

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Demam Berdarah *Dengue* (DBD)

Demam berdarah *dengue* (DBD) merupakan re-emerging disease dan endemis di seluruh negara beriklim tropis di dunia. Penyakit ini juga bisa ditemukan di kawasan subtropis. Meskipun begitu, Asia Tenggara merupakan daerah dengan angka kejadian tertinggi yang terutama menyerang anak-anak (Gubler, 2008).

Demam berdarah *dengue* merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus *dengue* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* (Ae). Demam *dengue* adalah demam akut diakibatkan oleh virus yang seringkali muncul dengan gejala seperti sakit kepala, nyeri tulang atau sendi disertai nyeri otot, ruam dan leukopenia. Sementara itu, demam berdarah *dengue* ditandai dengan empat gejala klinis yang berat, yaitu demam tinggi, fenomena perdarahan, sering dengan hepatomegaly, dan tanda kegagalan sirkulasi pada kasus yang lebih berat. Pasien dapat mengalami syok hipovolemik akibat kebocoran plasma. Tahap ini disebut sindroma syok *dengue* (DSS) dan dapat berakibat fatal (Kemenkes RI, 2016).

a. Manifestasi Klinik

Perjalanan klinis DBD dimulai dari peningkatan suhu tubuh secara mendadak disertai facial flush dan gejala lain yang merupakan demam *Dengue* seperti anoreksia, muntah, nyeri kepala, dan nyeri otot atau sendi. Beberapa penderita DBD mengeluhkan nyeri tenggorok dan pada pemeriksaan fisik dapat dijumpai injected pharynx. Nyeri epigastrium, margin sub-kostal kanan teraba, dan nyeri perut juga sering dijumpai. Demam tinggi selama 2-7 hari sebelum turun ke tingkat suhu normal atau subnormal. Suhu tubuh terkadang dapat mencapai 40⁰ dan dapat timbul kejang demam. Pola demam bifasik ini dapat diamati pada perjalanan klinis DBD (Aryati, 2017).

b. Serologi *Dengue*

Karakteristik Antigen Non Struktural 1 (NS1)

- 1) Dapat dideteksi dalam 9 hari pertama (sampai 18 hari)
- 2) Spesifisitas diagnostik NS1 sangat baik yaitu 100%
- 3) Sensitivitasnya diagnostik NS1 rendah
- 4) Lebih baik pada infeksi primer dibandingkan sekunder.

(Aryati, 2020)

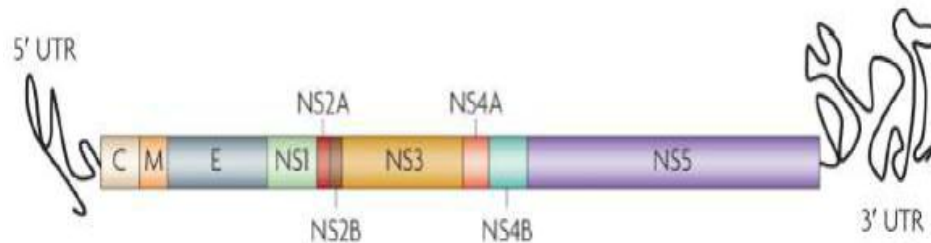
2. Virus *Dengue*

Virus *dengue* merupakan patogen penyebab penyakit demam berdarah *dengue* yang tersebar di sebagian besar wilayah Indonesia. Virus ini ditularkan oleh serangga vektor yaitu beberapa spesies nyamuk kosmopolitan seperti *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* dan beberapa jenis nyamuk lain. Infeksi virus *dengue* (IVD) dapat menunjukkan gejala-gejala yang berbeda seperti demam *dengue* (DD), demam berdarah *dengue* (DBD) yang disertai syok dan manifestasi yang tidak biasa seperti ensefalopati, kardiomiopati, dan lainnya (WHO, 2011).

Virus *dengue* merupakan virus RNA untai tunggal, genus flavivirus, terdiri dari 4 serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Struktur antigen ke-4 serotipe ini sangat mirip satu dengan yang lain, namun perlindungan silang. Variasi genetik yang berbeda pada ke-4 serotipe ini tidak hanya menyangkut antara serotipe, tetapi juga subtipe di dalam serotipe itu sendiri tergantung waktu dan daerah penyebarannya. Pada masing-masing segmen codon, variasi di antara serotipe dapat mencapai 2,6 – 1,0% pada tingkat nukleotida dan 1,3 – 7,7% untuk tingkat protein (Aryati, 2017).

Virus *dengue* termasuk dalam genus flavivirus, famili flaviviridae, yang terdiri dari 10.700 basa di dalam genomnya. Virus *dengue* terdiri dari *single-stranded positivesense* RNA (ssRNA sense+). Di dalam genomnya, terdapat sebuah *single open reading frame* (ORF) yang mengkode 2 macam protein struktural dan protein nonstruktural. Protein struktural terdiri dari C (protein inti/capsid/core), M (protein membran, termasuk preMembrane) dan E (*protein envelope*), serta 7 macam protein nonstruktural yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 yang ditandai oleh sebuah 5' dan 3' nontranslated region (NTR) pada kedua ujungnya (Aryati, 2017).

Protein struktural merupakan 25% dari total protein, sedangkan protein nonstruktural merupakan bagian yang tersebar (75%) terdiri dari NS-1 – NS-5. Kemampuan untuk merangsang pembentukan antibodi di antara protein struktural, urutan imunogenitas tertinggi adalah protein E, yang diikuti oleh protein prM dan C, sedangkan pada protein nonstruktural yang paling berperan adalah protein NS-1. (Aryati, 2017)



Gambar 2.1 Genom Virus *dengue* (Guzman, 2010)

3. Antigen Nonstruktural 1 (NS1)

Antigen NS1 (non structural-1) merupakan salah satu antigen protein yang dihasilkan oleh virus *dengue* dan berperan dalam replikasi virus. Antigen ini dihasilkan oleh virus pada hari pertama demam dan turun sampai tidak terdeteksi kadarnya pada hari ke 5-6, sehingga ditemukannya NS1 pada darah kita merupakan salah satu deteksi awal adanya infeksi virus *dengue*. Protein non struktural 1 (NS1) memiliki berat molekul 46–55 kDa tergantung pada status glikosilasinya. Terdapat beberapa macam dari protein NS1 berdasarkan lokasinya, ada yang terletak di membran sel (mNS1), di dalam rongga vesikel yang terletak di dalam maupun permukaan sel, atau di ekstrasel sebagai bahan sekresi (sNS1) (Gutsche, 2011). Protein NS1 intrasel berperan sebagai kofaktor dalam proses replikasi virus, sementara NS1 yang terdapat di permukaan sel maupun dalam bentuk sekresi bersifat imunogenik. Protein NS1 jenis ini berperan untuk memunculkan respon imun dari penjamu serta terlibat dalam patogenesis infeksi DENV.

Antigen NS1 juga berperan dalam terjadinya *trombositopenia* pada infeksi *dengue* (Hottz E, Tolley, 2011). Antigen non struktural-1 menginduksi lisisnya trombosit yang dimediasi oleh sistem komplemen sehingga menyebabkan penurunan jumlah trombosit di sirkulasi. Selain itu, reaksi autoantibodi dapat terjadi dengan target awal NS1 yang menyerang trombosit dan fibrinogen

sehingga Ag NS1 diduga berperan dalam terjadinya *trombositopenia* pada infeksi *dengue* (Hottz, 2011).

4. Pemeriksaan Rapid Test Antigen Nonstruktural 1 (NS1)

Rapid Tes NS1 adalah suatu tes *in vitro* dengan teknik pengujian *Immunochromatographic*, suatu tes satu langkah untuk menentukan secara kualitatif Antigen NS *Dengue* virus di dalam serum manusia untuk diagnosa dini pada infeksi *dengue* akut. Setiap tes berisikan satu membrane strip, yang telah dilapisi dengan anti-*dengue* NS1 antigen capture pada daerah garis tes. Anti-*dengue* NS1 *antigen-colloid gold conjugate* dan serum sampel bergerak sepanjang membran menuju daerah garis tes (T) dan membentuk suatu garis yang dapat dilihat sebagai suatu bentuk kompleks antibody-*antigen-antibody gold particle*. *Dengue* Dx NS1 Antigen Rapid Tes memiliki dua garis hasil, garis "T" (garis tes) dan "C" (garis kontrol). Kedua garis ini tidak akan terlihat sebelum sampel ditambahkan. Garis kontrol C digunakan sebagai kontrol prosedur. Garis ini selalu muncul jika prosedur tes dilakukan dengan benar dan reagen dalam kondisi baik. (Kemenkes RI, 2011)

Gejala DBD beragam, sehingga sering kali sulit didiagnosis terutama pada masa awal demam hari ketiga sampai keempat. Bila ditinjau dari runtunan perjalanan penyakit (*the sequences of the disease process*), yaitu proses mengembangkannya penyakit dibagi menjadi tiga tahapan (*stage*), maka di tahap awal (*initial stage*) sangat diperlukan cara mendiagnosis yang handal.

Program pengendalian Demam Berdarah *Dengue* membutuhkan suatu tes yang cepat, praktis dan dapat dipercaya untuk infeksi *dengue* primer dan sekunder. Saat ini telah dikenal Rapid Diagnosis Test (RDT) untuk mendeteksi NS1, IgG dan IgM. NS1 adalah suatu glycoprotein yang muncul dengan konsentrasi tinggi pada pasien terinfeksi *dengue* pada tahap awal penyakit. Antigen NS1 ditemukan pada hari pertama hingga hari ke sembilan sejak awal demam pada pasien-pasien dengan infeksi *dengue* primer maupun infeksi *dengue* sekunder. Respon kekebalan dengan memproduksi antibodi IgM muncul pada hari ke 3-5 sejak gejala dan bertahan untuk jangka waktu 30-60 hari (Kemenkes RI, 2011)

Penggunaan RDT mempercepat dalam mendiagnosa kasus infeksi *Dengue*, sehingga membuat pasien segera mendapatkan penanganan yang tepat, dan tindakan pengendalian penyakit seperti penyelidikan epidemiologi, penanggulangan fokus dapat segera dilakukan. Dengan ini diharapkan dapat membantu tercapainya sasaran program pengendalian DBD yaitu Angka kesakitan penderita DBD sebesar 51 per 100.000 penduduk dan mengurangi angka kematian <1%. (Kemenkes RI, 2011)

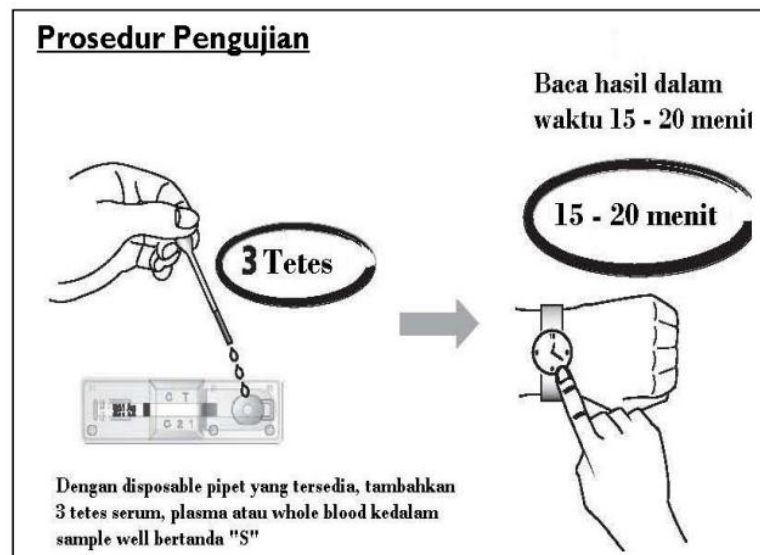
Dengan demikian proses penyakit tidak berkembang menjadi tahap giat (*active stage*) bahkan tahap pamungkas (*terminal stage*). Berbagai upaya pendiagnosaan sering kali dilakukan untuk dapat mendiagnosis infeksi virus *dengue* lebih dini dan mencegah terjadinya penyulit (komplikasi) atau kematian akibat infeksi virus *dengue* ini. Pemeriksaan serologik seperti IgG dan IgM anti *dengue* digunakan sebagai penentuan antigen dengan PCR atau pemeriksaan antigen NS1 *dengue*. Diharapkan penentuan antigen NS1 *dengue* dapat menemukan deteksi infeksi virus *dengue* dari segi penyebabnya bukan dari akibatnya. Rapid Diagnosis Test (RDT) dengan teknik imminochromatography juga dapat dilakukan untuk deteksi dini protein non-struktural virus *dengue* (termasuk NS1) secara kualitatif (Kemenkes RI, 2011)

Peran antigen NS1 *dengue* pada awal pengulangan membangun (replikasi) virus dan penyebab reaksi pengebalan (imunologis) yang tidak diharapkan menjadi hipotesis jangkitan/tularan virus *dengue*. Viroj Wiwanitkit pada tahun 2004 menganalisis filogenetik dan menyimpulkan bahwa antigen NS1 *dengue* menimbulkan antibodi terhadap protein manusia/human protein (fibrinogen dan integrin/adhesin di trombosit). Hal ini menjelaskan terjadinya kurang trombosit (trombositopenia) di penderita infeksi virus *dengue*.

Apabila demam masih di awal sekitar 0-4 hari maka pilihan pemeriksaannya adalah NS1Ag *dengue*, tetapi apabila sudah melewati hari ke-4 demam maka pilihannya adalah IgG & IgM *dengue*. Terkadang kedua pemeriksaan ini dilakukan bersamaan terutama saat waktu borderline atau hari ke-3 hingga hari ke-5 demam. Jadi apabila ada gejala DBD seperti demam tinggi, kedua pemeriksaan tadi dapat dilakukan selain pemeriksaan standar seperti pemeriksaan darah lengkap untuk melihat jumlah trombosit.

1) Prosedur Pengujian Rapid Test NS1

- a) Apabila tes dan sampel disimpan dalam lemari pendingin (*refrigerator*), adaptasikan terlebih dahulu pada suhu ruang.
- b) Buka kantong tes dan keluarkan tes. Letakkan ditempat bersih, kering dan datar.
- c) Dengan menggunakan disposable dropper, tambahkan 3 tetes sampel kedalam sumur (*well*) sampel bertanda (S).
- d) Jika tes berjalan dengan baik, akan terlihat pergerakan warna ungu sepanjang jendela hasil menuju kebagian tengah tes.
- e) Interpretasikan hasil setelah 15-20 menit. Jangan membaca hasil setelah 20 menit karena dapat meberikan hasil palsu.
- f) Hasil positif akan tetap setelah 20 menit. Walaupun demikian, untuk mencegah kesalahan hasil, jangan baca hasil setelah 20 menit.



Gambar 2.2 Prosedur Pengujian Rapid Diagnosis Tes NS1 (KemenkesRI, 2011)

2) Interpretasi Hasil Pengujian

Hasil Negatif: Jika hanya terbentuk garis pada area garis kontrol (C)

Hasil Positif: Jika terbentuk garis pada area garis (T) dan (C).

Hasil Invalid: jika tidak terbentuk garis pada area garis kontrol (C). Untuk hasil Invalid dilakukan tes ulang.



Gambar 2.3 Interpretasi Hasil Pengujian RDT NS1 (KemenkesRI, 2011)

5. Pemeriksaan Antigen Nonstruktural 1 (NS1) Metode ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) merupakan teknik biokimia yang biasa digunakan dalam imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam sampel. *Enzyme-linked immunosorbent assay* diperkenalkan pertama kali oleh Engvall dan Pearlmann pada tahun 1971. *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) merupakan immunoassay yang menggunakan enzim sebagai label. Prinsip immunoassay ini adalah mendeteksi keberadaan antigen atau antibodi yang terimobilisasi menggunakan antigen atau antibodi spesifik yang terkonjugasi dengan enzim (Murphy, 2012). Kehadiran antigen atau antibodi target ditandai dengan terjadinya reaksi enzimatik. Jika kompleks antigen dan antibodi terbentuk maka substrat yang ditambahkan ke dalam sumur akan diubah menjadi produk. Proses enzimatik tersebut akan mengakibatkan terjadinya perubahan warna. Perubahan warna tersebut yang akan dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer atau ELISA reader.



Gambar 2.4 ELISA Reader (Karim, 2016)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) dapat digunakan untuk berbagai macam kebutuhan, seperti menghitung tingkat antibodi, mendeteksi

virus, mendeteksi perubahan hormon, dan mendeteksi sirkulasi penanda inflamasi (Murphy, 2012).

Pada infeksi DENV, terdapat antigen NS1 dengan jumlah yang banyak di dalam sirkulasi. Oleh karena itu, pemeriksaan antigen NS1 sangat bermanfaat untuk mendiagnosa infeksi *dengue* (WHO, 2015). Pemeriksaan untuk mendeteksi NS1 telah tersedia secara luas, salah satu yang banyak digunakan adalah ELISA. Pemeriksaan ELISA memiliki spesifisitas yang tinggi. Sebagai contoh, Panbio NS1 capture ELISA memiliki sensitivitas 60,4-66% dan spesifisitas 97,9-99% (Costa, 2014).

Secreted soluble DNV NS1 (sNS1) ditemukan dalam serum pasien selama fase akut dan digunakan sebagai indikator diagnostik infeksi virus *dengue* akut. Tingkat sNS1 yang tinggi berhubungan dengan peningkatan derajat keparahan infeksi virus *dengue*, walaupun belum jelas kemaknaanya atau hanya sebagai petanda peningkatan viremia pada beberapa kasus (Aryati, 2017).

Pemeriksaan Antigen NS1 hanya mendeteksi keberadaan virus pada tubuh kita, sehingga tidak bisa membedakan apakah infeksi *dengue* yang terjadi adalah primer atau sekunder, juga tidak bisa membedakan serotipe virus *dengue*. Pemeriksaan terhadap antigen NS1 ini menggunakan metode ELISA dan ICT, dengan kebanyakan laboratorium menggunakan metode ICT karena lebih cepat dan mudah dikerjakan.

Diagnosis infeksi virus *dengue* sampai saat ini masih merupakan masalah terutama pada masa awal infeksi (*initial stage*). Diagnosis laboratorik jangkitan/tularan virus *dengue* dapat dilakukan melalui pengasingan (isolasi) virus, penemuan (deteksi) antigen atau uji serologis. *Gold standard* untuk mendeteksi virus *dengue* saat ini adalah kultur virus atau PCR, namun biaya yang besar dan teknis pengerjaan yang sulit masih menjadi kendala pemeriksaan ini. Saat ini telah dikembangkan suatu pemeriksaan terhadap antigen non struktural-1 *dengue* (Ag NS1) yang dapat mendeteksi virus *dengue* dengan lebih awal bahkan pada hari pertama onset demam (Silva AC, 2012).

Pemeriksaan Ag NS1 dalam penegakkan diagnosis *dengue* telah disarankan terutama pada fase awal sejak onset timbul demam (Kassim FM, 2011). Beberapa studi sepakat bahwa Ag NS1 *dengue* merupakan biomarker yang sangat penting

dalam diagnosis infeksi *dengue* karena Ag NS1 dapat dideteksi pada fase awal penyakit sebelum antibodi terbentuk. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa titer Ag NS1 terdeteksi tinggi serum pasien selama pada fase akut infeksi. Antigen ini dapat dideteksi baik pada infeksi primer maupun infeksi sekunder, titer antigen pada infeksi primer lebih tinggi dibanding infeksi sekunder. Antigen NS1 dapat dideteksi dalam darah mulai dari hari pertama hingga 9 setelah onset demam (Sistla S, 2016).

6. Sensitivitas dan Spesifisitas dalam metode Pemeriksaan

a. Sensitivitas

Terdapat 2 jenis sensitivitas yang dikenal dengan sensitivitas klinis dan sensitivitas analitik. Sensitivitas klinik adalah persentase hasil positif sejati di antara pasien-pasien yang berpenyakit.

$$\frac{\text{Positif sejati}}{\text{Positif sejati} + \text{Negatif palsu}} \times 100 \%$$

Sensitivitas yang baik adalah yang mendekati 100%. Sensitivitas analitik sering kali diartikan sebagai batas deteksi, yaitu kadar terendah dari suatu analit yang dapat dideteksi oleh suatu metode. Pemeriksaan dengan sensitivitas tinggi terutama dipersyaratkan pada pemeriksaan untuk tujuan skrining.

b. Spesifisitas

Sama halnya dengan sensitivitas, ada 2 jenis spesifitas yaitu spesifisitas klinis dan spesifisitas analitik. Spesifisitas klinis adalah persentase hasil negatif sejati di antara pasien-pasien yang sehat.

$$\frac{\text{Negatif sejati}}{\text{Negatif sejati} + \text{Positif palsu}} \times 100 \%$$

Spesifisitas analitik berkaitan dengan kemampuan dan akurasi suatu metode untuk memeriksa suatu analit tanpa dipengaruhi zat-zat lain. Sensitivitas 100% jarang diikuti dengan Spesifisitas 100% dan sebaliknya. Metode yang baik adalah metode yang memberikan sensitivitas dan spesifisitas setinggi mungkin.

Tidak ada satupun metode yang bebas dari positif palsu atau negatif palsu.
(Permenkes, 2013)

B. Hipotesis Penelitian

H₁: Terdapat perbedaan hasil pemeriksaan rapid tes antigen NS1 dan antigen NS1 metode ELISA dalam menegakkan Diagnosis penyakit demam berdarah *dengue*.

C. Variabel Penelitian

Variabel Dependent : Demam Berdarah *Dengue*

Variabel Independent : Rapid Test antigen NS1 dan antigen NS1 metode ELISA