



UNIVERSITAS INDONESIA

**KORELASI KADAR ANTIBODI ANTI PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE
TROMBOSIT DAN KEJADIAN TROMBOSITOPENIA DENGAN TITER
ANTI-NS1 PADA INFEKSI DENGUE**

TESIS

**SARI MARIYATI DEWI N
0906575621**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI
JAKARTA
19 DESEMBER 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**KORELASI KADAR ANTIBODI ANTI PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE
TROMBOSIT DAN KEJADIAN TROMBOSITOPENIA DENGAN TITER
ANTI-NS1 PADA INFEKSI DENGUE**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
MAGISTER BIOMEDIK (M.Biomed)

SARI MARIYATI DEWI N
0906575621

FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI
JAKARTA
19 DESEMBER 2012

SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Sari Mariyati Dewi N

NPM : 0906575621

Tanda tangan :

Tanggal: 19 Desember 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
 Nama : Sari Mariyati Dewi N
 NPM : 0906575621
 Program Studi : Ilmu Biomedik
 Judul Tesis : Korelasi Kadar Antibodi Anti Protein Disulfida Isomerase
 Trombosit dan Kejadian Trombositopenia dengan Titer
 Anti-NS1 pada Infeksi 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 : dr. Alida R. Harahap, SpPK (K), PhD (.....)
 Pembimbing II : Dr. dr. Andhika Rachman, SpPD (.....)
 Penguji I : Dr. dr. Budiman Bella, SpMK (.....)
 Penguji II : dr. Ninik Mudjihartini, MS (.....)
 Penguji III : Dr. dr. T. Djumhana Atmakusuma. SpPD, KHOM (.....)

Ditetapkan di : Jakarta
 Tanggal : 19 Desember 2012
 Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

(Dr. rer.physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi)

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah yang Maha Esa atas Rahmat dan karuniaNya sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.

Tulisan yang merupakan hasil penelitian dan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Biomedik ini dapat saya selesaikan berkat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Untuk itu ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang tinggi saya haturkan kepada dr. Alida Roswita Harahap, SpPK(K), PhD dan Dr. dr. Andhika Rachman, SpPD atas bimbingan, arahan dan dukungan yang tidak ternilai selama ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Dr. dr. Ratna Sitompul, SpM(K), Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi, Ketua Kekhususan Imunologi Dr. Drs. Heri Wibowo, MS dan segenap jajaran staf pengajar di Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menimba ilmu di Universitas Indonesia.

Penghormatan dan ucapan terima kasih juga saya haturkan kepada Dr. Ir. Chairy SE, MM selaku Rektor Universitas Tarumanagara, dan dr Tom Surjadi, MPH selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melanjutkan pendidikan ke jenjang yang lebih tinggi.

Ucapan terima kasih saya ucapkan kepada dr. Meilani Syampurnawati, PhD selaku Kepala Laboratorium Penelitian Biologi molekuler Divisi Hematologi Onkologi Medik RSUPN Cipto Mangunkusumo, dan dr Arie Munandar, Sp (Onk) Rad selaku penanggungjawab laboratorium biomolekuler Divisi Radioterapi, atas ijin untuk melakukan penelitian di laboratorium. Terima kasih kepada Delta Fermikuri Akbar, S.Si, Elly Yanah Arwanih, S.Si, serta Ira Widiarti, S.Si, M.I.L, yang telah mendampingi pada saat penelitian.

Terima kasih saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Pusat Trombosis Hemostasis RSUPN Cipto Mangunkusumo, dr. Shufrie Effendi, SpPD, KHOM atas ijin untuk melakukan penelitian. Tak lupa kepada Puspita Yudhistira AMAK, Ainul Mardiah AMAK atas bantuan dalam membantu mengerjakan agregasi trombosit.

Terima kasih kepada Dr. Drs. Heri Wibowo, MS, Kepala Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, atas ijinnya untuk saya meminjam alat sentrifugasi.

Terima kasih kepada rekan di Lembaga Eijkman Turyadi, M.Biomed, Erick Sidarta, S.Si di Laboratorium Hepatitis atas diskusinya dan terima kasih kepada Dr. Khin Saw Aye Myint, MD serta Ungke AJ, M.Biomed di Laboratorium Dengue atas diskusi yang berharga dalam membantu pemecahan masalah dalam pengerjaan ELISA. Terima kasih juga kepada DR. Sc. Hum Ari Winasti Satyagraha, dan Andreas Kusuma S.Si atas ijinnya untuk saya melakukan penelitian di laboratorium dan diskusi yang berharga dalam membantu memecahkan masalah dalam pengerjaan *Western Blot*.

Tidak juga saya lupakan, ucapan terima kasih kepada teman seangkatan dari kekhususan Imunologi, Retno Martini Widhyasih dan dr. Yohanna Angelina atas persahabatan dalam perjuangan selama ini.

Hormat dan bakti tulus ananda persembahkan kepada ibunda tercinta Ny. Joeng Lie Tjuen atas segala bimbingan, tauladan dan nasehat yang akan tetap ananda kenang.

Rasa cinta, kasih sayang yang tidak pernah putus kepada suami tercinta Christian Dharmawangca SE dan buah hati tersayang Timoty Joel Jeremy C, Joshua Taftfarel Petra C, dan Eljoenay Grace Victorya C. Semoga kecintaan, pengertian dan kesabaran selama ini mendapat berkat yang baik dari Tuhan.

Akhir kata, semoga Tesis ini dapat membawa manfaat bagi dunia pendidikan dan Tridharma Perguruan Tinggi.

Jakarta , 19 Desember 2012

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Sari Mariyati Dewi N
NPM : 0906575621
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Immunologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

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

“Korelasi Kadar Antibodi Anti Protein Disulfida Isomerase Trombosit dan kejadian trombositopenia dengan Titer Anti-NS1 pada Infeksi Dengue”. Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/ memformat, mengelola dalam bentuk pangkalan data, 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 : 19 Desember 2012
Yang menyatakan,

(Sari Mariyati Dewi N)

ABSTRAK

Nama : Sari Mariyati Dewi N
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik kekhususan Imunologi
Judul : Korelasi Kadar Antibodi Anti Protein Disulfida Isomerase
Trombosit dan kejadian trombositopenia dengan Titer anti-NS1
pada Infeksi Dengue

Latar belakang: Infeksi Dengue masih merupakan masalah kesehatan di Negara tropik dan subtropik. Trombositopenia merupakan manifestasi klinik yang selalu dijumpai pada infeksi Dengue dan patomekanismenya masih belum jelas. Cheng dkk mendapatkan adanya mimikri molekul antara protein disulfida isomerase (PDI) permukaan trombosit dengan protein NS1 virus Dengue (VD), sehingga anti-NS1 dapat mengenai PDI dan bertindak sebagai anti-PDI. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya korelasi antara anti-NS1 dan anti-PDI permukaan trombosit sebagai salah satu mekanisme trombositopenia pada infeksi Dengue. **Metode:** Penelitian dengan disain potong lintang pada 19 pasien infeksi Dengue. Darah pasien diambil pada demam hari ke 3, 5 dan 7. Jumlah trombosit dicatat, kemudian anti-NS1 dideteksi dengan menggunakan metode ELISA phase padat, dan anti-PDI dideteksi dengan metode MAIPA direk, dan eksplorasi pengenalan antibodi serum pasien dengan protein trombosit menggunakan *western blot*. **Hasil:** Didapatkan korelasi lemah tidak bermakna antara OD anti-NS1 dengan jumlah trombosit. Pada analisis kinetika anti-NS1 dan anti PDI secara individual didapatkan pola yang bervariasi. Analisis korelasi pada 2 kelompok sampel ($\leq 1 \times 10^5 / \mu\text{L}$ dan $> 1 \times 10^5 / \mu\text{L}$) didapatkan korelasi positif lemah yang kemudian berubah menjadi korelasi negatif lemah pada demam hari ke5 dan ke7. Pada penelitian ini juga kami menemukan adanya pengenalan antibodi pada serum pasien yang mengenali GPIIb, GPIIIa, dan ERp57, molekul yang mengandung sekuen PDI. **Kesimpulan:** Terdapat korelasi negatif lemah antara OD anti-NS1 dan jumlah trombosit yang semakin kuat pada demam hari ke5. Ada korelasi positif lemah antara OD anti-NS1 dan anti-PDI yang berubah menjadi korelasi negatif pada demam hari ke5 pada kelompok sampel IgG. Kemungkinan pengenalan antibodi serum pasien terhadap GPIIb, GPIIIa dan ERp57 belum dapat dipastikan.

Kata kunci: *anti-NS1, PDI, trombositopenia, infeksi Dengue Akut.*

ABSTRACT

Name : Sari Mariyati Dewi N
 Program of Study : Magister of Biomedical Science, majoring in Immunology
 Title : Correlation of Antibodies of Anti Protein Disulfide
 Isomerase Platelet Level and Trombositopenia with Anti-
 NS1 Titer on Dengue Infection.

Background: Dengue infection, is still a major public health problems for people in tropic and subtropic areas. Thrombocytopenia is a manifestation that always found in Dengue infection and its patomechanism still not clear. Cheng et all demonstrated molecular mimicry mechanism between PDI on platelet and region protein NS1-DV, so anti-NS1 recognize PDI on platelet and act like anti-PDI. In this study, we observed the correlation of anti-NS1 and anti-PDI on platelet as one of the mechanism of trombositopenia in Dengue infection

Materials and Method : We observed nineteen patients with Dengue infection by a cross sectional study. Patients blood were collected on day 3, 5 and 7 after the onset of fever. We collected data of platelet count, anti-NS1 were determined by using solid phase ELISA method, anti-PDI platelet were determined by using Direct MAIPA method, and the exploration of antibody activities in patient sera against PDI platelet were done using Western Blot method.

Result : There was no significant weak correlation between OD anti-NS1 and platelet count. In individually analysis of the kinetics of anti-NS1 and anti-PDI shows variation of patterns. Correlation analysis between 2 sampel group ($>1 \times 10^5/\mu\text{l}$ and $\leq 1 \times 10^5/\mu\text{l}$) we have weak correlation, but on 5th day after fever onset the correlation become weak negative correlation on 5th day and on 7th day after fever onset. Western blot analysis shows antibodies activity in patient serum that recognized GP IIb, GP IIIa, dan ERp 57, which is moleculer that content PDI.

Conclusion : We have weak negative correlation between OD anti-NS1 with platelet count that stronger in day 5th after the onset of fever. There was weak positive correlation between OD anti-NS1 and OD anti-PDI that the correlation change to negative correlation in day 5th after the onset of fever in IgG anti-Dengue positive (+) group. The recognize antibody in patient serum to GP IIb, GP IIIa, dan Erp 57, still not clear yet.

Key Words : *NS-1 antibodies, PDI antibodies, inhibition platelets aggregation, secondary Dengue Infection.*

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
I. PENDAHULUAN	1
I.1. Latar belakang	1
I.2. Identifikasi dan rumusan masalah	3
I.3. Pertanyaan penelitian	4
I.4. Tujuan penelitian.....	4
1.4.1. Tujuan umum	4
1.4.2. Tujuan khusus	4
I.5. Manfaat penelitian	4
1.5.1. Manfaat klinis	4
1.5.2. Manfaat bagi masyarakat	5
1.5.3. Manfaat bidang akademik	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1. Virus Dengue	6
II.1.1 Struktur Virus Dengue	6
II.1.2. Protein Struktural	7
II.1.3. Protein <i>Non-Structural</i>	8
II.1.4. Protein <i>Non-Structural</i> 1 VD (NS1)	9
II.2. Proses Invasi, Translasi, dan Replikasi Virus Dengue	9
II.3. Mekanisme Respon Imun pada Infeksi Dengue	11

II.4. Trombosit	14
II.5. Trombositopenia pada Infeksi Dengue	15
II.6. Protein Disulfida Isomerase	16
II.7. Autoimun dan <i>molecular mimicry</i> pada Infeksi Dengue	18
III. BAHAN DAN CARA KERJA	22
III.1. Desain penelitian	
III.2. Tempat dan waktu penelitian	22
III.3. Bahan penelitian	22
III.4. Alur penelitian	22
III.5. Perkiraan besar sampel	24
III.6. Populasi dan sampel	25
III.7. Penghitungan trombosit	26
III.8. ELISA Anti-NS1	26
III.9. Deteksi anti-PDI trombosit dengan MAIPA direk.....	26
III.10. <i>Western Blot</i>	28
III.11. Variabel dan batasan operasional	31
III.12. Etika penelitian	33
III.13. Analisa data	33
	34
IV. HASIL PENELITIAN	35
IV.1. Subjek Penelitian	
IV.2. Kinetika jumlah trombosit, OD anti-NS1 VD dan OD anti-PDI permukaan trombosit	35
	34
IV.3. Korelasi antara anti-NS1 dengan jumlah trombosit	
IV.4. Korelasi antara anti NS1 dengan anti PDI trombosit	41
IV.5. Korelasi antara OD anti NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada 2 kelompok sampel berdasarkan IgG anti-Dengue dan jumlah trombosit	42
	44
IV.6. Pengujian pengenalan antibodi dalam serum sampel terhadap PDI trombosit	46
V. PEMBAHASAN	49
V.1. Gambaran umum	
V.2. Kinetika OD anti-NS1, OD anti-PDI trombosit dan trombositopenia pada infeksi akut Dengue	49
	50
V.3. Korelasi OD anti-NS1 dan jumlah trombosit	
V.4. Profil anti-PDI trombosit pada infeksi akut Dengue	53
V.5. Korelasi anti-NS1 dan anti-PDI.....	53
V.6. Pengujian adanya pengenalan PDI trombosit oleh anti-NS1.... dalam	53

serum sampel	55
VI. SIMPULAN DAN SARAN	
VI.1. Simpulan	57
VI.2. Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	58
DRAFT ARTIKEL	
RIWAYAT HIDUP	

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Identifikasi variable penelitian	33
Tabel 4.1.	Karakteristik jumlah trombosit, OD anti-NS1 dan OD anti-PDI trombosit pada subjek dengan infeksi Dengue akut dan anti-Dengue IgG (-)	36
Tabel 4.2.	Karakteristik jumlah trombosit, OD anti-NS1 dan OD anti-PDI trombosit pada seubjet dengan infeksi Dengue akut dan anti-Dengue IgG (+)	36
Tabel 4.3.	Perubahan individual dari OD anti-NS1 dan OD anti-PDI pada demam hari ke5 dan ke7 dibandingkan dengan hari ke3	41
Tabel 4.4.	Korelasi OD anti-NS1 dengan jumlah trombosit pada demam hari ke 3, 5, dan 7.....	41
Tabel 4.5.	Korelasi OD anti-NS1 dengan jumlah trombosit pada demam hari ke3, 5, dan 7 pada sampel kelompok anti-Dengue IgG (-)	42
Tabel 4.6.	Korelasi OD anti-NS1 dengan jumlah trombosit pada demam hari ke3, 5, dan 7 pada sampel kelompok anti-Dengue IgG (+).....	42
Tabel 4.7.	Profil ELISA IgG anti-NS1 dan MAIPA anti-PDI trombosit	43
Tabel 4.8.	Korelasi OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada demam hari ke 3, 5, dan 7.....	43
Table 4.9.	Korelasi OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada kelompok anti-Dengue IgG (-).....	43
Tabel 4.10.	Korelasi OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada kelompok anti-Dengue IgG (+).....	44
Tabel 4.11.	Korelasi OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada kelompok dengan jumlah trombosit disalah satu hari pemeriksaan $\leq 1 \times 10^5 / \mu\text{l}$	44
Tabel 4.12.	Korelasi OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada kelompok dengan jumlah trombosit disalah satu hari pemeriksaan $> 1 \times 10^5 / \mu\text{l}$	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar I.1.	Area penyebaran nyamuk Aedes dan area epidemik Dengue	1
Gambar II.1.	Struktur dan genom Flavivirus.....	7
Gambar II.2.	Siklus hidup virus Dengue di dalam sel pejamu	11
Gambar II.3.	Mekanisme respon imun pada infeksi Dengue sekunder....	13
Gambar II.4.	Respon antibody pada infeksi primer dan sekunder pada infeksi VD	14
Gambar II.5..	Struktur PDI	17
Gambar II.6.	Kerangka Teori	20
Gambar II.7.	Kerangka konsep	21
Gambar III.1.	Alur penelitian	24
Gambar IV.1.	Kinetika jumlah trombosit, OD anti-NS1 dan OD anti-PDI.. trombosit demam hari ke3, ke5. Dan ke7 pada subjek kelompok A dan B	37
Gambar IV.2.	Grafik kinetika OD anti-NS1 demam hari ke 3, 5, dan 7 pada kelompok A dan kelompok B	39
Gambar IV.3.	Grafik kinetika OD anti-PDI trombosit demam hari ke 3, 5, dan 7 pada kelompok A dan kelompok B	40
Gambar IV.4.	Hasil Western Blot protein trombosit yang diinkubasi dengan serum sampel	47
Gambar IV.5.	Hasil Western Blot protein trombosit yang diinkubasi dengan mAb PDI dan mAB NS1.....	48
Gambar IV.6.	Hasil Western Blot yang memperlihatkan adanya reaksi langsung antibody sekunder dengan protein trombosit	48

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Surat persetujuan komisi etik
- Lampiran 2. Contoh surat persetujuan keikutsertaan penelitian (*inform consent*)
- Lampiran 3. Daftar subjek penelitian
- Lampiran 4. Gambar kinetika jumlah trombosit, OD anti-NS1, dan OD anti-PDI demam hari ke3, ke5, dan ke7
- Lampiran 5. Grafik kinetika OD anti-NS1 dan OD anti-PDI pada 19 sampel
- Lampiran 6. Perhitungan statistik
- Lampiran 7. Gambar kinetika OD anti-NS1 dan OD anti-PDI pada kelompok sampel berdasarkan hasil pemeriksaan IgG anti-Dengue dan jumlah trombosit

DAFTAR SINGKATAN

ADP	<i>Adenosin diphosphat</i>
ADE	<i>Antibody Dependent Enhancement</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
ADCC	<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
C	<i>Capsid</i>
cAMP	<i>cyclic Adenosin monophosphat</i>
CFR	<i>Case Fatal Rate</i>
CTLs	<i>Cytolytic T Lymphocytes</i>
DBD	<i>Demam Berdarah Dengue</i>
DD	<i>Demam Dengue</i>
DEN	<i>Dengue</i>
E	<i>Envelope</i>
GP1a/IIa	<i>Glikoprotein Ia/IIa</i>
GP1b/IIIa	<i>Glikoprotein Ib/IIIa</i>
IgG	<i>Imunoglobulin G</i>
IgM	<i>Imunoglobulin M</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1β</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IPA	<i>Inhibition Platelet Aggregation</i>
KLB	<i>Kejadian Luar Biasa</i>
M	<i>Membran</i>
MPA	<i>Maximal Platelet Aggregation</i>
mNS1	<i>membran Nonstruktural 1</i>
NS1	<i>Nonstruktural 1</i>
NS2A	<i>Nonstruktural 2A</i>
NS2B	<i>Nonstruktural 2B</i>
NS3	<i>Nonstruktural 3</i>
NS4A	<i>Nonstruktural 4A</i>
NS4B	<i>Nonstruktural 4B</i>
NS5	<i>Nonstruktural 5</i>
NTPase	<i>Nuklease trifosfat</i>
OD	<i>Optical Density</i>
OPD	<i>O-phenylenediamine</i>
ORF	<i>Open reading Frame</i>
PDI	<i>Protein Disulfide isomerase</i>
PGI2	<i>Prostasiklin</i>
preM	<i>preMembran</i>
PRP	<i>Platelet Rich Plasma</i>
PPP	<i>Platelet Poor Plasma</i>
RE	<i>Reticulum endoplasmic</i>
RNA	<i>Ribo Nucleic Acid</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
sNS1	<i>secretion Nonstruktural1</i>
SCF	<i>Soluble complement fixing</i>
SRD	<i>Sindrom Renjatan Dengue</i>
TNF α	<i>Tumor Necrotizing Factor α</i>
μ L	<i>mikro liter</i>

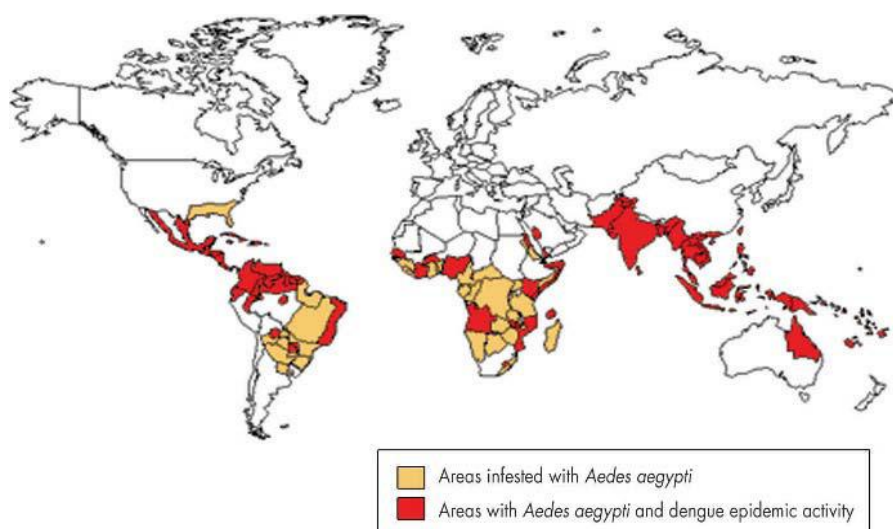
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>
VD	<i>Virus Dengue</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Infeksi Dengue disebabkan oleh virus dari keluarga *Flavivirus* yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Hingga saat ini infeksi Dengue masih menjadi masalah kesehatan bagi sekitar 2,5-3,0 milyar penduduk yang tinggal di daerah tropis dan subtropis.¹ WHO memperkirakan sekitar 50–100 juta kasus Dengue terjadi setiap tahunnya dengan interval epidemik setiap 3-5 tahun. Asia Tenggara pada umumnya dan Indonesia pada khususnya, merupakan daerah endemis infeksi Virus Dengue (VD), dengan angka kasus tertinggi pada periode 2006-2008, yaitu: 396.196 kasus infeksi dan 3.468 kasus kematian.² Tingginya mobilitas manusia menyebabkan meluasnya penyebaran nyamuk *Aedes* dan peningkatan interaksi manusia dengan nyamuk. Akibatnya daerah endemik Dengue meningkat dari 100 negara menjadi 112 negara, seperti yang nampak pada gambar I.1 yang menggambarkan area penyebaran vektor dan area epidemik Dengue.³



Gambar I.1. Gambaran area penyebaran nyamuk *Aedes* dan area epidemik Dengue³

Infeksi salah satu dari 4 serotipe virus ini (Den-1, Den-2, Den-3, dan Den-4) dapat menimbulkan berbagai manifestasi, mulai dari manifestasi ringan seperti demam Dengue pada infeksi primer, hingga manifestasi berat, yaitu demam berdarah Dengue (DBD) atau sindrom renjatan Dengue (SRD) yang terjadi pada 4-6% orang yang mengalami infeksi Dengue sekunder. Trombositopenia, perdarahan dan kebocoran plasma merupakan karakteristik DBD atau SRD.⁴ Hingga saat ini patomekanisme terjadinya trombositopenia dan kebocoran plasma masih belum jelas. Beberapa patomekanisme yang telah diajukan dari penelitian terdahulu yaitu: adanya antibodi bersifat tidak menetralkan virus yang mempermudah masuknya virus ke dalam sel, yang disebut dengan mekanisme *antibody dependent enhancement* (ADE),⁵⁻⁷ terjadinya aktivasi sel T memori yang mengakibatkan produksi sitokin yang berlebihan (*cytokine storming*),⁸ virulensi virus yang memperberat gejala klinis yang timbul, adanya *molecular mimicry* antara protein virus dengan protein pejamu, dan teraktivasi sistem komplemen karena terbentuknya kompleks antigen-antibodi.^{7,9}

Trombositopenia merupakan gejala klinik yang selalu dijumpai baik pada demam Dengue maupun DBD. Semakin rendahnya jumlah trombosit dapat memperberat gejala yang timbul. Jumlah trombosit didapatkan lebih rendah pada pasien dengan DBD dibandingkan demam Dengue.¹⁰ Dari berbagai penelitian terdahulu didapatkan beberapa patomekanisme terjadinya trombositopenia, seperti menurunnya sintesis trombosit karena infeksi VD terhadap sel progenitor dan sel stroma sumsum tulang yang mengubah ekspresi berbagai sitokin dan mengakibatkan hematodepresif,^{10,11} terbentuknya autoantibodi anti trombosit dan kompleks imun yang meningkatkan fagositosis dan bersihan trombosit oleh makrofag, serta lisisnya trombosit dikarenakan aktivasi komplemen,^{4,12} terjadinya interaksi trombosit dengan sel endotel terinfeksi VD yang kemudian mengaktifkan trombosit, menginduksi agregasi dan lisisnya trombosit,¹¹ adanya reaksi silang anti-NS1 (anti-non-struktural 1) terhadap protein permukaan trombosit yang mengakibatkan penghambatan agregasi,¹³⁻¹⁵ dan adanya destruksi trombosit akibat mekanisme *molecular mimicry* antara antigen NS1 dengan trombosit.

Dari penelitian terdahulu didapatkan bahwa anti-NS1 dari serum pasien dapat mengopsonisasi trombosit orang normal dan meningkatkan fagositosis oleh makrofag sehingga berperan dalam terjadinya trombositopenia.^{11,16} Pada penelitian Cheng dkk, didapat antibodi monoklonal anti-NS1 bereaksi silang dengan molekul protein disulfida isomerase (PDI) permukaan trombosit serta menghambat agregasi trombosit yang diinduksi oleh Adenosin Diphosphat (ADP).¹⁷ Ternyata domain CGHC thioredoxin PDI permukaan trombosit memiliki homologi sekuen dengan residu 311-330 pada regio C-terminal protein NS1 VD. Residu ini diduga merupakan epitop pre-dominan dan dikenali oleh anti-NS1 VD.^{11,18} PDI trombosit berperan dalam agregasi, sekresi dan adhesi trombosit.¹⁹⁻²¹ Dikenalnya PDI trombosit oleh anti-NS1 mengakibatkan terhambatnya kerja PDI dalam mengaktivasi integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sebagai reseptor fibrinogen dan integrin 1b sebagai reseptor adhesi.

Adanya reaksi silang anti-NS1 terhadap PDI trombosit dan mekanisme autoantibodi terhadap trombosit menimbulkan suatu hipotesis terdapatnya hubungan antara titer anti-NS1 VD dengan derajat trombositopenia dan titer anti-PDI pada permukaan trombosit. Dari penelitian terdahulu, penemuan tentang indikasi aktivitas anti-NS1 VD terhadap PDI trombosit belum terspesifikasi dan belum diketahui apakah aktivitas anti-NS1 VD terhadap PDI trombosit ini konsisten pada semua infeksi Dengue akut.

1.2. IDENTIFIKASI DAN RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat disusun premis-premis sebagai dasar perumusan masalah penelitian ini sebagai berikut:

1. Trombositopenia merupakan karakteristik demam Dengue.
2. Patomekanisme terjadinya trombositopenia pada infeksi Dengue akut masih belum jelas.
3. Anti-NS1 dapat mengopsonisasi dan meningkatkan bersihan trombosit oleh makrofag pada infeksi Dengue akut.
4. Anti-NS1 VD mengenali PDI dan diduga mempunyai aktivitas sebagai anti-PDI trombosit yang dapat menghambat agregasi trombosit.

1.3. PERTANYAAN PENELITIAN

Berdasarkan rumusan masalah di atas, didapatkan beberapa pertanyaan penelitian, yaitu:

1. Apakah terdapat korelasi antara penurunan hitung trombosit dengan peningkatan kadar anti NS-1
2. Apakah terdapat anti-PDI yang telah terikat pada trombosit pasien.
3. Apakah terdapat korelasi antara titer anti-NS1 pada serum pasien dengan titer anti-PDI pada permukaan trombosit pasien.
4. Apakah aktivitas anti-NS1 VD terhadap PDI trombosit ini konsisten pada semua derajat Dengue

1.4. TUJUAN PENELITIAN

1.4.1. Tujuan Umum Penelitian

Mengetahui adanya peningkatan titer anti-NS1 VD terhadap PDI sebagai salah satu mekanisme trombositopenia pada infeksi Dengue.

1.4.2. Tujuan Khusus Penelitian

1. Mengetahui hubungan antara titer anti NS-1 VD dengan derajat trombositopenia
2. Mengetahui adanya anti-PDI yang sudah berikatan dengan PDI trombosit pasien terinfeksi Dengue.
3. Mengetahui adanya korelasi antara peningkatan titer anti NS-1 VD dengan titer anti-PDI trombosit pasien.
4. Mengetahui apakah mekanisme trombositopenia karena aktivitas anti-NS1 VD terhadap PDI trombosit terjadi pada semua derajat infeksi Dengue.

1.5. MANFAAT PENELITIAN

1.5.1. Manfaat Klinis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan paradigma baru mengenai patomekanisme terjadinya trombositopenia dan disfungsi trombosit yang terjadi pada infeksi Dengue. Selain itu dari hasil penelitian ini juga

diharapkan dapat mengarahkan pengembangan obat-obatan yang menghambat terjadinya trombositopenia dan disfungsi trombosit pada infeksi Dengue, serta mencegah masuknya penderita ke stadium yang lebih berat.

1.5.2. Manfaat Bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar prediktor beratnya gangguan perdarahan pada demam Dengue akut dan pengembangan pengobatan yang dapat meningkatkan atau menggantikan PDI trombosit yang akan diikat oleh antibodi anti-NS1 sehingga trombositopenia dapat dicegah dan proses agregasi trombosit tidak terganggu.

1.5.3. Manfaat Bidang Akademik

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai pengembangan ilmu pengetahuan dalam bidang imunologi khususnya dalam patomekanisme autoimun terhadap trombosit dan dapat menjadi dasar bagi penelitian tingkat molekuler selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

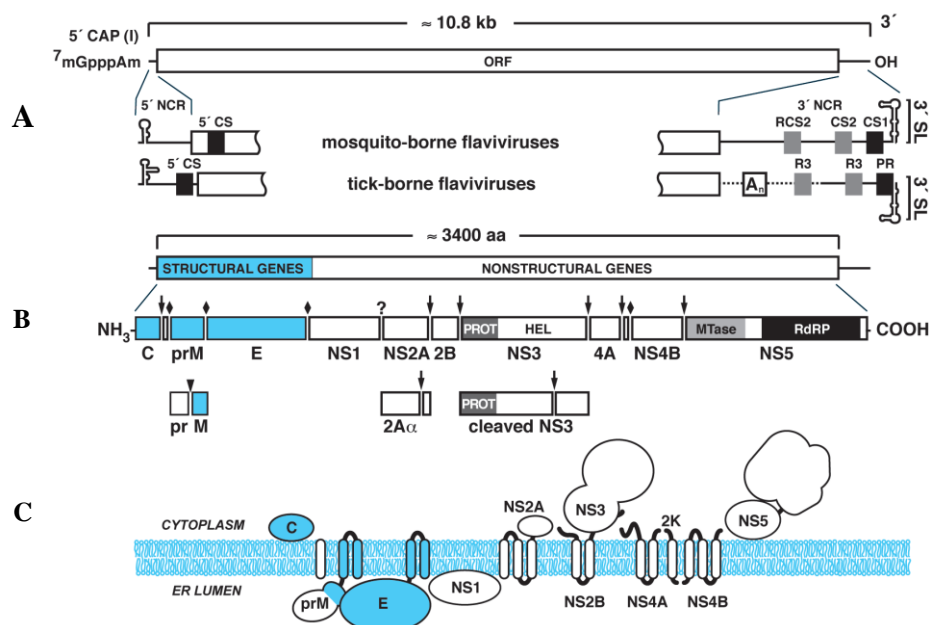
II.1. Virus Dengue

Virus Dengue merupakan anggota genus *flavivirus*, keluarga *Flaviviridae*, yang ditransmisikan oleh nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopituis*. Berdasarkan kriteria biologi dan imunologi virus Dengue dibagi menjadi 4 serotipe, yaitu: virus Dengue 1 (Den1), virus Dengue 2 (Den2), virus Dengue 3 (Den 3) dan virus Dengue 4 (Den 4). Diperkirakan VD merupakan hasil evolusi nenek moyangnya yang merupakan parasit pada primata *non-human* yang kemudian masuk ke lingkungan urban pada kira-kira 500-1000 tahun yang lalu.²² Infeksi VD mengakibatkan berbagai gejala, mulai dari demam ringan hingga demam tinggi yang disertai sakit kepala, nyeri retro-orbita, *myalgia*, *arthralgia*, vomitus, dan *rash* makulopapular. Pada keadaan yang lebih berat seringkali disertai dengan kebocoran plasma, trombositopenia dan manifestasi perdarahan. Berat atau ringannya gejala yang timbul sangat dipengaruhi berbagai faktor, baik dari virus maupun dari pejamu, seperti serotipe dan genotipe virus, serta genetik pejamu yang mempengaruhi respon imun pejamu terhadap VD.

II.1.1 Struktur Virus Dengue

Virus Dengue berbentuk spheris berdiameter 40-50 nm yang diselubungi oleh protein *Envelope* (E) dan protein membran (M).^{11,23} Genom VD merupakan rantai heliks tunggal positif RNA dengan panjang kira-kira 11 kb yang diselubungi oleh nukleokapsid (protein C) dan terdiri dari satu *open reading frame* yang panjang, yang diawali dan diakhiri dengan 5' dan 3' *Non-coding region* (NCR) dan berperan pada proses translasi serta replikasi genom. Sekuen 5' NCR merupakan sekuen yang tidak terlalu *conserve* diantara berbagai flavivirus. Sedangkan sekuen 3' NCR flavivirus antara yang disebarkan oleh nyamuk dengan kutu (*tick*) sangat berbeda. Pada bagian 5' terdapat 5' *cap* tipe 1, sedangkan pada bagian 3' tidak terdapat *poli(A) tail*. ORF (*Open ReadingFrame*) genom VD menyandi 3 protein struktural dan 7 protein non-struktural. Susunan

gen penyandi protein dari 5' sampai 3' adalah 5' NCR- C – PrM – E – NS1 – NS2A – NS2B – NS3 – NS4A – NS4B – NS5 – 3' NCR (gambar II.1.)



Gambar II.1. Struktur dan genom Flavivirus²⁴

(A) Genom virus Dengue terdiri dari 1 *open reading frame* (ORF) yang terdiri dari 10,8 kb. Pada ujungnya terdapat 5' NCR dan 3' NCR (*non coding region*). Pada stem loop (SL) 3' NCR genom virus terdapat perbedaan antara yang disebarkan oleh nyamuk dengan kutu. Pada ujung 5' terdapat *cap* tipe 1 sedangkan pada ujung 3' tidak terdapat *poly(A) tail*. (B) Poliprotein genom flavivirus, yang terdiri dari protein struktural (berwarna biru) dan protein non-struktural (berwarna putih). Poliprotein ini dipotong oleh signalase sel pejamu (♦), protease serin virus (↓), protease furin (▼), dan tidak diketahui (?). (C). Topologi protein flavivirus yang kemudian berada di membran retikulum endoplasma.

II.1.2 Protein Struktural

VD yang matur memiliki 3 protein struktural, yaitu protein kapsid (protein C/protein *core*/protein nukleokapsid), protein *envelope* (protein E) dan protein membran (protein M). Protein C berukuran 13–16 kDa terdiri dari 113 asam amino, diduga berperan pada pembentukan struktur virus dan meregulasi replikasi virus. Pada sel yang terinfeksi, protein C ditemukan dalam nukleus dan nukleoli serta sitoplasma.²³

Protein E VD terdiri dari 495 asam amino dan berperan dalam perlekatan dan fusi virus ke membran sel target. Protein E sangat imunogen sehingga dapat menginduksi terbentuknya antibodi netralisasi dan respon imun protektif.

Protein M VD didapatkan dalam 2 bentuk, yaitu protein pre-membran (protein preM) pada virion yang belum matang (*immature*) dan protein membran (protein M) pada virion yang matang (*mature*). Protein preM yang terdiri dari 165 asam amino, berinteraksi dengan protein E. Kompleks preM-E ini dapat melindungi protein dari *irreversible inactivation* karena pH asam dalam vesikel Golgi dan dalam mengaktivasi aktivitas fusogenik protein E VD.^{23,25} Selain itu protein prM bertindak sebagai *chaperone* bagi pelipatan protein E pada proses pelipatan membran dan penyusunan protein E.

II.1.3 Protein Non-Structural.

Protein non-struktural VD terdiri dari: NS1 - NS2A - NS2B - NS3 - NS4A - NS4B - NS5. Protein NS2A, NS2B, NS4A dan NS4B merupakan protein hidrofobik yang kecil dan sekuen primernya tidak *conserve* diantara ke empat serotipe VD. Ke empat protein NS ini berperan dalam sintesis RNA dan pembentukan virion. NS2A diduga berperan dalam perakitan dan/atau pelepasan virus. Protein NS2B diperlukan pada aktivitas proteolitik protease NS3,²³ sedangkan NS4A berperan dalam mentarget atau membentuk kait kompleks replikasi RNA virus. NS4B telah diidentifikasi melekat pada membran sitoplasma dan berperan dalam replikasi virus. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa protein NS2A, NS4A dan NS4B dapat menghambat transduksi sinyal yang dimediasi IFN (*IFN-mediated signal transduction*) sementara NS4B sendiri berpotensi menghambat persinyalan IFN- β dan IFN- γ .²⁶

Protein NS3 terdiri dari 618-623 asam amino dan berfungsi sebagai enzim protease virus yang terlibat dalam proses translasi poliprotein virus dan berperan dalam proses replikasi RNA melalui nukleotida-triphosphatase (NTPase). Selain itu didapatkan bahwa protein NS3 DEN2 berinteraksi dengan reseptor pengikat protein nukleus (*nuclear reseptor binding protein*) manusia dan memodulasi jalur intrasel antara retikulum endoplasma dengan kompartemen Golgi.

Protein NS5 terdiri dari 900-905 asam amino dan berperan sebagai polimerase RNA, salah satu enzim pada *capping pathway* replikasi RNA. Selain itu protein ini dapat menginduksi transkripsi dan translasi IL-8 melalui aktivasi *CAAT/enhancer binding protein*.

II.1.4 Protein Non-Structural 1 VD (NS1).

Protein NS1 VD sebesar 44-49 kDa terdiri dari 353–354 asam amino, yang mengandung 2 sisi glikosilasi yang tetap (*conserved*) dan 12 residu sistein yang tidak tetap (*non-conserved*). Protein ini berperan dalam proses replikasi dan perakitan virus. Dalam sel yang terinfeksi VD, NS1 diekspresikan dalam 3 bentuk yaitu: dalam bentuk kompleks dengan virion virus dalam retikulum endoplasma, dalam bentuk tersekresi (sNS1) atau terlarut yang berbentuk heksamer (3 sub-unit dimerik) dan dalam bentuk *membrane-anchored* yang berikatan pada membran sel pejamu yang berbentuk dimerik. NS1 berperan penting dalam replikasi virus pada sel nyamuk dan pada sel neural mencit.²⁶ sNS1 dapat melekat pada permukaan sel yang tidak terinfeksi melalui heparan sulfat (HS), heparin (HP), dan khondroitin sulfat yang mengandung sulfat glikoaminoglikan (GAG).²⁷ NS1 merupakan salah satu protein imunodominan terhadap sistem imunitas humoral sehingga dibentuk anti-NS1 yang berkaitan dengan patogenesis infeksi Dengue.

Pada beberapa penelitian didapatkan bahwa anti-NS1 dapat bereaksi silang dengan endotel, trombosit, faktor pembekuan darah seperti fibrinogen dan heparin.^{5,15,28} Pada trombosit, reaksi silang ini dapat menghambat agregasi trombosit dengan menghambat aktivasi integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ dan meningkatkan fagositosis trombosit oleh makrofag.^{9,29} Seperti pada penelitian Chen dkk¹⁷ yang mendapatkan antibodi monoklonal anti-NS1 bereaksi silang dengan molekul PDI permukaan trombosit dan menghambat proses agregasi yang diinduksi oleh ADP. Bila antibodi monoklonal anti-NS1 ini preabsorpsi dengan PDI maka efek penghambatan agregasi tersebut dapat dicegah. Pada penelitian tersebut juga didapatkan antibodi monoklonal anti-PDI dapat mengikat peptida yang mengandung asam amino residu 311-330 NS1 dan berdasarkan hasil *alignment* asam amino tersebut memiliki homologi dengan sekuen PDI.

II.2. Proses Invasi, Translasi, dan Replikasi Virus Dengue

Pada umumnya VD masuk ke dalam sel target melalui proses endositosis yang dimediasi reseptor (*receptor mediated endocytosis/RME*) atau melalui mekanisme *Antibody-Dependent Enhancement* (ADE), yaitu adanya antibodi dari

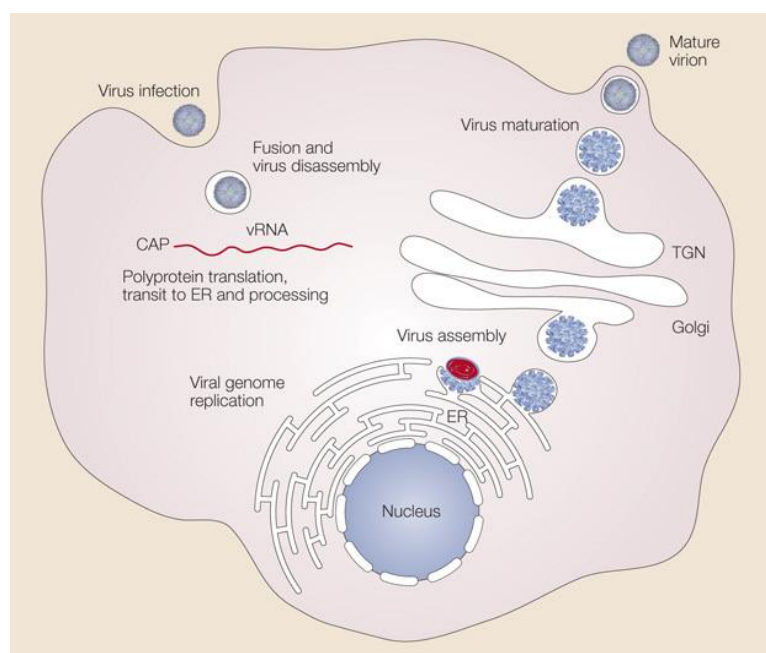
infeksi primer yang bersifat non-netralisasi yang mengopsonisasi virus dan membentuk kompleks imun sehingga membantu masuknya virus ke dalam sel yang mengekspresikan Fc reseptor pada permukaannya seperti monosit, limfosit B dan sel mast. Beberapa reseptor permukaan yang dapat membantu masuknya VD yaitu: *Dendritic Cell Specific ICAM Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN) pada permukaan sel dendritik, dua *Heat shock protein* (HSP90 dan HSP70), integrin $\alpha\beta3$, *Glucose Regulating Protein 78* (GRP78/BiP), CD 14 *assosiated protein*, *liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin* dan *Glycosaminoglycans* (GAG atau heparan sulfat).^{23,26,28} DC-SIGN merupakan reseptor permukaan yang dapat berinteraksi dengan semua strain VD melalui karbohidrat pada protein E.

Di dalam endosom, pH yang rendah menginduksi perubahan struktur molekul glikoprotein E virus sehingga terjadi fusi antara virus dengan membran sel.³⁰ Selanjutnya virion akan melepaskan nukleokapsidnya dan genom masuk ke dalam sitoplasma sel. Proses fusi membran ini dipengaruhi oleh komposisi lemak pada membran sel pejamu, seperti kolesterol, *oleic acid* dan *lyophosphatidylcholine*, yang juga mempengaruhi pH dalam endosom, tapi hal ini tidak absolut.^{26,31,32}

Dalam sel genom bebas VD mengalami proses translasi dan replikasi. Pada proses translasi terbentuk rantai tunggal poliprotein yang kemudian dipotong-potong oleh protease sel pejamu, yang memotong antara C-preM, preM-E, E-NS1 dan 2K-NS4B. Sedangkan protease serin yang dikode oleh virus memotong diantara NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4A-2K dan NS4B-NS5. Namun enzim yang memotong antara NS1-2A masih belum diketahui (gambar II.1.b).²⁴

Pada proses replikasi, genom RNA bergabung dengan kompleks replikasi dan membentuk *template RNA*. *Template RNA* kemudian digunakan untuk menghasilkan rantai positif RNA yang baru. Proses replikasi ini terjadi di permukaan membran retikulum endoplasma yang memberikan gambaran struktur vesikel kecil dengan membran yang halus. Vesikel-vesikel ini kemudian berakumulasi dan membentuk suatu bentuk baru yang terletak di regio perinuklear retikulum endoplasma. RNA yang baru terbentuk ini kemudian

melayang ke sitosol retikulum endoplasma dan diselubungi oleh protein C. Selanjutnya partikel virus ini dilapisi oleh kompleks protein E-preM. Partikel virus tersebut kemudian di transport melalui jalur sekretorik ke permukaan sel dan dilepaskan. Sesaat sebelum virion dilepaskan, protein preM dipotong oleh *furin-like protease* menjadi bentuk protein M yang matur yaitu protein M, sehingga protein E teraktivasi dan siap untuk menginfeksi sel lainnya (gambar II.2).²³



Gambar II.2. Siklus hidup virus Dengue di dalam sel pejamu²²

Virus masuk ke dalam sel melalui proses perlekatan pada beberapa reseptor permukaan sel yang kemudian diendositosis. pH asam dalam endosom mengakibatkan virus berfusi ke membran sel sehingga RNA virus terlepas dari protein struktural dan masuk ke sitoplasma sel target. Genom kemudian mengalami proses translasi dan replikasi. Selanjutnya melalui jalur sekretorik partikel virus yang baru dihantarkan melalui *network* Golgi untuk kemudian dilepaskan keluar sel melalui proses eksositosis.

II.3. Mekanisme Respon Imun pada Infeksi Dengue

Selain dipengaruhi virulensi virus, ringan atau beratnya manifestasi klinis yang timbul pada infeksi Dengue juga dipengaruhi oleh respon imun seluler dan humoral pejamu. Dari beberapa penelitian didapatkan bahwa respon imun yang berperan dalam mengeliminasi virus, karena beberapa keadaan dapat memperberat manifestasi penyakit. Respon imun pejamu ini dipengaruhi oleh

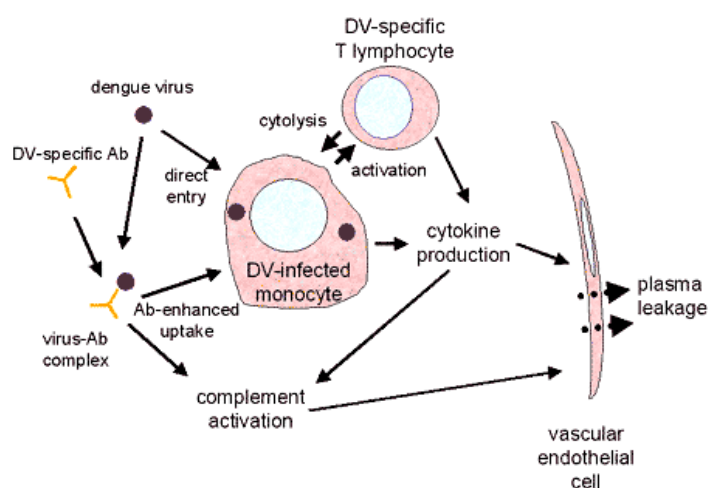
usia, ras, status gizi dan adanya penyakit kronik yang menyertai.⁵ Terinfeksi sel dendritik, makrofag/monosit oleh VD merangsang terbentuknya interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) dan interferon α/β ($\text{IFN}\alpha/\beta$) yang dapat menghambat infeksi pada sel monosit dan mengaktifasi makrofag untuk memproduksi *nitrit oxide* (NO) sehingga replikasi RNA VD terhambat.²⁶ Namun overproduksi NO dapat mengakibatkan teraktivasinya *caspase* apoptosis sehingga endotel mengalami apoptosis³³ dan mengakibatkan terjadinya kebocoran plasma. Selain IFN, sel monosit yang terinfeksi VD juga memproduksi $\text{TNF}\alpha$, IL-2, IL-6, IL-8, IL-1 β dan sitokin lainnya.^{8,32} Sitokin yang diproduksi ini juga dapat menginduksi pelepasan sitokin lain sehingga terjadi peningkatan kadar sitokin dan mediator kimiawi lainnya. Adanya sinergi antara $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ dan IL-1 dapat meningkatkan permeabilitas pembuluh darah yang lebih tinggi dibandingkan bila sitokin tersebut muncul secara sendiri.⁸ Adanya IL-6 dapat memicu maturasi sel plasma dan memproduksi autoantibodi.⁴

Lebih banyaknya ekspresi DC-SIGN pada sel dendritik immatur mengakibatkan lebih banyak VD yang melekat dan masuk ke dalam sel tersebut dibandingkan dengan sel dendritik matur yang memfasilitasi masuknya VD melalui Fc reseptor.⁶

Respon limfosit T memori setelah kontak dengan sel pemaian pada infeksi sekunder lebih cepat dari pada sel T naïf, sehingga memicu produksi sitokin pro-inflamasi yang juga dapat memicu pelepasan dan produksi sitokin lainnya.⁸ Rendahnya ambang aktivasi sel T memori menyebabkan terproduksinya klon, baik CD4^+ maupun CD8^+ (*cytolytic T lymphocytes/ CTL*) dengan afinitas rendah dan kurang efektif untuk netralisasi virus.^{34,35}

Terinfeksi salah satu dari 4 serotipe VD pada infeksi primer memberikan kekebalan jangka panjang terhadap serotipe tersebut (homolog). Meskipun dapat terjadi reaksi silang dengan serotipe VD yang berbeda (heterolog), antibodi yang terbentuk pada infeksi primer ini tidak memberikan efek netralisasi. Antibodi tersebut kemudian membentuk kompleks antibodi-virus yang secara langsung mengaktifasi mekanisme *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC) dan sistim komplemen. Aktivasi komplemen dapat meningkatkan permeabilitas pembuluh darah.⁹ Dikarenakan kurangnya spesifisitas dan konsentrasi antibodi

maka antibodi ini memberikan efek peningkatan masuknya dan replikasi virus ke dalam sel target melalui Fc reseptor. Mekanisme ini kemudian dikenal dengan mekanisme *Antibody Dependent Enhancement* (ADE). (gambar II.3.)^{9,28,36}

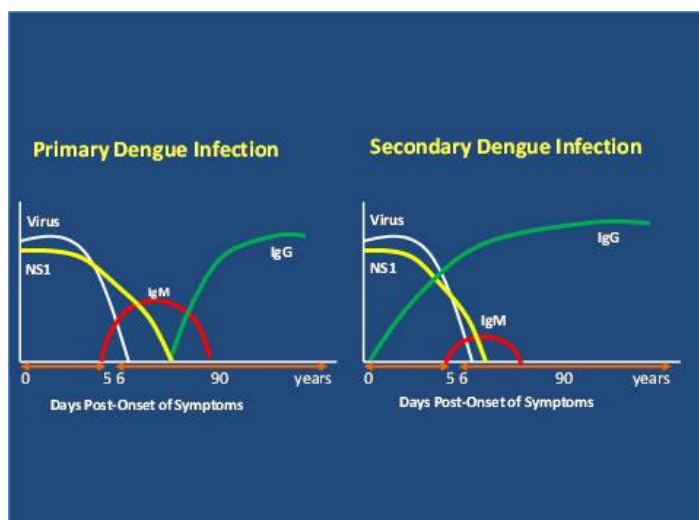


Gambar II.3. Mekanisme respon imun pada infeksi Dengue sekunder³⁷

Pada infeksi sekunder, antibodi *non neutralizing* mengenal virus Dengue dan membentuk kompleks imun. Kompleks imun ini dikenali oleh sel yang mengekspresikan Fc reseptor seperti monosit, untuk kemudian di endositosis. Interaksi ini meningkatkan masuknya virus ke dalam sel dan jumlah sel yang terinfeksi. Pada re-infeksi dengan virus Dengue serotipe yang berbeda, sel T memori akan teraktivasi dan mengekspresikan sitokin (seperti $TNF\alpha$, interferon γ) dalam waktu yang cepat. Akumulasi produksi sitokin oleh sel T memori dan kompleks imun yang terbentuk dapat mengaktifkan sistem komplemen dan memperberat kerusakan endotel dan kebocoran plasma.

Respon imun humoral yang terbentuk pada infeksi Dengue adalah IgM dan IgG anti Dengue. Adanya antibodi ini dapat digunakan sebagai salah satu penetapan diagnosis penunjang. Pada infeksi primer IgM terbentuk pada hari ke 3-5 demam, sedangkan IgG mulai muncul setelah 1 minggu timbulnya demam dengan kadar yang rendah. Pada infeksi sekunder IgG anti dengue terdeteksi pada masa akut, kemudian meningkat secara drastis pada 2 minggu setelah munculnya demam.³⁸ (gambar II.4).

Untuk diagnosis laboratorium, saat ini dideteksi antibodi spesifik Dengue, baik IgM maupun IgG dilakukan dengan menggunakan protein E sebagai antigen pendeteksi



Gambar II.4. Respon antibodi pada infeksi primer dan sekunder pada infeksi VD.³⁷ Pada infeksi primer IgM terdeteksi pada demam hari ke 3 sampai ke 6. Kemudian kadarnya meningkat dan bertahan sampai hari ke 90. Sedangkan IgG akan muncul mulai hari ke 14. Pada infeksi sekunder, IgG sudah dapat terdeteksi pada demam hari ke 2 dan bertahan lama, sedang IgM terbentuk pada hari ke 3 sampai ke 6 demam dalam kadar yang sangat rendah.

II.4. Trombosit

Trombosit adalah sel tidak berinti, dengan diameter 2-5 μm dan dilapisi oleh membran *lipid bilayer*. Produksi trombosit diawali dengan proses diferensiasi sel induk hematopoietik menjadi megakariosit. Dengan rangsangan dari trombopoetin dan dibantu oleh IL-3, IL-6 dan IL-11, megakariosit mengalami proses maturasi dan sitoplasmanya terpecah-pecah menjadi trombosit melalui sistim membran demarkasi.³⁹ Setiap megakariosit menghasilkan 2000-3000 fragmen diskoid yang kemudian masuk ke sirkulasi. Trombosit berusia 7–10 hari dan bila tidak terlibat dalam proses trombosis dan hemostasis, trombosit akan dihancurkan dalam sistim retikuloendotelial.

Di sirkulasi trombosit berada dalam keadaan yang tidak teraktivasi dan permukaannya halus. Apabila ada kerusakan endotel, perubahan aliran darah, atau rangsangan kimiawi (*agonist* trombosit) maka trombosit akan teraktivasi, kemudian berubah bentuk, dan membentuk pseudopodia sehingga dapat berinteraksi dengan sel darah atau trombosit lain. Selain itu trombosit juga melepaskan berbagai organel sekresi yang terdapat di sitoplasma seperti: granula

dense (*dense body*), granula alfa (*alpha granules*) dan lisosom yang dapat menimbulkan respon imun.^{40,41}

Dalam menjalankan fungsinya mencegah dan menghentikan perdarahan, trombosit memberikan respon berupa adhesi, sekresi, dan agregasi yang melibatkan reseptor permukaan trombosit, yaitu glikoprotein (GP) kompleks Ib-IX-V, kompleks GPIIb-IIIa (integrin α IIB β 3), dan GP VI. Selain itu masih banyak reseptor pada permukaan trombosit seperti *Toll Like Receptor* (TLR) yang merupakan transmembran reseptor tipe 1, reseptor trombin, reseptor ADP, reseptor *platelet activating factor* (PAFR), reseptor kemokin, DC-SIGN, CD40 Ligand, reseptor komplemen, antigen golongan darah, reseptor IgG Fc γ R dan lain-lain yang berperan pada reaksi inflamasi, antimikroba, pertumbuhan dan metastasis tumor, serta angiogenesis.⁴²

GP IIB/IIIa merupakan reseptor yang paling banyak terdapat pada permukaan trombosit (50.000-80.000 *copies*) karena peranannya berikatan dengan berbagai ligan.⁴³ GP IIB/IIIa (integrin α IIB β 3) terdiri dari subunit α IIB dan β 3. Pada kedua subunit ini terdapat banyak residu sistein yang penting bagi struktur dan perubahan konformasional integrin dari afinitas rendah menjadi tinggi.⁴⁴ Residu sistein pada integrin ini, mengandung sekuen CXGC yang merupakan karakteristik dari sisi aktif protein disulfida isomerasi (PDI).⁴² Telah diketahui dari penelitian terdahulu bahwa regio integrin yang banyak mengandung sistein ini merupakan epitop target reaksi autoimun anti-trombosit.^{45,46}

II.5. Trombositopenia pada infeksi Dengue

Trombositopenia merupakan karakteristik infeksi dengue dan keparahannya mempengaruhi gejala yang timbul. Hingga saat ini mekanisme trombositopenia masih belum jelas. Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan adanya keterlibatan faktor aktivasi trombosit, faktor prokoagulasi, faktor antikoagulasi dan aktivasi komplemen, faktor endotel serta faktor sitokin dalam mekanisme terjadinya trombositopenia.

Ada beberapa mekanisme trombositopenia yang mungkin terjadi pada infeksi Dengue. Pertama, infeksi VD pada sel progenitor dan stroma sumsum

tulang mengakibatkan penurunan produksi trombosit, karena apoptosis dan eliminasi sel progenitor,^{47,48} serta sitokin yang bersifat *hematodepressive* oleh stroma sumsum tulang yang terinfeksi (TNF α , IL-2, IL-8, INF- α , dan IFN- γ).⁴⁹ Kedua, adanya aktivasi trombosit karena interaksi langsung VD terhadap trombosit,⁵⁰ sehingga terjadi peningkatan pemakaian trombosit atau perlekatan trombosit ke sel endotel, leukosit, dan monosit.¹¹ Pemakaian trombosit secara berlebihan ini juga terjadi karena terinfeksi endotel oleh VD yang mengakibatkan terekspresinya *E-selectin*, *agonist* trombosit serta berbagai sitokin.^{51,52} Ketiga, terbentuknya antibodi terhadap permukaan trombosit (*platelet association* IgM/PAIgM atau terbentuknya auto-antibodi anti-trombosit)^{15,28} serta antibodi spesifik terhadap VD yang dapat bereaksi silang dengan molekul permukaan trombosit dan mengopsonisasi trombosit sehingga terjadi peningkatan bersihan trombosit oleh makrofag.^{9,12,14} Selain itu terbentuknya kompleks imun antibodi-antigen trombosit menyebabkan teraktivasi sistem komplemen sehingga terjadi lisis trombosit.

Pada penelitian yang dilakukan Sun dkk¹⁶ baik secara *in vivo* maupun *in vitro*, didapatkan anti-NS1 VD dapat mengopsonisasi trombosit dan meningkatkan perlekatan trombosit dengan makrofag. Selain itu penyuntikan anti-NS1 Ig pada mencit dapat meningkatkan deposit fibrin dalam paru dan kadar D-dimer plasma, serta menurunkan faktor antikoagulan seperti protein C, protein S, dan antithrombin III. Keadaan tersebut menunjukkan terjadinya *disseminated intravascular coagulopathy* (DIC).

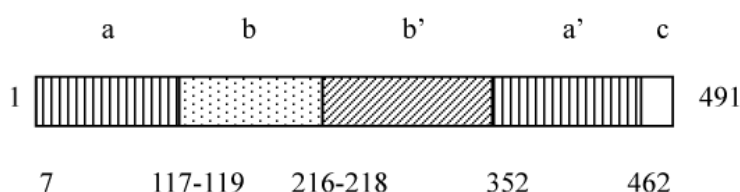
Dari berbagai hasil penelitian diatas, dapat disimpulkan adanya keterlibatan respon imun pejamu yang kompleks terhadap terjadinya trombositopenia pada infeksi Dengue.

II.6. Protein Disulfida Isomerase

Protein Disulfide Isomerase (PDI) merupakan enzim yang banyak terdapat pada retikulum endoplasma sel hepatosit, pankreas, endotel, dan membran trombosit.^{53,54} Enzim ini berfungsi mengkatalisa formasi ikatan disulfida diantara residu sistein protein *nascent* dengan melakukan tiga reaksi yaitu: reduksi, oksidasi, dan isomerasi.⁵⁵ Selain itu PDI juga memiliki

kemampuan lain seperti aktivitas proteolitik atau kemampuan mengikat kalsium, ATP, dan ligan kecil lainnya, namun relevansinya dalam peranan biologis masih belum jelas.⁵⁶

PDI memiliki struktur multidomain yang mengandung sekuen *thioredoxin-like active site* yang disebut domain katalisis. Domain ini memiliki motif CXXC, yaitu 2 sistein yang dipisahkan oleh 2 asam amino (gambar II.5).¹⁶ Diantara domain katalisis terdapat 2 domain non katalisis yang berperan sebagai pengikat peptida yang kecil.



Gambar II.5: Struktur PDI. Domain a dan a' adalah domain catalisis, domain b dan b' adalah domain non-katalisis. Diantaranya terdapat suatu *acidic carboxyl* pendek yang berperan dalam stabilitas PDI.⁵⁷

Telah ditemukan 13 anggota keluarga PDI pada manusia (*human PDI family*) dan PDI trombosit adalah salah satu PDI yang saat ini sering dipelajari. PDI trombosit disekresikan pada permukaan membran trombosit dan melekat melalui interaksi elektrostatik. PDI ini berfungsi untuk mengaktivasi integrin pada proses agregasi, adhesi, dan pengikatan fibrinogen dengan melakukan perubahan thioldisulfida intermolekuler dan intramolekuler.^{55,58,59} PDI diekspresikan pada permukaan trombosit baik pada saat trombosit teraktivasi dengan 81% sisi aktifnya berupa dithiol, maupun saat trombosit tidak teraktivasi (*resting platelet*) dengan 26% sisi aktifnya berupa dithiol.⁶⁰

Pada trombosit PDI berperan dalam mengaktivasi integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ yang berperan pada proses agregasi, integrin $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ yang berperan pada proses adhesi, dan glikoprotein $\text{1b-}\alpha$ sebagai reseptor adhesi.^{53,54,58,61} Pada proses aktivasi PDI terjadi modifikasi redoks atau perubahan konformasi intramolekuler integrin atau glikoprotein karena adanya stimulasi oleh ADP, kolagen, thrombin, dan epinephrine.^{58,61,62} Modifikasi redoks ini mengubah domain ekstraseluler integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ yang dikarakteristik dengan pembelahan dua ikatan disulfida dithiothreitol

dalam domain $\alpha\text{IIb}\beta 3$ yang kaya sistein (gambar II.6). Dengan demikian terjadilah interaksi antara lingkungan luar sel dengan sitoplasma.⁶³ Proses ini dipengaruhi oleh homeostasis lingkungan seperti perubahan pH, kalsium, dan sebagainya.^{55,61} Selain mengaktivasi integrin, PDI juga berperan dalam menghantarkan derivat NO ke dalam sel⁶⁴ dan mereduksi aktivasi *tissue factor* trombosit^{65,66}

II.7. Autoimun dan *molecular mimicry* pada infeksi Dengue

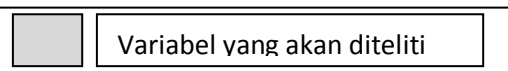
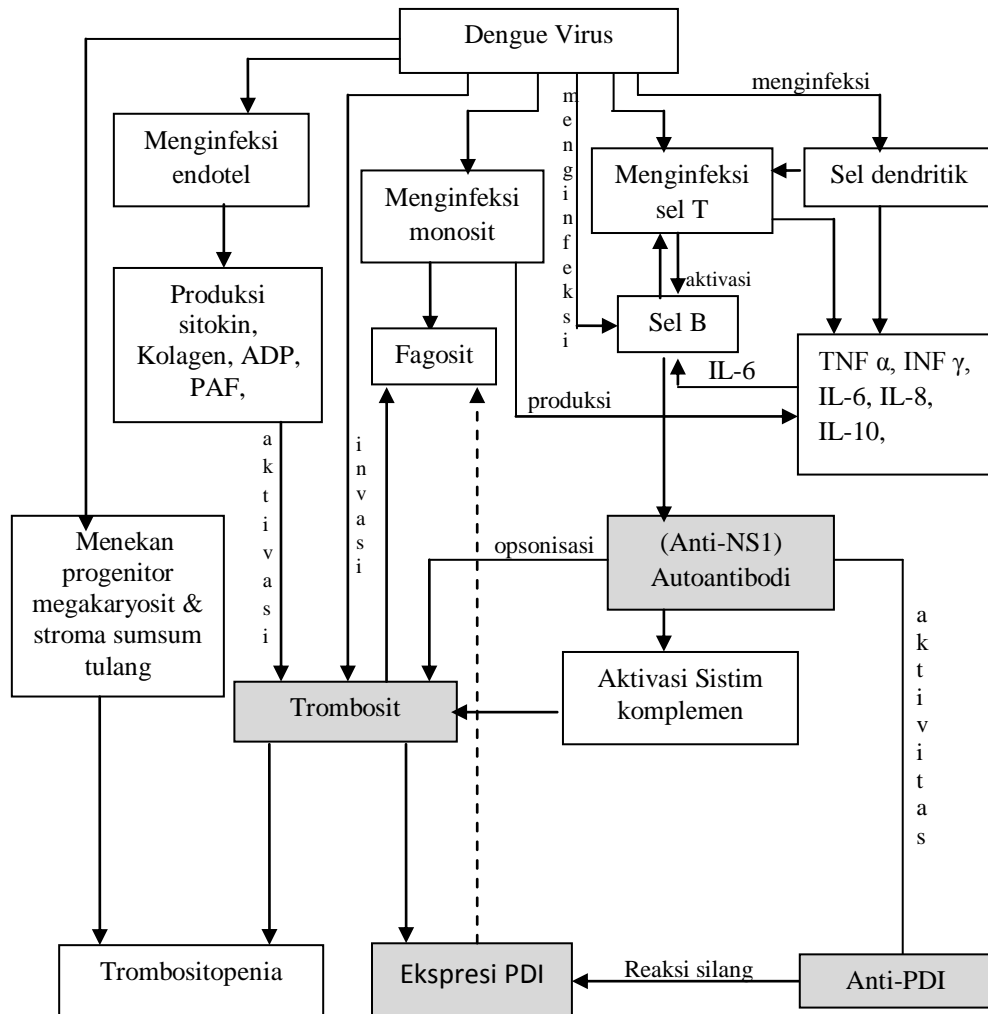
Autoimun terjadi karena hilangnya kemampuan toleransi sel T terhadap *self antigen*. Ada 2 mekanisme terjadinya reaksi autoimun, yaitu diproduksinya ko-stimulator dan sitokin yang tidak normal karena terinfeksi APC (*antigen presenting cell*) oleh virus tertentu dan atau terjadinya reaksi silang antara antibodi spesifik virus dengan *self antigen* karena adanya *molecular mimicry*.

Adanya sekuen homolog antara antigen *core*, preM, *envelope*, dan NS1 VD dengan protein trombosit, sel endotel, dan faktor koagulasi mengakibatkan terjadinya reaksi silang antara anti-*core*, anti-preM, anti-E, dan anti-NS1 dengan protein yang terdapat pada trombosit, sel endotel, dan faktor koagulasi.⁹ Reaksi silang ini mengakibatkan terjadi peningkatan bersihan trombosit oleh makrofag, gangguan koagulasi, dan kebocoran plasma. Teraktivasinya sel T memori pada infeksi sekunder oleh serotipe virus yang berbeda mengakibatkan terproduksinya sitokin secara berlebih sehingga terjadi kebocoran plasma dan teraktivasinya trombosit.⁹

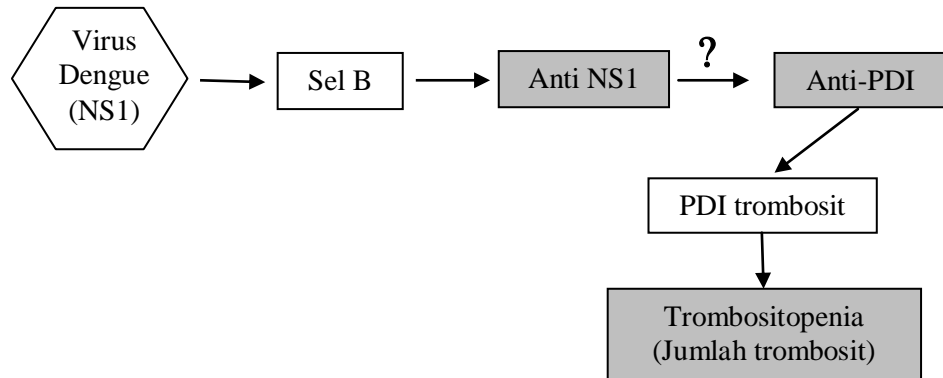
Dari hasil sekuensing yang dikerjakan oleh NCBI dan Swiss-Prot database diketahui bahwa anti-NS1 mengenali beberapa autoantigen, seperti: rantai *beta H⁺-transporter/ATP synthase*, Protein Disulfida Isomerase (PDI), Vimentin, dan *Heat Shock Protein 60*. Penelitian Chen dkk²⁹ mendapatkan bahwa kemampuan pengikatan antibodi monoklonal anti- ΔC NS1 VD (antibodi monoklonal anti-NS1 VD rekombinan yang dibuat tanpa residu terminal C) terhadap trombosit lebih lemah dari pada antibodi anti-*full length* NS1 VD. Ini menunjukkan bahwa adanya kemiripan antara asam amino residu terminal C dengan protein yang terdapat pada permukaan trombosit. Selain itu didapatkan pula antibodi monoklonal anti-NS1 VD bereaksi silang dengan PDI permukaan


trombosit, sehingga menurunkan agregasi trombosit dengan menghambat aktivasi integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$. Cheng dkk¹⁷ menduga reaksi silang anti-NS1 ini terdapat pada asam amino residu 311-330 regio terminal C NS-1 VD. Adanya pengenalan PDI oleh anti-P311-330 dan pre-absorpsi serum pasien dengan NS1 VD, PDI, dan P311-330 menurunkan aktivitas pengikatan anti-NS1 terhadap trombosit. Namun bagaimana mekanisme trombositopenia akibat adanya aktivitas anti-NS1 terhadap PDI permukaan trombosit dan mekanisme penghambatan integrin oleh anti-NS1 ini masih belum jelas dan masih memerlukan penelitian lanjut.

II.6. Kerangka Teori



Gambar II.7. Kerangka konsep



 Variabel yang diteliti

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

III.1. Desain penelitian

Desain penelitian ini menggunakan desain potong lintang analitik observasional. Pada penelitian ini akan dilihat korelasi antara titer anti-NS1 dan titer anti-PDI permukaan trombosit serta derajat trombositopenia penderita demam Dengue akut.

III.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi molekuler Divisi Hematologi dan Onkologi Departemen Ilmu Penyakit Dalam Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM) dan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman. Penelitian dilaksanakan sejak Februari 2011 hingga Oktober 2012.

III.3. Bahan penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari subjek yang memenuhi kriteria inklusi.

Kriteria inklusi:

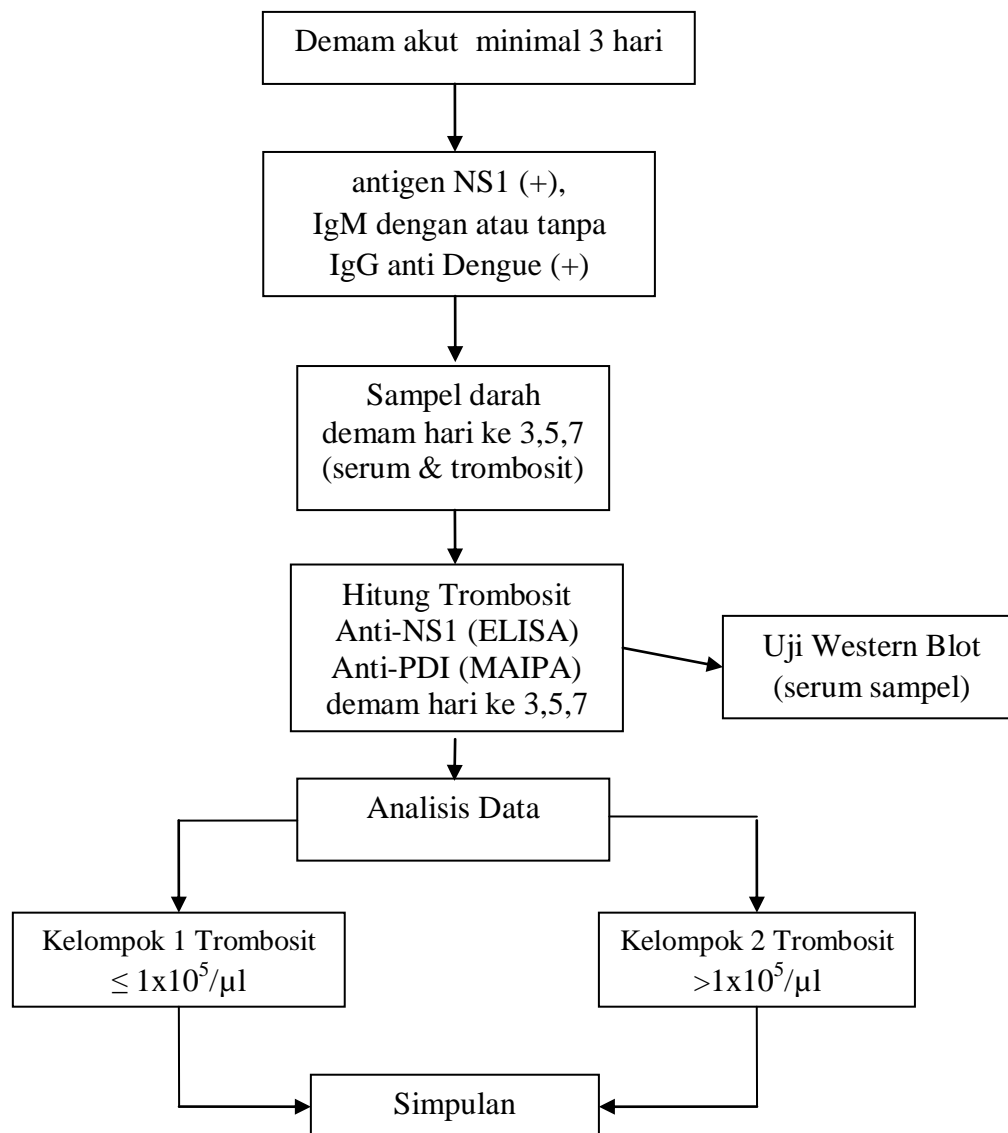
1. Pasien dengan riwayat demam tinggi mendadak sekurang-kurangnya tiga hari dan memenuhi kriteria WHO 1997 untuk diagnosis demam berdarah Dengue.
2. Uji antigen NS1 positif (*Rapid Immunochromatography test*).
3. Uji IgM anti Dengue positif dengan atau tanpa IgG anti dengue positif (*Rapid Immunochromatography test*)
4. Setuju untuk berpartisipasi dalam penelitian ini dengan menandatangani lembar persetujuan.

Kriteria eksklusi:

1. Menderita penyakit infeksi lain yang bersamaan dengan demam berdarah (*mix infection*).
2. Terdapat kelainan yang dapat mengaktivasi koagulasi: sepsis, trauma, kerusakan organ, keganasan, kelainan obstetri, kegagalan hati berat, toksik berat atau reaksi imunologi.
3. Mendapat terapi steroid

III.4. Alur penelitian

Alur penelitian ditampilkan pada gambar III.1.



Gambar III.1. Alur Penelitian

Pengumpulan subjek penelitian:

Subjek penelitian merupakan pasien demam Dengue akut. Anamnesis, pemeriksaan fisik dan laboratorium (hemoglobin, hematokrit, leukosit, trombosit, SGOT, dan SGPT) dilakukan oleh dokter yang merawat saat hari pertama dirawat. Pasien yang masuk kriteria inklusi, diambil darahnya secara serial pada

demam hari ke-3, hari ke-5, dan hari ke-7, untuk dihitung jumlah trombositnya kemudian dipisahkan serum dan trombositnya. Pada serum sampel dilakukan pemeriksaan OD anti NS1 dan pada trombosit sampel dilakukan pemeriksaan OD anti-PDI yang telah berikatan pada PDI permukaan trombosit. Karakteristik pasien dicatat seperti: jenis kelamin, usia, dan adanya manifestasi perdarahan. Western Blot dilakukan untuk melihat kemungkinan adanya reaksi silang antara anti NS-1 yang terdapat pada serum sampel dengan PDI permukaan trombosit.

III.5. Perkiraan besar sampel

Untuk menghitung korelasi antara anti NS1 antibodi dengan anti-PDI yang telah berikatan pada permukaan trombosit dan kejadian trombositopenia, perkiraan sampel yang diperlukan dihitung dengan menggunakan rumus untuk korelasi.

$$n = \left(\frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})}{0,5 \text{Ln} \left(\frac{1+r}{1-r} \right)} \right)^2 + 3 = 32$$

Keterangan:

n = besar sampel

$Z_{\alpha} = 1,960$

$Z_{\beta} = 0,842$; power sebesar 80%

r = koefisien korelasi = 0,5 (asumsi)

Oleh karena belum adanya data nilai koefisien korelasi dari penelitian sebelumnya maka diambil nilai 0,5 karena diharapkan terdapat hubungan yang cukup kuat antara antibodi NS1 dengan anti-PDI permukaan trombosit dan trombositopenia. Dari hasil perhitungan tersebut ditambah dengan *drop out* sebesar 10% didapatkan besar sampel 32 subjek untuk masing-masing kelompok (kelompok 1 dengan jumlah trombosit $\leq 1 \times 10^5 / \mu\text{L}$ dan kelompok 2 dengan jumlah trombosit $> 1 \times 10^5 / \mu\text{L}$).

III.6. Populasi dan sampel

Populasi target penelitian ini adalah semua pasien yang mengalami demam Dengue akut yang dirawat di RS Kramat 128 dalam kurun waktu penelitian. Sampling dilakukan secara *consecutive*, yaitu semua pasien yang masuk dalam kriteria inklusi diikutsertakan sebagai subyek.

III.7. Penghitungan Trombosit

Jumlah trombosit pasien didapatkan dari data hasil laboratorium tempat pasien dirawat. Perhitungan trombosit dilakukan dengan menggunakan *hematology analyzer ABX Micros 60*.

III.8. ELISA Anti-NS1

Pemeriksaan anti NS1 dilakukan untuk mengetahui kadar anti NS1 pada serum sampel dengan menggunakan teknik *Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) Indirect* yang dimodifikasi oleh Shu dkk,⁶⁷ dan Alcon dkk.⁶⁸ ELISA merupakan metode yang digunakan untuk observasi antibodi atau antigen (*analyte*) dengan melekatkan pada permukaan phase padat berdasarkan spesifisitas pengikatan yang tinggi. Sebelum pengujian sampel prosedur ELISA dioptimasi terlebih dahulu, meliputi: penggunaan *bovine serum albumin (BSA)* 1% atau 2% dalam dapar *blocking* dikarenakan terjadi reaksi silang dengan protein serum sehingga menimbulkan *background* yang tinggi, maka BSA diganti dengan *Non Fat Dry Milk (NFDM)* konsentrasi 5% yang kemudian ditambah Tween 20 0,1%. Optimasi pengenceran sampel serum mulai 1:50, 1:100, 1:200, dan 1:400. Pengenceran serum yang digunakan adalah 1:50 karena dapat memberikan perbedaan antara OD sampel negatif dan positif. Optimasi pengenceran *Peroxidase-conjugated Goat anti human IgG Fcγ fragment specific* (Abcam dan Jackson Immuno Research) mulai dari 1:5000, 1:10.000, 1:15.000, 1:30.000. Setelah optimasi, pada penelitian ini digunakan *Peroxidase-conjugated Goat anti human IgG Fcγ fragment specific* dari Jackson Immuno Research dengan pengenceran 1:15.000. Mikroplat yang awalnya dari IWAKI, karena memberikan latar warna yang selalu tinggi maka diganti dengan mikroplat

NUNC seperti direkomendasikan oleh CDC dan yang digunakan pada penelitian Alcon dkk.⁶⁸ Berdasarkan saran (*personal communication*) Khin Saw Aye Myint, MD (konsultan virology, Institut Eijkman) substrat 1,2 Phenylenediamine dihydrochlorida (OPD, Dako) yang kurang stabil diganti dengan 3,3',5,5' Tetramethyl benzidine (TMB) yang lebih stabil. Proses pencucian secara manual dengan menggunakan *multichannel* pipet diganti dengan menggunakan *washer Hydroflex-Tecan* agar diperoleh hasil yang lebih seragam. Suhu inkubasi serum yang telah diencerkan, yang semula 1 jam pada 37⁰C, setelah optimasi menjadi semalam pada 4⁰C yang terbukti memberikan hasil yang lebih baik karena ikatan kompleks antigen-antibodi spesifik menjadi lebih stabil. Inkubasi proses *blocking* yang semula 1 jam menjadi 2 jam pada 37⁰C.

Serum yang digunakan pada penelitian ini merupakan serum yang dikumpulkan dalam kurun waktu pelaksanaan penelitian. Untuk mengurangi bias antar pemeriksaan, pengujian dilakukan terhadap serum demam hari ke3, ke5, dan ke7 secara bersamaan. Selain itu pada setiap kali pengujian digunakan kontrol negatif dan positif yang sama. Karena tidak tersedia standar anti-NS1 maka hasil dilaporkan dalam bentuk OD (*optical density*) dan OD sampel disubstraksi dahulu dengan OD blanko.

Antibodi dan antigen yang digunakan untuk ELISA phase pada pada penelitian ini adalah: (1) Glikoprotein rekombinan NS1 virus Dengue (ab4456, Abcam, UK), (2) *Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated Goat anti Human IgG Fc* dari Jackson Immuno Research Lab (West Grove, PA, USA).

Cara kerja ELISA fase padat untuk pemeriksaan anti-NS1

Limapuluh (50) μ L *Recombinant full length Dengue Virus NS1 glycoprotein* (5 μ g/mL; ab64456, Abcam, UK) yang telah diencerkan dengan dapar pelapis (0,1M Na₂CO₃/NaHCO₃ (Merck), pH9,5) dimasukkan ke dalam tiap sumur mikroplat (NUNC, Denmark). Mikroplat ditutup dengan *seal* dan diinkubasi pada suhu 4⁰C semalam. Keesokan hari dapar pelapis dibuang dan mikroplat dicuci dengan 300 μ L larutan PBS-Tween20 1% (PBST 1%) sebanyak 5 kali dengan menggunakan *washer (Hydroflex-Tecan)*. Semua sumur mikroplat diisi dengan 250 μ L dapar *blocking* (PBS-Skim 5%-Tween 20 0,1%). Setelah itu

mikroplat ditutup dengan *seal* dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 2 jam. Mikroplat dicuci dengan 300 µL larutan PBST 1% sebanyak 5 kali. Kontrol negatif, kontrol positif dan serum pasien (serum demam hari ke3, ke5, dan ke7) yang akan diperiksa diencerkan dengan dapar *blocking* 1:50, kemudian dimasukkan masing-masing 100 µL (*duplo*) ke dalam sumur mikroplat. Mikroplat ditutup dengan *seal* dan diinkubasi 4⁰C semalam (\pm 16 jam). Mikroplat dicuci dengan 300 µL PBST 1% 5 kali. Dimasukkan 100 µL *Peroxidase-conjugated Goat anti human IgG,Fc γ fragment spesific* (Jackson Immuno Research) yang telah diencerkan dengan dapar *blocking* 1:15.000 ke dalam tiap sumur mikroplat lalu ditutup dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 1 jam. Tahap berikutnya, mikroplat dicuci kembali dengan 300 µL PBST 5 kali. Terakhir dimasukkan 100 µL larutan pewarna/substrat *Tetramethyl benzidine* (TMB) (Invitrogen) ke dalam tiap sumur. Mikroplat ditutup dan diinkubasi pada suhu ruang di tempat yang gelap selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan H₂SO₄ 1N sebanyak 100 µL pada semua sumur mikroplat. Intensitas warna yang muncul diukur menggunakan alat pembaca ELISA *Infinite f200* (Tecan, Austria) pada panjang gelombang 450 nm. Hasil dilaporkan dalam bentuk OD, dan untuk mengurangi bias antar pemeriksaan maka pemeriksaan terhadap trombosit demam hari ke 3, 5. Dan 7 dilakukan secara bersamaan dengan menggunakan kontrol negatif yang sama setiap kali pengujian. Selain itu OD anti-PDI disubstraksi dengan OD blanko terlebih dahulu.

III.9. Deteksi anti-PDI trombosit dengan MAIPA Direk.

Pemeriksaan anti-PDI pada permukaan trombosit sampel dilakukan dengan menggunakan teknik *Monoclonal Antibody Specific Immobilization of Platelet Antigens* (MAIPA) yang digunakan oleh Berry J.E dkk⁶⁹ dengan sedikit modifikasi. Teknik MAIPA semula digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi spesifik pada serum sampel terhadap molekul protein permukaan trombosit donor (MAIPA indirek), kemudian diubah untuk mendeteksi antibodi yang telah terikat pada protein (PDI) permukaan trombosit (MAIPA direk). Pada prosedur MAIPA direk ini trombosit yang digunakan adalah trombosit sampel yang telah didiagnosis infeksi akut Dengue. Tahapan pemaparan trombosit dengan serum

sampel pada MAIPA indirek tidak dilaksanakan, tapi trombosit sampel langsung dipaparkan dengan monoklonal antibodi anti-PDI. Pemeriksaan anti-PDI pada permukaan trombosit dilakukan dengan melekatkan antibodi monoklonal anti-PDI ke protein target di permukaan trombosit kemudian trombosit dilisis dan supernatan dipindahkan ke dalam mikrolat yang telah dilapis dengan antibodi anti *mouse*. Selanjutnya anti-PDI pasien pada PDI permukaan trombosit dideteksi dengan *Goat Anti-Human IgG* berlabel Peroksidase.

Antibodi yang digunakan untuk MAIPA direk pada penelitian ini adalah:

- (1) *AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG* (Jackson Immuno Research),
- (2) *Peroxidase-conjugated Goat anti human IgG,Fcγ fragment spesifik* (Jackson ImmunoResearch), dan
- (3) *Mouse Monoclonal (RL90) to PDI-ER Marker* (Abcam).

III.9.1. Isolasi trombosit

Dua (2) tabung 3 cc EDTA sampel darah yang dikumpulkan pada hari ke 3, hari ke 5, dan hari ke 7 demam, disentrifugasi (Universal 32R, Hettich Zentrifugen) dengan kecepatan 350 g (1600 RPM) selama 10 menit pada suhu 10⁰C. Kemudian supernatan (*platelet rich plasma* atau PRP) dimasukkan ke dalam tabung 10 cc yang baru. Trombosit dicuci dengan menambahkan larutan EDTA/PBS pada tabung yang berisi PRP hingga volume mencapai 10 cc dan tabung disentrifugasi dengan kecepatan 1300 g selama 5 menit. Supernatan dibuang dan disisakan ± 2 cc untuk resuspensi *pellet*. Pencucian trombosit dilakukan sebanyak 2 kali. Terakhir setelah *pellet* diresuspensi, jumlah trombosit dihitung dengan menggunakan alat *hematology analyzer ABX Micros 60* dan disesuaikan hingga jumlah trombosit mencapai 1 x 10⁵/uL. Trombosit disimpan pada suhu 4⁰C.

III.9.2. Cara kerja MAIPA direk

Sumur mikrolat *flat bottom* (NUNC, Denmark) dilapisi dengan 100 µl *AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG* (Jackson Immuno Research) yang telah diencerkan dengan dapar pelapis (Na₂CO₃ 15 mmol/L, NaHCO₃ 35mmol/L, pH 9,6) konsentrasi 3 µg/mL. Mikrolat kemudian ditutup dan diinkubasi pada suhu

4⁰C semalam. Mikroplat dicuci dengan 150 μ L (Tris 10mmol/L, NaCl 146 mmol/L, Triton X-100 0,5%, Tween 20 0,05%, CaCl₂ 0,5 mmol/L, BSA 0,2%) . Mikroplat kemudian di blok dengan 150 μ L dapar pencuci Tween dan diinkubasi pada suhu 4⁰C selama 30 menit. Cairan *blocking* dibuang saat mikroplat akan digunakan.

Seratus (100) mikroliter suspensi trombosit sampel dan kontrol dimasukkan ke dalam tiap sumur mikroplat *round bottom* (NUNC, Denmark), lalu mikroplat disentrifugasi, dengan kecepatan 1006 g selama 3 menit. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan *vortex*. Pada tiap sumur trombosit ditambahkan 40 μ L mAb PDI yang telah diencerkan dengan dapar TBS/BSA (Tris 10 mmol/L, NaCl 146 mmol/L, BSA 0,2%) konsentrasi 5 μ g/mL. Agar larutan homogen, mikroplat di *vortex*, lalu ditutup dan diinkubasi dalam penangas pada suhu 37⁰C selama 30 menit. Mikroplat dicuci dengan 200 μ L TBS/BSA sebanyak 3 kali. Tiap sumur dimasukkan 130 μ L dapar pelisis (Tris 1 mmol/L, NaCl 13,8 mmol/L, Triton X-100 0,5%, pH 7,4). Mikroplat ditutup dan diinkubasi pada suhu 4⁰C selama 30 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1006 g selama 15 menit. Sebanyak 100 μ L cairan supernatan dipindahkan dari mikroplat *round bottom* ke mikroplat *flat bottom* yang telah dilapisi dengan *Affinipure Goat Anti Mouse IgG*. Mikroplat ditutup dan diinkubasi pada suhu 4⁰C selama 90 menit, kemudian dicuci dengan 150 μ L dapar pencuci tween sebanyak 6X. Seratus (100) μ L *Peroxidase-conjugated Goat anti human IgG, Fcy fragment spesifik* (Jackson Immuno Research, USA) yang telah diencerkan dengan dapar pencuci tween 1:6000 dimasukkan ke dalam tiap sumur dan diinkubasi pada suhu 4⁰C selama 90 menit. Mikroplat dicuci dengan 150 μ L dapar pencuci tween sebanyak 6X. Seratus (100) μ L larutan substrat (1,2 *Phenylenediamine dihydrochlorida* yang mengandung 3% H₂O₂, Dako, UK) dimasukkan ke dalam tiap sumur dan mikroplat diinkubasi pada suhu ruang ditempat gelap selama 20 menit. Untuk menghentikan reaksi, dimasukkan 100 μ L H₂SO₄ 1N pada tiap sumur dan intensitas warna yang muncul diukur dengan alat pembaca *ELISA Infinite f200* (Tecan, Austria) pada panjang gelombang 492 nm.

III.10. *Western Blot*

Untuk mendeteksi kemungkinan adanya reaksi pengenalan antibodi, dalam hal ini anti-NS1, dalam serum sampel terhadap PDI trombosit, maka dilakukan teknik *Western Blot*. Pada metode ini ekstrak protein trombosit di dianalisis menggunakan SDS PAGE, kemudian ditransfer ke membran PVDF. Setelah itu protein pada membran dipaparkan dengan serum sampel.

III.10.1. Cara kerja SDS PAGE

Protein trombosit yang akan di analisis tersebut berasal dari trombosit dengan golongan darah O dan dipersiapkan dengan prosedur yang sama untuk MAIPA dengan jumlah konsentrasi trombosit disesuaikan menjadi kira-kira $500 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Perangkat cetak gel SDS PAGE disiapkan. Larutan *separating gel* 8% terdiri dari 2,7mL acrilamide *mix* 30%, 2,5 mL Tris 1,5 M, pH 8,8, 0,1 mL SDS 10%, 0,1 mL Ammonium persulfate, 4,6 mL ddH₂O dan terakhir tambahkan 0,006 mL TEMED, kemudian dimasukkan ke dalam cetakan gel hingga mencapai $\pm 1,5$ cm dari tepi atas. Agar permukaan gel rata maka ditambahkan isopropanol di atasnya. Gel dibiarkan selama 30 menit agar terjadi polimerisasi. Larutan isopropanolol dibuang dan dilanjutkan dengan memasukkan campuran *stacking gel* 5% (0,67 mL acrylamide *mix* 30%, 0,5 mL Tris 1,0 M pH 6,8, 0,04 mL SDS 10%, 0,04 ammonium sulfate 10%, 2,7 mL ddH₂O, 0,004 mL TEMED (N,N,N',N', tetramethyl ethylenediamine)) ke dalam cetakkan gel. Sisir untuk mencetak sumur dimasukkan pada bagian atas gel dan gel dibiarkan hingga memadat selama 30 menit. Gel yang telah memadat kemudian dimasukkan ke dalam *tank* dan *tank* diisi dengan *running buffer*.

Trombosit yang telah disiapkan dicampur dengan *Reducing sampel buffer* (RSB) dengan ratio 1:1 dan dipanaskan dalam air mendidih selama 3 menit. Lima (5) μL ekstrak trombosit kemudian dimasukkan ke dalam tiap sumur gel SDS PAGE. Untuk proses *running* trombosit dalam SDS PAGE ada 2 tahapan, yaitu *running* trombosit dalam *stacking gel* dengan arus listrik sebesar 60 volt selama 20 menit, kemudian dilanjutkan dengan *running* trombosit dalam *separating gel* dengan arus sebesar 100 volt selama 80 menit.

III.10.2. Cara kerja *Immunoblotting*.

Sebelumnya dipersiapkan dahulu 4 lembar kertas whatman, 1 lembar PVDF dan perangkat untuk *transfer* protein ke membran. Membran PVDF diaktivasi terlebih dahulu dengan cara dibasahi dengan methanol selama 10 detik. Kertas whatman dan membran PVDF kemudian direndam dalam *transfer buffer* (14,53 g Tris, 7,32 g glycine, dan ddH₂O hingga volume mencapai 500 mL) yang telah diencerkan dengan methanol dan ddH₂O (150 mL *transfer buffer* 5x, 150 mL methanol, dan 450 mL ddH₂O). Perangkat transfer disusun dengan urutan: spons – 2 lembar kertas whatman – gel SDS PAGE – membran PVDF - 2 lembar kertas whatman – spons. Plat *transfer* lalu ditutup dan dikunci kemudian dimasukkan ke dalam tempat *transfer* protein yang kemudian diisi dengan *transfer buffer*. Agar buffer dalam tempat *transfer* tidak menjadi terlalu panas maka tempat *transfer* protein harus dikelilingi dengan es. Arus dipasang pada 100 volt selama 1,5 jam. Membran PVDF kemudian dipotong menjadi beberapa bagian sesuai dengan alur proteinnya. Membran kemudian diblok dengan *blocking buffer* (PBS-Skim 5% tween 20 1%) selama 1 jam. Membran yang mengandung protein marker dan trombosit direndam dalam *Amido black* sebagai kontrol. Proses *blocking* diikuti dengan pencucian membran dengan PBST 1% selama 5 menit sebanyak 3 kali. Satu (1) bagian potong membran (bagian 1) kemudian diinkubasi dalam monoklonal antibodi anti-PDI yang telah diencerkan dengan *blocking buffer* (1:500), sebagai kontrol satu bagian potong membran (bagian 2) diinkubasi dalam monoklonal antibodi anti-NS1 yang telah diencerkan dengan *blocking buffer* (1:50), sedangkan potongan membran yang lainnya (bagian 3, 4, 5, 6, 7) diinkubasi dalam serum demam hari ke5 sampel pasien dengue dan serum kontrol negatif yang telah diencerkan dengan *blocking buffer* (1:200) selama 3 jam di atas *shaker*. Semua membran kemudian dicuci dengan PBST 1% selama 5 menit sebanyak 3 kali. Membran yang diinkubasi dengan mAb-PDI dan mAb-antiNS1 kemudian diinkubasi dengan *Goat anti Mouse* berlabel peroksidase yang telah diencerkan dengan PBS-Skim 5% tween 20 1% (1:6000) dan membran yang diinkubasi dengan serum sampel kemudian diinkubasi dengan *peroksidase conjugated goat anti human* (Jackson Immune

Research, USA) yang telah diencerkan dengan PBS-Skim 5% tween 20 1% (1:6.000) dan diinkubasi selama 60 menit. Membran PVDF kemudian dicuci dengan PBST 1% selama 5 menit sebanyak 3x, kemudian disusun di dalam *hypercassete* dan dibawa ke kamar gelap. Membran diberi larutan ECL (1 mL luminal, 10 μ L β commeric acid) dan dipaparkan dengan lembar *film x-ray* selama 10 detik, 30 detik, 5 menit dan 10 menit. Setelah itu *film* dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam larutan *developer* selama 3 menit, kemudian cuci di air mengalir, lalu dimasukkan ke larutan *fixer* selama 3 menit, dan terakhir dicuci lagi di air mengalir. Kemudian dilihat hasilnya.

III.11. Variabel dan batasan operasional

Vairabel penelitian dan batasannya dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1. Identifikasi variabel penelitian

No	Variabel dan definisi operasional	Cara pengukuran	Hasil ukur	Skala
1	Pemeriksaan NS1 untuk menemukan adanya antigen NS1 pada serum pasien	Rapid test SD Bioline/Panbio NS1 Dengue Early	Positif : Infeksi Dengue Negatif: Bukan infeksi Dengue	Nominal
2	Deteksi anti Dengue untuk mengetahui apakah pasien menderita infeksi primer atau sekunder dengan serologi anti Dengue IgM (+/-) dan IgG (+/-)	Panbio/ AIM Dengue Rapid ICT IgM, IgG	IgM (+/-) dan IgG (+/-)	Nominal
3	Pemeriksaan IgG anti NS1 adalah titer antibodi IgG terhadap NS1 Virus Dengue dalam serum	Pengukuran dilakukan dengan metode ELISA indirek	Angka serapan optik: Negatif: <0,16 Positif: ratio P/N >2 (> 0,32)	Numerik
5	Pemeriksaan anti-PDI trombosit adalah titer antibodi IgG terhadap PDI yang terdapat pada permukaan trombosit sampel	Pengukuran dilakukan dengan metode MAIPA direk	Angka serapan Optik: Negatif : <0,15 Positif : >0,31	Numerik

III.12. Etika penelitian

Penderita yang telah memenuhi kriteria inklusi, bersama keluarganya diberi penjelasan tentang tujuan dan manfaat yang diharapkan pada penelitian ini,

serta keuntungan dan kerugian yang diakibatkan dari pengambilan sampel untuk keperluan penelitian. Setelah mengerti dengan penjelasan yang diberikan dan tidak keberatan diikutsertakan dalam penelitian ini, penderita dan/ atau keluarganya kemudian diminta untuk menandatangani surat persetujuan.

Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia No. 291/PT02.FK/ETIK/2011 (lampiran 1)

III.13. Analisis data.

Sebaran demografi, seperti jenis kelamin dan umur (variabel katagorikal) disajikan dalam bentuk distribusi frekuensi dan presentasi. OD IgG anti NS1, OD anti-PDI trombosit, dan jumlah trombosit (variabel numerik) disajikan dalam bentuk *mean*, *median*, nilai maksimum, nilai minimum, dan standar deviasi. Untuk melihat normalitas data digunakan uji Shapiro-Wilk, untuk melihat korelasi anti NS1 dengan jumlah trombosit dan anti-PDI trombosit digunakan Spearman. Untuk melihat korelasi antara OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit yang dihubungkan dengan jumlah trombosit, maka sampel dibagi ke dalam 2 kelompok, yaitu kelompok 1 dengan jumlah trombosit salah satu hari pemeriksaan di bawah atau sama dengan $1 \times 10^5 / \mu\text{L}$ dan kelompok 2 dengan jumlah trombosit di atas $1 \times 10^5 / \mu\text{L}$. Kemudian dianalisis korelasi dengan Spearman.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

IV.1. Subjek penelitian

Dari 24 subjek yang didiagnosis terinfeksi Dengue Akut, hanya 19 subjek yang memenuhi kriteria inklusi dan disertakan pada penelitian ini. Lima subjek dikeluarkan dari penelitian karena terdiagnosis infeksi campuran (*mix infection*). Subjek terdiri dari laki-laki 13 orang (68,4 %) dan perempuan 6 orang (31,6%). Rerata usia subjek $29,08 \pm 8,37$ dengan rentang usia 17 sampai 45 tahun. Pada subjek penelitian ini didapatkan 6 subjek (31,6%) mengalami perdarahan spontan dan 13 subjek (68,4%) tidak mengalami perdarahan. Dari pemeriksaan anti-Dengue didapatkan 10 subjek dengan IgM anti-Dengue (+) dan IgG anti-Dengue negatif (-), 7 subjek dengan IgM anti-Dengue positif (+) dan IgG anti-Dengue positif (+), dan 2 subjek dengan IgM anti-Dengue negatif (-) IgG anti-Dengue positif (+). Selanjutnya berdasarkan hasil pemeriksaan IgG anti-Dengue maka, subjek dibagi dalam 2 kelompok, yaitu kelompok A dengan IgG anti-Dengue negatif (-) dan kelompok B dengan IgG anti-Dengue positif (+).

IV.2. Kinetika jumlah trombosit, OD anti-NS1 VD dan OD anti-PDI permukaan trombosit.

Telah dilakukan penelitian terhadap kinetika jumlah trombosit, titer anti-NS1 VD serum sampel, dan titer anti-PDI permukaan trombosit hari ketiga, kelima, dan ketujuh demam pada 19 subjek yang dirawat. Pada kedua kelompok didapat penurunan jumlah trombosit pada demam hari ketiga, tapi jumlah trombosit subjek kelompok B ($0,9 \times 10^5/\mu\text{L}$) (tabel 4.2) lebih rendah dari pada subjek kelompok A ($1,38 \times 10^5/\mu\text{L}$) (tabel 4.1). Jumlah trombosit kemudian menurun pada demam hari kelima dan kembali meningkat pada demam hari ketujuh dengan jumlah yang bervariasi (terendah $0,62 \times 10^5/\mu\text{L}$ hingga tertinggi $2,42 \times 10^5/\mu\text{L}$) (gambar IV.1.A). *Optical density* (OD) anti-NS1 sudah terdeteksi pada demam hari ketiga pada kedua kelompok. Pada kelompok B OD anti-NS1 lebih rendah ($0,62 \pm 0,23$) dari kelompok A ($0,9 \pm 0,69$). Kinetika OD anti-NS1 pada kelompok A mengalami penurunan pada demam hari kelima ($0,87 \pm 0,62$)

hingga hari ketujuh ($0,84 \pm 0,53$), sedangkan pada kelompok B OD anti-NS1 mengalami sedikit peningkatan pada demam hari kelima ($0,63 \pm 0,24$) hingga ketujuh ($0,64 \pm 0,24$) (gambar IV.1.B.). OD anti-PDI trombosit yang terdeteksi pada demam hari ketiga nampak sedikit lebih tinggi pada kelompok B ($0,36 \pm 0,17$) (tabel 4.2). Kinetika OD anti-PDI pada kelompok A sedikit meningkat pada demam hari kelima ($0,25 \pm 0,13$) seiring dengan penurunan jumlah trombosit dan OD anti-NS1. OD anti-PDI kemudian mengalami penurunan pada demam hari ketujuh ($0,21 \pm 0,11$). Pada kelompok B OD anti-PDI mengalami penurunan pada demam hari kelima ($0,32 \pm 0,14$) hingga hari ketujuh ($0,29 \pm 0,17$) seiring dengan peningkatan jumlah trombosit dan OD anti-NS1 (gambar IV.1.C.). Berbeda dengan OD anti-NS1, OD anti-PDI lebih rendah pada kelompok A dibandingkan kelompok B.

Tabel 4.1. Karakteristik jumlah trombosit, OD anti NS1, dan OD anti-PDI trombosit pada subjek dengan infeksi Dengue akut dan anti-Dengue IgG (-) (N = 10)*

Hari ke-	Jumlah trombosit (dalam $10^5/\text{ul}$)	Titer IgG anti NS1 (dalam OD)†	Titer anti-PDI trombosit (dalam OD)†
3	$1,38 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,69$	$0,23 \pm 0,14$
	1,55 (0,2; 2,08)	0,8(0,15; 2,66)	0,18(0,1; 0,4)
5	$1,36 \pm 0,53$	$0,87 \pm 0,62$	$0,25 \pm 0,13$
	1,42(0,39; 2,06)	0,82(0,14; 2,48)	0,2(0,12; 0,45)
7	$1,56 \pm 0,56$	$0,84 \pm 0,53$	$0,21 \pm 0,11$
	1,59(0,62; 2,42)	0,76(0,15; 2,18)	0,17(0,11; 0,46)

Keterangan:

*Nilai adalah rerata \pm simpang baku dan nilai tengah (minimum, maksimum)

† OD adalah *optical Density* dari titer IgG anti NS 1 dan anti-PDI trombosit.

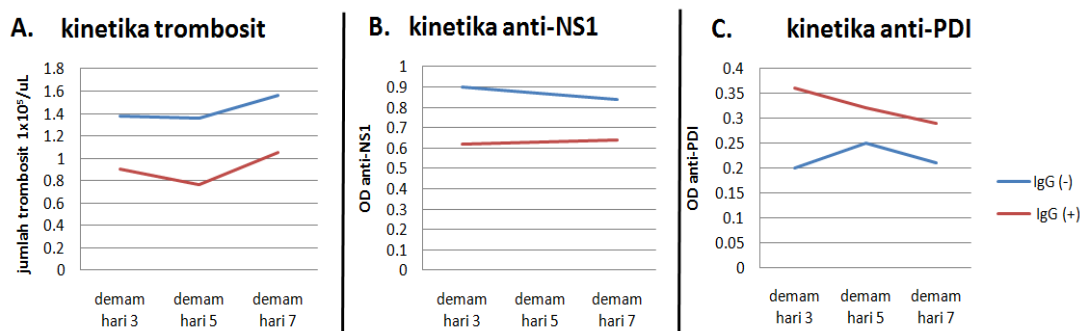
Tabel 4.2. Karakteristik jumlah trombosit, OD anti NS1, dan OD anti-PDI trombosit pada subjek dengan infeksi Dengue akut dan anti-Dengue IgG (+) (N = 9)*

Hari ke-	Jumlah trombosit (dalam $10^5/\text{ul}$)	Titer IgG anti NS1 (dalam OD)†	Titer anti-PDI trombosit (dalam OD)†
3	$0,9 \pm 0,56$	$0,62 \pm 0,23$	$0,36 \pm 0,17$
	1,03 (0,2; 1,54)	0,72(0,29; 0,97)	0,33(0,12; 0,61)
5	$0,76 \pm 0,38$	$0,63 \pm 0,24$	$0,32 \pm 0,14$
	0,7(0,27; 1,26)	0,72(0,28; 0,95)	0,28(0,13; 0,55)
7	$1,05 \pm 0,37$	$0,64 \pm 0,24$	$0,29 \pm 0,17$
	1,16(0,28; 1,54)	0,67(0,33; 1,02)	0,23(0,11; 0,7)

Keterangan:

*Nilai adalah rerata \pm simpang baku dan nilai tengah (minimum, maksimum)

† OD adalah *optical Density* dari titer IgG anti NS 1 dan anti-PDI trombosit.



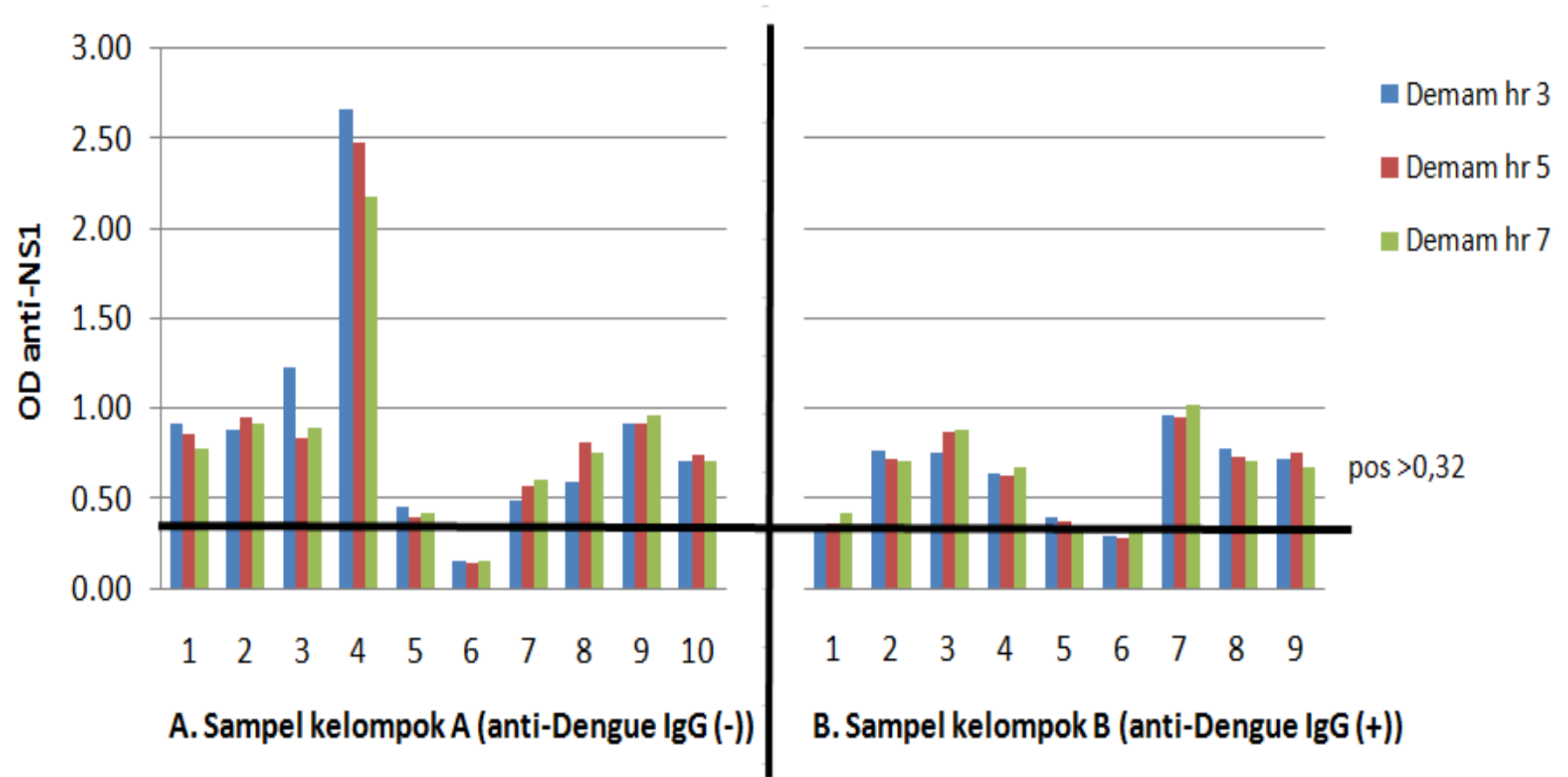
Gambar IV.1. Kinetika jumlah trombosit, OD anti-NS1 dan OD anti-PDI demam hari ke3, ke5, dan ke7 pada subjek kelompok A dan B.

Untuk mengetahui perbedaan OD anti-NS1, jumlah trombosit dan OD anti-PDI trombosit antar hari pemeriksaan maka dilakukan uji Friedman Test (lampiran 4.c). Dari tes tersebut dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan antar hari pemeriksaan, baik untuk OD anti-NS1 ($p=0,62$) maupun OD anti-PDI ($p=0,85$). Pada tes jumlah trombosit didapatkan ($p=0,012$), yang disimpulkan bahwa penurunan jumlah trombosit antar hari pemeriksaan bermakna.

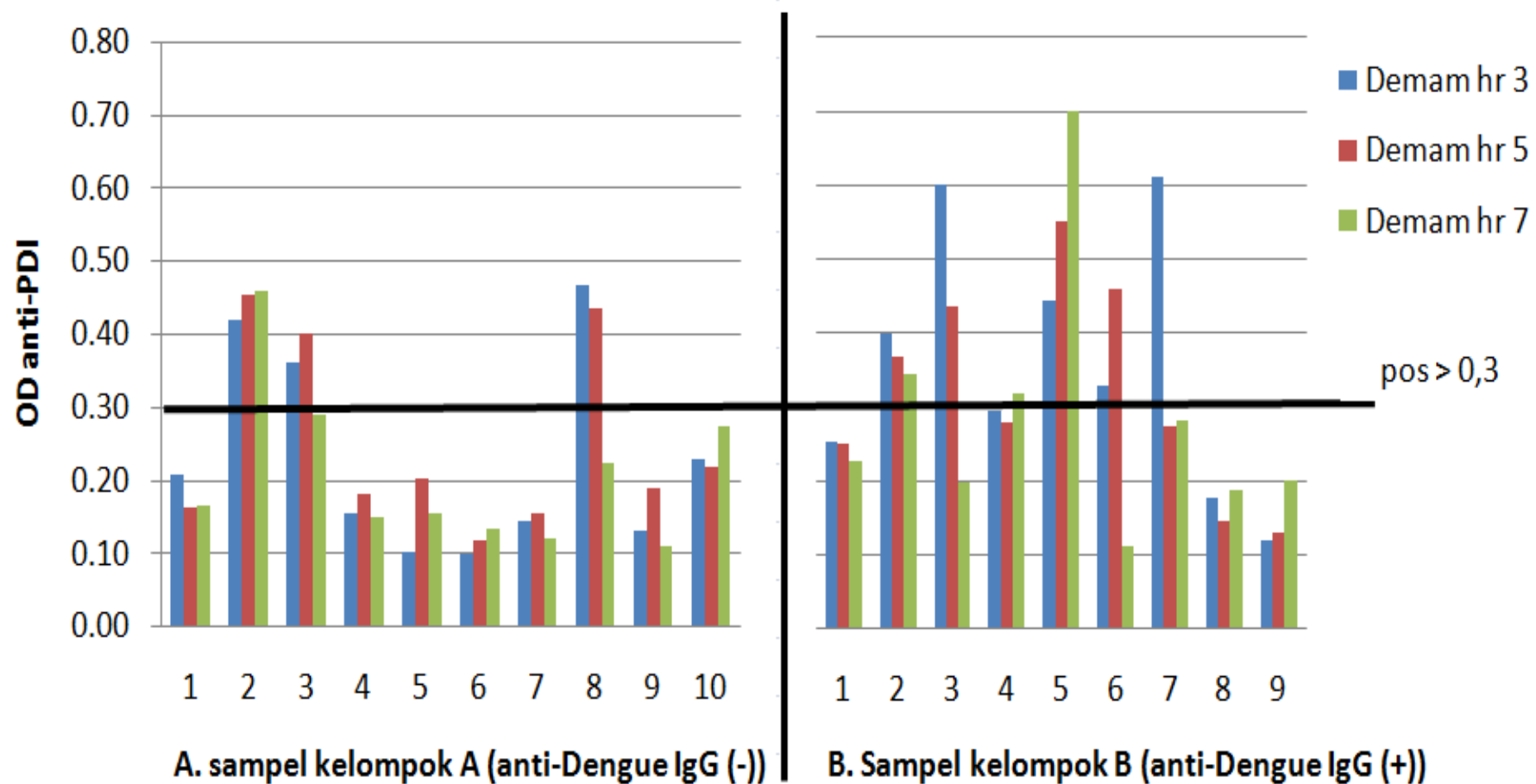
Pada eksplorasi kinetika OD anti-NS1 dan OD anti-PDI secara individual didapatkan pola yang bervariasi baik pada kelompok A maupun kelompok B. Kinetika OD anti-NS1 pada kelompok A didapat: 40% (4/10) sampel nampak adanya penurunan titer anti-NS1 pada hari ke 5 demam dan peningkatan pada hari ke 7 demam; 20% (2/10) sampel nampak adanya peningkatan titer anti-NS1 pada hari ke 5 demam dan penurunan pada hari demam ke 7; 20% (2/10) sampel nampak adanya penurunan titer anti-NS1 pada hari ke 5 demam terus mengalami penurunan hingga hari ke 7 demam; dan 20% (2/10) sampel nampak adanya peningkatan titer anti-NS1 pada demam hari ke 5 yang terus berlanjut hingga demam hari ke 7 (Gambar IV.2.A). Kinetika OD anti-NS1 pada kelompok B didapat: 33,3 % (3/9) sampel nampak adanya penurunan titer anti-NS1 pada hari ke 5 demam dan peningkatan pada hari ke 7 demam; 33,3 % (3/9) sampel nampak adanya penurunan titer anti-NS1 pada hari ke 5 demam terus mengalami penurunan hingga hari ke 7 demam; 22,2 % (2/9) sampel nampak adanya peningkatan titer anti-NS1 pada demam hari ke 5 yang terus berlanjut hingga demam hari ke 7; dan 11,1 % (1/9) sampel nampak adanya peningkatan titer anti-NS1 pada hari ke 5 demam dan penurunan pada hari demam ke 7 (gambar IV.2.B).

Pada eksplorasi kinetika OD anti-PDI secara individual pada kedua kelompok didapatkan juga pola yang bervariasi. Kinetika OD anti-PDI pada kelompok A didapat: 50% (5/10) sampel nampak kadar anti-PDI pada demam hari ke 5 meningkat kemudian menurun pada demam hari ke 7; 20% (2/10) sampel nampak adanya penurunan kadar anti-PDI pada demam hari ke 5 dan kemudian terjadi peningkatan pada demam hari ke 7; pada 20% (2/10) sampel nampak adanya peningkatan kadar anti-PDI pada hari ke 5 demam yang terus meningkat hingga hari ke 7 demam; dan pada 10% (1/10) sampel nampak adanya penurunan kadar anti-PDI pada demam hari ke 5 yang terus menurun hingga hari ke 7 demam (gambar IV.3.A). Kinetika OD anti-PDI pada kelompok B didapat: 33,3% (3/9) sampel nampak adanya penurunan kadar anti-PDI pada demam hari ke 5 dan kemudian terjadi peningkatan pada demam hari ke 7; 33,3% (3/9) sampel nampak adanya penurunan kadar anti-PDI pada demam hari ke 5 yang terus menurun hingga demam hari ke 7; 22,2% (2/9) sampel nampak adanya peningkatan kadar anti-PDI pada demam hari ke 5 yang terus meningkat hingga demam hari ke 7; dan 11,1% (1/9) sampel nampak kadar anti-PDI pada demam hari ke 5 meningkat kemudian menurun pada demam hari ke 7 (gambar IV.3.B).

Rangkuman perubahan kinetika individual dari OD anti-NS1 dan anti-PDI dapat dilihat pada tabel 4.3.



Gambar IV.2. Grafik kinetika OD anti-NS1 demam hari ke 3, 5, dan 7 pada kelompok A dan kelompok B



Gambar IV.3. Grafik kinetika anti-PDI trombosit demam hari ke 3, 5, dan 7 pada 19 sampel

Tabel 4.3. Perubahan individual dari OD anti-NS1 dan OD anti-PDI pada demam hari ke5 dan ke7 dibandingkan dengan hari ke3.

OD		Kelompok A	Kelompok B
Anti NS-1			
Demam hari ke 5	Demam hari ke 7		
Turun	Naik	40%	33,3%
Turun	Turun	20%	33,3%
Naik	Turun	20%	11,1%
Naik	Naik	20%	22,2%
Anti-PDI			
Demam hari ke 5	Demam hari ke 7		
Turun	Naik	20%	33,3%
Turun	Turun	10%	33,3%
Naik	Turun	50%	11,1%
Naik	Naik	20%	22,2%

IV.3. Korelasi antara anti-NS1 dengan jumlah trombosit

Pada uji korelasi antara OD anti-NS1 dan jumlah trombosit pada demam hari ke3, 5, dan 7 didapatkan bahwa adanya korelasi dengan kekuatan lemah tidak bermakna ($r = 0,342; 0,180; 0,154; p > 0,05$) (tabel 4.4)

Tabel 4.4. Korelasi OD anti NS1 dengan jumlah trombosit pada demam hari 3, 5, dan 7 (N=19).

		Jumlah trombosit demam hari ke 3	Jumlah trombosit demam hari ke 5	Jumlah trombosit demam hari ke 7
OD anti NS1	<i>r</i>	0,342	-	-
demam hari ke 3	<i>p</i>	0,151		
OD anti NS1	<i>r</i>	-	0,180	-
demam hari ke 5	<i>p</i>		0,461	
OD anti NS1	<i>r</i>	-	-	0,154
demam hari ke 7	<i>p</i>			0,528

Pada uji korelasi antara OD anti-NS1 dan jumlah trombosit pada sampel kelompok A didapat korelasi kuat ($r=0,6$) yang kemudian menurun menjadi lemah pada demam hari ke 5 ($r=0,2$) dan ke 7 ($r=0,248$) (tabel 4.5). Pada kelompok B didapatkan korelasi negatif ($r = -0,317$) yang semakin kuat pada demam hari ke 5 ($r = -0,527$) dan kemudian menurun pada demam hari ke 7 ($r = -0,084$) (tabel 4.6.).

Tabel 4.5. Korelasi OD anti-NS1 dengan jumlah trombosit pada demam hari 3, 5, dan 7 pada sampel kelompok anti-Dengue IgG (-) (N=10)

		Jumlah trombosit demam hari ke 3	Jumlah trombosit demam hari ke 5	Jumlah trombosit demam hari ke 7
OD anti-NS1	r	0,600	-	-
demam hari ke 3	p	0,067		
OD anti-NS1	r	-	0,200	-
demam hari ke 5	p		0,580	
OD anti-NS1	r	-	-	0,248
demam hari ke 7	p			0,489

Tabel 4.6. Korelasi OD anti-NS1 dengan jumlah trombosit pada demam hari ke 3, 5, dan 7 pada sampel kelompok anti-Dengue IgG (+) (N=9)

		Jumlah trombosit demam hari ke 3	Jumlah trombosit demam hari ke 5	Jumlah trombosit demam hari ke 7
OD anti-NS1	r	-0,317	-	-
demam hari ke 3	p	0,406		
OD anti-NS1	r	-	-0,527	-
demam hari ke 5	p		0,145	
OD anti-NS1	r	-	-	-0,084
demam hari ke 7	p			0,829

IV.4. Korelasi antara OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit

Telah dilakukan pemeriksaan ELISA IgG anti-NS1 dan MAIPA anti-PDI trombosit. OD anti-NS1 kontrol negatif yang didapatkan dari rerata OD anti-NS1 5 orang donor sehat adalah 0,16 sedangkan kontrol positif didapatkan dari 5 orang donor adalah 1,39 (lampiran 3). *Cut off* ELISA anti-NS merupakan dua kali rerata nilai negatif (-) yaitu 0,32 dan untuk hasil positif OD > 0,32 (gambar IV.2). Berdasarkan *cut off* OD anti-NS1 tersebut didapatkan 89,5 % (17/19) sampel positif IgG anti-NS1 (gambar IV.2).

Cut off OD anti-PDI trombosit untuk hasil positif (+) juga merupakan 2 kali nilai rerata kontrol negatif (-) OD = 0,15 yaitu: OD > 0,3. Berdasarkan pembagian *cut off* tersebut maka jumlah sampel yang OD anti-PDI positif (+): 47,3% (9/19) (gambar IV.3). Pada uji komparatif *Fisher's Exact Test* antara OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI didapat ($p > 0,05$) yang disimpulkan bahwa tidak ada hubungan antara titer anti-NS1 dengan titer anti-PDI (tabel 4.7. & lampiran 5.d)

Tabel 4.7. Profil ELISA IgG anti NS1 dan MAIPA anti-PDI trombosit (Uji Fisher)

		Anti-PDI trombosit						<i>P</i>
		Positif		Negatif		Total		
		n	%	n	%	n	%	
Anti-NS1	Positif	8	42,1	9	47,4	17	89,5	1,000
	Negatif	1	5,3	1	5,3	2	10,5	
Total		9	47,3	10	52,7	19	100	

Kemudian dilakukan pula uji korelasi Spearman antara OD anti-NS1 dan OD anti-PDI trombosit dengan hasil korelasi sangat lemah tidak bermakna baik pada demam hari ke 3, 5, dan 7 ($r=0,174$; $0,039$; $0,082$) (tabel 4.8). Uji korelasi antara OD anti-NS1 dan OD anti-PDI trombosit pada kelompok A korelasi lemah pada ke tiga hari pemeriksaan (tabel 4.9) sedangkan pada kelompok B diperoleh korelasi lemah yang menjadi korelasi negatif sedang pada demam hari ke 5 ($r=-0,435$) dan negatif sangat lemah pada demam hari ke 7 ($r=-0,013$) (tabel 4.10).

Tabel 4.8. Korelasi OD anti NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada demam hari 3, 5, dan 7 (N=19).

		OD anti-PDI trombosit demam hari ke 3	OD anti-PDI trombosit demam hari ke 5	OD anti-PDI trombosit demam hari ke 7
OD anti NS1 hari ke 3 demam	<i>r</i>	0.174	-	-
	<i>p</i>	0.477		
OD anti NS1 hari ke 5 demam	<i>r</i>	-	0.039	-
	<i>p</i>		0.875	
OD anti NS1 hari ke 7 demam	<i>r</i>	-	-	0.082
	<i>p</i>			0.737

Tabel 4.9. Korelasi OD anti NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada demam hari 3, 5, dan 7 pada kelompok anti-Dengue IgG (-) (N=10).

		OD anti-PDI trombosit demam hari ke 3	OD anti-PDI trombosit demam hari ke 5	OD anti-PDI trombosit demam hari ke 7
OD anti NS1 hari ke 3 demam	<i>r</i>	0.382	-	-
	<i>p</i>	0.276		
OD anti NS1 hari ke 5 demam	<i>r</i>	-	0.045	-
	<i>p</i>		0.328	
OD anti NS1 hari ke 7 demam	<i>r</i>	-	-	0.139
	<i>p</i>			0.701

Tabel 4.10. Korelasi OD anti NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada demam hari 3, 5, dan 7 pada kelompok anti-Dengue IgG (+) (N=9).

		OD anti-PDI trombosit demam hari ke 3	OD anti-PDI trombosit demam hari ke 5	OD anti-PDI trombosit demam hari ke 7
OD anti NS1 hari ke 3 demam	r	0.250	-	-
	p	0.516		
OD anti NS1 hari ke 5 demam	r	-	-0.435	-
	p		0.242	
OD anti NS1 hari ke 7 demam	r	-	-	-0.013
	p			0.974

IV.5. Korelasi antara OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada 2 kelompok sampel berdasarkan IgG anti-Dengue dan jumlah trombosit.

Untuk melihat adanya perbedaan sifat korelasi antara OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada jumlah trombosit yang berbeda, maka sampel dibagi ke dalam 2 kelompok berdasarkan kriteria trombositopenia WHO 1997 (jumlah trombosit $\leq 1 \times 10^5/\mu\text{l}$). Kelompok sampel dengan jumlah trombosit pada salah satu hari pemeriksaan $\leq 1 \times 10^5/\mu\text{l}$ didapatkan 8 sampel, sedangkan kelompok sampel dengan jumlah trombosit $> 1 \times 10^5/\mu\text{l}$ didapatkan 11 sampel.

Selanjutnya dilakukan uji korelasi Spearman terhadap masing-masing kelompok dan didapatkan hasil tabel 4.11 dan tabel 4.12.

Tabel 4.11. Korelasi OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada kelompok dengan jumlah trombosit disalah satu hari pemeriksaan $\leq 1 \times 10^5/\mu\text{l}$ (N=8).

Kelompok 1		OD anti-PDI trombosit hari ke 3 demam	OD anti-PDI trombosit hari ke 5 demam	OD anti-PDI trombosit hari ke 7 demam
OD anti NS1 hari ke 3 demam	r	0.452	-	-
	p	0.260		
OD anti NS1 hari ke 5 demam	r	-	-0.357	-
	p		0.385	
OD anti NS1 hari ke 7 demam	r	-	-	-0.36
	p			0.933

Tabel 4.12. Korelasi OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit pada kelompok dengan jumlah trombosit $>1 \times 10^5/\mu\text{l}$ (N=11).

Kelompok 2		OD anti-PDI trombosit hari ke 3 demam	OD anti-PDI trombosit hari ke 5 demam	OD anti-PDI trombosit hari ke 7 demam
OD anti-NS1 hari ke 3 demam	r	0.355	-	-
	p	0.285		
OD anti-NS1 hari ke 5 demam	r	-	0.236	-
	p		0.484	
OD anti-NS1 hari ke 7 demam	r	-	-	-0.009
	p			0.979

Pada uji korelasi antara OD anti NS 1 dengan OD anti-PDI trombosit yang dilakukan pada kedua kelompok tidak didapatkan korelasi yang bermakna ($p > 0,05$). Pada analisis korelasi kelompok 1 didapatkan pola korelasi dengan kekuatan sedang pada demam hari ke 3 ($r = 0,452$), kemudian korelasi tersebut berubah menjadi korelasi negatif dengan kekuatan lemah pada hari ke 5 demam ($r = -0,357$) dan sangat lemah pada hari ke 7 demam ($r = -0,036$). Sedangkan pada kelompok 2 didapatkan korelasi lemah pada hari demam ke 3 ($r = 0.355$) yang kemudian menurun pada hari ke 5 demam ($r = 0,236$) dan berubah menjadi korelasi negatif sangat lemah pada hari ke 7 demam ($r = -0.009$).

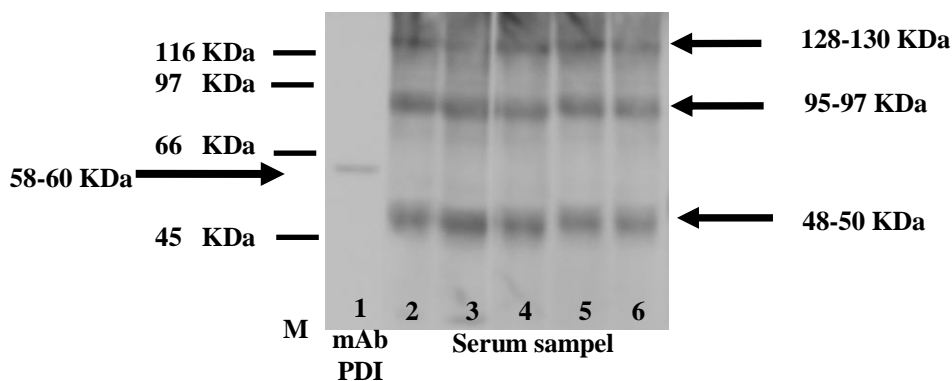
Pembagian kelompok kemudian dibagi lagi berdasarkan hasil pemeriksaan IgG anti-Dengue namun karena jumlah sampel yang terlalu sedikit maka analisa hanya berdasarkan gambaran kinetika saja. Gambaran kinetika OD anti-NS1 dan OD anti-PDI pada kelompok IgG anti-Dengue negatif (-) dan positif (+) dengan jumlah trombosit $\leq 1 \times 10^5/\mu\text{L}$ didapatkan pola yang berbeda (lampiran 8.1). Pada kelompok IgG anti-Dengue (-) nampak pola OD anti-NS1 yang meningkat pada demam hari ke5 dan menurun pada demam hari ke7 diikuti dengan sedikit penurunan OD anti-PDI pada demam hari ke 5 dan bertambah menurun pada demam hari ke7. Pada kelompok IgG anti-Dengue (+) nampak pola kinetika antara OD anti-NS1 dan OD anti-PDI yang terbalik, yaitu peningkatan OD anti-NS1 pada demam hari ke5 dan ke7 tidak diikuti dengan peningkatan OD anti-PDI.

Gambaran kinetika OD anti-NS1 dan OD anti-PDI pada kelompok IgG anti-Dengue negatif (-) dan positif (+) dengan jumlah trombosit $> 1 \times 10^5/\mu\text{L}$ didapatkan pola yang berbeda pula (lampiran 8.2). Pada kelompok IgG anti-

Dengue (-) nampak pola kinetika anti-NS1 yang menurun pada demam hari ke5 yang berlanjut ke demam hari ke7 yang diikuti dengan sedikit peningkatan OD anti-PDI pada demam hari ke5 dan menurun kembali pada demam hari ke7. Pada kelompok IgG anti-Dengue positif (+) nampak OD anti-NS1 meningkat pada demam hari ke5 dan sedikit menurun pada demam hari ke7 yang diikuti dengan peningkatan OD anti-PDI pada demam hari ke5 dan menurun pada demam hari ke7.

IV.6. Pengujian pengenalan antibodi dalam serum sampel terhadap PDI trombosit.

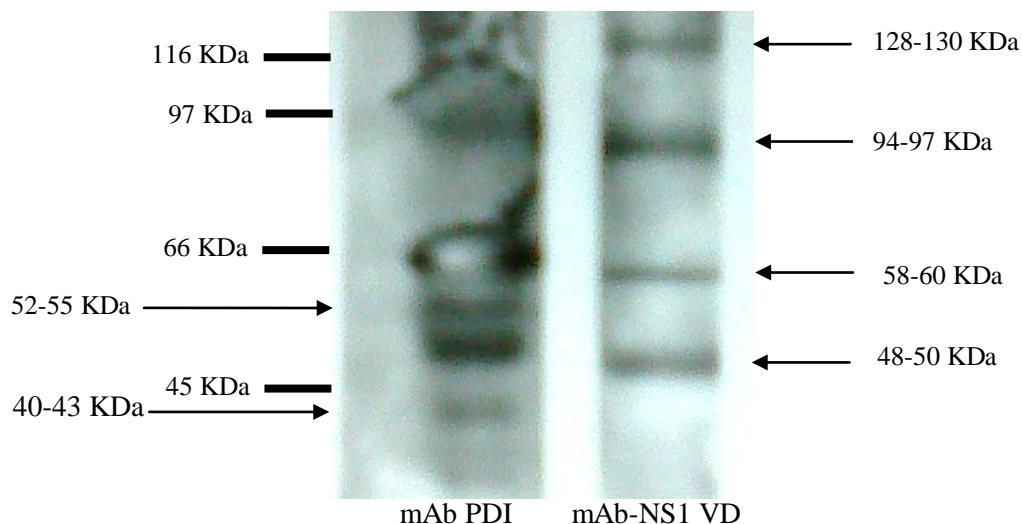
Cheng dkk¹⁷ sudah membuktikan bahwa anti-NS1 dari mencit yang diimunisasi dengan NS1 rekombinan mengenali PDI trombosit. Untuk melihat kemungkinan adanya pengenalan anti-NS1 yang terdapat dalam serum sampel terhadap PDI maka dilakukan pengujian dengan metode *Western Blot* terhadap protein trombosit yang dipisahkan (*separating*) dalam SDS PAGE, selanjutnya protein di *transfer* ke membran PVDF dan dipaparkan dengan mAb PDI (membran 1), serum sampel (2, 3, 4) pasien kontrol negatif, dan serum sampel pasien Dengue demam hari ke 5 (membran 5, 6). Hasil yang diperoleh pada pemaparan membran PVDF dengan kertas film selama 10-30 detik didapatkan pada membran 1 nampak pita pada berat molekul 58-60 KDa, yang sesuai dengan berat molekul protein PDI trombosit. Sedangkan pada membran 2, 3, 4, 5, dan 6 nampak pita pada protein dengan berat molekul pada 128-130 KDa, 95-97 KDa dan 48-50 KDa, tapi tidak nampak pita pada berat molekul 58 KDa yang sesuai dengan PDI (gambar IV.4). Hasil ini didapatkan konsisten pada semua membran yang diinkubasi dengan serum pasien.



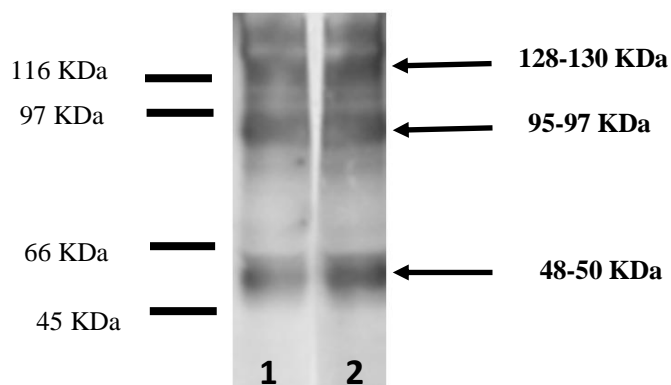
Gambar IV.4. Hasil Western Blot protein trombosit yang diinkubasi dengan serum sampel. Pada membran protein trombosit yang dipaparkan dengan serum kontrol negatif (2, 3, 4) dan pasien infeksi Dengue (5, 6) demam hari ke 5 tidak terdapat pita dengan berat molekul 58-60 KDa tapi terdapat pita pada protein dengan berat molekul 130 KDa, 95 KDa, dan 50 KDa. Protein trombosit yang dipaparkan dengan monoklonal antibodi anti-PDI (1, mAb PDI) dan serum sampel pasien Dengue (2, 3, 4, 5, 6) (M: *Marker protein*).

Selanjutnya protein trombosit pada membran PVDF di inkubasi dengan antibodi monoklonal anti-NS1 VD DEN3 (Abcam) dibandingkan dengan protein trombosit pada membran PVDF yang diinkubasi dengan mAb PDI. Hasil yang diperoleh setelah dipaparkan dengan kertas film selama 10 menit nampak gambaran pita yang bervariasi kekuatannya pada protein dengan berat molekul 128-130 KDa, 95-97 KDa, 58-60 KDa dan 48-50 KDa pada kedua membran tersebut. Selain nampak pita-pita tersebut, pada membran yang diinkubasi dengan mAb-PDI nampak pita lain yang tipis pada protein dengan berat molekul 52-55 KDa dan 40-43 KDa. (gambar IV.5)

Dari hasil inkubasi ekstrak protein trombosit pada membran PVDF dengan antibodi sekunder *HRP conjugated goat anti-human* dengan pengenceran 1:6000 didapatkan pula gambar pita pada protein dengan berat molekul 128-130 KDa, 95-97 KDa dan 48-50 KDa. Hal ini menunjukkan adanya reaksi secara langsung antibodi sekunder dengan protein trombosit (gambar IV.6).



Gambar IV.5. Hasil Western Blot protein trombosit yang diinkubasi dengan mAb PDI dan mAb NS1. Membran protein trombosit yang dipaparkan dengan mAb-PDI dan mAb-NS1 VD. Nampak gambaran pita yang spesifik pada berat molekul 58-60 KDa (PDI) tapi nampak pula gambaran pita lain yaitu pada protein dengan berat molekul 128-130 KDa, 95-97 KDa, dan 48-50 KDa. Protein trombosit yang dipaparkan dengan monoklonal antibodi anti-PDI (mAb-PDI) dan monoklonal antibodi anti-NS1 VD (mAb-NS1 VD).



Gambar IV.6. Hasil Western Blot yang memperlihatkan adanya reaksi langsung antibodi sekunder dengan protein trombosit. Nampak adanya gambaran pita pada protein dengan berat molekul sekitar 128-130 KDa, 95-97 KDa, dan 48-50 KDa. (1) Membran protein trombosit yang diinkubasi hanya dengan antibodi sekunder. (2) protein trombosit yang diinkubasi dengan serum pasien dan antibodi sekunder.

BAB V

PEMBAHASAN

V.1. Gambaran umum

Hingga saat ini infeksi Dengue masih menjadi masalah kesehatan bagi penduduk yang tinggal di daerah tropis dan subtropis, Asia Tenggara pada umumnya dan Indonesia pada khususnya. WHO memperkirakan sekitar 50–100 juta kasus Dengue terjadi setiap tahunnya dengan interval epidemik setiap 3-5 tahun.² Tingginya mobilitas manusia mengakibatkan meluasnya penyebaran nyamuk *Aedes*, yang merupakan vektor VD. Akibatnya daerah endemik dengue meluas menjadi 112 negara dari sebelumnya 100 negara.³

Trombositopenia merupakan karakteristik yang selalu dijumpai pada semua derajat infeksi Dengue dan hingga saat ini patomekanisme peningkatan destruksi trombosit dan gangguan fungsi trombosit masih belum jelas. Dari penelitian terdahulu didapatkan adanya mekanisme *molecular mimicry* antara antigen NS1 dengan trombosit⁹ sehingga terjadi reaksi silang anti-NS1 terhadap trombosit dan mengakibatkan destruksi trombosit.¹³⁻¹⁵ Penelitian Cheng dkk, mendapatkan adanya sekuen homologi pada residu 311-330 region C-terminal protein NS1 VD dengan PDI permukaan trombosit yang mengakibatkan terjadinya mekanisme *molecular mimicry*, sehingga anti-NS1 dari serum mencit yang diimunisasi dengan NS1 rekombinan mengenali molekul PDI trombosit donor.^{17,18} Dikenalnya PDI trombosit oleh anti-NS1 mengakibatkan terhambatnya kerja PDI dalam mengaktivasi reseptor fibrinogen dan adhesi sehingga terjadinya hambatan proses agregasi trombosit.

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan dengan menggunakan sampel dari 19 subjek terinfeksi Dengue akut yang terdiri dari laki-laki 13 orang (68,4%) dan perempuan 6 orang (31,6%) dengan rentang usia 17 sampai 45 tahun. Pada subjek penelitian ini didapatkan 31,6% subjek mengalami perdarahan spontan dan 68,4% tidak mengalami perdarahan. Dari pemeriksaan anti-Dengue didapatkan 10 subjek dengan IgM anti-Dengue (+) dan IgG anti-Dengue (-), 7 subjek IgM anti-Dengue (+) dan IgG anti-Dengue (+), dan 2 subjek dengan IgM

anti-Dengue (-) dan IgG anti-Dengue (+). Berdasarkan hasil pemeriksaan anti-Dengue ini maka data dibagi dalam 2 kelompok, yaitu kelompok A dengan IgG anti-Dengue negatif (-) yang terdiri dari 10 subjek dan kelompok B dengan IgG anti-Dengue positif (+) yang terdiri dari 9 subjek.

Rencananya penelitian ini akan dilakukan menggunakan 64 sampel. Kurangnya jumlah subjek yang diperoleh dikarenakan beberapa hal, yaitu karena suksesnya program pemerintah dalam memberantas infeksi Dengue dan waktu penelitian yang dilakukan diluar masa periode epidemik 5 tahunan infeksi Dengue, selain itu banyak subjek yang mengalami infeksi lain selain Dengue (*mix infection*) sehingga tidak dapat diikutsertakan dalam penelitian ini.

Analisis statistik pada penelitian ini didapatkan hasil yang tidak bermakna, dan tidak terlihat adanya suatu *trend* dari analisis korelasi antara OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI dan jumlah trombosit, hal ini dikarenakan jumlah sampel yang jauh dari target. Oleh karena itu pada pembahasan selanjutnya akan lebih dibahas secara deskriptif.

Pemeriksaan anti-NS1 dan anti-PDI pada penelitian ini tidak disertakan standard anti-NS1 maupun anti-PDI. Untuk menghindari variasi hasil ELISA anti-NS1 dan MAIPA anti-PDI antar pemeriksaan, maka kumpulan sampel serum demam hari ke3, 5, dan 7 selalu dilakukan pada plat yang sama, sehingga dalam menyatakan perubahan OD tidak berpengaruh terhadap variasi antar pemeriksaan.

V.2. Kinetika OD anti-NS1, OD anti-PDI trombosit, dan trombositopenia pada infeksi akut Dengue.

Pada penelitian terdahulu didapatkan anti-NS1 yang terbentuk pada saat infeksi Dengue mampu mengopsonisasi trombosit dan meningkatkan bersihan trombosit oleh makrofag.^{12,14,16} Selain itu terbentuknya kompleks imun antibodi-antigen trombosit menyebabkan teraktivasinya sistim komplemen yang mengakibatkan terjadinya lisis trombosit.^{5,6} Dari pernyataan di atas maka diperkirakan makin tinggi OD anti-NS1 maka jumlah trombosit menjadi semakin rendah.

Subjek yang digunakan pada penelitian ini dicatat jumlah trombosit dan data lainnya (leukosit, Hb, HT). Data tersebut tidak memperlihatkan adanya hematodepresi pada subjek tersebut, dikarenakan jumlah leukosit, kadar Hb dan HT yang lebih tinggi dari normal. Serum dan trombosit dipisahkan dari sampel yang didapat kemudian dilakukan eksplorasi kinetika OD anti-NS1 serta aktivitas antibodi terhadap PDI permukaan trombosit pasien pada demam hari ke 3, 5, 7.

Hasil pemeriksaan anti-NS1 terhadap 19 pasien didapatkan 89,5% (17/19) sampel memberikan hasil anti-NS1 positif dan 10,5% (2/19) sampel memberikan hasil negatif ($OD < 0,32$) (tabel 4.6). Hasil negatif ini didapat 1 subjek pada kelompok A dan 1 subjek pada kelompok B. Dari hasil ini didapatkan bahwa IgG anti-NS1 telah terbentuk pada hari ke 3 demam pada mayoritas pasien infeksi Dengue akut walaupun IgG anti-Dengue subjek negatif (gambar IV.2). Hasil OD anti-NS1 negatif bukan berarti tidak terbentuk IgG anti-NS1 tapi mungkin akibat masih rendahnya titer anti-NS1 tersebut sehingga hasil yang didapatkan kurang dari *cut off* ($OD < 0,32$).

Pada hasil eksplorasi jumlah trombosit, OD anti-NS1 dan OD anti-PDI pada kedua kelompok didapat beberapa perbedaan, seperti: (1) jumlah trombosit kelompok B lebih rendah dari kelompok A dengan pola kinetika yang sama (gambar IV.1.A), (2) OD anti-NS1 kelompok B lebih rendah dari OD anti-NS1 kelompok A dengan pola kinetika yang terbalik (gambar IV.1.B), dan (3) OD anti-PDI kelompok A lebih rendah dari pada kelompok B dengan pola kinetika yang berbeda (gambar IV.1.C). Hal ini menunjukkan bahwa pada subjek dengan IgG anti-Dengue positif, yang kemungkinan mengalami infeksi Dengue sekunder akut, mengalami trombositopenia yang lebih berat serta adanya kemungkinan anti-NS1 pada serum subjek dengan IgG (+) memiliki aktivitas anti-PDI.¹⁷

Pada analisis kinetika rerata OD anti-NS1, anti-PDI, dan jumlah trombosit pada kelompok A didapat bahwa OD anti-NS1 paling tinggi pada hari ketiga demam $OD = 0,9 \pm 0,69$ yang disertai dengan mulai terjadinya trombositopenia, dengan jumlah trombosit $1,38 \times 10^5 / \mu l \pm 0,5$ namun OD anti-PDI yang melekat pada permukaan trombosit masih rendah (di bawah *cut off*), yaitu $OD = 0,23 \pm 0,14$ (tabel 4.1). Pada hari selanjutnya OD anti-NS1 mulai menurun hingga demam

hari ke7. OD anti-PDI pada demam hari ke5 mengalami sedikit peningkatan ($OD=0,25\pm0,13$) yang kemudian menurun pada demam hari ke7, sedangkan jumlah trombosit menurun pada demam hari ke5 dan meningkat kembali pada demam hari ke7. Hal ini menunjukkan makin rendahnya OD anti-NS1 yang dibentuk maka makin tinggi jumlah trombosit, namun didapatkan pola kinetika yang terbalik antara OD anti-PDI dengan jumlah trombosit. Keadaan ini memperlihatkan kemungkinan adanya aktivitas anti-PDI yang mempengaruhi jumlah trombosit tapi belum dapat dinyatakan adanya kemungkinan anti-NS1 memiliki aktivitas sebagai anti-PDI sesuai dengan penelitian oleh Cheng dkk.¹⁷

Pada analisa kinetika rerata OD anti-NS1, anti-PDI, dan jumlah trombosit pada kelompok B didapat bahwa OD anti-NS1 paling tinggi pada demam hari ke3 ($OD=0,62\pm0,23$) namun OD anti-NS1 kelompok ini lebih rendah dari pada kelompok A. Tingginya OD anti-NS1 ini disertai dengan rendahnya jumlah trombosit ($0,9\times10^5/\mu l\pm0,56$) dan sedikit peningkatan OD anti-PDI ($0,36\pm0,17$) (tabel 4.2). Pada hari selanjutnya OD anti-NS1 meningkat hingga demam hari ke7. OD anti-PDI menurun pada demam hari ke5 dan berlanjut hingga demam hari ke7. Sedangkan jumlah trombosit mengalami penurunan pada demam hari ke5 yang kemudian meningkat pada demam hari ke7. Berbeda dengan pola kinetika kelompok A, pola kinetika kelompok B menunjukkan adanya kemungkinan anti-NS1 memiliki aktivitas anti-PDI sesuai dengan penelitian Cheng dkk¹⁷ (gambar IV.1).

Pada eksplorasi pola kinetika OD anti-NS1 dan anti-PDI secara individu baik pada kelompok A dan B (gambar IV.2 dan gambar IV.3), didapatkan pola yang bervariasi. Hal ini menunjukkan bahwa kinetika anti-NS1 dan anti-PDI pada pasien infeksi Dengue sangat individual dan kemungkinan mekanisme trombositopenia yang terjadi tidak hanya dikarenakan adanya anti-PDI pada permukaan trombosit tapi juga dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti meningkatnya produksi sitokin atau antagonis trombosit oleh sel endotel yang terinfeksi yang mengakibatkan teraktivasinya trombosit dan peningkatan perlekatan trombosit dengan endotel⁵¹ serta peningkatan interaksi trombosit dengan monosit atau neutrofil.⁸

Pada penelitian lain didapatkan pengikatan anti-NS1 isotype IgM terhadap trombosit dan lebih efisien mengaktivasi kaskade komplemen.^{14,70} Oleh karena keterbatasan waktu dan biaya pada penelitian ini hanya dilakukan deteksi anti-NS1 isotype IgG sehingga memerlukan penelitian lanjutan untuk mendeteksi anti-NS1 isotype IgM yang terdapat pada permukaan trombosit pasien.

V.3. Korelasi OD anti-NS1 dengan jumlah trombosit.

Pada uji korelasi OD anti-NS1 dengan jumlah trombosit didapat korelasi negatif pada kelompok B ($r=-0,317$) yang semakin kuat pada demam hari ke5 ($r=-0,527$) (tabel 4.4.). Hal ini menunjukkan adanya kemungkinan sampel pada kelompok B mengalami infeksi sekunder dan adanya peningkatan aktivitas anti-NS1 terhadap permukaan trombosit yang mengopsonisasi trombosit dan meningkatkan bersihan trombosit oleh makrofag sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelum^{12,14,16}

V.4. Profil anti-PDI trombosit pada infeksi akut Dengue.

Hasil pemeriksaan OD anti-PDI trombosit terhadap 19 pasien didapatkan 47,3% (9/19) positif dan 52,7% (10/19) negatif (tabel 4.6). Hal ini menyatakan terjadinya peningkatan kadar anti-PDI yang melekat pada PDI permukaan trombosit pada 47,3% sampel. Hal ini tidak berarti tidak terjadi peningkatan pengikatan anti-PDI pada PDI permukaan trombosit tapi kemungkinan (1) rendahnya jumlah PDI yang terekspresi dipermukaan trombosit karena sebagian besar PDI terletak di dalam sistim dense tubuler dan tidak terekspresi keluar⁷¹ sehingga anti-PDI yang melekat pada PDI permukaan trombosit sedikit, (2) adanya molekul lain pada permukaan trombosit yang homologi dengan PDI yang mungkin juga dikenali oleh anti-PDI, misalnya GPIIb/IIIa. Pada penelitian sebelumnya terbukti adanya reaksi silang IgG anti-NS1 terhadap GPIIbIIIa.⁷²

V.5. Korelasi anti-NS1 VD dan anti-PDI.

Pada uji komparatif Fisher's Exact Test antara OD anti-NS1 dan OD anti-PDI pada semua sampel didapatkan tidak ada hubungan antara OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI (tabel 4.6. & lampiran 5.d). Sampel kemudian dibagi dalam

dua kelompok berdasarkan kriteria trombositopenia WHO 1997 dan dilakukan uji korelasi antar OD anti-NS1 dengan OD anti-PDI trombosit. Uji korelasi pada kelompok dengan jumlah trombosit $\leq 1 \times 10^5/\mu\text{l}$ didapatkan hasil korelasi positif pada hari ke tiga demam, kemudian pada demam hari ke5 korelasi berubah menjadi negatif lemah ($r = -0,357, -0,36; p > 0,05$) (tabel 4.5). Pada kelompok dengan jumlah trombosit $> 1 \times 10^5/\mu\text{l}$ juga menunjukkan korelasi positif lemah yang kemudian berubah menjadi korelasi negatif pada demam hari ketujuh ($r = -0,009; p > 0,05$) (tabel 4.6). Hal ini menunjukkan peningkatan OD anti-NS1 pada demam hari ke5 dan ke7 pada kelompok jumlah trombosit $\leq 1 \times 10^5/\mu\text{l}$ dan pada demam hari ke7 pada kelompok jumlah trombosit $> 1 \times 10^5/\mu\text{l}$ tidak diikuti dengan peningkatan OD anti-PDI yang melekat pada permukaan trombosit.

Gambaran kinetika OD anti-NS1 dan OD anti-PDI pada kelompok yang berdasarkan jumlah trombosit dan hasil pemeriksaan IgG anti-Dengue didapatkan pola yang bervariasi. Gambaran pola kinetika OD anti-PDI pada ke4 kelompok menunjukkan gambaran yang sama yaitu terjadinya penurunan pada demam hari ke5 hingga ke7 yang disertai dengan peningkatan OD anti-NS1 pada kelompok dengan IgG anti-Dengue (+) (baik pada kelompok dengan jumlah trombosit $\leq 1 \times 10^5/\mu\text{l}$ maupun $> 1 \times 10^5/\mu\text{l}$) (lampiran 8).

Keadaan ini menunjukkan mungkin adanya aktivitas anti-NS1 sebagai anti-PDI trombosit sesuai dengan penelitian Cheng dkk.¹⁷ Penurunan OD anti-PDI pada demam hari ke7 kemungkinan (1) tidak adanya atau sedikitnya protein yang dikenali oleh anti-NS1 atau anti-PDI pada permukaan trombosit yang baru terbentuk seperti yang dispekulasikan oleh Lin dkk,⁷⁰ (2) berkurangnya partikel virus yang terdapat dalam trombosit yang berkorelasi dengan jumlah trombosit, sesuai dengan penelitian yang dilakukan Noisakran dkk.⁵⁰ (3) mulai berkurangnya produksi sitokin atau faktor lain oleh sel endotel dan sel yang terinfeksi lainnya, sehingga tidak banyak trombosit yang teraktivasi. Pada penelitian terdahulu didapatkan bahwa produksi sitokin atau faktor lain tersebut lebih banyak pada pasien dengan jumlah trombosit $\leq 1 \times 10^5/\mu\text{l}$.^{51,52}

V.6. Pengujian adanya pengenalan PDI trombosit oleh anti-NS1 dalam serum sampel.

Cheng dkk telah membuktikan adanya pengenalan PDI trombosit oleh anti-NS1 dari mencit yang dihiperimunisasi dengan NS-1 rekombinan.¹⁷ Pada penelitian ini dilakukan pemaparan ekstrak trombosit oleh serum pasien infeksi Dengue akut dengan menggunakan metoda *western blot*. Untuk menghindari adanya reaksi penyerta lain maka digunakan ekstrak trombosit donor golongan darah O. Pada hasil *immunoblotting* yang diinkubasi baik dengan serum pasien kontrol negatif (membran 2, 3, 4) maupun dengan serum pasien Dengue (membran 5 dan 6) menunjukkan pola yang sama yaitu adanya pita pada berat molekul sekitar 128-130 KDa yang sesuai dengan molekul GPIIb, 95-97 KDa yang sesuai dengan GPIIIa, dan 48-50 KDa yang sesuai dengan ERp57, tapi tidak didapatkan gambaran pita dengan berat molekul 55-58 KDa yang sesuai dengan berat molekul PDI (gambar IV.4). Adanya pola tersebut mungkin dikarenakan (1) adanya aktivitas anti-trombosit pada serum normal sehingga hasil *western blot* tidak bisa diinterpretasikan, (2) adanya reaksi antibodi “normal” yang sudah berikatan pada trombosit, (3) adanya reaksi *HRP conjugated goat anti-human* yang digunakan terhadap protein-protein trombosit tersebut. Pada saat ini kemungkinan (1) dan (2) belum dapat dipastikan. Kemungkinan (3) telah terbukti dengan menginkubasi ekstrak protein trombosit menggunakan antibodi sekunder.

Tidak nampaknya pita pada protein yang sesuai dengan PDI trombosit bukan berarti antibodi tidak mengenali PDI trombosit tapi kemungkinan (1) dikarenakan sedikitnya PDI trombosit sehingga tidak memberikan gambaran pita, (2) dikarenakan banyaknya molekul PDI pada GPIIb, GPIIIa dan ERp 57 yang dapat dikenali oleh antibodi pada serum.

ERp57 merupakan salah satu anggota keluarga PDI atau suatu *multiple thiol disulfide oxidoreductase* yang homolog dengan PDI dan diduga juga berperan dalam proses agregasi trombosit,^{54,73,73} sedangkan pada subunit β GPIIb/IIIa mengandung PDI.⁴¹ Dikarenakan pada NS1 terdapat 12 residu sistein maka anti-NS1 mengenali beberapa protein permukaan trombosit yang juga mengandung residu sistein.

Pada membran PVDF ekstrak trombosit yang diinkubasi dengan mAb anti-PDI dan mAb anti-NS1 DEN 3 diperoleh gambaran pita dengan kekuatan yang bervariasi pada protein dengan berat molekul 128-130 KDa yang sesuai dengan GPIIb, 95-97 KDa yang sesuai dengan GPIIIa, 58-60 KDa yang sesuai dengan PDI dan 48-50 KDa yang sesuai dengan ERp 57. Namun pada membran ekstrak trombosit yang diinkubasi dengan mAb anti-PDI nampak adanya pita yang tipis pada protein dengan berat molekul 52-55 KDa dan 40-43 KDa, protein trombosit yang belum dapat diidentifikasi. Pada penelitian sebelumnya, yang menggunakan PDI murni, telah didapatkan adanya anti-PDI dalam serum pasien dengan anti-NS1 (+) yang juga bereaksi dengan PDI atau protein yang mengandung PDI pada permukaan trombosit.⁷⁵

Dari penelitian ini disimpulkan adanya kemungkinan aktivitas anti-NS1 sebagai anti-PDI permukaan trombosit, namun mekanisme trombositopenia pada infeksi Dengue akut dipengaruhi juga oleh berbagai faktor. Tidak terekspresinya protein yang dikenali oleh anti-NS1 atau anti-PDI pada permukaan trombosit baru menyebabkan tidak diopsonisasinya trombosit pada demam hari ke7 dan menurunkan terjadinya bersihan trombosit oleh makrofag. Selain itu adanya kemungkinan pengenalan antibodi yang terdapat pada serum pasien Dengue terhadap protein GPIIb dan GPIIIa yang mengandung molekul PDI serta Erp57 yang termasuk anggota keluarga PDI. Sedangkan anti-NS1 DEN3 tidak hanya mengenali PDI trombosit tapi juga dapat mengenali GPIIb, GPIIIa, dan Erp57 yang juga dikenali oleh antibodi pada serum pasien dan mAb anti-PDI. Dengan demikian maka tujuan penelitian untuk melihat adanya peningkatan aktivitas anti-NS1 terhadap PDI trombosit sebagai salah satu patomekanisme trombositopenia belum dapat dipastikan.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Terdapat korelasi negatif lemah antara OD anti-NS1 dengan jumlah trombosit yang semakin kuat pada demam hari ke5.
2. Terdapat pengikatan antibodi dalam serum pasien pada PDI permukaan trombosit, namun tidak terjadi pada semua pasien infeksi Dengue akut.
3. Ada korelasi positif lemah antara OD anti-NS1 dengan anti-PDI yang kemudian berubah menjadi negatif pada demam hari ke 5 pada kelompok IgG anti-dengue positif (+) dan jumlah trombosit kurang dari $1 \times 10^5 / \mu\text{L}$.
4. Kemungkinan pengenalan antibodi dalam serum pasien terhadap molekul GPIIb, GPIIIa, dan ERp 57 yang juga merupakan molekul yang mengandung PDI, belum dapat dipastikan.

6.2. Saran

- Perlu dilakukan penelitian lanjut dengan jumlah sampel yang lebih besar dan waktu pemeriksaan yang lebih lama (masa akut hingga masa konvalesen) untuk melihat kinetika anti-NS1 atau anti-PDI lebih jauh.
- Perlu dilakukan pengujian Western blot ulang dengan menggunakan *HRP conjugated goat anti-human* yang berbeda.
- Perlu eksplorasi lebih jauh tentang adanya reaksi silang anti-NS1 terhadap molekul yang terdapat pada GP IIa, GP IIIb, ERp 57, dan protein lainnya yang berhubungan dengan kejadian trombositopenia pada infeksi Dengue.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organisation. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever.2009. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
2. World Health Organisation. Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. 2008. URL: http://www.saero.who.int/LinkFiles/Dengue_dengue-SEAR-2008
3. Malavige G.N, Fernando S,FernandoD.J, Seneviratne S.L. Review:Dengue Viral Infections.Postgraduated Medical Journal. 2004;80:588-601
4. Lei H-Y, Huang K-J, Lin Y-S, Yeh T-M, Liu H-S, Liu C-C. Immunopathogenesis of Dengue Haemorrhagic Fever. American Journal of Infectious Diseases.Taiwan.2008;4(1):1-9.
5. Rothman A.L. Review Series. Dengue: Defining Protective Versus Pathologic Immunity. The Journal of Clinical Investigation.2004;113(7):946-51.
6. Neilsen D.G. Review: The Relationship of Interacting Immunological Components in Dengue Pathogenesis. Virology Journal.2009;6:211-7
7. Lei H-Y, Yeh T-M, Liu H-S, Lin Y-S, Chen S-H, Liu C-C. Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. Journal Biomedical Science.2001;p.377-388.
8. Pang T, Cardoso M.J, Guzman M.G.Review: Of Cascade and Perfect Storms: the Immunopathogenesis of Dengue Haemorrhagic Fever-Dengue Shock Syndrome (DHF/DSS). Journal Immunology and Cell Biology.2007;85:43-45.
9. Lin Y-S, Yeh T-M, Lin C-F, Wan S-W, Chuang Y-C, Hsu T-K, et.al. Minireview: Molecular Mimicry Between Virus and Host, and Its Implications for Dengue Disease Pathogenesis.Journal Experimental Biology and Medicine.2011;236:515-23.
10. Mourao M.P.G, Lacerda M.V.G, Macedo V.O, Santos J.B. Thrombocytopenia in Patients with Dengue Virus Infection in the Brazilian Amazon. Journal Platelets.2007;18(8):605-12.

11. Hottz E, Tolley N.D, Zimmerman G.A, Weyrich A.S, Bozza F.A. Platelets in Dengue Infection. *Drug discovery today: Disease Mechanisms/ Haematology*.Elsevier.2011;8(1-2):e33-8
12. Honda S, Saito M, Dimaano E.M, Morales P.A, Alonzo M.T.G, Suarez L-A.C, dkk. Increased Phagocytosis of Platelet from Patients with Secondary Dengue Virus Infection by Human Macrophages. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 2009;80(5):841-5.
13. Shu P-Y, Chen L-K, Chang S-F, Yueh Y-Y, Chow L, Chien L-J, dkk. Dengue NS1-Specific Antibody Responses: Isotype Distribution and Serotyping in Patients with Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic Fever. *Journal of Medical Virology*.2000;62;224-32.
14. Lin C-F, Lei H-Y, Liu C-C, Liu H-S, Yeh T-M, Anderson R, Lin Y-S. Patient and Mouse Antibodies against Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Cross-React with Platelets and Cause Their Dysfunction or Depletion. *American Journal of Infectious Diseases*.2008;4(1):69-75
15. Huang K-J, Lin Y-S, Liu H-S, Yeh T-M, Liu C-C, Lei H-Y. Generation of Anti-platelet Autoantibody During Dengue Virus Infection. *American Journal of Infectious Diseases*.2008;4(1):50-9.
16. Sun D-S, King C-C, Huang H-S, Shih S-L, Lee C-C, Tsai W-J, Yu C-C, Chang H-H. Antiplatelet Autoantibodies Elicited by Dengue Virus Non-Structural Protein 1 Cause Thrombocytopenia and Mortality in Mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.2007;5:2291-9
17. Cheng H-J, Lei H-Y, Lin C-F, Luo Y-H, Wan S-W, Liu H-S, Yeh T-M, Lin Y-S. Anti-Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Antibodies Recognize Protein Disulfide Isomerase on Platelets and Inhibit Platelet Aggregation. *Molecular Immunology*.2009;47:398-406
18. Jacobs M.G,Robinson P.J, Bletchly C, Mackenzie J.M, Young P.R. Dengue Virus Nonstructural Protein 1 is Expressed in a Glycosylphosphatidylinositol-linked form that is Capable of Signal Transduction.*FASEB J*.2000;14:1603-10

19. Manickam N, Sun X, Li M, Gazitt Y, Essex D.Y. Protein Disulphide Isomerase in Platelet Function. *British Journal of Haematology*.2007;140:223-9.
20. Essex D.W, Li M. Protein Disulfide Isomerase Mediates Platelet Aggregation and Secretion(Abstrak).*Br J.Haematol*.1999;140(3):448-54
21. Lahav J, Gofer D.N, Lubashitz J, Hess O, Shaklai M. Protein Disulfide Isomerase Mediates Integrin-Dependent Adhesin(Abstrak). *FEBS Lett*.2000;475(2):88-92
22. Guzman M.G, Halstead S.B, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler D.J,dkk. Evaluating Diagnostics. Dengue: a Continuing Global Threat. *Nature Review Microbiology*.2010;p.7-16.URL: (www.nature.com/reviews/micro)
23. Beasley D.W.C, Barret A.D.T. The Infectious Agent. In: Halstead S.B.editors.Dengue.Tropical Medicine Science and Practice. 5thVol.London.Imperial College Press; 2008. p.29-72
24. Lindenbach B.D, Thiel H-J, Rice C.M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In Knipe D.M, Howley P.M. editors.Fields Virology. 5th ed. Philadelphia Lippincott-Ravens;2007.p.1101-52
25. Seema, Jain S.K. Molecular Mechanism of Pathogenesis of Dengue Virus: Entry and Fusion with Target Cell. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*.2005;20(2):92-103
26. Clyde K, Kyle J.L, Harris E. Minireview: Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis.*Journal of Virology*.2006;80(23):11418-31
27. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, dkk. Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate. *E.Plos Pathogen*.2007;3(11):1798-812.
28. Saito M, Oishi K, Inoue S,Dimaano E.M, Alera M.T.P, dkk. Association of Increased Platelet-Associated Immunoglobulin with Thrombocytopenia and the Severity of Disease in Secondary Dengue Virus Infection. *ClinicalExperiment Immunology*. 2004;138:299-30

29. Chen M-C, Lin C-F, Lei H-Y, Lin S-C, Liu H-S, Yeh T-M, dkk. Deletion of the C-Terminal Region of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Abolishes Anti-NS1-Mediated Platelet Dysfunction and Bleeding Tendency. *The Journal of Immunology*.2009;183;1797-803
30. Hillgard P, Stockert R.Heparan Sulfate Proteoglycans Initiate Dengue Virus Infection of Hepatocytes. *Hepatology*.2000;32(5);1069-77
31. Rey F.A. Cometary: Dengue Virus Envelope Glycoprotein Structure: New Insight Into Its Interactions During Viral Entry. *PNAS*.2003;100(12);6899-901
32. Gubler D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998;11(3):480-96.
33. Lin C-F, Lei H-Y, Shiau A-L, Liu H-S, Yeh T-M, Chen S-H, dkk. Endothelial Cell Apoptosis Induced by Antibodies Against Dengue Virus Non-structural Protein 1 via Production of Nitric Oxide. *The Journal of Immunology*.2002;169:657-64
34. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X-N, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, dkk. Original Antigenic Sin and Apoptosis in the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Nature Medicine*.2003;9(7):921-7.
35. Halstead S.B. Dengue. *Lancet*.2007;370:1644-52. (www.thelancet.com)
36. Beltramello M, Williams K.L, Simmons C.P, Macagno A, Simonelli L, Quyen N.T.H, et.al. The Human Immune Response to Dengue Virus is Dominated by Highly Cross-Reactive Antibodies Endowed with Neutralizing and Enhancing Activity. *Cell Host & Microbe*.2010;8:271-83
37. Rothman A.L. Immunology and Immunopathogenesis of Dengue Disease. *ADENV. Virus Res*. 2003;60:397-419
38. Blacksell SD. The Importance of Combo Test to Determine Dengue Infection: WHO experiences with rapid test . Jakarta, One day Symposium: All about Dengue, 2012
39. Italiano J.E. Jr, Hartwig J.H. Megakaryocyte Development and Platelet Formation. In: Michelson A.D. editors. *Platelet*, 2nd ed. San Diego. Academic Press. Elsevier ;2007.p. 23-44.

40. White J.G. Platelet structure. In: Michelson A.D. editors. Platelet. 2nd ed.: San Diego. Academic Press. Elsevier. 2007; p. 117-43.
41. Kekomaki R. Platelet Function and Immune Response. *Journal Pediatric Hematology Oncology*. 2003;3(1):19-23
42. Clemetson K.J, Clemetson J.M. Platelet Receptors. In Michelson A.D. editor. Platelets. 2nd ed. San Diego. Academic Press. Elsevier. 2007; p. 117-43.
43. Lefkovits J, Plow E.F, Topol E.J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. In Epstein F.H. editor. Mechanisms of Disease. 2006; vol 332(23):1553-9.
44. Peter K. Platelet Integrins and Signaling. In Quinn M, Fitzgerald D. Editors. Platelet Function. New Jersey; Humana Press Inc; 2005. p. 21-42
45. Beardsley D.J.S, Tang C, Chen B.G, Lamborn C, Gomes E, Srimatkandada V. Abst: The Sulfide-rich Region of Platelet Glycoprotein (GP)IIIa contains Hydrophilic Peptide Sequences that Bind Anti GPIIIa Autoantibodies from Patients with Immune Thrombocytopenia Purpura. *Biophysical Chemistry*; 2003; 105:503-15.
46. Kekomaki R, Dawson B, McFarland J, Kunicki T.J. Localization of Human Platelet Autoantigens to the Cysteine-rich Region of Glycoprotein IIIa. *Journal Clinical Investigation*. 1991; 88:847-54.
47. La Russa VF, Innis BL. Abstr: Mechanisms of Dengue Virus-Induced Bone Marrow Suppression. *Baillieres Clin Haematol*. 1995; 8(1):249-79
48. Basu A, Jain P, Gangodkar S.V, Shetty S, Ghosh K. Dengue 2 Virus Inhibits in Vitro Megakaryocytic Colony Formation and Induces Apoptosis in Thrombopoietin-Inducible Megakaryocytic Differentiation From Cord Blood CD34+ Cells. *FEMS Immunology Medicine Microbiology*. 2008; 53:46-51.
49. Mourao M.P.G, Lacerda M.V.G, Macedo V.O, Santos J.B. Thrombocytopenia in Patients With Dengue Virus Infection in the Brazilian Amazon. *Journal Platelets*. 2001; 18(8):605-12.
50. Noisakran S, Gibbons R.V, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, dkk. Detection of Dengue Virus in Platelets Isolated from

- Dengue Patients. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*.2009;40(2):253-62
51. Krisnhamurti C, Peat R.A, Cutting M.A, Rothwell S.W. Platelet Adhesion to Dengue-2 Virus Infected Endothelial Cells. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*.2002;66(4):435-41.
 52. Souza D.G, Fagundes C.T, Sausa L.P, Amaral F.A, Sauza R.S, Souza A.L,dkk.Essential Role of Platelet-Activating Factor Receptor in The Pathogenesis of Dengue Virus Infection.*PNAS*.2009;106(33):14138-43
 53. Hatahet F, Ruddock L.W. Minireview: Substrate Recognition by The Protein Disulfide Isomerase. *The FEBS Journal*;2007;274:5223-34.
 54. Ellgaard L, Ruddock L.W. Review. The Human Protein Disulphide Isomerase Family: substrate interactions and functional properties. *Embo Reports*.2005;6(1):28-32
 55. Jordan dkk. Comment: A New Regulatory Disulfide Isomerase on The Platelet. *Blood*.2005;105(4):1378-9.
 56. Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. Proteins of the PDI Family: Unpredicted Non-ER Locations and Functions. *Journal of Cellular Physiology*.2002;193:154-163
 57. Pirneskoski A. The Significance of the Domains of Protein Disulfide Isomerase for the Different Functions of the Protein (Dissertation).*Acta Universitatis Ouluensis Medica*.2003;758 URL: (<http://herkules.oulu.fi/isbn9514271726/isbn9514271726.pdf>)
 58. Manickam N, Sun X, Li M, Gazitt Y, Essex D.Y, Protein disulphide isomerase in platelet function. *British journal of Haematology*;2007;140:223-9.
 59. Chen K. Detwiler T.C, Essex D.W. Characterization of Protein Disulfide Isomerase Released from Activated Platelets. *British Journal of Haematology*.1995;90:425-431
 60. Burgess JK, Hotchkiss KA, Suter C, Dudman NP, Szöllösi J, Chesterman CN, Chong BH, Hogg PJ. Physical Proximity and Functional Association of Glycoprotein 1b alpha and Protein Disulfide Isomerase on the Platelet Plasma Membrane. *J.Biol.Chem*;2000;275(13):9758-66

61. Essex DW, Li M. Redox Modification of Platelet Glycoprotein(Abstrak). *Current Drugs Targets*.2006;7(10):1233-41
62. Lahav J, Gofer DN, Lubashitz J, Hess O, Shaklai M. Protein Disulfide Isomerase Mediates Integrin-Dependent Adhesin (abstrak). *FEBS Lett*.2000;475(2):88-92
63. Hogg PJ. Review:Disulfide Bonds as Swithches for Protein Function.*Trends in Biochemical Sciences*.2003;28(4):210-14
64. Bell SE, Shah CM, Gordge MP. Protein Disulfide Isomerase Mediates Delivery of Nitric Oxide Redox Derivatives into Platelet. *Biochemical Journal*.2007;403(2):283-288
65. Reinhardt C, Von Brühl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, dkk. Protein Disulfide Isomerase acts as an Injury Response Sinyal that Enhances Fibrin Generation via Tissue Factor Activation (abstrak). *Journal Clinical Investigation*.2008;118(3):1110-22
66. Manukyan D, Von Bruehl ML, Massberg S, Engelmann B. Protein Disulfide Isomerase as a Trigger for Tissue Factor Dependent Fibrin Generation(abstrak). *Thrombosis Respiration*.2008;122:19-22
67. Shu P-Y, Chen L-K, Chang S-F, Yueh Y-Y, Chow L, Chien L-J, dkk. 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. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.2003;10(4):622-30
68. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of The Antigen in The Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections.*Journal of Clinical Microbiology*.2002;40(2):376-81
69. Berry J.E, Murohy C.M, Smith G.A, Ranasinghe E, Finberg R, Walton J, dkk. Detection of Gov System Antibody by MAIPA Reveals an

- Immunogenicity Similar to The HPA-5 Alloantigens. *British Journal of Haematology*.2000;110:735-42
70. Lin C-F, Lie H-Y, Liu C-C, Liu H-S, Yeh T-M, Wang S-T, dkk. Generation of IgM Anti Platelet Autoantibody in Dengue Patients.*Journal of Medical Virology*.2001;63:143-9
71. Pannerden H.E.V.N, Dijk A.M.V, Du V, Heijnen H.F.G. Platelet Protein Disulfide Isomerase is Localized in The Dense Tubular System and Does Not Become Surface Expressed After Activation. *Blood Journal*. 2009;3:1-9
72. Rachman A. Identifikasi Salah Satu Mekanisme Trombositopenia pada Infeksi Virus Dengue: Telaah Khusus pada Antibodi Terhadap Protein Non-Struktural Tipe I Virus Dengue dan Target Epitop GPIIb/IIIa pada Permukaan Trombosit (disertasi).Jakarta:FKUI;2009.
73. Holbrook L-M, Watkins N.A, Simmonds A.D, Jones C.I, Ouwehand W.H, Gibbins J.M. Platelet Release Novel Thiol Isomerase Enzymes Which are Recruited to The Cell Surface Following Activation. *British Journal of Haematology*.2009;148:627-37
74. Frickel E-M, Frei P, Bouvier M, Stafford W.F, Helenius A, Glockshuber R, Ellgaard L. ERp 57 Is a Multifunctional Thiol-Disulfide Oxidoreductase.*The journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(18):18277-87
75. Widhyasih R.M. Korelasi Kinetika Anti-Non-Struktural 1 Virus Dengue dan Anti-Protein Disulfida Isomerase pada Infeksi Dengue Sekunder Terhadap Hambatan Fungsi Agregasi Trombosit (tesis). Jakarta:FKUI;2012.