

**PERBANDINGAN *Dried Blood Spot* (DBS) DAN SAMPEL SERUM
DALAM MENGUKUR SEROPREVALENSI DENGUE PADA
KOMUNITAS DEWASA SEHAT DI KOTA MAKASSAR INDONESIA**

**COMPARISON OF *Dried Blood Spot* (DBS) AND SERUM SAMPLES
FOR MEASURING DENGUE SEROPREVALENCE IN HEALTHY ADULT
COMMUNITY IN MAKASSAR INDONESIA**

NURSEHANG

P062211022



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024

**PERBANDINGAN *Dried Blood Spot* (DBS) DAN SAMPEL SERUM
DALAM MENGUKUR SEROPREVALENSI DENGUE PADA
KOMUNITAS DEWASA SEHAT DI KOTA MAKASSAR INDONESIA**

Tesis

Sebagai Salah satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

NURSEHANG

Kepada

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**PERBANDINGAN *Dried Blood Spot* (DBS) DAN SAMPEL SERUM DALAM
MENGUKUR SEROPREVALENSI DENGUE PADA KOMUNITAS DEWASA
SEHAT DI KOTA MAKASSAR INDONESIA**

Disusun dan diajukan oleh

NURSEHANG

Nomor Pokok: P062211022

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister **Program Studi Ilmu Biomedik Sekolah
Pascasarjana Universitas Hasanuddin**
pada tanggal 18 Januari 2024
dan telah dinyatakan memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama



dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., Ph.D., Sp.MK(K)
NIP. 196909181996032001

Pembimbing Pendamping



dr. Isra Wahid, S.Ked., Ph.D
NIP. 196812271996021001

Ketua Program Studi Ilmu Biomedik



Prof.dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D., Sp.PD, K-HOM
NIP. 196802181999032002

Dekan Fakultas/Sekolah Pascasarjana



Prof.dr. Budu, Ph.D., Sp.MK(K).M.Med ed
NIP. 196612311995031009

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Nursehang
Nomor Mahasiswa : P062211022
Program Studi : Ilmu Biomedik

Saya dengan tegas menyatakan bahwa tesis ini benar-benar karya saya sendiri dan tidak mengambil ide atau tulisan orang lain. Saya bersedia menerima sanksi jika di kemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini berasal dari karya orang lain.

Makassar, 7 November 2023



Yang menyatakan


Nursehang

PRAKATA

Bismillahir Rahmanirrahim

Assalamu Alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur kehadirat Allah SWT. atas limpahan rahmat dan karunia-Nya yang senantiasa tcurahkan kepada hamba-Nya, shalawat serta salam atas junjungan Rasulullah Muhammad SAW. yang sampai detik ini sebagai panutan hingga akhir hayat. Alhamdulillah setelah banyak tantangan dan kendala, hingga penulis mampu untuk menyelesaikan tesis ini yang berjudul “Perbandingan *Dried Blood Spot (DBS)* dan Sampel Serum dalam Mengukur Seroprevalensi Dengue pada Komunitas Dewasa Sehat di Kota Makassar Indonesia”.

Terimakasih tak terhingga dari lubuk hati yang tulus penulis ucapkan kepada dua orang penting dalam hidup penulis, sosok cinta pertama, ayahanda Tamodding dan sahabat sejati, ibunda Cappo atas cinta, kasih sayang dan materi yang tidak bisa diukur dengan apapun di dunia. Doa yang mustajab hingga menembus langit membawa penulis sampai pada titik ini. Kepada saudaraku dan saudara iparku, kakak tercinta Sudirman, Sudarmi dan Nurtina, adik tersayang Abd. Rahman, serta kakak ipar terkasih Samsul, Dzul Haidir dan Nur Eni yang telah banyak membantu, men-support dalam segala hal, ketika penulis mulai merasa putus asa, *down* hingga rasanya ingin menyerah, mereka selalu ada.

Kepada dosen pembimbing atas waktu luang, ide, pengetahuan, tenaga, ilmu, dan fikiran untuk membantu penulis menyelesaikan tesis ini, penulis mengucapkan terimakasih yang teramat dalam kepada dr. Rizalinda Sjahril, M.SC., PhD., Sp.MK sebagai pembimbing utama dan dr. Isra Wahid, PhD sebagai pembimbing kedua. Begitupun kepada jajaran dosen penguji Ms Joelle Ivy Rosser, MD.,MS, dr. Sudirman Katu, Sp.PD dan Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes atas saran dan masukan yang sangat berarti dan membangun bagi penulis demi terciptanya tesis ini, penulis ucapkan banyak terimakasih.

Banyak cerita dan kenangan seiring menyelesaikan tesis ini dari orang-orang yang ada disekitar penulis yang memberi pesan dan kesan bagi penulis, maka dari itu dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih yang begitu besar kepada:

1. Prof. Jamaluddin Jompa, M.Sc selaku Rektor Universitas Hasanuddin.
2. Prof. dr. Budu., Ph. D., Sp. M(K).,M.Med.Ed selaku Dekan Sekolah Pascasarjana, Universtas Hasanuddin.
3. dr. Rahmawati, Ph.D.,Sp.PD-KHOM., FINASIM selaku Ketua Prodi Ilmu Biomedik, Sekolah Pascasarjana Univeristas Hasanuddin.
4. Dr. dr. Ika Yustisia, S.Ked., M.Sc selaku pembiming akademik yang telah mengarahkan penulis sekaligus konsultasi terkait penelitian tugas akhir.
5. H. Andi Irwan Hamid, S.Sos selaku Bupati Kabupaten Pinrang dan jajaran Dinas Pendidikan Kabupaten Pinrang yang telah memberi

bantuan beasiswa Pemda yang sangat membantu penulis selama masa studi hingga selesai.

6. Murni, S.Si dan Nurul Fausiah, S.Si selaku partner penelitian, suka duka kami lalui bersama, serta teman-teman di Laboratorium Entomologi atas bantuan dan semangat bagi penulis dari awal penelitian hingga selesai.
7. Keluarga besar BTA 8 Jakarta Cab. Sul-Sel yang turut men-*support* dan mendoakan penulis selama proses penyelesaian studi.

Sudah menjadi harapan penulis agar tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan.

Makassar, 7 November 2023

Penulis

ABSTRAK

NURSEHANG. *Perbandingan Dried Blood Spot (DBS) dan Sampel Serum dalam Mengukur Seroprevalensi Dengue pada Komunitas Dewasa Sehat di kota Makassar Indonesia* (dibimbing oleh Rizalinda Sjahril dan Isra Wahid).

Demam berdarah dengue (DBD) disebabkan oleh virus dengue (DENV) yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti*, meliputi empat serotipe (DENV 1 sampai 4). Secara umum serum digunakan untuk mendeteksi antibodi anti-dengue IgG, *Dried blood spot* (DBS) merupakan metode yang lebih mudah untuk pengumpulan, transportasi, dan penyimpanan sampel dibandingkan dengan serum.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas DBS dalam mendeteksi antibodi dengue IgG menggunakan metode ELISA dengan membandingkan hasilnya dengan sampel serum dari individu yang sama. Sejumlah total 73 sampel DBS dan serum diperoleh dari pendonor sehat pada kegiatan donor darah oleh Palang Merah Indonesia kota Makassar.

Dengan menggunakan kit ELISA dengue IgG tidak langsung (Panbio, Australia). Hasil pemeriksaan menunjukkan seropositif sebesar 82% (60 dari 73) dari DBS dibandingkan dengan 89% (65 dari 73) dari sampel serum. Dengan menggunakan serum sebagai standar, penelitian ini menunjukkan bahwa DBS hasil pemeriksaan ELISA memiliki sensitivitas 92%, spesifisitas dan nilai prediksi positif (NPP) 100%, sedangkan nilai prediksi negatif (NPV) 62%.

Penelitian ini menekankan potensi DBS sebagai alternatif yang ramah lapangan untuk survei seroprevalensi. Selain itu, penelitian ini juga memberikan informasi mengenai tingkat paparan yang tinggi terhadap virus dengue pada populasi dewasa sehat di kota Makassar, yang mengkonfirmasi endemisitas virus di kota tersebut.

Kata Kunci: DBS, Serum, Dengue, Seroprevalensi

ABSTRACT

NURSEHANG. *Comparison Of Dried Blood Spot (DBS) And Serum Samples For Measuring Dengue Seroprevalence In Healthy Adult Community In Makassar Indonesia* (Supervised by Rizalinda Sjahril dan Isra Wahid).

Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) is caused by the dengue virus (DENV), transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito, encompassing four serotypes (DENV 1 to 4). Generally, serum is employed to detect anti-dengue IgG antibodies, while Dried Blood Spot (DBS) serves as a more convenient method for the collection, transportation, and storage of samples compared to serum.

This research aims to evaluate the effectiveness of DBS in detecting dengue IgG antibodies using the ELISA method, comparing the results with serum samples from the same individuals. A total of 73 DBS and serum samples were obtained from healthy blood donors during blood donation activities conducted by the Indonesian Red Cross in the city of Makassar.

By utilizing the indirect dengue IgG ELISA kits (Panbio, Australia), the examination results revealed a seropositivity rate of 82% (60 out of 73) for DBS compared to 89% (65 out of 73) for serum samples. By using serum as the standard, this study indicates that DBS ELISA examination results have a sensitivity of 92%, specificity, and positive predictive value (PPV) of 100%, while the negative predictive value (NPV) is 62%.

This study emphasizes the potential of Dried Blood Spot (DBS) as a field-friendly alternative for seroprevalence surveys. Additionally, the research provides information on the high level of exposure to the dengue virus in the healthy adult population in the city of Makassar, confirming the endemic nature of the virus in that urban area.

Keywords: DBS, Serum, Dengue, Seroprevalance

DAFTAR ISI

Sampul Judul Luar	i
Sampul Judul Dalam	ii
Lembar Pengesahan Tesis	3
Pernyataan Keaslian Tesis	4
Kata Pengantar	5
Abstrak	8
Abstract	9
Daftar Isi	10
Daftar Tabel	12
Daftar Gambar	13
Daftar Lampiran	14
Bab I. Pendahuluan	15
A. Latar Belakang	15
B. Rumusan Masalah	17
C. Tujuan Penelitian	18
D. Manfaat Penelitian	18
E. Ruang Lingkup	19
Bab II Tinjauan Pustaka	20
A. Dengue	20
B. Respon Imunitas terhadap Dengue	31
C. Vaksin Dengue	36
D. <i>Enzyme Lincked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA)	45
E. Metode <i>Dried Blood Spot</i> (DBS)	54

F. Kerangka Teori	61
G. Kerangka Konsep	62
H. Hipotesis	63
Bab III Metode Penelitian	64
A. Rancangan Penelitian	64
B. Tempat Dan Waktu Penelitian	64
C. Populasi Dan Teknk Pengambilan Sampel	65
D. Instrumen Pengumpulan Data	66
E. Analisis Data	66
F. Prosedur Penelitian	67
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	71
A. Hasil	71
B. Pembahasan	75
BAB V PENUTUP	80
A. Kesimpulan	80
B. Saran	80
Daftar Pustaka	81
Lampiran 1 Pengambilan Sampel DBS	88
Lampiran 2 Pengambilan Sampel Serum	89
Lampiran 3 Uji Correlation Spearman	90
Lampiran 4 Uji T-Test	91
Lampiran 5 Test Diagnostik	92

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Klasifikasi Demam Dengue	26
Tabel 2. Kriteria Penegakan Diagnosis DBS	27
Tabel 3. Profi Kandidat Vaksin Dengue	43
Tabel 4. Contoh Kualitas Hasil Spot pada Sampel DBS	57
Tabel 5. Hasil Seropositif DBS dan Serum berdasarkan Jenis Kelamin dan Umur	71
Tabel 6. Test Diagnostik DBS dibandingkan dengan Serum	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur Flavavirus	22
Gambar 2. Protein Flavavirus	22
Gambar 3. Serologi IgM dan IgG pada Infeksi Dengue	29
Gambar 4. Respon Imunitas terhadap DBD	33
Gambar 5. Skema Imunitas Heterolog	34
Gambar 6. Respon Antibodi Heterolog	34
Gambar 7. Perjalanan Penyakit DBD	35
Gambar 8. Prosedur Umum Pemeriksaan ELISA	46
Gambar 9. Pemeriksaan ELISA Langsung	47
Gambar 10. Pemeriksaan ELISA Tidak Langsung	48
Gambar 11. Pemeriksaan ELISA Sandwich	49
Gambar 12. Pemeriksaan ELISA Kompetitif	52
Gambar 13. Prosedur Sampling DBS	56
Gambar 14. Perbandingan Peralatan Sampling DBS vs Serum	59
Gambar 15. Scattergraph Distribusi Nilai ELISA dan Korelasi pada DBS dan Serum	72
Gambar 16. Perbandingan Boxplot Distribusi Nilai ELISA antara DBS dan Serum	73
Gambar 17. Distribusi Hasil ELISA Dengue IgG pada DBS vs Serum	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Pengambilan Sampel DBS	88
Lampiran 2 Pengambilan Sampel Serum	89
Lampiran 3 Uji Correlation Spearman	90
Lampiran 4 Uji T-Test	91
Lampiran 5 Test Diagnostik	92

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Demam berdarah dengue (DBD) adalah penyakit demam yang disebabkan oleh virus dengue (DENV) yang menyebar melalui gigitan nyamuk. Virus dengue ini terdiri dari empat serotipe yang berbeda, yaitu serotipe DENV 1 hingga 4.. Keempat serotipe DENV telah muncul dari galur sylvatic di hutan Asia Tenggara. Secara umum, saat ini DENV merupakan penyebab dari penyakit arboviral secara global, dan keempat serotipe DENV dapat ditemukan di seluruh dunia. Lebih dari 100 negara di dunia terpengaruh oleh penyakit ini, terutama mempengaruhi 2,5 miliar penduduk di daerah tropis dan subtropis. *World Health Organisation* (WHO) memperkirakan kejadian tahunan sekitar 100 juta infeksi, dimana sekitar 500.000 orang terkena demam berdarah dengue yang memerlukan rawat inap (Anne dan Lundkvist, 2013). Demam berdarah dengue dapat mengakibatkan berbagai gejala klinis yang berbeda, mulai dari gejala paling ringan seperti demam dengue (DD), demam berdarah dengue (DBD) hingga demam dengue disertai syok atau dengue shock syndrome (DSS) (WHO dan Departemen Kesehatan RI, 2003).

Selama 45 tahun terakhir di Indonesia, karakteristik epidemiologi infeksi virus dengue telah mengalami perubahan. Kelompok usia dewasa muda dan dewasa mengalami peningkatan kasus. Kejadian Luar Biasa (KLB) yang

dulunya bersifat siklik kini lebih sering terjadi, dan kasus dengue meningkat setiap tahun. Perubahan pola ini berdampak besar pada pengawasan dan pencegahan yang diperlukan (Karyanti et al, 2014).

Pemeriksaan imunologi IgG/IgM dengue adalah bagian penting dari diagnosis dengue, termasuk antibodi netralisasi, antibodi anti hemaglutinin, dan antibodi anti komplemen. Pengamatan dan analisis antibodi-antibodi ini membantu dalam mengklasifikasikan apakah infeksi tersebut bersifat primer atau sekunder dalam kasus DBD (Changal et al, 2016). Antibodi IgG adalah molekul serum yang memiliki kemampuan untuk menetralkan berbagai mikroorganisme penyebab infeksi, sehingga memberikan tingkat imunitas yang kuat. Selain itu, IgG juga memiliki kemampuan mudah menembus pembuluh darah dan menyebar ke dalam jaringan ekstrasvaskuler, dan melakukan aktivitas antibodi untuk melawan infeksi serta memberikan perlindungan (Musso et al, 2016). Selama infeksi DENV, konsentrasi imunoglobulin G (IgG) spesifik DENV meningkat kemudian akan membentuk kompleks virus baru yang melekat dan diambil oleh sel mononuklear. Setelah infeksi, sel-sel mononuklear sebagian besar mati oleh apoptosis.

Dried Blood Spot (DBS) adalah proses pengumpulan darah lengkap kemudian ditempatkan pada kertas saring dan dikeringkan. Di Indonesia, penggunaan DBS dalam penelitian masih belum umum. Meskipun begitu, Indonesian Family Life Survey (IFLS), yang dilakukan oleh Survey Meter Institute dan Rand Corporation, adalah salah satu studi epidemiologi di

Indonesia yang menggunakan metode DBS. Penelitian ini telah membuktikan efektivitasnya dalam mengumpulkan data (Herningtyas *et al*, 2017). Saat ini, berbagai jenis molekul dapat dideteksi dari sampel DBS, termasuk asam nukleat (DNA dan RNA), seperti cytomegalovirus, herpes simplex virus, virus hepatitis A dan C, dan HIV melalui metode PCR, q-PCR, dan RT-PCR untuk skrining penyakit viral. Selain itu, sampel DBS juga dapat digunakan untuk menguji protein serum seperti hemoglobin terglykosilasi dan antibodi terhadap berbagai patogen. Ini dapat dilakukan dengan menggunakan teknik ELISA. Teknologi ini memungkinkan lebih banyak penelitian dan diagnosis penyakit (Lehmann *et al*, 2013).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti ingin membandingkan sampel DBS dan sampel serum dalam mengukur seroprevalensi dengue pada komunitas dewasa sehat di kota Makassar dengan mendeteksi antibodi dengue IgG menggunakan metode pemeriksaan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

B. Rumusan Masalah

Membandingkan sampel DBS dan serum dalam mengukur seroprevalensi dengue pada komunitas dewasa sehat di kota Makassar menggunakan teknik ELISA.

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Membandingkan penggunaan sampel DBS dan serum dalam mengukur seroprevalensi dengue pada komunitas dewasa sehat di kota Makassar menggunakan metode pemeriksaan ELISA.

2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Membandingkan nilai ELISA IgG dengue antara sampel DBS dan serum.
2. Mengetahui nilai sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatif DBS terhadap serum.
3. Mengetahui seroprevalensi dengue berdasarkan hasil ELISA IgG dengue DBS dan serum pada komunitas dewasa sehat di kota Makassar.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Peneliti

Mengetahui dan mempelajari lebih dalam mengenai teknik pengambilan sampel dengan metode DBS.

2. Manfaat Akademik

Memberikan informasi terkait efektivitas dalam membandingkan sampel serum dan DBS dalam uji serologis

3. Manfaat Kesehatan

Dengan mengetahui luasnya paparan, maka dapat dijadikan sebagai data untuk perencanaan pencegahan dengue sebagai kontrol dimasa yang akan datang terhadap komunitas dewasa sehat di kota Makassar.

4. Manfaat Masyarakat

Memberikan informasi mengenai paparan dengue yang disebabkan oleh vektor nyamuk *Aedes aegypti* dikalangan dewasa sehat khususnya di kota Makassar.

E. Ruang Lingkup

Komunitas dewasa sehat yang melakukan donor darah di Unit Transfusi Darah (UTD) kota Makassar.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Dengue

1. Virus Dengue (DENV)

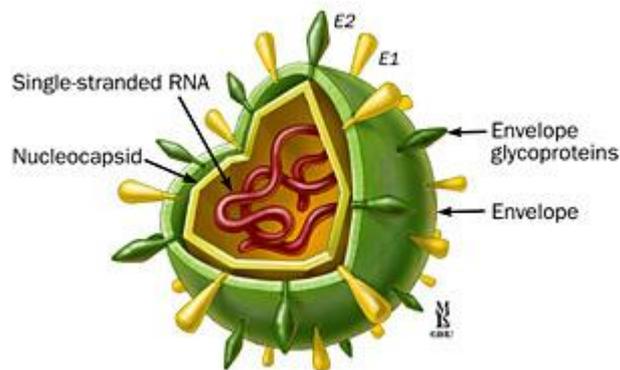
Virus dengue adalah virus yang berasal dari keluarga Flavivirus, genus Flavivirus, dan menyebar melalui nyamuk, terutama *Aedes aegypti*. Menurut hasil uji netralisasi, DENV dapat dibagi menjadi empat jenis: DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4. Lebih dari 50 juta kasus virus dengue terjadi setiap tahun, dan lebih dari 2,5 miliar orang berisiko terinfeksi. Ini adalah penyebab utama penyakit di wilayah tropis dan subtropis. Infeksi salah satu dari empat serotipe DENV dapat mengakibatkan sejumlah hasil klinis yang berbeda. Beberapa kasus infeksi DENV mungkin asimtomatik, sementara yang lain dapat menunjukkan beragam gejala klinis. Gejala tersebut bervariasi mulai dari sindrom flu ringan yang disebut sebagai demam berdarah (DF) hingga bentuk penyakit yang lebih serius, ditandai dengan gangguan pembekuan darah, peningkatan kerentanan pembuluh darah, dan peningkatan permeabilitas (dikenal sebagai demam berdarah dengue [DBD]). Bentuk terakhir ini dapat berkembang menjadi syok hipovolemik, yang dikenal sebagai dengue syok sindrom (DSS) (Byron et al, 2009).

Keempat serotipe virus dengue (DENV1-4) terdiri dari molekul ribonukleat asam (RNA) berpolimer tunggal yang memiliki panjang sekitar 10.700

basa (sebagaimana yang dijelaskan oleh Long et al. pada tahun 2003). Poliprotein tunggal ini dihasilkan dari satu untai terbuka protein yang diperoleh melalui proses pemotongan oleh protein-protein protease virus. Genom virus dengue mengandung informasi genetik yang mengodekan tiga protein struktural utama, yaitu capsid (C), pre-membrane (preM/M), dan envelope (env). Selain itu, terdapat tujuh protein non-struktural yang juga dikodekan oleh genom virus dengue, yakni NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5. Protein-protein ini berperan penting dalam siklus hidup virus dan dalam mengatur respon tubuh terhadap infeksi virus dengue (Kurane, 2007). Protein struktural dan non-struktural dalam virus dengue memiliki peran khusus masing-masing. Protein env dan protein M yang tidak terglykosilasi bertanggung jawab atas pembentukan dua lapisan lipid yang melindungi struktur nukleokapsid DENV. Protein env juga bertanggung jawab atas pengikatannya pada reseptor sel inang dan proses penyatuan membran. Oleh karena itu, protein env berfungsi sebagai imunogen utama dalam infeksi DENV. Protein ini juga memiliki banyak area yang berinteraksi dengan antibodi yang memiliki kemampuan untuk menetralkan virus (Lindenbach, 2007).

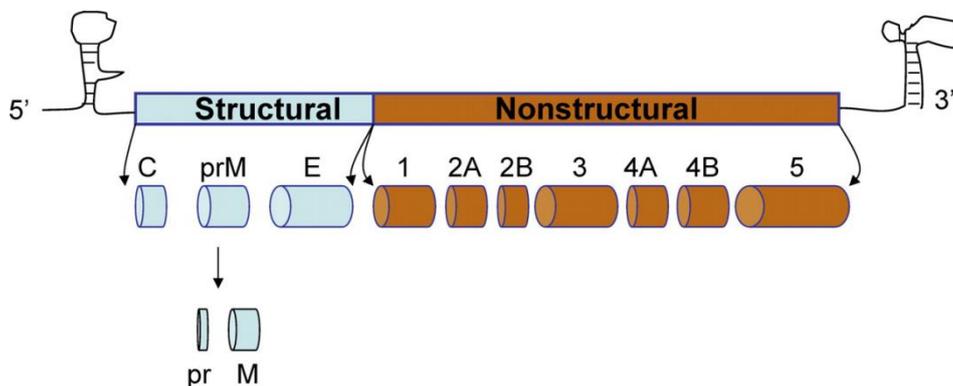
Nukleokapsid virus dengue terbentuk oleh protein C bersama dengan pita RNA tunggal. Ini adalah bagian inti dari virus yang mengandung informasi genetiknya, dan perannya penting dalam replikasi virus dan pembentukan partikel virus yang baru. Protein C dan nukleokapsid membantu menjaga

integritas materi genetik virus dengue selama proses infeksi dan replikasi (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Struktur Flavavirus

(Sumber: <http://www.stanford.edu/group/virus/flavi/2005/virion.jpg>)



Gambar 2. Protein Flavavirus

(Sumber: <http://ebm.rsmjournals.com/content/233/4/401/F1.large.jpg>)

2. Demam Berdarah Dengue (DBD)

Virus dengue yang ditularkan melalui gigitan nyamuk menyebabkan demam dengue akut. Namun, jenis lebih serius dari penyakit ini, demam berdarah dengue, memiliki tanda-tanda kebocoran plasma. DBD terutama memengaruhi anak-anak dan memiliki potensi untuk menyebabkan syok dan

kematian. WHO menyatakan bahwa DBD disebabkan oleh gigitan nyamuk *Aedes* yang terinfeksi salah satu dari empat jenis virus dengue. Manifestasi klinisnya meliputi demam, nyeri otot dan/atau nyeri sendi, disertai oleh gejala seperti leukopenia (jumlah sel darah putih yang rendah), ruam kulit, pembesaran kelenjar getah bening, trombositopenia (jumlah trombosit yang rendah), dan diathesis hemoragik (gejala pendarahan). DBD terjadi kebocoran plasma yang ditandai oleh hemokonsentrasi (peningkatan hematokrit) atau penumpukan cairan di dalam rongga tubuh (Ni Luh, 2019).

3. Epidemiologi Dengue

DBD sering mengincar anak-anak di bawah lima belas tahun. Sekitar lima puluh hingga lima belas tahun adalah usia yang paling rentan terhadap penyakit ini dibandingkan bayi dan dewasa. Nyamuk *Aedes aegypti*, penyebab penyakit dengue, aktif menggigit pada siang hari dalam dua puncak, yaitu antara pukul 08.00 dan 12.00 dan pukul 15.00 dan 17.00 (Ni Luh, 2019).

WHO menyatakan bahwa dari tahun 1968 hingga 2009, Indonesia memiliki jumlah kasus DBD tertinggi di Asia Tenggara. Ada 35 kabupaten/kota di Provinsi Jawa Tengah yang pernah mengalami DBD. Tingkat kejadian (incidence rate, IR) DBD di Provinsi Jawa Tengah pada tahun 2011 adalah sekitar 15,27 kasus per 100.000 penduduk, sebuah penurunan yang signifikan dari 59,8 kasus per 100.000 penduduk pada tahun 2010. Angka kematian (Case Fatality Rate, CFR) akibat DBD di Provinsi Jawa Tengah pada tahun 2011 adalah sekitar 1,29%. Pada tahun yang sama, tingkat kesakitan tertinggi tercatat

di Kota Semarang, sedangkan yang terendah terdapat di Kabupaten Wonogiri dengan angka sekitar 4,29 kasus per 100.000 penduduk. Meskipun terjadi penurunan signifikan dalam IR DBD di Jawa Tengah, penyakit ini masih menjadi perhatian serius di wilayah tersebut. (Ni Luh, 2019).

4. Patogenesis Dengue

Demam dengue, juga dikenal sebagai demam berdarah dengue, tidak dapat ditularkan dari orang ke orang. Proses penularan virus dengue dimulai ketika nyamuk *Aedes spp* menggigit manusia yang terinfeksi virus dengue dan memiliki viremia (kadar virus dalam darah yang tinggi). Nyamuk yang menggigit individu terinfeksi akan membawa virus dengue ke dalam tubuhnya. Nyamuk *Aedes spp* yang telah terinfeksi virus dengue akan terus menjadi sumber penularan sepanjang hidupnya dan akan terus menularkan virus ketika menggigit dan menghisap darah dari individu yang rentan. Virus dengue akan menyebar ke berbagai organ sasaran setelah masuk ke dalam tubuh manusia, seperti nodus limfatik, sumsum tulang, endotel pembuluh darah, sel Kupffer hati, dan paru-paru (Ni Luh, 2019).

Penelitian telah menunjukkan bahwa sel monosit dan makrofag memainkan peran penting dalam infeksi virus dengue. Virus menginfeksi sel-sel ini dengan cara menempel pada permukaan sel, memasukkan genom virus ke dalam sel dengan bantuan organel sel, dan membuat bagian perantara dan struktur virus. Setelah struktur terbentuk, virus dengue akan dilepaskan dari dalam sel. Infeksi virus dengue dapat memicu respons kekebalan tubuh yang

dapat memberikan perlindungan terhadap serotipe virus yang sama, tetapi tidak memberikan perlindungan silang terhadap serotipe virus lainnya. Artinya, orang yang pernah terinfeksi oleh satu jenis serotipe virus dengue dapat terinfeksi jenis serotipe virus dengue yang berbeda di kemudian hari (Ni Luh, 2019).

5. Diagnostik Dengue

Demam Dengue adalah penyakit dengan beragam presentasi klinis yang seringkali sulit diprediksi dan dapat menyerupai gejala penyakit lain. Sebagian kecil pasien dapat mengalami bentuk penyakit yang parah, sementara sebagian besar pasien ditandai oleh kebocoran plasma dengan atau tanpa pendarahan. Penentuan derajat keparahan Demam Dengue sebaiknya dilakukan dalam evaluasi awal ketika pasien pertama kali datang ke fasilitas kesehatan (triage). Ini penting untuk menentukan tingkat keparahan penyakit dan sejauh mana perawatan intensif yang diperlukan. Klasifikasi derajat keparahan Demam Dengue sering digunakan untuk mengidentifikasi pasien yang memerlukan perhatian medis lebih lanjut (Ni Lu, 2019):

Tabel 1. Klasifikasi Demam Dengue

Diagnosis	Kriteria	
Demam berdarah ± Tanda peringatan	Kemungkinan Demam berdarah : Pasien memiliki riwayat tinggal atau bepergian ke daerah di mana penyakit Dengue sering terjadi. Kriterianya termasuk demam dan diikuti oleh kriteria berikutnya: ➤ Mual, muntah ➤ Ruam ➤ Nyeri sendi ➤ Tes Torniquet (+) ➤ Leukopenia ➤ Tanda peringatan	Tanda peringatan : ➤ Nyeri perut atau bengkak ➤ Muntah persisten ➤ Akumulasi cairan ➤ Pendarahan mukosa ➤ Letargi, kelelahan ➤ Liver membesar > 2 cm ➤ Lab: peningkatan hematocirite dikombinasikan dengan penurunan jumlah platelet
Berat demam berdarah	Kebocoran plasma parah : ➤ Syok (DSS) ➤ Akumulasi cairan akibat tekanan pernapasan	
	Pendarahan hebat : Evaluasi berdasarkan pengujian fisik	
	Kerusakan Organ : ➤ Liver : SGOT/SGPT ≥1000 ➤ CNS : kesadaran terganggu ➤ Jantung terganggu begitupun organ lainnya	

Kriteria WHO untuk diagnosis DBD adalah bahwa pasien memenuhi dua kriteria klinis dan dua kriteria laboratorium berikut (Ni Luh, 2019):

Tabel 2. Kriteria Penetapan Diagnosis DBD

Kriteria Klinis	Kriteria Laboratorium
1. Demam tinggi yang muncul dengan cepat dan berlangsung selama dua hingga tujuh hari	Trombositopenia ($\leq 100.000 \text{ mm}^3$)
2. Manifestasi perdarahan seperti tourniquet positif, petechiae, echimosis, purpura perdarahan mukosa, epistaksis, perdarahan gusi, hematemesis, dan atau melena	Hematokrit $\geq 20\%$
3. Pembesaran hati	
4. Syok yang ditunjukkan dengan nadi yang lemah dan cepat, penurunan tekanan nadi, penurunan tekanan darah, kulit yang dingin dan lembab, terutama di ujung jari, sianosis di sekitar mulut, dan gelisah	

6. Pemeriksaan Laboratorium

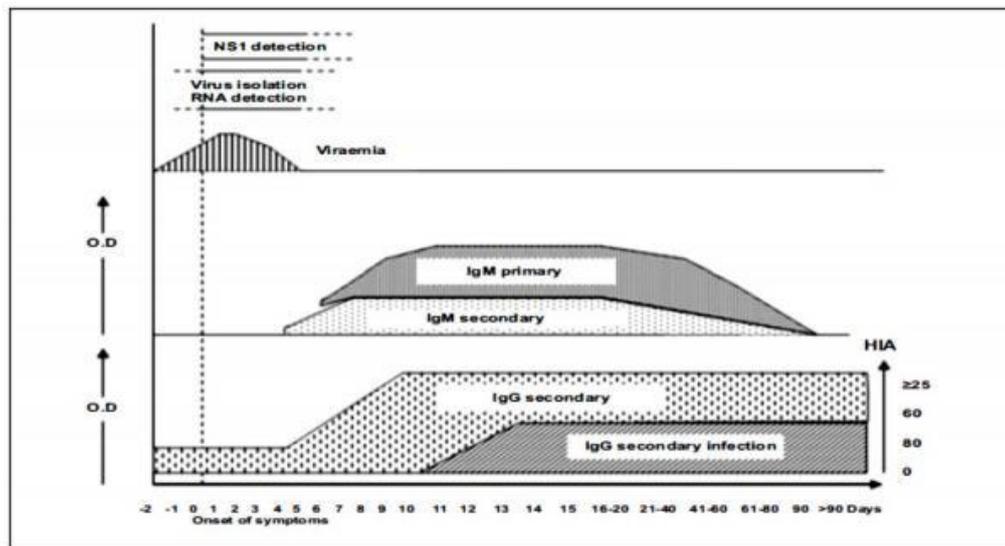
Pemeriksaan laboratorium memainkan peran penting dalam menegakkan diagnosis infeksi dengue. Hanya teknik laboratorium tertentu yang dapat digunakan untuk mendiagnosis infeksi virus dengue. Beberapa pemeriksaan laboratorium yang dilakukan dalam proses diagnosis demam berdarah dengue (DBD) mencakup pemeriksaan darah rutin, isolasi virus dan deteksi antigen virus (Ni Luh, 2019).

1. Tes Respon Imunologi IgM dan IgG

Waktu virus dengue berada dalam aliran darah biasanya berlangsung secara singkat, biasanya muncul dua hingga tiga hari sebelum

demam, dan penyakit berlangsung empat hingga tujuh hari. Asam nukleat dan antigen virus yang beredar selama periode ini dapat diidentifikasi (Gambar 2). Antibodi IgM dapat ditemukan pada hari ketiga hingga lima setelah mulai sakit, dan imunoglobulin IgG memiliki nilai diagnostik pada dengue. Banyak jenis imunoglobulin muncul sebagai tanggapan antibodi terhadap infeksi.

Hingga akhir minggu pertama, antibodi IgG dapat ditemukan dalam jumlah yang rendah. Setelah itu, mereka meningkat secara bertahap dan dapat tetap ada untuk waktu yang lama (selama bertahun-tahun). Karena munculnya antibodi IgM sangat lambat setelah lima hari sejak demam muncul, uji serologis biasanya menunjukkan hasil negatif. Titer antibodi meningkat dengan cepat pada infeksi dengue sekunder, yang terjadi ketika host sebelumnya telah terinfeksi virus DBD. Bahkan pada tahap awal, antibodi IgG dapat ditemukan dalam jumlah tinggi dan bertahan selama beberapa bulan hingga seumur hidup. Dalam infeksi sekunder, tingkat antibodi IgM jauh lebih rendah. Akibatnya, rasio IgM/IgG biasanya digunakan untuk membedakan infeksi dengue primer dari yang sekunder. Antara ketiga dan hari kedelapan, trombositopenia biasanya terjadi.



Gambar 3. Serologi Ig M dan Ig G pada infeksi dengue

2. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Pada lima hari pertama setelah penyakit muncul, DENV dapat dideteksi melalui PCR. Beberapa tes PCR dapat mendeteksi genom virus dan mengisolasi virus untuk mengidentifikasi ciri-ciri virus yang menginfeksi. Saat ini, assay RT-PCR real-time telah dikembangkan, tetapi masih belum tersedia secara umum. Assay ini sangat efektif untuk menemukan virus pada awal infeksi dengan sensitivitas 80-90% dan spesifisitas 95%. Hasil PCR yang positif dapat menunjukkan infeksi baru dan dapat mengkonfirmasi serotype virus yang menginfeksi. Pasien dengan hasil PCR negatif harus dikonfirmasi setelah hari kelima onset penyakit karena hasil ini dianggap "indeterminate".

3. Pemeriksaan protein NS1

Salah satu dari tujuh protein nonstruktural yang dihasilkan oleh DENV adalah protein nonstruktural 1 (NS1). Protein NS1 intrasel berfungsi sebagai kofaktor dalam proses replikasi virus, sementara protein NS1 dalam bentuk sekresi dan permukaan sel bersifat imunogenik. Protein NS1 jenis ini mengaktifkan sistem kekebalan tubuh dan terlibat dalam patogenesis infeksi karena adanya antigen NS1 yang tinggi di sirkulasi. Akibatnya, pemeriksaan antigen NS1 sangat membantu dalam diagnosis infeksi dengue, terutama pada tahap awal infeksi sebelum IgM dan IgG dapat diidentifikasi (WHO, 2015). Pemeriksaan NS1 telah tersedia secara luas. Salah satu pemeriksaan ELISA yang paling umum digunakan karena memiliki spesifisitas yang tinggi. Sebagai contoh, capture ELISA PanbioNS1 memiliki sensitivitas 60,4-66% dan spesifisitas 97,9-99%.

7. Faktor Risiko

Mobilisasi penduduk dan pertumbuhan penduduk yang cepat merupakan faktor risiko penularan DBD sebagai akibat dari peningkatan sarana dan prasarana transportasi, dan gangguan atau kelemahan dalam pengendalian populasi yang memungkinkan KLB. Faktor lain yaitu kemiskinan, yang menyebabkan orang-orang tidak memiliki rumah yang layak dan sehat, serta sumber air minum dan pembuangan sampah yang memadai. Namun, DBD juga dapat menyerang orang yang lebih kaya, khususnya mereka yang bepergian. Studi di Pekanbaru, Provinsi Riau, menemukan bahwa pendidikan dan

pekerjaan masyarakat, jarak antar rumah, adanya tempat penampungan air, taman dan tanaman hias, dan mobilitas penduduk adalah beberapa penyebab DBD. Di sisi lain, posisi rumah dan faktor adanya jentik tidak dianggap sebagai faktor risiko (Ni Luh, 2019).

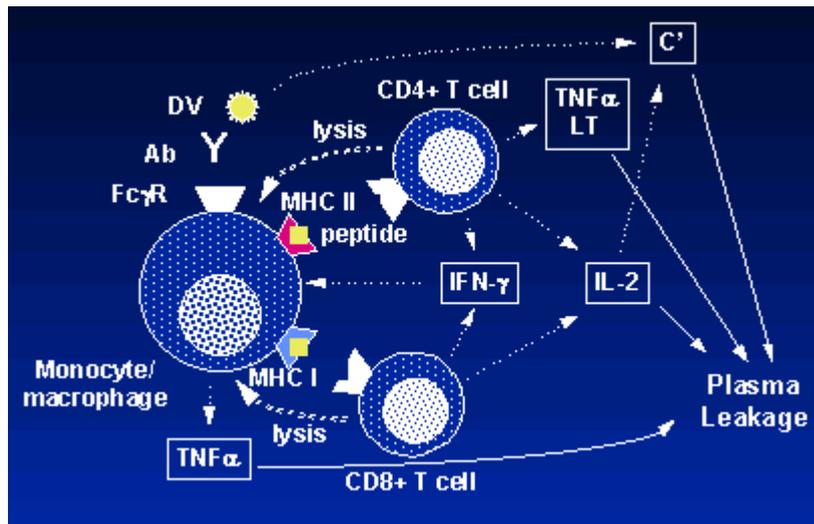
B. Respon Imunitas terhadap DENV

Target utama respons antibodi terhadap DENV adalah protein env yang terletak di bagian luar virion. Antibodi terhadap protein env menunjukkan tingkat reaksi silang terhadap setiap jenis virus. Antibodi terhadap protein env memiliki kemampuan untuk mencegah virus terikat pada sel dan menetralkan infeksi virus. Antibodi terhadap protein env juga mampu menghambat pengikatan virus pada epitop yang tidak menetralkan maupun pada konsentrasi di bawah ambang netralisasi, dapat diduga bahwa ADE berkontribusi pada hubungan antara titer viremia yang tinggi dan tingkat keparahan penyakit. Menurut penelitian, Bayi baru lahir dapat mengalami DBD pada infeksi pertamanya karena ibunya memiliki antibodi terhadap DENV transplasenta. Tetapi tingginya titer virus pada infeksi primer dan sekunder yang ringan menunjukkan bahwa ada faktor lain yang berperan. Salah satunya adalah pembentukan kompleks sistem kekebalan melalui aktivasi komplemen dan sekresi sitokin dan kemokin (Sudiro, 2002).

Walaupun tidak terdiri dari komponen virion, protein NS1 adalah target utama respons antibodi terhadap DENV. Permukaan sel yang terinfeksi mengekspresikan protein NS1 dan kemudian mensekresinya ke sirkulasi.

Dengan mengaktifkan komplemen, antibodi terhadap NS1 dapat menyebabkan lisis sel yang telah terinfeksi, yang menunjukkan perlindungan antibodi terhadap infeksi DENV. Hal ini juga berlaku untuk protein preM, tetapi perlindungan dan relevansinya untuk proses imunitas alami masih belum jelas (Chem et al, 2003).

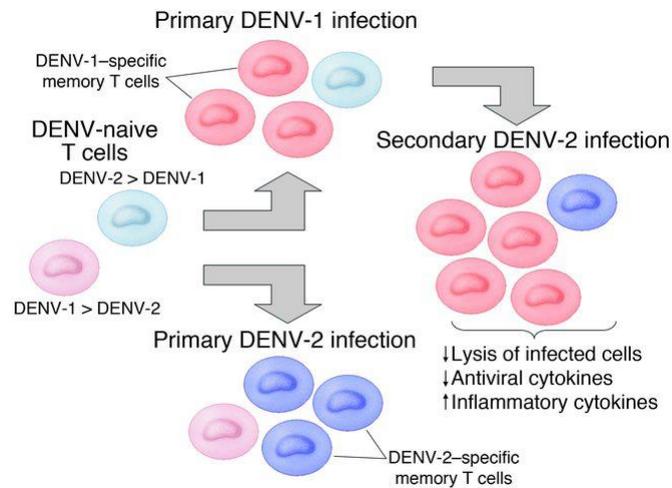
Selain itu, respons sel T CD4 dan CD8 menunjukkan respons terhadap berbagai antigen protein. Sel T yang bereaksi terhadap DENV dapat mengenali berbagai jenis DENV, tergantung pada tingkat homolog epitopnya. Selanjutnya, sel T menghasilkan interferon gamma, TNF- α , TNF- β , dan kemokin lainnya, termasuk protein penghambat macrophage. Selain itu, respons sel T terhadap infeksi DENV sekunder menunjukkan hubungan TNF- α dengan antigen DENV dan tingkat keparahan infeksi pada infeksi berikutnya (Gambar 4). Sitokin lain, seperti IL-12 dan IL-8, memiliki peran khusus yang terkait dengan keparahan DBD. IL-12 meningkatkan respons sel T helper (Th)1, sedangkan ketika IL-12 tidak ada, respons sel Th2 meningkat. IL-12 juga berkolaborasi dengan Th1, menyebabkan penyakit yang lebih parah (Raghupathy, 2004).



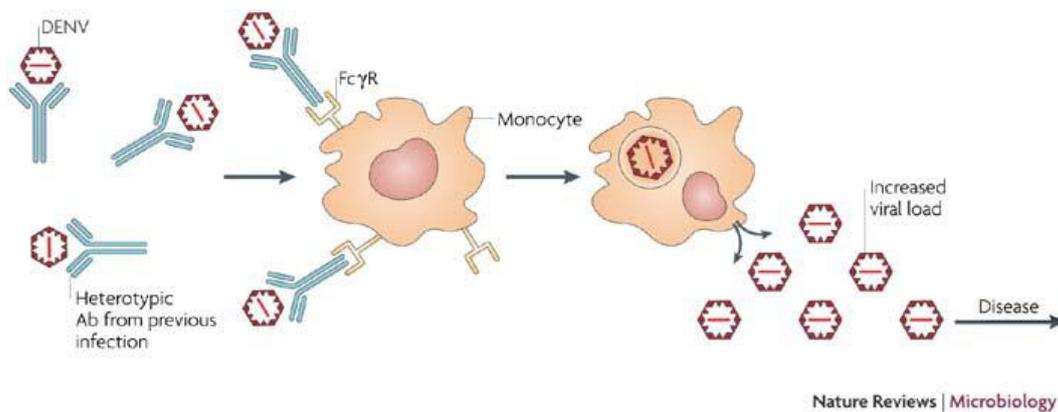
Gambar 4. Respon Imunitas terhadap DBD

Menurut prinsip imunologi, respons heterolog yang dikaitkan dengan infeksi DENV sekunder memiliki korelasi langsung dengan patogenesis DBD. Jenis virus DENV yang mengakibatkan infeksi sekunder selalu berbeda dari virus yang menyebabkan infeksi pertama, sehingga antibodi dan limfosit T memori yang terstimulasi oleh infeksi pertama menghadapi antigen dengan sekuens yang berbeda dari yang sebelumnya. Sekuens yang berbeda membuat antibodi yang telah terbentuk pada infeksi pertama menjadi lebih lemah terhadap DENV sekunder. ADE terjadi sebagai hasil dari interaksi tersebut (Gambar 5 dan 6). Respon imunitas heterolog mengubah keseimbangan antara fungsi perlindungan dan patologi antibodi. Oleh karena itu, respons antibodi yang menghasilkan sekresi sitokin pro-inflamasi atau reaksi silang dengan endotelium vaskular dapat menyebabkan inflamasi berlebihan, yang

menyebabkan progresivitas DBD dengan kebocoran plasma dan gejala klinis berupa syok.

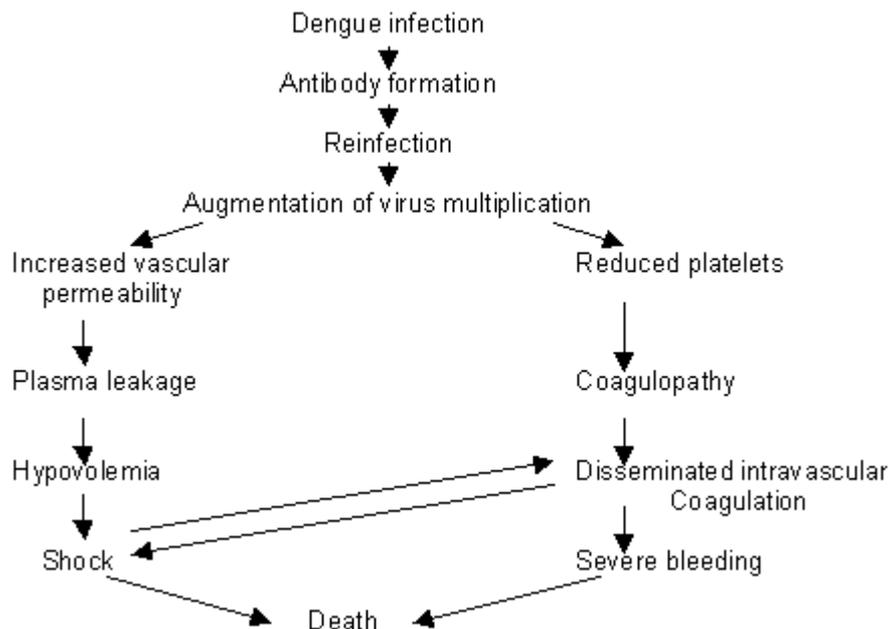


Gambar 5. Skema Imunitas Heterolog



Gambar 6. Respon Antibodi Heterolog

(Sumber: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n7/fig_tab/nrmicro1690_F3.html)



Gambar 7. Perjalanan Penyakit DBD

1. IgM dan IgG DENV

Infeksi virus Dengue dapat menunjukkan gejala yang sangat beragam, mulai dari demam yang tidak berbeda hingga demam yang tanpa gejala. Perdarahan, juga dikenal sebagai demam berdarah dengue (DBD), dan demam dengue yang disertai renjatan juga dikenal sebagai demam dengue shock syndrome (DSS). Di DBD, sistem kekebalan tubuh mengalami perubahan, baik secara humoral maupun seluler. Perubahan humoral dapat ditunjukkan dengan antibodi IgM dan IgG yang dapat diidentifikasi melalui pemeriksaan serologis, serta antibodi IgA dan IgE (Aryati, 2009).

IgM dibuat atau dihasilkan di infeksi primer mulai hari ketiga, tetapi biasanya baru ditemukan pada hari keenam mengidap demam. Antibodi IgG

meningkat cepat di infeksi sekunder dalam tiga sampai lima hari mengidap demam, dan antigen takterakit (nonstruktural) 1 (NS1) dapat ditemukan pada hari pertama hingga kesembilan mengidap demam. Oleh karena itu, antibodi IgA antidengue dapat ditemukan mulai hari pertama hingga hari ke lima belas, sehingga IgA merupakan tanda yang baik untuk tanda-tanda awal infeksi dengue. IgA juga dapat digunakan sebagai petanda kemungkinan berkembangnya infeksi ke peramalan penyakit DBD dan DSS (Demam Dengue Syndrome) (Baratawidjaja, 2006).

C. Vaksin Dengue

1. Pengertian Vaksin

Nama "vaksin" berasal dari kata latin "vacca", yang berarti sapi, dan "vaccinia", yang berarti cacar sapi. Vaksin adalah antigen yang digunakan untuk membangun kekebalan aktif terhadap penyakit. Ini mencegah atau mengurangi efek infeksi yang disebabkan oleh organisme alami atau liar. Galur virus atau bakteri yang telah dilemahkan sehingga tidak menimbulkan penyakit dapat digunakan sebagai vaksin. Vaksin juga dapat berupa organisme mati atau produk pemurnian dari vaksin, seperti protein, peptida, atau partikel virus serupa. Sistem kekebalan manusia atau hewan akan dibentuk oleh vaksin untuk menangkal patogen tertentu, seperti bakteri, virus, atau toksin. Selain itu, vaksin dapat membantu sistem kekebalan melawan sel-sel degeneratif, atau kanker. Dengan memberikan vaksin, sistem imun tubuh distimulasi untuk membuat

antibodi tertentu, yang melindungi tubuh dari penyakit yang dapat dicegah (Hukma, 2016).

2. Perkembangan Vaksin Dengue

Peneliti telah berusaha untuk mengembangkan vaksin dengue selama enam puluh tahun terakhir. Namun, baru sekitar sepuluh tahun ini pengembangan vaksin tersebut mencapai tahap terbaiknya. Terdapat beberapa vaksin yang telah melewati tahap akhir uji klinis yang memberikan harapan besar untuk mencegah DBD. Harapan ini ditunjukkan oleh uji awal pre-klinis, yang menilai efektivitas vaksin dengan menilai kemampuan untuk meningkatkan antibodi penetralisir dan mengurangi viremia. Meskipun vaksin tersebut belum dipasarkan di pasar, harapan ini masih sangat kecil. Pengurangan viremia terkait dengan penurunan keparahan penyakit dan penurunan efisiensi transmisi virus, yang mengakibatkan penurunan jumlah infeksi (Konishi, 2011).

telah terinfeksi salah satu jenis DENV, mereka akan terlindungi dari jenis DENV lainnya pada infeksi berikutnya. Oleh karena itu, imunitas baik humoral maupun seluler yang menanggapi antigen virus yang mirip dapat digunakan sebagai target untuk pembuatan vaksin (Wikramaratna et al., 2010). Selain itu, itu terkait dengan protein virus seperti prM, env, dan NS1. Protein ini bersifat kekebalan, sehingga mereka memiliki kemampuan untuk mendorong pembentukan kekebalan pertahanan. Ini ditunjukkan oleh penelitian yang menunjukkan bahwa antibodi prM melakukan aktivitas penetralisir dalam percobaan in vitro, dan antibodi NS1 juga melakukan fungsi perlindungan.

Setelah mengetahui mekanisme imunoseruler yang dapat membantu dalam pembuatan vaksin, formulasi vaksin harus dipertimbangkan. Jika Anda diberi vaksin satu tipe virus, misalnya vaksin monovalen, Anda dapat meningkatkan kemungkinan progresivitas DBD pada infeksi berikutnya dengan tipe virus yang berbeda. Mekanisme ini dikenal sebagai infeksi heterolog dan menyebabkan reaksi silang sel limfosit T dan antibodi yang tidak berfungsi sebagai penetralisir (Wikramaratna et al., 2010). Namun, individu yang telah terinfeksi salah satu jenis DENV akan terlindungi dari jenis DENV lainnya pada infeksi berikutnya. Oleh karena itu, pengembangan vaksin yang dapat menimbulkan respons imun terhadap keempat jenis vaksin sangat penting untuk mengembangkan vaksin DENV yang aman dan efektif. Beberapa vaksin telah dikembangkan, masing-masing dengan kelebihan dan kekurangan.

3. Jenis-jenis Vaksin Dengue

1. *Live Attenuated Vaccine (LAV)*

LAV adalah vaksin yang paling murah dan mudah diakses, terutama di negara berkembang. Dua calon vaksin tetravalen telah dikembangkan di Walter Reed Research Army di Amerika Serikat dan di Universitas Mahidol di Thailand. Menurut Konishi (2011), vaksin ini dikembangkan melalui proses khusus yang menggunakan sel ginjal anjing, monyet, dan fetus. Dalam dua sampai tiga dosis, kedua vaksin ini meningkatkan kekebalan terhadap keempat jenis DENV, tetapi perlu diperhatikan kemungkinan replikasi virus. Ditakutkan bahwa ketidakseimbangan respons imun yang

mungkin terjadi dapat menyebabkan penyakit menjadi lebih parah (Stephenson, 2005). Imunogenisitas keempat vaksin bergantung pada dosis dan jadwal pemberian. Studi potensial vaksin Avantis Pasteur ditunda untuk sementara karena masalah reaktogenisitas. Sementara itu, penelitian fase II Glaxo Smith Kline menunjukkan sedikit respons pada subjek penelitian. Selain itu, 63% peserta yang diuji dengan dua dosis penggunaan telah menunjukkan respons antibodi penetralisir tetravalen (Konishi, 2011). Sampai saat ini, penelitian telah mencapai fase ketiga. LAV akan selesai sekitar tahun 2015, siap dipasarkan, sesuai dengan rekomendasi program pengembangan vaksin WHO.

2. Vaksin Chimera

Dengan kemajuan dalam rekayasa genetika, virus chimera dapat dibuat dengan mengganti protein tertentu dari satu virus ke virus lainnya. Dalam tahun 2000, Most et al. membuat virus chimera dengan mengganti protein prM/env dari masing-masing jenis DENV. Ini dilakukan dengan gen homolog yellow fever virus (YFV) strain 17 D (ChimeriVaxDEN) dan LAV DENV2.

Dalam evaluasi studi uji pre-klinis dan fase I, vaksin tetravalen chimera dengan YFV strain 17D menunjukkan kemampuan untuk menghasilkan antibodi penetralisir DENV1-4 dan melindungi terhadap viremia. Selain itu, uji klinis fase II dan III sedang dilakukan di beberapa negara, dan di Australia.

Jenis vaksin tetraavalen chimera lainnya yang menggunakan strain DENV2 juga ditunjukkan mampu memperkuat sistem kekebalan dan melindungi. Hingga saat ini, uji klinis fase pertama masih berlangsung. Kombinasi genetik dengan virus yang berpotensi menyebar masih dapat terjadi, meskipun teknik chimerisasi dapat menghasilkan vaksin yang ideal. Dalam tahun 2002, Girakhoo et al. membuat ChimerVax-DEN dengan elektroporasi sel vero dengan transkripsi RNA virus yang telah disiapkan. Seperti yang ditunjukkan oleh penelitian preklinis, potensi vaksin tersebut memiliki kemampuan untuk bereplikasi, stabil secara genetik, dan tidak bersifat neurovirulen terhadap sel vero. Selain itu, hasil evaluasi menunjukkan bahwa vaksin tersebut aman dan memiliki sifat perlindungan. Untuk membuat vaksin ini, virus yang digunakan sangat lemah dibandingkan dengan DENV, sehingga sangat lemah dalam hal virulensi dan kemungkinan infeksi virus. Namun, vaksin ini masih memiliki sifat perlindungan. Untuk membuat vaksin ini, virus yang digunakan sangat lemah dibandingkan dengan DENV, sehingga sangat lemah dalam hal virulensi dan kemungkinan infeksi virus. Namun, vaksin ini masih memiliki sifat perlindungan.

Secara umum, temuan penelitian menunjukkan bahwa vaksin chimera aman dan efektif dalam melindungi tubuh, tetapi perlu dilakukan uji klinis untuk memastikan bahwa mereka aman dan efektif pada manusia. Untuk penyakit seperti tick-borne encephalitis, japanese encephalitis (JE),

dan virus west nile, teknik pengembangan virus chimera menjadi harapan baru untuk pengembangan vaksin.

3. Vaksin DNA DENV

Metode vaksin DNA, yang menggunakan plasmid yang mengekspresikan antigen virus untuk membuat vaksin, dapat memicu respons imun terhadap berbagai virus, termasuk DENV. Dalam penelitian tahun 2002, Kochel et al. kloning gen env dan preM pada berbagai ekspresi vektor plasmid, lalu inokulasi ke intradermal tikus. Hasilnya, 60% tikus eksperimen menunjukkan pembentukan antibodi anti-dengue. Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Putnak et al. pada tahun 2003 juga menunjukkan bahwa vaksin serupa menghasilkan antibodi penetralisir DENV (Kochel et al, 2002).

Selain itu, ditemukan bahwa satu regimen yang terdiri dari dua dosis setiap mikrogram DNA dapat memberikan proteksi selama hingga satu bulan. Revaksinasi dan dosis yang lebih tinggi diperlukan untuk melindungi dalam jangka panjang. Dalam tahun 2000, Raviprakash et al. memeriksa metode untuk meningkatkan kadar antibodi penetralisir dan sekaligus melindungi terhadap virus. Untuk melakukan pemeriksaan ini, plasmid granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), sequence immunostimulatory (ISS), atau campuran GM-CSF dan ISS. Hasilnya menunjukkan bahwa 87% dari populasi penelitian terlindungi dari viremia, dan titer antibodi penetralisir tetap stabil selama enam bulan

setelah vaksinasi. Penggunaan plasmid GM-CSF menghasilkan respons antibodi yang paling tinggi. Dalam tahun 2003, Wu et al. menemukan bahwa vaksin DNANS1 dapat mengaktifkan sistem kekebalan humoral dan seluler tertentu. Penggunaan DNA juga telah digunakan untuk membuat antibodi monoklonal terhadap protein NS1. Studi vaksin DNA DENV dan JE yang menggabungkan keduanya sudah dimulai (Konishi et al. 2003).

4. Vaksin DENV Terinaktivasi

Vaksinasi DENV yang terinaktivasi telah dibuat selama kurang lebih enam puluh tahun. Karena sulit untuk membuat virus berkualitas tinggi menggunakan metode yang ada saat ini, upaya terus dilakukan. Saat ini, kultur sel vero dan sel paru fetal diploid dapat menghasilkan titer DENV yang tinggi. Vaksinasi ini dibuat dengan menggunakan partikel virus utuh dan rekombinan subunit protein DENV (Chaturvedi, 2005).

Vaksin DENV Terinaktivasi – Partikel Virus Utuh

Kultur DENV sel vero yang dipurifikasi dengan sukrosa dan diinaktivasi dalam 0,05% formalin dibuat oleh Putnak et al. pada tahun 2003. Suhunya adalah 22 derajat Celcius. Setelah inaktivasi, virus tetap antigenis dan imunogenik, seperti yang ditunjukkan oleh titer antibodi penetralisir pada tikus eksperimen. Setelah menghasilkan hasil yang memuaskan pada tahap awal uji pre-klinis, vaksin sedang dalam proses pengujian klinis fase I.

5. Vaksin DENV Terinaktivasi - Rekombinan Subunit DENV

Vaksin rekombinan subunit untuk berbagai virus dapat dibuat dengan kemajuan dalam teknik biologi molekuler. Pembuatan rekombinan

env dan NS1 adalah fokus utama pekerjaan. Protein rekombinan harus disekresikan secara ekstraseluler untuk memicu respons imun yang baik. Ekspresi protein env dan prM dapat mencapai hal ini (Konishi dan Suzuki, 2002). Hasilnya menunjukkan bahwa ada perlindungan yang signifikan terhadap infeksi DENV. Vaksinasi yang dibuat menggunakan metode ini juga telah dibuat pada JE dan TBE dan telah memberikan hasil yang memuaskan. Akibatnya, Ini adalah jenis vaksin yang sangat menjanjikan. Selain itu, metode yang lebih baik untuk membuat ajuvan dan protein rekombinan diperlukan.

Tabel 3. Profil Kandidat Vaksin Dengue (Chaturvedi et al, 2005)

Kriteria	LAV	Chimera	DNA	Terinaktivasi
Total antigen	10	2	Lebih dari 1	Banyak
Replikasi in vivo	Ya	Ya	Tidak	Tidak
Respon imunitas	Sangat bagus	Sangat bagus	Sangat bagus	Sangat bagus
Sel T dan B	Sangat bagus	Sangat bagus	Sangat bagus	Bagus
Proteksi dalam penelitian hewan	Ya	Ya	Ya	Ya
Status pengembangan	Tahap III	Tahap II, III	Uji pre-klinis	Uji pre-klinis, tahap I

4. Tantangan dalam Perkembangan Vaksin Dengue

Pengetahuan tentang patogenesis dengue fever (DBD) berfungsi sebagai dasar untuk pengembangan vaksin dengue fever. Teori yang paling disetujui sampai saat ini adalah bahwa ADE berkontribusi secara langsung pada perkembangan DBD terkait infeksi sekunder heterolog. Orang yang telah mengalami infeksi dengue pertama akan memiliki sistem kekebalan humoral dan seluler yang melindungi mereka dari jenis infeksi dengue lain. Akibatnya, berbagai jenis vaksin dikembangkan, termasuk LAV, chimera, DNA dengue, dan DENV terinaktivasi (Hilman dan Saleha, 2013).

Agar vaksin dengue memberikan perlindungan yang optimal, imunitas harus dibangun secara bersamaan terhadap empat jenis DENV. Keamanan vaksin harus dipertimbangkan agar respons imun tidak tidak seimbang, yang dapat meningkatkan keparahan penyakit. Selain itu, penting untuk mempertimbangkan kinerja perlindungan vaksin, yang mencakup sifat imunogenisitas dan antigenisitas vaksin dalam memicu reaksi kekebalan humoral dan seluler. Produksi, penggunaan, dan penyimpanan vaksin yang baik harus diperhatikan. Karena DBD banyak ditemukan di negara yang sedang berkembang, vaksin harus murah dan mudah didapat (Hilman dan Saleha, 2013).

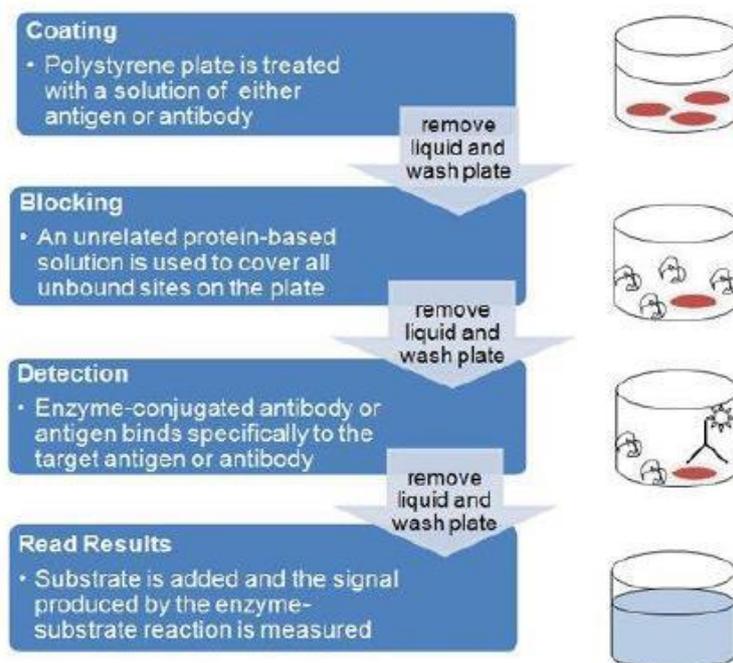
D. Enzyme Linked Immunosorbent Essay (ELISA)

1. Pengertian

Metode assay yang dikenal sebagai *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan plat atau lempung untuk mendeteksi dan mengukur jumlah protein, peptida, hormon, dan antibodi. Antigen harus dimobilisasi ke permukaan solid sebelum antibodi yang terikat dengan enzim ditambahkan. Untuk melakukan deteksi, enzim konjugat diinkubasi dengan substrat untuk menghasilkan produk yang diukur. Interaksi khusus antigen dan antibodi adalah komponen penting dari strategi deteksi ELISA. Pemeriksaan ELISA biasanya menggunakan plat atau lempeng polystyrene 96 atau 384 sumuran, yang akan mengikat pasif protein dan antibodi. Material yang tidak berikatan dapat dipisahkan dengan membantu reaktan pemeriksaan ELISA yang terimobilisasi di permukaan mikroplat. Ini memungkinkan pemeriksaan ELISA untuk mengukur analit spesifik karena dapat mencuci material nonspesifik yang tidak berikatan (Booster, 2020).

Pemeriksaan ELISA biasanya dimulai dengan lapisan pertama, di mana antigen atau antibodi target dimasukkan ke dalam plat polystyrene 96 sumuran. Setelah tahap ini, tahap blokade terjadi, di mana zat penghalang akan melapisi setiap area permukaan yang tidak terikat. Melakukan beberapa kali pencucian adalah langkah selanjutnya. Setelah itu, plat akan diinkubasi dengan antibodi yang terkoneksi dengan enzim. Selanjutnya, proses pencucian beberapa kali dilakukan untuk menghilangkan antibodi yang tidak berikatan. Untuk

menghasilkan sinyal kalorimetrik, substrat kemudian akan ditambahkan. Pada tahap akhir, analisis ini dilakukan dengan menggunakan proses seprasi melalui ikatan mikroplat. Untuk menghilangkan bahan yang tidak berikatan, pencucian pengulangan digunakan pada masing-masing tahap ELISA. Untuk mencegah cairan yang ditambahkan pada tahap assay berikutnya dilusi, cairan sisa sangat penting selama proses ini. Alat pencuci plat khusus sering digunakan untuk menjaga konsistensi (Booster, 2020).



Gambar 8. Prosedur Umum Pemeriksaan ELISA

2. Jenis Pemeriksaan ELISA

1. ELISA Langsung

Periksaan ELISA langsung mendeteksi antigen yang diimobilisasi ke permukaan plat melalui penggabungan langsung dengan HRP atau molekul

deteksi lainnya (ABCAM, 2020). Selain itu, pemeriksaan ELISA langsung memiliki tingkat kesalahan yang lebih rendah karena jumlah tahapan yang diperlukan.



Gambar 9. Pemeriksaan ELISA langsung

Kelebihan maupun kekurangan metode ELISA langsung (Biorad, 2020):

Kelebihan:

- Lebih cepat dengan tahapan yang lebih sedikit dibanding dengan tipe ELISA yang lain.
- Kemungkinan kesalahan rendah karena penggunaan reagen lebih sedikit dan tahapan lebih singkat.
- Tipe ELISA terbaik untuk menilai respons kekebalan terhadap antigen.

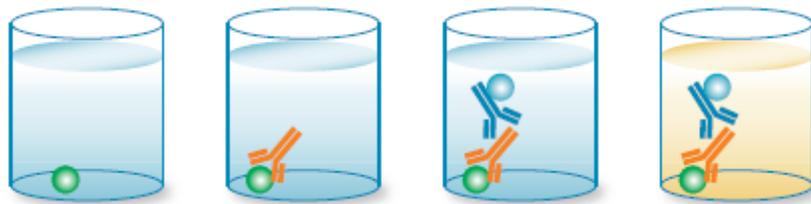
Kekurangan:

- Dibandingkan dengan ELISA tidak langsung, imobilisasi antigen tidak spesifik, yang menyebabkan background noise.
- Sebagian besar karena setiap protein dalam sampel, termasuk target protein, akan terikat pada plat.
- Kurang fleksibel karena setiap target protein memerlukan antibodi primer terkonjugasi tertentu.

- d. Tidak ada amplifikasi sinyal, yang dapat membuat sensitivitas assay lebih rendah.

2. ELISA tidak Langsung

Pemeriksaan ELISA berbeda dari tes langsung. Antigen masuk ke dalam permukaan plat. Proses dua tahap diperlukan untuk deteksi. Selama proses ini, antibodi primer spesifik terhadap antigen yang terikat dengan target dan diberi label oleh antibodi sekunder terhadap spesies host antibodi primer. Antibodi primer spesifik dalam sampel serum juga dapat diidentifikasi dengan menggunakan serum sebagai pengganti antibodi primer (ABCAM, 2020).



Gambar 10. Pemeriksaan ELISA tidak langsung

Kelebihan maupun kekurangan metode ELISA tidak langsung (Biorad, 2020):

Kelebihan:

- a. ELISA tidak langsung sangat sensitif karena dapat berikatan dengan lebih dari satu antibodi sekunder..
- b. Karena membutuhkan lebih sedikit antibodi berlabel daripada ELISA langsung, ELISA tidak langsung lebih murah.

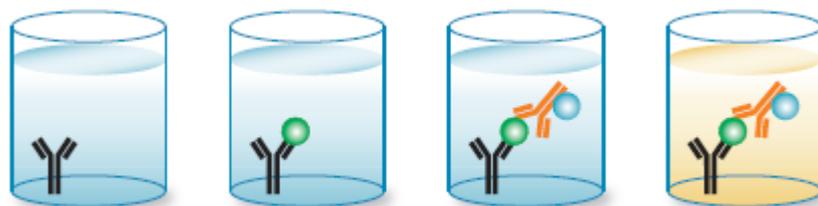
- c. Metode ELISA tidak langsung lebih fleksibel karena hanya dapat menggunakan satu antibodi sekunder berlabel untuk berbagai antibodi primer.
- d. Pemeriksaan ELISA terbaik untuk mengetahui jumlah total antibodi dalam sampel

Kekurangan:

- a. Apabila terjadi cross-reactive dari antibodi sekunder, noise background mungkin muncul.
- b. Prosedur membutuhkan lebih banyak tahap inkubasi untuk antibodi sekunder daripada metode ELISA langsung.

3. ELISA *Sandwich*

Tipe pemeriksaan ELISA yang paling umum adalah ELISA Sandwich. Pasangan antibodi yang cocok terdiri dari dua antibodi yang spesifik untuk epitop yang berbeda dari antigen yang digunakan dalam pemeriksaan ELISA ini. Salah satu antibodi akan menempel pada permukaan plat dan berfungsi sebagai antibodi penangkap untuk membantu antigen diikat. Antibodi lain akan berkonjugasi dengan antigen untuk memudahkan deteksi (ABCAM, 2020).



Gambar 11. Pemeriksaan ELISA *Sandwich*

Metode ELISA *sandwich* dimulai dengan lapisan antibodi penangkap pada sumuran plat ELISA. Sampel atau analisis kemudian akan dimasukkan, dan antibodi pendeteksi akan diikuti. Apabila antibodi pendeteksi tidak dilabelkan, antibodi sekunder pendeteksi harus terkonjugasi dengan enzim untuk melakukan ELISA *sandwich* tidak langsung.

Kelebihan maupun kekurangan metode ELISA *sandwich* (Biorad, 2020):

Kelebihan:

- a. Metode ELISA sangat sensitif—2-5 kali lebih sensitif daripada metode ELISA langsung atau tidak langsung.
- b. Karena dua antibodi ikut serta sebagai antibodi penangkap dan antibodi pendeteksi, metode ini memiliki spesifisitas tinggi.
- c. Tes ELISA lebih fleksibel karena dapat dilakukan deteksi secara langsung atau tidak langsung.
- d. Untuk sampel yang kompleks, pemeriksaan ELISA adalah pilihan terbaik karena antigen tidak perlu dipurifikasi sebelum pengukuran.

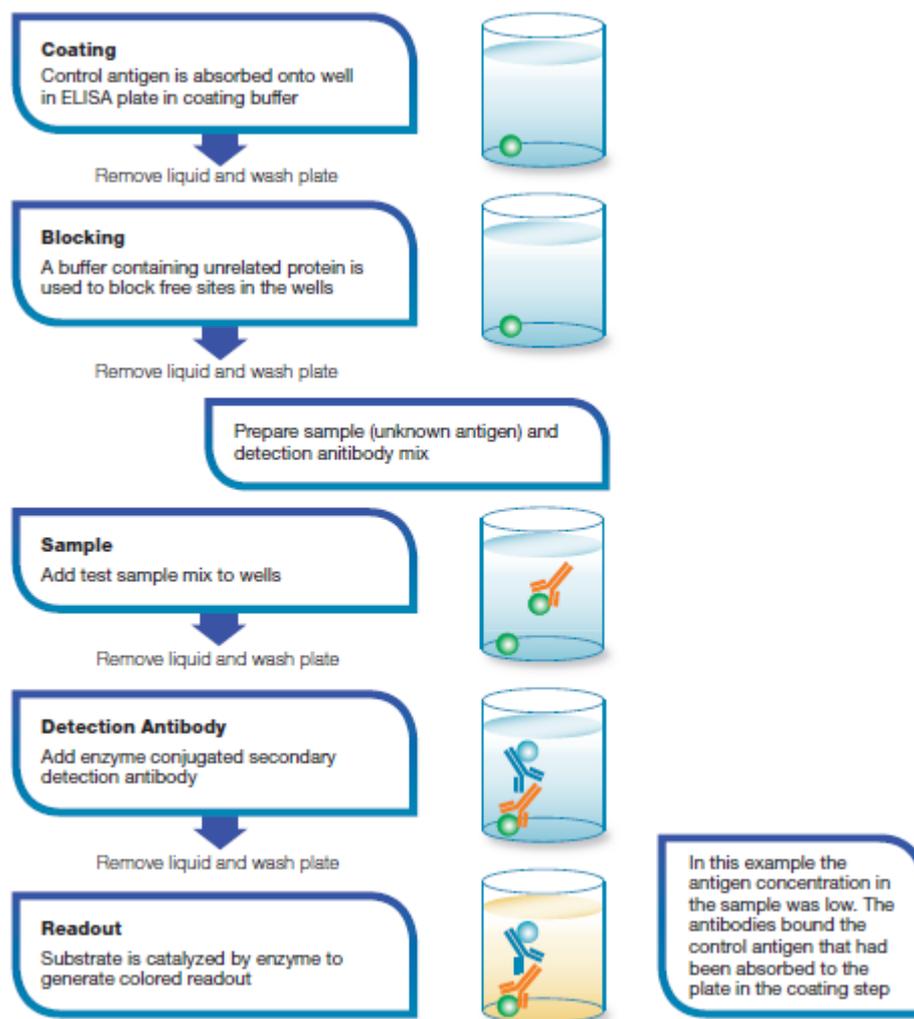
Kekurangan:

- a. Mungkin sulit untuk optimalisasi antibodi karena dapat terjadi cross-reactivity antara antibodi penangkap dan pendeteksi.
- b. Anda perlu menggunakan kit ELISA standar atau pasangan antibodi yang telah diuji.

4. ELISA Kompetitif

ELISA kompetitif atau ELISA inhibisi digunakan untuk mengukur jumlah antigen dengan menggunakan sinyal interferensi. Setelah pre-inkubasi dengan

antigen berlabel, sampel dimasukkan ke dalam sumuran. Antigen sampel dan antigen referensi bersaing untuk mengikat jumlah tertentu dari antibodi yang berlabel. Antigen referensi telah dilapisi sebelumnya pada permukaan plat. Jumlah antibodi bebas yang tersedia untuk berikatan dengan antigen referensi bergantung pada jumlah antigen yang ada dalam sampel. Beberapa kit ELISA menggunakan antigen yang berlabel daripada antibodi berlabel. Antigen sampel (tidak berlabel) dan antigen berlabel bersaing untuk berikatan dengan antibodi primer, sehingga sinyal yang lebih kuat dihasilkan dari jumlah antigen berlabel dalam sampel (ABCAM, 2020).



Gambar 12. Pemeriksaan ELISA Kompetitif

Antigen digunakan untuk melapisi plat, seperti yang ditunjukkan pada gambar. Antigen yang tidak diketahui ditambahkan ke sampel melalui prosedur standar blocking dan pencucian. Selanjutnya, substrat yang sesuai (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine atau TMB) digunakan untuk mendeteksi antibodi pendeteksi yang berlabel. Apabila sampel memiliki konsentrasi antigen yang

rendah, sinyal akan melemah, tetapi apabila hanya ada konsentrasi antigen yang sedikit, sinyal akan melemah (Biorad, 2020).

Kelebihan:

- a. Sampel tidak dapat diproses, dan sampel yang kasar atau tidak murni tidak dapat digunakan.
- b. Dibandingkan dengan sandwich ELISA, mereka lebih kuat dan sensitif terhadap efek matriks sampel dan dilusi sampel..
- c. Lebih konsisten, dengan variabilitas yang lebih kecil antara sampel assay dan duplikat.
- d. Maksimal fleksibilitas, dapat berbasis ELISA sandwich, tidak langsung, atau langsung.
- e. Metode ELISA terbaik untuk analisis ketika hanya ada satu antibodi yang tersedia untuk antigen yang akan dideteksi. Selain itu, seperti metode ELISA sandwich, pemeriksaan ELISA ini cocok untuk mendeteksi antigen kecil yang tidak dapat berikatan dengan dua antibodi berbeda..

Kekurangan:

Ada beberapa kelemahan terkait dengan teknik dasar tipe ELISA yang digunakan.

E. Metode *Dried Blood Spot* (DBS)

1. Pengertian *Dried Blood Spot* (DBS)

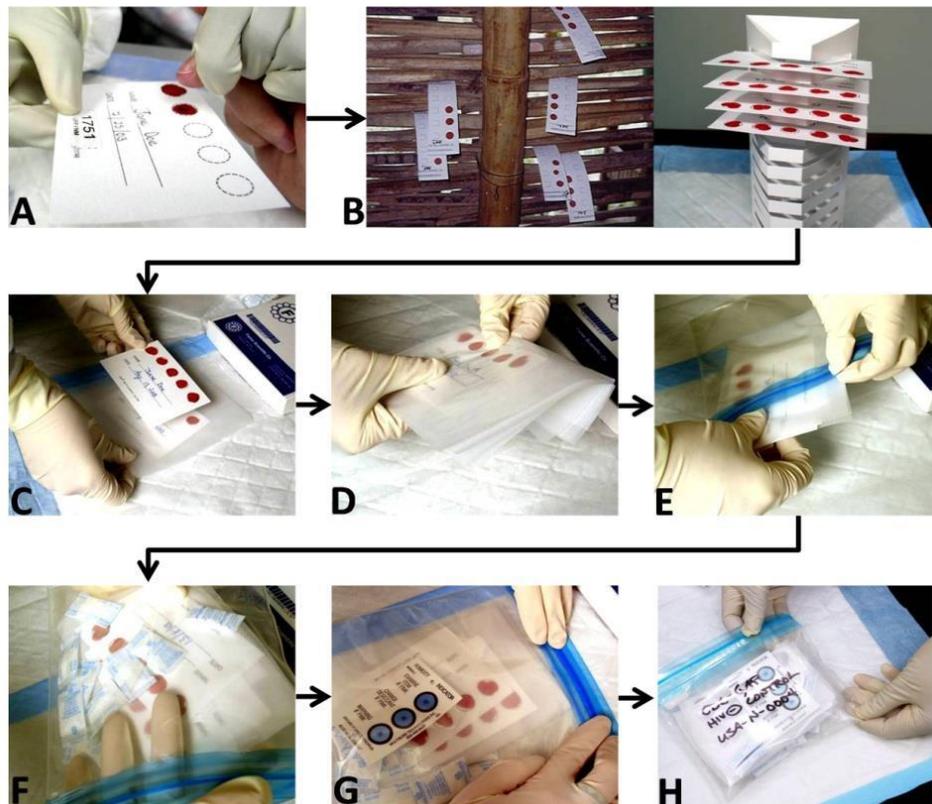
Darah lengkap yang dikumpulkan pada kertas saring dan kemudian dikeringkan disebut *dried blood spot* (DBS). Saat ini, banyak studi yang bertujuan untuk mengembangkan metode analisis yang berbasis sampel DBS. Berbagai molekul seperti cytomegalovirus, herpes simplex virus, virus hepatitis A dan C, dan HIV dapat dideteksi dari sampel DBS melalui PCR, q-PCR, dan RT-PCR untuk skrining penyakit viral. Sampel DBS juga dapat digunakan untuk menganalisis molekul lain, seperti vitamin D, asam amino, lipid, hingga narkotik (seperti kokain, opiate, dan amfetamin), serta protein serum seperti hemoglobin terglykosilasi (Lehmann et al, 2013). Selain itu, DBS dapat digunakan untuk penelitian genomik seperti amplifikasi seluruh genom, genotyping SNP, microarray, dan mutasi yang terkait dengan penyakit genetik seperti kanker (Klotz et al, 2006) dan thalasemia (Karthipan et al, 2011).

2. Metode Pengambilan Sampel DBS

Metode sampling DBS mengambil sampel darah dari pembuluh darah perifer dengan menggunakan jarum steril. Ini dilakukan dengan menusuk kulit di ujung jari atau tumit kaki. Darah dari ujung jari diteteskan ke kertas filter (Whatmann 903 Protein Saver Card, Whatmann, Springfield Mill, UK; Perkin Elmer 226 Spot Saver Card, Perkin Elmer, Waltham, USA), dan kemudian dikeringanginkan di suhu ruang selama beberapa jam. Untuk meningkatkan proses pengeringan dan mengurangi kelembaban, Sampel darah yang telah mengering dapat segera dianalisis atau disimpan dalam desikan plastik yang

kedap udara (Gambar 13). Sampel DBS yang telah dibungkus dalam plastik kedap udara dapat dikirim melalui pos atau dibawa langsung ke laboratorium tanpa memerlukan suhu dingin selama transportasi, tergantung pada target molekul yang ingin dideteksi (Lehmann et al, 2013).

Sebelum analisis dilakukan, spot berkualitas tinggi (Tabel 3) dilubangi untuk membentuk disc kecil berdiameter 3 hingga 5,5 mm, atau setara dengan 1-4 μ l serum. Setelah itu, disk tersebut dimasukkan ke dalam plat microtitre dengan dasar rata dan kemudian diekstraksi, atau dielusi, dengan menggunakan buffer (Parker and Cubitt, 1999). Buffer salin/fosfat adalah yang paling umum digunakan dalam proses elusi, dan seringkali ditambahkan dengan larutan deterjen yang terdiri dari Tween atau Triton, protein carrier, dan chelator agents (EDTA). Selain itu, dalam proses elusi, buffer organik yang mengandung methanol, acetonitril, atau etanol juga dapat digunakan (Lehmann *et al.*, 2013).



Gambar 13. Metode sampling DBS Setelah ditusuk dengan jarum atau lancet steril, ujung jari diusap dengan kapas alkohol (disinfektan) dan ditekan secara perlahan agar darah keluar. Di tengah lingkaran, teteskan darah di atas kertas saring (usahakan ujung jari tidak mengenai kertas saring) (A) Kemudian, DBS dikeringanginkan pada suhu ruang selama tiga hingga empat jam sampai kering (B) Kemudian, sampel DBS yang sudah kering disusun di atas kertas glisin sebagai pembatas untuk mencegah kontaminasi antar sampel (C) Kemudian, kertas pembatas dilipat lalu dipotong (D). Dimasukkan ke dalam plastik klip yang kedap udara (E), yang diberi desikan untuk mengurangi kelembaban dan menghalangi pertumbuhan jamur (F), dan indikator untuk tingkat kelembaban udara (G). Dengan menggunakan spidol permanen diberikan keterangan pada plastik klip (H) (Sumber : WHO, 2005).

Dengan atau tanpa shaker, elusi dapat dilakukan selama beberapa jam di suhu ruang atau 4 derajat Celcius (Parker and Cubitt, 1999; Grüner et al., 2015). Hasil elusi dapat dianalisis lebih lanjut dengan molekul target yang

dimaksud dengan menggunakan metode yang dibuat sendiri atau yang telah digunakan dalam penelitian sebelumnya. Untuk membuat penelitian yang berbasis DBS lebih mudah, sejumlah kit komersial khusus untuk analisis sampel DBS tersedia untuk dibeli.

Tabel 4. Contoh kualitas hasil spot pada sampel DBS (Sumber : Ostler *et al.*, 2014; WHO, 2005)

TIDAK BAGUS	BAGUS
 <p>Keluar dari area spot, masih valid untuk digunakan</p>	
 <p>Spot terlalu kecil</p>	
 <p><i>Overlapping</i></p>	
 <p>Terlalu kecil dan <i>overlapping</i></p>	<p>Sampel darah penderita anemia, valid untuk digunakan</p>
 <p>Spot tidak kering sebelum dikemas dan dikirim</p>	
 <p>Darah pada spot menggumpal dan bertumpuk</p>	
 <p>Sampel mengalami hemolisis, perubahan warna, atau terkontaminasi</p>	
 <p>Terbentuk cincin serum, yaitu serum terpisah dari sel</p>	

3. Kelebihan Dan Kekurangan DBS

CDC menyatakan bahwa metode sampling darah yang menggunakan kertas saring sama reproduksibilitas dan presisi dengan metode sampling darah konvensional (Mei et al., 2001). Teknik sampling DBS juga memiliki banyak keunggulan dari segi teknik, keamanan, dan ekonomi dibandingkan dengan metode venipuncture konvensional. Dari perspektif teknis, prosedur pengambilan sampel DBS sederhana dan tidak memerlukan tenaga medis berpengalaman, sehingga dapat mengatasi kendala keterbatasan fasilitas dan tenaga medis di daerah terpencil. Ketika dibandingkan dengan pengambilan darah melalui intravena, prosedur DBS bersifat invasif dan menyebabkan rasa sakit hanya sedikit dibandingkan dengan pengambilan darah melalui intravena. Akibatnya, DBS sangat cocok untuk orang tua, bayi yang menjalani screening bayi baru lahir, atau pasien yang sering menjalani pengambilan darah seperti pasien kanker (Parker and Cubitt, 1999; Lehmann et al, 2013)

Pengering sampel DBS dapat mencegah infeksi dan kontaminasi. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa saat pengeringan dapat merusak kapsid atau bagian envelop beberapa jenis virus, seperti HIV, cytomegalovirus (CMV), virus hepatitis C (HCV), dan Tlymphotropic virus (HTLV). Virus-virus ini biasanya ada di darah atau serum. Ini mengurangi risiko infeksi atau kontaminasi dengan membuat virus inaktif (Resnick et al, 1986).

Dibandingkan dengan metode sampling darah yang lebih umum, metode sampling DBS memerlukan peralatan yang lebih sederhana (Gambar

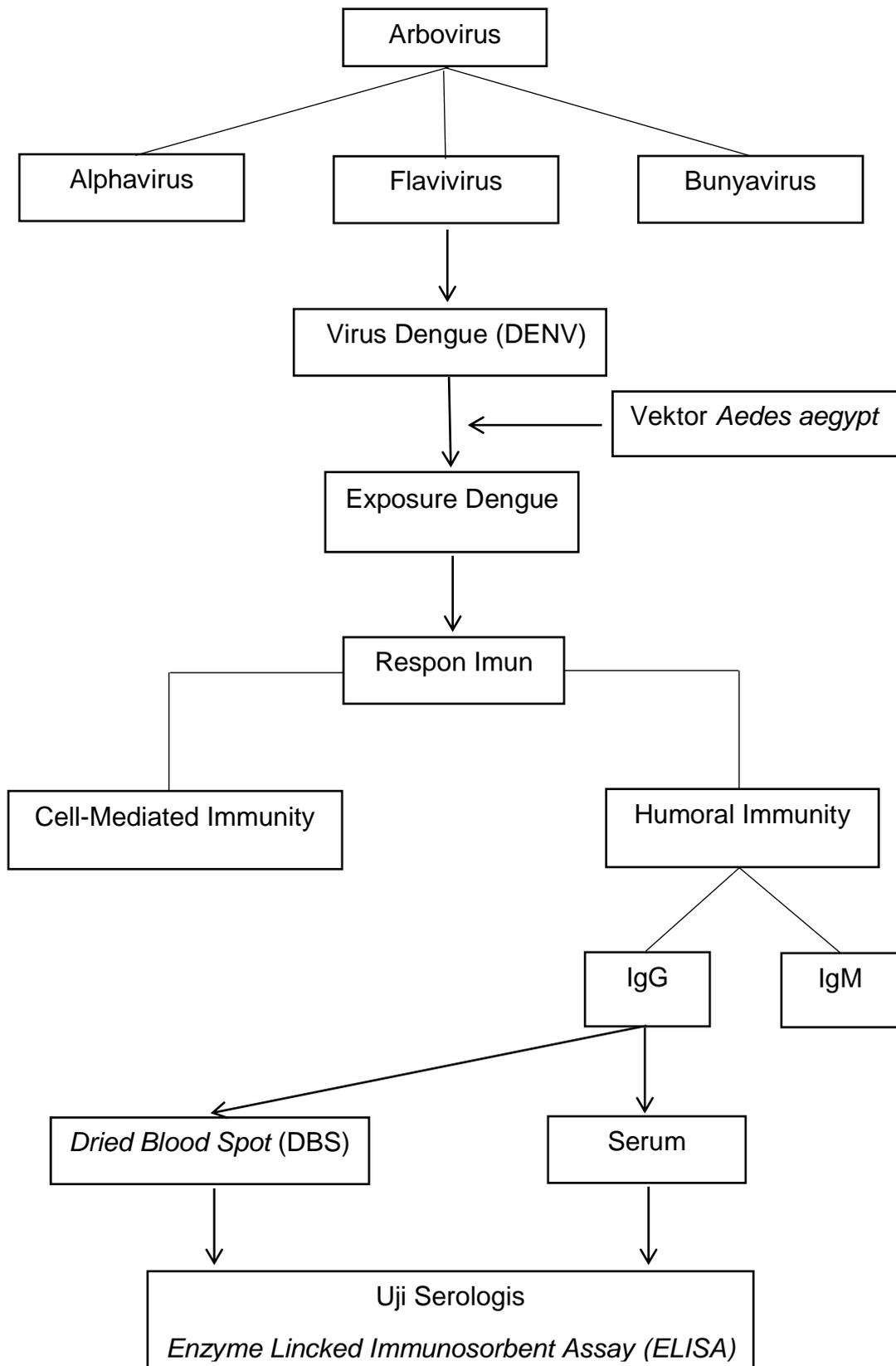
14). Selain itu, sampel DBS dapat dikirimkan melalui pos tanpa memerlukan kondisi suhu dingin seperti nitrogen cair, ice pack, atau es dingin (Parker and Cubitt, 1999), yang membedakannya dari sampel darah segar (whole blood) yang disimpan dalam kantong dengan atau tanpa antikoagulan. Bentuk dan ukuran sampel DBS yang dapat ditata bertumpuk dengan mudah juga membantunya disimpan baik selama transportasi maupun di fasilitas penyimpanan laboratorium, seperti di dalam kotak di suhu ruang, di freezer, atau di lemari pendingin. Keunggulan sampel DBS sangat tepat untuk digunakan dalam penelitian epidemiologi yang melibatkan populasi besar, terutama di negara-negara tropis seperti Indonesia. Teknik sampling DBS juga dapat mengatasi masalah mencakup wilayah terpencil dan luas.



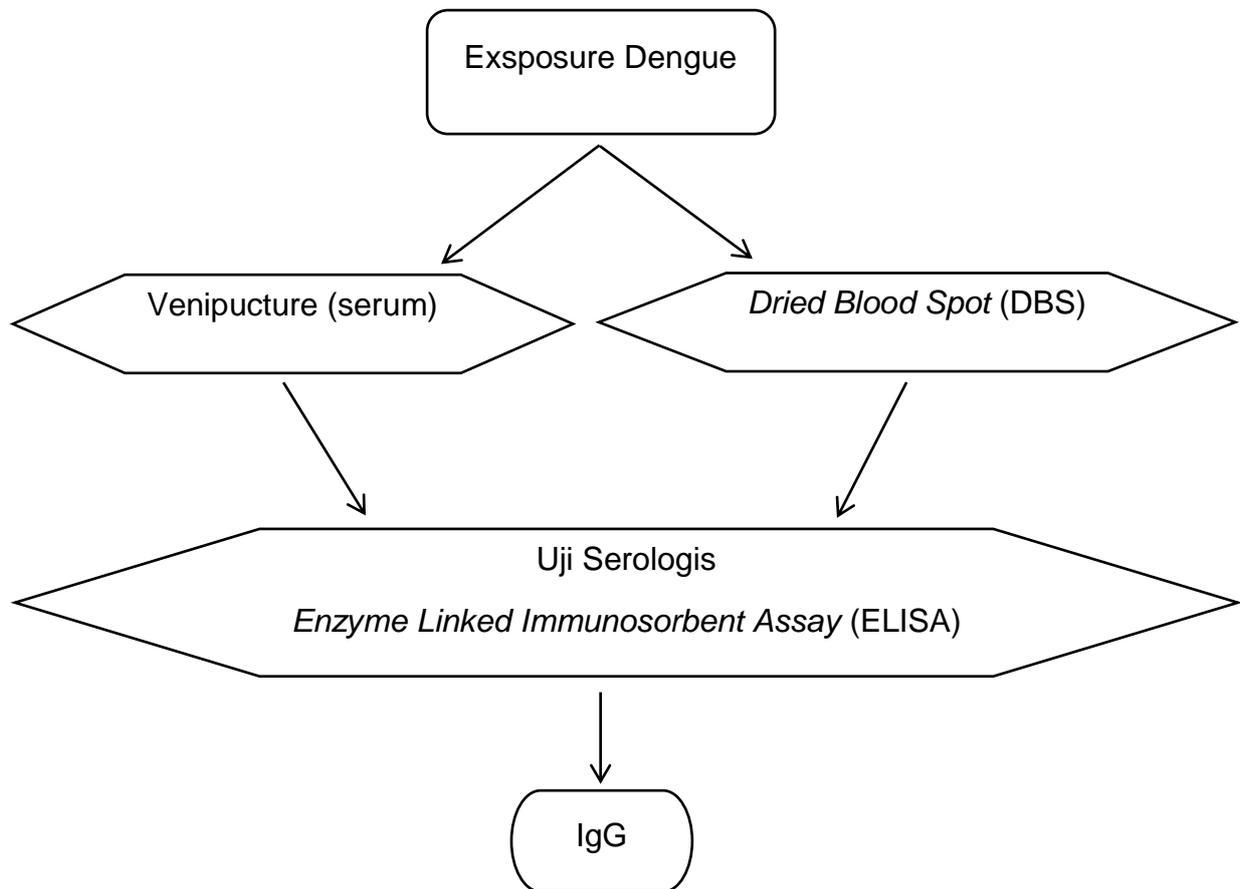
Gambar 14. Perbandingan antara peralatan yang diperlukan untuk proses sampling venipuncture dan DBS (Sumber : WHO, 2005; <https://phlebotomytraininggroup.com/>).

Interferensi dengan bagian sel darah lain, seperti hemoglobin dan molekul intraseluler, mungkin terjadi selama proses analisis karena sampel DBS terdiri dari keseluruhan darah, bukan hanya serum atau plasma. Selain itu, proses pengeringan dapat mengubah sel darah, sehingga uji hematologi sel tidak dapat dilakukan pada sampel DBS. Protein dalam darah juga dapat terdenaturasi, dan aktivitas enzimatis juga dapat berubah selama proses ini. Mengingat volumenya yang rendah, sampel DBS dapat mengurangi sensitivitas pengujian dan menghambat pengujian berulang (Parker and Cubitt, 1999; Lehmann *et al.*, 2013).

F. Kerangka Teori

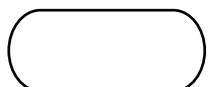


G. Kerangka Konsep



Keterangan :

 Variabel antara (intervening)

 Variabel terikat (dependent)

H. Hipotesis

Sampel DBS dapat sebagai alternatif dalam menggantikan serum pada uji serologis IgG dengue.