reaksi silang serum pasien dengue dengan sel endotel. Terdapat presentasi lebih tinggi reaksi sel endotel pada DBD/DSS dibandingkan DD. Presentasi reaksi sel endotel tersebut terhadap Ig M lebih tinggi dibandingkan dengan Ig G. Studi tersebut mengemukakan aktivitas pengikatan sel endotel dan serum pasien dengue yang menginduksi

apoptosis sel endotel melalui *caspase-dependent pathway* yang dihambat oleh pre treatment oleh NS1. Antibodi yang melawan produksi NS1 sesudah infeksi virus dengue, menjelaskan reaksi silang sera pasien dengan sel endotel. Dalam penelitian tersebut disimpulkan *antibodi cross reactive* terhadap sel endotel menunjukkan adanya disfungsi yang mungkin berperan dalam patogenesis infeksi dengue (Lin *et al.*, 2003).

Penelitian Chiou *et al.* (2002), mendemonstrasikan antibodi melawan protein non struktural NS1 virus dengue yang berasal dari tikus bereaksi silang dengan sel endotel manusia dan endothelium pembuluh darah. Setelah terjadi pengikatan endotel oleh antibodi anti NS1 menyebabkan apoptosis sel endotel pada pola *caspase dependent pathway*. Dalam proses ini diamati kemampuan dan hasil ekspresi sintesis dari NO (iNOS) yang berkorelasi dengan *dose dependent* produksi NO. Penambahan NO sintetase menghambat proteksi dari Anti NS1 mencetuskan apoptosis. Apoptosis dari sel endotel ditandai paparan dari *serin phosphatidyl* pada permukaan sel dan fragmentasi nukleus DNA, yang diblok dari pengobatan dengan *inhibitor sintetase N nitro L arginine methyl ester*. Studi lebih lanjut menggambarkan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xl menurun baik mRNA dan kadar protein, ditandai dengan p53 dan Bax meningkat sesudah pengobatan anti NS1. Penelitian ini juga mengamati pelepasan terhadap sitokrom, efek yang timbul dihambat oleh N nitro L arginine methyl ester. Dari penelitian ini dapat disimpulkan anti NS1 ab bereaksi sebagai auto antibodi bereaksi silang dengan sel endotel yang tidak terinfeksi dengan mencetuskan signal intraseluler menyebabkan produksi NO dan apoptosis. Kerusakan sel endotel dan apoptosis sel endotel mungkin berhubungan dengan disrupsi barier endotelial yang menyebabkan kebocoran transien pembuluh darah pada vaskulopati dengue dan berkontribusi dalam patogenesis penyakit dengue (Fenglin *et al.*, 2002).

Penelitian dari Chiou *et al.* (2002), mengemukakan trombositopenia sebagai manifestasi klinik infeksi virus dengue, mekanisme patogeniknya sampai saat ini belum dapat dipecahkan. Terdapat aktivitas serum anti platelet anti dengue yang disebabkan oleh antibodi melawan protein NS1 virus dengue. Penelitian tersebut menggunakan virus dengue yang terinfeksi atau rekombinan imunisasi NS1 pada tikus, memperlihatkan antibodi NS1 bereaksi silang dengan trombosit manusia. Aktivitas ikatan trombosit terhadap pasien dengue atau antibodi anti NS1 dihambat dengan pemberian pengobatan terhadap trombosit dengan anti NS1 atau serum pasien. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa antibodi NS1 mampu menghambat agregasi trombosit dan lisis trombosit dalam presentasi komplemen, aktivitas trombosit dan induksi lisis trombosit (Feng-Lin *et al.*, 2008).

Penelitian dari Chungue *et al.* (1994) mengemukakan suatu analisis, walaupun kebanyakan demam dengue menjadi sembuh sempurna, kebocoran plasma dapat menjadi faktor penting memberatkannya menjadi DSS. Dalam penelitian tersebut dikatakan, berkembangnya antibodi dan reaksi silang terhadap plasminogen dilaporkan memiliki persentasi tinggi pada pasien di Thailand dengan DD dan DBD/DSS. Korelasi diantara deteksi terhadap *plasminogen cross reactive antibody* dan pendarahan dievaluasi pada 88 anak di Tahiti dengan dengue virus tipe 3. Hasil tersebut menunjukkan pada 59 anak atau tanpa (29 anak) dengan pendarahan. *Plasminogen cross reactive antibodies* didapatkan pada serum akut dan konvalesen dari 33 dan 11 anak masing masing (5607 ov s. 310zo, $p < 0.5$) dan antibodi paralel terhadap tempat reaksi silang pada protein E virus dengue. Antibodi lebih sering pada anak dengan infeksi sekunder dari pada infeksi primer (6007 ov v s. 3207o $p < 0.5$). *Plasminogen cross reactive antibodies* tidak berhubungan dengan terjadinya DBD/DSS atau trombositopenia. Hasil ini konsisten dengan

kemungkinan bahwa *plasminogen cross reactive antibodies* berperan penting sebagai etiologi terhadap pendarahan pada infeksi virus dengue (Chunge *et al.*, 1994).

Penelitian dari Lewis (1991), terhadap 40 pasien di Thailand, dengan menggunakan peptide sintetik pada ELISA, antibodi E secara potensial mengikat plasminogen dideteksi pada 750Zo yang terinfeksi dengue akut tipe 1, 2, 3, atau 4. *Plasminogen cross reactivity* dari antibodi dengue diperlihatkan menjadi spesifik hubungannya dengan glikoprotein envelope (E) dan plasminogen. Sekuensi E dengue kesamaannya terhadap plasminogen sebagai sekuensi E Flavivirus. Dimana dari pengamatan laboratorium, antibodi menyerang E yang mengandung serotipe, sub grup dan antigen spesifik flavivirus. E (MT 56000) adalah penangkapan protein virus yang memiliki aktivitas hemaglutinasi dan fusi. Analisis penelitian ini menghasilkan kesamaan sekuensi diantara E dengue dan kelompok faktor-faktor pembekuan, termasuk urokinase, faktor X, prothrombin, plasminogen dan aktivator plasminogen jaringan. Faktor tersebut memiliki peran dalam menghasilkan fibrin atau fibrinolisis. Faktor X mempromosikan konversi protrombin menjadi thrombin yang dikatalisa oleh proteolisis dari fibrinogen untuk memproduksi monomer fibrin. Plasmin sebagai efektor utama dari fibrinolisis, mengaktivasi komponen ketiga dan keempat dari *complement pathway*. Aktivitas plasmin dimodulasi dari antagonis α -2 anti plasmin dari pengikatan *serine active site* dalam plasmin. Hal ini ditandai infeksi virus dengue menguraikan antibodi E spesifik bereaksi silang dengan plasminogen yang memiliki hubungan dengan sekuensi plasminogen (Markoff, 1991).

Penelitian Henchal (1998), mengemukakan pada non netralisasi serotipe antibodi monoklonal anti NS1 spesifik, secara parsial melindungi tikus yang diinfeksi virus dengue-2 intracerebral yang mematikan. Tidak ada hubungan diantara aktivitas menetap komplemen dan kapasitas

protektif diantara individu terhadap antibodi monoklonal anti NS1. Imunisasi dengan kombinasi spesifik yang tidak protektif atau antibodi proteksi parsial menghasilkan survival yang lebih panjang atau mengurangi mortalitas. Proteksi penuh yang didapatkan sesudah imunisasi dengan antibodi netralisasi poliklonal, dicapai sebagian antibodi individual dan komplemen ke titer tinggi dengan virus homologous. Beberapa kelompok dari tikus meningkat angka kesakitan sesudah imunisasi dengan kombinasi terhadap proteksi antibodi monoklonal yang mengikat epitop secara tumpang tindih. Hasil ini berdampak terhadap disain vaksin dengue rekombinan yang mungkin memberikan masuknya serotipe domain spesifik antigenik (Henchal *et al.*, 1998).

Menurut penelitian Valde (2008), antibodi yang melawan protein virus dengue tipe 2 dan 4 pada sera fase akut, dari 10 pasien primer dan sekunder demam dengue dan dengue haemorrhagic fever diteliti dengan *western blotting*. Pada kelompok pertama respon imun hampir tidak terdeteksi, sementara pada kelompok sekunder lebih banyak protein dideteksi dengan reaksi sangat kuat. Antibodi NS1 dan NS3 dideteksi terutama pada kasus sekunder. Anti E, NS3, dan NS5 antibodi dideteksi pada sejumlah besar kasus. Kemungkinan hal ini menjadi implementasi diagnostik awal untuk deteksi antigen (Valde *et al.*, 2008).

Berdasarkan data-data akurat bahwa mekanisme immunopatologik berperan dalam patogenesis DBD. Antibodi dengue dilaporkan memediasi tiga fungsi biologik secara *in vitro* yang berkontribusi terhadap pencegahan atau pengendalian infeksi virus yaitu netralisasi, *complement mediated cytolysis* dan *antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*. Antibodi dapat bertambah pada infeksi virus dengue melalui fenomena ADE. Respon antibodi infeksi sekunder ditandai secara berbeda dari infeksi primer. Protein virus dengue dapat menstimulasi produksi antibodi. Namun sedikit studi yang melakukan karakterisasi respon ini

untuk mendefinisikan bagaimana antibodi dihubungkan dari perbaikan atau beratnya infeksi dengue. Studi ini didefinisikan terhadap respon imun protein struktural dan non struktural. Sampel serum diambil dalam 5-7 hari dari *onset* penyakit dengan 20 kasus konfirmasi secara serologi yang diteliti. Ig M anti dengue dideteksi pada semua sampel. Serum 5 pasien virus (seluruhnya dengan infeksi primer) dan 15 DBD (5 primer dan 10 infeksi sekunder) diperiksa dengan *western blotting*. Antibodi monoklonal dan poliklonal dengue dan serum dari dengue *non immune* yang terinfeksi digunakan sebagai kontrol. Total immunoglobulin sedikitnya satu atau dua protein Den-4 antigen digambarkan pada 9 dari 10 (90%) kasus primer. Tidak ada antibodi NS1 dapat dideteksi pada beberapa serum kasus primer, sedangkan 4 dari 10 kasus sekunder (40%) memiliki antibodi NS1. Respon terhadap envelop (E) dan NS5 protein konsisten baik pada infeksi primer dan infeksi sekunder. Tidak ada anti NS3 antibodi dideteksi pada kasus primer maupun kasus sekunder. Lebih banyak respon terbatas diamati dengan Den-2 antigen. Sebaliknya terdapat respon E antibodi yang luas diamati baik pada kasus primer maupun sekunder. Respon antibodi NS1 diamati hanya pada kasus sekunder tetapi lebih tinggi (80%) dan lebih intensif diamati pada Den-4 antigen. Infeksi pada manusia secara natural pada virus dengue, respon antibodi yang poten secara mudah dapat diukur dengan beberapa tes serologi. Kualitas respon antibodi pada virus dengue tidak secara luas dipelajari berpijak kepada laporan sebelumnya. Bagi infeksi primer maupun infeksi sekunder, Antibodi anti E lebih sering dideteksi. Kemungkinan, kenyataan ini berhubungan dengan peran protein E bahwa permukaan protein utama dan *antigen viral* penting dalam terminologi biologi virus, imunitas humoral dan proteksi. Hal yang sangat menarik untuk dicatat dalam penelitian respon antibodi NS5, pada protein non struktural dengan aktivitas polymerase. Beberapa penulis melaporkan respon antibodi yang

bermakna terhadap NS3 protein baik pada primer maupun sekunder (Juffrie *et al.*, 1999; Valde *et al.*, 2008).

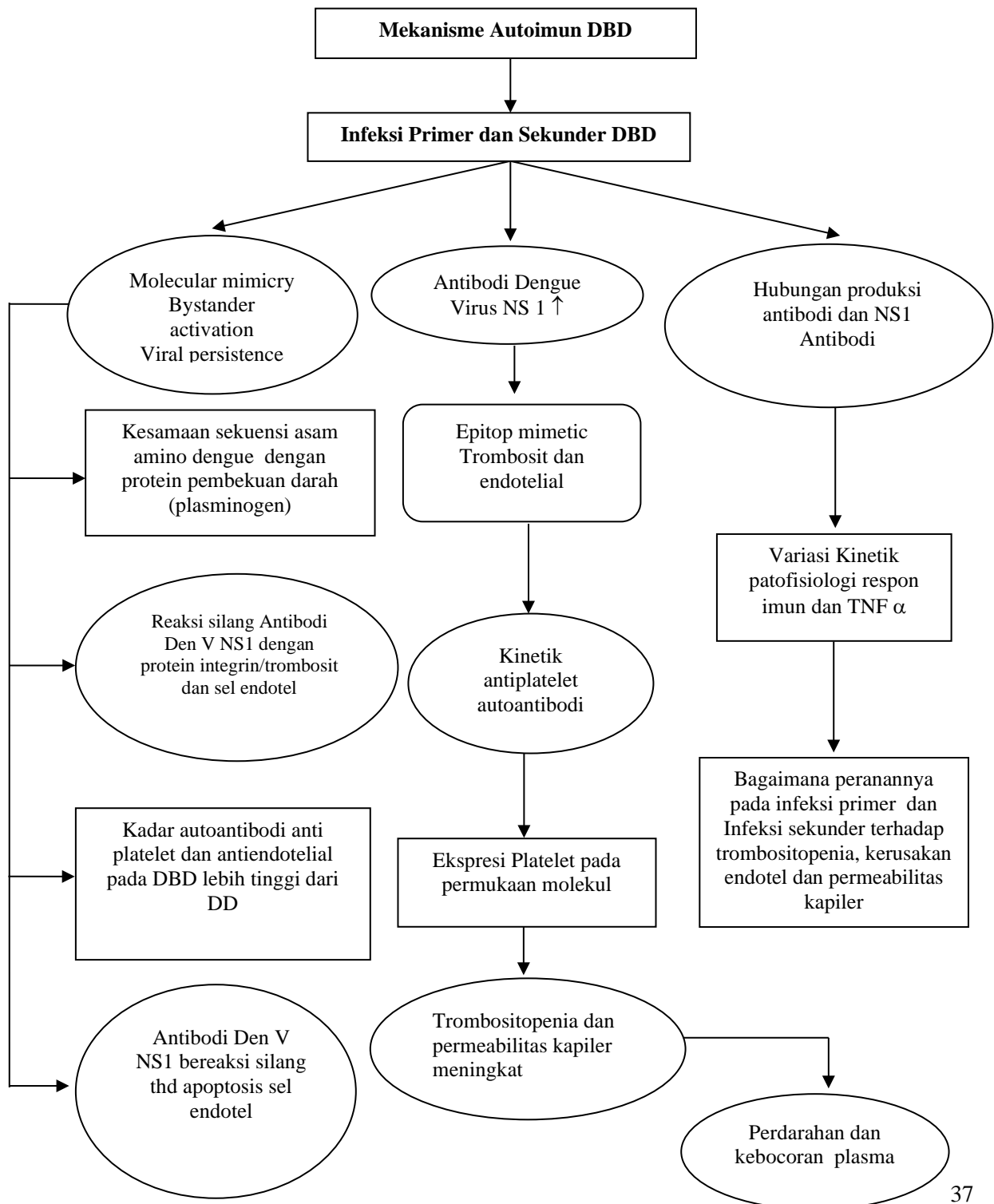
D. Landasan Teori/Kerangka Teori

Dari tinjauan pustaka diketahui bahwa antibodi NS1 merupakan salah satu faktor yang berperan untuk terjadinya reaksi silang memberatnya DBD atau pendarahan. Beberapa teori yang dikemukakan diatas, mengungkapkan mekanisme autoimun merupakan faktor utama untuk terjadinya trombositopenia dan pendarahan. Antibodi dengue memediasi tiga fungsi biologik secara *in vitro* yang berkontribusi terhadap pencegahan atau pengendalian infeksi virus (netralisasi, *complement mediated cytolysis* dan *antibody dependent cell mediated cytotoxicity*). Antibodi dapat bertambah pada infeksi virus dengue melalui fenomena ADE. Dalam perkembangan lebih lanjut, terdapat mekanisme lain yang berperan dalam memberatnya infeksi virus dengue. Penelitian tersebut mengungkapkan hipotesis mekanisme autoimun yang menyebabkan gejala DBD, protein NS1 mengeluarkan *molecular structural mimicry* dengan trombosit manusia, sel endotel dan protein pembekuan darah. Antibodi meningkat pada tikus DENV NS1 bereaksi dengan *epitops mimetic* pada trombosit manusia dan sel endotel, menyebabkan masa hidup trombosit lebih pendek dan permeabilitas vaskuler pada sistem *in vitro*. Hipotesis penelitian tersebut mengungkapkan kontribusi autoimun pada infeksi virus dengue terhadap trombositopenia dan permeabilitas vaskuler adalah varian kinetik terhadap patofisiologi dan respon imun.

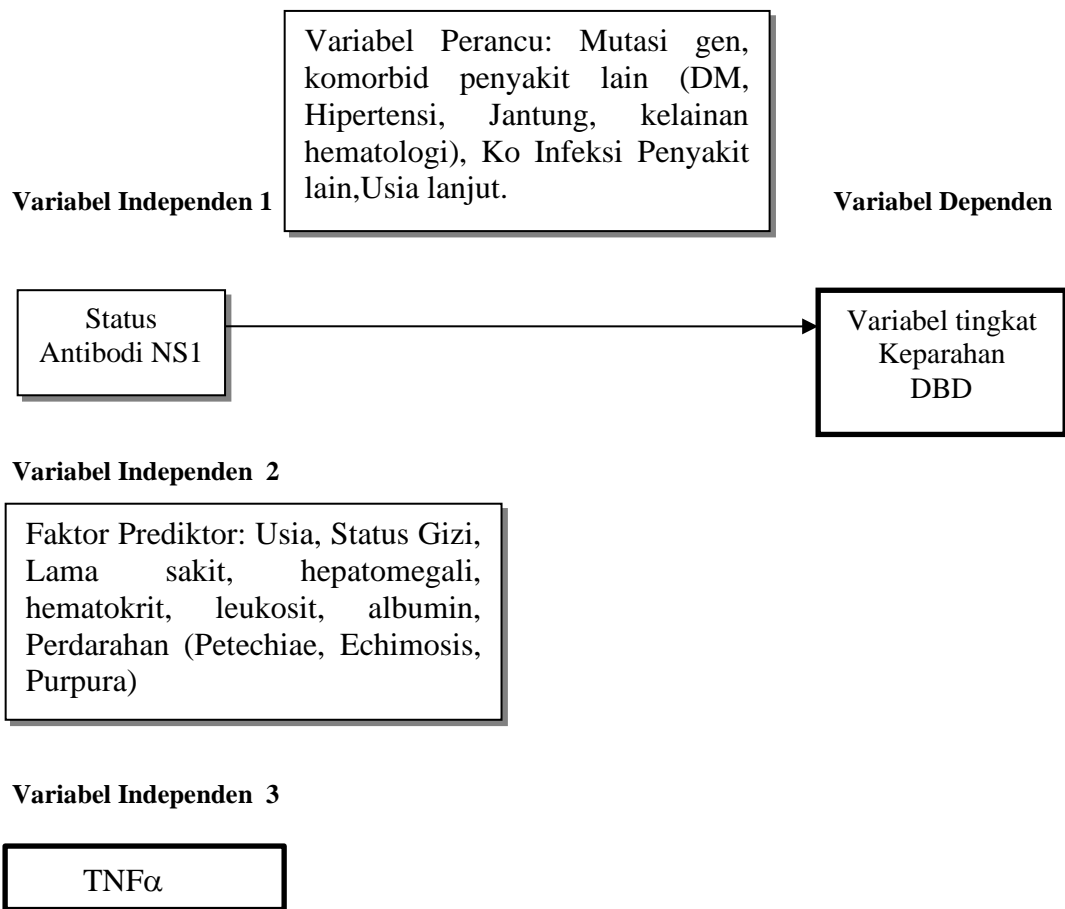
Pada tingkat endotel di penelitian lain, dikemukakan antibodi yang melawan produksi NS1 sesudah infeksi virus dengue terjadi reaksi silang sera pasien dengan sel endotel. Dalam penelitian tersebut disimpulkan *antibodi cross reactive* terhadap sel endotel menunjukkan adanya

disfungsi yang mungkin berperan dalam patogenesis infeksi dengue. Kerangka Teori yang dapat diajukan dalam rancangan penelitian ini adalah sebagai berikut:

ANTIBODI NS1 DAN TROMBOSIT SEBAGAI PREDIKTOR MEMBERATNYA DEMAM BERDARAH DENGUE



E. Kerangka Konsep



Sebelum diajukan hipotesis untuk penelitian ini maka beberapa premis yang dapat diungkapkan adalah sebagai berikut :

Premis 1: Pendekatan epidemiologi, mendukung adanya hubungan diantara DBD/DD dengan infeksi sekunder virus dengue. Namun masih diperlukan penjelasan lebih lanjut, kaitannya diantara DBD/DSS dengan respon imun, patogenesis, mekanisme *molecular mimicry* serta peningkatan antibodi NS1 terhadap manifestasi klinik dan terjadinya DBD/DSS (Lei *et al.*, 2008).

Premis 2: Beberapa alternatif imunopatogenesis infeksi virus dengue, yaitu *Aberrant immune response* yg terdiri

gangguan respon imun untuk membersihkan virus, over produksi sitokin dan produksi abnormal terhadap antibodi. Generasi Antibodi anti NS1 yang bereaksi silang dengan trombosit atau sel endotel yang mengawali berkembangnya infeksi dengue. Autoantibodi anti endothelial atau Autoantibodi trombosit harus dilibatkan dalam manifestasi klinik terhadap trombositopenia dan disfungsi sel endotel. Infeksi virus dengue yang menyebabkan kerusakan endotel dan perdarahan, berkontribusi untuk terjadinya pendarahan, ketidakseimbangan koagulasi dan aktivasi fibrinolisis sehingga menyebabkan perdarahan berat pada DBD/DSS (Lei *et al.*, 2008).

F. Hipotesis

Berdasarkan Premis yang dikemukakan diatas, maka hipotesis penelitian yang diajukan adalah:

1. Antibodi NS1 merupakan prediktor memberatnya DBD.
2. Terdapat korelasi Antibodi NS1 dengan beratnya trombositopenia.
3. Model Prediktor dengan melibatkan Antibodi NS1 dan TNF α terhadap memberatnya DBD

BAB III METODE PENELITIAN

A. Disain Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan merupakan penelitian epidemiologi dengan rancangan nested case control study dengan variabel bebas lama sakit, hematokrit, leukosit, trombositopenia, perdarahan, albumin, antibodi NS1, Ig M atau Ig G anti dengue, apus tebal sitokimia, dan TNF α . Variabel terikat dalam penelitian ini adalah memberatnya DBD. Subjek dalam penelitian ini adalah pasien demam berdarah dengue. Populasi terjangkau adalah pasien demam berdarah dengue yang masuk Instalasi Rawat Inap Departemen Penyakit Dalam RSPAD Gatot Soebroto pada periode 2012- 2014 dari bulan Januari 2012 – Desember 2014. Semua subjek diberikan penjelasan mengenai profil penelitian dan kerahasiaan data yang akan diberikan. Subjek yang memenuhi kriteria inklusi akan dijadikan subyek penelitian dan dimintakan *informed consent* yang harus ditandatangani. Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan dari *Medical and Health Research Ethics Committee* (MHREC) Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan No Ref : KE/FK/719/EC.

Semua subjek yang masuk penelitian dilakukan: 1) seleksi untuk penelitian; 2) kemudian mencatat baseline data (umur, status gizi, lama sakit, pemeriksaan laboratorium, dan pemeriksaan penunjang lain); 3) diambil darah sebanyak 5cc untuk disimpan dalam bentuk serum; 4) pasien akan diikuti untuk menilai apakah memberat atau tidak; 5) pasien yang memberat akan diperiksa Antibodi NS1; dan 6) kemudian dilakukan random dari pasien yang tidak memberat untuk pemeriksaan darah dengan urutan sebagai berikut:

B. Kriteria Inklusi, Kriteria Eksklusi dan Kriteria Drop out

- a. Kriteria Inklusi penelitian
- b. Usia lebih dari > 10 thn (Harris E, AJTMH,63(1,2),2000)
- c. Penderita demam kurang dari hari ke 5 demam.
- d. Penderita yang secara klinis dan laboratoris merupakan demam berdarah dengue derajat I dan II berdasarkan kriteria WHO 1997 yaitu:

1. Kriteria Klinis

- Demam tinggi mendadak, tanpa sebab jelas, berlangsung terus menerus selama 2-7 hari
- Terdapat manifestasi pendarahan ditandai dengan:
 - Uji Rumpel Leede / RL/ tourniquet positif
 - *Petechiae*, ekimosis, purpura perdarahan mukosa, epistaksis, perdarahan gusi, hematemesis dan atau melena.
- Pembesaran hati (hepatomegali)

2. Kriteria Laboratoris

- Trombositopenia.
- Hemokonsentrasi, dapat dilihat dari peningkatan hematokrit 20% atau lebih, menurut standar umur dan jenis kelamin, atau penurunan hematokrit 20 % sesudah terapi cairan.
- Pasien dengan Ig M anti dengue dan atau Ig G anti dengue positif yang diperiksa pada hari ke enam perawatan di ruang perawatan.

1. Kriteria Eksklusi Penelitian Kohort

Memiliki riwayat penyakit lain yang bersifat imununocompromise seperti diabetes, *acquired immunodeficiency syndrome*, penyakit kelainan darah, kanker dan penyakit jantung.

2. Kriteria *Drop Out*

Kriteria *Drop Out* adalah pasien yang tidak bersedia melanjutkan dalam

penelitian

2. Kriteria inklusi desain *nested case control*:

a. Kriteria inklusi kasus

Pasien penelitian kohort yang dalam perjalanan penyakitnya mengalami pemberatan DBD Derajat III. Kriteria tersebut ditandai secara klinis dengan adanya tekanan darah sistolik < 90 mm Hg, tekanan nadi < 20 mm Hg dan didukung adanya kulit lembab dan dingin (ekstremitas). Kriteria DSS selain kriteria DBD Derajat III ditambah dengan nadi tidak teraba dan TD tidak terukur.

b. Kriteria eksklusi kasus

Sama kriteria eksklusi penelitian kohort

c. Kriteria inklusi kontrol

Pasien yang memenuhi kriteria sebagaimana disebutkan pada kriteria inklusi penelitian kohort yang dalam perjalanan penyakitnya tidak mengalami DBD Derajat III/DSS.

d. Kriteria eksklusi kontrol

Sama dengan eksklusi penelitian kohort.

C. Kerangka Sampel

1. Cara Pengambilan Sampel

Untuk desain kohort, metode sampling yang digunakan konsekuatif sampling. Untuk desain *nested case control*, metode sampling untuk kelompok kasus dilakukan secara random. Untuk kelompok kontrol

metode sampling dilakukan secara random dengan menggunakan perangkat lunak *Win Pepi versi 11.28*

2. Perhitungan besar sampel

a) Perhitungan besar sampel untuk penelitian kohort (Ganti Roman)

Variabel bebas yang diteliti sebanyak 10 variabel. Insidensi DBD Derajat III DSS di RSPAD GS berdasarkan data audit DBD tahun 2009 sebanyak 298 pasien sebesar 18 %. Besar sampel untuk penelitian kohort adalah $10 \times \text{variabel bebas} / \text{insiden} = 10 \times 10 / 0,18 = 556$ pasien

b) Perhitungan besar sampel untuk nested case control (Ganti Roman)

Perhitungan besar sampel untuk penelitian *case control* dengan keluaran perbandingan proporsi

1. Keluaran IgM antiNS1

$$n = \left(\frac{Z_{\alpha} \sqrt{2PQ} + Z_{\beta} \sqrt{P_1Q_1 + P_2Q_2}}{P_1 - P_2} \right)^2$$

n = Jumlah subjek perkelompok

α = Tingkat kesalahan tipe I=0,05

$Z_{\alpha/2}$ = 1,96

β = Tingkat kesalahan tipe II=0,20

Z_{β} = 0,842

P_1 = Proporsi IgM anti NS1 positif dari kelompok kasus. Karena belum ada penelitian sebelumnya, peneliti menduga proporsinya sebesar 0,1.

$$Q_1 = 1 - P_1 = 1 - 0,1 = 0,9$$

P_2 = Proporsi IgM anti NS1 positif dari kelompok kontrol. Karena perbedaan proporsi minimal yang dianggap bermakna ditetapkan oleh peneliti sebesar 0,25 dan proporsi pada kontrol lebih tinggi daripada kasus, maka $P_2 = 0,10 + 0,25 = 0,35$.

$$Q_2 = 1 - P_2 = 1 - 0,35 = 0,65$$

$$P = (P_1 + P_2) / 2 = (0,10 + 0,35) / 2 = 0,225$$

$$Q = 1 - P = 1 - 0,225 = 0,775$$

$$n = \left(\frac{1,96 \sqrt{2 \times 0,225 \times 0,775} + 0,842 \sqrt{0,1 \times 0,9 + 0,35 \times 0,65}}{0,25} \right)^2 = 43$$

2. Keluaran IgG antiNS1

$$n = \left(\frac{Z_{\alpha} \sqrt{2PQ} + Z_{\beta} \sqrt{P_1Q_1 + P_2Q_2}}{P_1 - P_2} \right)^2$$

n = Jumlah subjek perkelompok

α = Tingkat kesalahan tipe I = 0,05

$$Z_{\alpha/2} = 1,96$$

β = Tingkat kesalahan tipe II = 0,20

$$Z_{\beta} = 0,842$$

P_1 = Proporsi IgG antiNS1 positif dari kelompok kasus. Karena belum ada penelitian sebelumnya, peneliti menduga proporsinya sebesar 0,3.

$$Q_1 = 1 - P_1 = 1 - 0,3 = 0,7$$

P_2 = proporsi IgG antiNS1 positif dari kelompok kontrol. Karena perbedaan proporsi minimal yang dianggap bermakna ditetapkan oleh peneliti sebesar 0,30 dan proporsi pada kontrol lebih tinggi daripada kasus, maka $P_2 = 0,30 + 0,30 = 0,60$.

$$Q_2 = 1 - P_2 = 1 - 0,60 = 0,40$$

$$P = (P_1 + P_2) / 2 = (0,30 + 0,60) / 2 = 0,45$$

$$Q = 1 - P = 1 - 0,45 = 0,55$$

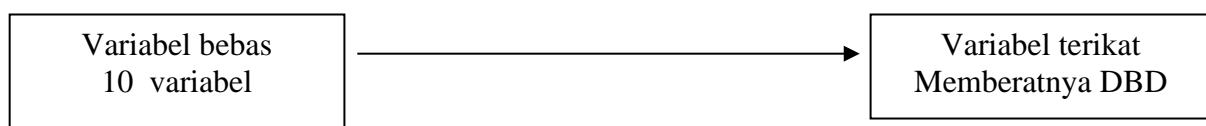
$$n = \left(\frac{1,96 \sqrt{2 \times 0,45 \times 0,55} + 0,842 \sqrt{0,3 \times 0,7 + 0,60 \times 0,40}}{0,25} \right)^2 = 42$$

3. Kesimpulan nested case control

Penelitian memerlukan 43 kasus dan 43 kontrol.

D. Variabel-variabel penelitian

1. Identifikasi Variabel



Tabel 2. Variabel, definisi operasional dan skala pengukurannya

No .	Konsep Variabel	Waktu pengambilan (hari perawatan)	Definisi Operasional	Variabel dan Skala Pengukurannya
1.	Lama Sakit		Lama sakit adalah waktu pasien datang kerumah sakit pada waktu: (a) hari ke 1-3; (b) hari ke 4-6	Kategorik
2.	Hematokrit	Hari 1, 3,6	Peningkatan Hematokrit merupakan indikator adanya proses hemokonsentrasi yang dalam perjalann klinisnya menunjukkan adanya perembesan plasma.	Kategorik Berisiko Tidak berisiko
3.	Leukosit	Hari 1,3,6	Leukosit adalah target awal proses patogenenesis DBD. Infeksi virus pada tahap awal akan menyerang monosit dalam fase aferen yang akan menyebabkan terjadinya leukopenia.	Kategorik 1. Berisiko 2. Tidak berisiko

No .	Konsep Variabel	Waktu pengambilan (hari perawatan)	Definisi Operasional	Variabel dan Skala Pengukurannya
4.	Trombositopenia	Hari 1,3,6	<p>Penurunan jumlah trombosit pada umumnya terjadi sebelum ada peningkatan hematokrit dan terjadi sebelum suhu turun</p> <p>Pemeriksaan trombosit dibawah 50.000 menunjukkan adanya trombositopenia yang dari penelitian sebelumnya merupakan prediktor memberatnya DBD</p> <p>Pemeriksaan trombosit dibawah 100.000 menunjukkan adanya trombositopenia yang dalam penelitian EDEN dibawah 143.000 digunakan sebagai salah satu algoritma penilaian memberatnya DBD</p>	<p>Kategorik</p> <p>1. 50.000 - 100.00</p> <p>2. > 100.000</p> <p>Hasil Trombosit positif jika didapatkan nilai trombosit dibawah 50.000</p> <p>Hasil Trombosit positif jika didapatkan nilai trombosit dibawah 100.000</p>
5.	Pendarahan Kulit		Petechiae Echimosis Purpura	Kategorik Ya Tidak

No .	Konsep Variabel	Waktu pengambilan (hari perawatan)	Definisi Operasional	Variabel dan Skala Pengukurannya
6	Albumin	Hari 1,6	Albumin dapat menurun dan bersifat sementara. Klasifikasi albumin ke dalam berisiko dan tidak berisiko.	Kategorik Berisiko Tidak berisiko
7	Antibodi NS 1	Hari 1	Pemeriksaan Antibodi NS1 sebagai prediktor DBD mengalami reaksi silang dengan protein pembekuan darah, protein integrin/adhesi, trombosit dan sel endotel. Nilai dari Titer Antibodi NS1	Numerik
8	Ig M dan atau Ig G Anti Dengue	Hari 6	Pemeriksaan Ig M dan Ig G anti Dengue merupakan pemeriksaan antibodi terhadap Dengue untuk menunjukkan infeksi primer dan sekunder dari	Kategorik 1. Infeksi Primer 2. Infeksi Sekunder
9	TNF α	Hari 1	Pemeriksaan TNF α untuk menunjukkan proses inflamasi pada DBD sebagai paramater menilai proses memberatnya DBD	Kategorik 1. Positif 2. Negatif

No .	Konsep Variabel	Waktu pengambilan (hari perawatan)	Definisi Operasional	Variabel dan Skala Pengukurannya
10	Apus Tebal Sitokimia	Hari 1-3 Hari 4-5	Positif : Sitoplasma leukosit berwarna coklat Negatif : Sitoplasma leukosit berwarna biru	Kategori 1. Positif 2. Negatif

E. Definisi operasional variabel penelitian

Pasien Demam Berdarah Dengue adalah pasien yang masuk melalui Unit Gawat Darurat dengan infeksi virus dengue dan perjalanan klinis di unit rawat inap sebagai demam berdarah dengue. Parameter pemeriksaan klinis dan laboratorium untuk menegakkan diagnostik Demam Berdarah Dengue yaitu dengan didapatkan adanya Ig M dan atau Ig G Anti Dengue. Kemudian dilakukan skrining prediktor untuk beberapa parameter dan mengikuti kriteria DBD WHO 2009.

Pasien Demam Berdarah Dengue Memberat adalah yang menjalani perawatan dan mengalami perburukan dalam perjalanan klinisnya yaitu mengalami DBD derajat III (tekanan darah sistolik <90 mm Hg, tekanan nadi <20 mm Hg dan didapatkan akral dingin) dan DSS yaitu kriteria DBD Derajat III ditambah dengan nadi tidak teraba dan TD tidak terukur, masuk dalam kriteria untuk penelitian dalam kaitannya pemeriksaan Antibodi NS1.

F. Analisis Data

Setelah dikumpulkan, data diverifikasi, diedit dan dikoding kemudian dianalisis menggunakan program perangkat lunak *epicalc 2000*. Ditentukan terlebih dahulu distribusi data untuk memastikan uji statistik yang akan dipergunakan. Data yang telah diolah akan dianalisis secara analitiik dengan uji kemaknaan yang sesuai.

1. Uji statistik penelitian ini adalah (Kok 12)

a. Pertanyaan utama no 1

Perbandingan kadar antibodi NS1 diantara pasien DBD yang memberat dan tidak memberat diuji dengan uji t tidak berpasangan dengan alternatif Uji Mann-Whitney.

b. Pertanyaan utama no 2

Korelasi kadar NS1 (awal masuk perawatan) dengan kadar trombosit (awal perawatan) akan diuji dengan uji korelasi Pearson dengan alternatif uji Spearman.

c. Pertanyaan tambahan no 1

Hubungan antara variabel bebas dengan skala kategorik (Status Gizi, Lama Sakit, Hepatomegali, Hematokrit, Leukosit, Trombositopenia, Pendarahan, Albumin, Ig M dan Ig G Anti Dengue.) dengan memberatnya DBD akan diuji dengan uji Chi-Square disertai nilai risiko relatif (RR) dan interval kepercayaan 95%.

Hubungan antara variabel bebas dengan skala numerik (Umur, Antibodi NS1) dengan memberatnya DBD akan diuji dengan uji t tidak berpasangan dengan alternatif Uji Mann-Whitney.

Variabel yang pada analisis bivariat mempunyai nilai p kurang dari 0,25 akan dimasukkan ke dalam analisis multivariat.

2. Analisis multivariat

Analisis multivariat yang digunakan adalah regresi logistik model prediksi. Model prediksi akan dicari dengan menggunakan backward stepwise. Model prediksi akan dikonversi ke dalam sistem skoring.

3. Analisis bivariat

Analisis bivariat digunakan untuk mencari hubungan antara variabel bebas dengan skala kategorik (Status Gizi, Lama Sakit, Hepatomegali, Hematokrit, Leukosit Trombositopenia, Pendarahan, Albumin, Ig M dan Ig G Anti Dengue) dengan memberatnya DBD akan diuji dengan uji Chi-Square disertai nilai odds rasio (OR) dan interval kepercayaan 95%.

Hubungan antara variabel bebas dengan skala numerik (Umur, Antibodi NS1) dengan memberatnya DBD akan diuji dengan uji t tidak berpasangan dengan alternatif Uji Mann-Whitney.

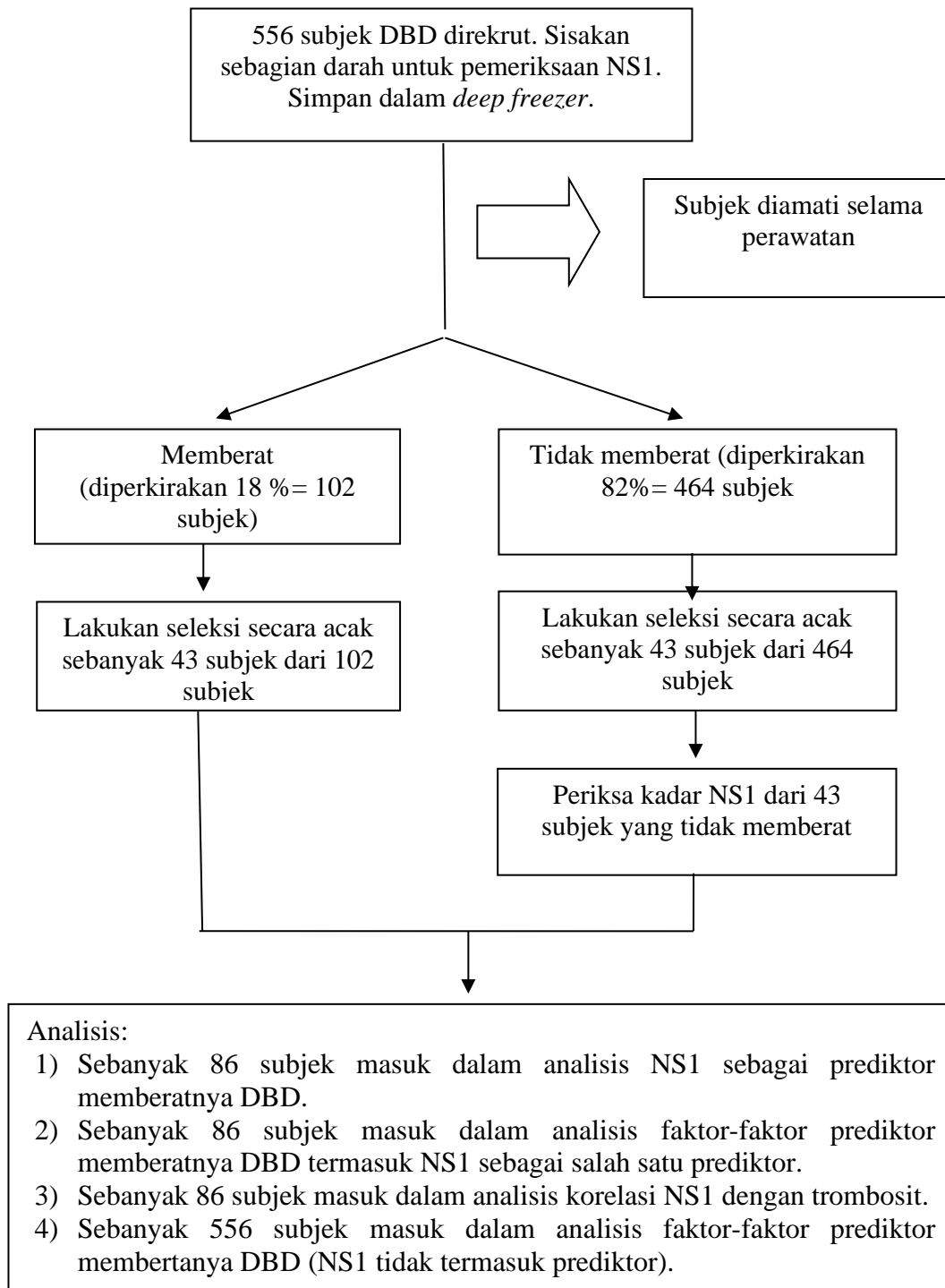
Variabel yang pada analisis bivariat mempunyai nilai p kurang dari 0,25 akan dimasukkan ke dalam analisis multivariat.

Analisis multivariat yang digunakan adalah regresi logistik model prediksi. Model prediksi akan dicari dengan menggunakan *backward stepwise*. Model prediksi akan dikonversi ke dalam sistem skoring.

G. Bagan Alur Penelitian

Semua subyek yang masuk penelitian dilakukan: 1) seleksi untuk penelitian; 2) kemudian mencatat baseline data (umur, status gizi, lama sakit, pemeriksaan laboratorium, dan pemeriksaan penunjang lain); 3) diambil darah sebanyak 5cc untuk disimpan dalam bentuk serum; 4) pasien akan diikuti untuk menilai apakah memberat atau tidak; 5) pasien yang memberat akan diperiksa Antibodi NS1; dan 6) kemudian dilakukan

random dari pasien yang tidak memberat untuk pemeriksaan darah dengan urutan sebagai berikut:



H. Deteksi anti-NS1 VD dengan teknik ELISA (Andhika, 2009)

a. Reagensia yang dibutuhkan adalah sebagai berikut:

- 1) Dapar pelapis: 0,1 M Na₂CO₃ dan 0,1 M NaHCO₃ dalam NaCl 0,9%, pH 9,5.
- 2) Dapar Blocking, PBS-BSA 1% : Phosphate buffered saline 10x (Gibco 04204080, Jerman) diencerkan dalam akuades rasio 1:10. pH dikoreksi hingga 7,2. BSA ditambahkan dengan konsentrasi 1%.
- 3) Dapar pencuci (PBST) : PBS- berisi 0,1% Tween-20.

b. Prosedur

Teknik ELISA untuk deteksi anti-NS1 ini merupakan modifikasi teknik Alcon dkk (2002) dan Shu dkk. (2000).

- 1) Ke dalam tiap sumur dimasukkan 50 µL protein NS1 VD (5 µg/ml; Prospect Tany Techno Gene, Israel) yang telah diencerkan 20 kali dalam 1000 µL dapar pelapis.
- 2) Mikroplat ditutup dan disimpan pada suhu 4°C semalaman.
- 3) Keesokan hari, dapar pelapis dibuang dan mikroplat dicuci dengan 200 µL PBST sebanyak 4 kali.
- 4) Cairan di dalam sumur dibuang dengan cara mengetuk-ngetukan mikroplat secara terbalik berulang kali pada kertas tisu. Lalu ditambahkan 200 µL dapar blocking.
- 5) Mikroplat disimpan selama 1 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya dicuci sebanyak 4 kali dengan PBST.
- 6) Kontrol dan serum yang akan diperiksa diencerkan dalam dapar blocking dengan perbandingan 1:50, kemudian dimasukkan ke dalam sumur mikroplat dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.

- 7) Setelah dicuci sebanyak 4 kali dengan PBST, ke dalam tiap sumur dimasukkan 50 μ L goat anti human IgG yang telah dilarutkan dalam dapar blocking (perbandingan 1:10.000).
- 8) Mikroplat kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 1 jam.
- 9) Setelah dicuci sebanyak 4 kali dengan PBST, ke dalam tiap sumur dimasukkan 100 μ L substrat. Setelah inkubasi di ruang gelap suhu 37°C selama 1 jam, reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 μ l H₂SO₄ 2,5 N
- 10) Densitas optik dari warna yang terbentuk dibaca dengan microplate reader pada panjang gelombang 405 nm dan 630 nm.

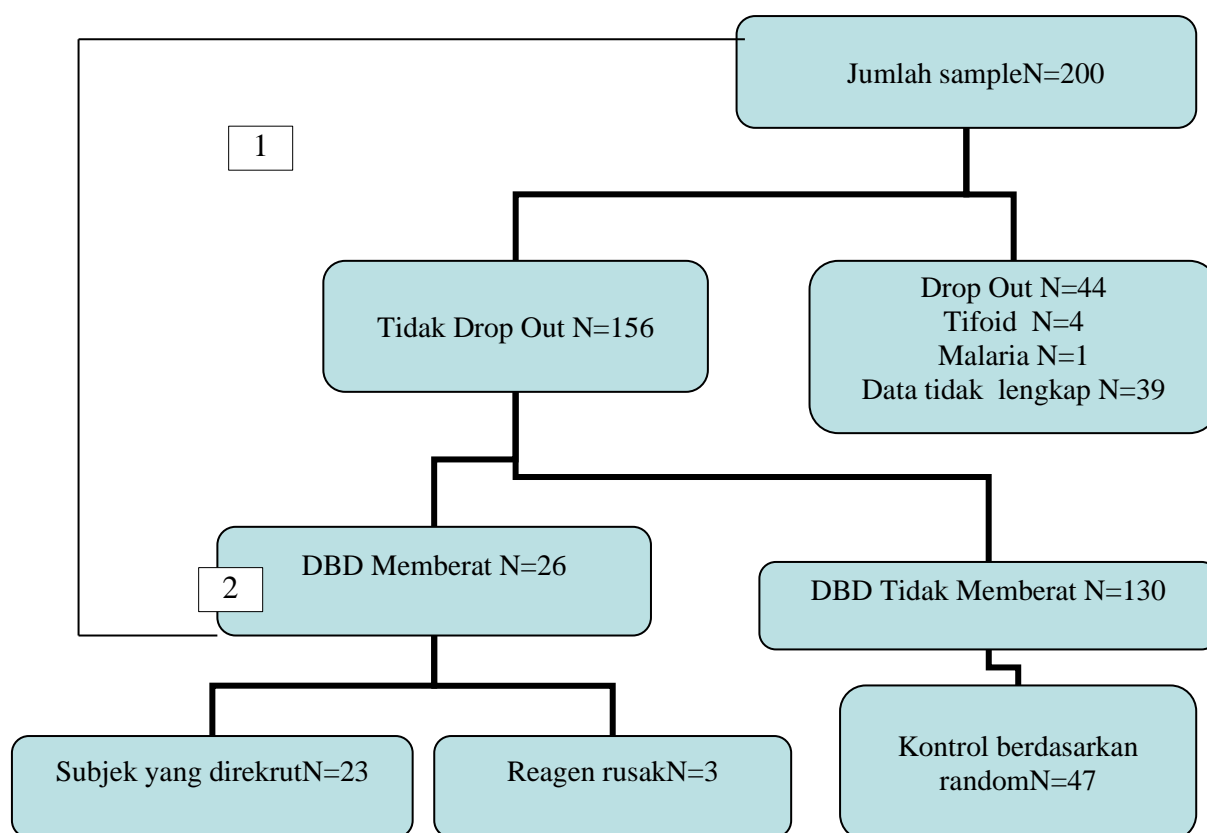
I. Tempat Pemeriksaan Laboratorium

Pemeriksaan laboratorium dilakukan di dua tempat yaitu di Laboratorium Patologi Klinik RSPAD Gatot Soebroto untuk pemeriksaan darah lengkap dan pemeriksaan tambahan klinik lainnya dan pemeriksaan pemeriksaan Antibodi NS1 metode ELISA yang dilakukan di Laboratorium Parasitologi FK UGM

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Karakteristik subjek penelitian

Dalam periode penelitian dari bulan Januari 2012 – Desember 2014 di Ruang Perawatan Umum Departemen Penyakit Dalam RSPAD Gatot Soebroto terdapat 156 pasien yang memenuhi kriteria inklusi penelitian. Dari sejumlah 156 pasien infeksi dengue, 101 pasien pria (64,7%) dengan 55 (35,5%) pasien wanita. Rentang usia 14 sampai dengan 62 tahun dengan rerata $28,73 \pm 10,09$ tahun.



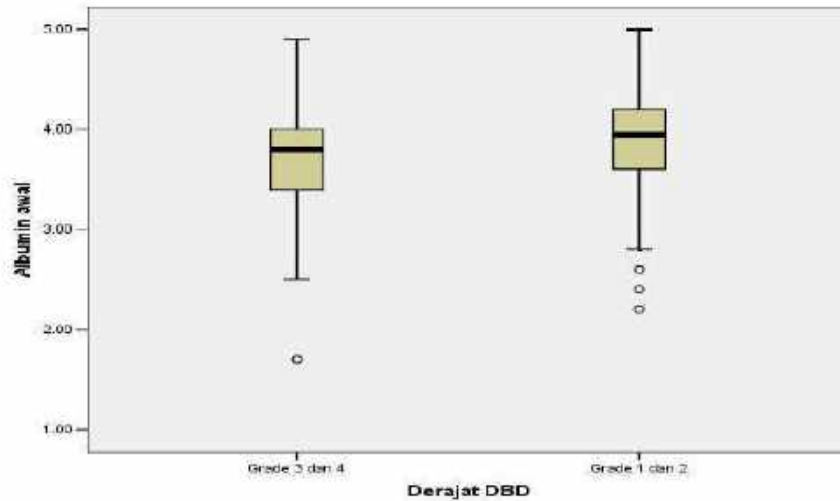
Gambar 10 : Flow Penelitian

Keterangan:

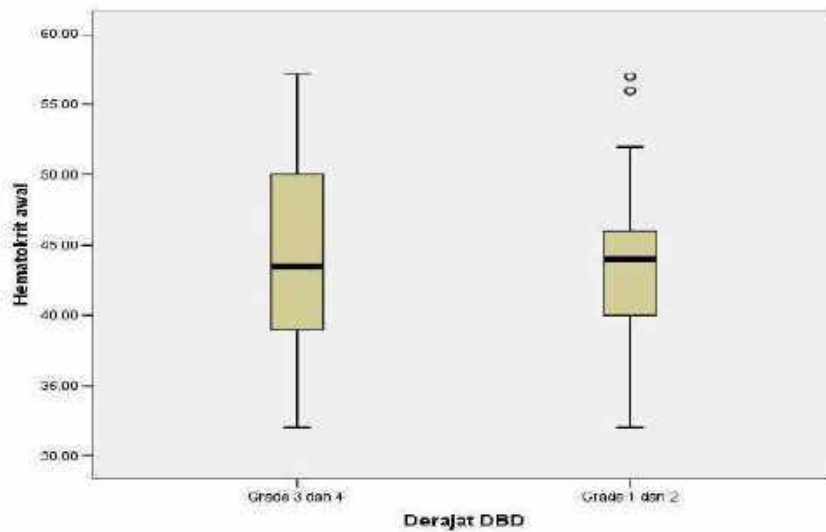
1. Penelitian *Kohort*
2. Penelitian *Nested Case Control*

Jenis infeksi sekunder lebih banyak dibandingkan infeksi primer. Pada DBD dengan IgM dan Ig G Anti Dengue positif didapatkan 22 pasien (16,9%) DBD Derajat I-II dan 9 pasien (34,5 %) DBD Derajat III-IV. Pada katagori IgM anti dengue (-) dan Ig G anti Dengue (+) didapatkan 49 pasien (37,7%) dengan DBD Derajat I-II dan 11 pasien (42,3%) DBD Derajat III-IV. Secara sistematis data yang diuraikan diatas, penderita Laki 87 (86,1%) pada DBD Derajat I dan 14 (13,9%) pada DBD Derajat III, lebih banyak dibandingkan penderita perempuan 43 (78,2%) pada DBD Derajat I dan 12 (21,8%) pada DBD Derajat III dengan rentang usia rata rata $28,73 \pm 10,09$ tahun.

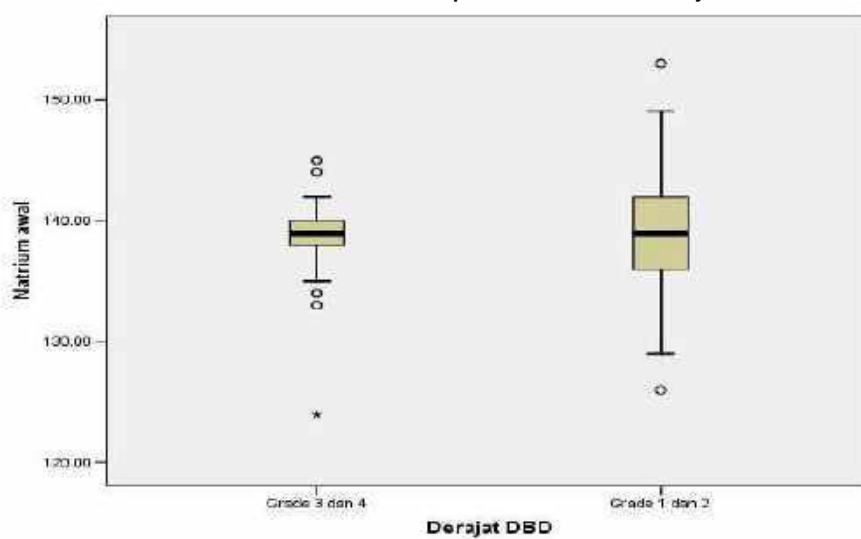
Gejala dan tanda yang paling menonjol pada penderita DBD Derajat I adalah Sakit kepala (82,0%), Mual dan Muntah (81,6%), Nafsu makan menurun (70,4%), Nyeri sendi (83,5%), Nyeri retroorbital (81,4%). Pada DBD Derajat III didapatkan Sakit kepala (18,0%), Mual dan Muntah (18,4%), Nafsu makan menurun (29,6%), Nyeri sendi (16,5 %) dan nyeri retroorbital (18,6%). Petekiae DBD Derajat I (69,2%) dan DBD Derajat III (30,8%). Penderita yang sebelumnya sudah menderita Demam Berdarah pada DBD Derajat I sebanyak 26 pasien (86,7%) dan 4 pasien (13,3%) DBD Derajat III. Penderita yang belum menderita Demam Berdarah, DBD Derajat I sebanyak 39 pasien (76,9%) dan sebanyak 10 pasien (20,4%) DBD Grade III.



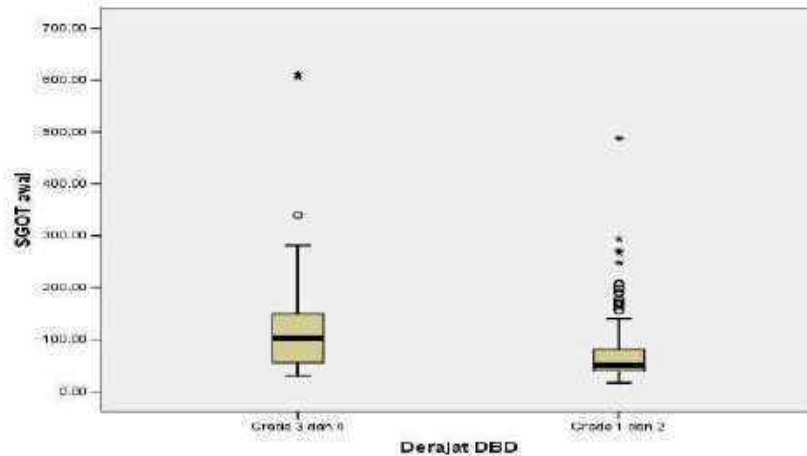
Gambar 11: Perbedaan kadar albumin pada DBD Derajat I dan DBD Derajat III



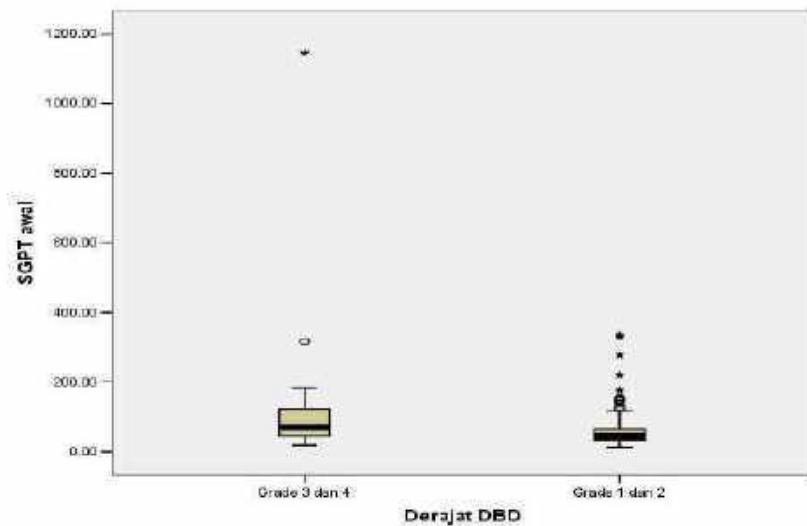
Gambar 12 : Perbedaan kadar hematokrit pada DBD Derajat I dan DBD Derajat III



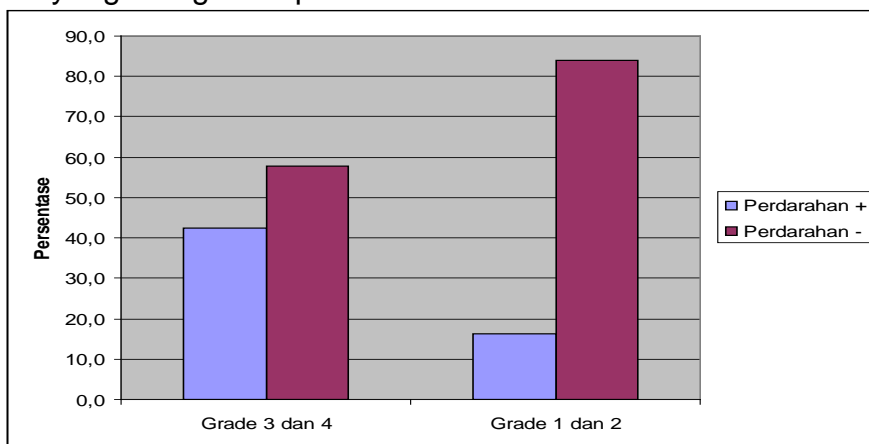
Gambar 13 :Perbedaan kadar elektrolit Natrium DBD Derajat I dan DBD Derajat III yang mengalami pemberatan



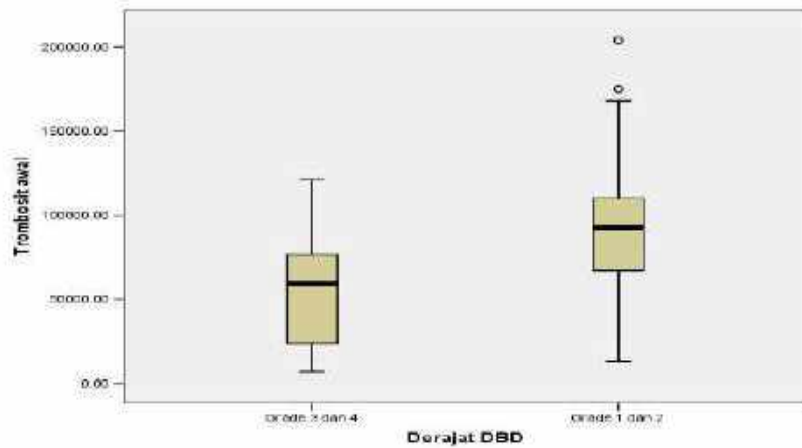
Gambar 14 :Perbedaan Karakteristik Penderita Infeksi Dengue DBD Derajat I dan DBD Derajat III yang mengalami pemberatan berdasarkan SGOT awal



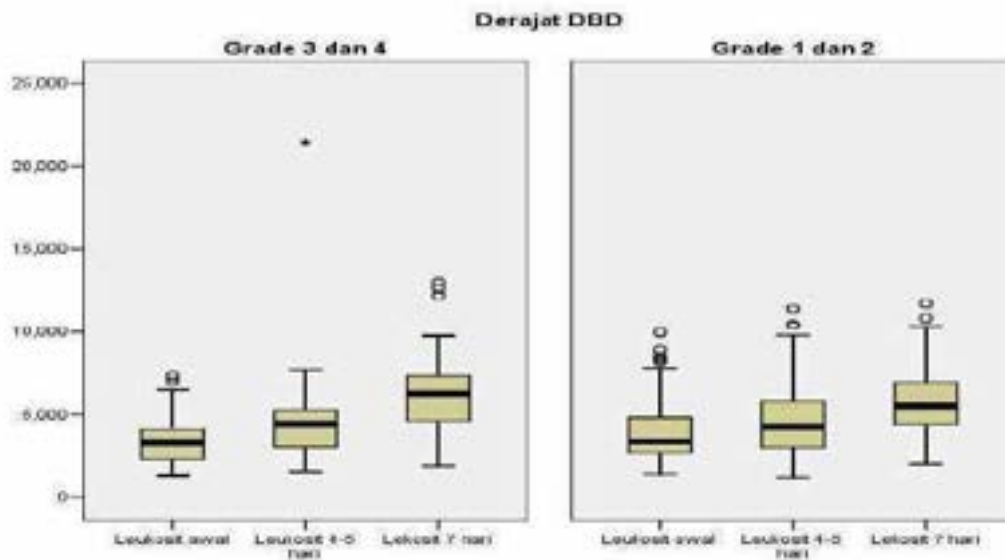
Gambar 15: Perbedaan Kadar SGPT Penderita DBD Derajat I dan DBD Derajat III yang mengalami pemberatan



Gambar 16: Karakteristik *Petechiace* diantara pasien DBD Derajat I dan DBD Derajat III



Gambar 17 : Karakteristik Jumlah Trombosit Infeksi Dengue DBD Derajat I dengan DBD Derajat III yang mengalami pemberatan



Gambar 18: Gambaran Leukosit pada DBD Derajat I dan DBD Derajat III yang mengalami pemberatan

B. Karakteristik Antibodi NS1 dan TNF α

Karakteristik Antibodi NS1 dan TNF α dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 3. Hubungan IgG Anti NS1, IgM anti NS1, dan TNF α dengan status DBD

		Kasus		Kontrol		Nilai p	OR	IK95%	
		N	%	n	%			Min	Mak
IgG Anti NS1	+	3	13,0	16	34,0	0,117	0,29	0,07	1,13
	-	20	87,0	31	66,0		Ref		
IgM anti NS1	+	7	30,4	37	78,7	<0,001	0,12	0,04	0,37
	-	16	69,6	10	21,3		Ref		
TNF α	+	7	31,8	10	22,2	0,583	1,63	0,52	5,10
	-	15	68,2	35	77,8		Ref		

Uji Chi square

Proporsi Ig M Anti NS1 (+) lebih banyak pada kelompok kontrol (DBD Derajat I) sebesar 78,7% dibandingkan kelompok kasus (DBD Derajat III/DSS) sebesar 30,4% ($p < 0,001$, OR 0,12). Sedangkan Proporsi Ig M Anti NS1 (-) lebih banyak pada kelompok kasus 69,6% dibandingkan kelompok kontrol sebesar kontrol sebesar 21,3%. Proporsi Ig G Anti NS1 (+) didapatkan pada kelompok kasus sebesar 13% dan kelompok kontrol 34,0%. Proporsi Ig G Anti NS1 (-) didapatkan pada kelompok kasus sebesar 87,0% dan kelompok kontrol 66,0%. Proporsi Ig G Anti NS1 (-) sebagai paparan (+) pada kelompok kasus 87,7% dan kelompok kontrol 66,0% ($p 0,117$ OR 3,44) Proporsi TNF α (+) lebih banyak kelompok kasus (DBD Derajat III/DSS) sebesar 31,8% dibandingkan dengan kontrol sebesar 22,2%, sedangkan proporsi TNF α (-) lebih banyak pada kelompok kontrol (DBD I) sebesar 77,8% dibandingkan dengan kelompok kasus (sebesar 68,2%).

Tabel 4: Hubungan IgM anti NS1 dengan lama demam, leukosit, trombosit, jenis infeksi, albumin, natrium, dan kalium

Variabel			IgM anti NS1				Nilai p	OR	IK95%	
			+		-				Min	Mak
			n	%	n	%				
Keseluruhan	Demam	4-5 hari	24	60,0	16	40,0	0,748 ^a	0,75	0,28	2,01
		1-3 hari	20	66,7	10	33,3		Ref		
	Leukosit	<4,500	31	59,6	21	40,4	0,502 ^a	0,57	0,18	1,83
		>4.500	13	72,2	5	27,8		Ref		
	Trombosit awal	<50.000	10	50,0	10	50,0	0,257 ^a	0,47	0,16	1,36
		>50.000	34	68,0	16	32,0		Ref		
	Jenis infeksi	Primer	6	100,0	0	0,0	0,063 ^b	-	-	-
		Sekunder	27	61,4	17	38,6	0,837 ^a	1,30	0,45	3,79
		Dengue	11	55,0	9	45,0		Ref		
	Albumin	<3,6	10,0	52,6	9	47,4	0,422 ^a	0,56	0,19	1,62
		>3,6	34,0	66,7	17	33,3		Ref		
	Natrium	<135	8,0	80,0	2	20,0	0,391 ^a	2,67	0,52	13,66
		>135	36,0	60,0	24	40,0		Ref		
	Kalium	<3,8	31,0	67,4	15	32,6	0,535 ^a	1,59	0,57	4,45
		>3,8	13,0	56,5	10	43,5		Ref		
Kasus	Demam	4-5 hari	3	23,1	10	76,9	0,65 ^b	0,45	0,07	2,74
		1-3 hari	4	40,0	6	60,0		Ref		
	Leukosit	<4,500	6	28,6	15	71,4	0,526 ^b	0,4	0,02	7,48
		>4.500	1	50,0	1	50,0		Ref		
	Trombosit awal	<50.000	3	27,3	8	72,7	1,000 ^b	0,75	0,13	4,49
		>50.000	4	33,3	8	66,7		Ref		
	Jenis infeksi	Primer	0	0,0	0	0,0	-	-	-	-
		Sekunder	6	33,3	12	66,7	1,000 ^b	2,00	0,18	22,06
		Dengue	1	20,0	4	80,0		Ref		
	Albumin	<3,6	3	37,5	5	62,5	0,657 ^b	1,65	0,26	10,31
		>3,6	4	26,7	11	73,3		Ref		
	Natrium	<135	2	50,0	2	50,0	0,557 ^b	2,8	0,31	25,52
		>135	5	26,3	14	73,7		Ref		
	Kalium	<3,8	7	41,2	10	58,8	0,124 ^b	-	-	-
		>3,8	0	0,0	6	100,0				
Kontrol	Demam	4-5 hari	21	77,8	6	22,2	1,000 ^b	0,88	0,21	3,63
		1-3 hari	16	80,0	4	20		Ref		
	Leukosit	<4,500	25	80,6	6	19,4	0,716 ^b	1,39	0,33	5,86
		>4.500	12	75,0	4	25		Ref		
	Trombosit awal	<50.000	7	77,8	2	22,2	1,000 ^b	0,93	0,16	5,39
		>50.000	30	78,9	8	21,1		Ref		
	Jenis infeksi	Primer	6	100,0	0	0,0	0,262 ^b	-	-	-
		Sekunder	21	80,8	5	19,2	0,453 ^b	2,1	0,49	8,96
		Dengue	10	66,7	5	33,3		Ref		

Variabel			IgM anti NS1				Nilai p	OR	IK95%	
			+		-				Min	Mak
			n	%	n	%				
Albumin	<3,6		7	63,6	4	36,4	0,213 ^b	0,35	0,08	1,58
	>3,6		30	83,3	6	16,7		Ref		
Natrium	<135		6	100,0	0	0,0	0,317 ^b	-	-	-
	>135		31	75,6	10	24,4				
Kalium	<3,8		24	82,8	5	17,2	0,707 ^b	1,48	0,34	6,47
	>3,8		13	76,5	4	23,5		Ref		

Uji Chi-square; ^b Uji Fisher

Tabel 5. Hubungan IgG anti NS1 dengan lama demam, lekosit, trombosit, jenis infeksi, albumin, natrium, dan kalium

Variabel			IgG anti NS1				Nilai p	OR	IK95%	
			+		-				Min	Mak
			n	%	N	%				
Keseluruhan	Demam	4-5 hari	13	32,5	27	67,5	0,372 ^a	1,93	0,63	5,86
		1-3 hari	6	20,0	24	80,0		Ref		
	Leukosit awal	<4,500	17	32,7	35	67,3	0,123 ^b	3,89	0,80	18,87
		>4.500	2	11,1	16	88,9		Ref		
	Trombosit awal	<50.000	6	30,0	14	70,0	0,966 ^a	1,22	0,39	3,84
		>50.000	13	26,0	37	74,0		Ref		
	Jenis infeksi	Primer	3	50,0	3	50,0	0,644 ^b	1,86	0,29	11,76
		Sekunder	9	20,5	35	79,5	0,350 ^a	0,48	0,15	1,55
		Dengue	7	35,0	13	65,0		Ref		
	Albumin	<3,6	4,0	21,1	15	78,9	0,691 ^a	0,64	0,18	2,25
		>3,6	15,0	29,4	36	70,6		Ref		
	Natrium	<135	2,0	20,0	8	80,0	0,869 ^a	0,63	0,12	3,29
		>135	17,0	28,3	43	71,7		Ref		
	Kalium	<3,8	12,0	26,1	34	73,9	0,924 ^a	0,81	0,27	2,44
		>3,8	7,0	30,4	16	69,6		Ref		
Kasus	Demam	4-5 hari	2	15,4	11	84,6	1,000 ^b	1,64	0,13	21,1
		1-3 hari	1	10,0	9	90,0		Ref		
	Leukosit awal	<4,500	3	14,3	18	85,7	1,000 ^b	-	-	-
		>4.500	0	0,0	2	100,0				
	Trombosit awal	<50.000	2	18,2	9	81,8	0,590 ^a	2,44	0,19	31,53
		>50.000	1	8,3	11	91,7		Ref		
	Jenis infeksi	Primer	0	0,0	0	0,0	-	-	-	-
		Sekunder	2	11,1	16	88,9	0,539 ^a	0,50	0,04	7,00
		Dengue	1	20	4	80,0		Ref		
	Albumin	<3,6	1	12,5	7	87,5	1,000 ^b	0,93	0,07	12,14
		>3,6	2	13,3	13	86,7		Ref		
	Natrium	<135	0	0,0	4	100,0	1,000 ^b	-	-	-
		>135	3	15,8	16	84,2				

Variabel			IgG anti NS1				Nilai p	OR	IK95%	
			+		-				Min	Mak
			n	%	N	%				
	Kalium	<3,8	1	5,9	16	94,1	0,155 ^b	0,13	0,01	1,75
		>3,8	2	33,3	4	66,7		Ref		
Kontrol	Demam	4-5 hari	11	40,7	16	59,3	0,415 ^a	2,06	0,58	7,35
		1-3 hari	5	25,0	15	75,0		Ref		
	Leukosit awal	<4.500	14	45,2	17	54,8	0,056 ^a	0,86	0,72	1,02
		>4.500	2	12,5	14	87,5		Ref		
	Trombosit awal	<50.000	4	44,4	5	55,6	0,466 ^a	1,73	0,39	7,63
		>50.000	12	31,6	26	68,4		Ref		
	Jenis infeksi	Primer	3	50,0	3	50,0	1,000 ^b	1,50	0,22	10,08
		Sekunder	7	26,9	19	73,1	0,492 ^a	0,55	0,14	2,13
		Dengue	6	40,0	9	60,0		Ref		
	Albumin	<3,6	3	27,3	8	72,7	0,725 ^b	0,66	0,15	2,95
		>3,6	13	36,1	23	63,9		Ref		
	Natrium	<135	2	33,3	4	66,7	1,000 ^b	0,96	0,16	5,93
		>135	14	34,1	27	65,9		Ref		
	Kalium	<3,8	11	37,9	18	62,1	0,791 ^a	1,47	0,41	5,30
		>3,8	5	29,4	12	70,6		Ref		

Chi-square; ^b Uji Fisher

Tabel 6 : Hubungan TNF α dengan lama demam, lekosit, trombosit, jenis infeksi,albumin, natrium, dan kalium.

Variabel			TNF α				Nilai p	OR	IK95%	
			+		-				Min	Mak
			n	%	n	%				
Keseluruhan	Demam	4-5 hari	11	32,4	23	67,6	0,501 ^a	1,75	0,55	5,56
		1-3 hari	6	21,4	22	78,6		Ref		
	Leukosit awal	<4.500	12	25,5	35	74,5	0,740 ^b	0,69	0,19	2,41
		>4.500	5	33,3	10	66,7		Ref		
	Trombosit awal	<50.000	6	35,3	11	64,7	0,524 ^b	1,69	0,51	5,62
		>50.000	11	24,4	34	75,6		Ref		
	Jenis infeksi	Primer	0	0,0	0	0,0	-	-	-	-
		Sekunder	13	30,2	30	69,8	0,661 ^a	1,63	0,45	5,85
		Dengue	4	21,1	15	78,9		Ref		
	Albumin	<3,6	5	25,0	15	75,0	1,000 ^a	0,97	0,29	3,25
		>3,6	12	25,5	35	74,5		Ref		
	Natrium	<135	4	36,4	7	63,6	0,591 ^a	1,89	0,48	7,48
		>135	13	23,2	43	76,8		Ref		
	Kalium	<3,8	8	17,0	39	83,0	0,066 ^a	0,28	0,09	0,92
		>3,8	8	42,1	11	57,9		Ref		
Kasus	Demam	4-5 hari	4	33,3	8	66,7	1,000 ^b	1,17	0,19	7,12
		1-3 hari	3	30,0	7	70,0		Ref		

Variabel			TNF α				Nilai p	OR	IK95%	
			+		-				Min	Mak
			n	%	n	%				
	Leukosit awal	<4,500	6	30,0	14	70,0	1,000 ^b	0,43	0,02	8,04
		>4.500	1	50,0	1	50,0		Ref		
	Trombosit awal	<50.000	3	30,0	7	70,0	1,000 ^b	0,86	0,14	5,23
		>50.000	4	33,3	8	66,7		Ref		
	Jenis infeksi	Primer	0	0,0	0	0,0	-	-	-	-
		Sekunder	6	33,3	12	66,7	1,000 ^b	1,5	0,13	17,67
		Dengue	1	25,0	3	75,0		Ref		
	Albumin	<3,6	4	50,0	4	50,0	0,343 ^b	3,67	0,56	24,13
		>3,6	3	21,4	11	78,6		Ref		
	Natrium	<135	3	75,0	1	25,0	0,077 ^b	10,50	0,84	130,66
		>135	4	22,2	14	77,8		Ref		
	Kalium	<3,8	5	29,4	12	70,6	1,000 ^b	0,63	0,08	4,96
		>3,8	2	40,0	3	60,0		Ref		
Kontrol	Demam	4-5 hari	7	31,8	15	68,2	0,464 ^b	2,33	0,51	10,78
		1-3 hari	3	16,7	15	83,3		Ref		
	Leukosit awal	<4.500	6	22,2	21	77,8	0,700 ^b	0,64	0,15	2,84
		>4.500	4	30,8	9	69,2		Ref		
	Trombosit awal	<50.000	3	42,9	4	57,1	0,338 ^b	2,79	0,5	15,46
		>50.000	7	21,2	26	78,8		Ref		
	Jenis infeksi	Primer	0	0,0	0	0,0	-	-	-	-
		Sekunder	7	28	18	72	0,715 ^b	1,56	0,33	7,24
		Dengue	3	20	12	80		Ref		
	Albumin	<3,6	1	8,3	11	91,7	0,246 ^b	0,24	0,03	2,16
		>3,6	9	27,3	24	72,7		Ref		
	Natrium	<135	1	14,3	6	85,7	1,000 ^b	0,54	0,06	5,07
		>135	9	23,7	29	76,3		Ref		
	Kalium	<3,8	3	10,0	27	90,0	0,019 ^b	0,15	0,03	0,73
		>3,8	6	42,9	8	57,1		Ref		

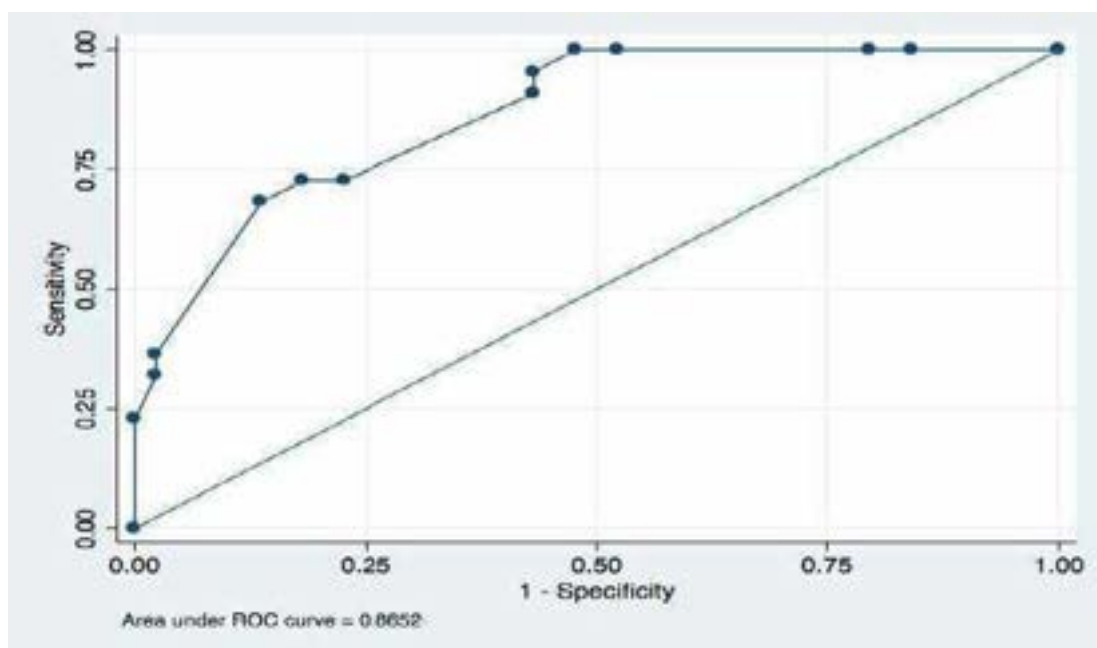
Tabel 3. Analisis multivariat variabel yang mempengaruhi memberatnya DBD

Variabel		Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
Leukosit	<4500	22,76 (2,30 – 225,43)	22,00 (2,36 – 205,21)	13,66 (1,67 – 111,68)	14,36 (1,77 – 116,40)
	≥4500	1	1	1	1
Trombosit	<50000	9,79 (1,45 – 66,32)	9,34 (1,57 – 55,55)	6,19 (1,13 – 33,89)	7,08 (1,43 – 35,08)
	≥50000	1	1	1	1
SGPT	≥40	0,89	-	1,40	-

Variabel		Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
		(0,17 – 4,63)		(0,29 – 6,58)	
	<40	1	-	1	-
IgM Anti NS1	Negatif	5,94 (1,48 – 23,83)	5,87 (1,48 – 23,27)	8,62 (2,28 – 32,62)	9,02 (2,41 – 33,73)
	Positif	1	1	1	1
IgG Anti NS1	Negatif	7,80 (1,00 – 60,99)	7,58 (1,01 – 56,89)	-	-
	Positif	1	1	-	-
	AIC	64,939	62,96	67,65	65,83
	BIC	78,077	73,91	78,60	74,59

Model terpilih adalah model 2 (memiliki nilai AIC dan BIC terendah).
 Persamaan logistik $y = -6,24 + 3,09 \cdot \text{Leukosit} + 2,23 \cdot \text{Trombosit} + 1,77 \cdot \text{IgM Anti NS1} + 2,03 \cdot \text{IgG Anti NS1}$; Nilai AUC(IK95%) 0,865 (0,781 - 0,950); dan Uji Hosmer and Lemeshow, $p=0,394$

Berdasarkan pertimbangan statistik dan klinis, peneliti memilih model 2 sebagai model prediksi. Model ini mempunyai nilai diskriminasi yang baik (AUC= 0,846 [IK95%0,754-0,938]) dan nilai kalibrasi yang baik (nilai p uji Hosmer and Lemeshow =0,0,394).



Gambar.19 : Grafik ROC. Nilai AUC(IK95%) 0,865 (0,781 – 0,950)

Persamaan logistik dapat digunakan untuk memprediksikan subjek mengalami DBD yang memberat. Hasil perhitungan probabilitas memberatnya DBD pada berbagai skenario subjek disajikan pada table dibawah ini:

Tabel 8 : Prediksi DBD memberat pada berbagai skenario subjek

Leukosit	Trombosit	IgM Anti NS1	IgG Anti NS1	Probabilitas DBD memberat
1	1	1	1	0,947
1	1	1	0	0,701
1	1	0	1	0,752
1	0	1	1	0,656
0	1	1	1	0,447
1	1	0	0	0,285
1	0	0	1	0,245
1	0	1	0	0,201
0	0	1	1	0,080
0	1	0	1	0,120
0	1	1	0	0,096
1	0	0	0	0,041
0	1	0	0	0,018
0	0	1	0	0,011
0	0	0	1	0,015
0	0	0	0	0,002

Keterangan tabel :

Probabilitas dihitung dengan rumus $1/(1+\exp[-y])$

Di mana:

$y = -6,24 + 3,09*\text{Leukosit} + 2,23*\text{Trombosit} + 1,77*\text{IgM Anti NS1} + 2,03*\text{IgG Anti NS1}$

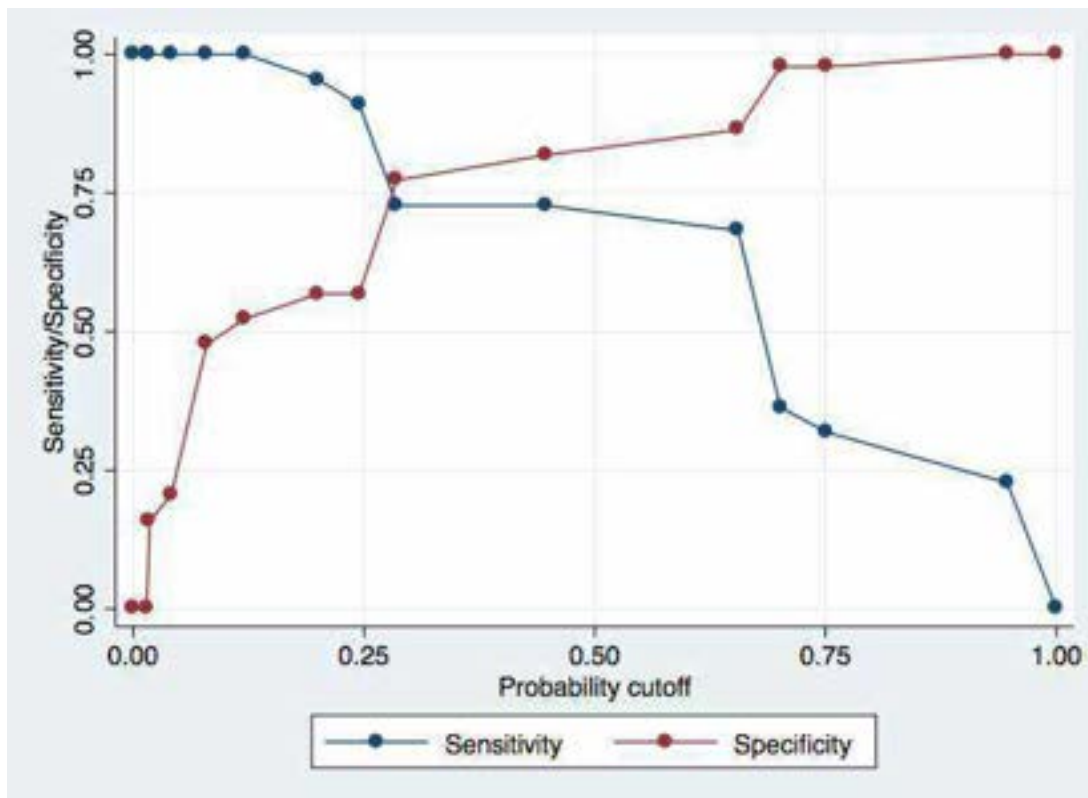
Trombosit : 1 jika <50.000 ; 0 jika ≥ 50.000

Leukosit : 1 jika <4500 ; 0 jika ≥ 4500

IgM anti NS1 : 1 jika Negatif; 0 jika Positif

IgG anti NS1 : 1 jika Negatif; 0 jika Positif

Titik potong probabilitas memberatnya DBD dicari dengan menggunakan grafik sensitivitas-spesifisitas-probabilitas. Hal ini dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 20: Titik potong optimal pada probabilitas 0,285 dengan sensitivitas 0,727 dan spesifisitas 0,773.

Melihat gambar diatas dapat dijelaskan sumbu x merupakan nilai probabilitas, sumbu y merupakan nilai sensitivitas dan spesifistas. Garis merah menunjukkan grafik spesifisitas. Garis biru menunjukkan grafik sensitifitas. Spesifisitas berbanding lurus dengan probabilitas. Makin tinggi probabilitas makin tinggi spesifisitas. Sensitifitas berbanding terbalik dengan probabilitas. Makin rendah probabilitas, makin tinggi sensitivitas. Maksud dari grafik diatas untuk mencari titik potong optimal (yaitu titik potong hasil tarik ulur diantara sensitivitas dan spesifisitas). Titik potong 0,285, Jika menghitung probabilitas berbagai kemungkinan. Jika perhitungan $\geq 0,285$ dapat diprediksi pasien tersebut akan mengalami

pemberatan. Dari hasil penelitian ini didapatkan titik potong optimal pada probabilitas 0,285 dengan sensitivitas 0,727 dan spesifisitas 0,773

C. Karakteristik Antibodi NS1 dan keberadaan antigen viral dengue pada leukosit

1. Hasil pemeriksaan sediaan imunositokimia pada apusan darah

Keberadaan antigen viral dengue telah diperiksa pada sediaan apusan darah 26 pasien yang dirawat di RSPAD (Rumah Sakit Pusat Angkatan Darat) Gatot Soebroto Jakarta pada tahun 2013 yang diduga terinfeksi virus dengue dan 1 orang sehat sebagai kontrol negatif dengan metode imunositokimia *streptavidin biotin peroxidase complex*. Hubungan antara keberadaan antibodi terhadap virus dengue (IgM dan IgG) dan hasil imunositokimia untuk mengetahui keberadaan antigen viral dengue pada leukosit ditunjukkan pada Tabel 5.


Tabel 9 dibawah menunjukkan bahwa dari 26 pasien yang diperiksa ada 12 (46,15%) pasien yang menunjukkan positif antigen viral dengue berdasarkan metode imunositokimia. Hasil positif ditunjukkan oleh 3 pasien (11,54%) yang belum memiliki antibodi, 4 pasien (15,38%) yang positif IgM, 2 pasien (7,69%) yang positif IgG, dan 3 pasien (11,54%) yang positif IgM dan IgG. Hasil negatif antara lain ditunjukkan oleh orang sehat yang pernah terinfeksi virus dengue (positif IgG).

Tabel 9: Hubungan antara keberadaan antibodi terhadap virus dengue dan hasil imunositokimia *streptavidin biotin peroxidase complex* pada sediaan apusan darah

ELISA		Imunositokimia		Total	% Positif
Keberadaan antibodi		antigen dengue			
IgM	IgG	(+)	(-)		
(-)	(-)	3	7	10	11,54
(+)	(-)	4	1	5	15,38
(-)	(+)	2	4	6	7,69
(+)	(+)	3	2	5	11,54
Total		12	14	26	46,15
Tidak diperiksa		1	2	3	
Sehat (pos IgG)		0	1	1	
Total		13	17	30	

Gambar 21 berikut ini merupakan salah satu contoh hasil imunositokimia pasien yang belum memiliki antibodi terhadap virus dengue yang positif antigen viral dengue pada leukositnya.

IA, 17 tahun
 Antibodi: IgG (-), IgM (-)
 Demam 1-3 hari
 Temperatur: 37,3⁰C
 Rumple Leed (+)
 Pusing, Mual
 Nyeri sendi, Nyeri retroorbital
 Trombosit awal: 90/ μ l;
 perawatan: 70/ μ l
 Leukosit: 2100/ μ l
 Hematokrit: I 47%, II 49%,
 III 52%

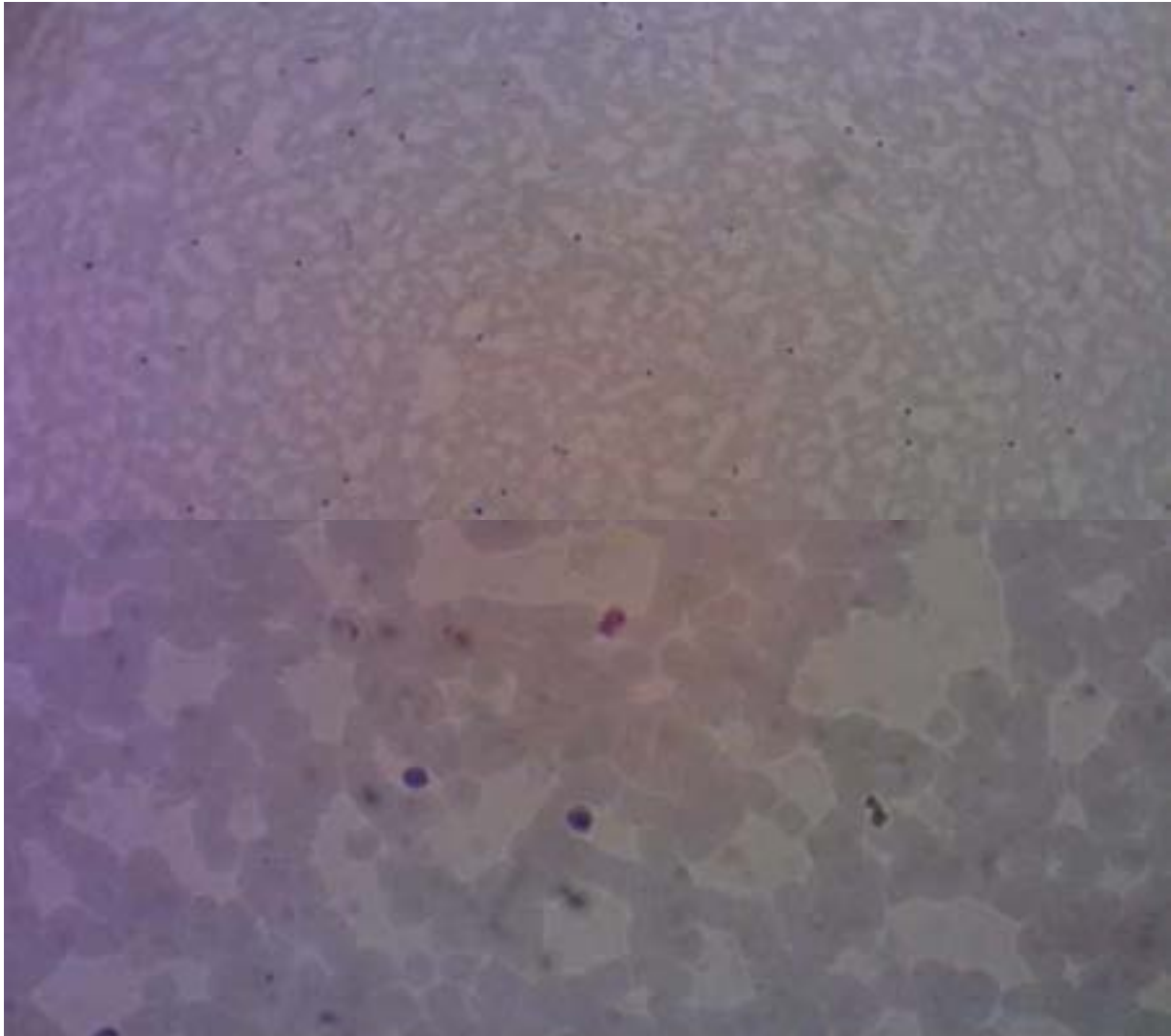




Gambar 21.

Gambaran mikroskopis imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex apusan darah tipis penderita demam dengue yang dirawat di RSPAD Gatot Subroto, Jakarta pada tahun 2013 memperlihatkan titik-titik coklat pada perbesaran 10x10, dan leukosit berwarna coklat (positif antigen viral dengue) pada perbesaran 40x10 dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer . Keterangan: foto diambil dengan kamera Optilab pada dimensi 1600x1200.

Hasil ini membuktikan bahwa metode imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer berhasil mendeteksi keberadaan antigen viral dengue sejak dini sebelum antibodi terhadap virus dengue terbentuk. Metode ini juga spesifik karena pada orang sehat walaupun pernah terinfeksi virus dengue (positif IgG) menunjukkan hasil negatif (Gambar 22).



Gambar 22:
Gambaran mikroskopis imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex apusan darah tipis orang sehat yang pernah menderita DBD (positif IgG anti dengue) memperlihatkan titik-titik biru pada perbesaran 10x10, dan leukosit (limfosit) berwarna biru (negatif antigen viral dengue) pada perbesaran 40x10 dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer. Keterangan: foto diambil dengan kamera Optilab pada dimensi 1600x1200.

Keterbatasan dari penelitian ini tidak semua sampel yang telah diperiksa keberadaan antibodi NS1 diikuti dengan pemeriksaan imunositokimia pada apusan darah, hanya ada 14 sampel yang diikuti dengan pemeriksaan imunositokimia. *Performance* (prestasi) metode ELISA untuk mendeteksi keberadaan IgM anti NS1 dibandingkan dengan metode imunositokimia *streptavidin peroxidase complex* pada sediaan

apusan darah untuk mendeteksi keberadaan antigen viral dengue pada leukosit sebagai *gold standard* ditunjukkan pada Tabel 10.

Tabel 10:

Performance (prestasi) metode ELISA untuk mendeteksi keberadaan IgM anti NS1 pada darah dibandingkan dengan metode imunositokimia SBPC pada sediaan apusan darah untuk mendeteksi keberadaan antigen viral dengue pada leukosit dengan antibodi monoklonal produksi UGM yang disekresikan oleh hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer

ELISA		Imunositokimia		Total	Sensitivitas	Spesifisitas	PPV	NPV
INDIREK		Positif	Negatif	Sampel	(%)	(%)	(%)	(%)
IgM	Positif	4 (PB)	7 (PP)	11	66,67	12,5	36,36	33,33
Anti NS1	Negatif	2 (NP)	1 (NB)	3				
		6	8	14				

PB= Positif Benar; PP= Positif Palsu; NP= Negatif Palsu; NB= Negatif Benar

$$\text{Sensitivitas: } \frac{\text{PB}}{\text{PB}+\text{NP}} \times 100\%$$

$$\text{Spesifisitas: } \frac{\text{NB}}{\text{PP}+\text{NB}} \times 100\%$$

$$\text{PPV: } \frac{\text{PB}}{\text{PB}+\text{PP}} \times 100\%$$

$$\text{NPV: } \frac{\text{NB}}{\text{NB}+\text{NP}} \times 100\%$$

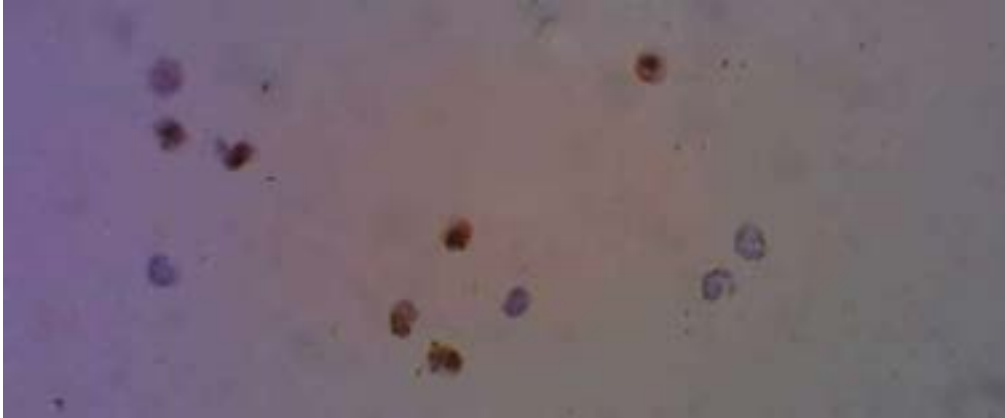
(Herrmann, 1995).

Pengukuran sensitivitas pada penelitian ini bertujuan untuk menghitung pasien yang sungguh-sungguh dinyatakan terkena infeksi dengue dengan hasil tes positif. Tabel 6 menunjukkan bahwa sensitivitas metode ELISA untuk mengukur keberadaan IgM anti NS1 sebesar 66,67% artinya ada 66,67% dari 6 sampel yang dinyatakan positif IgM Anti NS1 benar-benar terinfeksi virus dengue (positif antigen viral dengue pada leukosit) berdasarkan metode imunositokimia. Pengukuran spesifisitas ditujukan untuk menghitung pasien yang benar-benar tidak terinfeksi virus

dengue dengan hasil tes negatif. Tabel 10 menunjukkan bahwa spesifisitas metode ELISA untuk mengukur keberadaan IgM anti NS1 sebesar 12,5% artinya ada 12,5% dari 8 sampel yang dinyatakan negatif IgM Anti NS1 benar-benar tidak terinfeksi virus dengue (negatif antigen viral dengue) berdasarkan metode imunositokimia.

Pengukuran *Positive Predictive Value* (PPV) pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui probabilitas seorang pasien benar-benar terinfeksi dengue, sedangkan pengukuran *Negative Predictive Value* (NPV) menggambarkan probabilitas seorang pasien benar-benar tidak terinfeksi dengue. Tabel 10 menunjukkan bahwa nilai PPV metode ELISA untuk mengukur keberadaan IgM anti NS1 sebesar 36,36% artinya probabilitas seorang pasien yang dinyatakan positif IgM anti NS1 benar-benar terinfeksi virus dengue (positif antigen viral dengue pada leukosit) berdasarkan metode imunositokimia sebesar 36,36%. Tabel 10 juga menunjukkan bahwa nilai NPV metode ELISA untuk mengukur keberadaan IgM anti NS1 sebesar 33,33% artinya probabilitas seorang pasien yang dinyatakan negatif IgM anti NS1 benar-benar tidak terinfeksi virus dengue (negatif antigen viral dengue) sebesar 33,33%.



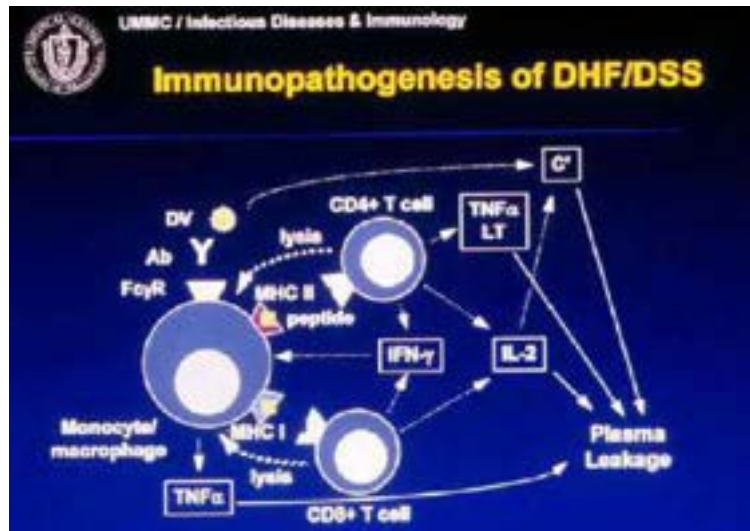


Gambar 23 : Gambaran mikroskopis imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex apusan darah tebal pasien dengan infeksi sekunder (positif IgM an IgG) yang belum memiliki IgM anti NS1 memperlihatkan 5 monosit dan 1 limfosit berwarna coklat (positif antigen viral dengue), sedangkan pasien dengan infeksi sekunder (positif IgM dan IgG) yang telah memiliki antibodi NS1 (IgM anti NS1) memperlihatkan limfosit berwarna biru (negatif antigen viral dengue) pada perbesaran 40x10 dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer. Keterangan: foto diambil dengan kamera Optilab pada dimensi 1600x1200.

Gambaran mikroskopis sediaan apus darah tebal pasien dengan infeksi sekunder (positif IgM dan IgG) yang belum memiliki IgM anti NS1 terbukti menunjukkan infektivitas yang tinggi pada monosit (Gambar 22 atas), sedangkan gambaran mikroskopis sediaan apusan darah tipis dengan infeksi sekunder (positif IgM dan IgG) yang telah memiliki IgM anti NS1 menunjukkan hasil negatif (Gambar 23 atas). Ini memperkuat hasil analisis multivariat (Tabel 7) yang menunjukkan bahwa hasil negatif IgM anti NS1 secara bermakna berhubungan dengan memberatnya infeksi dengue ($P < 0,001$) sampai 5,87 x ($OR = 5,87$). Hasil ini tidak sesuai dengan hipotesis pada penelitian ini yang menyatakan bahwa antibodi NS1 merupakan prediktor memberatnya DBD.

Fenomena pada Gambar 23 ini dapat dijelaskan sebagai berikut. Menurut Henchal dan Putnak (1990) protein NS1 adalah glikoprotein yang paling terpelihara (conserved) dan penting dalam proses replikasi virus, sehingga jika pasien belum memiliki IgM anti NS1, maka proses replikasi

virus tidak dapat dicegah, sebagai akibatnya fenomena ADE pada infeksi sekunder berjalan mulus (Times RomaN 13)



Gambar 24. Immunopatogenesis DBD/DSS (Pang *et al.*, 2006 *cit.* Halstead, 2007)

Fenomena ADE dapat dijelaskan sebagai berikut. Selama infeksi sekunder virus dengue, antibodi yang telah berada dalam darah pasien membentuk kompleks dengan virus dengue. Bagian Fc antibodi ini akan mengikat reseptor $Fc^{\gamma} RII$ pada monosit, dan sebagai akibatnya ada peningkatan jumlah sel-sel yang terinfeksi oleh virus dengue. Semakin banyak sel yang terinfeksi semakin besar respon sel T dan produksi sitokin sebagaimana ditunjukkan pada gambaran skematis berikut ini (Pang *et al.*, 2006 *cit.* Halstead, 2007).

Gambar 24, menunjukkan bahwa pada infeksi sekunder, virus dengue membentuk kompleks dengan antibodi heterologus yang sudah ada sebelumnya (*non-neutralizing antibody*), kompleks ini selanjutnya diterima oleh reseptor $Fc^{\gamma} RI$ pada makrofag jaringan, dan $Fc^{\gamma} RII$ pada monosit, dan sebagai akibatnya ada peningkatan jumlah sel yang terinfeksi oleh virus dengue, aktivitas komplemen, $TNF\alpha$ yang memicu terjadinya kebocoran plasma.

Limfosit T CD4⁺, sebagian besar adalah *helper cell*, mengikat peptida yang berikatan dengan molekul MHC Klas II pada *antigen presenting Cell* (APC). Limfosit T CD4⁺ yang terinfeksi ini menghasilkan limfokin interferon (IFN γ), dan sitokin *tumor necrosis factor* (TNF α), dan interleukin (IL-2) yang mengaktivasi komplemen, begitu pula limfosit T CD8⁺ yang terinfeksi akan menghasilkan IFN γ dan IL-2. Adanya peningkatan TNF α dan komplemen tersebut memicu terjadinya kebocoran plasma. Limfosit T CD8⁺ sebagian besar adalah *Cytolytic T Lymphocytes* (CTLs), mengenal fragmen peptida yang berikatan dengan molekul MHC Klas I pada sel-sel yang akan dilisis oleh CTLs. Peptida yang berasosiasi dengan molekul MHC Klas I ini biasanya merupakan derivat protein yang disintesis di dalam sel, misalkan antigen viral (Abbas *et al.*, 1991). Selanjutnya CTLs memprogram kematian sel target dengan menginduksi fragmentasi DNA dan bermigrasi ke sel target baru lainnya sehingga sel target mati secara apoptosis (Garland Science, 2008 *cit.* Murphy *et al.*, 2008). Sel endotel merupakan salah satu sel target virus dengue (Lin *et al.*, 2003), sehingga jika terinfeksi oleh virus dengue akan dikenali oleh CTLs yang secara apoptosis akan membunuh sel endotel yang terinfeksi, sehingga memicu terjadinya peningkatan permeabilitas membran endotel atau kebocoran plasma yang berakibat memberatnya DBD. Sementara itu jika pasien dengan infeksi sekunder (positif IgM dan IgG) tetapi telah memiliki antibodi NS1 (IgM anti NS1) fenomena di atas tidak terjadi karena antibodi NS1 (IgM anti NS1) berperan dalam mencegah replikasi virus dengue yang telah berikatan dengan antibodi heterologus yang sudah ada sebelumnya (non-neutralizing antibody), sehingga tidak ada kompleks virus-antibodi heterologus yang diterima oleh reseptor FcYRI pada makrofag jaringan, dan FcYRII pada monosit, dan sebagai akibatnya hasil imunositokimia menunjukkan hasil negatif meskipun pasien terinfeksi sekunder virus dengue (Gambar 24).

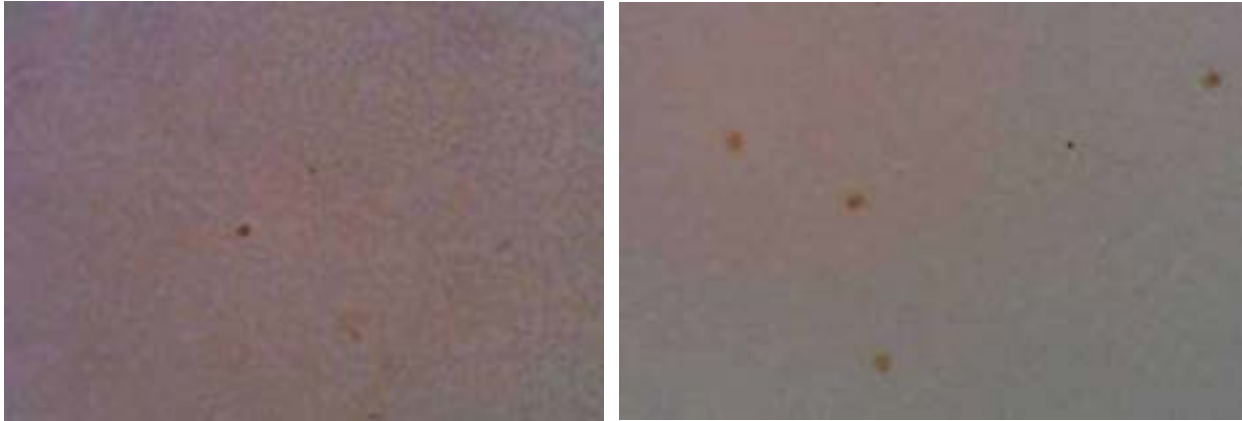
Hubungan status infeksi (primer, sekunder), dan keberadaan antibodi NS1 (IgM anti NS1) dengan hasil imunositokimia pada apusan darah untuk mendeteksi keberadaan antigen viral dengue pada leukosit ditunjukkan pula pada Tabel 6 dan Gambar 24

Tabel 11 :
Hubungan status infeksi (primer, sekunder), dan keberadaan antibodi NS1 (IgM anti NS1) dengan hasil imunositokimia SBPC pada apusan darah untuk mendeteksi keberadaan antigen viral dengue pada leukosit dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10

Status Infeksi	Antidengue		IgM anti NS1		Imunositokimia	
	IgM	IgG	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Belum	(-)	(-)	4	0	1	3
Pernah	(-)	(-)	0	1	0	1
Primer	(+)	(-)	2	0	2	0
Infeksi sekunder	(+)	(+)	0	2	2	0
Pernah terinfeksi	(+)	(+)	1	0	0	1
	(-)	(+)	3	0	1	2
	(-)	(+)	1	0	0	1
Total sampel			11	3	6	8

Tabel 11 menunjukkan ada 2 pasien dengan infeksi primer yang telah memiliki antibodi NS1 masih menunjukkan positif antigen viral dengue. Namun dari hasil imunositokimia terlihat bahwa jumlah leukosit yang terinfeksi sangat sedikit (Gambar 25 kiri), sedangkan pada pasien yang belum memiliki antibodi terlihat jumlah leukosit yang positif antigen viral dengue terlihat lebih banyak (kanan).

Tabel 11, juga menunjukkan bahwa dari 4 pasien yang pernah terinfeksi virus dengue (positif IgG) yang telah memiliki IgM anti NS1 hanya ada 1 pasien yang masih menunjukkan positif virus dengue.



Gambar 25 :
 Gambaran mikroskopis pada perbesaran 10x10 sediaan imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex apusan darah tipis penderita yang terinfeksi dengue primer yang telah memiliki antibodi NS1 (kiri) yang dirawat di RSPAD Gatot Subroto, Jakarta pada 2013 memperlihatkan satu leukosit berwarna coklat , sedangkan yang belum memiliki antibodi memperlihatkan lebih banyak leukosit berwarna coklat (positif antigen viral dengue) dengan antibodi monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer . Keterangan: foto diambil dengan kamera Optilab pada dimensi 1600x1200.



Gambar 26 :
 Gambaran mikroskopis pada perbesaran 40x10 sediaan imunositokimia streptavidin biotin peroxidase complex apusan darah tipis penderita yang pernah terinfeksi dengue (positif IgG) yang telah memiliki antibodi NS1 yang dirawat di RSPAD Gatot Subroto, Jakarta pada 2013 memperlihatkan tiga leukosit berwarna coklat (positif antigen viral dengue) dan 1 limfosit berwarna biru dengan antibodi

monoklonal produksi UGM dari hibridoma DSSE10 sebagai antibodi primer . Keterangan: foto diambil dengan kamera Optilab pada dimensi 1600x1200.

Hasil imunositokimia memperlihatkan leukosit (monosit, dan limfosit) berwarna coklat (positif antigen viral dengue), sedangkan orang sehat memperlihatkan leukosit berwarna biru (negatif antigen viral dengue) dapat dijelaskan sebagai berikut. Antibodi monoklonal anti dengue yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibodi yang disekresikan oleh hibridoma DSSE10. Antibodi ini dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen dengue pada otak nyamuk *Toxorhynchites splendens* yang telah disuntik dengan serum penderita yang positif virus dengue berdasarkan metode RT-PCR dan pada sel C6/36 yang telah diinfeksi dengan filtrat nyamuk tersebut (Umniyati et al., 2011). Hasil menunjukkan positif artinya ada ikatan antara antigen dengue yang berada di leukosit dengan antibodi primer (antibodi monoklonal DSSE10), ikatan ini tidak lepas oleh adanya pencucian, sehingga ketika ditambahkan antibodi sekunder yang terlabel biotin, antibodi primer ini berikatan dengan antibodi sekunder, dan ikatan inipun tidak dapat lepas oleh adanya proses pencucian. Oleh karena itu ketika ditambahkan konjugat streptavidin yang terlabel enzim horseradish peroxidase, biotin akan diikat oleh streptavidin dengan ikatan yang sangat kuat ($K=10-15M$), dan ikatan inipun tidak mudah lepas oleh proses pencucian, sehingga ketika ditambahkan substrat kromogen, terjadilah reaksi enzimatik antara enzim dan substrat . Enzim peroksidase akan mengkatalisa substrat, hidrogen peroksida, dan mengubah kromogen menjadi deposit warna coklat yang intensitas warnanya tergantung dari jumlah kromogen yang bereaksi dengan enzim peroksidase (Anonim, 2005). Hasil menunjukkan berwarna biru atau negatif artinya tidak ada antigen pada leukosit, sehingga tidak ada ikatan antara antibodi primer dan antigen, maka ketika

preparat dicuci, antibodi primer akan hanyut, sehingga ketika ada penambah antibodi sekunder yang terlabel biotin, tidak ada ikatan antara antibodi sekunder dengan antibodi primer. Oleh karena itu pada proses pencucian berikutnya antibodi sekunder yang terlabel biotin juga hanyut, sehingga ketika ditambahkan konjugat streptavidin yang terlabel enzim HRP, streptavidin tidak mengikat biotin, sehingga pada proses pencucian berikutnya konjugat yang terlabel HRP inipun hanyut. Karena preparat tidak ada enzim HRP, maka ketika ditambahkan substrat tidak ada reaksi enzimatik yang mengubah kromogen menjadi deposit warna coklat, sehingga sel-sel yang negatif akan menyerap warna biru ketika ditambahkan counterstain hematoksilin. Hasil imunositokimia ini menunjukkan pula eritrosit berwarna biru karena virus dengue tidak bisa bereplikasi pada eritrosit.

D. Analisis Hubungan Faktor Prediktor Memberatnya DBD

Faktor pemberat DBD sudah banyak dilakukan oleh penelitian sebelumnya. Hal tersebut didasarkan oleh multidimensinya perkembangan penyakit DBD yang tidak dapat dilihat dari satu sisi. Berbagai aspek yang berperan dari hulu ke hilir menjadi acuan pendekatan terhadap penyakit ini. Pendekatan diagnostik dan terapeutik DBD mewajibkan berbasiskan dari gejala klinis yang muncul saat pasien datang ke rumah sakit, namun pendekatan epidemiologi, patogenesis didukung pemeriksaan imunologi dan biomolekuler menjadi faktor penting dalam ketajaman penatalaksanaan DBD secara menyeluruh. Bahkan akan lebih sempurna jika di dampingi oleh suatu model prediktor.

Beberapa penelitian sebelumnya mengemukakan faktor prediktor menjadi pegangan dalam mengikuti dan menindaklanjuti perjalanan DBD. Teori tentang faktor prediktor DBD dikemukakan oleh Guzman dan Kouri

yang menyampaikan teori integral hipotesis bahwa faktor risiko terjadinya DBD berat dan DSS adalah faktor individu, faktor virus dan faktor epidemiologis. Faktor individu terdiri dari usia, jenis kelamin, ras, status gizi, infeksi sekunder dan respon pejamu. Faktor virus terdiri dari strain dan serotipe virus. Faktor epidemiologis terdiri dari jumlah kasus, densitas virus, penyebaran virus serta hiperendemi (Guzman dan Kouri, 2002). Juffrie *et al.* (1999) melalui penelitian desain kasus kontrol untuk mengetahui prediktor terjadinya renjatan dengan keluaran *odds ratio* (OR). Faktor faktor yang secara statistik berhubungan dengan renjatan adalah asites (OR 5,1), akral dingin (OR 9,8), ekimosis (OR 4,6), efusi pleura (OR 10,7), trombositopenia terendah (OR 5,9), dan protein plasma (OR 7,3). Penelitian tersebut mempunyai kekuatan untuk mendeteksi kekuatan hubungan (*odds ratio*) sebesar minimal 3 sehingga hepatomegali (OR=2,2) dan hematokrit tertinggi (OR 1,5) tidak bermakna secara statistik namun bermakna secara klinis. Penelitian ini tidak melaporkan model prediksi renjatan (Juffrie *et al.*, 1999). Hadinegoro dengan desain potong lintang, mendapatkan variabel trombosit terendah secara statistik bermakna sebagai prediktor memberatnya penyakit pada pasien DBD derajat ringan, sedangkan variabel hemokonsentrasi, endotoksemia dan IL-6 secara klinis bermakna. Penelitian ini menghasilkan model untuk memprediksi namun tidak membuat sistem skoring (Hadinegoro, 1996). Gayatri melakukan penelitian dengan desain kasus kontrol, menemukan hematokrit tertinggi (OR 1,08), trombositopenia terendah (OR 1,00), demam (OR 1,31) dan usia (OR 0,85) bermakna sebagai prediktor renjatan. Variabel yang diteliti diukur dalam skala numerik. Penelitian ini menghasilkan model prediksi namun tidak membuat sistem skoring (Gayatri,1997). Penelitian Dewi (2004) mengkonfirmasi bahwa hepatomegali (OR 2,4) dan trombosit terendah (OR 4,4) adalah prediktor terjadinya renjatan. Variabel hematokrit

mempunyai OR sebesar 1,7 yang secara statistik tidak bermakna namun bermakna secara klinis . Penelitian ini menghasilkan model prediksi namun tidak membuat sistem skoring (Dewi, 2004). Triono (2004) dengan disain penelitian kasus kontrol, mendapatkan variabel hepatomegali (OR 11,08) dan hematokrit awal (OR 8,9) bermakna secara statistik sebagai prediktor renjatan. Sementara trombositopenia awal (OR 2,2), leukosit (OR 2,3) bermakna secara klinis namun secara statistik tidak bermakna (Triono, 2004).

Beberapa penelitian lain mencoba meneliti faktor profil lipid dan sitokin sebagai penanda kerusakan endotel dan immunoglobulin spesifik (Villar, 2008). Gorp (2002) dengan disain potong lintang, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada kadar kolesterol total, HDL, LDL dan trigliserida diantara pasien renjatan dengan non renjatan. Penemuan ini didasarkan pada pemahaman patofisiologi renjatan yaitu adanya kerusakan pada hati (Gorp, 2002) . Penelitian Hadinegoro dengan disain potong lintang, menunjukkan bahwa penurunan IL-6 menurunkan risiko terjadinya renjatan (OR 0,82) walaupun secara statistik tidak bermakna (Hadinegoro, 2001).

Penelitian Juffrie *et al.* (1999) dengan disain potong lintang menunjukkan bahwa kadar IL-3 pasien dengan renjatan lebih tinggi daripada pasien DBD tanpa renjatan (Juffrie *et al.*, 1999). Koraka dengan disain potong lintang, mendapatkan perbedaan kadar Ig A, IgG1 dan IgG4 diantara pasien renjatan dengan non renjatan (Koraka and Setiati, 2002), sedangkan penelitian Nisalak menemukan perbedaan klinis diantara berbagai serotipe virus dengue (Kalyanarooj and Nimmannitya, 2002; Nisalak *et al.*, 2003).

Hasil penelitian yang dilaksanakan saat ini, berdasarkan hubungan beberapa variabel demografis dan klinis terhadap DBD memberat, didapatkan nafsu makan menurun ($p < 0,001$, OR 6,72), rumple leed (OR

1,44), hepatomegali ($p < 0,003$, OR 23,45), tanda pendarahan ($p < 0,003$, OR 3,81). Sedangkan hubungannya variabel klinis dan laboratorium didapatkan tekanan darah sistolik ($p 0,051$), hematokrit awal ($p 0,382$), leukosit awal ($p 0,341$), trombosit awal ($p < 0,001$), SGOT awal ($p 0,001$), SGPT awal ($p 0,002$), albumin awal ($p 0,031$) dan Kalium awal ($p 0,420$). Setelah dilakukan analisis multivariat terhadap faktor faktor pemberat DBD adalah nafsu makan menurun ($p 0,007$, OR 4,87), hepatomegali ($p 0,009$, OR 27), tekanan darah sistolik ($p 0,037$, OR 0,95) dan trombosit awal ($p 0,000$, OR 0,97).

E. Analisis Hubungan DBD memberat dengan Trombositopenia

Demam Berdarah Dengue dan Demam Dengue dalam tataran klinik dibagi berdasarkan infeksi primer dan sekunder. Kondisi ini ditandai dengan tiga kriteria primer yaitu terjadinya defek permeabilitas vaskuler sebagai hasil kebocoran plasma, abnormalitas hemostatik multifaktorial termasuk adanya trombositopenia dan diatesis pendarahan. Kebocoran plasma dibuktikan dari hemokonsentrasi dan atau efusi pada pleura atau peritoneal yang biasanya terjadi sesudah 3-5 hari demam, dan hal ini sangat penting menyangkut triase dan terapi. Trombositopenia penanda beratnya dengue, dengan trombosit dibawah 100.000 sel/mm^3 diperlukan untuk memenuhi definisi kasus. Kadar hitung trombosit secara tipikal bersamaan dengan kebocoran plasma, dan trombositopenia berat juga terjadi dalam persentasi bermakna pada pasien dengan DD, namun penurunan hitung trombosit secara tipikal mendahului kebocoran plasma. Penemuan ini berguna dalam memutuskan untuk merawat pasien dengan dugaan DBD. Manifestasi Pendarahan, sebagai contoh, dari saluran cerna, dapat menjadi berat pada pasien DBD namun tidak selalu kondisi berat memerlukan transfusi dan jarang menyebabkan hipotensi.

Meskipun demam hemoragik pada beberapa pasien DBD memiliki manifestasi hemoragik minor dengan *petekhia (test tourniquet)* sebagai tanda klinik, Trombositopenia merupakan proses lebih lanjut adanya gangguan hemostasis dalam perjalanan klinis demam berdarah dengue (Rothman, 2004).

Dari kasus yang diteliti, didapatkan beberapa kasus yang memiliki kecenderungan untuk terjadinya pendarahan sebagai salah satu proses memberatnya DBD. Beberapa penelitian sebelumnya mengungkapkan terjadinya pendarahan disebabkan oleh adanya perbedaan rantai panjang protein NS1 yang mengalami reaksi silang dengan trombosit.

Berdasarkan pendekatan epidemiologi sudah ada dua penelitian sebelumnya yaitu *EDEN study* dan strategi *triage* mengidentifikasi individu dengan infeksi dengue pada stadium awal terutama pada saat 72 jam demam yang dilakukan oleh Tanner *et al.* (2008) dan (Low, 2006). Kedua penelitian tersebut menyimpulkan trombosit < 50.000 pada hari ke 5-7 penyakit, merupakan marker beratnya penyakit dan dihubungkan dengan berkembangnya komplikasi pendarahan dan syok (Tanner, 2008; Low, 2006). Hal ini juga sesuai dengan penelitian Balmaseda (2005), trombosit < 50.000 menjadi prediktor memberatnya DBD.

Hal ini konsisten dengan kriteria WHO 1997 dan WHO 2009 dalam diagnosis DBD terdapat hitung trombosit < 100.000/mm³ dan juga berdasarkan penelitian Balmaseda di Nikaragua (Pan WHO) trombosit < 50.000 /mm³ (Balmaseda, 2005).

Hasil penelitian yang didapatkan mendukung terhadap penelitian sebelumnya seperti yang dilihat dari tabel dibawah ini :

Tabel 12: Karakteristik Trombosit DBD Pemberatan dan DBD Derajat I

		DBD memberat (n=26)	DBD tidak memberat (n=130)	nilai p
Trombo sit	Awal	59.500 (7.000- 121.000)	93.000 (13.000- 204.000)	<0,00 1 ^b
	4-5 hari	28.500 (5.000- 105.000)	57.500 (11.000- 165.000)	<0,00 1 ^b
	7 hari	90.000 (20.000- 193.000)	106.500 (13.000- 259.000)	0,165 b

F. Analisis Hubungan Antibodi NS1 dengan Trombositopenia

Penelitian Lin (2009), mengungkapkan antibodi protein nonstruktural 1 (NS1) anti dengue virus bereaksi silang dengan trombosit dan menghambat agregasi platelet. Berdasarkan susunan homologi sekuensi reaksi silang epitop terletak pada regio C-terminal NS1 virus dengue. Penelitian ini membandingkan efek antibodi terhadap rantai penuh NS1 DV dan kelemahan aa 271 s/d 352 C-terminal (ditandai_C NS1). Anti_C NS1 mempertunjukkan aktivitas pengikatan trombosit rendah dibandingkan anti NS1 rantai panjang. Anti NS1 rantai panjang tetapi bukan Antibodi Anti_C NS1 menghambat agregasi platelet yang melibatkan inaktivasi integrin_iib. Diungkapkan melalui penelitian ini, waktu pendarahan NS1 rantai panjang-tikus hiperimunisasi lebih panjang daripada kontrol (tikus normal). Dengan kontras tikus _C NS1 *hyperimmunized* memperlihatkan waktu pendarahan yang sama dengan kontrol tikus normal. Secara pasif pemberian anti DV NS1, tetapi bukan

anti _C NS1, kadar antibodi menurun pada serum dan penurunan ini dihubungkan dengan pengikatan antibodi pada platelet. Kehilangan transient trombosit pada sirkulasi diamati sesudah proses pada anti DV-NS1. Penemuan ini mungkin menjadi penting tidak hanya untuk memahami patogenesis DBD tetapi juga untuk pengembangan vaksin dengue (Lin, 2009).

Antibodi berasal dari infeksi pertama virus dengue meningkatkan infeksi sekunder dari serotipe berbeda, dengan fenomena yang disebut *Ab-dependent enhancement*. Antibodi terhadap protein NS1 virus dengue umumnya mengenal epitop pada koagulasi berhubungan protein, trombosit dan sel endotel, juga menggambarkan adanya antibodi pada pasien dengan serum yang bereaksi silang dengan trombosit dan sel endotel. Investigasi lebih lanjut memperlihatkan bahwa anti NS1 virus dengue menyebabkan apoptosis sel endotel dan aktivasi imun (Lin, 2009).

Kecenderungan pendarahan adalah penanda abnormalitas pasien DBD/DSS. Sel endotel vaskular dan trombosit memegang peranan penting pada fenomena ini, meskipun mekanisme patogenik tidak sepenuhnya dipahami. Autoantibodi platelet yang menyebabkan trombositopenia sudah dilaporkan pada beberapa infeksi virus, termasuk hepatitis C virus, cytomegalovirus dan HIV. Pada infeksi virus dengue, autoantibodi anti platelet menyebabkan komplemen memediasi lisis sel sebagian mekanisme patogenik dari trombositopenia. Sebagai tambahan, antibodi juga menghambat agregasi trombosit. Saat kerusakan pembuluh darah, aktivasi trombosit menempel pada tempat luka diikuti dengan perubahan dan terlepasnya kandungan granula dan akhirnya bersama membentuk formasi fibrin. Penelitian ini bertujuan mengklarifikasi tahap agregasi trombosit yang dipengaruhi oleh anti DV NS1 Abs. Menggunakan sekuensi homologi sejajar, mendapatkan bahwa C-

terminal region dari DV NS1 protein mengandung reaksi silang epitop dengan *self-Ags* (Lin, 2009).

Proses yang terjadi ditandai oleh anti DV NS1 Abs bereaksi silang dengan trombosit dan menyebabkan disfungsi trombosit. Penelitian ini mengungkapkan bahwa anti NS1 menghambat ADP menimbulkan agregasi trombosit melalui blocking aktivasi integrin_IIb3, sebagai tambahan reaksi silang epitop berada pada regio C-terminal dari protein NS1. Membandingkan dengan Ab terhadap rantai panjang NS1, Abs terhadap terminal C memperlihatkan kemampuan ikatan trombosit lemah dan tidak menghambat ADP menyebabkan agregasi trombosit. Hasil ini berhubungan dengan kecenderungan pendarahan pada tikus. Hasil penelitian tersebut menyatakan waktu pendarahan yang lebih panjang sesudah tikus diimunisasi dengan NS1 sebagai perbandingan dengan tikus diimunisasi dengan _C NS1 atau JEV NS1 (Lin, 2009) .

Anti-dengue Abs berperan penting dalam berkembang virus dengue menjadi penyakit, tingkatan dari penambahan jumlah infeksi dengue pada sel target pada awal infeksi menjadi tahap lanjut dari *immune-mediated cell* atau kerusakan jaringan. Generasi dan titer dari antibodi anti dengue juga status infeksi primer atau infeksi sekunder sangat penting untuk menerangkan peran dari patogenesis dengue. Dalam penelitian ini, ditunjukkan peran anti-NS1 dalam disfungsi trombosit dan kecenderungan pendarahan. Hal ini dapat dikaji bahwa terjadinya trombositopenia adalah gambaran umum pasien sesudah infeksi virus dengue. Satu dari mekanisme paling mungkin, virus dengue menyebabkan trombositopenia bahwa virus dengue mengganggu pertumbuhan sel progenitor hematopoetik dengan menurunkan trombopoiesis. Juga anti envelope protein Abs meningkatkan ikatan virus dengue terhadap trombosit, mendukung peran klirens trombosit dalam patogenesis trombositopenia. Mengkaji hal diatas, reaksi silang antibodi

pada sera pasien dengue dan anti NS1 Abs menyebabkan lisis trombosit, menggambarkan mekanisme potensial lebih lanjut untuk kehilangan trombosit pada penyakit dengue. Studi terakhir menggambarkan bahwa anti autoantibodi trombosit dihapus oleh DV NS1 menyebabkan trombositopenia dan mortalitas pada tikus. Dalam penelitian ini juga diperlihatkan imunisasi pasif dengan anti NS1 Abs rantai panjang menyebabkan kehilangan transien trombosit, suatu gambaran umum dari penyakit dengue. Hal yang paling menarik, anti_C NS1 tidak menyebabkan kehilangan trombosit. Saat ini, data penelitian tidak menghapuskan mekanisme kehilangan trombosit. Hal tersebut disebabkan sekuesterasi dari sirkulasi atau destruksi trombosit atau oleh mekanisme lain tetap memerlukan investigasi lebih lanjut. Penentuan titer Ab NS1, melalui komplemen C5 a dan kadar LDH pada serum tikus setelah imunisasi pasif dengan anti-NS1 Abs. Dalam 6 jam, titer anti-DV NS1 pada serum tikus memperlihatkan suatu penurunan dibandingkan dengan 1 jam. Kadar LDH dan kadar C5a meningkat dalam kelompok perlakuan anti NS1 dengan kelompok kontrol pada 6 jam (data tidak dipublikasi). Lebih lanjut, anti-NS1 Abs mengikat sel endotel dan menstimulasi ekspresi molekul adhesi. Molekul adhesi ini memerangkap trombosit pada permukaan sel endotel, yang mungkin memberikan alasan lain untuk jumlah trombosit rendah dalam sirkulasi saat 6 jam. Dengan 24 jam, penambahan trombosit mengikuti trombosit mencapai normal (Lin, 2009)

Peran agregasi trombosit dalam penelitian ini ditunjukkan peran dari PDI (*Protein Disulfide Isomerase*). Dengan menggunakan gel elektroforesis dua dimensi dan analisis western blot, sebelumnya mengidentifikasi anti DV NS1 reaksi silang protein dari ekstrak membran sel endotel. Diantara semuanya, protein disulfide isomerasi (PDI) dapat diekspresi pada permukaan trombosit dan berpartisipasi dalam agregasi

trombosit. Hasil yang tidak dipublikasi memperlihatkan bahwa anti DV NS1 juga bereaksi silang dengan PDI pada permukaan trombosit. PDI mungkin meregulasi aktivasi integrin α _{IIb} β ₃, reseptor fibrinogen, yang diperlukan untuk tahap akhir agregasi trombosit. Oleh karena itu, efek inhibitor dari anti DV NS1 pada aktivasi integrin α _{IIb} β ₃ mungkin melalui pengenalan permukaan trombosit PDI untuk memblok tempat aktif dan bertentangan dengan fungsi PDI. Hipotesis tentang hal ini masih dalam penelitian (Lin, 2009). Sedemikian kompleksnya yang dikemukakan diatas tentang proses dan potensi terjadinya trombositopenia dan pendarahan dikaitkan peranan Antibodi NS1.

Penelitian Rachman (2009), mengemukakan puncak aktivitas anti-trombosit sesuai dengan nadir hitung trombosit yaitu pada hari ke lima paske demam, terdapat hubungan yang bermakna antara hitung trombosit dengan anti NS1-VD, Antibodi anti NS1-VD bereaksi silang dengan GPIIb/IIIa dan pemberian antibodi NS1 menyebabkan penurunan jumlah trombosit manusia normal secara *in vivo* pada mencit NOD/SCID, yang mendukung hipotesis antibodi NS1 menyebabkan trombositopenia pada infeksi dengue sekunder (Rachman, 2009).

Pada penelitian ini didapatkan pada DBD berat, proporsi Ig M Anti NS1 (+) terhadap trombosit > 50.000 sebesar 33,3% dibandingkan trombosit < 50.000 sebesar 27,3% dan proporsi TNF α (+) terhadap trombosit < 50.000 sebesar 20,0 % dibandingkan trombosit > 50.000 sebesar 33,3%.

Setelah dilakukan analisis bivariat dengan melibatkan Ig M anti NS1 dan Ig G Anti NS1 didapatkan probabilitas untuk memberatnya DBD dengan trombosit < 50.000 (p 0,035 dan OR 3,24).

G. Model Prediktor Memberatnya DBD

Model prediktor DBD adalah suatu parameter untuk menilai secara terukur memberatnya DBD berdasarkan faktor faktor yang dapat menjadi hipotesis dan secara faktual dapat dikaji dari manifestasi klinis yang timbul. Model prediktor dengue adalah parameter skoring dalam menentukan beratnya dengue. Beberapa pendekatan yang sudah dilaksanakan, diantaranya pendekatan epidemiologi, klinis dan imunopatogenesis sebagai titik tolak analisis. Model prediksi berbagai pakar dengue di dunia merupakan suatu keprihatinan masih tingginya mortalitas dengue dan kerinduan untuk berkesinambungan menajamkan pendekatan diagnostik dengue melalui keselarasan klinis dan imunopatogenesis.

Model prediksi dengue adalah parameter skoring dalam menentukan beratnya dengue. Beberapa pendekatan yang sudah dilaksanakan, diantaranya pendekatan epidemiologi, klinis dan imunopatogenesis sebagai titik tolak analisis. Model prediksi berbagai pakar dengue di dunia merupakan suatu "keprihatinan" masih tingginya mortalitas dengue dan "kerinduan" untuk berkesinambungan menajamkan pendekatan diagnostik dengue melalui keselarasan klinis dan imunopatogenesis.

Model prediksi yang dikemukakan oleh Nainggolan (2012) merupakan penelitian kohort prospektif dari bulan Februari 2010 sampai Januari 2011. Penelitian ini merupakan *prognostic research* yang dilakukan pada penderita infeksi dengue sebelum kebocoran plasma terjadi. Kebocoran plasma infeksi dengue umumnya terjadi hari ke 3-7 dengan seleksi pasien sebelum berobat ke rumah sakit melalui pendekatan berbasis komunitas. Dari 64 penderita yang dirawat, 39 penderita dengan kebocoran plasma dan 25 penderita tanpa kebocoran plasma. Penderita infeksi dengue dengan kebocoran plasma menunjukkan kadar sTNFR-1, VEGF,

pendarahan spontan, aktivitas enzim SGOT dan SGPT yang lebih tinggi serta jumlah trombosit dan leukosit yang lebih rendah dibandingkan penderita tanpa kebocoran plasma. Model prediksi akhir mendapatkan variabel kejadian petekia (skor 14), jumlah trombosit $< 134.000/31$, dan aktivitas enzim SGOT ≥ 48 U/L (skor 10) sebagai prediktor kebocoran plasma. Jumlah skor ≥ 24 merupakan indikasi rawat dan pemberian cairan intravena. Penelitian Nainggolan (2012) menyimpulkan TNF α berperan dalam patofisiologi kebocoran plasma pada awal perjalanan sakit sedangkan VEGF berperan pada tahap selanjutnya. Kebocoran lebih mudah saat awal sakit telah terjadi vaskulopati dan migrasi leukosit. Petekie, jumlah trombosit, dan aktivitas enzim SGOT dapat dipergunakan sebagai prediktor kebocoran plasma pada infeksi dengue. (Nainggolan, 2012).

Sedangkan untuk mengetahui patofisiologi terjadinya leukopenia pada infeksi dengue ditinjau dari apoptosis sel, peran aktivasi sel endotel vaskuler, adhesi dan migrasi leukosit serta pengaruhnya terhadap jumlah leukosit diteliti Widayat (2014). Penelitian ini dilaksanakan secara kohort prospektif dari Februari 2010 sampai dengan Januari 2011. Penelitian dilakukan terhadap 63 pasien diantaranya dengan infeksi sekunder. Kadar sPECAM-1 pada hari ke-5 demam digunakan sebagai penurunan sN-Chaderin pada hari ke 6 demam. Pada analisis multivariat, awitan demam > 5 hari mempunyai skor 1 dan leukosit ≥ 2500 mempunyai skor 8. Pada titik potong ≥ 9 sistem skor dapat memprediksi peningkatan trombosit dengan area *under curve* 74,9%, sensitivitas 30,77% dan spesifisitas 91,89%. Dengan penambahan faktor kadar sN Cadherin $< 32,98$ ng/mL yang mempunyai skor 4 dan kadar Annexin-V $< 3,999$ ng/ML yang mempunyai skor 6, pada titik potong 12 sistem skor dapat memprediksi peningkatan trombosit dengan area *under curve* 61,33% sensitivitas 19,23% dan spesifisitas 100%. Penelitian ini menyimpulkan

bahwa kadar sPECAM-1 pada fase kritis dapat dipakai sebagai prediktor penurunan sN Cadherin pada fase awal pemulihan. Perbaikan leukopenia pada fase awal pemulihan dapat dipakai sebagai prediktor peningkatan jumlah trombosit pada fase pemulihan. Awitan demam > 5 hari, leukosit $\geq 2.500/\mu\text{L}$, Annexin V, sN-Cadherin dapat digunakan untuk memprediksi peningkatan trombosit (Widayat, 2014).

Penelitian Rachman (2009), terhadap 50 subyek pada infeksi primer dan sekunder dengue dilakukan pada hari ketiga, hari kelima dan hari ketujuh demam. Hasil penelitian tersebut mengungkapkan nilai kadar Ig G anti NS1 yaitu < 0,2 dianggap negatif, 0,21-0,4 ringan, 0,41 – 0,8 sedang, 0,8-1,2 berat dan >1,2 sangat berat. Pengkajian respon imun terhadap infeksi dengue, dimana respon imun humoral memegang peranan penting yaitu dengan didapatkannya berbagai jenis antibodi terhadap komponen-komponen virus dengue. Perjalanan Demam Berdarah Dengue tidak terlepas dari aspek patogenesis dan perjalanan klinis demam dengue, sebelum adanya respon antibodi menjadi parameter penilaian klinis (Rachman, 2009).

Hasil penelitian yang didapatkan di RSPAD Gatot Soebroto beranjak dari pemikiran peranan Antibodi NS1 sebagai protektif dan prediktor. Proporsi Ig M Anti NS1 (+) lebih banyak pada kelompok kontrol (DBD Derajat I) sebesar 78,7% dibandingkan kelompok kasus (DBD Derajat III/DSS) sebesar 30,4% ($p < 0,001$, OR 0,12). Sedangkan Proporsi Ig M Anti NS1 (-) lebih banyak pada kelompok kasus 69,6% dibandingkan kelompok kontrol sebesar 21,3%. Proporsi Ig G Anti NS1 (+) didapatkan pada kelompok kasus sebesar 13% dan kelompok kontrol 34,0%. Proporsi Ig G Anti NS1 (-) didapatkan pada kelompok kasus sebesar 87,0 % dan kelompok kontrol 66,0%. Proporsi Ig M Anti NS1 (-) sebagai paparan positif pada kelompok kasus 69,6% dan kelompok kontrol 21,3% ($p < 0,001$, OR 8,46). Proporsi Ig G Anti NS1 (-)

sebagai paparan (+) pada kelompok kasus 87,7% dan kelompok kontrol 66,0% (p 0,117 OR 3,44) Proporsi TNF α (+) lebih banyak kelompok kasus (DBD Derajat III/DSS sebesar 31,8 % dibandingkan dengan kontrol sebesar 22,2%, sedangkan proporsi TNF α (-) lebih banyak pada kelompok kontrol (DBD I) sebesar 77,8% dibandingkan dengan kelompok kasus (sebesar 68,2%).

Kajian teoritis mengungkapkan, antibodi virus dengue dapat berpengaruh terhadap perjalanan penyakit melalui beberapa mekanisme. Penelitian primata *non human*, transfer pasif antibodi terhadap virus dengue akan meningkatkan titer viremia. Penelitian tersebut memperlihatkan hubungan positif diantara titer viremia puncak dan beratnya penyakit, mendukung ide pentingnya potensi *in vivo* pada ADE. Kejadian DBD saat infeksi primer tahun pertama anak lahir terhadap virus dengue-imun ibu, mendapatkan antibodi virus dengue secara transplacentaria, mendukung ide peran *in vivo* pada ADE. Namun demikian, tingginya titer viremia anak dan dewasa dengan infeksi primer virus dengue dan secara klinik infeksi sekunder virus dengue ringan, menunjukkan terdapatnya faktor lain yang terlibat. Formasi kompleks imun *in vivo* sudah dideteksi hubungannya dengan aktivasi komplemen pada pasien dengan penyakit berat. Reaksi silang antibodi terhadap protein E dengan plasminogen dihubungkan dengan pendarahan pada dengue akut (Rothman, 2004).

Produksi sitokin dan sitolisis oleh aktivasi limfosit T adalah tambahan potensial mendukung penyakit. Peningkatan kadar sirkulasi dari marker aktivasi termasuk *soluble TNF receptors*, *soluble IL-2 receptors*, dan *soluble CD8* berhubungan dengan beratnya penyakit. Hubungan dengan beratnya penyakit ditunjukkan dengan ekspresi penanda aktivasi terhadap sirkulasi *CD8+T cells* dan ekspansi *epitope virus dengue* – populasi sel T spesifik. Peningkatan variasi produksi dari sitokin, termasuk

IFN- γ , TNF α , IL-10, dan *chemokin* dideteksi pada infeksi akut virus dengue. Peningkatan kadar sitokin tipe 1 dan tipe 2 dideteksi pada DBD. Durasi waktu dari produksi yang muncul, menjadi faktor penting induksi lebih awal sitokin tipe 1 dihubungkan dengan beratnya penyakit. Analisis *in vitro* dari respon sel T terhadap virus dengue sebelum infeksi sekunder, memperlihatkan hubungan diantara respon TNF α terhadap antigen virus dengue dan penyakit yang lebih berat pada infeksi berikutnya (Rothman, 2004).

Hal ini dapat dilihat dari tabel berikut :

Tabel 13: Dalil Mekanisme Patologik Virus Dengue – respon imun reaktif pada perkembangan DBD

1	Mekanisme Antibodi	:	Efek Postulat
2	Peningkatan Infeksi	:	Peningkatan infeksi seluler, Peningkatan beban virus
3	Formasi Imun Kompleks	:	Aktivasi Komplemen
4	Reaksi Silang terhadap koagulasi dan protein sel endotel Limfosit T	:	Pendarahan, disfungsi sel endotel
5	Produksi sitokin Pro Inflamasi	:	Peningkatan permeabilitas vaskular
6	Lysis of bystander (uninfected) cells		Kerusakan Hati

Menurut Delia (1998) sitokin yang terkait dengan viremia memegang peranan penting pada DBD. DSS sebagai komplikasi berat DBD, ditandai dengan peningkatan massif permeabilitas kapiler. Konsentrasi sitokin plasma secara prospektif diteliti pada 443 anak Vietnam dengan DBD dimana 6 pasien meninggal. Dari 188 anak yang masuk rumah sakit, 71 anak berkembang lebih lanjut menjadi DSS. Ekspektasi sebaliknya terhadap penanda inflamasi tertentu (*interleukin-6*, dan *ICAM* terlarut) adalah rendah pada kelompok syok dan hal ini menggambarkan

kehilangan protein umum dari sirkulasi yang disebabkan kebocoran plasma. Hanya kadar *TNFR* memperlihatkan suatu konsistensi dengan beratnya penyakit. Pada pasien dengan dugaan DBD tanpa syok, *TNFR* saat masuk dengan *TNFR*75 melebihi 55 pg/ml memprediksi berkembangnya lebih lanjut kejadian syok dengan resiko relatif 5.5 (95% CI, 2.3-13.2). Skala pelepasan lebih besar *TNFR* mungkin merupakan penanda awal perubahan yang menyebabkan DSS (Delia, 1998).

Berbasisikan penelitian sebelumnya Balmaseda (2005), Rachman (2009), Purba (2012), Nainggolan (2012) dan Widayat (2014), secara ringkas menunjukkan adanya suatu proses berkesinambungan dalam monitoring terhadap suatu pemberatan DBD. Penelitian diatas juga menunjukkan suatu upaya kritis terhadap *guidelines* WHO (1986, 1997) dalam konteks kebijakan dan filosofis penatalaksanaan DBD dan pemberatannya, apakah terdapat benang merah yang kuat dengan aplikasi di lapangan sehari hari jika diterapkan oleh dokter dari berbagai tingkatan pelayanan. Proses yang berjalan ini menunjukkan suatu analisis model prediktor yang berkembang terhadap DBD, akan senantiasa kontinu mencari perbaikan dikaitkan dengan mutu dan keselamatan pasien.

Model prediktor dari hasil penelitian ini, dilakukan dengan suatu analisis bivariat dari berbagai parameter yang diuji terhadap memberatnya DBD. Analisis bivariat dilakukan terhadap parameter laboratorium awal (leukosit, trombosit, albumin, natrium, kalium, Ig M Anti NS1, Ig G Anti NS1, dan $TNF\alpha$).

Pengolahan statistik dilakukan dengan uji chi square dan uji Fisher. Syarat variabel dimasukkan ke dalam analisis multivariat adalah secara statistik (nilai $p < 0,25$). Variabel yang memenuhi kriteria secara statistik adalah leukosit, trombosit, SGPT, IgM anti NS1 dan IgG anti NS1. Setelah

dianalisis model terpilih untuk menilai beratnya dengue adalah model 2 yang meliputi kadar leukosit, trombosit, Ig M anti NS1 dan Ig G Anti NS1.

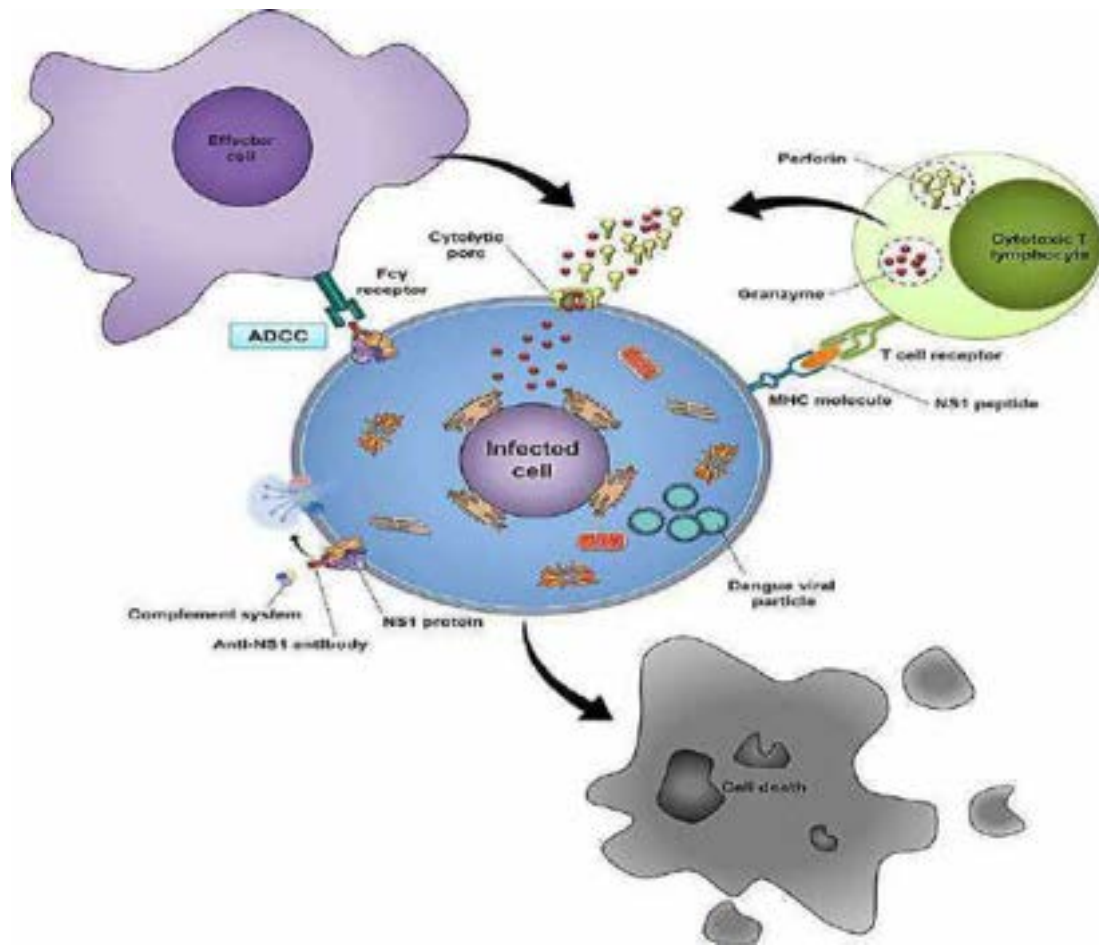
H. Rekonstruksi peran protein NS1 sebagai fungsi protektif

Analisis dan fungsi protektif NS1 dalam patogenesis dengue tidak mudah untuk diuraikan. Mengingat sebagian besar penelitian sebelumnya mengungkapkan mekanisme autoimun (*molecular mimicry*) berperan terhadap memberatnya dengue.

DEN V NS1 menunjukkan reaksi silang pada epitop yang membagi dengan sejumlah komponen sel inang dan autoantibodi diinduksi oleh faktor utama infeksi sekunder, yang akan berkontribusi terhadap kerusakan trombosit dan endotel, sehingga terjadi peningkatan permeabilitas pembuluh darah sebagai karakteristik DBD/DSS. Dalam proses dinamik sNS1 di dalam sirkulasi, sedikit diketahui interaksi diantara berbagai spesies saat perjalanan penyakit berlangsung, terkait dengan peran baik NS1 dan antibodi pada fase akut terhadap efek modulasi terjadinya interaksi, kompleks imun dan proses keseluruhannya (Muller et.al, 2013).

Meskipun banyak kesenjangan pengetahuan tentang struktur dan fungsi NS1, sebuah gambaran yang muncul, kunci protein virus yang terlibat dalam beberapa tahap siklus hidup virus dari peran penting replikasi virus RNA, untuk kontribusinya, agak kontradiktif terhadap induksi baik perlindungan dan patogenesis pada inang terinfeksi (Muller et.al, 2013).

Hal ini dapat dilihat dari gambar dibawah ini :



Gambar 27: Protein DEN V NS1 adalah target respon imun diinduksi oleh pendekatan vaksin. Sel sel terinfeksi memperlihatkan rantai panjang protein NS1 pada membran sitoplasmik yang mungkin menjadi target antibodi spesifik. Antibodi ini mungkin merekrut sistem komplemen atau sel efektor yang mungkin menginduksi *complement-dependent cell lysis* atau ADCC. Sebagai tambahan, epitop protein NS1 mungkin diproses dan dipresentasikan oleh molekul reseptor MHC I pada permukaan sel terinfeksi, mempresentasikan target dari sel T sitotoksik.

Penelitian NS1 berbasis imunisasi, dilakukan sebagai komponen virus ekstraseluler. Satu studi dengan model tikus melaporkan bahwa imunisasi pasif dengan anti antibodi NS1 mencegah penyakit mematikan diakibatkan DEN V. Sedangkan melalui intraperitoneal aktif atau imunisasi subkutan, protein NS1 rekombinan mengakibatkan proteksi parsial pada otak tikus dengan DEN V. Studi lebih lanjut terhadap kondisi *interferon-alpha receptor deficient* pada tikus menemukan protein DEN

NS1 bertindak sebagai efektor kunci yang meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. Kesimpulan penelitian ini mengungkapkan bahwa imunisasi lengkap NS1 dapat mencegah demam berdarah – dimediasi kebocoran vaskuler dengan melindungi *interferon alpha receptor* terhadap efek mematikan dari tantangan DENV2 (Liu Y *et al*, 2016)

Dalam konteks siklus hidup virus dengue, protein NS1 mewakili target untuk pengembangan vaksin karena sel sel yang terinfeksi baik protein NS1 rantai panjang dihubungkan dengan membran plasma dan peptida NS1 disajikan oleh molekul MHC Clas I. Rantai panjang protein mewakili target antibodi, yang merekrut protein protein komplemen atau sel efektor untuk membunuh sel terinfeksi. Sebagai tambahan, epitop protein NS1 berhubungan dengan molekul MHC I adalah target untuk sel T. Sejauh ini, jumlah yang cukup terhadap pendekatan vaksin sub unit berdasarkan protein NS1 (baik DNA, virus rekombinan atau pemurnian protein) sudah diinvestigasi dibawah kondisi non klinik (Amorim *et al*, 2014)

Benang merah yang mungkin dapat dijelaskan dari penelitian ini dimana pasien dengue dengan Ig M Anti NS1 memiliki fungsi protektif terhadap memberatnya dengue dapat dilihat dari proses perjalanan patogenesis dengue. Berdasarkan satu penelitian, Ig M Anti NS1 sebagai fungsi diagnostik dapat dideteksi pada hari ke satu sampai dengan hari kelima demam (Sankar *et al*, 2012).

Partikel virus dan memediasi komplemen pasien yang diteliti terdiri dari dua kelompok dengue yaitu demam hari ke 1-3 dan demam hari 4-5 dengan proporsi Ig M Anti NS1 kelompok kontrol (DBD Derajat I) sebesar 78,7 % dibandingkan kelompok kasus (DBD Derajat III/DSS) sebesar 30,4 % ($p < 0,001$, OR 0,12).

Jika dikaji berdasarkan perjalanan patogenesis dengue, replikasi RNA dengan peningkatan protein NS1 akan berperan sebagai efektor yang akan menyebabkan defisiensi dari *interferon-alpha receptor*. Respon

interferon merupakan lini pertama untuk menghambat infeksi virus saat menginfeksi pertama kali sel target. IFN akan berikatan dengan reseptor IFN dipermukaan sel target dan mengaktifkan JAK STAT (*transcription factor signaling pathway*) untuk menghambat translasi RNA virus dan sintesis virus. Kemampuan virus menanggulangi respon imun yang dimediasi IFN dengan mengurangi kemampuan reseptornya pada tahap lebih lanjut menyebabkan meningkatkan permeabilitas vaskuler sehingga terjadi kebocoran vaskuler (Liu *et al*, 2106 ; Tjahyono *et al*, 2011).

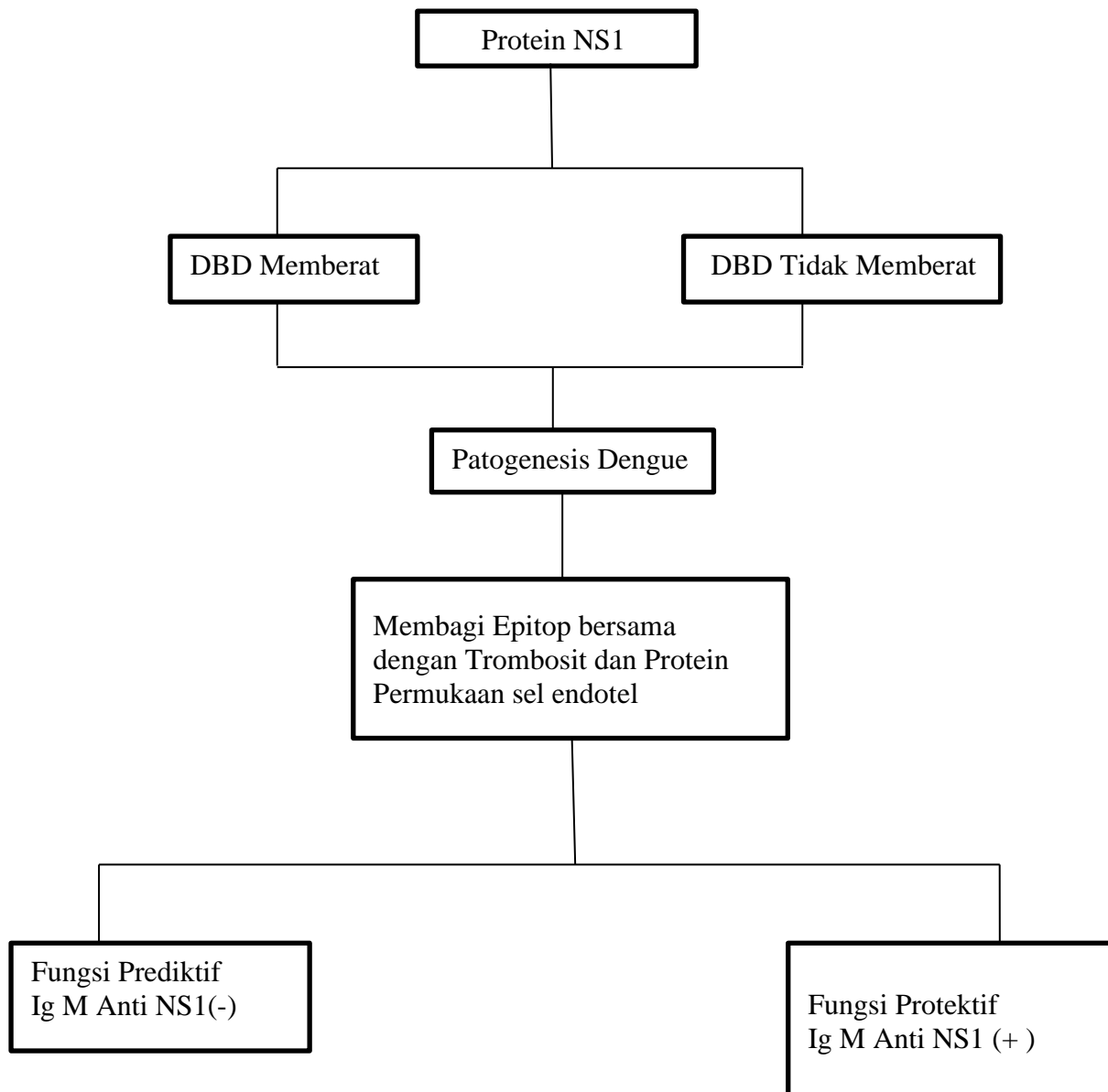
Seperti diketahui Ig M Anti NS1 merupakan respons imun adaptif terhadap infeksi virus dengue, yang memiliki kemampuan memblokir ikatan virus dengan sel sasaran serta mencegah masuknya virus ke dalam sel inang. Antibodi memiliki peran efektif mengeliminasi virus selama virus di ekstraseluler. Ig M Anti NS1 sebagai antibodi memiliki peran dalam netralisasi, opsonisasi atau penyelubungan yang mempengaruhi sel fagosit untuk membersihkan virus tersebut (Nasronudin, 2011).

Hal yang menarik untuk dianalisis dari penelitian ini adalah dimana peranan Ig M NS1 sebagai faktor protektif pada DBD Derajat I. Perlu dicari benang merah untuk mengungkap hal tersebut. Pada pasien DBD yang sudah memiliki Antibodi NS1 kemungkinan sudah memiliki sistem imun yang memperkuat sistem imun dari tahap awal yaitu peran dari Interferon sehingga tidak terjadi defisiensi alpha receptor, dan pada tahap awal IFN sudah berfungsi optimal untuk mengeliminasi virus, yang secara dinamis tidak terjadi peningkatan permeabilitas kapiler.

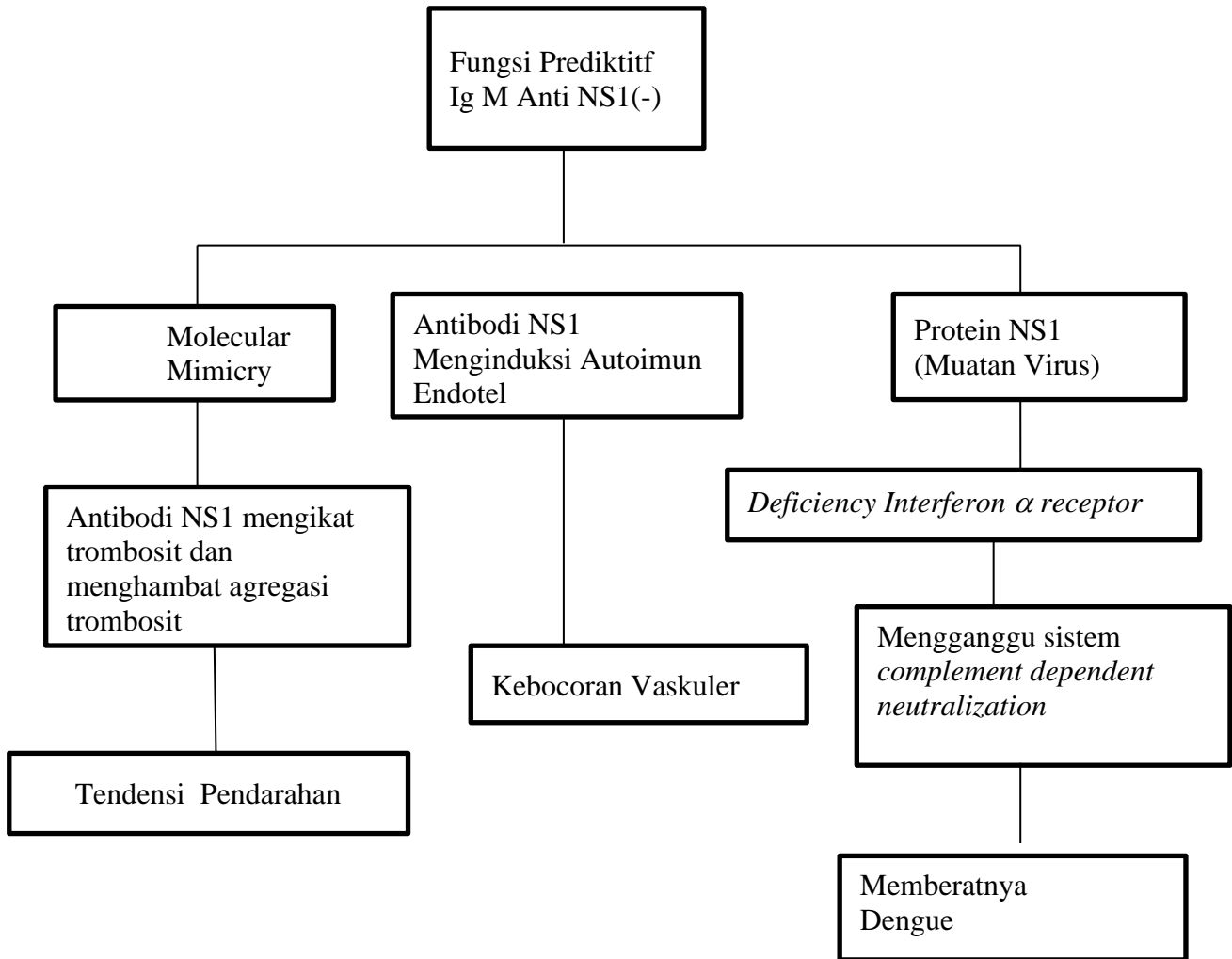
Dengan demikian algoritma Fungsi Prediktif dan Protektif Protein NS1 yang kami ajukan dalam pembahasan ini.

Fungsi Protektif dari DBD ini juga dapat dilihat dari hasil penelitian tentang apus tebal sitokimia untuk melihat *performance* Antibodi NS1 terhadap viral dengue. Gambaran mikroskopis sediaan apus darah tebal

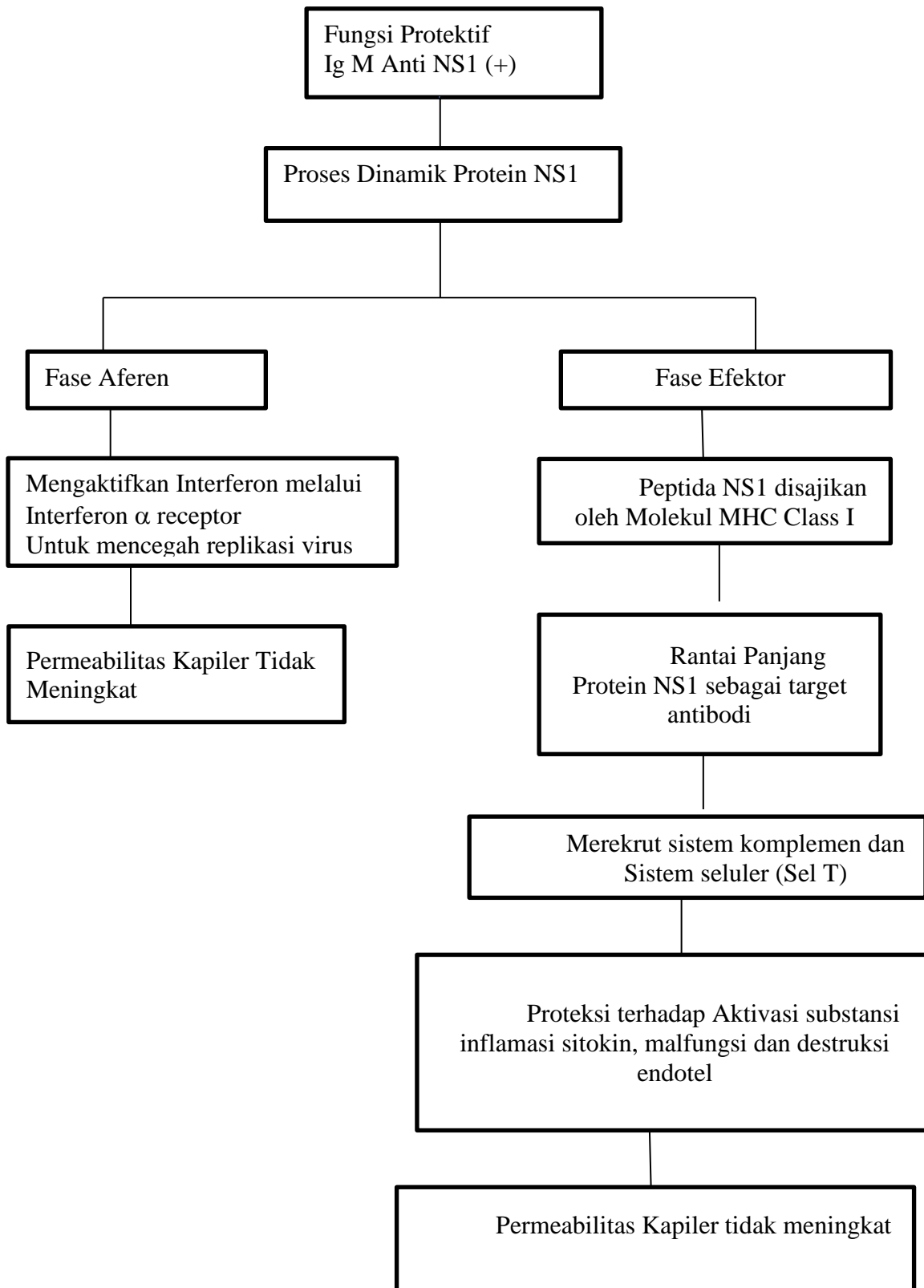
pasien dengan infeksi sekunder (positif IgM dan IgG) yang belum memiliki IgM anti NS1 terbukti menunjukkan infektivitas yang tinggi pada monosit (Gambar 31 atas), sedangkan gambaran mikroskopis sediaan apusan darah tipis dengan infeksi sekunder (positif IgM dan IgG) yang telah memiliki IgM anti NS1 menunjukkan hasil negatif) Ini memperkuat hasil analisis multivariat yang menunjukkan bahwa hasil negatif IgM anti NS1 secara bermakna berhubungan dengan memberatnya infeksi dengue ($P < 0,001$) sampai 11x (OR= 11,11). Hasil ini tidak sesuai dengan hipotesis pada penelitian ini yang menyatakan bahwa antibodi NS1 merupakan prediktor memberatnya DBD.



Algoritma Fungsi Prediktif an Protektif Protein NS1



Lanjutan : Algoritma Fungsi Protektif Protein NS1



I. Keterbatasan Penelitian

Penelitian Antibodi NS1 pada Demam Berdarah Dengue merupakan penelitian case control terhadap DBD Derajat I yang masuk UGD RSPAD Gatot Soebroto. Pada tahap awal pasien masuk dilakukan pemeriksaan darah lengkap dan diambil serum pasien untuk pemeriksaan Antibodi NS1. Beberapa keterbatasan dalam penelitian ini adalah: 1) pasien yang masuk terdiri dari dua katagori yaitu demam dibawah tiga hari dan demam dibawah lima hari. Kondisi ini menjadi keterbatasan dalam penilaian proses patogenesis DBD dikaitkan dengan kondisi spesifik pasien yang ditemukan, terutama dalam menilai kondisi proses inflamasi untuk pemeriksaan TNF α dan menilai respon antibodi (Antibodi NS1); 2) pasien yang masuk tidak dapat ditentukan kondisi infeksi primer dan sekunder. Hal ini didapatkannya variasi data Ig M dan Ig G Anti dengue yang tidak seluruhnya pasitif, namun secara klinis berdasarkan WHO 1997 masuk kriteria untuk DBD; 3) masih kurangnya sampel penelitian berdasarkan hubungan statistik namun secara power penelitian dapat dilakukan suatu analisis; dan 4) tidak dilakukannya suatu penilaian kinetik dari Ig M dan Ig G Anti NS1 dalam pemantauan pasien kelompok kontrol (DBD Derajat I) dan kelompok kasus (DBD Derajat III) sehingga dalam penelitian ini tidak dapat ditentukan suatu kinetika dari Ig M Anti NS1 dan Ig G Anti NS1 untuk menilai suatu prediktor suatu penyakit.

Keterbatasan penelitian dari jumlah sampel adalah dari jumlah yang seharusnya direkrut dalam rencana penelitian adalah 556 sampel dengan 102 DBD yang memberat namun yang didapatkan adalah 156 sampel dengan 26 sampel DBD memberat. Hal ini terkait dengan keterbatasan waktu pengumpulan sampel

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. .Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan dapat diambil kesimpulan:

1. Antibodi NS1 tidak bisa menjadi prediktor memberatnya demam berdarah dengue, namun sebagai fungsi protektif.
2. Terhadap faktor faktor yang berhubungan dengan memberatnya demam berdarah dengue didapatkan nafsu makan menurun, hepatomegali, tekanan darah sistolik dan trombosit awal.
3. Melalui modelling, didapatkan hasil modelling menunjukkan angka trombosit, nilai SGPT, angka leukosit, Ig M Anti NS1 dan Ig G Anti NS1 merupakan prediktor memberatnya demam berdarah dengue.

B. Saran

Berdasarkan hasil dan analisis pada penelitian ini, disarankan beberapa hal berikut:

1. Dalam mengkaji peran dan variasi faktor faktor yang berpengaruh pada pasien DBD dengan derajat manifestasi klinis yang ditimbulkannya, selain analisis tentang gambaran faktor klinis dan laboratorium yang berperan dalam memberatnya DBD, diperlukan pula analisis tentang pengaruh peran infeksi primer dan infeksi sekunder terhadap perbedaan nilai variabel yang diperiksa. Untuk mendukung ketepatan hasil analisis diperlukan penelitian lanjutan dengan memperbesar jumlah sampel pasangan antara penderita

derajat manifestasi berat dengan kejadian infeksi lanjutan dengan pemeriksaan serial IgM Anti NS1 dan Ig G Anti NS1.

2. Guna meningkatkan ketepatan hasil analisis dengan menggunakan variasi OD Antibodi NS1 (IgM dan AgG Anti NS1) menggunakan variasi klinis dan laboratorium yang ada (faktor yang mempengaruhi) diperlukan suatu kesesuaian dan distribusi serta proporsi antibodi NS1 sebagai faktor determinan prediktor atau protektif memberatnya DBD dalam perjalanan klinis, diperlukan penelitian-penelitian pendukung sebagai berikut: 1) penelitian tentang serial Antibodi NS1 pada fase viremia, fase kritis dan fase recovery; 2) penelitian lanjutan untuk mendapatkan kejelasan tentang pengaruh komposisi antigen NS1 tentang sifat dan potensi antigeniknya, serta kapasitas untuk berperan terbentuknya antibodi NS1; dan 3) diperlukan kajian lebih lanjut tentang tingkat kesesuaian distribusi dan proporsi Antibodi NS1 dengan perangkat antigen Dengue 1 sampai dengan 4 yang berpengaruh terhadap prediksi memberatnya DBD.
3. Model prediktor yang dilakukan sebelumnya merupakan kasanah yang sangat berguna dalam memprediksi DBD dengan varian klinik dan perubahan perubahan yang tidak bisa diprediksi terkait dengan masih banyaknya misteri dari proses imunopatogenesis DBD. Sebaiknya dilakukan suatu pengembangan lebih lanjut menguji model prediktor tersebut dalam satu rangkaian benang merah yang dapat diaplikasikan di bidang klinis.

C. SUMMARY

Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Demam dengue (DF), and Dengue Shock Syndrome (DSS) are viral infections caused by Flavivirus with a very broad spectrum and clinical variant. DHF, during its clinical

course, in the area of epidemiology and immunopathogenesis shows manifestations and clinical impacts which are occasionally distinct from the natural pattern and clinical sign that has been defined by WHO guidelines or other clinical guidelines from the health policy.

As we have already known, DHF evokes huge burden of health, social conditions, and economy in the endemic areas. Globally, the number of Disability-Adjusted Life Years (DALYs) lost in 2001 amounted to 528. Based on research in Puerto Rico (1984 and 1994), an annual estimation of 580 DALYs per one million residents lost due to dengue is equal to the cumulative number of DALYs lost from malaria, tuberculosis, worm diseases, and diseases of children in Latin America and the Caribbean. While in Southeast Asia, based on prospective study of school children, the average annual burden of dengue in the period of 5 years is 465.3 DALYs per one million inhabitants, with patients who were not treated accounted for 44 – 73 %.

What lessons can we obtain from these situations? Isn't it a long time the world authority (WHO), government, and experts have been formulating many strategies for resolving DHF supported by a number of researches? According to that consideration, the policies and management of DHF are supposed to be able to be implemented optimally. However, it is not a simple task regarding DHF is included in the category of re-emerging diseases in which the development process of the disease is not merely a viral infection that attacks human with various symptoms when entering hospital care, but also a multifactorial process that occurs to the patient suffering from DHF.

The multifactorial process could be divided into two aspects. The first is the upstream aspect. The upstream aspect encompasses climate change, the behavior of healthy living, and environmental health, including various policies and SOP (Standard Operational Procedure) prepared for

anticipating the occurrence of an extraordinary event based on approach of early warning. In this case, a map showing endemic region of DHF is an important thing. According to the global report by WHO, dengue have been increased to thirty-fold for the last five decades. Of the 2.5 billion of the world population, it is estimated that there are 50-100 million cases annually in more than 100 endemic countries. Every year, 100 thousand cases raises with total 20,000 death. DHF cases in Indonesia has increased since 1968 and the spread has occurred to many provinces and districts/cities, from 2 provinces and 2 cities, to 32 (97%) and 382 (77%) districts/cities in 2009. In 2007, the number of cases climbed to 156,767 (IR 71.18) with 1570 deaths (CFR 1.00%). In 2008, total cases of dengue decreased to 98,869 (IR 43.62) and 158,912 patients in 2009. The second aspect of multifactorial process is downstream aspect. Downstream aspect includes the clinical course (including pathogenesis) of patients associated with the immune system condition and the level of severity of the illness when patients admitted to the hospital.

The development of science of DHF on immunopathogenesis-based approach has been progressing rapidly. This condition is caused by a gap between the WHO guidelines for treating DHF, with the impact and application in real practice. It triggered some researches to analyse the various factors that can be served as reference aggravating the DHF.

Several studies have been done to solve the complexity of the disease. Research by Balmaseda (2005) was a study conducted in Nicaragua concerning about the predictor parameters for DHF, which was carried out from January 1999 until December 2001 at three major hospitals in Nicaragua. The research done on 1671 cases of dengue was about to see the effectiveness of the WHO classification schemes of DHF associated with the severity of the disease. The WHO classification of DHF and DSS was compared to the presence of hemorrhagic

manifestations, increase of vascular permeability, thrombocytopenia, and shock on 114 infants, 1211 children, and 346 adults. The study found that the criteria of WHO failed to detect a significant number of patients with severe manifestations, particularly in adults. All four dengue virus serotypes (DEN 1-4) cause a wide spectrum of disease from fever which is self-limited to dengue and life-threatening phase of DHF and DSS.

WHO and Pan American Health Organization are using the criteria of the WHO 1986 for classifying the severity of dengue. Dengue fever and DHF compared to mild dengue fever, DHF, and DSS are considered as severe disease syndrome. The research revealed that more than half of patients from all level of age with shock did not meet the criteria of DHF/DSS and the classification of DHF/DSS cannot identify cases of adults with one or more severe manifestations. From dengue cases that were classified into dengue fever /mild DHF, 39 (49%) babies, 419 (44%) children, and 102 (32%) adults emerged with at least a severe clinical manifestations. Furthermore, more than 50% of infants with shock, more than 50% of children with internal bleeding, shock and severe thrombocytopenia, and over 60% of adults with a couple or four severe manifestations that are internal bleeding (i.e. 80%), plasma leakage (60%), shock (77%), severe thrombocytopenia <50,000 (73%) were not classified as DHF/DSS. Based on research above, classification of DHF/DSS that is being used effectively to identify severe dengue particularly in Asia is unable to be used universally for clinical management and classification of cases. This is due to the weakness of the technology or resources in monitoring and capturing data that are required to meet the needs of the cases. If the WHO criteria is rigidly followed, many shock and fatal cases will not be able to be detected. The research of dengue cases in Nicaragua with the classification of the dengue fever/mild DHF, 32-49% of the cases have at least one clinical

manifestation. Therefore, it is necessary to do standardization and have guidance towards the possibility of the occurrence of severe DHF based on geography. One of the concerns is the platelets under 50,000.

Following up the process of scientific development of dengue, the realm of current and future researches is to bridge the two sides of a coin. The first is the realm of epidemiology and the second is the realm of the expected impact of clinical epidemiology based on immunopathogenesis.

The link that is being developed is to observe the approach of patients' clinical aspect, which needs a larger effort to understand the clinical course and immunopathogenesis of the disease. Severe DHF with bleeding, shock, and multi-organ complication is a downstream condition of patients admitted to the hospital. These complications show the complexity of the disease that needs a measured parameter to derajat the severity of DHF. Therefore, management of the disease can be done progressively and optimally. To deal with the aforementioned problems, WHO (2009 and 2011) has released guidelines of dengue particularly in determining early warning, comprehensive management, and atypical cases (extended). Several DHF experts have also tried to evaluate the disease through clinical and lab changes parameters such as abnormal liver function, several inflammation markers as the predictor of severe DHF. Through this concept, a scoring system was made to grade the severity of DHF. It is hoped that the number of mortality is able to be decreased. Management of severe DHF requires a long process and learning-by-doing. Doctors and health workers need to be trained consistently and continuously based on cases to be able to examine, investigate, and identify every early warning of DHF patients that enter the hospital, so that early and progressive management can be initiated.

The approach of immunopathogenesis of DHF becomes the center of knowledge and research to reveal the core process of DHF severity development. One aspect that is still a controversy is the role of NS1 protein in virus replication and pathogenesis that involves autoimmune mechanism in increasing the severity of DHF.

The role of NS1 protein in the pathogenesis and immune response avoidance by molecular and cellular mechanism that is involved in etiology of DHF and DSS is still difficult to understand. Current hypothesis connects the function of NS1 with the dysfunction of immune system and defect of circulation system due to the generation of antibody reaction, which causes thrombocyte depletion, endothelial cell apoptosis and complement activation by destructing the host cell tissue. Therefore, NS1 participation in the pathogenesis of DHF and DSS is associated with autoimmune mechanism.

While the autoimmune mechanism that involves NS1 antibody (IgM Anti NS1 and IgG Anti NS1) is associated with autoimmune phenomenon in DHF pathogenesis. Mechanism of autoimmune that involves NS1 protein encompasses the involvement of NS1 protein in the pathogenesis of DEN V. NS1 protein shares epitope with thrombocyte and endothelial cell surface protein. Molecular mimicry allows antibody anti NS1 to bind thrombocyte and inhibit aggregation, which increases the tendency to bleed. Antibody anti NS1 also induces autoimmune damage of the endothelial cell of blood vessel and causes plasma leakage. In addition, NS1 protein contributes to the increasing virus load by interfering the complement system, showing protection of DENV particle from other particles.

Reviewing the a fore mentioned ideas, it shows the importance of studying the role of NS1 antibody in the clinical field with an emphasis on pathogenesis. Previous research on NS1 antibody (IgG anti NS1) was

done using cross-sectional design study to observe highest titer and its lowering. According to that, a case control study that was followed by cohort method towards DHF patients that undergo increased DHF severity becomes the basis of this research.

This research was done from January 2012 to December 2014 in General Ward of Department of Internal Medicine Gatot Subroto Army Hospital with 156 patients that fulfill the inclusion criteria. Among 156 DHF patients, there were 101 men (64.7%) and 55 women (35.3%). Age ranged from 14 to 62 years old with the average age $28,73 \pm 10,09$ years old. From this number, 124 patients have been diagnosed with DHF Grade I, 6 patients with DHF Grade II, 20 patients with DHF Grade III, and 6 patients with DSS. The most significant signs and symptoms on DHF Grade I patients were headache (82.0%), nausea and throw up (81.6%), decreased appetite (70.4%), joint pain (83.5%), retroorbital pain (81.4%), petechiae DHF Grade I (69.2%) and DHF Grade III (30.8%). Based on the correlation of various clinical variables and demography, the duration of fever was obtained with OR 1.29, headache with OR 6.72, decreased appetite with OR 6.72, retroorbital pain with OR 1.28, rumple leed with OR 1.44, hepatomegaly with OR 23.45, and inflammation signs with OR 3.81. Through physical examination, the systolic blood pressure was found with $p = 0.051$, initial thrombocyte value $p < 0.0001$. After multivariate analysis towards factors that was associated with the increasing severity of DHF by Hosmer and Lemeshow test step 9, it was found that four variables were associated clinically and statistically, including: decreased appetite with $p = 0.007$ (OR 4.87), hepatomegaly with $p = 0.009$ (OR 27.00), systolic blood pressure with $p = 0.037$ (OR 0.95), and initial thrombocyte with $p = 0.000$ (OR 0.97).

Characteristics of increasing DHF severity include average initial thrombocyte of 59,500 U/L ($p < 0.001$) and average thrombocyte after 4-5

days of treatment that was 28,500 U/L (p.0.001). Analysis of the relationship between antibody NS1 with thrombocytopenia and TNF alpha on severe DHF showed proportion of IgM anti NS1 (+) towards thrombocyte > 50,000 as much as 20.0% compared to thrombocyte < 50,000 as much as 27.3%, and proportion of TNF alpha (+) towards thrombocyte < 50,000 as much as 20.0% compared to thrombocyte > 50,000 as much as 33.3%. After multivariate analysis that involved IgM anti NS1 and IgG anti NS1, the probability to develop severe DHF with thrombocyte < 50,000 was found (p 0.050 and OR 3.4). Proportion of IgM anti NS1 (+) in the control group (DHF derajat I), that was as much as 78.7%, was more than the proportion in the case group (DHF derajat III/DSS), that was as much as 30.4% (p <0.001, OR 0.12). After multivariate analysis and probability test towards clinical parameter thrombocyte, leucocyte, SGPT, IgM anti NS1, and IgG Anti NS1 as predictor models, with the logistic formula $y = -6.24 + 3.09 \cdot \text{leucocyte} + 2.23 \cdot \text{thrombocyte} + 1.77 \cdot \text{IgM anti NS1} + 2.03 \cdot \text{IgG anti NS1}$; AUC value (CI 95%) 0.865 (0.781 - 0.950); and Hosmer and Lemeshow test, it was found that p = 0.394.

In conclusion, IgM antibody anti NS1 positive was found proportionally higher in the control group (DHF derajat I/II) with (p < 0.001, OR 0.12). Based on multivariate analysis and related to the parameters that indicates the increasing severity of DHF including thrombocyte level, SGPT and leucocyte level, IgM anti NS positive cannot be used as a predictor of severe DHF, but is protective factor towards the clinical course of the increasing severity of DHF.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. (2005) Immunity to Viruses. *In. Cellular and Molecular Immunology*. Fifth Edition. Editors: Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. Philadelphia: Elsevier, Pp : 247-359
- Agnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. (1999) Bystander Target Cell Lysis and Cytokine Production by Dengue Virus-Specific Human CD41 Cytotoxic T-Lymphocyte Clones. *Journal of Virology*, p: 3623–29
- Anonim, 2005. *Histology and Immunocytochemistry*. Available at website:(URL www.hmds.org.uk/histology.html)
- Amorim JH, Santo Alves RP, Boscardin SB, Souza Ferrerira LC. (2014) Silvia Beatriz Boscardin, Luís Carlos de Souza Ferreira . The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. *Virus Research* ; 181 : 53–60
- Aryati. (2008) *Update On Laboratory Diagnostic of Dengue Infection*. Prosiding dalam Simposium Nasional Penyakit Tropik – Infeksi dan HIV dan AIDS. Surabaya: Divisi Penyakit Tropik-Infeksi Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK Unair dan Institute Of Tropical Disease UNAIR.
- Avirutnan, P., Zhang, L., Punyadee, N., Manuyakorn, A., Puttikhun, C. (2007) Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate EE. *PloS Pathog*, 3(11): 1798-1812.
- Balmaseda, A., Hammond, N. S., Perez, M. A., Cuadra, R., Solano, S. (2005) Short Report Assesment of The World Health Organization Scheme for Classification of Dengue Severity in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 73:(6)1059-62.
- Beatty, P. R., Puerta-Guardo, H., Killingbeck, S. S., Glasner, D. R., Harris, E. (2015) Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med*, 7(304):141.

- Birnbaumer, D. M. (2007) Fever in the Returning Traveler. In: Slaven, E. M., Stone, S. C., Lopez, F. A. (Editors). *Infectious Diseases Emergency Department Diagnosis & Management*. Mc Graw-Hill, pp. 418-27.
- Boonnak, K., Slike, B. M., Burgess, T. H., Mason, R. M., Jue, W. S. (2008) Role of Dendritic Cells in Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *Journal of virology*, 3939–51.
- Cardosa & Tio. (1991) Dot Enzyme Immunoassay: an Alternative Diagnostic Aid for Demam dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. *Bulletin of the WHO*, 69:(6) 741-45.
- Catharina. (2001) Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. In: *Dengue Hemorrhagic Fever in Indonesia: the role cytokines in plasma leakage, coagulation and fibrinolysis*. Nijmegen University Press. Dinsdag, pp. 15-23.
- Chiou-Feng, L., Huan-Yao, L., Ai-Li, S., Hsiao-Sheng, L., Shun-Hua, C. (2002) Endothelial Cell Apoptosis Induced by Antibodies Against Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Via Production of Nitric Oxide. Endothelial Cell Apoptosis Induced by Antibodies Against Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Via Production of Nitric Oxide *The Journal of Immunology*, 169: 657–664.
- Chunge, E., Poli, L., Roche, C., Gestas, P., Glaziou, P. (1994) Correlation between Detection Of Cross Reactive Antibodies and Hemorrhage in Dengue Virus Infection. *The Journal Of Infectious Diseases*, 170:4-7.
- Costa, S. M., Azevedo, A. S., Paes, M. V., Sarges, F. S., Freire, M. S. (2007) DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology*, 358: 413–423.
- Dash, A. P., Bathia, R., Kalra, N. L. (2012) Dengue in South-East Asia: an appraisal of case management and vector control. *Dengue Bulletin WHO South East Asia Region*, 36(1) 1-2.

- Dejnirattisai, W., Webb, A. I., Chan, V., Jumnainsong, A., Davidson, A. (2011) Lectin Switching During Dengue Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 203: 1775–83.
- Delia, B. B., Karin, F., Cao, X. T. P., Nicholas, P. J. D., Pham, T. P. (1998) Pathophysiologic and Prognostic Role of Cytokines in Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 177:778–82.
- Dewi. (2004) Prediktor terjadinya renjatan pada DBD. *Tesis*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Dussart, P., Labeau, B., Lagathu, G., Louis, P., Nuners, M. R. T. (2006) Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in human Serum. *Clinical and Vaccine Immunology*, 113:(11) 1185-89.
- Fanani MZ (2011) Arsitektur Genom Virus Dengue dan Peluang Disain Inhibitor. Program Magister Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga) Tugas Perkuliahan Bioteknologi Mikroorganisme S2 Kimia UNAIR).
<https://mazfanani.wordpress.com>
- Feng, L. C., Yao, L. H., Chuan, L. C., Sheng, L. H., Ming, Y. T. (2001) Generation Of IgM Anti Platelet Autoantibody in Dengue Patients. *Journal Of Medical Virologi*, 63: 143-49.
- Fenglin, C. F., Chiu, S. C., Hsiao, Y. L., Wan, S. W., Lei, H. Y. (2005) Expression of Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecules Endothelial Cell Activation Induced by Antibodies against Dengue Virus Nonstructural Protein. *The Journal of Immunology*, 174: 395–403.
- Fenglin, C. F., Lei, H. Y., Shiau, A. L., Liu, H. S., Yeh, T. M. (2002) Endothelial Cell Apoptosis Induced by Antibodies Against Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Via Production of Nitric Oxide. *The Journal of Immunology*, 169: 657–664.
- Fenglin, C. F., Lei, H. Y., Shiau, A. L., Liu, H. S., Yeh, T. M. (2008) Patient and mouse antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 cross-react with platelets and cause their

dysfunction or depletion. *American Journal of Infectious Diseases*. January 2008

- Fujinami, R. S., Von-Herrath, M. G., Christen, U., Whitton, L. (2006) Molecular Mimicry, Bystander Activation or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clinical Microbiology Reviews* p 80-84.
- Falconar A.K.I, Martnez F. The NS1 Glycoprotein Can Generate Dramatic Antibody-Enhanced Dengue Viral Replication in Normal Out-Bred Mice Resulting in Lethal Multi-Organ Disease. *PLoS ONE* 6(6): e21024. doi:10.1371/journal.pone.0021024, June 2011
- Gayatri, P. (1997) Faktor-Faktor Prognosis Terjadinya Renjatan Demam Berdarah Dengue. *Tesis*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Goncalvez, A. P., Engle, R. E., Claire, M. S., Purcell, R. H., Ching-Juh, L. (2007) Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection *in vitro* and *in vivo* and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci.*, 104(22):9422-7.
- Gorp, E. C. M., Suharti, C., Mairuhu, A. T. A. (2002) Changes in The Plasma Lipid Profile as a Potential Predictor of Clinical outcome in Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Infectious Diseases*; 34:1150-3.
- Guzman, M. G., Kouri, G. (2002) Dengue: an Update. *Lancet*, 2: 33-42.
- Guzman, M. G., Alvarez, M., Rodriguez-Roche, R., LídiceBernardo, Vazquez, S. (2007) Neutralizing Antibodies after Infection with Dengue 1 Virus. *Emerging Infectious Diseases*,13(2): 282-86.
- Hadi, U. (2007) Tatalaksana terhadap DBD pada Orang Dewasa. Dalam: Nasronudin, H. U., Vitanata, Bramantono, Soewandojo, E. Penyakit Infeksi di Indonesia. Surabaya: Airlangga University Press hal 69-78.
- Hadinegoro. (1996) Telaah endotoksemia pada perjalanan penyakit demam berdarah dengue, perhatian khusus pada syok, produksi TNF α , Interleukin-6, dan endotoksin sebagai factor predictor

- demam berdarah dengue berat. *Disertasi*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Hadinegoro. (2001) *Imunopatogenesis Demam Berdarah Dengue*. Dalam: Akib, A. A., Tumbelaka, A. R., Matondang, C. S., (editors). *Pendekatan Immunologis berbagai Penyakit Alergi dan Infeksi*. Jakarta: 41-57.
- Halstead, S. B. (2007). Dengue Epidemiology part II. *J.Gen. Virol* . 88: 365-77
- Halstead, S. B. (2008A) Pathophysiology. In Halstead, S. B. (Ed). *Dengue: Tropical Medicine science and Practise:International Vaccine Institute Korea*; 5 :285-88.
- Halstead, S. B. (2008B) Dengue Hemorrhagic Fever is Caused by Autoimmune Phenomena Triggered by a Dengue Viral Infection: Controversy. In Halstead SB.(Ed) *Dengue: Tropical Medicine science and Practise: International Vaccine Institute Korea*; 5: 472-74.
- Halstead, SB.(2008 C). Dengue : Overview and History. In Dengue . In Halstead, S. B. (Ed). *Dengue: Tropical Medicine science and Practise:International Vaccine Institute Korea*; 5 : 18-20.
- Harris, E., Videa, R., Pe´rez, L., Sandoval, E., Te´llez, Y. (2000) Clinical, Epidemiologic, and Virologic Features of Dengue in the 1998 Epidemic in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 63:(1, 2) 5–11.
- Harun, S. R. (1996) Telaah endotoksemia pada perjalanan penyakit demam berdarah dengue, perhatian khusus pada syok, produksi TNF α , Interleukin -6, dan endotoksin sebagai factor predictor demam berdarah dengue berat. *Disertasi*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Henchal, E. A., Henchal, L. S., Schlesinger. (1998) Synergistic Interactions Of Anti NS1 Monoclonal Antibodies Protect Passively Immunized Mice from Lethal Challenge with Dengue 2 Virus. Department of Virology, U.S. Army Medical Component, Armed Forces Research Institute of The Medical Sciences, 315/6 Rajavithi Road, Bangkok 10400, Thailand and Department

of Medicine, Rochester General Hospital and the University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, New York 14621, U.S.A.

- Henchal, E.A. and Putnak, J.R. (1990). The Dengue Viruses. *Clin Microbiol Rev.* 3(4): 376–396.
- Herrmann, J.E. (1995). Immunoassays for The Diagnosis of Infectious Diseases In : P.R. Murray (ed): *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. ASM Press. Washington D.C. pp. 110-122
- Hou-Chang, H., Fen-Syu, H., Ming, W. Y., Shan, S. D., Hwa, S. (2002) Facilitation of Cell Adhesion by Immobilized Dengue Viral Nonstructural Protein 1 (NS1): Arginine-Glycine-Aspartic Acid Structural Mimicry within the Dengue Viral NS1 Antigen. *The Journal of Infectious Diseases*, 186:743–51.
- Hsien-Jen, C., Huand-Yao, L., Chiou-Feng, L., Yueh-Hsia, L., Shu-Wen, W. (2009) Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. *Molecular Immunology*, 47 : p 398–406.
- Huan-Yao, L., Trai-Ming, Y., Hsiao-Sheng, L., Yee-Shin, L., Shun-Hua, C., Ching-Chuan, L. (2001) Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *Journal of Biomedical Science*, 8:377-388.
- Juffrie, M., Vande, G. M. M., Hassnoot, K., Groen, J., Sutaryo, Hack, C. E. (1999) Early clinical and laboratory indicators for development of shock in children with dengue virus infection. *Crit Care & Shock*; 4: 201-7.
- Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S. (2000) Clinical and laboratory presentation of dengue patients with different serotypes. *Dengue Bulletin*, 24 :53-59.
- Koraka, P. C. C. S., Setiati, T. E. (2001) Kinetic of Dengue Virus Specific Serum Immunoglobulin Classes and Subclasses Correlate with Clinical outcome of Infection. *Journal of clinical microbiol*; 39 (12).2: 4332-8.
- Krishnamurti, C., Peat, R. A., Cutting, M. A., Rothwell, S. W. (2002) Platelet adhesion todengue-2 virus-infected endothelial cells. *Department of Blood Research, Walte Reed Army Institute of*

Research, Silver Spring, Maryland Am. J. Trop. Med. Hyg., 66(4), pp. 435–441.

- Kyle, J. L., Beatty, R. P., Harris, E. (2007) Dengue Virus Infects Macrophages and Dendritic Cells in a Mouse Model of Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 195:1808–17.
- Lei, H. Y., Huang, K. J., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, H. S. (2008) Immuno pathogenesis of Dengue Haemorrhagic Fever. *Am. J. Infect. Dis.*, 4(1):1-9.
- Lin, C. F., Lei, H. Y., Shiau, A. L., Liu, C. C., Liu, H. S. (2003) Antibodies From Dengue Patient Sera Cross- React With Endothelial Cells and Induce Damage. *Journal of Medical Virology*, 69 : 82-90.
- Low, J. G. H., Eong, O. O. I. E., Tolvenstam, T., Yee-Sin, L., Martin, H. (2006) Early dengue infection and outcome study (EDEN). *Annal of The Academy of Medicine Singapore*, 35: 783-89.
- Liu Y, Liu J, Cheng G (2016). Vaccines and immunization strategies for dengue prevention. *Emerging Microbes and Infection*, 5, e77; doi :10.1038/emi.2016.74;published on.line 20 Juli 2016
- Markoff, L. J., Innis, B. L., Houghten, R., Henchal, L. S. (1991) Development of Cross-Reactive Antibodies to Plasminogen during the Immune Response to Dengue Virus Infection
Author(s): Lewis J. Markoff, Bruce L. Innis, Richard Houghten, Laraine S. Henchal Source: *The Journal of Infectious Diseases*, 164 : 294-301.
- Martina, B. E. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009) Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical microbiology reviews*, p. 564–581.
- Monath, P. (1991) *Viral Febrile Illnesses*. In: Strickland G. *Hunters tropical medicine*. WB.Saunderscompany: 200-207.
- Morens. (2008) Dengue Hemorrhagic Fever is Caused by Autoimmune Phenomena Triggered by a Dengue Viral Infection: Controversi. In Halstead, S. B. (ed) *Dengue: Tropical Medicine science and Practise: International Vaccine*. Institute Korea, 5: 469-71.

- Mulyaningrum. (2010) Evaluasi uji Imunositokimia untuk Deteksi Infeksi Virus Dengue pada Sediaan Apus Darah Tipis dan Tebal Penderita Demam. *Tesis* Yogyakarta: Program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Tropis, Universitas Gadjah Mada.
- Murphy K., Travers, P., Walport, M. 2008. *Janeway's Immuno Biology* 7thed. Garland Science. Publishing, USA. America.
- Martins S, Silveira GF, Alves LR, Santos CND, Bordignon J. (2012) Dendritic Cell Apoptosis and the Pathogenesis of Dengue. *Virus* (4): 2736-2753)
- Muller DA, Young PR. (2013) The Flavivirus NS1 protein : Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic marker. *Antiviral Research* ; 98. p.192-208
- Nainggolan, L. (2012) Pengembangan system skor sebagai predictor kebocoran Plasma pada Demam Berdarah Dengue: Peran sTNFR-1, VEGF, sVE-Cadherin dalam patofisiologi Kebocoran Plasma. *Disertasi*, Jakarta: FKUI.
- Nasronuddin. (2007) *Imuno patofisiologi molekuler Infeksi Virus Dengue*. Dalam Nasronuddin, H. U., Vitanala. Penyakit Infeksi di Indonesia Solusi Kini dan Mendatang, Surabaya: Airlangga University Press
- Nasronuddin. (2008) *Role of Micronutrient in Dengue Haemorrhagic Fever*. Prosiding dalam Simposium Nasional Penyakit Tropik-Infeksi dan HIV dan AIDS. Divisi Penyakit Tropik-Infeksi Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK Unairdan Institute of Tropical Disease UNAIR: 96-107.
- Nasronudin (2011) . Aspek Imun Penyakit Infeksi. Dalam Nasronudin, H.U
Vitanala, Hadi U, Triyono EA, Suharto et al. Penyakit Infeksi di Indonesia Solusi Kini dan Mendatang, Surabaya : Airlangga University Press : 5-13
- Nathan, M. B., Drager, R. D., Guzman, M. (2009) Epidemiology, burden of disease and transmission. In: *Dengue Guidelines for*

Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. New Edition
.WHO:3-17.

Nisalak, A., Endy, T. P., Nimmannitya, S., Kalayanarooj, S.,
Thisayakorn, U., Scott, R. M. (2003) Serotype-specific dengue
virus circulation and dengue diseases in Bangkok, Thailand from
1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg*, 2(68): 191 – 202.

Noisakran, S., & Perng, G. C. (2008) Alternate Hypothesis on the
Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/Dengue
Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection. *Experimental
Biology and Medicine* 2008, 233:401-408.

Pujiati. (2003) Kinetika Gangguan Koagulasi pada Penderita Demam
Berdarah Dengue. *Tesis*. Semarang: Universitas Diponegoro.

Purba, E. R. (2012) Kinetika Ig-Anti NS1 Virus Dengue Serta
Hubungannya Dengan Hitung Trombosit dan Kebocoran Plasma
Pada Infeksi Dengue. *Tesis*. Program Pendidikan Dokter
Spesialis Penyakit Dalam FKUI.

Rachman, A. (2009) Identifikasi Salah Satu Mekanisme Trombosit
openia pada Infeksi virus Dengue: Telaah khusus pada Antibodi
terhadap Protein Non Struktural tipe I Virus Dengue dan target
epitop GP IIb/IIIa pada permukaan trombosit. *Desertasi*. Jakarta:
Universitas Indonesia.

Rothman, A. L. (2004) Dengue: defining protective versus pathologic
immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(7).

Sansanee, N., Kulkanya, C., Pucharee, S., Nattawat, O., Hui-Mien, H.
(2009A) Re-evaluation of the Mechanisms Leading to Dengue
Hemorrhagic Fever. Immunology and Pathogenesis of Viral
Hemorrhagic Fever: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1171: E24–E35

Santoso, W. D. (2014) Patofisiologi Leukopenia dan Model Prediksi
Peningkatan Trombosit Menggunakan Annexin-V, sNChaderin,
Peningkatan Leukosit dan Awitan Demam pada Infeksi Dengue.
Desertasi. Jakarta: FKUI.

Sankar, SG, Dhananjeyan KJ, Paramasivan R, Thenmozhi V, Tyagi BK
et al.

2012) Evaluation and use of NS1 Ig M Antibody detection for
acute dengue virus diagnosis : report from an outbreak

investigation (Research Note). *Clinical Microbiology and Infection* ; 18(1) : E8-E10.

Setiati, T. E., Soemantri, A. G. (2003) *Serum Lactic Acid as Predictor of Mortality in Severe Dengue Haemorrhagic Fever in Kariadi Hospital*. Semarang, Central Java, Semarang: Universitas Diponegoro.

Sharon de T. Martins, Guilherme F. Silveira, Lysangela R. Alves, Claudia Nunes Duarte dos Santos, 1, Juliano Bordignon. 2012 Dendritic Cell Apoptosis and the Pathogenesis of Dengue. *Viruses*; 4 :2736- 53

Shin, L. L. Y., Sheng, L. H., Ming, Y. T., Anderson, R., Chun, C. M. (2009) Dysfunction and Bleeding Tendency Abolishes Anti-NS1-Mediated Platelet Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Deletion of the C-Terminal Region of Dengue. *J Immunol*; 183:1797-1803.

Shi-Wei, L., Yung-Chun, C, Yee-Shin, L., Huan-Yao, L., Hsiao-Sheng, L., Trai-Ming, Y. (2012) Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. *Journal of Infection*, 64: 325 -44.

Soegijanto, S. (2006) *Demam Berdarah Dengue*. Edisi 2. Surabaya: Airlangga University Press.

Soewandojo, E. (2002) *Perkembangan Terkini Dalam Pengelolaan Beberapa Penyakit Tropik Infeksi*. Surabaya: Airlangga University Press: 113-29.

Sophie, A. L., Marie-Thérèse, D., Pascal, R., Marie-Pascale, F., Michel, A. (2005) The Secreted Form of Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is Endocytosed by Hepatocytes and Accumulates in Late Endosomes: Implications for Viral Infectivity. *Journal of virology*, 79(17): 11403–11411.

Sopiyudin, D. M. (2007) *Kinetika Trombosit sebagai Prediktor Renjatan pada Demam Berdarah Dengue Anak: Analisis Survival*. Tesis. Jakarta. Fakultas Pasca Sarjana, Universitas Indonesia.

- Suparyana, I. B. G. (2002) Faktor-faktor prediktor renjatan pada Demam Berdarah Dengue. *Tesis*. Denpasar : Universitas Udayana.
- Supratman S. (2010) Masalah Vektor Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Pengendaliannya di Indonesia. *Buletin Jendela Epidemiologi*, 2(8): 26-30.
- Suseno A, Nasronudin.(2011) Mekanisme Perdarahan Pada Infeksi Virus Dengue. Dalam Nasronuddin, H. U., Vitanela. Penyakit Infeksi di Indonesia Solusi Kini dan Mendatang, Surabaya: Airlangga University Press: 112-16
- Tanner, L., Schreiber, M., Low, J. G. H., Ong, A., Tolvenstam, T. (2008) Decision Tree Algorithms Predict the Diagnosis and Outcome of Demam dengue in the Early Phase Of Illness. *PLoS Negl Trop Dis*. 2(3):196.
- Tassaneetrithep, B., Burgess, T. H., Piperno, A. G., Trumpheller, Finke, J., (2003) DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(7): 823–29.
- Triono S. (2004) Faktor prognostic memberatnya Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue di Instalasi Kesehatan Anak RS Dr. Sardjito. *Tesis*. Yogyakarta: Universitas GajahMada.
- Tjahjono G, Nasronudin. (2011). Immunopatogenesis Demam Berdarah Dengue. Dalam Nasronudin, H.U Vitanela, Hadi U, Triyono EA, Suharto et al. Penyakit Infeksi di Indonesia Solusi Kini dan Mendatang, Surabaya : Airlangga University Press : 117 121
- Umniyati, S. R., Sutaryo, Wahyono, D., Artama, W. T. (2010) Deteksi diniinfeksi virus dengue dengan teknik imunokromatografi menggunakan antibody monoklonal. Laporan Tahun II Penelitian Hibah Kompetitif Penelitian Strategis Nasional.Yogyakarta.
- Umniyati, S. R., Sutaryo, Wahyono, D., Artama, W. T. (2008) Application of monoclonal antibody DSSC7 for early detection Of dengue infecion in blood smear preparation based on immunocytochemical streptavidin botin peroxidase complex assay. Int. Joint. Symp.Frontier Sciences from gene to application. Faculty of Medicine.GadjahMada University.Yogyakarta.

- Umniyati, S.R. Wahyono, D. Arthama, W.T. 2011. Isolation and Confirmation of Dengue Virus from Positive Febrile Patient by Indirect Fluorescent Technique using Monoclonal antibody against dengue DSS10. Seminar Hasil Penelitian. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Hibah Strategis Nasional Nomor: 389/SP2H/PL/Dit Litabmas/IV/2011, tanggal 14 April 2011
- Valde, K., Alvarez, M., Pupo, M., Va'zquez, S., Guez, R. R. (2000) Human Dengue Antibodies against Structural and NonStructural Proteins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*;7 (2): 856-67.
- Watanabe, S., Tan, K. H., Rathore, A. P. S., Rozen-Gagnon, K., Shuai, W. (2012) The Magnitude of Dengue Virus NS1 Protein Secretion Is Strain Dependent and Does Not Correlate with Severe Pathologies in the Mouse Infection Model. *Journal of Virology*. p. 5508–5514.
- Vazquez, S., Ruiza, D., Barrero, R., Ramirez, R., Calzada, N. (2010) Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68: 46-49.
- Villar, L. A., Centeno, Quijano, F. A. D., Vega, R. A. M. (2008). Biochemical Alterations as Markers of Dengue Hemorrhagic Fever, *Am. J Trop. Med. Hyg*; 78(3): 370-74.
- Yee-Shin, L., Trai-Ming, Y., Chiou-Feng, L., Shu-Wen, W., Yung-Chun, C. Between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Experimental Biology and Medicine*; 236: 515–523.
- Yng-huey, H., Huan-yao, L., Hsiao-sheng, L., Yee-shin, L, Ching-chuan, L. Dengue virus infects human endothelial cells and induces il-6 and il-8 production. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 63(1, 2):pp. 71–75.

Zulkarnain, I, Tambunan, K. L., Nelwan, R. H. H. (2002)
Penatalaksanaan Demam Berdarah Dengue pada Dewasa di
RSPUN Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta. Dalam: Hadinegoro,
S. R., Satari, H. I. (editors). *Naskah Lengkap Pelatihan Pelatih
Dokter Spesialis Dalam Tatalaksana DBD*. Balai Penerbit FKUI:
150-61.

CURRICULUM VITAE

SOROY LARDO

MD, Internist, FINASIM, PhD

The Indonesian Army Central Hospital Gatot Soebroto

Abdul Rachman Saleh Street 24

Central Jakarta



Office: +6221-3512190

Mobile: +628121045570

+682113860984 (WA)

Email: soroylardo@gmail.com

[Website: soroylardo.com](http://soroylardo.com)

Education

- Medical Doctor, Faculty of Medicine University of Padjadjaran, Bandung. 1991.
- Internal Medicine, Faculty of Medicine University of North Sumatera, Medan. 2006
- PhD Faculty of Medicine Gadjah Mada University, 2016
- Consultant of Infectious Diseases (CID) Faculty of Medicine Universitas Indonesia (FMUI)
(Ongoing)

Members participation

- Indonesia Society of Internal Medicine (PAPDI)
- International Society of Infectious Diseases (ISID)
- International Society for Antiviral Research (ISAR)
- The Indonesia Society for the Study Of Tropical Medicine and Infectious Diseases (PETRI)

Rank Academic

- Lector Faculty of Medicine UPN Veteran Jakarta
- NIDN (National Lecture Number) : 031056304

Expertise

- Malaria
- Dengue
- Diagnosis and management of infectious diseases
- Pandemic Influenza
- Biology molecular, immunology and vaccinology
- Emergency in internal medicine.
- Care, support and treatment (CST) of HIV/AIDS
- Antibiotic Stewardshi Program (ASP) and Multi Drug Resistance Antibiotic
- Infection Control Risk Assesment
- Health Security dan Medical Disaster

Positions

- Section Chief Research and Development Department Of Pulmonology Indonesia Army Central Hospital 2007-2009
- Head Of Division Of Medical Services Department Of Internal Medicine Indonesia Army Central Hospital , 2009-2012
- HIV AIDS Working Group Indonesia Army Central Hospital Gatot Soebroto
- January 2007 – Present . Greater Jakarta Area Indonesia
- Chief Of Infection Control Team. 2013 – Present . Greater Jakarta Area Indonesia
- Education Coordinator Clinical Work Department Of Internal Medicine Indonesia Army Central Hospital Gatot Soebroto, 2007 - 2012
- Lecturer (Lector) Faculty Of Medicine National Development University Veteran (2007 – Present)
- Clinical Research / Expert Committe Indonesia Army Health Institute (Lakesmil Ditkesad)
- Member Of Research Committee Indonesia Army Central Hospital Gatot Soebroto
- Member Of Medical Committee Indonesia Army Central Hospital Gatot Soebroto
- Director, Army Hospital in Binjai, North Sumatera. 1997
- Medical Doctor, Battalion 132/BS Bangkinang, Riau, Indonesia. 1992 – 1995.
- Scientific Committe. The41st ICMM World Congress on Military Medicine 17-22 May 2015. Bali Nusa Dua Convention Center Bali, Indonesia.

Expert

- Member National Expert Malaria Committe, Ministry of Health
- Sub Coordinator Chief Antibiotic Microbial Resistance National Expert Committe Global Health Security Agenda (GHSA), Ministry of Defence
- Medical Staf Tuberculosis and Non Tuberculosis Infectious Diseasees
- Health Ministry's Health Tourism Implementation and Development Task Force Team
- Member of MPPK (Professional Services Development Council) PB IDI (Indonesia Medical Association)

Project:

- The Effectivity of Chempedak Bark Extract as a Malarial Prophylactic Drug for Indonesian Soldiers on duty (RCT) Papua Border .Collaboration Indonesia Army Health Institute (Lakesmil Ditkesad) with Instsitute Tropical Diseases (ITD) UNAIR (2018) Research Phase 2 Researcher : Prof Indah Tantular PhD (Parasitologist) , Dr. Aty Widyawaruyanti (Pharmacologist) Dr Waras Budiman (Immunologist)
- Anopheles Mapping Studies of Malaria in Papua Border – PNG (Security Duty Border
- Soldier) Collaboration Indonesia Army Health Institue (Lakesmil Ditkesad) with
- Department of Parasitology Hassanudin University
- Researcher : Isra Wahid PhD (Parasitologist), Dr Waras Budiman (Immunologist)
- Characterization of genotypes *plasmodium falciparum* and *plasmodium vivax* as malaria vaccine candidate - indonesia strain . Research in Battalion Duty Borders In Indonesia
- Collaboration Indonesia Army Health Institue (Lakesmil Ditkesad) with Department of
- Parasitolog Hassanudin University
- Researcher : Isra Wahid PhD (Parasitologist), Dr Waras Budiman (Immunologist)
- National Research Vector and Vector Reservoar as basic controlling vector diseases in Indonesia. Collaboration Vector Institute Ministry of Health and Indonesia Army Health Institute. Researcher : Research institutions
- Tafenoquin RCT Research In Indonesia, Collaboration Eijkman Institute – Oxford and Indonesia Army Health Institute (2017-2018) (Co Investigator)
- Researcher : Inge Sutanto, Rintis Noviyanti, Erni Juwilta Nelwan, Waras Budiman)

Contact Info

Email

soroylardo@gmail.com

Phone

+0628121045570 (Mobile)/+06282113860984

Address

Division Tropical Medicine and Infectious Diseases

Indonesia Army Central Hospital Gatot Soebroto

Abdul Rachman Saleh 24

Central Jakarta 10410

LIST OF PUBLICATION (local and international)

1. Lardo S, Sulistio B, Purnama Y, Wibisono D. The effect of a unique propolis compound (Propoelix™) on clinical outcomes in patients with dengue hemorrhagic fever. 2014. *Infection and Drug Resistance*: 7. p. 323–329 (**Pub Med**)
2. Lie KC, Widodo D, Lardo S, Eppy and R Sinto. Association of initial intracellular signalling pathway and cytokine level with early mortality in severe sepsis patients. 2014. *Critical Care* 18 (Suppl 2): p46 (**Index Scopus**)
3. Lardo S. Management of Dengue Hemorrhagic Fever with Complications. 2013. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran*. Vol. 40 No. 9 (*local scientific magazine*). (**Google Scholar**)
4. Lardo S and Nasution SR. Progression of Chronic Renal Failure. 2004. *Majalah Medika: Jakarta* (**local scientific magazine**).
5. Lardo S and Harris Hasan, Valve Prolapse. 2003. *Mitra Majalah Medika: Jakarta* (*local scientific magazine*).
6. Lardo S, Ginting Y, Zein U, Bachtiar Panjaitan. Patterns of antibiotics resistance against *Pseudomonas aeruginosa* at H. Adam Malik Hospital in Medan, North Sumatera. 2003. *Majalah Medika* (**local scientific magazine**).
7. Titi L, Lardo S, Azmi S Kar. Fibrinogen Levels and Age. 2001. National Congress of Infonesian Association of Haematology and Blood Transfusion, Semarang: Central Java (**local scientific magazine**).
8. Soroy Lardo, Yaldiera Utami, Benedktius Yohan, Seri MMU Traigan, Widayat Djoko Santoso³Leonard NainggolanR. Tedjo Sasmono Concurrent infections of dengue viruses serotype 2 and 3 in patient with severe dengue from Jakarta, Indonesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* Volume 9, Issue 2, February 2016, Pages 134–140 (**Index Scopus**)

9. Lardo S , Ariane A , Chen K . Septic Pulmonary Embolism Following Appendectomy Surgery. Acta Medica Indonesiana [2015, 47(3):234-237] (PMID:26586389) **(Index Scopus)**
10. Soroy Lardo, Bebet Prasetyo, Dis Bima Purwaamidjaja. Infection Control Risk Assesment. Majalah Cermin Dunia Kedokteran Volume 3 No 43 ((2016). //www.cdkjournal.com/index.php/CDK/issue/view/5 (local scientific journal) **(Google Scholar)**
11. Soroy Lardo, Infection Control Policy in The Hospital. Majalah Medika. Volume 2, February 2016 **(local scientific journal)**
12. Soroy Lardo. Diagnosis and Treatment of Candidiasis. Journal Indonesia Medical Association, Volume 63, No : 6, June 2013 **(local scientific journal)**
13. Antibiotic Stewardship in The Hospital. Majalah Medika Volume 4, April 2014 **(local scientific journal)**
14. Microbial Bioterorism and Infectious Diseases in Battle Transformation. Majalah Yudhagama TNI AD (Indonesia Army Magazine) . September Edition 2014 **(local magazine journal)**
15. Kabul Priyantoro, Soroy Lardo, Yoga Yuniadi. Cardiac Dysfunction due to Sepsis. Indonesia Cardiology Journal . Volume 31 : 2010. 177-86 (**local scientific journal**)
16. Evi Rosa Nasution, Soroy Lardo. Immune Reconstitution Inflammation Syndrome (IRIS) and The timing of treatment ARV. Majalah Medika. Volume : XLI eds 5, May 2015 **(local scientific journal)**
17. 17 Soroy Lardo, Aty Widyawaruyanti, Indah Tantular, Waras Budiman , Bagus Sulistyoy , Arie Fakhrizal, Achmad Fuad Hafid, Djoko Rusdianto, Ben Yura Rimba, Nasronudin. Preliminary Study of Safety and Toxicity of Cempedak Capsules as an Alternative Complementary Drug for Malaria Prophylaxis at Nanga Badau, Kalimantan. International Review of the Armed Force Medical Services. Volume 89/4 December 2016 **(International Military Medicine Journal/ Google Scholar)**

18. Fatia Ayu Rahmadani, Soroy Lardo. Diagnosis and Management Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Majalah Medika*. Volume 08 eds 13\, Agustus 2017 **(local scientific journal)**
19. Soroy Lardo, Marsetyawan HNE, Juffrie, Siti Rahmah Umniyati. DHF Kinetic in clinical and Immunophatogenesis spectrum. [//www.cdkjournal.com/index.php/CDK/issue/view/5](http://www.cdkjournal.com/index.php/CDK/issue/view/5) (local scientific journal .*Majalah Cermin Dunia Kedokteran* 247 Vol 45, 2016. H. 896 – 899
20. Soroy Lardo, Marsetyawan HNE, Juffrie, Siti Rahmah Umniyati. The Worsening factors of dengue hemorrhagic fever (DHF) based on cohort study with nested-case control in a tertiary hospital. *IOP Conf. Series : Earth and Environmental Science* 125 (2018)012011 doi 10:1088/1755-1315/125/012011. IOP Publishing. **(Index Scopus)**
21. Soroy Lardo, Marsetyawan HNE, Juffrie, Siti Rahmah Umniyati. The Autoimmune Mechanism in Dengue Hemorrhagic Fever. *Acta Medica Indonesiana* [2018, 50(1):70-79].**(Index Scopus)**
22. Randy Adiwinata, Andi Kristanto, Timoteus Richard, Daniel Edbert, Frida Angelina, Eppy, Ifael Yerosias Mauleti, Soroy Lardo, Iman Firmansyah, Rika Bur, Titos Ahimsa, Erni Juwita Nelwan. Clinical Profile Hepatitis A Patients in Jakarta, Indonesia. *Makara J. Health Res.*,2017,21(1):1-5 doi:10.7454/msk.v21i1.4610
23. Frans Liwang, Dewi M Ratih, Soroy Lardo. Plasmodium ovale infection After One Year Mefloquin Prophylaxis in A Young Indonesian Soldier: A Case Report. *Acta Medica Indonesiana* [2019, 51(1):59-62]
24. Felix F.Widjaja, Diah Martina, Soroy Lardo, Suryo A.K Wibowo. Adult onset Still's Disease as a Differential Diagnosis in Prolonged Fever: Diagnosis and Treatment Experience. *Acta Medica Indonesiana* [2019, 51(2):158-64]
25. Febyan, Soroy Lardo. Patogenesis Ventilator Associated Pneumonia Terkini di Intensive Care Unit. *Indonesia Journal of Chest* [2018, 5(4):35-43]

26. Soroy Lardo. Indonesia's Defense Health Perspective. Jurnal Pertahanan. [2019, 5(1):46-60]. [http: dx.doi.org/10.33172/jp. V 5i1.452](http://dx.doi.org/10.33172/jp. V 5i1.452)
27. Noreka Azizah, Soroy Lardo, Nunuk Nugrohowati. Hematocrite, Thrombocyte, Body Mass Index, and Their Association with the Severity of Dengue Hemorrhagic Fever Among Adult Patients at Esnawan Antariksa Air Force Hospital, Jakarta. Advances in Health Sciences Research volume 22. 2020.p 640-43
28. Soroy Lardo, Strategi Pembangunan Kesehatan dan Ketahanan Nasional Dalam Perspektif Daya Juang Bangsa. Jurnal Pertahanan dan Bela Negara. April 2020, Volume 10 Nomor 1

Book :

- KME Syafruddin ARL, Soroy Lardo, Yongki Iswandi Purnama. Pendekatan Komprehensif Terhadap Infeksi (Comprehensive Approach to Infection). PT Mega Medika Mandiri, 2012
- Soroy Lardo, Waras Budiman. Kesehatan Pertahanan dalam Integrasi Sistem Ketahanan Nasional (Health Defense in the Integration of the National Resilience System) ISBN (International Standard Book Number) 978-602-6712-08-0. 2019. PT Adfale Prima Cipta
- Soroy Lardo. Membangun Rumah Sakit Pendidikan dan Penelitian (Building a Teaching and Research Hospital) ISBN 976-602-6712-04-2. 2018. PT Adfale Prima Cipta
- Soroy Lardo. Membangun Mutu Rumah Sakit Pendidikan (Building the Quality of Educational Hospitals). ISBN 978-602-6712-06-6. 2018. PT Adfale Prima Cipta
- Soroy Lardo. Manajemen Kejadian Luar Biasa (outbreak) infeksi Perspektif Epidemiologi – Klinis (Management of Outbreaks of Epidemiological Perspecific - Clinical infections).
- ISBN 978-602-6712-06-6.2018. PT Adfale Prima Cipta

- Soroy Lardo. Membangun Pranata Pelayanan Rumah Sakit Rujukan (Building a referral hospital institution). ISBN 978-602-6712-07-3.2018. PT Adfale Prima Cipta
- Soroy Lardo. Rumah Sakit Rujukan, Energi Pelayanan Kesehatan Bangsa (Referral Hospital, Energy Nation Health Services) ISBN 978-602-6712-09-7 PT Adfale Prima Cipta. 2019
- Soroy Lardo. Sumber Daya dan Gagasan Kesehatan Bangsa Untuk Pembangunan Berkelanjutan(Resources and Nation Health Ideas for Sustainable Development) ISBN 978-602-6712-11-0. 2020
- Soroy Lardo, Edy Rizal Wachyudi, Asep Saepul Rohmat, Agastya Wisjnu Wardhana, Tommy Partunggul Sibuea. Ilmu Penyakit Dalam Sosial Perspektif Berbasiskan Keilmuan. ISBN 978-602-6712 10-3

INTERNATIONAL and NATIONAL TRAINING

Basic Immunology and Infectious Course, Brawijaya University, Malang 2002
Clinical Practise in Diabetes Care University of Newcastle Australia Perkeni- Jakarta, 2006
Good Clinical Practise (GCP) Workshop, PT Quintiles Singapore, Jakarta, 2007
USPACOM/COE Pandemic Influenza Workshop. US PACOM –CDC Bangkok. 2007
Care Support and Treatment HIV-AIDS Pokdissus FKUI/RSCM. ODC US Embassy – Puskes TNI - Pokdissus FKUI/RSCM Jakarta. 2008
Pandemi Influenza Military Annex Workshop Honolulu Hawaii USA. 2010
Asia Pasific Infection Control Workshop (APSIC) Workshop. APSIC Singapore. 2010
Molecular Biology and Immunology Course, Gadjah Mada University, Yogyakarta 2010
Fungal Infection Workshop. Pfizer Regional Anti Infectives Meeting For Excellence. Kunming China. 2011
Infection Control And Hospital Accreditation Workshop. ICAS Singapore. 2011
Pandemic Influenza Disease Workshop Series, US PACOM-USAID. Jakarta 2011
WHO International Training Course on Management Malaria Mahidol University, Bangkok 2014
Training of HIV-1 in Vitro Assay, ITD Unair – Kobe Univesity. Surabaya 2014
Intensif Immunology Course Musketers-Janeway Book Gadjah Mada University Yogyakarta (5 weeks) 2015
Advance Immunology Infection Workshop. Gadjah Mada University Yogyakarta. 2015
Antibiotic Stewardship Program (ASP). Institute Infectious Diseases & Epidemiology Singapore. 2016
Workshop :Introduction to the Clinical Drug Development Process: ICH GCP for Clinical Trial Sites Quitntiles – EOCRU- Eijkman Institue. 2018

