

**DETEKSI MOLEKULER DAN ANALISIS KERAGAMAN GENETIK  
VIRUS DENGUE DI SULAWESI UTARA TAHUN 2022  
BERDASARKAN SEQUENCING PADA REGION PROTEIN C-PRM**

**ALFANI MARING DATU**

**P062211008**



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2023**

**DETEKSI MOLEKULER DAN ANALISIS KERAGAMAN GENETIK  
VIRUS DENGUE DI SULAWESI UTARA TAHUN 2022  
BERDASARKAN SEQUENCING PADA REGION PROTEIN C-PRM**

**ALFANI MARING DATU**

**P062211008**



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

**2023**

**MOLECULAR DETECTION AND ANALYSIS OF DENGUE VIRUS  
GENETIC DIVERSITY FROM NORTH SULAWESI IN 2022 BASED  
ON SEQUENCING OF THE C-PRM PROTEIN REGION**

**ALFANI MARING DATU**

**P062211008**



**MASTER PROGRAM OF BIOMEDICAL SCIENCE  
GRADUATE SCHOOL  
HASANUDDIN UNIVERSITY  
MAKASSAR  
2023**

**DETEKSI MOLEKULER DAN ANALISIS KERAGAMAN GENETIK  
VIRUS DENGUE DI SULAWESI UTARA TAHUN 2022  
BERDASARKAN SEQUENCING PADA REGION PROTEIN C-PRM**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

ALFANI MARING DATU

P062211008

Kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2023**

## LEMBAR PENGESAHAN TESIS

### DETEKSI MOLEKULER DAN ANALISIS KERAGAMAN GENETIK VIRUS DENGUE DI SULAWESI UTARA TAHUN 2022 BERDASARKAN SEQUENCING PADA REGION PROTEIN C-PRM

Disusun dan diajukan oleh

**ALFANI MARING DATU**

**P062211008**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka

Penyelesaian Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin

Pada tanggal 27 Juli 2023

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

**Menyetujui**

**Pembimbing Utama**

**Pembimbing Pendamping**

  
**Prof. dr. Rosdiana Natzir, PhD**  
NIP: 19570326 198803 2 001

  
**Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc**  
NIP: 19770121 200312 2 003

**Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik**

**Dekan Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin**

  
**dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D., Sp.PD.K-HOM**  
NIP: 19680218 199903 2 002

  
  
**Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed**  
NIP: 19661231 199503 1 009

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul “Deteksi Molekuler dan Analisis Keragaman Genetik Virus Dengue di Sulawesi Utara Tahun 2022 Berdasarkan Sequencing pada Region Protein C-Prm” adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Prof. dr. Rosdiana Natzir, PhD sebagai Pembimbing Pertama dan Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc sebagai Pembimbing Kedua. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka disertasi ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal (Biodiversitas, Volume 24, Nomor 6, Halaman 3407-3413, dan DOI: 10.13057/biodiv/d240636) sebagai artikel dengan judul “Molecular detection and analysis of dengue virus genetic diversity in North Sulawesi, Indonesia during 2022”.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.



Makassar, Juli 2023

*Alfani Maring Datu*  
Alfani Maring Datu

P062211008

## UCAPAN TERIMAKASIH

Puji dan Syukur selalu penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala penyertaan dan perlindunganNya sehingga penulisan tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

Penelitian ini dapat terlaksana dengan sukses dan tesis ini dapat terampungkan dengan baik atas bimbingan, diskusi dan arahan Prof. dr. Rosdiana Natzir, PhD sebagai Pembimbing Pertama dan Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc sebagai Pembimbing Kedua. Terimakasih atas kesabaran dalam membimbing penulis selama ini.

Pada kesempatan ini pula penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. dr.Isra Wahid,S.Ked.,Ph.D, Dr.dr.Syahrijuita,M.Kes.,Sp.THT, dan dr.Gita Vita Soraya,Ph.D selaku penguji, terimakasih atas masukan dan bimbingan yang sangat bermanfaat dalam penulisan tesis ini.
2. dr.Rahmawati Minhajat,Ph.D,Sp.PD.K-HOM, selaku ketua Program Studi Biomedik dan Prof.Dr.Budu,Ph.D.,Sp.M(K).,M.MedEd selaku Dekan Sekolah Pascasarjana dan juga kepada seluruh staf Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin, terimakasih atas kesempatan dan petunjuk selama penulis menjadi mahasiswa.
3. Bidang PPSDM Kemenkes RI terimakasih atas bantuan dana pendidikan.
4. Kepala Kantor serta rekan-rekan kerja di BTKL PP Kelas I Manado terimakasih atas dukungan selama penulis menjalani perkuliahan dan penelitian.
5. Orang Tua terkasih ayah Fransiskus Danga' dan ibu Alfrida Arung Allo, ayah Agustinus Birana dan ibu Ruth Kamban atas dukungan doa serta bimbingannya, juga kepada kakak dan adik Gesti Parelangan, Julio Danga', Ivansius Palumean, Conelius Gideon Danga', dan Glori Debora Palungan atas dukungan dan kebersamaan yang telah diberikan.
6. Suami Hardianus Sambo yang selalu memberi motivasi dan dukungan selama penulis menjalani pendidikan.
7. Rekan-rekan seperjuangan angkatan 2021 Prodi Biomedik Peminatan Biologi Molekuler

Penulis sadar tesis ini masih jauh dari sempurna baik dari segi isi maupun bahasanya. Oleh karena itu, saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan dalam menyempurnakan tesis ini.

Akhirnya penulis berharap semoga tesis ini dapat memberikan bermanfaat dan memberikan sumbangan ilmu pengetahuan kepada kita semua.

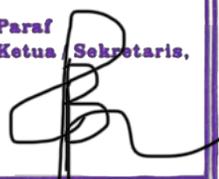
Penulis  
2023

## ABSTRAK

**ALFANI MARING DATU.** *Deteksi Molekuler dan Analisis Keragaman Genetik Virus Dengue di Sulawesi Utara Tahun 2022 Berdasarkan Sequencing pada Region Protein C-Prm ( dibimbing oleh Rosdiana Natzir dan Ika Yustisia)*

Dengue merupakan salah satu jenis penyakit menular yang disebabkan oleh virus dengue yang sangat endemik di daerah tropis. Virus dengue terdiri atas empat serotipe yaitu DENV1, DENV2, DENV3, dan DENV4. Terjadinya keragaman serotipe dan genotipe virus dengue memiliki dampak besar pada tingkat virulensi, manifestasi klinis, serta epidemiologi penyakit. Sulawesi Utara merupakan salah satu provinsi dengan kasus dengue terbanyak di Indonesia. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi dan menganalisis keragaman serotipe dan genotipe virus dengue yang tersebar di Sulawesi Utara pada tahun 2022. Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik *cross sectional* dengan total sampel 137 serum pasien, yang diperoleh dari 3 puskesmas sentinel dengue. Sampel dikumpulkan berdasarkan kriteria, setiap pasien yang memiliki gejala demam dengue, nyeri retro orbital, nyeri sendi, nyeri otot, nyeri ulkus, muntah, ruam, syok/luka, dan riwayat demam selama 1-5 hari serta tes Ag NS1 positif. Sampel serum dianalisis untuk penentuan serotipe dengan metode RT PCR. Penentuan genotipe berdasarkan hasil sequencing pada region protein C-prM dengan membangun pohon filogenetik berdasarkan metode *maximum likelihood* pada MEGA 11 software. Penelitian ini menemukan 10 sampel yang positif virus dengue. Serotipe 1 merupakan serotipe dominan yakni terdapat 70% DENV1, 20% DENV2, dan 10% DENV4. Pohon filogenetik menunjukkan genotipe dari setiap serotipe dimana DENV1 dengan genotipe I, DENV2 dengan genotipe Cosmopolitan, dan DENV4 dengan genotipe I yang merupakan genotipe baru dari DENV4 yang bersirkulasi di Sulawesi Utara. Sebagai kesimpulan, virus dengue yang tersebar di Sulawesi Utara pada tahun 2022 dominan berasal dari DENV1 genotipe I.

**Kata Kunci:** *Dengue, C-PrM, Genotipe, Serotipe, Sequencing*

 <b>GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS</b>	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua, Sekretaris,
Tanggal : _____	

## ABSTRACT

**ALFANI MARING DATU.** *Molecular Detection and Analysis of Dengue Virus Genetic Diversity from North Sulawesi in 2022 Based on Sequencing of The C-Prm Protein Region* (supervised by **Rosdiana Natzir** and **Ika Yustisia**)

Dengue is a highly endemic infectious disease in the tropics caused by the dengue virus, which consists of four serotypes (DENV1-DENV4). The diversity of dengue virus serotypes and genotypes significantly impacts the degree of virulence, clinical manifestations, and the epidemiology of the disease. North Sulawesi is an Indonesian province with one of the highest numbers of dengue cases. This study aimed to identify and analyze the diversity of serotypes and genotypes of the dengue virus in North Sulawesi in 2022. The research conducted was an observational analytical cross-sectional study with a total sample of 137 patient sera obtained from 3 dengue sentinel health centers. Samples were collected based on specific criteria, including patients exhibiting symptoms such as dengue fever, retro-orbital pain, joint pain, muscle pain, ulcer pain, vomiting, rash, shock/wounds, and a history of fever for 1-5 days with a positive NS1 Ag test. The serum samples were analyzed to determine the serotypes using the RT-PCR method. Genotype determination was based on sequencing results in the C-prM protein region, and a phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method in MEGA 11 software. The study found 10 samples positive for the dengue virus, with Serotype 1 being the dominant serotype, comprising 70% DENV1, 20% DENV2, and 10% DENV4. The constructed phylogenetic tree revealed the genotypes of each serotype, indicating that DENV1 belonged to genotype I, DENV2 belonged to the Cosmopolitan genotype, and DENV4 belonged to genotype I, which represents a new genotype of DENV4 circulating in North Sulawesi. In conclusion, the dengue viruses circulating in North Sulawesi in 2022 were predominantly derived from DENV1 genotype I.

**Keywords:** *Dengue, C-prM, Genotype, Serotype, Sequencing*

 <b>GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS</b>	
<b>Abstrak ini telah diperiksa.</b>  <b>Tanggal :</b> _____	<b>Paraf Ketua / Sekretaris.</b> 

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA .....	ii
UCAPAN TERIMAKASIH.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN .....	xiv
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Kegunaan Penelitian .....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	8
2.1 Tinjauan Virus Dengue .....	10
2.1.1 Tinjauan Patogenesis Dengue .....	14
2.2 Tinjauan Diagnosis Dengue .....	18
2.3 Tinjauan Analisa Filogenetik .....	21
2.4 Kerangka Teori .....	22
BAB III METODE PENELITIAN .....	23
3.1 Rancangan Penelitian .....	23
3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	23
3.3 Prosedur Kerja .....	24

3.3.1	Pengumpulan Sampel .....	24
3.3.2	Isolasi RNA Virus Dengue .....	24
3.3.3	Serotiping dan Deteksi Molekuler Virus Dengue .....	24
3.3.3.1	Metode <i>Real Time</i> RT PCR .....	25
3.3.3.2	Metode RT PCR Konvensional .....	27
3.3.4	Genome Sequencing .....	28
3.3.5	Pembuatan Pohon Filogenetik .....	28
3.4	Waktu dan Tempat Penelitian .....	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....		30
4.1	Hasil .....	30
4.1.1	Hasil <i>Real Time</i> RT PCR .....	31
4.1.2	Hasil RT PCR Konvensional .....	33
4.1.3	Pohon Filogenetik dan Keragaman Molekuler .....	36
4.1.4	Penyelarasan Asam Amino .....	39
4.2	Pembahasan .....	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....		49
5.1	Kesimpulan .....	49
5.2	Saran .....	49
DAFTAR PUSTAKA .....		50
LAMPIRAN .....		56

## DAFTAR TABEL

Nomor Urut	Halaman
1. Daftar Genotipe masing-masing serotipe virus dengue .....	13
2. Primer dan Probe yang digunakan pada Metode <i>real time</i> RT PCR.....	25
3. Primer yang digunakan untuk Proses RT PCR Konvensional dan Amplifikasi.....	25
4. Komponen <i>Reaction Mix real time</i> RT PCR.....	26
5. Detektor yang digunakan pada Metode <i>real time</i> RT PCR .....	27
6. Protokol Metode <i>real time</i> RT PCR .....	27
7. Komponen <i>Reagen Mix</i> Metode RT PCR Konvensional.....	28
8. Protokol Metode RT PCR Konvensional.....	28
9. Hasil <i>Real Time</i> RT PCR.....	31
10. Karakteristik klinis pasien positif dengue .....	32
11. Hasil RT PCR Konvensional .....	33
12. Daftar Genotipe dari Sampel yang diperoleh.....	36
13. Penyelarasan asam amino region C-prM virus dengue .....	40

## DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
1. Genom Virus Dengue.....	12
2. Siklus Hidup Virus Dengue.....	16
3. Alur Kerja Pengumpulan dan Pemeriksaan Sampel.....	30
4. Peta Lokasi Puskesmas Sentinel Dengue.....	32
5. Hasil Elektroforesis Kontrol Positif, Kontrol Negatif, Sampel 4 dan 20.....	34
6. Hasil Elektroforesis Sampel 30,34,42,42,102,26, dan 50.....	34
7. Hasil Elektroforesis Sampel 88,119,33,51,66,75,80.....	35
8. Hasil Elektroforesis Sampel 87,26,35,44.....	35
9. Pohon Filogenetik DENV1 dari Sampel yang diperoleh bersama dengan Sequens DENV1 dari situs NCBI.....	37
10. Pohon Filogenetik DENV2 dari Sampel yang diperoleh bersama dengan Sequens DENV2 dari situs NCBI.....	38
11. Pohon Filogenetik DENV4 dari Sampel yang diperoleh bersama dengan Sequens DENV4 dari situs NCBI.....	39
12. Penyelarasan asam amino region C-prM virus dengue).....	40

## DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

°C	= derajat Celsius
%	= persen
Ag	= Antigen
C	= capsid
CFR	= <i>Case Fatality Rate</i>
DENV	= Dengue Virus
E	= Envelope
INF $\gamma$	= <i>Interferon Gamma</i>
IR	= <i>Incidence Rate</i>
M	= Membran
NS	= Non Struktural
prM	= Premembran
TNF $\alpha$	= <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. LATAR BELAKANG

Dengue merupakan penyakit menular yang sangat endemik di daerah tropis, disebabkan oleh virus dengue yang ditularkan dari manusia ke manusia melalui nyamuk aedes betina. Penyakit dengue bervariasi mulai dari demam ringan hingga kondisi parah berupa demam berdarah. Berdasarkan perbedaan antigenik virus dengue dibagi menjadi empat serotipe yang berbeda yakni serotipe 1,2,3, dan 4 (DENV1, DENV2, DENV3, dan DENV4) yang memiliki kesamaan sekitar 65% pada asam amino penyusunnya. Setiap serotipe ini masing-masing memiliki genotipe yang beragam berdasarkan distribusi geografis, potensi epidemik serta perbedaan urutan nukleotida. Keberagaman serotipe dan genotipe ini menimbulkan respon kekebalan yang beragam serta memiliki kemampuan yang bervariasi dalam menginfeksi sel target yang pada gilirannya dapat mengakibatkan keparahan penyakit dengue. Terjadinya sirkulasi virus dengue yang berbeda dapat berpengaruh pada siklus endemik dari serotipe, genotipe, atau pergantian clade serta dapat menimbulkan terjadinya reaksi imun antar serotipe. Evolusi dari virus dengue ini memiliki dampak besar pada tingkat virulensi di manusia serta pada epidemiologi penyakit. Infeksi virus dengue dengan serotipe yang berbeda mengakibatkan peningkatan *antibody dependent enhancement* (ADE) sehingga dapat menyebabkan resiko yang lebih tinggi pada manifestasi Demam Berdarah Dengue (DBD) dan *Dengue Shock Syndrome* (DSS) (Harapan H., dkk., 2020; Poltep, K., dkk., 2021).

Virus dengue adalah virus RNA beruntai tunggal. Genom virus dengue terdiri dari 11.000 basa nukleotida yang terdiri atas *Single open reading frame* yang diapit oleh 5' dan 3' *Untranslated Region* (UTR) (Zhang, X., dkk., 2017). RNA virus mengkode poliprotein terdiri atas 3 protein struktural yaitu Capsid (C), Premembran (prM), dan Envelope (E) dan 7 protein non struktural (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, dan NS5) (Qi, R. F., dkk., 2008; Harapan, dkk., 2020). Protein E bertanggung

jawab dalam pengikatan virus ke reseptor. Peran dari protein E ini dapat memberikan pemahaman dalam menemukan treatment dan usaha preventif terhadap infeksi virus dengue. Beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap protein E ini menunjukkan perannya dalam pengembangan vaksin dan terapi antibody monoklonal. Protein C berperan dalam pembentukan nukleokapsid selama tahap utama perakitan virion dengue virus. Bagian dari protein C dan Protein E digunakan sebagai kandidat dari vaksin dengue. Protein M berperan dalam pengaturan dan pematangan partikel dengue virus. Sequencing terhadap daerah pertemuan protein C-prM merupakan alternatif untuk mengurutkan daerah pendek dengan biaya yang cenderung lebih murah serta waktu yang lebih cepat. Protein non struktural dari virus dengue memiliki peranan dalam replikasi virus (Bona, A.C.D, dkk., 2012; Verma, R., dkk., 2014).

Wabah Dengue di Indonesia diakibatkan oleh Serotipe 1,2, dan 3, sedangkan Serotipe 4 merupakan jenis serotipe virus dengue yang terakhir ditemukan di Indonesia dalam kurun waktu lima dekade terakhir. Hasil penelitian terhadap wabah DBD yang terjadi di Jember terhadap 191 pasien suspek dengue menunjukkan bahwa jumlah serotipe dominan yang terdapat di Jember adalah serotipe 4 sedangkan kasus yang diakibatkan serotipe 1 dan 2 terbilang rendah. Hasil penelitian tersebut menyebutkan tidak terdapat perbedaan yang cukup signifikan antara serotipe dan keparahan penyakit, dimana dari beberapa penelitian serotipe 4 disebutkan tidak mengakibatkan derajat keparahan yang tinggi pada pasien yang terinfeksi dengan serotipe tersebut (Aryati dkk., 2020).

Penelitian yang dilakukan di Singapura pada pasien dewasa dalam kurun waktu 2005- 2011 menunjukkan bahwa infeksi virus serotipe 1 menunjukkan tingkat keparahan yang lebih tinggi dibandingkan dengan infeksi virus serotipe 2. Pada tingkat molekuler tingkat keparahan ini kemungkinan dikaitkan dengan DENV1 genotipe 1 dan DENV2 genotipe cosmopolitan. Dalam penelitian ini ditemukan jumlah RNA virus pada infeksi dengan DENV1 lebih tinggi dibandingkan pada infeksi dengan DENV2, dengan kata lain tingkat virulensi DENV1 lebih tinggi dibandingkan DENV2 ( Yung, C.F., dkk., 2015). Sedangkan kasus yang terjadi di Cuba pada tahun 2002 menunjukkan bahwa tingkat keparahan

lebih tinggi terjadi pada infeksi sekunder DENV 2 bahkan mengakibatkan tingkat kematian yang cukup tinggi. Tingkat keparahan meningkat pada infeksi primer dengan DENV 1 dan infeksi sekunder dengan DENV 2 (Guzman, dkk., 2002).

Penelitian yang dilakukan pada sampel dengue selama terjadi wabah di Senegal dan Mali tahun 2015-2019 menunjukkan kemunculan DENV1 di Afrika Barat sedangkan serotipe yang ditemukan bersirkulasi pada periode sebelumnya adalah DENV2 (1970-2000) dan DENV3 (2009). Pada tingkat molekuler Genotipe V dari DENV1 tersebut ditemukan memiliki kekerabatan yang dekat dengan genotipe yang berasal dari Asia Tenggara. Genotipe jenis ini selanjutnya ditemukan tersebar ke Medina Gounass, Senegal, dimana jenis genotipe tersebut dikatakan intens menyebabkan wabah yang kemudian terjadi di tahun-tahun berikutnya (Dieng, I., dkk, 2021). Di Rosso, Senegal, ditemukan 3 jenis serotipe (DENV1-DENV3) yang bersirkulasi selama wabah yang terjadi setiap tahun dalam kurun waktu 2017-2021. DENV1 merupakan serotipe yang dominan ditemukan pada wabah yang terjadi di tahun 2021. Serotipe ini menggantikan DENV2 yang sebelumnya merupakan serotipe dominan pada tahun 2018 (Dieng, I., dkk., 2022).

Kasus yang terjadi di Surabaya pada tahun 2013 menunjukkan infeksi primer oleh DENV1 genotipe IV mengakibatkan manifestasi klinis yang parah (Soegijanto, S., dkk., 2013). Sedangkan penelitian lain mengenai perubahan sirkulasi dengue di Surabaya pada tahun 2014 menunjukkan terjadinya perubahan sirkulasi dari DENV1 dan DENV2 (bersirkulasi di Surabaya dalam kurun waktu 1 dekade) ke DENV3 genotipe I. Perubahan sirkulasi ini berpotensi mengakibatkan wabah dengue di Surabaya (Kotaki, T., dkk., 2014). Pengawasan terhadap sirkulasi virus dengue harus dilakukan secara terus menerus untuk memprediksi terjadinya kasus DBD dan demam dengue, selain daripada itu hal ini berfungsi untuk meningkatkan perbaikan pada manajemen terhadap kasus dengue (Soegijanto, S., dkk., 2013).

Penelitian di Kota Manado pada saat terjadi KLB DBD tahun 2019 terhadap 149 pasien demam di RS. Prof DR. Kandouw Manado yang dicurigai terinfeksi virus dengue menunjukkan 102 pasien yang terkonfirmasi terinfeksi virus dengue. Serotipe yang dominan ditemukan

pada 102 sampel terkonfirmasi tersebut adalah DENV3 yakni sebanyak 79 sampel (75.9%) (Tatura,S., dkk., 2019). Menurut penelitian yang dilakukan terhadap kejadian DBD di Kota Bitung pada tahun 2015-2017 ditemukan terjadi penurunan jumlah kasus dari 124 kasus menjadi 110 kasus, tetapi terjadi peningkatan pada kasus kematian akibat DBD yakni angka kematian yang meningkat dari 2 jiwa menjadi 5 jiwa (Mokolensang, dkk., 2018).

Penyebaran demam berdarah diketahui telah terjadi dalam kurun waktu ratusan tahun, namun penyebab pasti mengenai kebangkitan epidemi demam dengue dan DBD belum diketahui secara pasti. Pertumbuhan penduduk yang tidak terkendali, urbanisasi yang tidak terencana, pengelolaan air limbah yang tidak memadai dan pengendalian nyamuk yang kurang efektif berimplikasi pada peningkatan dan distribusi kepadatan vektor serta peningkatan penyebaran virus. Seiring dengan perkembangan teknologi di bidang diagnosis dengue secara molekuler, dapat ditemukan bahwa evolusi mikro pada virus dengue juga berkontribusi pada penyebaran strain yang lebih ganas di seluruh dunia. Beberapa penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa semakin banyak genotipe virus yang lebih ganas menggantikan genotipe yang kurang ganas dalam hal infeksi virus (Malavige, dkk., 2004).

Beberapa tahun terakhir berbagai macam teknik diagnostik dikembangkan dan terbukti sangat berguna dalam diagnosis dengue diantaranya hibridisasi asam nukleat serta RT-PCR. Diagnosis dengue didasarkan pada tes serologi, isolasi virus, dan deteksi RNA virus. *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) merupakan teknik yang paling banyak digunakan, namun teknik ini memiliki keterbatasan yakni tidak dapat menentukan jenis serotipe dari sampel tersebut sehingga teknik molekuler mengambil peran yang sangat penting dalam diagnosis dengue. Perkembangan dalam biologi molekuler menjanjikan berbagai macam terobosan dalam hal peningkatan percepatan proses diagnosis suatu penyakit. Salah satu teknik diagnostik yang semakin berkembang saat ini adalah teknik PCR. Terdapat dua jenis teknik diagnosis PCR yang umumnya digunakan pada laboratorium yakni PCR konvensional dan *real time* PCR. Teknik PCR ini merupakan teknik yang diyakini paling memuaskan dalam hal deteksi virus dengue karena teknik ini dapat

mendeteksi virus dengue sampai pada hari ke 10 setelah terjadinya gejala (Paula dan da Fonseca, 2004; Khariri, 2020).

Teknik RT-PCR dan *real time* RT-PCR dapat mendiagnosis dengan cepat pada stadium infeksi dini dengan mengetahui jenis serotipe pada virus dengue sehingga penatalaksanaan dapat dilakukan sedini mungkin sesuai dengan serotipe yang menginfeksi. Pemeriksaan virus dengue sangat diperlukan untuk mendeteksi virus dengue pada fase awal untuk mencegah terjadinya kematian pasien dan bermanfaat untuk mengetahui penyebaran dan epidemiologi daerah tertentu. (Nugraheni dkk, 2016).

Pemantauan terhadap sirkulasi strain yang berbeda dari virus dengue sangat diperlukan. Hal ini dapat memberikan pemahaman terhadap dinamika virus dan memberikan petunjuk mengenai dampak serotipe/genotipe tertentu dalam epidemi lokal (Hamel dkk., 2019). Analisa filogenetik dari berbagai isolat virus dengue dapat memberikan pemahaman mengenai proses evolusi serta migrasi virus dengue sehingga dapat memberikan pemahaman yang lebih baik terhadap epidemiologi dari penyakit (Drumond, B.P., dkk., 2016). Perubahan mikro yang terjadi pada setiap serotipe dengue mengakibatkan perubahan genetik yang menghasilkan keberagaman genotipe yang kemudian menjadi endemik dan epidemik. Kemajuan di bidang genetika molekuler saat ini dapat memberikan informasi mengenai hubungan keberagaman genotipe yang terjadi dengan tingkat keparahan penyakit dan potensi epidemi (Khan, dkk., 2012). Data mengenai keberagaman genotipe virus dengue di suatu wilayah sangat penting dalam hal surveilans dan epidemiologi penyakit serta berguna dalam hal pengembangan vaksin (Zeng, dkk., 2018).

Pemantauan virus dengue di Indonesia sebagian besar berfokus pada epidemiologi, vektor, aspek klinis, dan aspek virologi namun masih terdapat kesenjangan dalam aspek genomik. Beberapa penelitian yang telah disebutkan di atas menunjukkan bahwa data genomik juga sangat penting dalam pemantauan dengue. Kemampuan mutasi yang tinggi mengakibatkan keragaman genetik yang tinggi dari virus dengue sehingga data genomik sangat diperlukan dalam penanganan virus ini

termasuk pengawasan virus, pathogenesis, diagnosis, desain obat, dan pengembangan vaksin ( Yohan, B., dkk., 2018).

Data dari KEMENKES RI menyatakan kasus kumulatif dengue Indonesia di awal tahun 2022 sebanyak 45.387 kasus, dan kasus DBD mencapai 432 kasus. Sulawesi Utara merupakan salah satu daerah endemis dengue di Indonesia dengan jumlah kasus DBD yang terbilang cukup tinggi.

Menurut laporan kasus dari Dinas Kesehatan Propinsi Sulawesi Utara bahwa tercatat 2014 total kasus DBD di Sulawesi Utara selama tahun 2018 dengan jumlah kematian akibat DBD yaitu 25 kasus. Peningkatan penderita yang cukup tinggi terjadi pada awal tahun 2019 yakni tercatat sebanyak 165 kasus DBD dengan jumlah kematian 5 jiwa. Selanjutnya total kasus selama terjadi KLB di Sulawesi Utara pada bulan Januari 2019 yaitu 1210 kasus dengan jumlah kematian 15 Jiwa. Total kasus sepanjang tahun 2019 yaitu 2381 kasus dengan jumlah kematian 28 kasus. Tahun 2020 terjadi penurunan kasus yakni 1219 total kasus dengan jumlah kematian 18 kasus. Di tahun 2021 terjadi peningkatan kasus kematian yang cukup tinggi yakni 32 total kasus kematian, namun jumlah kasus DBD cenderung lebih berkurang dari tahun sebelumnya yakni terdapat 1196 total kasus. Tahun 2022 terjadi penurunan kasus kematian dari tahun sebelumnya dengan total 21 kasus kematian akibat DBD namun terjadi peningkatan kasus DBD dari tahun sebelumnya dengan total 1917 kasus.

Kondisi tersebut memberikan gambaran bahwa kasus DBD cenderung masih mengalami fluktuasi di Sulawesi Utara. Data mengenai keragaman virus dengue sangat diperlukan untuk kontrol dan deteksi dini terjadinya wabah DBD di suatu wilayah. Informasi yang diperoleh dari data tersebut sangat penting dalam bidang surveilans dan epidemiologi penyakit, juga dapat digunakan dalam pengembangan antivirus serta penetapan kebijakan bagi pemerintah dalam pengadaan dan pemberian vaksin di Sulawesi Utara dan Indonesia secara umum. Sampai pada saat ini penelitian pada keragaman serotipe dan genotipe virus dengue di Sulawesi Utara masih sangat kurang dilakukan, sehingga untuk mengetahui perkembangan sirkulasi serotipe dan genotipe virus dengue dilakukanlah penelitian ini.

## **1.2. RUMUSAN MASALAH**

1. Jenis serotipe apa saja yang ditemukan tersebar di Sulawesi Utara dan serotipe apakah yang lebih dominan?
2. Jenis genotipe apa saja dari setiap serotipe tersebut yang tersebar di Sulawesi utara?

## **1.3. TUJUAN PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan:

1. Mengetahui jenis serotipe dan jenis serotipe virus dengue yang dominan di Sulawesi Utara
2. Mengetahui jenis genotipe virus dengue di Sulawesi Utara berdasarkan hasil sequencing pada region protein C-prM

## **1.4. KEGUNAAN PENELITIAN**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan data sebaran serotipe dan genotipe virus dengue yang dapat digunakan sebagai kontrol dan deteksi dini terjadinya wabah DBD di Sulawesi Utara

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

Dengue merupakan infeksi virus akut yang ditularkan oleh nyamuk yang dianggap sebagai penyakit arboviral yang paling penting secara internasional karena lebih dari 50% populasi di dunia tinggal di daerah yang beresiko (Murray, N.E.A., dkk., 2013). Infeksi dengue terjadi di lebih dari 100 negara di wilayah Asia-Pasifik, Amerika, Timur Tengah, dan Afrika. Angka kejadian dengue meningkat terutama di daerah tropis dan sub tropis. Sekitar 2,5 hingga 3 miliar orang yang sebagian besar tinggal di daerah perkotaan di daerah tropis dan subtropis memiliki resiko terkena infeksi virus dengue. Diperkirakan bahwa setiap tahunnya terdapat 100 juta kasus demam dengue dan setengah juta kasus merupakan demam berdarah dengue. Penyebaran vektor ke berbagai wilayah baru sebagai akibat dari peningkatan urbanisasi, pergerakan orang dan barang, perubahan lingkungan, dan tantangan biologis seperti resistensi nyamuk terhadap insektisida (Malvige, G.N., dkk., 2004).

Wabah dengue pertamakali dikonfirmasi secara bersamaan terjadi di Asia, Afrika, dan Amerika Utara pada tahun 1778-1780. Wabah besar terjadi pada tahun 1780 di Philadelphia, Pennsylvania, Amerika Serikat. Dengue masuk ke wilayah Amerika akibat dari perdagangan rum dan budak yang terjadi antar pelabuhan di Afrika dan Karibia. Wabah terjadi di seluruh Amerika Serikat, Karibia, dan Amerika Selatan selama awal abad ke 19 dan 20. Pandemi dengue kedua terjadi di Queensland, Australia dimana pertumbuhan pesat populasi vektor dengue (*Aedes aegypti*) terjadi di wilayah pertambangan. Wabah dengue juga terjadi di wilayah Mediterania Timur yang mengakibatkan epidemi besar di Yunani pada tahun 1928 (Endy, T.P., dkk., 2010). Setelah perang dunia ke dua pandemi dengue terjadi di Asia Tenggara. Hal ini disebabkan oleh rusaknya sistem pengelolaan air setelah perang sehingga menciptakan genangan yang menyediakan tempat bagi berkembang biakan nyamuk. Wabah Demam Berdarah Dengue (DBD) terjadi sebelum perang di wilayah Pasifik dan Amerika sehingga mobilisasi yang terjadi selama perang dunia ke 2 pada tahun 1975 memungkinkan terjadinya

penyebaran vektor ke wilayah Asia Tenggara. Urbanisasi yang semakin meningkat serta iklim yang cocok untuk vektor menyebabkan endemisitas DBD di Asia Tenggara (Araf, Y., dkk., 2021).

Berdasarkan data dari WHO bahwa epidemi DBD pertama yang dikonfirmasi berasal dari Filipina pada tahun 1953-1954 dan di Thailand tahun 1958, sejak saat itu negara-negara Asia Tenggara dan Wilayah Pasifik Barat telah melaporkan kejadian demam berdarah yang besar. India pertama kali melaporkan wabah DBD di tahun 1963. Negara lain di kawasan Asia Tenggara dan Pasifik Barat juga melaporkan kejadian besar Wabah DBD diantaranya Indonesia, Maldives, Myanmar, dan Sri Lanka (WHO, 2009).

Demam Berdarah pertamakali ditemukan di Indonesia yaitu di Surabaya pada tahun 1968. Konfirmasi virologis pada tahun 1972. Sejak saat itu kasus demam berdarah tersebar ke seluruh Indonesia sehingga pada tahun 1980 seluruh provinsi di Indonesia dikonfirmasi telah terjangkit oleh virus dengue dan penambahan kasus dilaporkan terus bertambah dari tahun ke tahun. Menurut data pada bulan Juni 2020 dari Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI menyatakan bahwa kasus Demam berdarah sampai pada bulan Juni tahun 2020 masih terus mengalami peningkatan yaitu kasus antara 100-500 perhari (data bulan Januari-Juni 2020) serta kasus total seluruh Indonesia terdapat 68 ribu kasus (Pusdatin Kemenkes, 2020).

DBD masih sering menjadi masalah utama di beberapa Negara di dunia termasuk Indonesia. Data dari WHO menyatakan bahwa Indonesia menduduki urutan ke 2 dengan kasus terbesar dari 30 negara endemis di Asia Pasifik. Menurut data dari Kemenkes RI jumlah kasus demam berdarah terus meningkat hingga awal tahun 2019 yaitu sebanyak 16.692 kasus dengan 169 orang meninggal dunia. Laporan kasus DBD yang diterima oleh Kemenkes pada awal tahun 2019 terdapat 22 provinsi yang mengalami peningkatan kasus suspek dengue, dari 22 provinsi itu ada beberapa wilayah yang menyatakan sudah masuk kategori kejadian luar biasa (KLB), yakni Kabupaten Kapuas, Provinsi Sulawesi Utara, dan Kabupaten Manggarai Barat (Kemenkes RI, 2019).

Terdapat beberapa teori yang menyatakan bahwa kasus fatal akibat DBD dapat disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya yaitu

dengan adanya infeksi berurutan oleh 2 jenis serotipe virus dengue yang berbeda. Terjadinya infeksi pertama oleh salah satu jenis serotipe virus mengakibatkan pembentukan antibody terhadap jenis serotipe tersebut. Komplikasi yang lebih berat pada penderita terjadi ketika infeksi oleh jenis serotipe yang berbeda pada infeksi kedua. Antibodi yang terbentuk pada infeksi pertama tidak dapat menetralkan jenis serotipe lain pada infeksi kedua.

## 2.1 Virus Dengue

Demam berdarah (DBD) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus dengue (DEN) dari genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae* yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes* (*Stegomyia*), dimana terdapat dua jenis nyamuk *Aedes* yaitu *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (Kemenkes RI, 2013 ; BTKL Yogyakarta, 2004). Virus dengue merupakan virus yang mengandung untai tunggal RNA yang berukuran sekitar 50 nm. Virion terdiri dari nukleokapsid dengan bentuk simetri kubik yang berada dalam amplop lipoprotein (WHO, 2011). Struktur genom (Gambar 1) dari dengue virus dengan panjang 11644 nukleotida dan tersusun dari tiga protein gen struktural yang mengkode nukleokapsid atau inti protein (C), Pre Membran/ membran (prM/M), protein amplop (E), dan tujuh protein gen non struktural (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. Protein tersebut diapit oleh 5' untranslated region (5'-UTR) dan 3' untranslated Region (3'UTR) (Behura, S.K., dkk., 2013). 5'-UTR terdiri atas 95-101 urutan nukleotida pada serotipe 1-4 virus, sedangkan 3'UTR memiliki panjang yang beragam dalam setiap serotipe virus. Urutan protein struktural dari ujung 5' genom DENV yaitu C-prM/M-E. Beberapa salinan dari protein C merangkul genom RNA membentuk nukleokapsid yang dibatasi oleh lipid bilayer dari sel inang. Dalam lipid bilayer yang diturunkan dari sel inang tersebut terdapat 180 salinan protein M dan E. Protein M berukuran kecil yang memiliki fragmen proteolitik berupa prekursor (Verma, M., dkk, 2014; Nanaware, 2021).

Protein penyusun virus dengue tersebut memiliki peran yang berbeda dalam struktur biologi virus dimana protein struktural merupakan komponen pembentuk virus dan protein non struktural memiliki berbagai

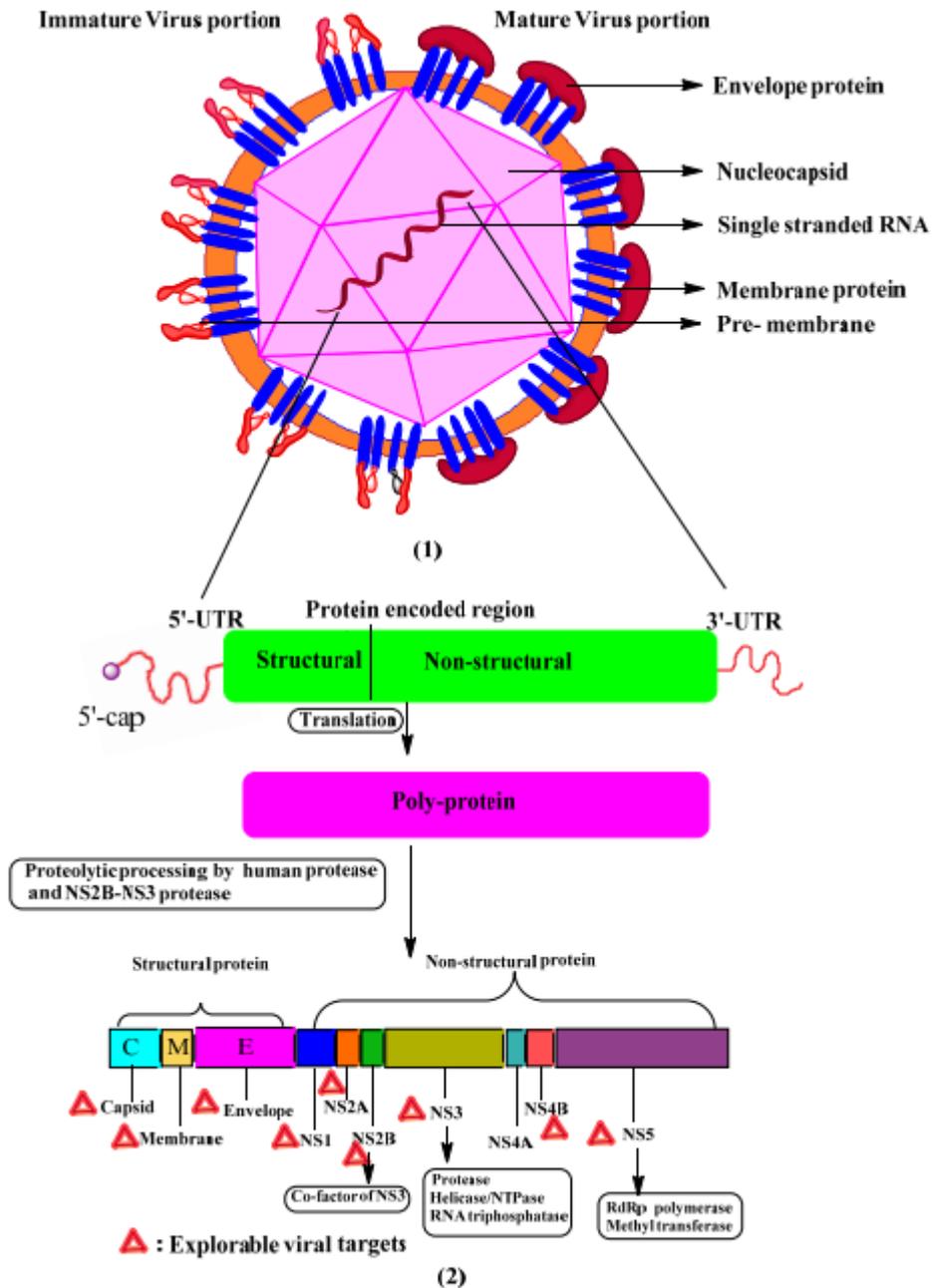
aktivitas enzimatik yang berperan dalam replikasi RNA virus (Harapan, 2020). Protein struktural virus dengue terlibat dalam enkapsidasi RNA virus dimana dalam tahap ini terjadi pembentukan membran nukleokapsid, pematangan, dan pembungkusan terhadap virion. Protein non struktural yakni NS3 dan NS5 memiliki peran dalam proses replikasi RNA virus. NS2B merupakan enzim protease serin dari virus, protein NS tersebut bersama dengan protein NS1, NS2A, NS4 dan NS4B memainkan berbagai peran dalam replikasi, pembentukan, serta pelepasan virus (Nanaware, 2021).

Protein C merupakan protein virus dengue yang paling pertama disintesis pada proses translasi. Protein C terdiri atas 25% lisin dan arginin yang memiliki fungsi utama dalam interaksi dan perlindungan virion yang merupakan asam amino bersifat basa, dimer, serta memiliki lipatan helix yang berfungsi dalam pengemasan genom virus. Protein C berasosiasi dengan membran intraseluler melalui domain hidrofobik yang ditemukan berakumulasi di retikulum endoplasma. Virus dengue mengalami replikasi pada kompleks replikasi yang terasosiasi dengan membran, hal yang sama juga pada morfogenesis dan pembentukan virion berlangsung di membran retikulum endoplasma yang menyediakan platform untuk pembentukan kapsid selama proses perakitan virus (Nemesio, H., dkk., 2011; Meng, F., dkk., 2015).

Virus yang belum matang mengandung protein prM yang merupakan prekursor untuk protein M. Protein prM/M terdiri atas 175 asam amino yang terdiri dari region N-Terminal, domain M, region batang dan dua heliks transmembran. Protein M berfungsi dalam pematangan virus dengue. Proses ini terjadi di apparatus golgi. Pemecahan terjadi di situs antarmuka domain N dan M sehingga menyebabkan terjadinya pembelahan prM menjadi protein M sehingga dihasilkan virus protein yang matang yang mengandung ektodomain dan region transmembran C-Terminal (Meng, F., dkk., 2015; Dharmapala, B.T., dkk., 2022).

Protein amplop memiliki peran penting dalam memulai infeksi, dimana protein amplop (E) berperan dalam membentuk kontak pertama dengan reseptor dari sel inang (Hyatt, dkk., 2020). Virus dengue memasuki sel inang melalui proses endositosis yang diperantarai oleh reseptor. Kondisi pH rendah pada endosom mengakibatkan perubahan

konformasi pada protein E sehingga memicu terjadinya fusi antara membran virus dan membran endosom dari sel inang ( Lin, dkk., 2011).



**Gambar 1. Genom Virus Dengue** (Dharmapalan, B.T., dkk., 2022)

Protein E merupakan glikoprotein yang memiliki tiga domain yang masing-masing memiliki peran yang berbeda dalam proses infeksi virus. Domain tersebut antarlain, Transmembran C-Terminal (Immunoglobulin konstan) IgC mirip dengan domain jangkar yang mengenali dan mengikat

sel inang, jangkar penghubung domain pusat, dan ektodomain yang terlibat dalam perlekatan dan internalisasi virus (Hyatt, dkk., 2020 dan Nanaware, dkk., 2021). Protein E merupakan penentu tropisme dan virulensi serta menjadi target utama dalam mempelajari penetralan serta peningkatan antibodi terhadap virus dengue (Lin, dkk., 2011).

Serotipe spesifik virus dengue mencapai sel target melalui proses endositosis yang dimediasi oleh reseptor non spesifik. Sel yang berperan dalam proses infeksi virus dengue yaitu sel dendritik, monosit/ makrofag, sel B, sel T, sel endotel, hepatosit, dan sel otak inang (Dharmapalan, B.T., dkk., 2022).

Virus dengue tidak dapat hidup lama dalam tubuh manusia, tetapi kehidupannya dapat berlangsung dalam tubuh nyamuk vektor sepanjang hidupnya (2-3 bulan) dan selama itu nyamuk akan menjadi infeksi. Dengan demikian nyamuk dapat menjadi reservoir untuk virus DEN di alam. Virus dengue dikenal memiliki 4 tipe virus yaitu DENV1, DENV2, DENV3, dan DENV4 (Kemenkes RI, 2013 ; BTKL Yogyakarta, 2004). Keempat serotype virus dengue tersebut berbeda secara antigenetik dan genetik namun memiliki kesamaan dari sisi epidemiologi yang menyebabkan gejala yang hampir sama ketika terjadi infeksi pada manusia. Masing-masing serotipe virus dengue juga terdiri atas beberapa genotipe (Drumond dkk., 2016), dimana serotipe tersebut memiliki 3-5 genotipe yang berbeda yang diklasifikasikan berdasarkan divergensi genetik. Genotipe biasanya dipisahkan berdasarkan geografis (Hamel dkk., 2019). Penularan virus yang terjadi pada periode epidemi antara menimbulkan gejala yang cukup ringan, namun akan menunjukkan gejala yang cukup berat pada setiap periode 3-5 tahunan (Gubler, 2002).

Pengelompokan genotipe dari masing-masing serotipe virus dengue dapat dilihat pada table 1 berikut (Cuypers, L., dkk., 2018; Harapan, dkk., 2020):

**Tabel1.** Daftar Genotipe masing-masing serotipe virus dengue

Serotipe	Genotipe
1	I
	II
	IV
	V
	Silvatik (Genotipe III & VI)

Serotipe	Genotipe
2	Asian I
	Asian II
	Cosmopolitan
	American
	Asian/American
3	Silvatic
	I
	II
	III
	IV
4	V
	I
	II
	III
	Silvatic

## 2.2 Patogenesis Dengue

Demam berdarah dapat disebabkan oleh salah satu serotipe virus dengue. Umumnya, infeksi dengan satu serotipe dapat memberikan kekebalan protektif terhadap serotipe tertentu tetapi tidak terhadap serotipe lainnya. Selanjutnya, ketika terinfeksi untuk kedua kalinya dengan serotipe yang berbeda, infeksi yang lebih parah dapat terjadi. Hal ini disebabkan oleh fenomena yang disebut *antibody dependent enhancement* (ADE), di mana antibodi yang terbentuk terhadap infeksi serotipe pertama mengakibatkan peningkatan infeksi pada serotipe kedua (Malavige, dkk., 2004).

Setelah terinfeksi oleh DEN virus (1,2,3 atau 4) yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti*, manusia mengalami gejala yang khas antaralain:

- a. Demam Dengue (DD): demam tinggi, sakit kepala, nyeri ulu hati dan dapat disertai tanda-tanda perdarahan;
- b. Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) atau Demam Berdarah Dengue (DBD) : ruam merah pada kulit, mimisan sampai hematemesis dan melena; Dengue Shock Syndrome
- c. (DSS) : Kelihatan lemas sampai shock (Kemenkes RI, 2013 ; BTKL Yogyakarta, 2004).

Demam dengue umumnya berlangsung selama 2-7 hari. Sebagian besar pasien mampu sembuh sepenuhnya setelah periode demam tersebut,

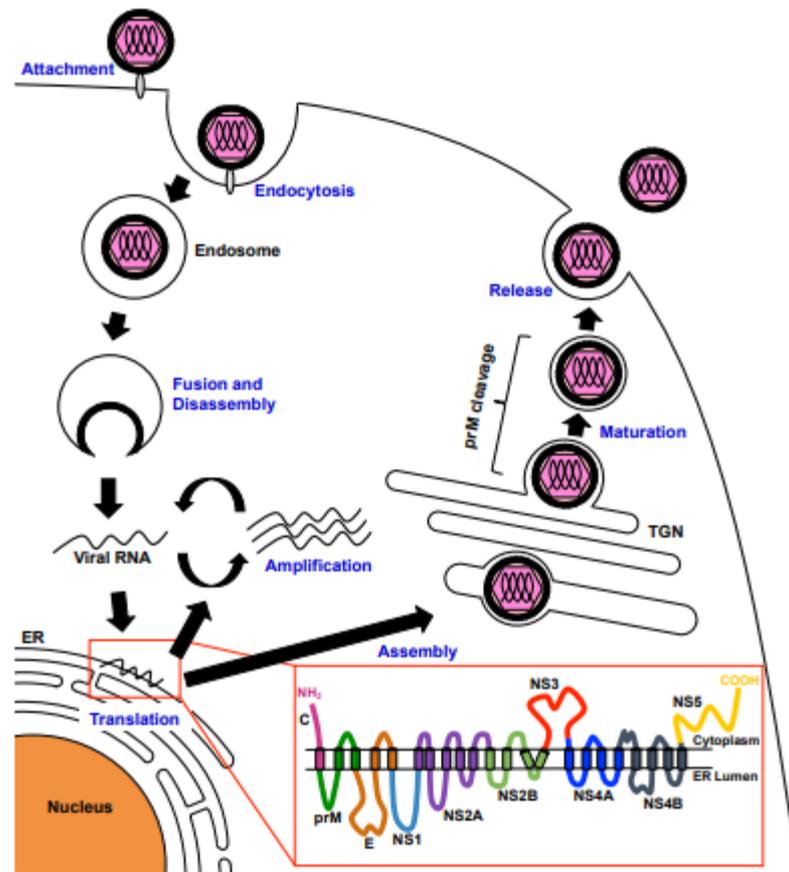
namun beberapa pasien dapat memasuki stadium kritis DBD hingga menyebabkan kematian jika tidak ditangani dengan baik (Wang, dkk., 2020).

Berdasarkan buku pedoman WHO tentang pencegahan dan kontrol terhadap Dengue dan DHF bahwa tidak ada pengobatan khusus terhadap penyakit DBD, tetapi dengan perawatan medis yang tepat maka dapat menyelamatkan nyawa pasien (WHO, 2009).

Virus menginfeksi tubuh manusia dengan perantara nyamuk *Aedes betina*. Virus dengue yang bereplikasi pada kelenjar air liur nyamuk berupa pelepasan virion yang kemudian akan memasuki tubuh inang pada saat terjadi gigitan (Nanaware, 2021). Peristiwa ini mengakibatkan infeksi sel Langerhans yang belum matang (Sel dendritik) dan keratinosit. Sel yang terinfeksi tersebut kemudian bermigrasi dari lokasi infeksi ke kelenjar getah bening tempat perekrutan monosit dan makrofag yang kemudian menjadi target infeksi sehingga virus tersebut tersebar ke system limfatik (Martina, B.E.E., dkk., 2009).

Virus yang memasuki tubuh inang akan mengalami proses endositosis yang dimediasi oleh reseptor yang kemudian diikuti dengan penyatuan membran virus dengan membran vesicular dan selanjutnya terjadi pelepasan RNA virus ke sitoplasma dan selanjutnya akan mengalami proses replikasi (Gambar 2) (Norazharuddin dan Lai, 2018). Reseptor spesifik untuk dengue belum diidentifikasi secara pasti, namun reseptor tersebut diperkirakan termasuk heparan sulfat dan lektin dari molekul adhesi sel dendritik, reseptor monose dari makrofag, reseptor lipopolisakarida, dan reseptor tirosin kinase yang sebagian besar diekspresikan oleh makrofag, sel-sel pembuluh darah, sistem saraf, reproduksi dan kekebalan tubuh. Hal ini menunjukkan bahwa virus dengue tidak memerlukan reseptor spesifik untuk masuk ke dalam sel namun dapat mengenali dan mengikat beragam molekul sehingga dapat menginfeksi berbagai jenis sel. Beberapa studi menyebutkan bahwa limpa dan kelenjar getah bening, monosit, makrofag, dan sel dendritik sebagai target utama infeksi DENV (Constantino, B.T., dan Cruz, M.T.A.C.D., 2021). Demam Dengue (DD) disebabkan oleh terjadinya proses konsumsi darah viremia oleh nyamuk *aedes betina* kemudian ditransmisikan ke manusia sebagai host kedua. Terdapat masa inkubasi

rata-rata 4-7 hari setelah terjadi gigitan diikuti dengan gejala demam dan gejala non spesifik lainnya misalnya sakit kepala frontal, nyeri sendi, mual dan muntah (Guglani dan Kabra, 2005).



**Gambar 2. Siklus Hidup Virus Dengue (Kato dan Hishiki, 2016)**

Respon imun seluler disebutkan juga berperan mengakibatkan infeksi dengue yang lebih parah. Ekspresi epitope virus pada permukaan sel yang terinfeksi memicu proliferasi sel T memori dan produksi sitokin pro-inflamasi yang memiliki efek tidak langsung pada sel endotel pembuluh darah yang dapat mengakibatkan kebocoran plasma. Tingkat respon sel T diperkirakan memiliki korelasi dengan tingkat keparahan penyakit. Respon sel T pada pasien yang parah sebagian besar bersifat mono fungsional karena menghasilkan INF  $\gamma$  atau TNF  $\alpha$  saja dan jarang menghasilkan CD107a sebagai marker degranulasi sitotoksik. Sel T CD8<sup>+</sup> yang mengekspresikan CD107a relatif lebih banyak pada pasien dengue

tanpa komplikasi dan hanya sedikit yang mengekspresikan INF  $\gamma$  atau TNF  $\alpha$  (Whitehorn, J., dan Simmons, C.P., 2011).

Pada kasus DBD, antibodi dimungkinkan tidak dapat menetralkan virus dengue dan dapat berperan sebagai alternatif yang memicu masuknya serotipe DENV kedua membentuk sel yang mengekspresikan Fc $\gamma$  yang menghasilkan penguatan aktivasi komplemen dan dengan cepat menghasilkan sitokin yaitu sitokin pro inflamasi tipe 1 seperti TNF  $\alpha$  dan INF  $\gamma$ . Sitokin ini diperkirakan memiliki efek langsung pada sel-sel endotel vascular yang dapat mengakibatkan kebocoran plasma (Wang, dkk., 2020). Infeksi sekunder dengan jenis serotipe yang berbeda dapat mengakibatkan munculnya antibodi *cross reactive*, sehingga antibodi ini akan mengikat virion tetapi tidak dapat menetralkannya, sebaliknya dapat meningkatkan penyerapan oleh sel-sel yang mengekspresikan reseptor Fc $\gamma$  pada permukaannya seperti sel dendritik, makrofag, dan monosit. Virion yang mengandung antibody tersebut akan diserap lebih banyak oleh sel yang menyebabkan peningkatan presentasi antigen oleh dendritik sel ke sel T sehingga sel T memori akan teraktivasi dan berproliferasi. Sitokin yang dihasilkan oleh sel T tersebut memiliki beberapa efek yang mengarah pada pathogenesis DBD/DSS (Guglani dan Kabra, 2005).

Sistem komplemen merupakan salah satu komponen humoral yang utama dari imunitas bawaan. Sistem tersebut berperan sebagai sistem pertahanan pertama terhadap pathogen. Mekanisme kekebalan bawaan ini mengakibatkan waktu yang diperlukan oleh inang membentuk kekebalan adaptif yang maksimal menjadi lebih lambat (Martina, B.E.E., dkk., 2009). Peningkatan permeabilitas vascular dapat dimediasi oleh sistem komplemen. Peningkatan kadar fragmen komplemen disebutkan dapat menyebabkan terjadinya DBD. Beberapa fragmen komplemen seperti C3a dan C5a diketahui memiliki efek pada peningkatan permeabilitas. Studi terbaru menyatakan bahwa antigen NS1 virus dengue terbukti berpengaruh pada aktivasi komplemen dan berperan dalam pathogenesis DBD (WHO,2011).

Fenomena patofisiologi utama yang menentukan derajat penyakit dan membedakan antara DD dan DBD yaitu peningkatan permeabilitas pembuluh darah, penurunan volume plasma, terjadinya hipotensi,

trombositopenia, serta diathesis hemoragik. Pada kasus berat, syok terjadi secara akut, nilai hematokrit meningkat bersamaan dengan hilangnya plasma melalui endotel dinding pembuluh darah. Peningkatan nilai hematokrit pada kasus syok diduga akibat adanya kebocoran plasma hingga pada daerah ekstra vascular melalui kapiler yang rusak. Pada kasus plasma yang menghilang dapat diganti secara efektif dengan memberikan plasma atau ekspander plasma. Pertolongan dini dapat dilakukan dengan memberikan cairan elektrolit. Syok secara akut dan perbaikan klinis terjadi secara drastis (Soedarmo, 2008).

## **2.3 Diagnosis dengue**

Prosedur diagnosis yang tepat dan cepat terhadap infeksi virus dengue sangat diperlukan. Peningkatan terhadap analisa virus dengue dalam beberapa tahun terakhir mengalami peningkatan yang cukup signifikan. Teknik diagnosis tersebut antara lain tes serologi, deteksi antigen, isolasi virus, dan deteksi molekular.

### **2.3.1 Tes Serologi**

Tes serologi yang digunakan dalam deteksi dengue antara lain *hemagglutinationinhibition* (HI), *complement fixation* (CF), *neutralization test* (NT), *immunoglobulin M* (IgM) *capture enzyme linked immunosorbent assay* (MAC-ELISA) dan *indirect immunoglobulin G ELISA*. Pengukuran antibodi IgM dan IgG menggunakan *antibody-capture enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) merupakan metode yang umum digunakan untuk mengkonfirmasi infeksi dengue. Teknik ini terbilang mudah dilakukan dibandingkan dengan teknik deteksi menggunakan isolasi asam nukleat. Keterbatasan dari tes serologi yaitu tingginya reaktivitas silang dengan golongan flavivirus lainnya (Demam kuning dan Japanese Encefalitis) yang diamati selama proses analisa berlangsung dan di beberapa daerah terdapat virus yang menyebabkan manifestasi klinis yang serupa tetapi bukan dari golongan flavivirus seperti virus chikungunya, selain itu pada awal infeksi dimana titer antibodi yang dihasilkan masih sangat rendah mengakibatkan kurangnya sensitifitas

dari teknik ini sehingga mengurangi kegunaan teknik ini dalam manajemen klinis (Paula dan da Fonseca, 2004; Raafat, dkk., 2019).

### **2.3.2 Isolasi Virus**

Veremia dengue dapat dideteksi pada hari ke 2 dan 3 sebelum timbul demam hingga lima hari setelah terjadinya infeksi primer dan sekunder. Selama periode veremia ini sampel darah, serum atau plasma dapat digunakan untuk isolasi virus. Inokulasi nyamuk merupakan metode yang paling sensitif untuk isolasi virus. Nyamuk diinokulasi secara intratorakal dengan specimen serum atau plasma. Isolasi virus dengue pada nyamuk atau kultur sel dapat dikonfirmasi dan ditentukan jenis serotipenya masing-masing dengan uji imunofluoresensi dengue virus dan antibodi monoklonal serotipe spesifik. Metode isolasi virus sangat spesifik meskipun pada prakteknya memiliki sensitivitas sekitar 40.5% dalam isolasi virus berbasis sel. Teknik ini juga memerlukan operator yang sangat terlatih, ketergantungan pada kualitas sampel dan periode veremia yang singkat memberikan jeda waktu yang sempit dari timbulnya penyakit. Terlepas dari kelebihanannya metode ini jarang digunakan laboratorium dalam diagnostik rutin (Tang dan Ooi, 2012).

### **2.3.3 Tes Antigen**

NS1 merupakan glikoprotein yang disekresikan dari sel yang terinfeksi sebagai heksamer dan dapat diukur untuk mendeteksi infeksi dengue. NS1 disekresikan pada serum dalam jumlah yang melimpah pada awal infeksi, sehingga hal ini memungkinkan NS1 sebagai kandidat yang ideal dalam pembuatan *Rapid Diagnostic Test* (RDT). Kekurangan dari deteksi NS1 ini terjadi pada infeksi sekunder dengue, dimana terdapat pembentukan kompleks antigen-antibodi dengan IgG yang telah ada sebelumnya sehingga memperpendek deteksi NS1 dan mengurangi sensitivitasnya. Masalah lain yang terjadi yaitu sensitivitas tes bervariasi menurut serotipe virus dengue, sehingga pengenalan terhadap infeksi serotipe baru dapat terlewatkan (Raafat dkk., 2019).

### 2.3.4 Deteksi Molekuler

Reaksi Polimerase merupakan teknik menggandakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme yang melibatkan beberapa tahap yang berulang dan pada setiap siklus terjadi duplikasi untai ganda DNA sampai jutaan copy fragmen DNA. DNA yang dihasilkan dari teknik ini lebih besar jumlahnya dan waktu yang diperlukan relative singkat. Pengembangan teknik analisa dengan menggunakan PCR terus berkembang seiring dengan perkembangan di bidang biologi molekuler. PCR digunakan untuk identifikasi berbagai penyakit genetik, infeksi oleh berbagai mikroorganisme, biologi evolusi, *Site-directed mutagenesis of genes* dan *mRNA Quantitation* pada sel ataupun jaringan. (Nurhayati dkk, 2017).

Dasar siklus PCR yang utama merupakan siklus berulang 30-35 siklus meliputi:

- a. Denaturation (95°C), 30 detik meliputi denaturasi dua untai DNA template menjadi untai tunggal ,
- b. Annealing (55–60°C), 30 detik meliputi pengenalan/penempelan primer DNA template. Annealing ditentukan oleh susunan primer.
- c. Extension (72°C), waktu tergantung panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi (Fatchiyah dkk, 2012).

Deteksi *Riverse Transcriptase* PCR (RT-PCR) RNA virus dengue yang diekstraksi dari darah, serum atau plasma merupakan metode yang sensitif dan spesifik untuk konfirmasi infeksi dengue. Saat ini terdapat dua metode PCR yang sering digunakan dalam teknik diagnostik molekular yaitu metode RT PCR dan *real time* RT PCR. Kedua metode ini dapat digunakan untuk menganalisis dan mengetahui jenis serotipe virus dengue dengan cepat (Tang dan Ooi, 2012).

Sejak tahun 1990 berbagai tes dikembangkan dalam metode *real time* RT PCR. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa teknik *real time* RT PCR memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi untuk mendeteksi bakteri patogen dan virus. Dibandingkan dengan metode RT PCR (PCR konvensional), metode *real time* PCR memiliki sejumlah kelebihan, antara lain:

- a. Hasil pengujian yang lebih cepat

- b. Sensitivitas tinggi
- c. Menggunakan close system sehingga dapat mengurangi kontaminasi
- d. Hasil yang diperoleh bukan hanya secara kualitatif tetapi juga secara kuantitatif (Pestana dkk, 2010).

## **2.4 Analisis Filogenetik**

Epidemiologi molekuler memiliki peran yang sangat penting dalam memecahkan masalah dengue di daerah endemik. Hal ini terus dikembangkan untuk memahami faktor yang dapat menjadi penyebab endemisnya virus dengue di suatu daerah (Aryati, 2012). Analisis filogenetik memungkinkan pemantauan terhadap penyebaran atau peningkatan keanekaragaman genotipe virus dengue serta pemantauan terhadap pergeseran genotipe, dan perubahan virulensi di suatu daerah (Hamel, 2019). Selain itu studi epidemiologi filogenetik dan molekuler dari dengue virus juga dapat memberikan informasi mengenai kepunahan turunan dari genotipe dan subgenotipe selama periode transmisi epidemi dan endemi namun faktor pendorong terhadap pergeseran tersebut belum diketahui secara pasti (Santiago dkk., 2019). Analisis Filogenetik yang dilakukan terhadap virus dengue dapat memberikan gambaran mengenai proses evolusi dan migrasi dari virus dengue. Dengan adanya analisis filogenetik maka dapat memberikan pemahaman yang lebih baik terhadap epidemiologi virus dengue (Drumond dkk., 2016).

## 2.4 KERANGKA TEORI

Kerangka teori merupakan sebuah rangkaian yang terdiri atas kumpulan teori dan konsep, merupakan pengembangan dari dasar teori atau pengetahuan yang dimiliki oleh peneliti dan selanjutnya akan dijadikan dasar untuk menganalisis serta mengembangkan data yang akan digunakan dalam penelitian (Kivunja, 2018)

