

**PERBANDINGAN PERFORMA UJI HAMBATAN  
HEMAGLUTINASI DAN *ENZYME LINKED*  
*IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA) DALAM MENENTUKAN  
INFEKSI PRIMER DAN SEKUNDER VIRUS DENGUE**

**TESIS**

**GUSTIANI  
0606000131**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI  
JAKARTA  
JULI 2009**

**PERBANDINGAN PERFORMA UJI HAMBATAN  
HEMAGLUTINASI DAN *ENZYME LINKED*  
*IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA) DALAM MENENTUKAN  
INFEKSI PRIMER DAN SEKUNDER VIRUS DENGUE**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Ilmu Biomedik**

**GUSTIANI  
0606000131**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI  
JAKARTA  
JULI 2009**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun yang dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : GUSTIANI, S.Si

NPM : 0606000131

Tanda Tangan :



Tanggal : 2 Juli 2009

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : GUSTIANI, S.Si  
NPM : 0606000131  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul Tesis : Perbandingan Uji Hambatan Hemaglutinasi dan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dalam menentukan Infeksi Primer dan Sekunder Virus Dengue

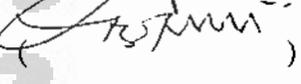
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. dr. Mohamad Sadikin, D.Sc (  )

Pembimbing II : dr. Herman Kosasih (  )

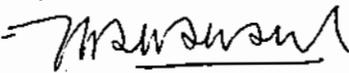
Penguji I : dr. Indra G. Mansur, DHES, Sp.And (  )

Penguji II : dr. Ani Retno Prijanti, M.S. (  )

Penguji III : Dra. Beti Ernawati Dewi, Ph.D (  )

Ditetapkan di : Jakarta  
Tanggal : 2 Juli 2009

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi

## KATA PENGANTAR

*Alhamdulillah Rabbil'alamin*

Segala puja dan puji hanya kepada Allah SWT, Rabb semesta alam sumber segala ilmu dan pengetahuan yang atas izin dan kehendak-Nya semata penulis mampu menyelesaikan tesis ini.

Penelitian ini hanyalah sebagian kecil dari usaha manusia untuk bisa mengerti segala rahasia Allah SWT, semoga bisa menjadi suatu bentuk rasa syukur kepada-Nya atas kehidupan yang telah diberikan. Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terimakasih yang tulus kepada:

- Prof. DR. Mohammad Sadikin, D.Sc, selaku pembimbing I yang telah mempercayakan pengerjaan penelitian ini, pengertian dan bimbingan yang diberikan atas segala kekurangan dan keterbatasan yang penulis miliki.
- Dr. Herman Kosasih, selaku pembimbing II untuk semua bimbingan, dorongan, arahan, kesabaran dan pengertian penulis selama melakukan riset.
- DR. Drs. Heri Wibowo, M.Si dan DR. Alida Harahap, Ph.D selaku ketua kekhususan imunologi, juga segenap Dosen dan semua pihak yang telah membagi ilmu, pengalaman dan pengetahuannya tanpa henti, semoga Allah SWT memberikan keberkahan bagi segenap ilmu yang diberikan.
- Mahasiswa program magister ilmu biomedik terutama kekhususan imunologi atas persahabatan yang indah, pengertian, dukungan maupun uluran tangan selama penulis menempuh pendidikan dan menjalani penelitian.
- Segenap sahabat dan teman yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas semangat, dukungan dan pengertian yang diberikan.
- Keluarga besar US NAMRU-2 khususnya departemen virology, Dr. Maya Williams, drh. Susana Wijaya dan Drs. Ungke Antonjaya yang telah memberikan waktu dan tempat bagi penulis untuk melaksanakan penelitian ini. Ibu Nami, mbak Sri, dan mbak Sherley, yang telah membagi ilmu yang tiada ternilai. Santo, Upi, Yuyu, Elish, Anti, Ayu yang turut berperan dalam penyusunan tesis ini. Ibu Ratna, 'Ade' Mara, Dasep,

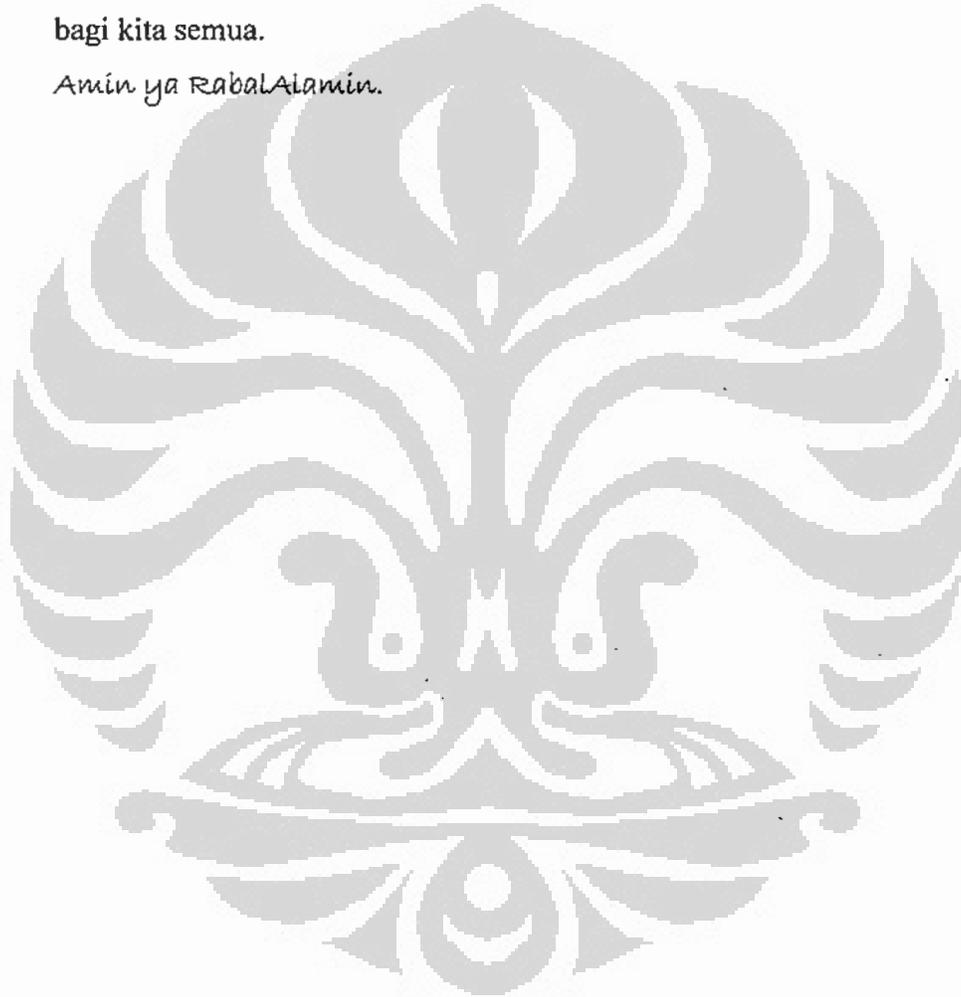
Peppy, Dayah, Anton, Viktor, Risma, Adit, Ester, Melinda dan mba Sinta, terima kasih atas bantuan dan dukungan dengan berbagi keceriaan dan perhatian yang teramat besar.

- Kakak-kakakku beserta keponakanku, terimakasih atas segala curahan kasih sayang yang sangat berarti.

Hanya Allah SWT yang memberikan ilmu dan pengetahuan kepada mereka yang dikehendaki-Nya. Semoga hasil penelitian yang jauh dari sempurna ini berguna bagi kita semua.

*Amin ya RabalAlamin.*

Penulis



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : GUSTIANI, S.Si  
NPM : 0606000131  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Departemen : Imunologi  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Non-eksklusif (*non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Perbandingan uji Hambatan Hemaglutinasi dan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dalam menentukan Infeksi Primer dan Sekunder Virus Dengue**

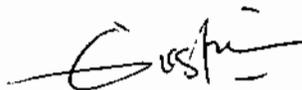
Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Nonekklusif ini Universitas Indoensia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal: 2 Juli, 2009

Yang menyatakan



GUSTIANI, S.Si

## ABSTRAK

Nama : GUSTIANI, S.Si  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul : Perbandingan Uji Hambatan Hemaglutinasi dan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dalam menentukan Infeksi Primer dan Sekunder Virus Dengue

Infeksi virus dengue merupakan masalah serius dengan angka kejadian yang terus meningkat setiap tahun dan hampir separuh populasi dunia beresiko terinfeksi. Infeksi sekunder virus dengue seringkali dihubungkan dengan tingkat keparahan penyakit yang ditimbulkan. Oleh karenanya sangat penting untuk dapat membedakan infeksi primer dan sekunder virus dengue. Uji HI merupakan uji serologi yang direkomendasikan oleh badan kesehatan dunia (*World Health Organization/WHO*) untuk membedakan tipe infeksi tersebut. Namun selain secara teknis mempunyai banyak kekurangan, uji ini juga seringkali kurang tepat dalam mengklasifikasikan antara infeksi primer dengan sekunder. Studi ini dilakukan untuk mengevaluasi performa uji HI dalam membedakan infeksi primer dan sekunder yaitu dengan membandingkan uji tersebut dengan PRNT. Penelitian ini juga mengevaluasi performa ELISA IgG sebagai kandidat metode alternatif. Dari 19 kasus infeksi primer berdasarkan PRNT, semua kasus (100%) juga ditetapkan sebagai infeksi primer dengan HI dan ELISA IgG. Namun dari 73 kasus infeksi sekunder, hasil HI yang bersesuaian dengan PRNT hanya 31,5% sementara ELISA IgG sebanyak 98,6%. Dapat dikatakan HI memiliki performa yang baik dalam menentukan infeksi primer tetapi kurang baik pada infeksi sekunder. Analisa statistik juga memperkuat perbedaan performa uji HI dan ELISA tersebut dengan nilai  $p=0$  ( $p<0$ ). Dengan demikian performa ELISA IgG lebih baik dan dapat dijadikan alternatif pengganti HI. Berdasarkan titer HI pada fase konvalesens yang diperoleh dari penelitian ini, kriteria infeksi primer apabila titer HI  $\leq 80$  dan infeksi sekunder apabila titer HI  $\geq 1280$ . Tipe infeksi pada titer HI antara 160-640 tidak dapat didefinisikan.

Kata kunci: Virus dengue, infeksi primer dan sekunder, HI, ELISA, PRNT

## ABSTRACT

Name : GUSTIANI, S.Si  
Program : Biomedical science  
Research title : Comparison of Hemmagglutination Inhibition Assay and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Performance in Discriminating Primary and Secondary Dengue Infections

Dengue infections have become a global concern since its increasing incidence with almost half of world's population at risk. Secondary or multiple dengue virus infection is often implicated in the severity of the diseases. Therefore, discriminating dengue infection between primary versus secondary is very important. World Health Organization recommends hemagglutination inhibition (HI) assay as the reference test to distinguish the infection. But besides its technical drawbacks, HI interpretations often misclassify between primary and secondary. In this study, we try to evaluate HI performance by comparing the assay with Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT). We also evaluate enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) IgG performance as suggested alternative method. Of 19 primary infection cases determined by PRNT, all of them (100%) also defined as primary infection by both HI and ELISA IgG. From 72 of secondary infection cases, only 31.5 % of HI result that had agreement with PRNT, meanwhile ELISA IgG 98.6%. In this case, we found that HI is good in determination of primary but poor in secondary infection. Statistical analysis revealed that HI and ELISA IgG performance is significantly different with  $p=0$  ( $p<0$ ). This result also indicated that ELISA IgG performance is better than HI and can be used to replace HI. Furthermore from this study, base on HI titer at convalescent phase, we concluded that primary infection is classified with titer  $\leq 80$  and secondary infection at titer  $\geq 1280$ . Type of infection with HI titer between 160-640 can not be determined.

Keywords: Dengue virus, primary and secondary infection, HI, ELISA, PRNT

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PENGESAHAN UNTUK PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR GRAFIK.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN .....	xv
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Hipotesa Penelitian .....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.4.1 Tujuan umum.....	4
1.4.2 Tujuan khusus.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Virus Dengue.....	5
2.2 Patogenesis .....	6
2.2.1 <i>Antibody Dependent Enhancement</i> (ADE) .....	7
2.2.2 <i>Molecular mimicry</i> .....	7
2.3 Kinetik Respon Antibodi Terhadap Infeksi Virus Dengue.....	8
2.4 Diagnosis Infeksi Primer dan Sekunder Virus Dengue.....	9
2.4.1 <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i> (PRNT) .....	10
2.4.2 Uji Hambatan Aglutinasi (HI) .....	12
2.4.3 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	14

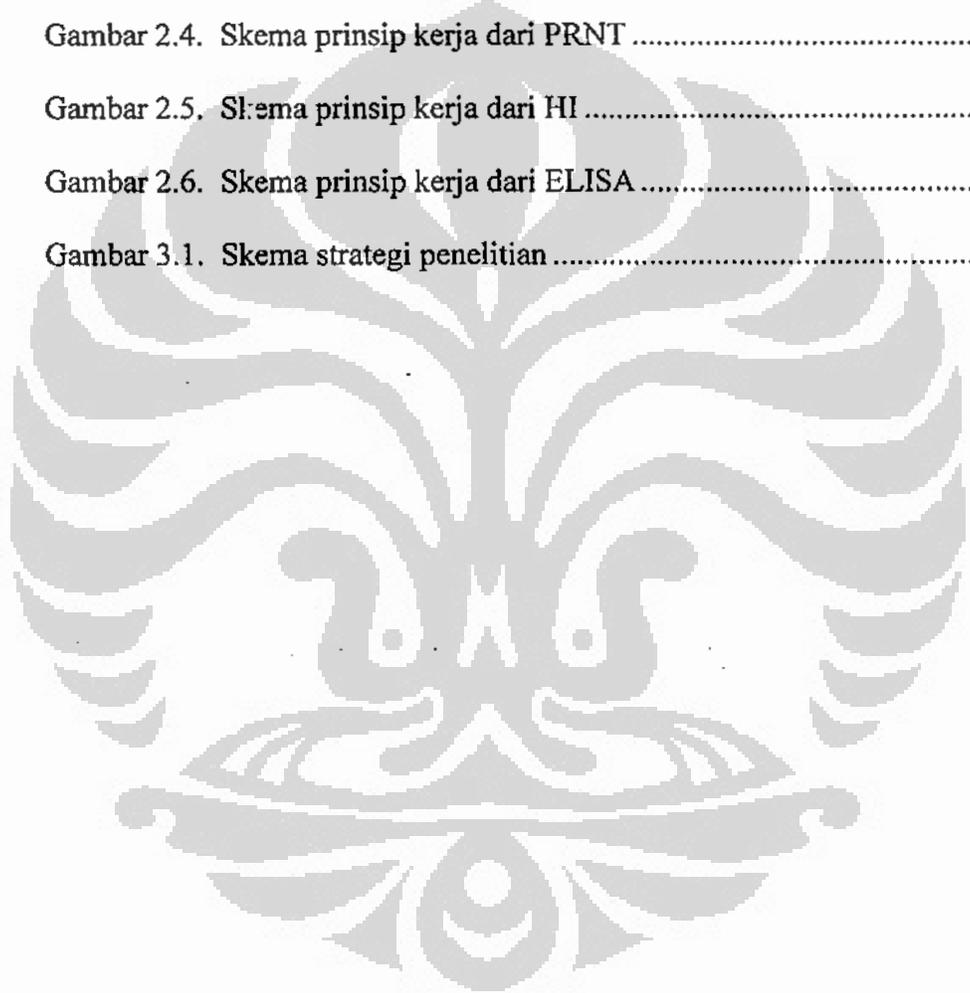
<b>3. BAHAN DAN CARA KERJA .....</b>	<b>16</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	16
3.2 Strategi Penelitian.....	16
3.3 Bahan .....	16
3.3.1 Koleksi sampel.....	17
3.3.2 Bahan untuk uji PRNT .....	18
3.3.3 Bahan untuk uji HI.....	18
3.3.4 Bahan untuk uji ELISA IgG .....	18
3.4 Cara Kerja.....	18
3.4.1 Uji PRNT .....	20
3.4.2 Uji HI.....	22
3.4.3 Uji ELISA IgG.....	22
3.4.4 Analisa Statistik .....	
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>23</b>
4.1 Analisa Hasil PRNT, HI, dan ELISA .....	23
4.2 Kriteria Hasil Positif dan Negatif.....	25
4.3 Sensitivitas dan Spesifisitas Uji HI dan ELISA IgG .....	25
4.4 Determinasi Infeksi Primer dan Sekunder Virus Dengue Berdasarkan PRNT, HI, dan ELISA.....	27
4.5 Performa HI dan ELISA IgG Dalam Menentukan Infeksi Primer dan Sekunder .....	28
4.6 Kategori Infeksi Dengue Berdasarkan Titer HI Pada Fase Konva- lesens dibandingkan PRNT .....	30
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>33</b>
5.1 Kesimpulan .....	33
5.2 Saran .....	33
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>35</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>40</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Contoh hasil positif dan negatif uji PRNT, HI dan ELISA pada spesimen yang diuji .....	24
Tabel 4.2. Hasil yang diperoleh pada uji PRNT, HI dan ELISA dalam mendeteksi antibodi .....	25
Tabel 4.3. Perbandingan performa HI terhadap PRNT dalam mendeteksi antibodi .....	26
Tabel 4.4. Perbandingan performa ELISA terhadap PRNT dalam mendeteksi antibodi .....	26
Tabel 4.5. Nilai sensitivitas dan spesifisitas HI dan IgG .....	27
Tabel 4.6. Determinasi infeksi primer dan sekunder berdasarkan PRNT, IgG dan ELISA .....	27
Tabel 4.7. Kriteria infeksi primer dan sekunder berdasarkan titer HI yang ditetapkan oleh WHO. ....	28
Tabel 4.8. Performa HI dan ELISA IgG dalam membedakan infeksi primer dan sekunder.....	30
Tabel 4.9. Perbandingan titer HI fase konvalesens dengan hasil PRNT ....	31

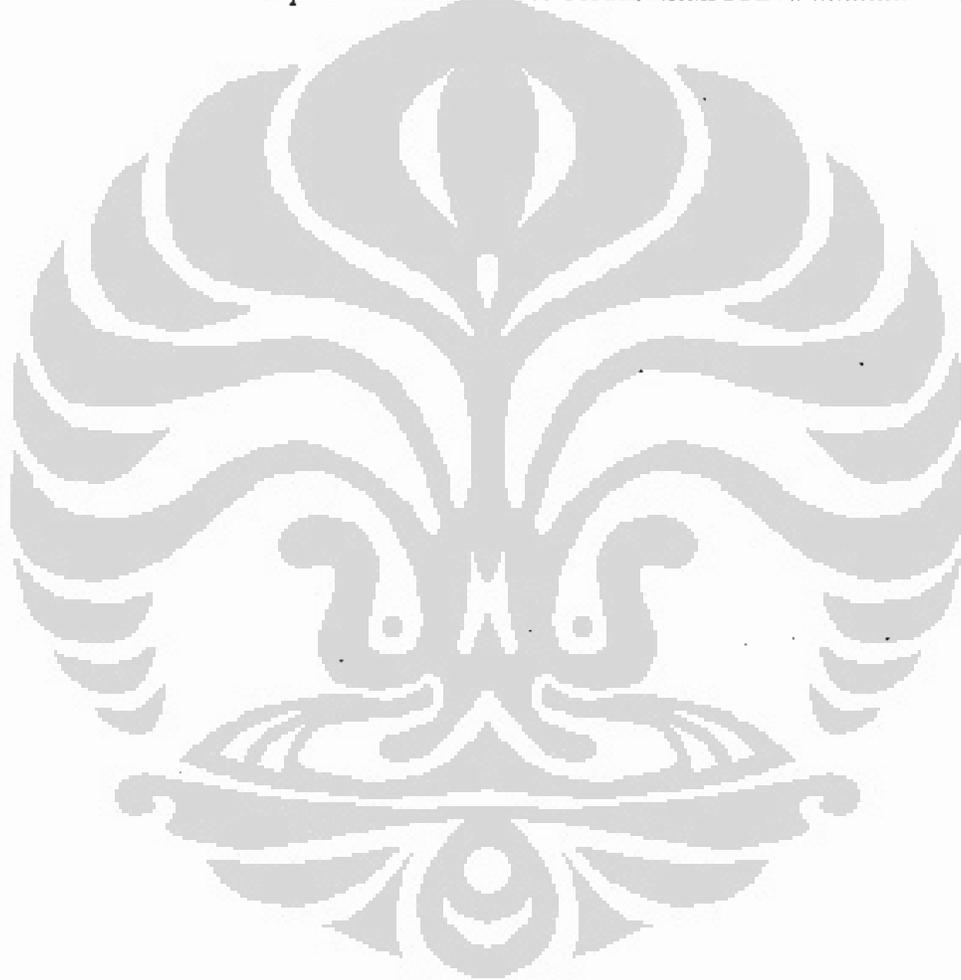
## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Organisasi genom virus dengue .....	6
Gambar 2.2. Kinetik antibodi IgM dan IgG selama ineksi primer dan sekunder virus dengue .....	9
Gambar 2.3. Peristiwa infeksi dengue dan diagnosa laboratorium.....	9
Gambar 2.4. Skema prinsip kerja dari PRNT .....	11
Gambar 2.5. Skema prinsip kerja dari HI .....	13
Gambar 2.6. Skema prinsip kerja dari ELISA .....	14
Gambar 3.1. Skema strategi penelitian .....	16



## DAFTAR GRAFIK

Grafik 4.1. Korelasi antara titer PRNT dengan titer HI.....	24
Grafik 4.2. Korelasi antara titer PRNT dengan nilai indeks ELISA IgG ...	25
Grafik 4.3. Perbandingan titer HI fase konvalesens dengan presentase infeksi primer dan sekunder berdasarkan PRNT .....	31



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Contoh pembacaan hasil PRNT .....	38
Lampiran 2.	Contoh hasil uji HI dan nilai indeks ELISA .....	39
Lampiran 3.	Persetujuan kode etik studi kohort prospektif infeksi dengue pada pekerja pabrik di Bandung .....	40
Lampiran 4.	<i>Inform consent</i> studi kohort prospektif infeksi dengue pada pekerja pabrik di Bandung.....	41
Lampiran 5.	Persetujuan kode etik studi kluster di Jakarta dan Bandung...	45
Lampiran 6.	<i>Inform consent</i> studi kluster di Jakarta dan Bandung untuk kasus indeks .....	46
Lampiran 7.	<i>Inform consent</i> studi kluster di Jakarta dan Bandung untuk Peserta lingkungan .....	49
Lampiran 8.	<i>Inform consent</i> studi chikungunya di Jakarta.....	52
Lampiran 9.	Riwayat Hidup .....	55
Lampiran 10.	Artikel .....	57

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. LATAR BELAKANG PENELITIAN

Infeksi virus dengue telah menjadi perhatian global seiring dengan peningkatan insiden dan penyebarannya selama lebih dari 4 dekade. Jumlah infeksi dengue terus bertambah di daerah endemis seperti Asia Tenggara, Amerika Selatan dan Pasifik. Setiap tahun diperkirakan lebih dari 80 juta infeksi dengue menyebabkan lebih dari 24 ribu kematian dan lebih dari 50 juta penduduk dari lebih 100 negara beresiko terinfeksi termasuk Indonesia.<sup>1,2</sup>

Virus dengue termasuk dalam keluarga Flaviviridae, genus *Flavivirus*, terdiri dari 4 serotipe yang berbeda (Dengue 1,2,3 dan 4). Infeksi oleh salah satu dari keempat serotipe tersebut dapat bersifat asimtomatik atau menyebabkan manifestasi klinis mulai dari demam dengue (DD) yang ringan sampai dengan demam berdarah dengue yang parah (Demam Berdarah Dengue/DBD) dan Sindroma Syok Dengue (SSD) yang fatal. Respon imun terhadap infeksi virus dengue umumnya menyediakan proteksi yang lengkap dan tahan lama terhadap strain yang homotipik, namun proteksi silang (*cross-protection*) antar serotipe dengue sangatlah terbatas. Akibatnya, seseorang dapat mengalami infeksi kedua (sekunder), ketiga (tersier) dan keempat (kuartener) dengan serotipe yang berbeda.

Infeksi sekunder diperkirakan berhubungan dengan resiko yaitu gejala dapat timbul dengan tingkat keparahan yang tinggi, seperti DBD dan SSD selain faktor-faktor lainnya seperti virulensi virus dan latar belakang hospes (imunitas, genetik dan nutrisi).<sup>3</sup> Sekitar 80-90% peristiwa DBD/SSD merupakan infeksi sekunder. Kejadian infeksi sekunder tinggi pada daerah endemis termasuk Indonesia.<sup>4</sup> Oleh karena itu sangatlah penting untuk dapat membedakan jenis infeksi virus dengue antara infeksi primer dengan infeksi sekunder. Selain penting sebagai nilai prognostik bagi para praktisi klinis, juga penting untuk lebih mengerti patofisiologi mengapa keadaan klinis yang lebih berat berhubungan dengan infeksi sekunder, juga sebagai alat epidemiologi yang berharga dalam mempelajari infeksi dengue.<sup>5</sup>

Uji hambatan hemaglutinasi (*Hemagglutination Inhibition/*HI) merupakan uji referensi yang direkomendasikan oleh badan kesehatan dunia (*World Health Organization/*WHO) yang dapat digunakan untuk membedakan antara infeksi primer dan sekunder. Uji ini bekerja berdasarkan fakta bahwa virus dengue dapat mengaglutinasi sel darah merah angsa dan efek ini dapat dihambat oleh suatu antibodi spesifik.<sup>6</sup> Namun demikian, beberapa peneliti telah meragukan dan mempertanyakan penggunaan uji HI ini dalam membedakan infeksi primer dari infeksi sekunder. Menurut Graham dkk,<sup>7</sup> hasil yang diperoleh dari interpretasi uji HI akan cenderung lebih banyak mengklasifikasikan infeksi virus dengue sebagai infeksi primer daripada infeksi sekunder dibandingkan dengan uji *Plaque Reduction Neutralization Test* (PRNT).

Kekurangan lain dari uji HI adalah tidak spesifik karena antibodi IgG yang diukur bersifat reaktif terhadap flavivirus lain. Selain itu uji ini juga memerlukan pasangan serum akut dan konvalesens sehingga tidak dapat memberikan hasil diagnosis dengan segera. Sebagai alternatif, sekarang ini telah banyak dikembangkan suatu uji serologi baru berformat *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).<sup>8</sup> Uji ini cukup sensitif, cepat dan spesifik dalam mendeteksi antibodi Immunoglobulin M (IgM) dan Immunoglobulin G (IgG). Uji ini juga dapat diaplikasikan untuk mengidentifikasi infeksi primer dan sekunder dari suatu infeksi virus dengue yaitu dengan menghitung rasio IgM/IgG,<sup>9</sup> mengukur titer IgG<sup>10</sup> atau mengukur aviditas IgG.<sup>11,12</sup> Beberapa kit ELISA komersial yang telah tersedia telah terbukti cukup sensitif dan spesifik dalam membedakan infeksi primer dan sekunder menggunakan sampel serum dari pasien pada fase konvalesen.<sup>13</sup>

Uji serologi lain yang juga dapat digunakan untuk membedakan infeksi primer dan sekunder adalah PRNT.<sup>7</sup> PRNT merupakan suatu uji yang digunakan untuk mengukur antibodi netralisasi berdasarkan fakta bahwa virus dengue dapat menghasilkan efek sitopatik (*Cytopathic Effect/CPE*) yang teramati sebagai plak pada kultur sel yang bersesuaian. Dengan adanya antibodi yang spesifik, virus dengue akan dinetralisasi sehingga CPE yang terbentuk berkurang atau tidak terbentuk sama sekali. Sampai sekarang PRNT masih ditetapkan sebagai standar baku emas (*gold standard*) oleh WHO karena sensitivitas dan spesifisitasnya yang

tinggi diantara flavivirus dan serotipe virus dengue.<sup>6</sup> PRNT juga dapat mengidentifikasi tipe virus di setiap infeksi dengue. Kekurangan utama dari uji PRNT adalah uji ini tergolong mahal, memerlukan waktu yang lama untuk mendapatkan hasil dan secara teknik cukup sulit. Oleh karena itu uji ini tidak umum dikerjakan di laboratorium-laboratorium.<sup>7</sup>

## 1.2. RUMUSAN MASALAH

Walaupun beberapa peneliti telah meragukan akurasi dari uji HI dalam menentukan infeksi primer dan sekunder, uji ini masih umum digunakan sebagai referensi pada beberapa studi yang ingin melihat hubungan antara tipe infeksi dengan keparahan penyakit yang ditimbulkan oleh infeksi dengue<sup>14,15</sup> maupun pada studi yang dilakukan untuk mengembangkan suatu metode serologi lain.<sup>16,17,18</sup> Hal ini dapat mengarahkan peneliti pada suatu kesimpulan yang tidak tepat pada studi-studi tersebut. Sejauh ini dari penelusuran literatur yang telah dilakukan, belum ada laporan penelitian yang membahas perbandingan antara HI atau ELISA terhadap PRNT. Kebanyakan hanya membandingkan performa HI terhadap ELISA atau sebaliknya dan seringkali menggunakan sampel yang dikoleksi dari pasien di rumah sakit yang telah beberapa hari melewati demam.

Studi ini dilakukan untuk mengevaluasi performa uji HI dan ELISA dalam membedakan infeksi primer dan sekunder yaitu dengan membandingkan kedua uji tersebut dengan PRNT. Sampel-sampel yang digunakan diperoleh dari kasus demam yang telah dikonfirmasi sebagai infeksi dengue. Sebagian besar kasus-kasus ini berasal dari studi kohort prospektif sehingga selain sampel-sampel yang diambil saat fase akut dan konvalesen, terdapat pula sampel-sampel dari fase sebelum sakit (saat sehat) untuk memastikan status imunnya.

## 1.3. HIPOTESA PENELITIAN

Hipotesa yang dapat dibangun dari penelitian ini adalah  $H_0$  = uji ELISA IgG sama baiknya dengan HI dalam membedakan infeksi primer dan sekunder pada kasus-kasus infeksi dengue.

### **1.3. TUJUAN PENELITIAN**

#### **1.3.1. Tujuan Umum**

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi mengenai performa uji HI dalam menentukan infeksi primer dan infeksi sekunder berdasarkan kriteria yang telah ditetapkan oleh WHO.

#### **1.3.2. Tujuan Khusus**

Adapun tujuan khusus dari penelitian ini adalah: 1) Membandingkan uji HI dan ELISA dalam membedakan infeksi primer dan sekunder menggunakan sample-sampel yang telah dikonfirmasi sebagai kasus infeksi dengue dan telah ditetapkan sebagai infeksi primer atau sekunder berdasarkan uji PRNT sebagai standar baku, 2) Mengajukan modifikasi kriteria interpretasi hasil uji HI (jika terbukti uji tersebut tidak akurat), dan 3) Merekomendasikan metode alternatif (jika tersedia).

### **1.3. MANFAAT PENELITIAN**

1. Pengetahuan mengenai performa uji HI dari penelitian ini dapat diterapkan untuk menetapkan kriteria HI yang lebih tepat dalam membedakan infeksi primer dan sekunder.  
Diagnosa infeksi primer dan sekunder yang akurat akan membantu analisa korelasi antara sifat infeksi ini dengan berat ringannya penyakit, sehingga akan membantu dalam menjelaskan patofisiologi penyakit ini
2. Dapat menggunakan metode alternatif lain seperti ELISA IgG yang terbukti lebih baik dibandingkan HI dalam menentukan infeksi dengue

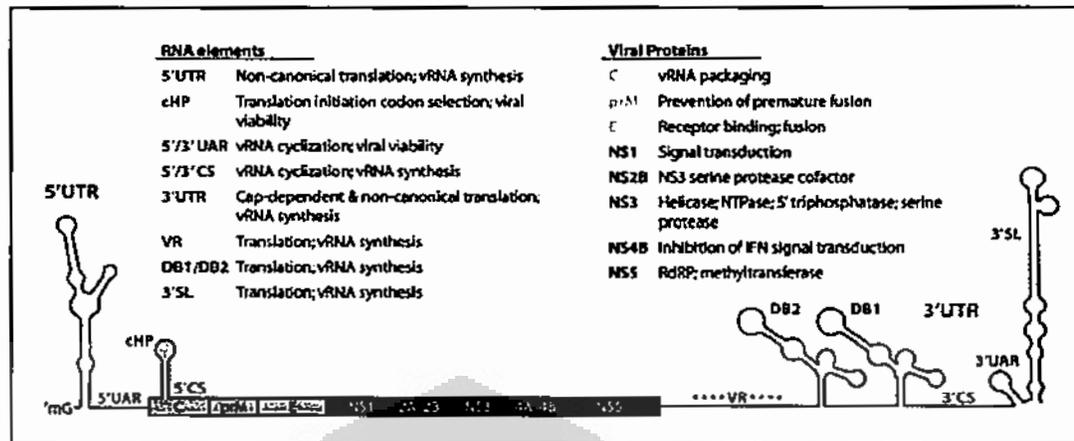
## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. VIRUS DENGUE

Virus dengue sebagai agen dari penyakit dengue termasuk dalam famili Flaviviridae, genus *Flavivirus*. Virus dengue terdiri dari empat serotipe yang secara genetik sama tapi secara antigenik berbeda, yaitu Dengue (DEN)-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Keempat serotipe tersebut bersirkulasi di Indonesia.<sup>19</sup> Transmisi virus dengue melalui vektor utama yaitu nyamuk *Aedes Aegypti* yang umum ditemukan di daerah tropis dan sub tropis.<sup>3</sup>

Secara morfologis, partikel virus dengue (virion) berbentuk sferikal dengan diameter berukuran 40-60 nm. Sama halnya dengan Flavivirus lainnya, virus dengue memiliki genom RNA yang dilindungi nukleokapsid ikosahedral berdiameter 30 nm dan envelop setebal 10 nm. Genom virus dengue berupa RNA untai tunggal positif sebesar 11 kilobasa yang terbagi menjadi 3 bagian utama: daerah yang tidak menyandi protein (*Non Translated Region/NTR*) pada posisi 5' berukuran 100 pasangan basa (pb), daerah yang menyandi protein (*Open Reading Frame/ORF*) dan NTR pada posisi 3' berukuran 450 pb. ORF menyandi 3 protein struktural dan 7 protein non struktural. Protein struktural terdiri atas protein kapsid (C), protein premembran/membran (prM/M), dan protein envelop (E). Protein nonstruktural meliputi protein NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b dan NS5 (Gambar 2.1).<sup>20,21</sup> Protein E memegang peranan utama pada beberapa proses penting termasuk proses pengenalan dan pengikatan reseptor, hemaglutinasi sel darah, induksi respon imun protektif, fusi membran dan perakitan virion.<sup>8</sup>



Gambar 2.1. Organisasi genom virus dengue dan protein yang disandi.<sup>21</sup>

## 2.2. PATOGENESIS

Tergantung dari faktor-faktor yang mempengaruhi daya tahan tubuh, latar belakang genetik, nutrisi hospes, virulensi virus dan lainnya, infeksi oleh setiap serotipe virus dengue dapat bersifat asimtomatik atau menyebabkan salah satu dari empat derajat keparahan manifestasi klinis, yaitu demam ringan yang tidak spesifik (*undifferentiated fever*), demam dengue (DD), demam berdarah dengue (DBD) dan sindrom syok dengue (SSD).<sup>5</sup> Infeksi oleh salah satu serotipe virus dengue umumnya memberikan kekebalan seumur hidup hanya terhadap serotipe tersebut namun tidak memberikan proteksi silang terhadap serotipe lainnya. Dengan demikian seseorang yang tinggal di daerah endemik dimana keempat serotipe dengue bersirkulasi, dapat mengalami infeksi kedua (sekunder), ketiga (tersier), atau keempat (kuartener).<sup>3</sup>

Infeksi sekunder diperkirakan sebagai faktor utama penyebab patogenesis DBD dan SSD disamping faktor-faktor lainnya. Dilaporkan dari studi epidemiologi yang dilakukan di negara endemik seperti Thailand dan Myanmar kejadian DBD/SSD rata-rata 42,7 per 1000 kasus infeksi sekunder. Pada kasus infeksi primer, rata-rata kejadian DBD/SSD hanya 1 per 1000 kasus sehingga dapat dikatakan kejadian DBD/SSD 40 kali lebih sering pada infeksi sekunder daripada infeksi primer.<sup>22</sup>

Berbagai penelitian telah dilakukan selama lebih dari dua dekade untuk mengidentifikasi mekanisme yang menyebabkan gejala permeabilitas vaskular dan perdarahan pada infeksi sekunder. Beberapa hipotesis muncul berdasarkan

data yang diperoleh dari studi-studi yang dilakukan di daerah dimana epidemi dengue terjadi maupun dari penelitian yang dilakukan secara *in vitro*. Hipotesis-hipotesis utama yang muncul diantaranya adalah teori *antibody-dependent enhancement* dan *molecular mimicry* atau reaksi autoimun.<sup>23,24</sup>

### 2.2.1. *Antibody-Dependent Enhancement (ADE)*

Antibodi dengue heterolog yang telah ada sebelumnya akan mengenali virus yang menginfeksi, membentuk non-netralisasi kompleks antigen-antibodi yang akan terikat pada reseptor Fc pada membran sel monosit-makrofag, menyebabkan infeksi produktif. Antigen virus kemudian dipresentasikan oleh MHC pada sel makrofag yang terinfeksi dan menyebabkan stimulasi sel limfosit T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>. Pengaruh dari aktivasi sel limfosit T tersebut adalah dihasilkannya sitokin-sitokin yang selanjutnya mengaktifasi sel lain termasuk makrofag; mengakibatkan meningkatnya ekspresi reseptor Fc dan MHC. Dengan demikian terjadi reaksi berantai yang berujung pada konsekuensi imunopatologi. Faktor-faktor lain, seperti aktivasi komplemen, aktivasi platelet, dan produksi sitokin yang bersifat sitotoksik termasuk *tumour necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin (IL)-1, dan IL-6 oleh makrofag, limfosit dan sel endotel/epitel berkontribusi dan memperburuk kejadian rangkaian reaksi inflamasi.<sup>23,22</sup>

### 2.2.2. *Molecular mimicry*

Diketahui bahwa kurang lebih ada 20 asam amino dari protein E virus dengue memiliki kesamaan sekuens dengan protein dari keluarga faktor pembekuan (*clotting factor*), termasuk plasminogen. Lebih jauh, antibodi yang bereaksi silang terhadap plasminogen muncul selama respon imun terhadap infeksi dengue terutama pada pasien yang mengalami infeksi sekunder. Walaupun demikian tidak ada korelasi antara keberadaan autoantibodi tersebut dengan manifestasi DBD dan SSD, namun diperkirakan berkontribusi dalam manifestasi perdarahan setidaknya pada kasus DBD.<sup>24</sup>

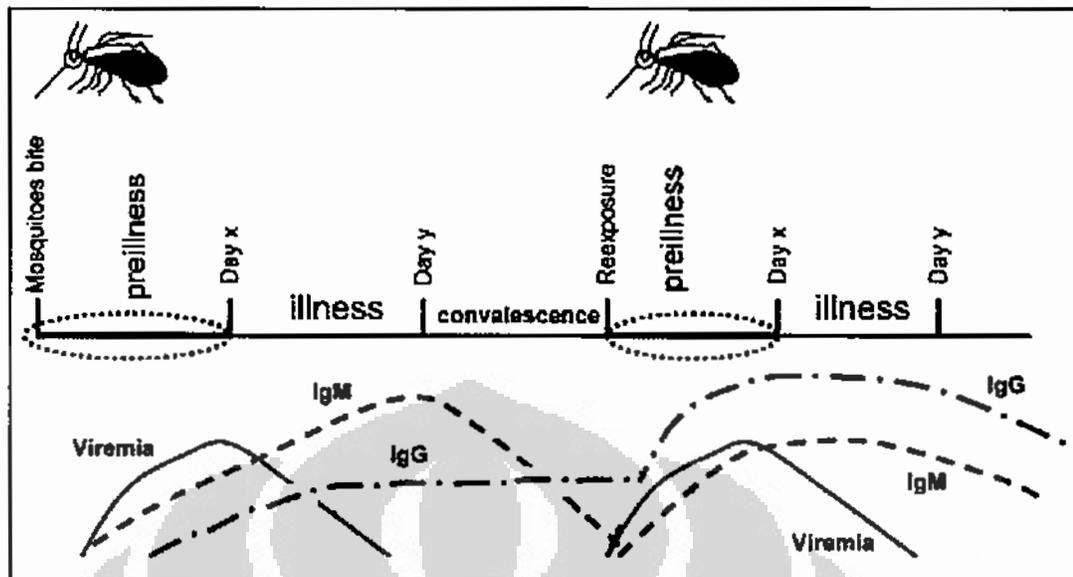
Diketahui pula bahwa protein NS1 virus dengue memicu pembentukan antibodi yang bereaksi silang terhadap epitop pada faktor pembekuan darah (platelet) dan sel endotel manusia. Reaksi silang antara anti-NS1 dengue dengan sel endotel mengakibatkan disfungsi sel endotel. Anti-NS1 virus dengue menginduksi apoptosis sel endotel melalui perantara oksidasi nitrat setelah terikat

pada sel tersebut. Lebih lanjut lagi antibodi ini menginduksi inflamasi sel endotel dengan mengaktivasi IL-6, IL-8 dan CCL2. CCL2 merupakan protein yang dapat mereduksi perlekatan kuat antar sel endotel vaskular. Protein ini terdeteksi dalam konsentrasi tinggi pada pasien DBD dan SSD.<sup>23,24</sup>

### 2.3. KINETIK RESPON ANTIBODI TERHADAP INFEKSI VIRUS DENGUE

Ada dua pola respon imun yang dibedakan terhadap infeksi virus dengue, yaitu respon imun primer dan respon imun sekunder (anamnestik). Pada infeksi primer, antibodi yang pertama muncul dan dominan adalah IgM. Setidaknya pada 50% pasien yang terinfeksi virus dengue, IgM terdeteksi pada hari ketiga sampai kelima periode demam dan pada akhirnya semua pasien akan memiliki IgM yang terdeteksi 2 hari setelah defervesens (demam hilang). Level IgM akan terus meningkat dan mencapai puncaknya dalam 2 minggu, turun dengan cepat selama 2 minggu berikutnya, kemudian turun perlahan-lahan dan mulai tak terdeteksi selama 2-3 bulan setelah infeksi.<sup>25</sup> IgG anti-dengue terdeteksi pada fase demam atau fase awal konvalesens, segera setelah IgM muncul. Pada infeksi primer ini IgG terdeteksi dalam level yang rendah sedangkan IgM jauh melebihi level IgG dalam 2-4 minggu, oleh karena itu infeksi primer dikarakterisasikan dengan tingginya fraksi IgM anti-dengue dan rendahnya fraksi IgG anti-dengue (Gambar 2.2).<sup>6</sup>

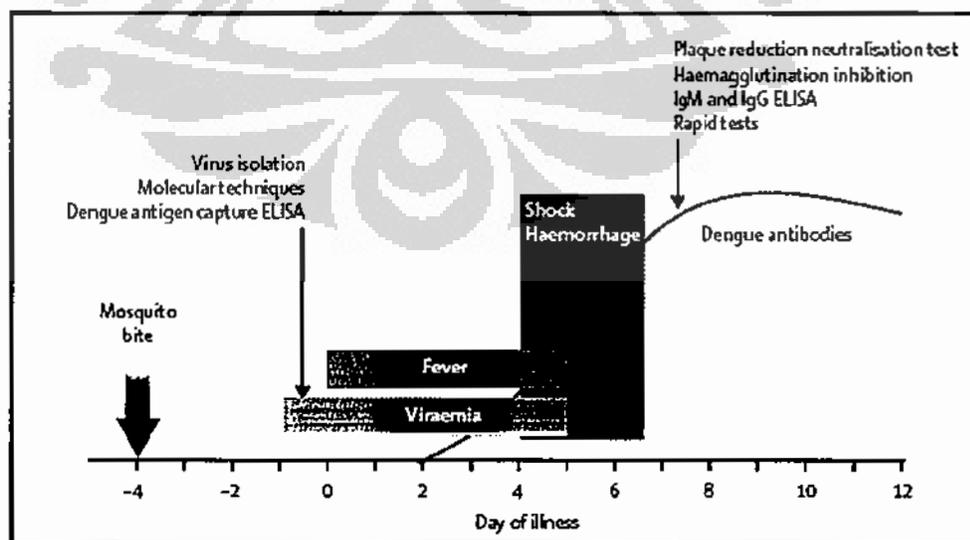
Karakter infeksi sekunder adalah rendahnya fraksi IgM anti-dengue dan tingginya fraksi IgG anti-dengue. IgG terdeteksi dalam level tinggi bahkan pada fase akut dan meningkat drastis dalam 2 minggu, sedangkan level IgM cenderung sangat rendah (bahkan tidak terdeteksi) dan hanya terjadi peningkatan sedikit dibandingkan dengan IgG. Kinetik dari respon IgM pada infeksi sekunder lebih bervariasi. Secara umum IgM muncul pada akhir fase demam. Peningkatan dan level puncaknya jauh lebih rendah dari infeksi primer. Pada lebih dari 50% peristiwa infeksi sekunder, IgM anti-dengue turun drastis dan menjadi tak terdeteksi dalam 30 hari (Gambar 2.2).<sup>5,25</sup>



Gambar 2.2. Kinetik antibodi IgM dan IgG selama infeksi primer dan sekunder virus dengue. Hari ke-x merupakan munculnya gejala, biasanya 2 sampai 5 hari. Hari ke-y mengindikasikan berakhirnya demam, biasanya 5 sampai 7 hari.<sup>26</sup>

#### 2.4. DIAGNOSIS INFEKSI PRIMER DAN SEKUNDER VIRUS DENGUE

Dua metode dasar dalam menetapkan diagnosis infeksi dengue yaitu dengan mendeteksi virus dengue atau antigen lainnya atau deteksi antibodi terhadap virus dengue (serologi). Penerapan kedua metode tersebut memerlukan pengetahuan yang tepat mengenai kinetik dari replikasi virus dan respon antibodi hospes (Gambar 2.3).<sup>5,23</sup>



Gambar 2.3. Peristiwa infeksi dengue dan diagnosa laboratorium.<sup>23</sup>

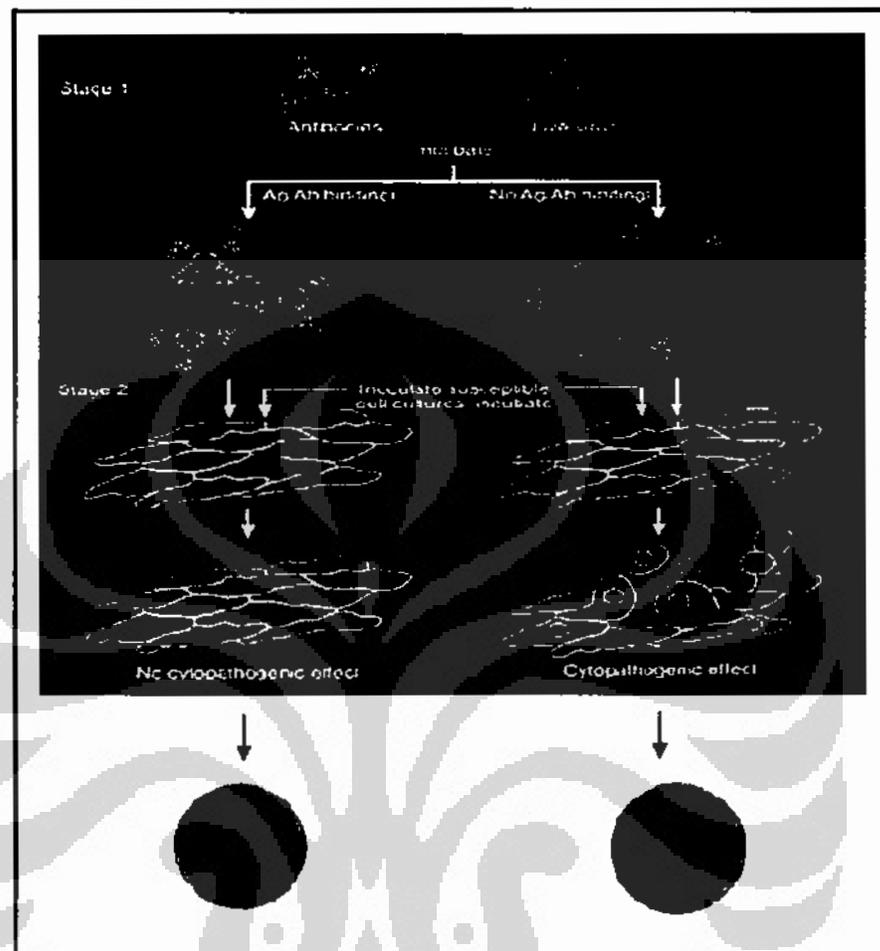
Deteksi antigen dapat dilakukan menggunakan teknik virus isolasi, teknik molekular (misalnya teknik *polymerase chain reaction*), atau deteksi protein NS1 virus antigen dengan teknik ELISA. Uji untuk deteksi antibodi meliputi uji fiksasi komplemen (*complement fixation*), HI, ELISA, dan uji netralisasi. Namun demikian penentuan infeksi primer atau sekunder hanya dapat dilakukan dengan mendeteksi antibodi terhadap virus dengue, diantaranya yaitu dengan uji netralisasi (PRNT), uji HI, dan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).<sup>6</sup>

#### 2.4.1. Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT)

Pada tahun 1952, Dulbecco dkk memperkenalkan metode uji plak (*plaque assay*) untuk beberapa virus. Uji tersebut bekerja berdasarkan keadaan bahwa virus dapat menghasilkan efek sitopatik (CPE) yang teramati sebagai plak pada kultur sel yang bersesuaian. CPE yang terbentuk ini memungkinkan kuantitasi virus dalam format *plaque forming unit* (PFU). Pada tahun 1962 PRNT dikembangkan untuk menghitung titer antibodi netralisasi terhadap virus dengue. Serum yang diencerkan berseri diinkubasi dengan virus pada konsentrasi tertentu dimana pada konsentrasi tersebut virus dapat menghasilkan jumlah PFU konstan yang diinginkan. Dengan adanya antibodi yang spesifik, virus dengue akan dinetralisasi sehingga CPE yang terbentuk berkurang atau tidak terbentuk sama sekali. Reduksi plak tersebut mengekspresikan titer antibodi netralisasi terhadap virus dengue.<sup>27,28</sup>

Pada uji PRNT, serum yang diencerkan berseri kelipatan 4 ditambahkan dengan suspensi virus dalam perbandingan volume yang sama dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Suspensi virus biasanya mengandung 20-50 PFU tergantung kultur *plate* yang digunakan. Campuran serum-virus lalu ditambahkan ke kultur sel dan dibiarkan selama 2-3 jam agar virus terabsorpsi ke dalam sel. Kultur sel yang bersesuaian untuk uji PRNT umumnya adalah sel LLC-MK2, sel Vero, dan sel *Baby Hamster Kidney* 21 (BHK21). Setelah inkubasi selama 5-7 hari pada suhu 37°C, sel akan membentuk *monolayer* pada dasar *plate*. Sel yang terinfeksi virus akan terlepas dari dasar *plate* dan terbuang pada proses pencucian, kemudian ketika diwarnai akan terlihat sebagai plak pada dasar *plate* (Gambar 2.4). Titer antibodi dihitung menggunakan metode log probit berdasarkan plak yang dihitung pada setiap sumur *plate*. *Endpoint* dari titrasi adalah pengenceran

tertinggi dari serum yang dapat mereduksi jumlah plak sebanyak 50-90%.<sup>27,28,29</sup>



Gambar 2.4. Skema prinsip kerja dari PRNT

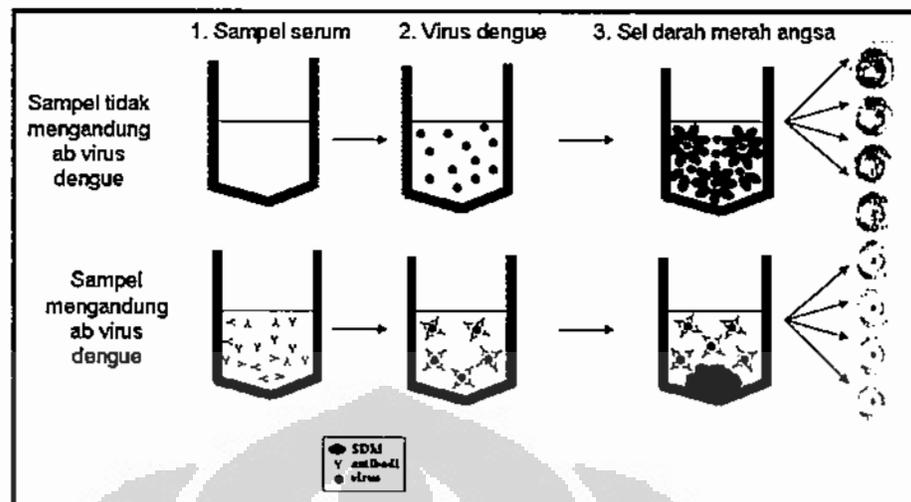
Hasil PRNT biasanya akan memperlihatkan reaksi monotipik pada peristiwa infeksi primer. Titer antibodi tertinggi yang ditunjukkan oleh PRNT homolog terhadap tipe virus dengue yang sedang menginfeksi. Pada infeksi sekunder, titer antibodi yang tinggi diperlihatkan terhadap setidaknya 2 atau bahkan keempat serotipe dengue, dan juga terhadap flavivirus lainnya. Titer antibodi netralisasi tertinggi pada sampel konvalesen yang ditunjukkan oleh hasil PRNT merupakan antibodi terhadap serotipe virus yang menginfeksi sebelumnya, hal ini dikenal sebagai *original antigenic sin theory*.<sup>5,29</sup>

PRNT merupakan uji serologi tradisional yang paling spesifik dan sensitif. Selain dapat membedakan tipe infeksi, PRNT juga dapat menentukan serotipe dengue dibandingkan dengan HI dan uji serologi lainnya. Kekurangannya adalah uji ini tergolong mahal, memerlukan waktu yang lama untuk mendapatkan hasil

dan secara teknik cukup sulit.<sup>6</sup> Perkiraan biaya pemeriksaan dengan uji PRNT yang dilakukan di laboratorium US NAMRU-2 adalah sekitar \$10 per sampel dan hasilnya baru bisa diperoleh setelah 4-6 hari. Selain itu uji PRNT sendiri termasuk *bioassay in vitro* yang cukup kompleks dikarenakan banyaknya inter- dan intra-variasi yang terlibat dalam pengerjaannya. Variasi umumnya berupa galur sel yang digunakan, preparasi virus dan sejarah pasasinya, dan kultur sel yang digunakan untuk preparasi virus. Dengan demikian hasil yang didapat juga cukup variatif sehingga sulit untuk menginterpretasikan data PRNT dan mengidentifikasi infeksi dengue sebelumnya. Walaupun sampai saat ini upaya untuk menetapkan standar interpretasi hasil uji PRNT sedang berlanjut, namun uji ini masih dijadikan standar baku emas dalam mendeteksi antibodi netralisasi oleh WHO.<sup>27</sup>

#### **2.4.2. Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)**

Uji HI dikembangkan oleh Casals dan Brown pada tahun 1954. Uji HI bekerja berdasarkan pengetahuan bahwa virus dengue termasuk dalam salah satu virus yang mempunyai kemampuan untuk berikatan dengan sel darah merah dari spesies mamalia atau avian tertentu sehingga terjadi aglutinasi. Antibodi spesifik terhadap virus dengue tersebut dapat menghambat proses aglutinasi sel darah merah. Bila di dalam sampel uji mengandung antibodi, maka virus akan terikat membentuk kompleks antigen-antibodi. Ketika ke dalam reaksi tersebut ditambahkan sel darah merah, virus tersebut tidak dapat lagi berikatan dengan sel darah merah. Dengan demikian, aglutinasi sel darah merah oleh virus juga tidak terjadi. Aglutinasi sel darah merah ditunjukkan dengan terbentuknya anyaman aglutinasi antar sel darah merah dengan perantaraan antigen yang tampak sebagai endapan merata yang tersebar pada sumur. Hambatan aglutinasi ditunjukkan dengan absennya anyaman aglutinasi dan tampak sebagai titik atau area endapan sel darah merah (Gambar 2.5).<sup>27</sup>



Gambar 2.5. Skema prinsip kerja uji HI

Sel darah merah yang dapat digunakan pada uji HI terhadap dengue adalah sel darah merah angsa dan sel darah merah manusia golongan O. Sel darah merah angsa diperoleh dari angsa betina dewasa (*Anser cinereus*). Aglutinasi sel darah merah bergantung pada pH dan konsentrasi antigen. Antigen dengue umumnya diperoleh dari virus dengue yang diinokulasi pada otak tikus (*suckling mice/Mus musculus*) atau kultur sel. Konsentrasi antigen dihitung dalam satuan unit HA (*haemagglutination*). Satu unit HA adalah titer tertinggi dari antigen yang masih mampu menyebabkan aglutinasi sel darah merah secara maksimum.<sup>27</sup>

Antibodi HI terhadap dengue bereaksi silang terhadap flavivirus bahkan dengan keempat serotipe lainnya.<sup>29</sup> Penelitian yang dilakukan oleh Anantapreecha dkk<sup>30</sup> memperlihatkan titer HI pada level yang hampir sama antara keempat serotipe baik pada fase akut maupun konvalesens sehingga uji HI tidak dapat digunakan untuk menentukan serotipe dengue yang sedang menginfeksi. Namun demikian dengan tingginya reaksi silang tersebut, penggunaan antigen dari serotipe apapun virus dengue akan cukup untuk mengatakan seseorang pernah atau sedang terinfeksi.

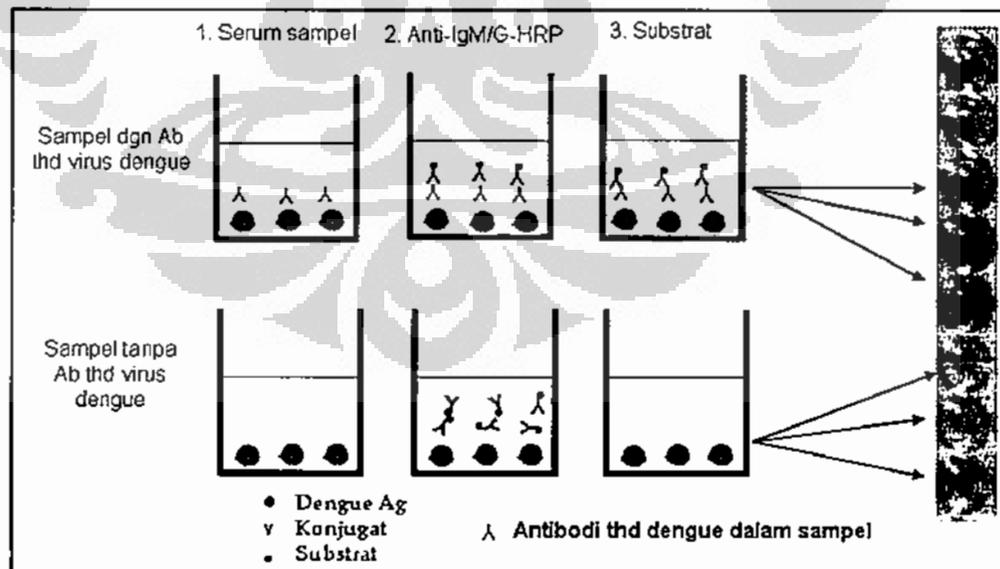
Interpretasi uji HI didasarkan pada titer dan waktu setelah munculnya gejala. *Endpoint* titrasi adalah pengenceran tertinggi dari serum yang dapat menghambat aglutinasi sejumlah konsentrasi standar tertentu antigen. Hasil positif terhadap infeksi dengue ditunjukkan dengan adanya kenaikan titer 4 kali atau lebih antara serum akut dan konvalesen. Jika titer HI  $\geq 2560$  dikategorikan sebagai infeksi

sekunder dan titer  $\leq 1280$  sebagai infeksi primer.<sup>6,29</sup>

### 2.4.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA telah banyak digunakan untuk diagnosa serologi infeksi virus dengue dikarenakan pengerjaannya yang mudah dan simpel, reproduibel dan semi-otomatis sehingga memungkinkan pengerjaan sampel dalam jumlah besar. Nilai tambah lainnya dari uji ini adalah kemampuannya untuk membedakan infeksi primer dan sekunder.<sup>27</sup>

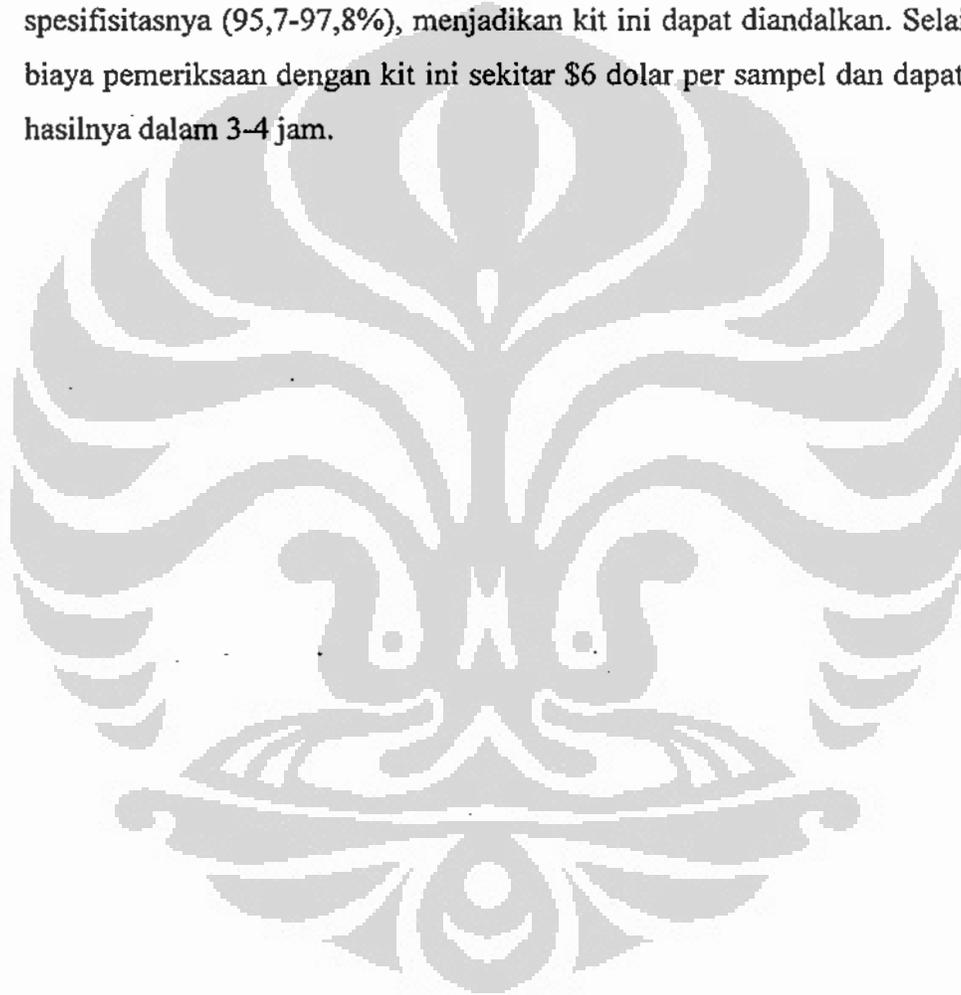
ELISA baru diperkenalkan oleh Innis dkk pada tahun 1989<sup>8</sup> untuk mendeteksi antibodi IgM dan IgG anti-dengue. Pada format ini sumur-sumur mikrotiter dilapisi anti-human IgM atau IgG. Sampel serum lalu ditambahkan dan diinkubasi, dilanjutkan dengan penambahan antigen dengue virus, antibodi sekunder yang dikonjugasi dengan horseradish peroksidase (HRP), enzim substrat dan kromogen. Jika di dalam sampel serum terdapat antibodi IgM atau IgG, maka antibodi tersebut akan terikat pada anti-human IgM/IgG, berikutnya antigen virus akan terikat pada antibodi IgM/IgG, dan antibodi sekunder terikat pada antigen. Warna akan terbentuk ketika enzim substrat berikatan dengan HRP pada antibodi sekunder. Warna yang dihasilkan dari reaksi tersebut diukur kerapatan optiknya (OD) dengan spektrofotometer (Gambar 2.6).<sup>27</sup>



Gambar 2.6. Skema prinsip kerja ELISA

Kini banyak kit ELISA komersial yang sudah dibuat dan beredar di pasaran. Kit-kit tersebut menawarkan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dalam

mendeteksi antibodi dengue dibandingkan dengan metode *in-house* konvensional yang diperkenalkan oleh Innis dkk tersebut.<sup>8</sup> De souza dkk<sup>12</sup> telah menguji performa Dengue Virus IgG DxSelect™ (OUS) dari Focus Diagnostics, salah satu kit ELISA komersial, dalam membedakan infeksi primer dan sekunder. Determinasi infeksi dengue dilakukan baik berdasarkan nilai indeks titer IgG, nilai indeks aviditas IgG dan nilai rasio IgM/IgG. Ketiga pendekatan tersebut memberikan hasil yang sangat baik dilihat dari nilai sensitivitas (100%) dan spesifisitasnya (95,7-97,8%), menjadikan kit ini dapat diandalkan. Selain itu juga biaya pemeriksaan dengan kit ini sekitar \$6 dolar per sampel dan dapat diketahui hasilnya dalam 3-4 jam.



### BAB III

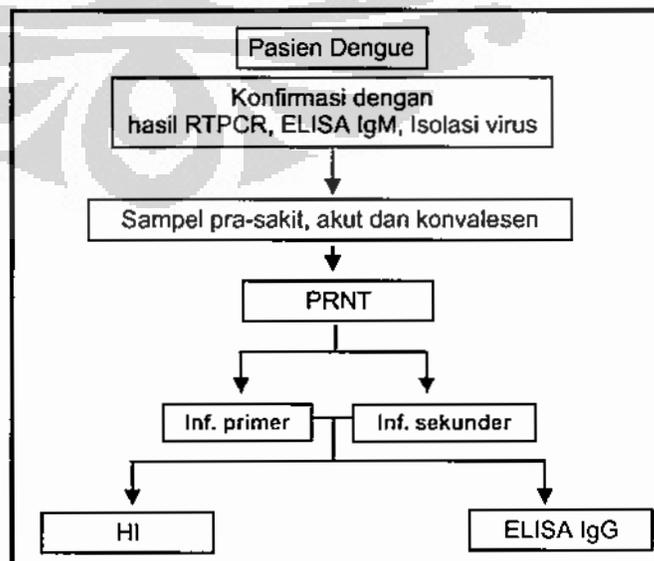
#### BAHAN DAN CARA KERJA

##### 3.1. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian dilakukan di laboratorium *United States Naval Medical Research Unit 2* (US NAMRU-2), departemen virologi, Jakarta mulai bulan Oktober 2008 hingga April 2009.

##### 3.2. STRATEGI PENELITIAN

Sampel-sampel yang digunakan pada penelitian ini berasal dari kasus yang telah terkonfirmasi sebagai infeksi dengue dengan uji *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), isolasi virus dan ELISA IgM. Penelitian dilaksanakan dengan melakukan uji HI, ELISA IgG dan PRNT. Ketiga uji tersebut dilakukan pada sampel pasien fase akut, konvalesens dan pra sakit/saat sehat (jika tersedia) dari beberapa studi. Data yang diperoleh dari ketiga uji tersebut dianalisa secara statistik dan dibandingkan satu sama lain untuk melihat performa (sensitivitas, spesifisitas, *positive* dan *negative predictive values*) serta kemampuan masing-masing uji dalam menentukan infeksi primer dan sekunder (Gambar 3.1)



Gambar 3.1. Skema strategi penelitian

### 3.3. BAHAN

#### 3.3.1. Koleksi Sampel

Sampel serum yang digunakan pada penelitian ini dikoleksi dari beberapa studi surveilans, yaitu

- 1) Studi kohort prospektif infeksi dengue pada pekerja pabrik di Bandung,
- 2) Studi kohort prospektif pada keluarga dan tetangga terdekat penderita infeksi dengue (studi kluster) di Bandung dan Jakarta,
- 3) Studi chikungunya di Jakarta.

Serum fase akut diambil ketika peserta studi berobat ke klinik atau puskesmas dan fase konvalesens diambil setidaknya tujuh hari kemudian. Serum fase pra-sakit diambil antara 1 minggu sampai 3 bulan sebelum peserta studi sakit. Jumlah kasus infeksi dengue yang dimasukkan dalam penelitian ini adalah 92 kasus yang terdiri dari 39 sampel pra-sakit, 92 sampel akut serta 92 sampel konvalesen sehingga total jumlah keseluruhan sebanyak 223 sampel.

#### 3.3.2. Bahan untuk uji PRNT

Uji PRNT menggunakan bahan berupa sel *Baby Hamster Kidney-21* klon 15 (BHK-21C115) dari *American Type Cell Collection* (ATCC); virus referensi berupa virus dengue 1 (16007), dengue 2 (16681), dengue 3 (16562), dan dengue 4 (1036); positif sera standar berupa *Hyperimmune Ascitic Fluid* (HMAF) antibodi anti-dengue 1 (ATCC VR 71, nomor katalog V574-701-562), HMAF antibodi anti-dengue 2 (New Guinea VR 222, nomor katalog V575-701-562), HMAF antibodi anti-dengue 3 (H87 VR216, nomor katalog V576-701-562), HMAF antibodi anti-dengue 4 (ATCC VR217, nomor katalog V557-701-562); diluen untuk antigen virus dan sampel serum berupa *Minimal Essential Medium Hank's* (MEM-H) [Sigma/nomor produk M1018] pH 7,4 yang mengandung 2% *heat-inactivated* Fetal Bovine Serum (FBS)[Gibco/nomor katalog 26140-079] dan 1% antibiotik Penicillin-Streptomycin (1000 units/ml)[Gibco/nomor katalog 15140-148]; medium untuk pertumbuhan (*growth medium*) sel BHK-21C115 berupa MEM-H yang mengandung 10% FBS dan 1% antibiotik; medium untuk *overlay* berupa 1,5% *Carboxymethylcellulose* (CMC) [Sigma/nomor katalog C-4888] dalam 1X MEM tanpa *phenol red* [Sigma/nomor produk M3024] yang mengandung 15% FBS, 0,3% sodium bikarbonat [Gibco/nomor katalog 11810-

025] dan 1% antibiotik; larutan pewarna (*staining solution*) berupa campuran 1,6mM *Naphtol-blue black* [Sigma/nomor katalog 19524-3], 0,16M sodium asetat [Sigma/nomor katalog S-5636], dan 6% asam asetat glasial [Sigma/nomor katalog A-0808].

### 3.3.3. Bahan untuk uji HI

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam uji HI ini terdiri dari larutan borate saline (BS) berupa NaCl 0,12M, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,05M, NaOH 0,024N; kaolin 25% dalam BS pH 9.0; *Bovine Albumin* dalam BS (BABS) 0.4% pH 9.0; sel darah merah angsa pekat; sel darah merah angsa 0,4% dalam BS pH 6,4; antigen virus dengue-3 dengan titer sebesar 4-8 HA (Hemaglutinasi) unit, kontrol referensi serum positif dan negatif.

### 3.3.4. Bahan untuk uji ELISA IgG

Uji ELISA IgG dilakukan menggunakan kit ELISA IgG komersial Dengue Virus IgG DxSelect™ (OUS) dari Focus Diagnostics, Amerika Serikat. Bahan-bahan yang dipakai dan tersedia dalam kit ini berupa 96 sumur mikro yang sudah dilapisi antigen virus dengue 1-4 yang murni dan inaktif, *goat anti-human IgG* (spesifik terhadap fragmen Fc) yang dikonjugasi dengan peroksida, diluen, dapar pencuci (*wash buffer*) berupa surfaktan di dalam Phosphat Buffer Saline (PBS), reagen substrat berupa tetramethylbenzidine (TMB) dan hidrogen peroksida dalam dapar, reagen penghenti reaksi (*stop reagent*) berupa asam sulfat 1 M, kontrol positif dan negatif untuk reaksi, dan *IgG cut off calibrator*.

## 3.4. CARA KERJA

### 3.4.1. Uji PRNT

#### a. Preparasi virus

Untuk preparasi virus, masing-masing stok virus dengue 1-4 referensi diencerkan dengan diluen MEM-H dengan FBS 2% pada konsentrasi tertentu dimana pada konsentrasi tersebut virus akan membentuk 20-30 plak ketika diinokulasi pada sel BHK21C115.

b. Preparasi antibodi (sampel serum dan kontrol)

Untuk sampel serum yang akan diuji, termasuk kontrol positif dan negatif, diencerkan sebesar kelipatan 4. Sebanyak 20  $\mu$ l serum ditambahkan dengan diluen MEM-H FBS 2% 180  $\mu$ l untuk mendapatkan pengenceran 1:10. Kemudian 50  $\mu$ l dari pengenceran 1:10 tersebut dipindahkan ke tabung pengenceran baru dan ditambahkan diluen sebanyak 150  $\mu$ l untuk mendapatkan pengenceran 1:40. Sebanyak 50  $\mu$ l dari pengenceran 1:40 dipindahkan lagi dan ditambahkan 150  $\mu$ l diluen untuk menghasilkan pengenceran 1:160, begitu seterusnya untuk mendapatkan pengenceran 1:640, 1:2560 dan 1:10240. Sebanyak 100  $\mu$ l dari setiap pengenceran tersebut dipindahkan ke tabung baru.

c. Preparasi sel BHK21Cl15

Sel BHKCl15 yang berusia dua hari disiapkan dan dipastikan bebas dari kontaminasi baik jamur maupun bakteri. Medium pertumbuhan sel dibuang dan sel dicuci dua kali menggunakan tripsin. Terakhir tripsin ditambahkan dan didiamkan selama 5 menit sehingga sel terlepas dari dasar *flask*. Sel kemudian dihitung menggunakan bilik hitung dan diencerkan untuk mencapai jumlah sel sebesar  $3 \times 10^5$  sel/ml menggunakan medium pertumbuhan MEM-H dengan FBS 10%. Sebanyak 1 ml dari sel tersebut lalu dibagikan ke setiap sumur dari *plate*.

d. PRNT untuk sampel serum dan kontrol

Masing-masing virus dengue 1-4 hasil pengenceran sebelumnya (bagian a) ditambahkan ke semua tabung yang sudah berisi sampel serum pengenceran 1:10 sampai 1:10240 (bagian b) dan dicampur dengan sempurna. Campuran lalu diinkubasi pada 37°C dalam inkubator dengan CO<sub>2</sub> sebesar 5% selama 1 jam. Setiap 15 menit masa inkubasi, rak berisi tabung reaksi digoyang-goyang agar campuran tercampur baik dan reaksi berjalan sempurna. Setelah 1 jam, 2 x 50  $\mu$ l (duplo) campuran virus-sampel serum ditambahkan ke sumur *plate* yang sudah berisikan sel BHK21Cl15 (bagian c). *Plate* digoyang perlahan agar sel dan campuran virus-sampel serum tersebar merata. *Plate* diinkubasi selama 3 jam atau sampai sel terlihat menempel di dasar sumur. Medium *overlay* CMC ditambahkan ke setiap sumur sebanyak 1 ml. *Plate* lalu diinkubasi pada 37°C dalam inkubator dengan CO<sub>2</sub> sebesar 5% selama 4-5 hari untuk dengue 2, 5-6 hari untuk dengue 1,3 dan 4.

e. PRNT untuk kontrol titer plak

Ke dalam delapan tabung pengenceran baru diisikan masing-masing 100  $\mu$ l diluen MEM-H 2% FBS. Virus dengue 1-4 hasil pengenceran (bagian a) ditambahkan ke dalam tabung tersebut (masing-masing duplo) dan dicampur dengan baik. Campuran lalu diinkubasi pada 37°C dalam inkubator dengan CO<sub>2</sub> sebesar 5% selama 1 jam. Perlakuan selanjutnya sama dengan perlakuan terhadap sampel serum dan kontrol (bagian c).

e. Pewarnaan

Semua cairan yang ada dalam sumur *plate* dituang ke dalam wadah pembuangan yang berisi larutan kloroks 10% untuk mendekontaminasi sisa-sisa virus dan sel dari reaksi. *Plate* kemudian dicuci dengan air keran yang mengalir dengan hati-hati. Larutan pewarna 1 ml ditambahkan dengan segera dan dibiarkan selama 1-3 jam. *Plate* lalu dicuci kembali dari larutan pewarna dan dikering-anginkan. Jumlah plak yang dihasilkan dihitung.

f. Penghitungan reduksi titer plak 50% (*50% plaque reduction*)

Aktivitas antibodi netralisasi ditentukan dengan menghitung jumlah reduksi plak yang dihasilkan virus pada sample serum yang diuji dibandingkan dengan jumlah plak yang dihasilkan virus pada kontrol titer plak. Reduksi jumlah plak sebanyak 50% ditetapkan sebagai *endpoint* dari aktivitas netralisasi. Perhitungan reduksi 50% ini dilakukan menggunakan program SPSS 9.0 dari *windows* dengan memasukkan besarnya titrasi, jumlah plak dari tiap titrasi dan jumlah plak dari kontrol, kemudian dianalisa dengan melihat nilai probit pada posisi 0.50.

### 3.4.2. Uji HI

a. Absorpsi Kaolin

Absorpsi kaolin dilakukan sebagai perlakuan awal sampel serum untuk menghilangkan penghambat non-spesifik. Di dalam tabung, 50  $\mu$ l serum dicampur dengan 200  $\mu$ l BS pH 9,0. Campuran lalu dinaktivasi dengan menginkubasi dalam *waterbath* pada suhu 56°C. Setelah 30 menit inkubasi, 250  $\mu$ l suspensi kaolin 25% ditambahkan dan divorteks tiap 5 menit selama 20 menit. Campuran disentrifugasi pada 2000 rpm selama 20 menit pada suhu ruang. Campuran lalu

ditambahkan sel darah merah angsa padat 100  $\mu$ l dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit dengan agitasi setiap 10 menit. Terakhir campuran disentrifugasi pada 1500 rpm selama 10 menit dan serum (supernatan) dipindahkan ke tabung baru. Serum siap digunakan dalam reaksi HI selanjutnya atau disimpan pada 4°C atau -20°C jika tidak segera digunakan.

b. Titrasi antigen dan Uji Hemaglutinasi (HA)

Uji HA dilakukan untuk menentukan besarnya titer antigen virus yang digunakan untuk uji HI selanjutnya yaitu sebesar 8 unit HA. Satu unit HA adalah pengenceran tertinggi dari antigen virus dengue yang masih dapat mengagglutinasi sel darah merah angsa secara maksimal. Sumur mikrotiter dari *plate* diisi dengan 25  $\mu$ l BABS pH 9,0. Pada sumur pertama ditambahkan 25  $\mu$ l antigen virus dengue-3 yang sudah diencerkan 1:10 menggunakan BABS dan dilakukan pengenceran serial sampai pada sumur kesebelas (1:20480). Setelah pengenceran selesai, 25  $\mu$ l BABS kembali ditambahkan ke dalam setiap sumur berisi antigen tersebut. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. sel darah merah angsa yang sudah diencerkan dengan dapar pH 6,4 (merupakan hasil optimasi sebelumnya), ditambahkan sebanyak 50  $\mu$ l. Setelah inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang, pola hemaglutinasi dalam sumur dibaca. Nilai titer antigen adalah pengenceran tertinggi yang masih memperlihatkan hemaglutinasi. Hemaglutinasi ditunjukkan dengan terbentuknya anyaman aglutinasi antar sel darah merah dengan perantaraan antigen yang tampak sebagai endapan merata yang tersebar pada sumur. Delapan unit HA diperoleh dari membagi besarnya titer tersebut dengan delapan.

c. Hambatan hemaglutinasi

Pada setiap sumur mikrotiter (kecuali sumur pertama dan kedua) diisi dengan 25  $\mu$ l BABS. Pada sumur pertama dan kedua ditambahkan 50  $\mu$ l sampel serum (bagian a). Pengenceran dimulai dari 1:10 dengan mengambil 25  $\mu$ l serum dari sumur kedua dan dipindahkan ke sumur ketiga, begitu seterusnya sampai mencapai pengenceran 1:10240 pada sumur keduabelas. Sumur pertama berfungsi sebagai kontrol serum. Antigen yang diencerkan dengan BABS sebesar 8 unit HA (bagian b) ditambahkan pada tiap sumur sebanyak 25  $\mu$ l kecuali pada sumur pertama. *Plate* lalu diagitasi menggunakan *microshaker* selama beberapa detik.

Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam, ke dalam sumur ditambahkan sel darah merah angsa dengan pH yang bersesuaian terhadap antigen yang digunakan (pH 6,4) sebanyak 50  $\mu$ l dan diagitasi dengan *microshaker* selama beberapa detik. *Plate* didiamkan pada suhu ruang selama 1 jam dan pola hemaglutinasinya kemudian dibaca.

### 3.4.3. Uji ELISA IgG

Uji ELISA IgG dilakukan dengan urutan kerja mengikuti petunjuk penggunaan kit. Serum sampel yang sudah diencerkan dengan diluen sebesar 1:10 dimasukkan ke dalam sumur mikro titer sebanyak 100  $\mu$ l dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam supaya antibodi spesifik yang terdapat di dalam serum berikatan dengan antigen. Sumur lalu dicuci dengan dapar pencuci untuk menghilangkan reaktan non-spesifik. Sebanyak 100  $\mu$ l konjugat peroksida ditambahkan dan diinkubasi selama 30 menit. Sumur kembali dicuci untuk menghilangkan konjugat yang berlebih. Reagen substrat kemudian dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 100  $\mu$ l untuk memberi warna pada campuran reaksi. Setelah 10 menit inkubasi pada suhu ruang, reagen penghenti reaksi ditambahkan. Sumur yang mengandung positif antibodi akan berubah warna dari biru menjadi kuning pada proses penambahan ini. Warna yang dihasilkan tersebut diukur OD-nya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

### 3.4.4. Analisa Statistik

Data yang diperoleh dari ketiga uji di atas diolah dengan menghitung nilai sensitivitas, spesifitas, *negative predictive value* (NPV) dan *positive predictive value* (PPV). Performa HI dan ELISA dibandingkan secara statistik menggunakan uji *chi-square* dengan program STATA dari windows.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. ANALISA HASIL PRNT, HI DAN ELISA

PRNT merupakan uji yang mendeteksi antibodi netralisasi terhadap dengue. Pada penelitian ini titer antibodi netralisasi dihitung berdasarkan reduksi plak sebesar 50%. Untuk berbagai tujuan penelitian lain, titer antibodi netralisasi dapat dihitung pada reduksi >50%. Namun *endpoint* 50% merupakan yang paling akurat. Presentase reduksi yang lebih besar akan meningkatkan spesifisitas namun menurunkan sensitivitas uji PRNT.<sup>38</sup> Contoh pembacaan hasil PRNT disajikan pada lampiran 1.

Pada uji HI, hambatan hemaglutinasi ditunjukkan dengan absennya anyaman aglutinasi yang tampak sebagai titik atau area endapan sel darah merah. Nilai titer antibodi ditunjukkan oleh pengenceran serum tertinggi yang memperlihatkan tidak terjadinya (terhambatnya) hemaglutinasi seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 2.

Hasil yang didapat dari uji ELISA berupa nilai indeks relatif terhadap *cut-off calibrator*. Nilai indeks tersebut dihitung dari nilai OD setiap spesimen dibagi dengan nilai OD dari *cut-off calibrator*. Pada lampiran 2 diperlihatkan contoh OD hasil pembacaan ELISA dan nilai indeks titer IgG yang diperoleh.

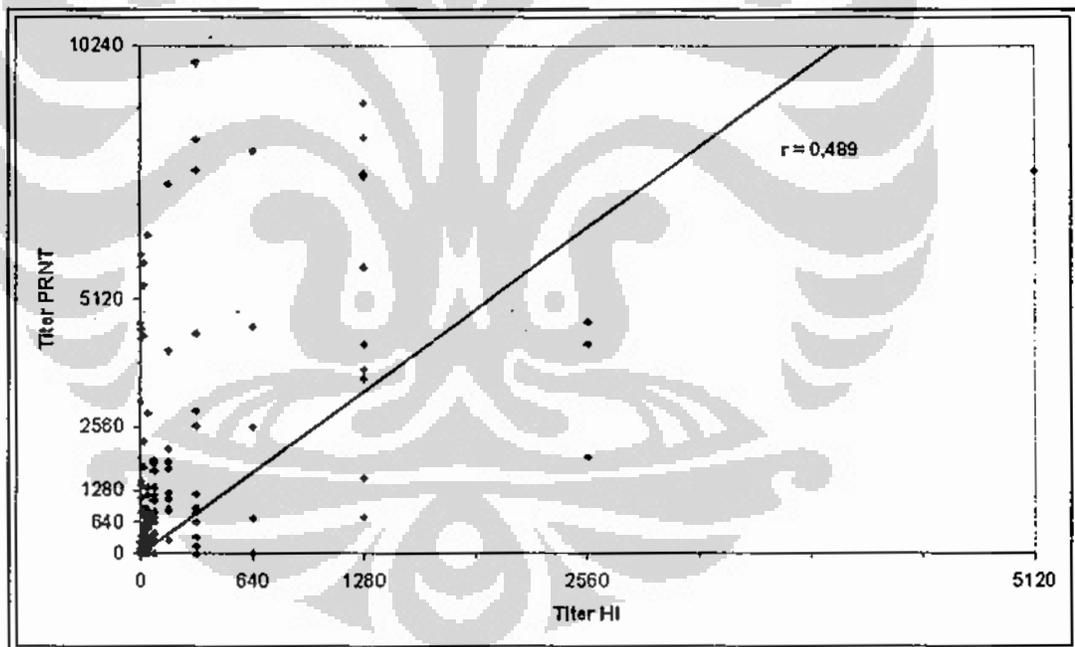
### 4.2. KRITERIA HASIL POSITIF DAN NEGATIF

Hasil PRNT dikatakan negatif atau tidak terdapatnya antibodi terhadap virus dengue di dalam sampel serum apabila tidak terjadi reduksi plak sebesar 50% pada titer 1:10 terhadap keempat serotipe dengue. Sedangkan pada HI, hasil negatif apabila tidak terjadi hambatan aglutinasi pada titer <10. Untuk uji ELISA IgG hasil negatif ditunjukkan dari nilai indeks <1, sesuai dengan instruksi protokol produsen kit Dengue Virus IgG DxSelect™ (OUS) dari Focus Diagnostics (Tabel 4.1).

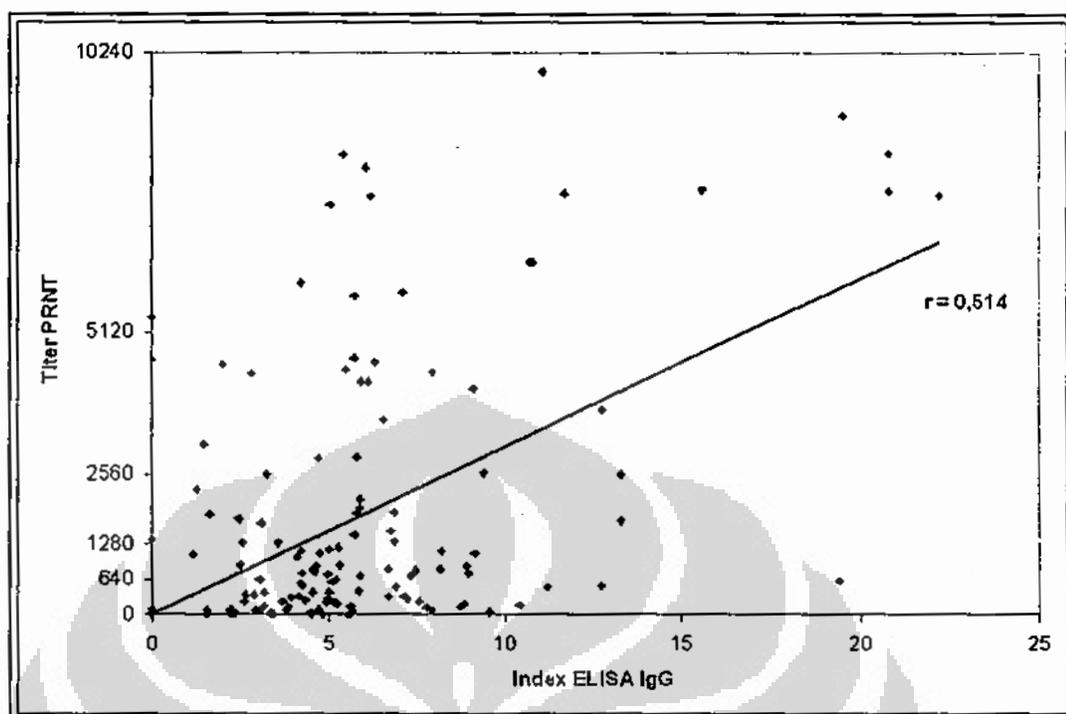
Tabel 4.1. Contoh hasil positif dan negatif uji PRNT, HI dan ELISA pada spesimen yang diuji

	ID Sampel	Tanggal Koleksi	PRNT								HI	ELISA
			D1-50%	D2-50%	D3-50%	D4-50%	D1-80%	D2-80%	D3-80%	D4-80%		
Hasil Negatif	50059	3/4/2001	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	0,196
Negatif	50066	9/29/2001	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	0,337
Hasil Positif	50076	4/12/2001	15500.7	14216.1	3316.6	2602.7	4708.9	4393.9	1375	640.8	1280	20.26
Positif	50160	2/8/2001	4158.2	>1000	28561.2	978.7	1649.7	>1000	2101.4	145.03	2560	12.397

Grafik korelasi antara titer PRNT dan titer HI ditunjukkan pada grafik 4.1 dan korelasi dengan angka indeks IgG tampak pada grafik 4.2. Terlihat hubungan yang kurang bagus antara titer PRNT dan titer HI ( $R=0,489$ ), sedangkan korelasi antara titer PRNT dengan indeks IgG memperlihatkan hasil yang lebih baik ( $R=0,51$ ).



Grafik 4.1. Korelasi antara titer PRNT dengan titer HI



Grafik 4.2. Korelasi antara titer PRNT dengan nilai indeks ELISA IgG

#### 4.3. SENSITIVITAS DAN SPESIFISITAS UJI HI DAN ELISA IgG

Performa uji HI dan ELISA dalam mendeteksi antibodi di dalam sampel serum dilihat dengan menghitung nilai sensitivitas dan spesifisitas kedua uji tersebut terhadap PRNT. Total jumlah spesimen yang dikerjakan pada penelitian ini sebanyak 223 sampel serum, terdiri dari sampel pada fase pra-sakit (jika tersedia), akut dan konvalesen. Hasil dari ketiga uji tersebut disajikan pada tabel 4.2.

Tabel 4.2. Hasil yang diperoleh pada uji PRNT, HI dan ELISA dalam mendeteksi antibodi

	PRNT	HI	ELISA
Positif	200	195	197
Negatif	23	28	26

Dari 200 sampel yang positif dengan PRNT, sebanyak 185 dan 192 positif dengan HI dan ELISA IgG. Dari 23 sampel yang negatif dengan PRNT, 13 dan 18 sampel juga negatif dengan HI dan ELISA IgG. Tabel 2x2 dari uji PRNT terhadap HI dan PRNT terhadap ELISA IgG disajikan pada tabel 4.3 dan 4.4.

Tabel 4.3. Perbandingan performa HI terhadap PRNT dalam mendeteksi antibodi

		PRNT	
		+	-
HI	+	185	10
	-	15	13
		(n = 200)	(n = 23)
		(n = 195)	(n = 28)

Tabel 4.4. Perbandingan performa ELISA terhadap PRNT dalam mendeteksi antibodi

		PRNT	
		+	-
ELISA IgG	+	192	5
	-	8	18
		(n = 200)	(n = 23)
		(n = 197)	(n = 26)

Dengan demikian nilai sensitivitas HI adalah sebesar 92,5%, spesifisitas 56,5%, PPV 94,4% dan NPV 46,4%. Untuk uji ELISA IgG, nilai sensitivitas sebesar 96%, spesifisitas 78,3%, PPV 97,5% dan NPV 62,9%. Secara keseluruhan hasil tersebut memperlihatkan performa ELISA IgG lebih baik dibandingkan dengan HI namun perbedaan tersebut secara statistik (uji *chi-square*) tidak signifikan ( $p > 0,05$ ; CI 95%) (Tabel 4.5). Keadaan tersebut disebabkan karena jumlah spesimen negatif yang kurang banyak sehingga nilai spesifisitas dan NPV antara ELISA dan HI tidak berbeda bermakna.

Tabel 4.5. Nilai sensitivitas dan spesifisitas HI dan ELISA

	HI	ELISA	Nilai p
Sensitivitas	92.5%	96.0%	0.13
Spesifisitas	56.5%	78.3%	0.11
PPV	94.9%	97.5%	0.18
NPV	46.4%	69.2%	0.09

#### 4.4. DETERMINASI INFEKSI PRIMER DAN SEKUNDER VIRUS DENGUE BERDASARKAN PRNT, HI DAN ELISA

Klasifikasi infeksi primer berdasarkan PRNT dalam penelitian ini yaitu apabila titer sampel pra-sakit atau akut negatif terhadap semua serotipe dengue. Kasus infeksi sekunder diindikasikan dengan adanya positif titer pada serum pra-sakit dan akut kemudian terjadi kenaikan titer pada sampel fase konvelesen dan tingginya reaksi silang terhadap keempat serotipe (Tabel 4.6).<sup>7</sup>

Kriteria HI dalam menentukan infeksi primer dan sekunder ditetapkan WHO berdasarkan pemeriksaan virologi dan imunologi secara ekstensif terhadap pasien dengue di laboratorium US Army, Bangkok, Thailand.<sup>31</sup> Pada penelitian ini, kriteria infeksi primer dan sekunder infeksi dengue mengikuti kriteria yang ditetapkan WHO (Tabel 4.7). Suatu kasus infeksi dengue dikategorikan sebagai infeksi primer bila terjadi serokonversi atau titer antibodi  $\leq 1280$  pada fase konvelesen. Infeksi sekunder apabila titer HI  $\geq 2560$  dengan interval akut-konvelesen selama 7 hari atau lebih (Tabel 4.6).

Tabel 4.6. Determinasi infeksi primer dan sekunder berdasarkan PRNT, IgG dan ELISA

Infeksi dengue	Fase sampel	ID sampel	Tanggal koleksi	PRNT								ELISA	HI	
				D1 50%	D2 50%	D3 50%	D4 50%	D1 80%	D2 80%	D3 80%	D4 80%			
Infeksi primer	Pra-sakit	50059	26/2/01	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	0.254	<10
	Akut	50059	4/3/2001	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	0.196	<10
	Konv	50059	22/3/01	196.9	4517	42	18.5	36	882.2	19.8	<10	<10	2.016	10
Infeksi sekunder	Pra-sakit	50258	15/11/00	329.7	42.4	183.5	79.7	90.6	<10	117.9	23.2	5.257	160	
	Akut	50258	6/12/2000	827.3	134.6	216	280.9	128.9	50.4	139.2	15.8	8.156	320	
	Konv	50258	19/12/00	3280824	2860.2	>1000	1233.3	5741.6	717.1	>1000	175.3	12.14	10240	

Tabel 4.7. Kriteria infeksi primer dan sekunder berdasarkan titer HI yang ditetapkan oleh WHO.

Antibody Response	S1—S2 Interval	Convalescent titre (any dengue antigen)	Interpretation
≥ 4x rise	≥ 7 days	≤ 1:1280	Definite infection, primary
≥ 4x rise	any specimen	≥ 1:2560	Definite infection, secondary
≥ 4x rise	< 7 days	≤ 1:1280	Definite infection, possible primary or secondary
No change	any specimen	≥ 1:2560	Presumed infection, secondary
No change	≥ 7 days	≤ 1:1280	Not dengue
No change	< 7 days	≤ 1:1280	Uninterpretable
--	One specimen	≤ 1:1280	Uninterpretable

Dari hasil ELISA IgG, infeksi primer dan sekunder diklasifikasikan berdasarkan nilai indeks titer IgG pada sampel serum fase pra-sakit, akut dan konvalesen. Kasus infeksi primer ditetapkan jika nilai indeks IgG negatif (<1) pada fase pra sakit diikuti dengan serokonversi pada serum akut dan peningkatan indeks pada fase konvalesen untuk kasus yang memiliki ketiga fase sampel. Untuk kasus dengan sampel fase akut dan konvalesen saja, indeks IgG negatif (<1) pada fase akut yang disertai dengan serokonversi pada sampel konvalesen. Kasus infeksi sekunder ditetapkan apabila nilai indeks IgG positif (>1) pada fase pra-sakit dan meningkat pada fase akut dan konvalesen (Tabel 4.6).<sup>13</sup>

#### 4.5. PERFORMA HI DAN ELISA IgG DALAM MENENTUKAN INFEKSI PRIMER DAN SEKUNDER

Ada 2 alasan utama mengapa penting untuk dapat membedakan suatu infeksi dengue sedini mungkin menggunakan uji yang mudah dan simpel. Alasan yang pertama adalah informasi mengenai tipe infeksi dengue berguna dalam suatu studi epidemiologi untuk mengetahui apakah insiden dari keparahan kasus dengue secara signifikan lebih tinggi pada infeksi sekunder dibandingkan infeksi primer. Kedua, dengan mengetahui status imun dari pasien yang terinfeksi dengue, para praktisi klinis akan lebih waspada terhadap kemungkinan keadaan pasien

berkembang menjadi lebih parah terutama pada pasien yang tinggal di daerah endemik seperti Indonesia. Pada daerah endemik, kasus infeksi sekunder akan lebih tinggi dibandingkan infeksi primer. Menurut hipotesa ADE, infeksi sekunder merupakan faktor penyebab resiko terjadinya keparahan infeksi dengue seperti DBD dan SSD.<sup>11</sup>

Uji HI oleh banyak peneliti dirasakan mempunyai banyak kekurangan. Oleh karenanya perlu untuk melakukan evaluasi performa HI dan mencari metode alternatif lain yang lebih mudah dan sensitif termasuk dalam mendefinisikan infeksi dengue. Perkembangan diagnosa antibodi dengue mengarah pada ELISA sebagai kandidat. Namun kebanyakan studi yang telah dilakukan hanya membandingkan performa ELISA dengan HI semata.<sup>10,16,17,18</sup> Seperti telah disinggung sebelumnya, HI sebagai metode yang direkomendasikan WHO dinilai seringkali kurang tepat dalam mengklasifikasikan (*misclassified*) infeksi primer dan sekunder virus dengue jika mengacu pada kriteria yang ditetapkan WHO tersebut.<sup>6,32</sup> Penelitian yang dilakukan disini berupaya untuk menjawab penilaian tersebut. Performa uji HI dan ELISA IgG dalam membedakan infeksi primer dan sekunder dibandingkan dengan uji PRNT sebagai standar baku emas WHO.

Sejumlah 92 kasus infeksi dengue telah diuji dengan PRNT. Sembilan belas kasus menunjukkan infeksi primer sementara 73 kasus infeksi sekunder. Dari 19 kasus infeksi primer diatas, seluruhnya (100%) termasuk infeksi primer berdasarkan ELISA IgG sementara dari 73 kasus infeksi sekunder, 72 kasus (98,7%) juga termasuk dalam infeksi sekunder berdasarkan ELISA IgG (Tabel 4.8).

Hasil yang diperoleh dari uji HI pada infeksi primer seluruhnya (100%) sesuai dengan hasil PRNT. Namun untuk determinasi infeksi sekunder, performa HI jauh lebih rendah yaitu hanya 23 (31,5%) kasus yang berarti terdapat 50 (68,5%) kasus infeksi sekunder berdasarkan hasil PRNT yang ditetapkan sebagai infeksi primer oleh HI (Tabel 4.8). Hal tersebut mengindikasikan performa HI sama baiknya dengan ELISA IgG dalam menentukan infeksi primer, namun untuk infeksi sekunder secara signifikan ( $p=0$ ) lebih buruk. Jadi dalam penelitian ini performa ELISA IgG yang sangat bagus dan dapat diandalkan dalam menentukan infeksi sekunder. Dengan nilai  $p=0$ , hipotesa penelitian ini ditolak yang berarti

bahwa performa HI dan ELISA IgG tidak sama baik atau dapat dikatakan ELISA IgG lebih baik dibandingkan dengan HI.

Tabel 4.8. Performa HI dan ELISA IgG dalam membedakan infeksi primer dan sekunder

	PRNT			
	Infeksi Primer		Infeksi Sekunder	
HI	19/19	100,0%	23/73	31,5%
IgG	19/19	100,0%	72/73	98,6%

$p = 0$  (CI 95%)

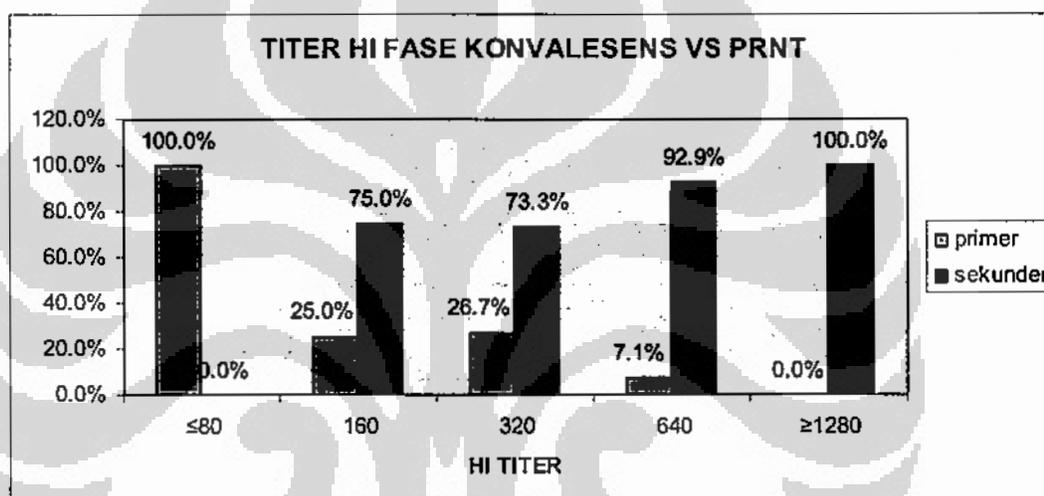
Sejalan dengan pendapat Graham dkk<sup>7</sup>, hasil HI yang diperoleh pada penelitian ini cenderung mengklasifikasikan infeksi dengue sebagai infeksi primer daripada infeksi sekunder. Pertimbangan yang diajukan oleh Graham dkk<sup>7</sup> berkaitan dengan hasil HI tersebut adalah ada suatu fraksi antibodi HI yang tidak diketahui terdegradasi seiring dengan waktu sehingga memberikan hasil di bawah batas ambang deteksi. Namun dalam penelitian ini sampel serum diuji dalam kurun waktu yang tidak terlalu lama setelah pengambilan. Kemungkinan pertimbangan lainnya adalah diperkirakan kriteria interpretasi titer HI yang ditetapkan WHO belum dengan tepat memberikan batasan atau *threshold* dalam membedakan infeksi primer dan sekunder.

#### 4.6. KATEGORI INFEKSI DENGUE BERDASARKAN TITER HI PADA FASE KONVALESEN DIBANDINGKAN PRNT

Seperti yang telah dibahas sebelumnya, klasifikasi berdasarkan interpretasi titer HI yang mengacu pada standar WHO lebih banyak mengkategorikan infeksi dengue sebagai infeksi primer. Tabel 4.9 dan grafik 4.3 memperlihatkan perbandingan titer HI pada fase konvalesen terhadap PRNT. Semua kasus pada titer  $\leq 80$  merupakan infeksi primer dan infeksi sekunder pada titer  $\geq 1280$  dibandingkan dengan PRNT. Hasil kontras terhadap kriteria WHO ditunjukkan pada titer 160-640 dimana presentase infeksi sekunder pada interval tersebut cukup besar (73,3-92,9%).

Tabel 4.9. Perbandingan titer HI fase konvalesens dengan hasil PRNT.

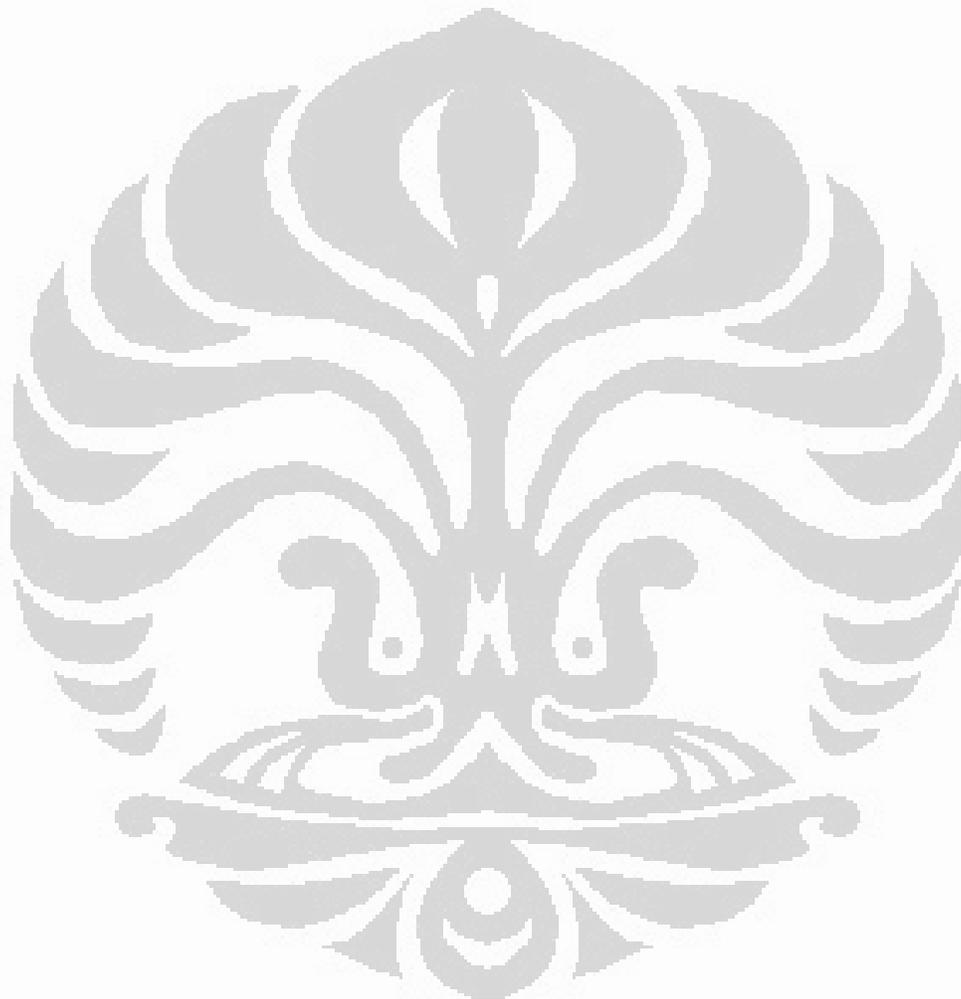
Titer HI	Jumlah kasus	PRNT			
		Infeksi primer		Infeksi sekunder	
		Jumlah kasus	%	Jumlah kasus	%
≤80	13	13	100,0%	0	0,0%
160	4	1	25,0%	3	75,0%
320	15	4	26,7%	11	73,3%
640	14	1	7,1%	13	92,9%
≥1280	45	0	0,0%	45	100,0%



Grafik 4.3. Perbandingan titer HI fase konvalesens dengan presentase infeksi primer dan sekunder berdasarkan PRNT.

Dari data di atas dapat diambil kesimpulan bahwa infeksi primer hanya dapat ditentukan jika titer HI pada fase konvalesens  $\leq 80$  dan infeksi sekunder pada titer  $\geq 1280$ . Pada titer antara 160 dan 640, infeksi dengue tidak dapat didefinisikan melihat kejadian infeksi primer dan sekunder pada interval tersebut hampir sama besarnya. Dengan interpretasi infeksi primer atau sekunder seperti ini akan mempengaruhi hasil berbagai studi yang menggunakan HI dengan kriteria WHO dalam menentukan infeksi virus dengue. Sebagai contoh pada beberapa studi epidemiologi yang menganalisa korelasi berat ringannya penyakit dengan tipe infeksi yang dilakukan di Thailand<sup>14</sup> atau pada studi yang dilakukan Becerra dkk<sup>15</sup> yang menganalisa konsentrasi protein interleukin-1 receptor-like 1 (IL-1 RL-1/ST2) pada pasien dengan infeksi primer dan sekunder. Contoh lainnya yaitu

ketika HI dijadikan referensi pada studi yang mengevaluasi performa ELISA dalam menentukan infeksi dengue.<sup>16,17,18</sup>



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini yaitu:

1. Berdasarkan nilai sensitivitas, spesifisitas, PPV dan NPV, performa ELISA IgG dalam mendeteksi antibodi terhadap virus dengue pada penelitian ini lebih baik daripada HI walaupun secara statistik tidak berbeda secara signifikan dengan nilai  $p > 0,05$ .
2. Uji ELISA maupun HI memiliki performa yang baik dalam menentukan infeksi primer, yaitu 100% bersesuaian dengan hasil PRNT.
3. Hasil ELISA yang bersesuaian dengan PRNT mencapai 98,6% sedangkan hasil HI hanya sebesar 31,5%. Hasil analisa statistik juga menunjukkan perbedaan yang bermakna antara ELISA dan HI dalam menentukan infeksi sekunder, yaitu dengan nilai  $p = 0$  ( $p < 0,05$ ). Dengan demikian hipotesa ditolak dan ELISA IgG lebih baik dibandingkan dengan HI.
4. Semua hasil HI pada titer konvalesen  $\leq 80$  merupakan infeksi primer, sedangkan semua nilai HI dengan titer konvalesen  $\geq 1280$  merupakan infeksi sekunder. Hasil HI pada titer 160-640 tidak dapat didefinisikan tipe infeksi.
5. ELISA IgG, terutama ELISA kit komersial yang digunakan dalam penelitian ini, dapat dijadikan sebagai alternatif dalam menentukan suatu infeksi dengue menggantikan HI.

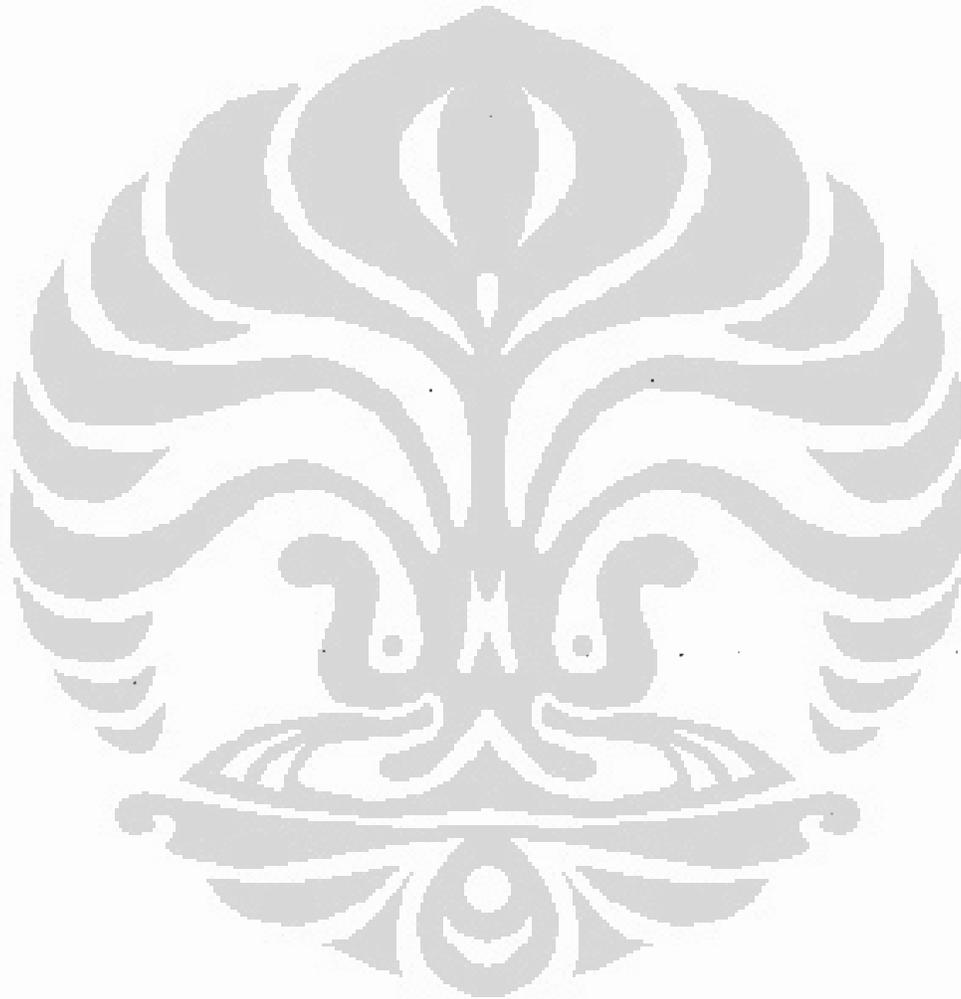
#### 5.2. SARAN

Walaupun dari penelitian ini telah diperoleh informasi mengenai performa HI dan ELISA IgG dalam menentukan infeksi dengue, namun penelitian lanjutan masih dirasa perlu dalam hal:

1. Melakukan studi lanjutan dengan jumlah kasus infeksi primer yang lebih banyak agar diperoleh perbandingan yang lebih berimbang dengan infeksi sekunder sehingga diperoleh analisa statistik yang lebih akurat dan dapat

ditetapkan kriteria atau batasan yang lebih tepat dalam menentukan infeksi primer dan sekunder dengan uji HI.

2. Menggunakan kit ELISA komersial lain yang lebih murah dan mudah didapat agar dapat dibuktikan performanya dan digunakan sebagai alternatif selain HI.



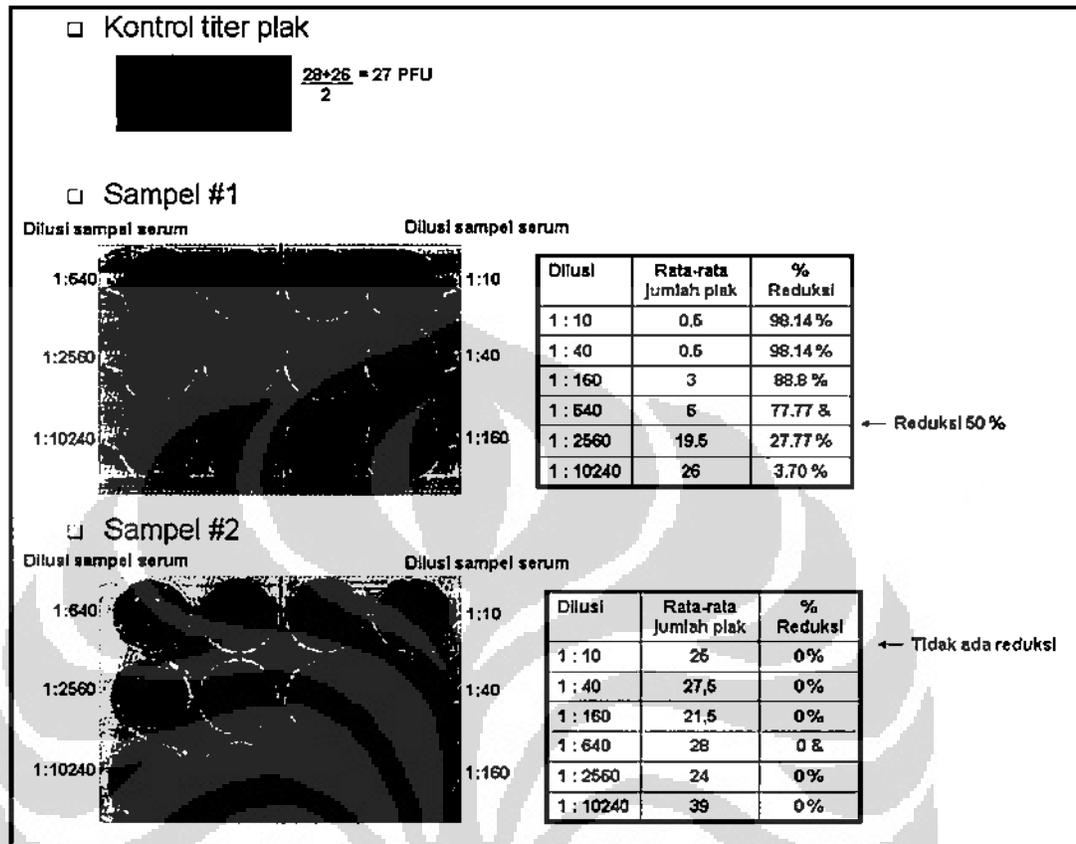
## DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Diunduh dari <http://www.who.int/ctd/dengue/burdens.html>. Diakses pada tanggal 1 Mei 2008.
2. Egger JR & Coleman PG. Age and clinical dengue illness. *EID Journal* 2007; 13(6): 1-2.
3. Guy B & Almond JW. Towards a dengue vaccine: Progress to date and remaining challenges. *Comp Imm Microbiol Infect Dis.* 2006;31:239-52.
4. Suwandono A, Kosasih H, Nurhayati, Kusriastuti R, Harun S, et al. Four dengue virus serotypes found circulating during an outbreak of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia, during 2004. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 855-62.
5. Cordeiro MT, Braga-Neto U, Nogueira RM, Marques ETA Jr. Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute dengue infection based on IgG ELISA. *PlosOne.* April 2009; 4(4): 1-10.
6. World Health Organization. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control.* 2<sup>nd</sup> ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1997.
7. Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, et al. A prospective seroepidemiology study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995-1996. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 6: 412-9.
8. Guzman MG & Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 2004; 8: 69-80.
9. Innis BL, Nisalak A, Nimmanitya S et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 30: 418-27.
10. Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanaroj, Dung NM, et al. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 693-8.
11. Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, et al. Discrimination between primary and secondary dengue virus infection by an immunoglobulin G avidity test using a single acute-phase serum sample. *J Clin Microbiol* 2005a; 43: 2793-7.

12. Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, et al. Use of four dengue virus antigens for determination of dengue immune status by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol* 2005b; 43: 5784-6.
13. De Souza VAUF, Tateno AF, Oliveira RR, Domingues RB, Araujo ES, et al. Sensitivity and specificity of three ELISA-based assay for discriminating primary from secondary acute dengue infection. *J Clin Virol* 2007;39:230-3.
14. Sriptom M, Pongsumpun P, Yoksan S, Barbazan P, Gonzales JP, et al. Dengue haemorrhagic fever in Thailand, 1998-2003: primary or secondary infection. *Dengue Bulletin* 2003; 27: 39-45.
15. Becerra A, Warke RV, de Bosch N, Rothman AL, Bosch I. Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. *Cytokine* 2008; 41: 114-20.
16. Lam SK & Devine PL. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. *Clin Diag Virol* 1998; 10: 75-81.
17. Miagostovich MP, Nogueira RMR, Dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araujo ESM, et al. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol* 1999; 14: 183-9.
18. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, et al. Comparison of capture Immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diag Lab Imm* 2003; 10(4): 622-30.
19. Beckett CG, Kosasih H, Faisal I, Nurhayati, Tan R, et al. Early detection of dengue infection using cluster sampling around index cases. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72(6): 777-782.
20. Henchal EA & Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Micro Rev* 1990; 3(4): 480-496.
21. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 2006; 80(23): 11418-31.
22. Halstead SB. Pathogenesis: Risk factors prior to infection. In: Halstead SB, editor. *Dengue, tropical medicine: Science and practice*. Vol 5. London: Imperial College Press; 2008.p.219-56.

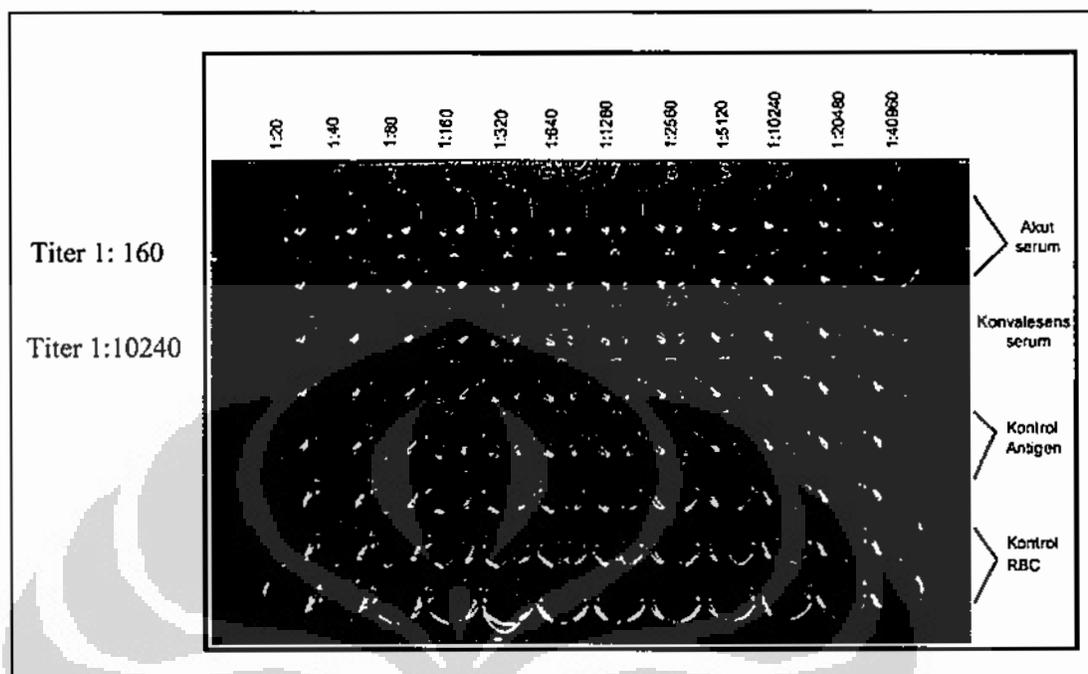
23. Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370:1644-72.
24. McBride WJH & Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infection; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and infection* 2000; 2: 1041-50.
25. Innis BL. Antibody responses to dengue virus infection. In: Gubler DJ & Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International; 1997.p.221-71.
26. Noisakran S & Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/Dengue Shock Syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Soc Exp Biol Med* 2008; ?;401-8.
27. Endy TP, Nisalak A, Vaughn DW. Diagnosis of dengue virus infections. In: Halstead SB, editor. *Dengue, tropical medicine: Science and practice*. Vol 5. Imperial College Press; 2008.p.327-60.
28. World Health Organisation. Diunduh dari [http://www.searo.who.int/en/Section10/Section332/Section554\\_2566.htm](http://www.searo.who.int/en/Section10/Section332/Section554_2566.htm). Diakses pada tanggal 1 Mei 2008.
29. Vorndam V & Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler DJ & Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International; 1997.p.221-71.
30. Anantapreecha S, A-nuegoonpipat A, Prakong S, Chanama S, Sa-ngasang A et al. Dengue virus cross-reactive hemagglutination inhibition antibody responses in patients with primary dengue virus infection. *Jpn J Infect Dis* 2007;60:267-70.
31. World Health Organization. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1986.
32. A-Nuegoonpipat A, Prakong S, Sa-ngasang A, Chanama S, Sawanpanyalert S, et al. Comparison between Haemagglutination Inhibition (HI) Test and IgM and IgG-capture ELISA in determination of Primary and Secondary Dengue Virus Infections. *Dengue Bulletin, World Health Organization* 2006;30:141-45.

## Lampiran 1. Contoh pembacaan hasil PRNT



Gambar hasil uji PRNT dan penghitungan titer antibodi netralisasi. Hasil positif adanya antibodi di dalam sample serum ditunjukkan oleh sampel nomor 1. Reduksi plak sebanyak 50% dibandingkan dengan kontrol titer plak terletak pada posisi dilusi antara 640-2560 yang berarti titer antibodi yang dapat menyebabkan reduksi plak 50% secara garis besar adalah antara 640-2560. Untuk mendapatkan nilai titer antibodi netralisasi secara detail dilakukan dengan penghitungan menggunakan analisa probit program SPSS dari *windows*. Hasil negatif ditunjukkan oleh sampel nomor 2 dimana tidak terjadi reduksi plak sebesar 50% pada dilusi 1:10.

## Lampiran 2. Contoh hasil uji HI dan nilai indeks ELISA

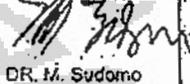


Gambar hambatan aglutinasi yang ditunjukkan oleh terbentuknya titik endapan sel darah merah di dasar sumur. Titer antibodi yang ditentukan dari besarnya dilusi yang masih dapat menghambat aglutinasi sel darah merah. Pada fase akut titer antibodinya adalah sebesar 160 dan pada fase akut sebesar 10240.

Tabel contoh nilai OD yang diperoleh dari mesin pembaca ELISA dan nilai indeks IgG yang dihitung dengan membagi nilai OD terhadap nilai *cutt-off*

No	No sampel	OD	Cutt-off	Nilai indeks
1	2005909936	0,1	0,264	0,379
2	2005910243	2,871	0,264	10,889
3	2005910183	2,586	0,264	9,808
4	2005910585	2,030	0,264	7,699
5	2005908436	0,110	0,264	0,417
6	2005910744	0,932	0,264	3,535
7	2005910985	0,119	0,264	0,451
8	2005912338	0,348	0,264	1,320

Lampiran 3. Persetujuan kode etik studi kohort prospektif infeksi dengue pada pekerja pabrik di Bandung

	<b>MINISTRY OF HEALTH NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH RESEARCH AND DEVELOPMENT</b>																																																																																																					
Jl. Pervetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226 Jakarta 10017 Telp. (021) 4261088	Faks. (021) 4243933 E-mail : <a href="mailto:serban@litbang.depkes.go.id">serban@litbang.depkes.go.id</a> Website : <a href="http://www.litbang.depkes.go.id">http://www.litbang.depkes.go.id</a>																																																																																																					
No. : <i>LB 03 02/KE/HIQI/2007</i>																																																																																																						
T.R Jones US NAMRU-2 Jl. Percetakan Negara No. 29 Jakarta Pusat	31 October 2007 																																																																																																					
<b>Subject: IRB Approval for the Extension of Study Project</b>																																																																																																						
<b>Ref : (a) Prospective Study of Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever in a Cohort of Adult Factory Workers in Bandung (0006.0001)</b> <b>(b) NIHRD Ethical Clearance dated June 19, 2007 ; No. KS.02.01.2.1.2776</b>																																																																																																						
This refers to your letter dated October 30, 2007, No. Ser 031/070124, on the above mentioned subject.																																																																																																						
The Committee on Health Research Ethics of NIHRD, after conducting review on the Continuing Review Report of this project, has decided to approve on the extension of the study through October 30, 2009. The IRB has issued this approval according to the delayed of this study for 10 months and accrual of dengue cases occurred slower than anticipated. Please submit the progress report of this project for annual review. The next scheduled review of this study will be conducted no later than 1 November 2008 (1 year prior to this approved date).																																																																																																						
Should there be any other modification and/or extension of the study, the Principal Investigator is required to resubmit the protocol for approval. Also, please submit the final summary report to NIHRD Health Research Ethics Committee.																																																																																																						
Thank you very much for your kind cooperation.																																																																																																						
	Sincerely yours,																																																																																																					
	Committee of Health Research Ethics Chairperson,																																																																																																					
	 DR. M. Sudomo	<table border="1"> <tr> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> <td>6</td> <td>7</td> <td>8</td> <td>9</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td></td> </tr> </table>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10																																																																																										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10																																																																																													
cc to : 1. DG of NIHRD 2. Head of Center for R & D of Biomedical and Pharmacy, NIHRD 3. Director of US NAMRU-2 4. IRB Chair of US NAMRU-2 5. Timothy H. Burgess, I.M.D., MPH																																																																																																						

Lampiran 4. *Inform consent* studi kohort prospektif infeksi dengue pada pekerja pabrik di Bandung.

PERSETUJUAN UNTUK BERPARTISIPASI SECARA SUKARELA

DALAM PENELITIAN

Studi prospektif demam dengue dan demam berdarah dengue pada suatu populasi pekerja pabrik dewasa di Bandung

1. Kami mengajak anda untuk secara sukarela berpartisipasi dalam studi yang berjudul "Studi prospektif demam dengue dan demam berdarah dengue pada suatu populasi pekerja pabrik dewasa di Bandung". Maksud dari studi ini adalah untuk mempelajari lebih jauh tentang penyakit dengue pada masyarakat pekerja di Bandung. Partisipasi anda dalam studi ini sepenuhnya bersifat sukarela. Sebelum memutuskan untuk berpartisipasi, diharapkan anda dapat membaca dengan teliti informasi berikut ini yang menjelaskan tentang apa yang akan anda dapatkan. Tidak ada biaya apapun yang akan dibebankan atas partisipasi anda. Silahkan mengajukan pertanyaan bila ada hal-hal yang belum dimengerti. Anda harus mengerti bahwa bila anda memutuskan untuk menolak berpartisipasi, anda masih tetap berhak mendapatkan semua fasilitas pelayanan kesehatan yang telah disediakan bagi karyawan di dalam perusahaan anda. Bila anda bersedia untuk berpartisipasi dalam studi yang akan berjalan selama 3 tahun ini, maka anda akan:
  - a. Diminta untuk menjawab beberapa pertanyaan yang berhubungan dengan kesehatan anda. Seorang petugas kesehatan yang mengerti tentang studi ini akan memberikan penjeasan bila anda memiliki pertanyaan seputar penelitian ini. Selanjutnya, sekitar satu sendok makan darah akan diambil dari lengan anda. Sebagian darah anda akan diperiksa untuk melihat ada tidaknya anemia (kurang darah) dan penyakit hati atau ginjal. Darah anda juga akan diperiksa untuk memastikan ada tidaknya infeksi dengue. Semua pemeriksaan yang akan dilakukan pada anda tersebut bersifat gratis. Bila hasil pemeriksaan klinis menunjukkan kalau anda menderita anemia atau suatu gangguan darah, anda tidak dapat melanjutkan partisipasi anda dalam studi ini.
  - b. Setelah pengambilan darah yang pertama ini, kami akan mengambil kembali darah anda sebanyak 1 sendok teh setiap empat bulan selama tiga tahun. Darah-darah ini akan diperiksa untuk mengetahui apakah anda pernah terpapar dengan virus dengue selama periode penelitian ini.

## Lampiran 4. (Lanjutan)

- c. Bila anda mengalami demam setelah keikutsertaan anda, anda harus menemui dokter perusahaan sesegera mungkin. Bila mereka mencurigai bahwa anda telah terinfeksi virus dengue, maka 10 ml darah anda (dua sendok teh) akan diambil pada saat itu juga. Dua minggu kemudian, setelah anda sembuh dari sakit, kembali 5 ml (satu sendok teh) darah anda akan diambil.
  - d. Bila anda menderita demam dengue atau demam berdarah dengue anda akan dirawat. Di rumah sakit, darah anda akan diperiksa dan akan dilakukan pemeriksaan ultrasonografi (USG). Pemeriksaan ini menggunakan gelombang suara untuk mendeteksi calran di dalam tubuh anda dan tidak menimbulkan rasa sakit. Biaya pemeriksaan ini tidak akan dibebankan pada anda.
  - e. Kecuali biaya-biaya tambahan setelah tujuh hari, semua biaya yang dikenakan selama masa perawatan yang tidak ditanggung oleh asuransi JAMSOSTEK anda akan disediakan oleh studi ini.
2. Selama survey serologis tiga tahun ini, sejumlah sampel darah akan diambil dari anda. Proses pengambilan darah ini mungkin akan menimbulkan rasa tidak nyaman dan sedikit rasa sakit pada tempat dimana jarum dimasukkan dalam lengan anda. Kemungkinan timbulnya infeksi sangat kecil. Tidak ada resiko yang ditimbulkan akibat pemeriksaan USG ataupun X-ray, kecuali resiko yang sangat kecil yang mungkin ditimbulkan setelah dilakukannya X-ray pada seorang wanita yang sedang hamil. Berkaitan dengan pemeriksaan X-ray pada seorang wanita yang sedang hamil, akan disediakan perlengkapan pelindung tambahan.
  3. Manfaat langsung bagi anda sepanjang pelaksanaan studi ini meliputi suatu pemeriksaan medis dan klinis selama keikutsertaan. Meskipun tidak ada keuntungan langsung bagi anda, studi ini bisa memberikan informasi penting tentang resiko kejadian penyakit dengue di lingkungan tempat kerja anda.
  4. Partisipasi anda dalam studi ini sepenuhnya bersifat sukarela. Anda dapat memutuskan untuk tidak melanjutkan partisipasi anda dalam studi ini kapan saja tanpa kehilangan keuntungan apapun yang seharusnya anda terima bila anda tidak berhenti. Bila anda memutuskan untuk tidak lagi berpartisipasi, harap menghubungi Dr. Herman Kosasih pada nomor telepon 021-421-4457 ext. 1575 untuk meyakinkan proses pengunduran diri anda. Jika ada pertanyaan yang sifatnya ilmiah, hubungi Dr. Herman Kosasih atau Dr. Patrick Blair pada nomor telepon 021- 4214457 ext. 1583. Jika anda mempunyai pertanyaan tentang aspek medis, luka-luka atau kekhawatiran tentang kesehatan atau keselamatan

## Lampiran 4. (Lanjutan)

yang berkaitan dengan partisipasi anda, anda bisa menghubungi Dr. Jonathan S. Glass pada nomor telepon 021-4214457 ext. 1236. Untuk pertanyaan mengenai aspek etika dari studi ini, hak anda sebagai peserta sukarela atau masalah apapun yang berhubungan dengan perlindungan peserta sukarela, hubungi Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan (IRB), Dr. William Rogers, NAMRU-2, Kompleks P2M/LITBANGKES, Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta, Indonesia (Telepon: 021-4214457).

5. Segala Informasi yang diperoleh dalam studi ini akan dijaga kerahasiaannya dan dipelihara sebagaimana mestinya. Ini berarti bahwa semua formulir dengan nama atau identitas anda lainnya akan disimpan dalam kantor tertutup di pusat pelayanan kesehatan anda atau Naval Medical Research Unit #2 (Jakarta, Indonesia). Hanya orang-orang yang secara resmi terlibat dalam studi ini yang bisa mengakses database ini. Hasil-hasil pemeriksaan laboratorium akan di berikan kepada dokter anda. Database yang akan diproses tidak akan mencantumkan nama anda.
6. Pada saat menandatangani formulir persetujuan ini berarti anda telah mengetahui bahwa:
  - a. Saya telah diberi penjelasan bahwa NAMRU-2, Jakarta bertanggung jawab untuk penyimpanan surat persetujuan saya serta catatan penelitian sehubungan dengan keikutsertaan saya dalam studi ini. Data ini akan disimpan ditempat yang aman di NAMRU-2, dan di RSHS Bandung.
  - b. Saya telah mengajukan sejumlah pertanyaan pada kertas terlampir, dan jawaban-jawaban tertulis yang telah diberikan oleh peneliti dapat saya mengerti dan memuaskan. Saya mengerti apa yang telah dijelaskan dalam surat persetujuan tentang keikutsertaan saya dalam studi ini. Saya (membutuhkan/tidak membutuhkan) keterangan lebih lanjut untuk menentukan keputusan saya untuk secara sukarela ikut berpartisipasi.
  - c. Saya (memberikan/tidak memberikan) izin untuk menggunakan sampel darah yang saya berikan untuk melakukan studi penelitian yang lain dalam bidang penyakit infeksi. Saya mengerti bahwa jika darah saya digunakan dalam studi yang lain, nama dan keterangan pribadi lainnya akan dihilangkan dari sampel dan sampel akan diperiksa tanpa mengetahui dari mana sampel berasal.
  - d. Dengan membubuhkan tanda-tangan saya di bawah ini, saya nyatakan persetujuan saya untuk ikut berpartisipasi dalam penelitian seperti telah dijelaskan kepada saya, dan menyatakan telah menerima kopi dari form ini

## Lampiran 4. (Lanjutan)

untuk keperluan catatan pribadi saya.

\* Saya menjamin bahwa saya telah menerima satu kopi dari form persetujuan ini dan mengerti bahwa dengan menandatangani form ini, menunjukkan kesediaan saya untuk berpartisipasi secara sukarela dalam studi ini\*

NAMA SUKARELAWAN	TANDA TANGAN	TANGGAL
NAMA SAKSI	TANDA TANGAN	TANGGAL
NAMA PENELITI	TANDA TANGAN	TANGGAL

Pertanyaan dari Peserta:

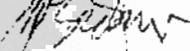
Jawaban dari Peneliti

I certify that this is a true and accurate translation of the consent form

---

**Dr Zen Hafi**, U.S NAMRU-2, American Embassy Jakarta, Unit 8132 NAMRUTWO,  
FPO AP 96520-8132, Phone. 62-21-4214457 ext. 1587

## Lampiran 5. Persetujuan kode etik studi kluster di Jakarta dan Bandung.

	<b>MINISTRY OF HEALTH NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH RESEARCH AND DEVELOPMENT</b>	
Jl. Persetikan Negara No. 29 Jakarta 10130 Kode Pos 10130 Jakarta 10012 Telp. (021) 4241083	Faks. (021) 4241933 Email : <a href="mailto:webmaster@litbang.depkes.go.id">webmaster@litbang.depkes.go.id</a> Website : <a href="http://www.litbang.depkes.go.id">http://www.litbang.depkes.go.id</a>	
No. LB.02.02/22/4511/2007	28 December 2007 	
T.R Jones US NAMRU-2 Jl. Persetikan Negara No. 20 Jakarta Pusat		
<b>Subject:</b> IRB Approval for the Extension of Study Project		
<b>Ref :</b> (a) Expanded Utilization of the Cluster Investigation Method for the Early Detection of Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Cases (protocol NAMRU 22004.0010, dated September 2006) (b) NIHRD Approval for the Extension of Study Project dated November 26, 2007, No. LB.02.02/KE/4236/2007 (c) PP RI No.41 Tahun 2006 about Approval Study for Foreign Investigator		
This refers to our letter dated November 26, 2007, No. LB.02.02/KE/4236/2007, on the above mentioned subject		
The Committee on Health Research Ethics of NIHRD, after conducting review on the progress report of this study and based on PP RI No.41 Tahun 2006 about Approval Study for Foreign Investigator, has decided to rectify the period of extension of the study from November 30, 2006 becoming November 30, 2008. The next scheduled review of this study will be conducted no later than 1 year prior to this approved date.		
Should there be any other modification and/or extension of the study, the Principle Investigator is required to resubmit the protocol for approval. Also, please submit the final summary report to NIHRD Health Research Ethics Committee.		
Thank you very much for your kind cooperation.		
Sincerely yours, <i>Vicentia Cruz</i>		Committee of Health Research Ethics Chairperson,
		DR. M. Sudarto
<b>cc to :</b>		
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. DG of NIHRD</li> <li>2. Head of Center for R &amp; D of Biomedical and Pharmacy, NIHRD</li> <li>3. Director of US NAMRU-2</li> <li>4. IRB Chair of US NAMRU-2</li> <li>5. Timothy H. Burgess, MD, MPH</li> </ol>		
		Np. <i>Jean Ehti</i>

Lampiran 6. *Inform consent* studi kluster di Jakarta dan Bandung untuk kasus indeks

**"Pengembangan Penerapan Metoda Penelitian Pada Kelompok Tertentu Untuk Deteksi Dini Kasus Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue"**

Persetujuan untuk berpartisipasi secara sukarela  
Untuk penderita yang sedang dirawat di rumah sakit atau untuk kasus indeks

1. Anda (atau anak anda) adalah satu diantara 6.000 orang yang diminta untuk ikut berpartisipasi secara sukarela dalam suatu kajian penelitian berjudul "Pengembangan penerapan metoda penelitian Pada kelompok tertentu untuk deteksi dini kasus demam dengue dan demam berdarah dengue". Demam dengue (DD) dan/atau demam berdarah dengue (DBD) adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh virus yang ditularkan oleh nyamuk. Di Indonesia DD dan DBD terjadi di semua propinsi dan telah lama menyebabkan banyak kematian, khususnya pada anak-anak.  
Maksud dari kajian ini adalah:  
Mempelajari bagaimana tubuh anda melawan kuman-kuman yang membuat anda sakit saat anda terkena dengue.  
Selama anda (atau anak anda) ikut serta dalam penelitian ini, kami akan meminta anda (atau anak anda) untuk menjawab daftar pertanyaan secara lisan yang berhubungan dengan kesehatan anak anda (atau anak anda). Anda (atau anak anda) akan diambil darahnya setiap hari sebanyak 1 sendok teh selama dirawat di rumah sakit dan dua minggu kemudian untuk diperiksa adanya infeksi dengue di laboratorium secara cuma-cuma. Pengambilan darah ini merupakan prosedur yang biasa dilakukan guna memantau kondisi penderita penyakit dengue. Anda (atau anak anda) akan dinilai setiap hari menurut kebijaksanaan yang sama seperti yang diterapkan rumah sakit terhadap penderita yang bukan peserta kajian ini, kecuali anda (atau anak anda) akan dinilai dengan prosedur ultrasonografi. Ultrasonografi adalah suatu prosedur yang mirip dengan foto rontgen, tetapi menggunakan gelombang suara untuk menilai gambaran di dalam tubuh. Maksud dari prosedur ini adalah untuk mengetahui apakah ada kebocoran cairan yang masuk kedalam rongga dada atau perut. Anda (atau anak anda) akan memperoleh semua pemeriksaan tersebut diatas secara cuma-cuma.
2. Para peneliti berpendapat bahwa risiko atau rasa tidak nyaman bagi anda (atau anak anda) tidak seberapa dan hanya berupa risiko yang berhubungan dengan pengambilan darah. Risiko bahwa dapat terjadi sesuatu pada anda (atau anak anda) sangat kecil, dan hanya berupa rasa sakit sedikit dan kemerahan ditempat darah diambil dan kemungkinan pingsan. Ada kemungkinan yang sangat kecil terjadi infeksi ditempat darah diambil, namun hal ini tidak mungkin terjadi karena petugas yang mengambil darah anak anda akan membersihkan dahulu bagian dimana darah akan diambil dan menggunakan peralatan yang steril. Tidak ada atau kecil sekali risiko berhubungan dengan prosedur ultrasonografi. Jika terjadi kejadian atau sakit sebagai akibat partisipasi anda (atau anak anda) pada penelitian ini, seperti adanya infeksi pada tempat pengambilan darah, maka penelitian akan menanggung biaya pengobatannya.
3. Manfaat langsung yang dapat anda (atau anak anda) harapkan adalah pemeriksaan ultrasonografi dan pemeriksaan protein total serta albumin untuk mendeteksi adanya kebocoran cairan plasma, yang biasanya tidak dilakukan pada pasien biasa. Manfaat bagi dokter anak anda dan bagi pejabat kesehatan Indonesia adalah bahwa mereka akan lebih memahami penyakit ini.
4. Pilihan lain selain penelitian dan prosedur ini adalah anda (atau anak anda) tidak ikut berpartisipasi dan anda akan mendapatkan perawatan sesuai dengan standar rumah sakit (diawasi dengan ketat dan pemeriksaan darah lengkap)

## Lampiran 6. (Lanjutan)

5. Kerahasiaan tentang keikutsertaan anda (atau anak anda) dalam penelitian ini akan dijamin oleh Dr. Timothy Burgess. Bila ada pertanyaan mengenai penelitian ini, harap anda menghubungi dokter-dokter berikut ini:
- Untuk pertanyaan mengenai segi medis atau penelitian (ilmiah), hubungi Dr. Timothy Burgess (021-4214458-63 ext. 1575), Dr. Djoko (021-4261088), Dr. Tatang (021-2033274) atau Dr. Soesilowati Soerachmad (021-5682011-124), Dr Bachtu (022-2038986), Dr Djanika Setiabudi (022-2035957).
  - Untuk pertanyaan mengenai segi medis, luka atau pertanyaan tentang kesehatan dan keselamatan berkenaan dengan keikutsertaan anak anda atau peserta sukarela yang lain, hubungi Dr. Narain Punjabi di NAMRU-2, Kompleks P2M/ITBANGKES, Jl. Percetakan Negara 29, Jakarta, Indonesia (021-4214458 ext. 1235).
  - Untuk pertanyaan mengenai segi etis dari kajian ini, mengenai hak anak anda sebagai peserta sukarela, atau hal yang berkaitan dengan perlindungan bagi peserta sukarela penelitian, hubungi Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan (IRB), Dr. William O. Rogers, di NAMRU-2, Jakarta, Indonesia, Kompleks P2M/ITBANGKES, Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta, Indonesia (021-4214457 through 4463).
6. Keikutsertaan anda (atau anak anda) sepenuhnya bersifat sukarela. Anda (atau anak anda) tidak akan dikenakan sanksi bila tidak mau ikut berpartisipasi. Anda dapat sewaktu-waktu menghentikan keikutsertaan anda (atau anak anda) bila anda (atau anak anda) menghendakinya. Bila anda/ia berhenti berpartisipasi, anda/ia tidak akan dikenakan sanksi.
7. Saya/anak saya telah diberitahu bahwa NAMRU-2, Jakarta, Indonesia bertanggung jawab atas penyimpanan surat persetujuan anak saya serta catatan penelitian yang berhubungan dengan keikutsertaan anak saya dalam penelitian ini. Catatan ini akan disimpan ditempat yang aman di NAMRU-2, Jakarta.
8. Saya telah memahami serta puas dengan jawaban yang diberikan oleh para peneliti dalam menanggapi pertanyaan saya. Saya mengerti apa yang telah dijelaskan dalam surat persetujuan mengenai keikutsertaan saya/anak saya dalam penelitian ini. Saya (memerlukan/tidak memerlukan) keterangan lebih lanjut untuk mengambil keputusan untuk keikutsertaan saya/anak saya dengan sukarela.
9. Saya (mengizinkan/tidak mengizinkan) digunakannya sampel darah yang anak saya berikan untuk melakukan kajian penelitian lain mengenai penyakit menular. Saya mengerti bahwa kalau darah saya (atau anak saya) dipakai untuk kajian-kajian lain, maka nama dan keterangan lain mengenai jatidiri saya (atau anak saya) akan dihapus dari sampel darah itu dan sampel tersebut akan diperiksa tanpa diketahui dari siapa sampel itu berasal. Jika anda tidak mengizinkan, maka sampel tersebut akan dimatikan kumananya dengan pemanasan tinggi (autoclave) dan langsung dibuang segera setelah pemeriksaan-pemeriksaan yang dibutuhkan oleh penelitian ini selesai dilaksanakan.
10. Dengan membubuhkan tanda tangan saya dibawah ini, saya berikan persetujuan saya (anak saya) dengan sukarela untuk ikut berpartisipasi dalam penelitian sebagaimana telah dijelaskan kepada saya, dan menyatakan telah menerima tentbusan surat ini guna catatan saya pribadi.

Nama peserta sukarela : \_\_\_\_\_ Umur : \_\_\_\_\_

Alamat peserta sukarela: \_\_\_\_\_

## Lampiran 6. (Lanjutan)

Tanda tangan peserta sukarela anak-anak Persetujuan dari anak ybs (umur >8-18)	_____ HR/BL/TH
Nama & Tanda tangan wali peserta sukarela (umur 4-18)	_____ HR/BL/TH
Nama dan Tanda tangan Saksi (bukan peneliti atau orang yg bekerja pada penelitian)	_____ HR/BL/TH
Nama dan Tanda tangan Peneliti atau orang yang telah menjelaskan isi dari surat persetujuan ini	_____ HR/BL/TH
"I certify this is a true and accurate translation of the consent form"	
Dr. Zen Hafi, US NAMRU-2, American Embassy Jakarta, Unit 8132 NAMRUTWO, FPO AP 96520-8132, Ph. 62-21-4214460 ext. 1583	

Lampiran 7. *Inform consent* studi kluster di Jakarta dan Bandung untuk peserta lingkungan

**"Pengembangan Penerapan Metoda Penelitian Pada Kelompok Tertentu Untuk Deteksi Dini Kasus Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue"**

Formulir persetujuan untuk berpartisipasi Secara Sukarela  
Untuk peserta lingkungan

1. Anda (atau anak anda) adalah satu diantara 6.000 orang yang diminta untuk ikut berpartisipasi secara sukarela dalam suatu kajian penelitian berjudul "Pengembangan penerapan metoda penelitian Pada kelompok tertentu untuk deteksi dini kasus demam dengue dan demam berdarah dengue". Demam dengue (DD) dan/atau demam berdarah dengue (DBD) adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh virus yang ditularkan oleh nyamuk. Di Indonesia DD dan DBD terjadi di semua propinsi dan telah lama menyebabkan banyak kematian, khususnya pada anak-anak. Anda (atau anak anda) diminta untuk ikut serta berpartisipasi karena infeksi dengue telah dipastikan pada seorang tetangga dekat anda.

Maksud dari kajian ini adalah:

Mempelajari bagaimana tubuh anda melawan kuman-kuman yang membuat anda sakit saat anda terkena dengue.

Selama anda (atau anak anda) ikut serta dalam penelitian ini, kami akan meminta anda untuk menjawab daftar pertanyaan yang berhubungan dengan kesehatan anda (atau anak anda). Pada permulaannya kami akan mengambil darah anda (atau anak anda) sebanyak kira-kira 2 sendok teh dan berdasarkan hasil pemeriksaan di laboratorium, dokter akan memberitahu apakah anda (atau anak anda) perlu dirawat di rumah sakit yang ditunjuk. Peserta yang tidak masuk rumah sakit akan dipantau suhu badannya setiap hari dan diambil darahnya sebanyak kira-kira 1 sendok teh setiap tiga atau empat hari selama dua minggu. Darah yang diambil (kira-kira 4-5 sampel darah) akan diperiksa guna mendeteksi infeksi dengue. Bila hasilnya positif, maka anda (atau anak anda) disarankan supaya masuk rumah sakit (tapi boleh dipantau dirumah saja apabila menolak untuk dirawat di rumah sakit atau hasil pemeriksaan darahnya normal). Selama dirawat dirumah sakit, anda akan diminta untuk diambil kira-kira satu sendok teh darah setiap hari, dilanjutkan dua minggu setelah keluar dari rumah sakit guna pemeriksaan laboratorium yang tidak dipungut biaya untuk mendeteksi infeksi penyakit dengue serta 6 bulan kemudian. Pengambilan darah ini merupakan prosedur yang biasa dilakukan guna memantau kondisi penderita penyakit Demam Berdarah Dengue. Anda (atau anak anda) akan dinilai setiap hari menurut kebijaksanaan yang sama seperti yang diterapkan rumah sakit terhadap penderita yang bukan peserta kajian ini, kecuali anda akan dinilai dengan prosedur ultrasonografi. Ultrasonografi adalah pemeriksaan yang serupa dengan foto rontgen, tetapi menggunakan gelombang suara untuk melihat gambaran dalam tubuh. Maksud dari prosedur ini adalah untuk mengetahui apakah ada kebocoran cairan yang masuk kedalam rongga dada atau perut. Seluruh biaya rumah sakit bila anda (atau anak anda) dirawat dikelas tiga akan ditanggung oleh penelitian ini.

2. Para peneliti berpendapat bahwa risiko atau rasa tidak nyaman bagi anda (atau anak anda) tidak seberapa dan hanya berupa risiko yang berhubungan dengan pengambilan darah. Risiko bahwa dapat terjadi sesuatu pada anda sangat kecil, dan hanya berupa rasa sakit sedikit dan kemerahan ditempat darah diambil dan kemungkinan pingsan. Ada kemungkinan yang sangat kecil terjadi infeksi ditempat darah diambil, namun hal ini tidak mungkin terjadi karena petugas yang mengambil darah anda (atau anak anda) akan membersihkan dahulu bagian dimana darah akan diambil dan menggunakan peralatan yang steril. Tidak ada atau kecil sekali risiko berhubungan dengan prosedur ultrasonografi. Penelitian akan menanggung semua biaya yang pengobatan jika terjadi kondisi atau sakit yang disebabkan oleh partisipasi pada penelitian ini ( contoh: infeksi pada tempat pengambilan darah, dan sebagainya)

## Lampiran 7. (Lanjutan)

3. Manfaat langsung yang dapat anda (atau anak anda) harapkan dari keikutsertaan dalam penelitian ini adalah anda (atau anak anda) akan dipantau secara dini dan intensif bagi kemungkinan terkena infeksi virus dengue. Jika anda atau anak anda sakit dan dirawat di rumah sakit akan dilakukan pemeriksaan ultrasonografi, protein total dan albumin untuk mendeteksi adanya kebocoran cairan plasma. Manfaat bagi dokter anda (atau anak anda) dan bagi pejabat kesehatan Indonesia adalah bahwa mereka akan lebih memahami penyakit ini.
4. Pilihan lain selain penelitian dan prosedur ini adalah anda (atau anak anda) tidak ikut berpartisipasi, dan anda akan mendapatkan perawatan sesuai dengan standar rumah sakit (pengawasan secara intensif dan pemeriksaan darah lengkap).
5. Kerahasiaan tentang keikutsertaan anda (atau anak anda) dalam penelitian ini akan dijamin oleh Dr. Timothy Burgess. Bila ada pertanyaan mengenai penelitian ini, harap anda menghubungi dokter-dokter yang berikut ini:
  - Untuk pertanyaan mengenai segi medis atau penelitian (ilmiah), hubungi Dr. Timothy Burgess (021-4214458-63 ext. 1575), Dr. Djoko (021-4261088), Dr. Tatang (021-2033274) Dr. Soesilowati Soerachmad (021-5682011-124), Dr. Bachtu (022-2038986), atau Dr. Djatnika (022-2035957).
  - Untuk pertanyaan mengenai segi medis, luka atau pertanyaan tentang kesehatan dan keselamatan berkenaan dengan keikutsertaan anda atau peserta sukarela yang lain, hubungi Dr. Narain Punjabi di NAMRU-2, Kompleks P2M/LITBANGKES, Jl. Percetakan Negara 29, Jakarta, Indonesia (021-4214458 ext. 1235).
  - Untuk pertanyaan mengenai segi etis dari kajian ini, mengenai hak anda (atau anak anda) sebagai peserta sukarela, atau hal yang berkaitan dengan perlindungan bagi peserta sukarela penelitian, hubungi Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan (IRB), Dr. William O. Rogers, di NAMRU-2, Jakarta, Indonesia, Kompleks P2M/LITBANGKES, Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta, Indonesia (021-4214457 through 4463).
6. Keikutsertaan anda (atau anak anda) sepenuhnya bersifat sukarela. Anda (atau anak anda) tidak akan dikenakan sanksi bila tidak mau ikut berpartisipasi. Anda (atau anak anda) dapat sewaktu-waktu menghentikan keikutsertaan pada penelitian ini bila anda (atau anak anda) menghendakinya. Bila anda (atau anak anda) memutuskan untuk berhenti berpartisipasi, tidak akan dikenakan sanksi.
7. Saya telah diberitahu bahwa NAMRU-2, Jakarta, Indonesia bertanggung jawab atas penyimpanan surat persetujuan saya (atau anak saya) serta catatan penelitian yang berhubungan dengan keikutsertaan saya (atau anak saya) dalam penelitian ini. Catatan ini akan disimpan ditempat yang aman di NAMRU-2, Jakarta.
8. Saya telah memahami serta puas dengan jawaban yang diberikan oleh para peneliti dalam menanggapi pertanyaan saya. Saya mengerti apa yang telah dijelaskan dalam surat persetujuan mengenai keikutsertaan saya (atau anak saya) dalam penelitian ini. Saya (memerlukan/tidak memerlukan) keterangan lebih lanjut untuk mengambil keputusan (atau memutuskan anak saya) untuk ikutserta dengan sukarela.
9. Saya (mengizinkan/tidak mengizinkan) digunakannya sampel darah yang saya (atau anak saya) berikan untuk melakukan kajian penelitian lain mengenai penyakit menular. Saya mengerti bahwa kalau darah saya dipakai untuk kajian-kajian lain, maka nama dan keterangan lain mengenai jati diri saya (atau anak saya) akan dihapus dari sampel darah itu dan sampel tersebut akan diperiksa tanpa diketahui dari siapa sampel itu berasal. Jika anda tidak mengizinkan, maka sampel tersebut akan dimatikan kumannya dengan menggunakan pemanasan tinggi (autoclave) dan langsung dibuang segera setelah pemeriksaan-pemeriksaan yang dibutuhkan oleh penelitian ini selesai dilaksanakan.
10. Dengan membubuhkan tandatangan saya dibawah ini, saya berikan persetujuan saya (atau persetujuan anak saya) untuk ikut berpartisipasi dengan sukarela dalam penelitian sebagaimana telah dijelaskan kepada saya, dan menyatakan telah menerima tembusan surat ini guna catatan saya pribadi.

## Lampiran 7. (Lanjutan)

Nama peserta sukarela : \_\_\_\_\_ Umur : \_\_\_\_\_

Alamat peserta sukarela: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Tanda tangan peserta sukarela  
Dewasa (>18 tahun) atau persetujuan dari anak (>8-18 tahun) \_\_\_\_\_  
HR/BL/TH

\_\_\_\_\_  
Nama dan tanda tangan wali peserta sukarela (umur 4-18 thn) \_\_\_\_\_  
HR/BL/TH

\_\_\_\_\_  
Nama dan tanda tangan saksi (bukan peneliti  
atau karyawan yang bekerja pada penelitian) \_\_\_\_\_  
HR/BL/TH

\_\_\_\_\_  
Nama dan tanda tangan peneliti atau orang  
yang telah menjelaskan isi dari surat persetujuan ini \_\_\_\_\_  
HR/BL/TH

"I certify this is a true and accurate translation of the consent form"

---

Dr. Zen Hafi, US NAMRU-2, American Embassy Jakarta, Unit 8132 NAMRUTWO,  
FPO AP 96520-8132, Ph. 62-21-4214460 ext. 1583

**Lampiran 8. Inform consent studi chikungunya di Jakarta.**

**SURVEILANS INFEKSI VIRUS CHIKUNGUNYA BERBASIS  
LABORATORIUM DI JAKARTA.**

**PERSETUJUAN UNTUK BERPARTISIPASI SECARA SUKARELA**

1. Anda/anak anda adalah satu dari 1300 orang yang diminta untuk secara sukarela berpartisipasi dalam studi yang berjudul "Surveilans infeksi virus Chikungunya yang berbasis laboratorium di Jakarta". Maksud dari studi ini adalah untuk menentukan apakah anda/anak anda terinfeksi virus Chikungunya yang biasanya menyebabkan sakit persendian dan demam. Infeksi virus ini juga biasa dikenal di Indonesia sebagai "Flu tulang" Anda/anak anda akan terlibat dalam prosedur sbb:

- a) Menjawab pertanyaan dimana anda akan ditanya tentang keluarga anda, riwayat kesehatan anda/anak anda, umur, dan alamat anda yang tepat.
- b) Untuk studi ini, anda/anak Anda akan diperiksa untuk mengetahui adanya gejala infeksi Chikungunya seperti demam, sakit persendian atau bengkak, pusing kepala, dll. dan diminta untuk memberikan 7ml (atau sekitar 2 sendok makan) darah dalam 2 kesempatan untuk pemeriksaan virus

2. Para peneliti percaya bahwa resiko atau rasa tidak nyaman yang dialami anda/anak anda mungkin berupa sedikit rasa sakit ketika jarum dimasukkan ke dalam lengan anda/anak anda untuk mendapatkan sampel darah. Ada resiko, meskipun jarang terjadi, terkena infeksi ringan dalam prosedur ini. Kita akan mengurangi resiko tersebut dengan menggunakan jarum yang steril dan membersihkan lengan anda/anak anda sebelum memasukkan jarum dan melakukan penekanan pada tempat masuknya jarum setelah prosedur selesai. Tiap jarum digunakan hanya sekali terhadap satu pengikut dan kemudian dibuang untuk tidak dipakai lagi. Dalam beberapa kejadian memar kecil dapat terjadi pada tempat dimana darah diambil tetapi ini biasanya tidak menyebabkan masalah dan akan hilang dalam beberapa hari. Juga ada kemungkinan kecil jatuh pingsan pada saat atau segera setelah darah diambil.

3. Tidak ada keuntungan langsung bagi anda/anak anda yang dapat diharapkan dari keikutsertaan dalam studi ini. Anda/anak anda akan mendapatkan hasil pemeriksaan darah anda terhadap virus Chikungunya secara gratis.

4. Partisipasi Anda/Anak Anda dalam studi ini sepenuhnya bersifat sukarela. Pilihan lain dalam studi ini adalah tidak ikut berpartisipasi. Jika anda tidak ingin ikut berpartisipasi, tidak akan ada sanksi. Anda dapat memutuskan untuk tidak melanjutkan partisipasi anda dalam studi ini kapan saja. Jika anda berhenti, tidak akan ada sanksi dan anda tidak akan kehilangan keuntungan apapun yang seharusnya anda terima bila anda tidak berhenti.

5. Kerahasiaan Anda selama studi ini dan kerahasiaan keterangan yang berhubungan dengan keikutsertaan anda dalam studi ini dijamin oleh Dr. Herman Kosasih and Dr. Patrick J. Blair, NAMRU-2 Jakarta.

## Lampiran 8. (Lanjutan)

6. Jika anda mempunyai pertanyaan tentang studi ini anda sebaiknya menghubungi orang-orang berikut:

- a) Untuk pertanyaan tentang penelitian yang sifatnya ilmiah, hubungi Dr. Hermian Kosasih di Namru-2 (62 21 421-4457 ext 1583) atau Dr. Agus Suwandono, MPH, DRPH di LITBANGKES (62 21 424-4375).
- b) Jika anda mempunyai pertanyaan tentang aspek medis, luka-luka atau kekhawatiran tentang kesehatan atau keamanan yang berkaitan dengan keikutsertaan anda/anak anda hubungi Dr Narain Punjabi, Namru-2, Jakarta di 62 21 421-4457 ext. 1235.
- c) Untuk pertanyaan mengenai aspek etika dari studi ini, hak anda sebagai sukarelawan atau masalah apapun yang berhubungan dengan perlindungan terhadap catatan studi yang berkenaan dengan keikutsertaan dalam studi ini, hubungi Dr. Jason Maguire, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan (IRB), Namru-2, di 62 21 421-4457 ext. 1132.

7. Saya telah diberi penjelasan bahwa NAMRU-2, Jakarta bertanggung jawab untuk penyimpanan surat persetujuan saya serta catatan penelitian sehubungan dengan keikutsertaan saya dalam studi ini. Data ini akan disimpan ditempat yang aman di NAMRU-2, dan akan tetap bersifat rahasia.

8. Jawaban-jawaban yang diberikan oleh para peneliti sebagai tanggapan terhadap pertanyaan-pertanyaan saya dapat saya mengerti dan memuaskan. Saya mengerti apa yang telah dijelaskan dalam surat persetujuan tentang keikutsertaan saya (atau anak saya) dalam studi ini. Saya (membutuhkan/tidak membutuhkan) keterangan lebih lanjut untuk menentukan keputusan saya (atau untuk anak saya) untuk secara sukarela ikut berpartisipasi.

9. Saya (memberikan/tidak memberikan) izin (atau izin untuk anak saya) untuk menggunakan sampel darah yang saya (atau anak saya) berikan untuk melakukan studi penelitian yang lain dalam bidang penyakit infeksi. Saya mengerti bahwa jika darah saya (anak saya) digunakan dalam studi yang lain, nama dan keterangan pribadi lainnya akan dihilangkan dari sampel dan sampel akan diperiksa tanpa mengetahui dari mana sampel berasal.

10. Dengan membubuhkan tanda-tangan saya di bawah, saya nyatakan persetujuan saya (atau persetujuan untuk anak saya) untuk ikut berpartisipasi dalam penelitian seperti telah dijelaskan kepada saya, dan menyatakan telah menerima kopi dari form ini untuk keperluan catatan pribadi saya.

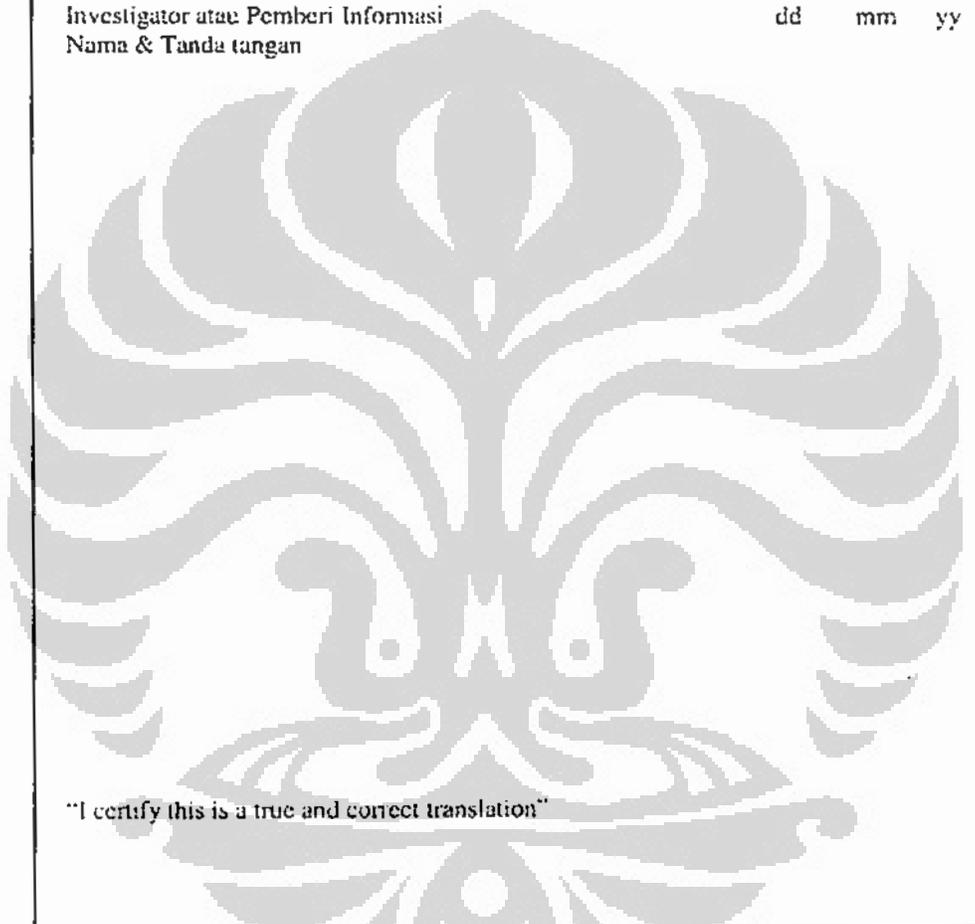
Nama Sukarelawan.....Umur.....

Alamat Sukarelawan (tepat dan jelas).....

RT.....RW.....Kelurahan.....

-----/-----/-----

## Lampiran 8. (Lanjutan)

Nama & tanda tangan peserta/wali	dd mm yy
-----	-----/-----/-----
Nama & tanda tangan Saksi (bukan peneliti atau orang yang disewa oleh tim)	dd mm yy
-----	-----/-----/-----
Investigator atau Pemberi Informasi Nama & Tanda tangan	dd mm yy
	
"I certify this is a true and correct translation"	
<hr/> Ms. Fitria Wulandari, US NAMRU-2, American Embassy Jakarta, Unit 8132 NAMRU TWO, FPO AP 96520-8132, Ph. 62-21-4214460 ext. 1204	

## Lampiran 9. Riwayat hidup.

**RIWAYAT HIDUP****A. DATA PERSONAL**

Nama : GUSTIANI  
 NPM : 0606000131  
 Tempat tanggal lahir : Jakarta, 12 Agustus 1974  
 Alamat : Karang anyar JL F no. 4 Jakarta Pusat 10740  
 Email : [Gustiani@namrutwo.org](mailto:Gustiani@namrutwo.org), [G\\_salim12@yahoo.com](mailto:G_salim12@yahoo.com)

**B. PENDIDIKAN**

1981 – 1987 : SDN 01 pagi Kelapa Dua, Kebon Jeruk Jakarta Barat  
 1987 – 1990 : SMPN 17 Karang Anyar, Jakarta Pusat  
 1990 – 1993 : SMAN 1 Budi Utomo, Jakarta Pusat  
 1993 – 1998 : Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia

**C. RIWAYAT PEKERJAAN**

Oktober 1999 - sekarang  
 : *Laboratory technologist*, departemen virologi, US NAMRU-2 Jakarta  
 : *Biosafety officer representative*, departemen virologi, US NAMRU-2 Jakarta  
 January 1998 – September 1999  
 : Asisten proyek, Laboratorium genetika, Departemen Biologi FMIPA-UI  
 Juli 1997 – Desember 1998  
 : Research student, Eijkman Institute for Molecular biology.

**D. PUBLIKASI ILMIAH**

**Gustiani**, Erlin Listiyaningsih, Fredrik, Ungke Antonjaya, Zen Hafy, Maya Williams, James L McArdle, Timothy H Burgess, Agus Suwandono, and Patrick J Blair. *Envelope region genetic characterization of Chikungunya Virus isolates from Indonesia.*

**PERBANDINGAN PERFORMA UJI HAMBATAN HEMAGLUTINASI  
DAN ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) DALAM  
MENENTUKAN INFEKSI PRIMER DAN SEKUNDER VIRUS DENGUE**

Gustiani<sup>1,2</sup>, Mohamad Sadikin<sup>1</sup>, Herman Kosasih<sup>2</sup>, Susanna Widjaja<sup>2</sup>,  
Maya Williams<sup>2</sup>, Timothy H. Burgess<sup>3</sup>

- 1 Program pendidikan pascasarjana, ilmu biomedik, Fakultas kedokteran Universitas Indonesia
- 2 *United States Naval Medical Research Unit 2, Jakarta, Indonesia*
- 3 *Naval Medical Research Centr, Silver Spring, Maryland*

Infeksi sekunder seringkali dihubungkan dengan tingkat keparahan penyakit yang ditimbulkan virus dengue. Uji HI sebagai uji serologi yang direkomendasikan oleh badan kesehatan dunia (WHO) untuk membedakan tipe infeksi tersebut sekarang ini dinilai kurang tepat dalam mengklasifikasikan infeksi primer dan sekunder. Penelitian dilakukan untuk menganalisa performa HI dibandingkan ELISA IgG sebagai kandidat metode alternatif terhadap *Plaque Reduction Neutralization Test* (uji PRNT). Dari 19 kasus infeksi primer berdasarkan PRNT, semua kasus (100%) juga ditetapkan sebagai infeksi primer dengan HI dan ELISA IgG. Namun dari 73 kasus infeksi sekunder, hasil HI yang bersesuaian dengan PRNT hanya 31,5% sementara ELISA IgG sebanyak 98,6%. Dapat dikatakan HI memiliki performa yang baik dalam menentukan infeksi primer tetapi kurang baik pada infeksi sekunder. Analisa statistik juga memperkuat perbedaan performa uji HI dan ELISA tersebut dengan nilai  $p=0$  ( $p<0$ ). Dengan demikian performa ELISA IgG lebih baik dan dapat dijadikan alternatif pengganti HI. Berdasarkan titer HI pada fase konvalesens yang diperoleh dari penelitian ini, kriteria infeksi primer apabila titer HI  $\leq 80$  dan infeksi sekunder apabila titer HI  $\geq 1280$ . Titer HI pada interval 160-640 tidak dapat didefinisikan.

**Kata kunci:** Virus dengue, infeksi primer dan sekunder, HI, ELISA, PRNT

## PENDAHULUAN

Infeksi virus dengue telah menjadi perhatian global seiring dengan peningkatan insiden dan penyebarannya selama lebih dari 4 dekade. Setiap tahun diperkirakan lebih dari 80 juta infeksi dengue menyebabkan lebih dari 24 ribu kematian dan lebih dari 50 juta penduduk dari lebih 100 negara beresiko terinfeksi termasuk Indonesia.<sup>1,2</sup>

Virus dengue termasuk dalam keluarga *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, terdiri dari 4 serotipe yang berbeda (Dengue 1,2,3 dan 4). Infeksi oleh salah satu dari keempat serotipe tersebut dapat bersifat asimtomatik atau menyebabkan manifestasi klinis mulai dari demam dengue yang ringan sampai dengan demam berdarah dengue yang parah (Demam Berdarah Dengue/DBD) dan Sindroma Syok Dengue (DSS) yang fatal. Infeksi sekunder diperkirakan berhubungan dengan resiko yaitu gejala dapat timbul dengan tingkat keparahan yang tinggi, seperti DBD dan SSD selain faktor-faktor lainnya seperti virulensi virus dan latar belakang hospes (genetik dan nutrisi).<sup>3</sup> Oleh karena itu sangatlah penting untuk dapat membedakan jenis infeksi virus dengue antara infeksi primer dengan infeksi sekunder. Selain sebagai nilai prognostik bagi para praktisi klinis, juga penting untuk lebih mengerti patofisiologi mengapa keadaan klinis yang lebih berat berhubungan dengan infeksi sekunder., juga sebagai alat epidemiologi yang berharga dalam mempelajari infeksi dengue.<sup>4</sup>

Uji hambatan aglutinasi (*Hemagglutination Inhibition*/HI) merupakan uji referensi yang direkomendasikan oleh badan kesehatan dunia (WHO) yang dapat digunakan untuk membedakan antara infeksi primer dan sekunder. Namun uji HI mulai dinilai kurang akurat dalam membedakan infeksi primer dari infeksi sekunder.<sup>5</sup>

Sekarang ini telah banyak dikembangkan suatu uji serologi baru berformat *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untuk mengidentifikasi infeksi primer dan sekunder dari suatu infeksi virus dengue<sup>6,7,8</sup>. Beberapa kit ELISA komersial yang telah tersedia telah terbukti cukup sensitif dan spesifik dalam menentukan tipe infeksi virus dengue menggunakan sampel serum dari pasien pada fase konvalesens.<sup>9</sup>

Uji serologi lain yang juga dapat digunakan untuk membedakan infeksi primer dan sekunder adalah *Plaque Reduction Neutralization Test* (PRNT).<sup>6</sup> Sampai sekarang PRNT masih ditetapkan sebagai standar emas (*gold standard*) oleh WHO karena sensitivitas dan spesifisitasnya yang tinggi diantara flavivirus dan serotipe virus dengue.<sup>5</sup> Kekurangan utama dari uji PRNT adalah uji ini tergolong mahal, memerlukan waktu yang lama untuk mendapatkan hasil dan

secara teknik cukup sulit. Oleh karena itu uji ini tidak umum dikerjakan di laboratorium-laboratorium.

Sejauh ini dari penelusuran literatur yang telah dilakukan, belum ada laporan penelitian yang membahas perbandingan antara HI atau ELISA terhadap PRNT. Studi ini dilakukan untuk mengevaluasi performa uji HI dan ELISA dalam membedakan infeksi primer dan sekunder yaitu membandingkan kedua uji tersebut dengan PRNT. Sampel-sampel yang digunakan diperoleh dari suatu studi kohort prospektif sehingga selain dari fase akut dan konvalesen, sampel-sampel dari fase pra sakit juga akan dibandingkan untuk mendukung analisisnya.

## **BAHAN DAN CARA KERJA**

### **Koleksi sampel**

Sampel serum yang digunakan pada penelitian ini dikoleksi dari beberapa studi surveilans, yaitu

- 1) Studi kohort prospektif infeksi dengue pada pekerja pabrik di Bandung,
  - 2) Studi kohort prospektif pada keluarga dan tetangga terdekat penderita infeksi dengue (studi kluster) di Bandung dan Jakarta, 3) Studi chikungunya di Jakarta.
- Serum fase akut diambil ketika peserta studi berobat ke puskesmas dan fase konvalesens diambil setidaknya tujuh hari kemudian. Total jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 92 kasus infeksi yang terdiri dari 92 sampel fase akut, 92 sampel fase konvalesen dan 39 sampel fase pra-sakit (ketika masih sehat) sehingga jumlah keseluruhan sampel sebanyak 223.

### **PRNT**

Sampel serum diencerkan mulai dari 1:10, sampai dengan 1:10240 menggunakan medium MEM-H 2% FBS. Sebanyak 100 ul dari masing-masing pengenceran tersebut dicampur dengan 100 ul virus dengue yang mengandung 20-30 unit plak (plaque forming unit/pfu) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Campuran serum-virus (50 ul) kemudian diinokulasikan pada 1 ml suspensi sel *Baby Hamster Kidney* (BHK-21) di dalam sumur kultur. Sumur kultur dilapisi carboxymethyl cellulose (CMC) dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 7 hari untuk dengue 1, 3 dan 4 dan 5 hari untuk dengue 2. Titer end point

ditentukan dari pengenceran tertinggi yang dapat menimbulkan reduksi atau pengurangan plak sebanyak 50%.

### Uji HI

Perlakuan awal (*pre-treatment*) dilakukan terhadap sampel serum guna menghilangkan penghambat non-spesifik yang terdapat pada serum dengan mereaksikan serum dengan kaolin. Sampel kemudian diencerkan dari 1:10 sampai 1:10240 menggunakan 0,4 % Bovine Albumin Borat Saline (BABS) di dalam sumur mikrotiter. Antigen sebesar 4-8 unit HA kemudian ditambahkan pada setiap sumur yang telah diencerkan tersebut dan dikocok. Campuran lalu diinkubasi pada 4°C semalaman. Inkubasi pada 37°C kemudian dilakukan setelah sel darah merah angsa ditambahkan. Hasil HI ditunjukkan dengan nilai pengenceran tertinggi dimana masih terjadi hambatan hemaglutinasi terhadap sel darah merah angsa.

### ELISA IgG

ELISA IgG dilakukan menggunakan kit komersial *Dengue Fever IgG capture DxSelect* (Focus Diagnostics, Cypress, California). Urutan kerja dilakukan mengikuti petunjuk penggunaan kit. Sampel serum yang diencerkan dimasukkan ke dalam sumur mikrotiter yang sudah dilapisi virus dengue 1 – 4 dan diinkubasi. Sumur lalu dicuci untuk menghilangkan reaktan non-spesifik. Anti-human IgG yang sudah dikonjugasi dengan HRP ditambahkan dan dicuci kembali. Substrat enzim dan kromogen diberikan untuk memberi warna pada campuran reaksi. Warna yang dihasilkan diukur kerapatan optiknya (OD) menggunakan spektrofotometer.

### Analisa Statistik

Data yang diperoleh dari ketiga uji di atas diolah dengan menghitung nilai sensitivitas, spesifitas, *negative predictive value* (NPV) dan *positive predictive value* (PPV) Performa HI dan ELISA dibandingkan secara statistik menggunakan uji *chi-square* dengan program STATA dari *windows*..

## HASIL

Total jumlah spesimen yang dikerjakan pada penelitian ini sebanyak 92 kasus infeksi dengue, terdiri dari 39 sampel pada fase pra-sakit, 92 sampel fase akut dan 92 sampel fase konvalesen sehingga jumlah keseluruhan sampel sebanyak 223. Dari 200 sampel yang positif dengan PRNT, sebanyak 185 dan 192 positif dengan HI dan ELISA IgG. Sebanyak 23 sampel yang negatif dengan PRNT, 13 dan 18 sampel juga negatif dengan HI dan ELISA IgG. Nilai sensitivitas, spesifisitas, NPV dan PPV dari uji HI dan ELISA dapat dilihat di tabel 1.

Sejumlah 92 kasus infeksi dengue yang telah diuji dengan PRNT, 19 kasus menunjukkan infeksi primer sementara 73 kasus infeksi sekunder. Dari 19 kasus infeksi primer diatas, seluruhnya (100%) termasuk infeksi primer sementara dari 73 kasus infeksi sekunder, 72 kasus (98,7%) juga termasuk dalam infeksi sekunder berdasarkan ELISA IgG (Tabel 2). Pada penelitian ini juga dianalisa perbandingan titer HI pada fase konvelesens dengan PRNT (Tabel 3, grafik 1).

Tabel 1. Nilai sensitivitas dan spesifisitas HI dan IgG

	HI	IgG	Nilai p
<b>Sensitivitas</b>	92.5%	96.0%	0.1327
<b>Spesifisitas</b>	56.5%	78.3%	0.1148
<b>PPV</b>	94.9%	97.5%	0.1779
<b>NPV</b>	46.4%	69.2%	0.0905

Tabel 2. Performa HI dan ELISA IgG dalam membedakan infeksi primer dan sekunder

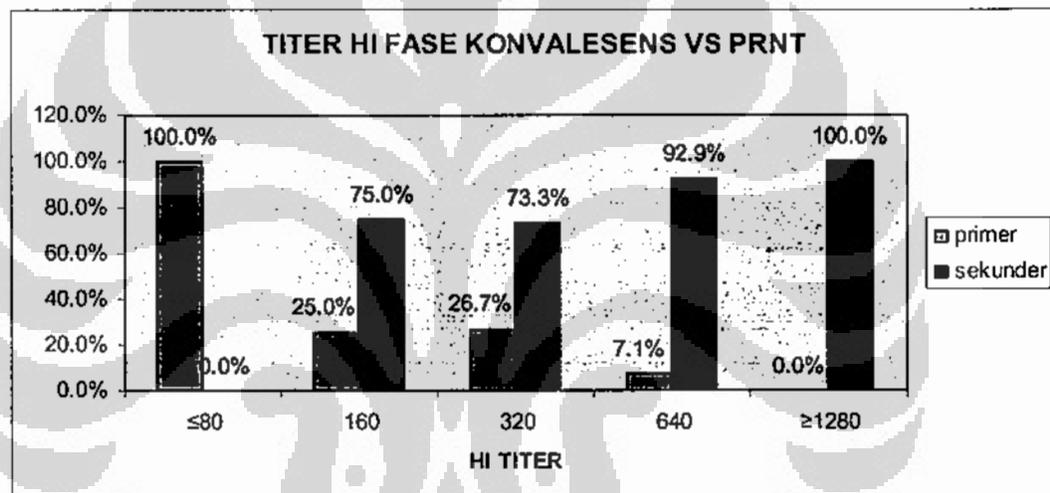
	PRNT			
	Infeksi Primer		Infeksi Sekunder	
<b>HI</b>	19/19	100,0%	23/73	31,5%
<b>IgG</b>	19/19	100,0%	72/73	98,6%

p = 0 (CI 95%)

Tabel 3. Perbandingan titer HI fase konvalesens dengan hasil PRNT

Titer HI	Jumlah kasus	PRNT			
		Infeksi primer		Infeksi sekunder	
		Jumlah kasus	%	Jumlah kasus	%
≤80	13	13	100,0%	0	0,0%
160	4	1	25,0%	3	75,0%
320	15	4	26,7%	11	73,3%
640	14	1	7,1%	13	92,9%
≥1280	45	0	0,0%	45	100,0%

Grafik 1. Perbandingan titer HI fase konvalesen dengan presentase infeksi primer dan sekunder berdasarkan PRNT



## PEMBAHASAN

Performa uji HI dan ELISA dalam mendeteksi antibodi di dalam sampel serum dilihat dengan menghitung nilai sensitivitas dan spesifisitas kedua uji tersebut terhadap PRNT. Total jumlah spesimen yang dikerjakan pada penelitian ini sebanyak 223 sampel serum, terdiri dari sampel pada fase pra-sakit, akut dan konvalesens. Nilai sensitivitas HI yang diperoleh pada penelitian ini adalah sebesar 92,5%, spesifisitas 56,5%, PPV 94,4% dan NPV 46,4%. Untuk uji ELISA IgG, nilai sensitivitas sebesar 96%, spesifisitas 78,3%, PPV 97,5% dan NPV 62,9%. Secara keseluruhan hasil tersebut memperlihatkan performa ELISA IgG lebih baik dibandingkan dengan HI namun perbedaan tersebut secara statistik tidak signifikan ( $p > 0,05$ ; CI 95%)(Tabel 1). Keadaan tersebut bisa saja

disebabkan karena jumlah spesimen negatif yang kurang banyak sehingga nilai spesifisitas dan NPV antara ELISA dan HI tidak berbeda bermakna.

Sejumlah 92 kasus infeksi dengue telah diuji dengan PRNT. Sembilan belas kasus menunjukkan infeksi primer sementara 73 kasus infeksi sekunder. Dari 19 kasus infeksi primer diatas, seluruhnya (100%) termasuk infeksi primer sementara dari 73 kasus infeksi sekunder, 72 kasus (98,7%) juga termasuk dalam infeksi sekunder berdasarkan ELISA IgG (Tabel 2). Hasil tersebut memperlihatkan performa ELISA IgG yang sangat bagus dan dapat diandalkan dalam membedakan infeksi dengue.

Sama halnya dengan ELISA IgG, hasil yang diperoleh dari uji HI pada infeksi primer seluruhnya (100%) sesuai dengan hasil PRNT. Namun untuk determinasi infeksi sekunder, performa HI jauh lebih rendah yaitu hanya 23 (31,5%) kasus. Dengan demikian terdapat 50 kasus infeksi sekunder berdasarkan hasil PRNT yang didiagnosa sebagai infeksi primer oleh HI.

Performa HI dibandingkan dengan ELISA IgG secara statistik pada infeksi sekunder juga berbeda secara signifikan ( $p=0$ ) (Tabel 4). Keadaan tersebut mengindikasikan uji HI kurang baik dalam menentukan infeksi sekunder. Sejalan dengan pendapat Graham dkk<sup>10</sup>, hasil HI yang diperoleh pada penelitian ini cenderung mengklasifikasikan infeksi dengue sebagai infeksi primer daripada infeksi sekunder. Pertimbangan yang diajukan oleh Graham dkk<sup>10</sup> berkaitan dengan hasil HI tersebut adalah ada suatu fraksi antibodi HI yang tidak diketahui terdegradasi seiring dengan waktu sehingga memberikan hasil di bawah batas ambang deteksi. Namun dalam penelitian ini sampel serum diuji dalam kurun waktu yang tidak terlalu lama setelah pengambilan. Kemungkinan pertimbangan lainnya adalah diperkirakan kriteria interpretasi titer HI yang ditetapkan WHO belum dengan tepat memberikan batasan atau *threshold* dalam membedakan infeksi primer dan sekunder. Seperti telah disinggung sebelumnya, HI sebagai metode yang direkomendasikan WHO dinilai seringkali kurang tepat dalam mengklasifikasikan (*misclassified*) infeksi primer dan sekunder virus dengue jika mengacu pada kriteria yang ditetapkan WHO tersebut.<sup>11</sup>

Pada tabel 5 dan grafik 1 diperlihatkan perbandingan titer HI pada fase konvalesens terhadap PRNT. Semua kasus pada titer  $\leq 80$  merupakan infeksi

primer dan infeksi sekunder pada titer  $\geq 1280$  dibandingkan dengan PRNT. Hasil kontras terhadap kriteria WHO ditunjukkan pada titer 160-640 dimana presentase infeksi sekunder pada interval tersebut cukup besar (73,3-92,9%). Dari data di atas dapat diambil kesimpulan bahwa infeksi primer hanya dapat ditentukan jika titer HI pada fase konvalesens  $\leq 80$  dan infeksi sekunder pada titer  $\geq 1280$ . Pada titer antara 160 dan 640, infeksi dengue tidak dapat didefinisikan melihat kejadian infeksi primer dan sekunder pada interval tersebut hampir sama besarnya.

### DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Diunduh dari <http://www.who.int/ctd/dengue/burdens.html>. Diakses pada tanggal 1 Mei 2008.
2. Egger JR & Coleman PG. Age and clinical dengue illness. *EID Journal* 2007; 13(6): 1-2.
3. Guy B & Almond JW. Towards a dengue vaccine: Progress to date and remaining challenges. *Comp Imm Microbiol Infect Dis.* 2006;31:239-52.
4. Cordeiro MT, Braga-Neto U, Nogueira RM, Marques ETA Jr. Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute dengue infection based on IgG ELISA. *PlosOne.* April 2009; 4(4): 1-10.
5. World Health Organization. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control.* 2<sup>nd</sup> ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1997.
6. Innis et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 30: 418-27.
7. Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanarooj, Dung NM, et al. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 693-8.
8. Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, et al. Discrimination between primary and secondary dengue virus infection by an immunoglobulin G avidity test using a single acute-phase serum sample. *J Clin Microbiol* 2005a; 43: 2793-7.

9. De Souza VAUF, Tateno AF, Oliveira RR, Domingues RB, Araujo ES, et al. Sensitivity and specificity of three ELISA-based assay for discriminating primary from secondary acute dengue infection. *J Clin Virol* 2007;39:230-3.
10. Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, et al. A prospective seroepidemiology study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995-1996. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 6: 412-9.
11. A-Nuegoonpipat A, Prakong S, Sa-ngasang A, Chanama S, Sawanpanyalert S, et al. Comparison between Haemagglutination Inhibition (HI) Test and IgM and IgG-capture ELISA in determination of Primary and Secondary Dengue Virus Infections. *Dengue Bulletin, World Health Organization* 2006;30:141-45.

