

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus Dengue (DENV)

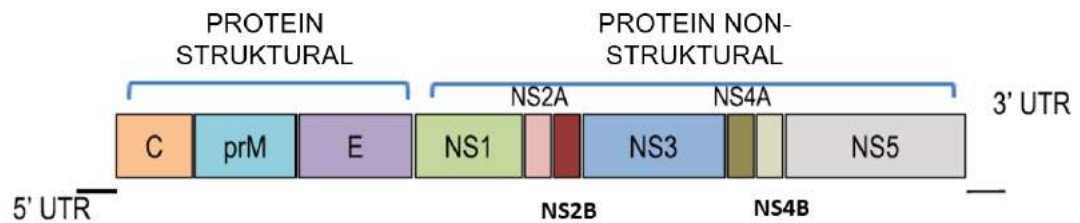
DENV merupakan virus penyebab IVD termasuk DBD (*World Health Organization*, 2011). DENV ditransmisikan pada manusia oleh nyamuk betina *Aedes* (*Ae.*) subgenus *Stegomyia* yaitu *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (Khetarpal dan Khanna, 2016). *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* merupakan vektor terpenting IVD (*World Health Organization*, 2011). *Ae. aegypti* merupakan vektor terpenting terjadinya epidemik IVD di daerah tropis dan subtropis (*World Health Organization*, 2015; Khetarpal dan Khanna, 2016). *Ae. polynesiensis* (spesies lain dari nyamuk *Aedes*), anggota dari kelompok *Ae. scutellaris*, dan *Ae. niveus* telah ditemukan berperan sebagai vektor sekunder IVD. *Ae. niveus* dianggap hanya sebagai vektor silvatik IVD (*World Health Organization*, 2015; Khetarpal dan Khanna, 2016).

Ae. albopictus menjadi vektor yang semakin penting karena dapat dengan mudah beradaptasi dengan lingkungan baru, termasuk daerah beriklim sedang. *Ae. albopictus* menyebar ke negara yang bebas dari nyamuk *Ae. aegypti* dan telah menciptakan peluang bagi DENV untuk memasuki lokasi baru dan menyebabkan penyakit IVD. *Ae. albopictus* masih berkontribusi kecil pada fase IVD yang terjadi pada manusia (Khetarpal dan Khanna, 2016).

2.1.1 Struktur genom DENV

Ciri-ciri khas genom DENV yaitu partikel berbentuk bulat (*spherical*) yang ditutupi oleh *envelope* glikoprotein dan RNA *messenger* untai tunggal dengan polaritas positif (*single-stranded positive-sense*) yang mengkodekan sepuluh protein. Urutan *open reading frames* genom DENV yang disandakan mengkodekan tiga protein struktural yaitu protein kapsid (C), protein membran (M) atau membran prekursor (prM), dan protein *envelope* (E), dengan tujuh protein non-struktural (NS) yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5 (Guzman *et al.*, 2016; Khetarpal dan Khanna, 2016; Cucunawangsih dan Lugito, 2017).

DENV mengandung RNA untai tunggal dan berukuran kecil (berdiameter ± 50 nm) (Henchal dan Putnak, 1990; World Health Organization, 2015; Cucunawangsih dan Lugito, 2017). Panjang genom RNA DENV adalah sekitar 10.700 kb. Genom RNA DENV dikelilingi oleh nukleokapsid ikosahedral atau isometrik berukuran sekitar 30 nm dan ditutupi oleh selubung lipid sedalam 10 nm yang berisi *envelope* dan protein membran (Chambers *et al.*, 1990; Henchal dan Putnak, 1990). Partikel DENV disusun oleh kompleks RNA dengan protein kapsid dan dikelilingi oleh membran berlapis lipid yang berisi secara eksternal protein M dan protein E (Guzman *et al.*, 2016). Protein NS diselubungi oleh glikoprotein (Tayade *et al.*, 2018).



Gambar 2.1 Genom secara utuh dan organisasi protein DENV (Cucunawangsih dan Lugito, 2017).

Genom RNA DENV terdiri dari satu bingkai pembacaan terbuka dan diapit oleh dua daerah nonkode (*Non Coding Regions/NCRs*) atau daerah tidak diterjemahkan (*Untranslated Region/UTR* atau *Non Translated Region/NTR*) di ujung 5' dan 3' yang menyandikan prekursor poliprotein (Chambers *et al.*, 1990; Khetarpal dan Khanna, 2016; Cucunawangsih dan Lugito, 2017). UTR 5' dan 3' berisi struktur sekunder dan urutan sekuens yang terlibat dalam regulasi replikasi virus (Khetarpal dan Khanna, 2016). 5'UTR (± 100 nukleotida) memiliki struktur *cap* tipe I yang dimetilasi (m⁷G5'ppp5'A) tetapi 3'UTR (± 450 nukleotida) tidak memiliki ujung ekor *polyadenylate* / poli (A) (Henchal dan Putnak, 1990; Khetarpal dan Khanna, 2016).

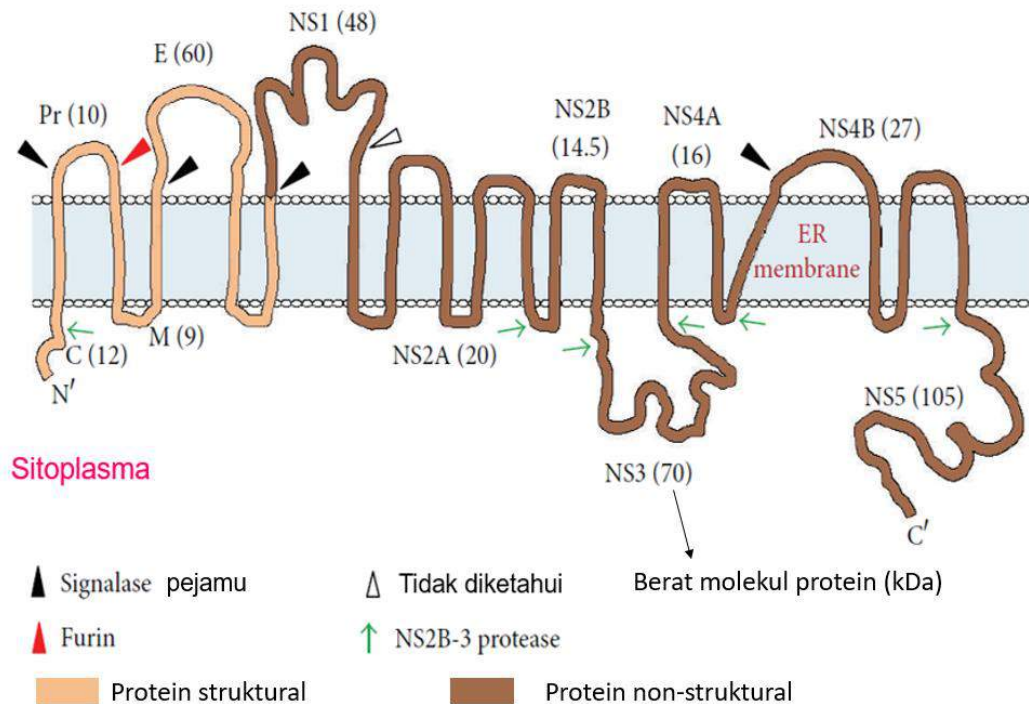
Genom DENV yang diekspresikan sebagai prekursor poliprotein tunggal secara bersama-sama dibelah oleh protease virus dan signalase pejamu (pembelahan ko-translasi dan proteolitik paska-translasi) (Chambers *et al.*, 1990; Khetarpal dan Khanna, 2016). Poliprotein DENV yang terdiri dari sekitar 3.390 residu yang memerlukan pemrosesan proteolitik lebih lanjut untuk menghasilkan protein virus aktif (Meng *et al.*, 2015). Penerjemahan genom dari setiap serotipe DENV menghasilkan polipeptida tunggal yang diklasifikasikan sebagai protein

struktural atau protein non-struktural (Meng *et al.*, 2015; Guzman *et al.*, 2016; Khetarpal dan Khanna, 2016).

Sintesis protein DENV terjadi pada sitoplasma retikulum endoplasma kasar (RER) (Khetarpal dan Khanna, 2016). Semua protein struktural terletak di dalam bagian terminal N dari poliprotein (Meng *et al.*, 2015). Protein struktural (E dan prM) berada di sisi luminal dari membran retikulum endoplasma dimana terjadi perakitan dan pematangan virion. Protein C menempel di sisi sitoplasma dari membran retikulum endoplasma. Protein PrM selanjutnya dibelah oleh furin menjadi peptida pr dan protein M di TGN (*Trans Golgi Network*) (Khetarpal dan Khanna, 2016). Protein M dan protein E yang mengatur interaksi antara virus dan pejamu selama proses masuknya DENV (Guzman *et al.*, 2016).

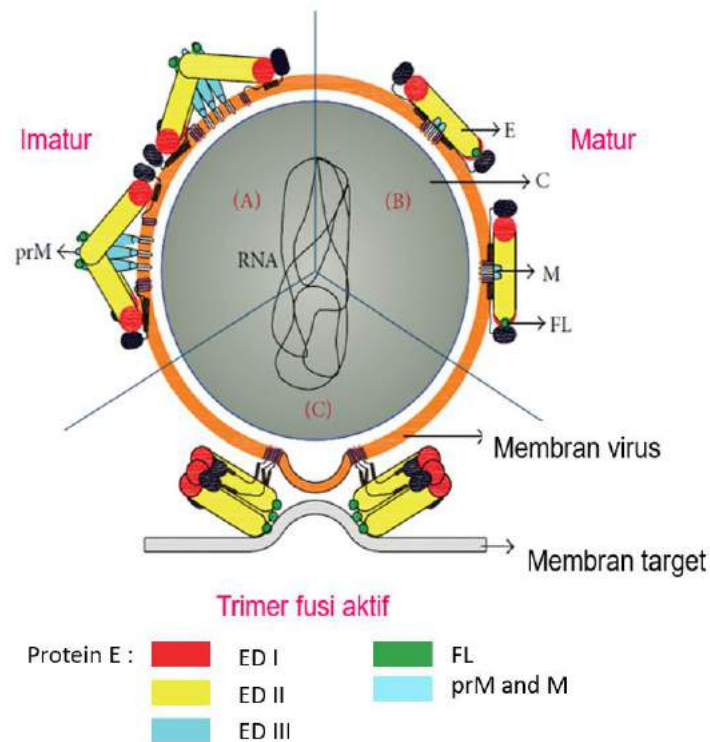
Seluruh protein NS diproses di sitoplasma terutama oleh NS2B-NS3. NS2B-NS3 merupakan protease DENV. NS2A/2B dan NS4A/4B adalah protein transmembran dan menempel di retikulum endoplasma (Khetarpal dan Khanna, 2016).

Lumen Retikulum Endoplasma Kasar



Gambar 2.2 Organisasi genom dan topologi membran DENV (Khetarpal dan Khanna, 2016).

Virion DENV dewasa (matur) mengandung tiga protein struktural yaitu protein C (nukleokapsid atau protein inti), protein M (protein membran), dan protein E (protein *envelope*) (Henchal dan Putnak, 1990). Struktur DENV matur terdiri dari sebuah lapisan luar protein (E dan M), sebuah lipid *bilayer*, dan sebuah inti nukleokapsid (C dan genom RNA) (Khetarpal dan Khanna, 2016). DENV intraseluler yang belum dewasa (imatur) mengandung protein yang dikenal sebagai prM (terkadang juga disebut preM) yaitu membran prekursor (Henchal dan Putnak, 1990).



Gambar 2.3 Organisasi virion DENV imatur dan matur (Khetarpal dan Khanna, 2016).

Urutan imunogenitas tertinggi diantara protein struktural DENV dalam kemampuan untuk merangsang pembentukan antibodi secara berurutan yaitu protein E, protein prM, dan protein C (Leitmeyer *et al.*, 1999). Protein E DENV berperan dalam fenomena hemaglutinasi, netralisasi, dan interaksi antara virus dan sel pejamu selama fase awal infeksi (Cucunawangsih dan Lugito, 2017). DENV menunjukkan struktur permukaan yang berbeda selama proses pematangannya dan proses infeksi dan perubahan konformasi ini dikaitkan pada fleksibilitas inheren dari protein E DENV (Khetarpal dan Khanna, 2016).

Urutan imunogenitas tertinggi protein nonstruktural adalah protein NS1 (Leitmeyer *et al.*, 1999). Protein NS memainkan berbagai peran dalam mengendalikan, mengkoordinasi, dan mengatur berbagai proses intraseluler dari

siklus hidup virus (Meng *et al.*, 2015). Protein NS terlibat dalam replikasi dan pengemasan virus, proses yang terkait erat dengan retikulum endoplasma pejamu (ER) dan fungsi jalur sekretori (Guzman *et al.*, 2016). Protein NS1 ditemukan dengan kadar yang tinggi dalam serum penderita fase akut, sedangkan protein NS lainnya lebih berperan dalam proses replikasi virus (Noor *et al.*, 2012). Fungsi dari masing-masing protein NS belum dikarakterisasi dengan baik. Protein NS1 telah terbukti berinteraksi dengan sistem kekebalan tubuh pejamu dan dapat membangkitkan respons sel T (World Health Organization, 2015).

2.1.2 Serotipe DENV

Serotipe DENV adalah suatu istilah pembagian tipe DENV dimana pemeriksaannya menggunakan teknik biologi molekuler RT-PCR dengan metode standar internasional. RT-PCR DENV menggunakan primer yang telah dirancang khusus sesuai dengan region di dalam genom DENV tersebut (Wardhani, 2013). Keempat serotipe DENV ditemukan bermula dari strain silvatik di hutan-hutan Asia Tenggara (Wang *et al.*, 2000). Siklus silvatik telah dilaporkan di Asia Tenggara dan Afrika Barat, tetapi saat ini belum pasti sejauh mana siklus silvatik berkontribusi pada infeksi manusia (Meng *et al.*, 2015).

DENV merupakan anggota famili *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* (Westaway *et al.*, 1985; World Health Organization, 2011). DENV membentuk kompleks berbeda yang dikelompokkan berdasarkan karakteristik antigenik dan biologis (World Health Organization, 2011). DENV memiliki empat serotipe, yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4 (Yann A. Meunier, 2014). Keempat serotipe DENV membentuk kelompok filogenetik dan berbeda dalam urutan

nukleotida antara serotipe, tetapi mempunyai hubungan erat antara serotipe dibandingkan dengan genus *Flavivirus* lainnya (*World Health Organization*, 2015). DENV-5 merupakan serotipe terbaru yang telah diumumkan pada Oktober 2013. DENV-5 telah terdeteksi selama penyaringan sampel virus yang diambil dari seorang petani berusia 37 tahun yang dirawat di rumah sakit di negara bagian Malaysia, Sarawak pada tahun 2007. Dalam *outbreak* di Sarawak, hanya satu kasus diterima dan kasus dikonfirmasi lainnya dirawat secara rawat jalan, sehingga menunjukkan bahwa penyakit yang disebabkan oleh DENV-5 adalah kasus ringan (Mustafa *et al.*, 2014).

Keempat serotipe DENV memiliki kesamaan antigenik tetapi cukup berbeda dalam memperoleh proteksi silang yaitu hanya beberapa bulan setelah infeksi oleh salah satu dari serotipe DENV. Infeksi dengan satu serotipe memberikan kekebalan seumur hidup terhadap serotipe virus tersebut (*World Health Organization*, 2015). Keempat serotipe DENV dapat menghasilkan kasus DBD atau SSD (*World Health Organization*, 2011).

Serotipe DENV dapat bergeser secara tunggal atau lebih dari satu jenis serotipe di wilayah manapun pada saat yang bersamaan (*World Health Organization*, 2015). Serotipe DENV yang bergeser akan terus mengalami perubahan dan berbeda di setiap daerah. Pergeseran serotipe dan genotipe mempengaruhi terjadinya *outbreak* DBD di berbagai negara (Akualing *et al.*, 2017).

Serotipe DENV mengalami pengenalan di daerah baru melalui penderita viremia tanpa gejala (asimtomatik) yang disebabkan karena meluasnya perjalanan

antar wilayah, peningkatan industri pariwisata dan perdagangan yang eksponensial. Pergeseran serotipe dan genotipe berperan dalam membangun potensi transmisi DENV yang tinggi di daerah baru (*World Health Organization*, 2011).

Daerah hiperendemik DENV di seluruh dunia menjadi semakin banyak sehingga keempat serotipe DENV dapat berko-sirkulasi di negara yang sama sehingga infeksi sekunder sering terjadi di negara-negara hiperendemik (Back dan Lundkvist, 2013). Keempat serotipe DENV dapat beredar bersama di daerah endemis karena kekebalan terhadap satu serotipe tidak mampu melindungi dari infeksi oleh serotipe heterotop (*World Health Organization*, 2015). Data epidemiologis juga menunjukkan bahwa tidak semua infeksi sekunder menyebabkan DBD atau SSD (Back dan Lundkvist, 2013). Infeksi oleh salah satu dari empat serotipe dapat menghasilkan serangkaian manifestasi klinis yang waktu atau urutan infeksi dapat menjadi penentu penting keparahan penyakit dan perjalanan penyakit IVD (Guzman *et al.*, 2016).

Keempat serotipe DENV juga dikelompokkan ke dalam beberapa genotipe DENV (Guzman *et al.*, 2016). Genotipe atau garis keturunan yang berbeda telah diidentifikasi dalam setiap serotipe menunjukkan keragaman genetik yang luas dari serotipe DENV (*World Health Organization*, 2009).

2.1.3 Siklus hidup DENV

DENV menampilkan siklus enzootik yang melibatkan nyamuk *Aedes sp.* yang berkembangbiak di lubang pohon dan menularkan virus di antara monyet, dari monyet ke manusia, dan antara manusia. *Ae. aegypti* dianggap sebagai vektor

yang paling penting, spesies *Aedes* lainnya juga dapat berperan dalam penularan infeksi (Meng *et al.*, 2015). Penularan vertikal dapat terjadi ketika nyamuk betina yang terinfeksi menularkan virus melalui telur ke keturunannya, tetapi kepentingan epidemiologis dari cara penularan ini masih belum dapat dijelaskan dengan pasti (Guzman *et al.*, 2016).

Siklus hidup nyamuk *Aedes* tergantung pada lamanya fase *feeding* berlangsung yaitu sekitar 8-10 hari pada suhu kamar. Siklus hidup nyamuk terdiri dari dua fase: fase akuatik (larva, pupa) dan terestrial (telur, dewasa) (Khetarpal dan Khanna, 2016). Nyamuk betina rata-rata hidup sekitar 1 minggu, tetapi beberapa nyamuk betina dapat hidup selama 2 minggu (Guzman *et al.*, 2016).

Nyamuk betina menjadi terinfeksi ketika menghisap darah selama fase demam akut dan viremia penderita IVD. Selama masa inkubasi ekstrinsik, virus pertama menginfeksi sel midgut dan kemudian menyebar untuk mereplikasi di beberapa jaringan nyamuk, akhirnya menginfeksi kelenjar ludah 5-12 (umumnya 8-10) hari kemudian, proses ini dipengaruhi oleh suhu sekitar, strain virus dan kemampuan nyamuk. Setelah kelenjar ludah terinfeksi, nyamuk infeksiif dan dapat menularkan virus ke orang lain selama fase *blood-feeding* (Guzman *et al.*, 2016).

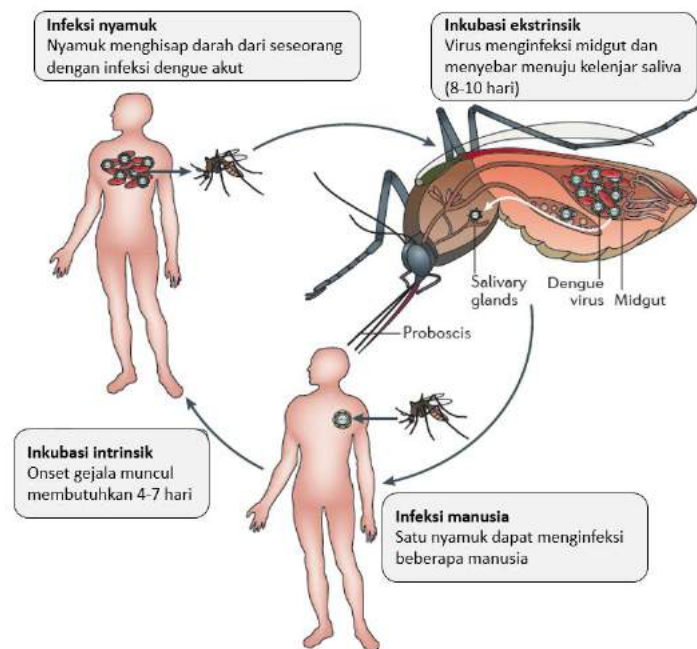
Target utama IVD pada nyamuk adalah epitel midgut, dimana DENV pertama kali bereplikasi dan kemudian menyebar ke kelenjar ludah dan bereplikasi di kelenjar ludah, dari mana infeksi ditularkan berikutnya selama fase *feeding* melalui air liur ke pejamu vertebrata (manusia) (Khetarpal dan Khanna, 2016).

Nyamuk tetap infeksiif seumur hidup dan dapat menginfeksi setiap orang pada fase *feeding*. Waktu dari infeksi hingga timbulnya penyakit (masa inkubasi

intrinsik) pada manusia berkisar antara 3 hingga 14 hari, dengan rata-rata 4–7 hari. Individu yang bergejala dan tidak bergejala dapat menularkan DENV ke nyamuk (Guzman *et al.*, 2016).

Nyamuk yang telah terinfeksi mengirimkan virus dalam epitel kulit tempat DENV menginfeksi selama IVD alami pada manusia, dan bereplikasi di dalam sel-sel garis turunan mononuklear (MN) seperti monosit, sel dendritik (DC), makrofag, dan subdermal sel Langerhans (Khetarpal dan Khanna, 2016).

Sel-sel garis turunan MN pejamu yang terinfeksi menjadi aktif dan membawa DENV bermigrasi ke kelenjar getah bening sehingga menghasilkan viremia. Viremia yang terjadi diikuti oleh infeksi sistemik pada hepar, paru-paru, dan limpa (Back dan Lundkvist, 2013; Khetarpal dan Khanna, 2016).



Gambar 2.4 Siklus DENV pada manusia dan pada nyamuk di perkotaan (Guzman *et al.*, 2016).

Target utama replikasi gen DENV adalah sitoplasma sel pejamu yang terinfeksi. Di sitoplasma sel pejamu, *viral load* diterjemahkan menjadi poliprotein,

yang kemudian diarahkan ke retikulum endoplasma. Protein DENV mencakup tiga protein struktural (C, prM / M dan E), yang bertanggung jawab untuk pembentukan komponen virion, dan tujuh protein non-struktural (NS1, NS2A / B, NS3, NS4A / B dan NS5) yang memainkan berbagai peran dalam replikasi RNA virus. Urutan sinyal dalam poliprotein mentranslokasi NS1 dan ektodomain prM dan E ke lumen retikulum endoplasma, sedangkan protein C, NS3 dan NS5 dilokalisasi ke sitoplasma (Meng *et al.*, 2015).

Pengiriman genom DENV ke dalam sitoplasma pejamu adalah proses bertahap (multistep) yang dimulai dengan fusi membran virus dengan membran plasma pejamu, diikuti oleh endositosis virus menjadi endosom dan kemudian fusi tergantung pH dari virus dan endosomal membran. Partikel virus dewasa menempel pada sel pejamu dengan mengikat protein E pada reseptor pejamu untuk DENV. Proses masuknya virus dicapai melalui proses endositosis yang dimediasi reseptor (Guzman *et al.*, 2016). Beberapa reseptor pejamu untuk DENV yang telah diketahui yaitu protein pengikat manosa (MBP), heparan sulfat, kondroitin sulfat, dan DC-SIGN (Back dan Lundkvist, 2013).

Antibodi alami (IgM), komplemen, dan sel NK dalam proses IVD mengendalikan tingkat awal viremia dan sampai batas tertentu penyebaran pada jaringan. Sel yang terinfeksi setelah dikenali oleh limfosit T sitotoksik akan ditargetkan oleh sistem imun seluler (Back dan Lundkvist, 2013).

Penataan ulang protein E di dalam sel pejamu (manusia) sangat bergantung pada pH yang memfasilitasi fusi membran virus dan endosom untuk melepaskan nukleokapsid. Nukleokapsid akan dibongkar untuk melepaskan RNA genomik

virus yang tertutup. RNA genomik kemudian diterjemahkan menjadi poliprotein panjang, yang dibelah secara autokatalitik oleh NS2B atau NS3, protease virus, dan protease pejamu menjadi protein individu. Protein NS yang dilepaskan ditargetkan ke situs replikasi pada retikulum endoplasma (ER) yang berasal vesikel untuk memulai proses transkripsi (Guzman *et al.*, 2016).

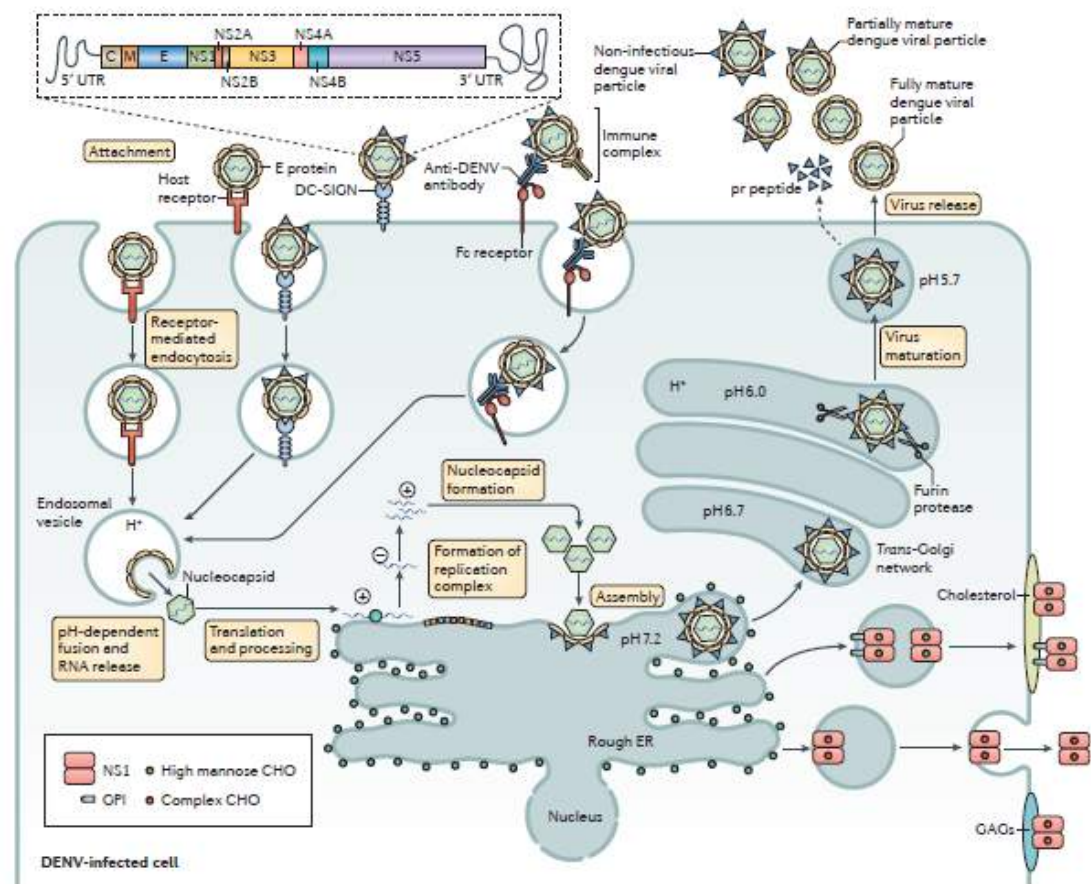
NS1 awalnya dinyatakan dalam hubungannya dengan retikulum endoplasma dalam bentuk monomer dimodifikasi dengan penambahan setengah *high mannose carbohydrate (high mannose CHO)* dan menghasilkan NS1 yang menempel membran (*membrane-bound NS1*). Beberapa subset NS1 DENV mendapatkan glikosil-fosfatidil-inositol (GPI). *Membrane-bound NS1* dan *GPI-anchored NS1* dikenalkan ke permukaan sel melalui jalur yang tidak diketahui, dimana mereka telah terbukti berhubungan dengan lipid seperti kolesterol (Guzman *et al.*, 2016).

Beberapa NS1 terkait permukaan sel sebelumnya dapat disekresikan NS1 yang telah terikat langsung ke glikosaminoglikan permukaan sel (GAG). Beberapa NS1 juga dapat disekresikan dari sel pejamu. Bentuk prekursor dari protein membran (prM) dan protein E tertanam ke dalam membran retikulum endoplasma dan menghasilkan nukleokapsid yang baru berbentuk seperti tunas yang menonjol ke dalam lumen retikulum endoplasma untuk membentuk partikel yang imatur (Guzman *et al.*, 2016).

Partikel imatur DENV dikenalkan melalui jalur sekretori. Konsentrasi pH rendah TGN menyebabkan penataan ulang protein prM dan E yang memungkinkan pembelahan prM oleh furin protease untuk membentuk protein M

matang. Virion dilepaskan dari sel pejamu dengan pelepasan pr peptida. Satu subset partikel DENV yang dilepaskan dengan prM masih intact dan tidak dapat menginfeksi sel pejamu baru (Guzman *et al.*, 2016).

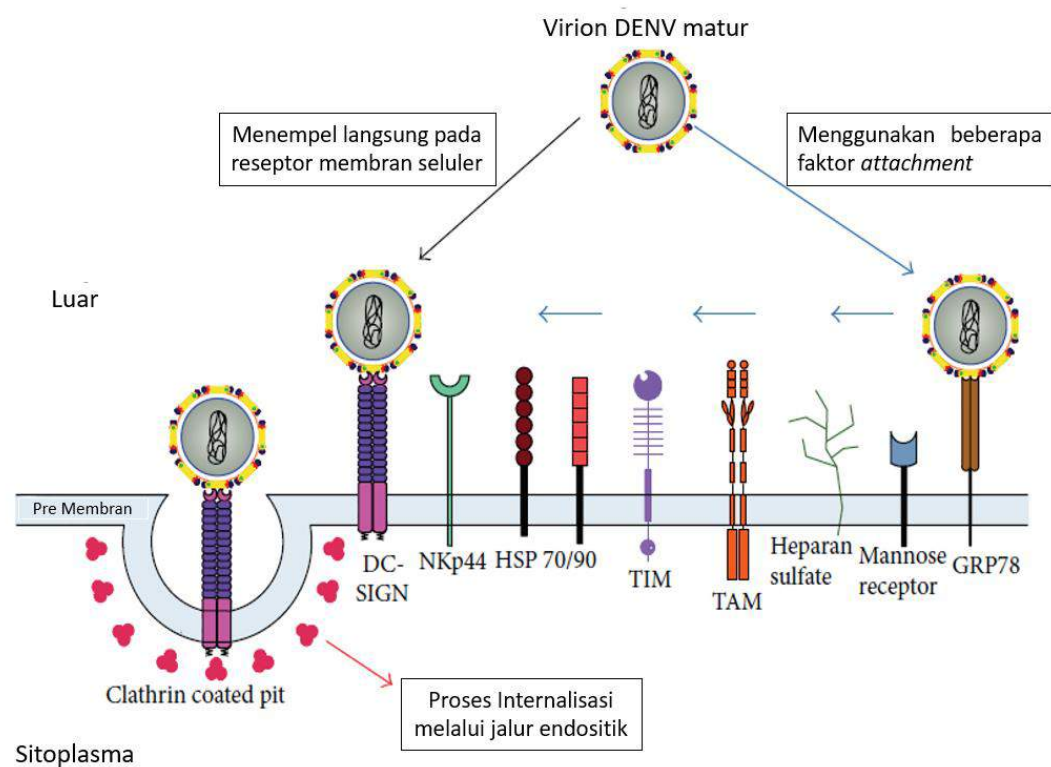
Berbagai proses masuknya sel DENV saat ini memerlukan penggunaan dua set molekul yang berbeda secara fungsional yaitu faktor kelekatan yang membantu virus untuk berkonsentrasi pada permukaan sel dan reseptor primer yang membantu mengarahkan virion ke jalur endositik (Khetarpal dan Khanna, 2016).



Gambar 2.5 Siklus hidup DENV dalam sel target pejamu (Guzman *et al.*, 2016).

DENV memanfaatkan reseptor membran dan faktor perlekatan pada membran plasma sel untuk menemukan jalannya ke sitoplasma. Virion matur

dapat menempel langsung ke reseptor membran seluler atau menggunakan beberapa faktor *attachment* untuk akhirnya memicu jalur endositik yaitu *clathrin dependent pathway*. Vesikel endositik menjadi *late endosome*, dimana suasana asam memicu perubahan konformasi pada dimer protein E menjadi beberapa trimer fusogenik. Pada akhir proses terbentuk pori-pori dan genom DENV dilepaskan ke dalam sitoplasma (Khetarpal dan Khanna, 2016).



Gambar 2.6 Representasi skematis dari proses masuknya DENV (Khetarpal dan Khanna, 2016).

2.2 Infeksi DENV (IVD)

IVD merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat utama dunia terutama di daerah tropis dan subtropis. Pada tahun 2012, IVD menjadi peringkat pertama sebagai penyakit yang ditularkan oleh nyamuk (arbovirus) terpenting di

dunia. IVD merupakan penyakit arbovirus yang paling cepat menyebar, dengan peningkatan insiden di dunia sebesar 30 kali lipat selama 50 tahun terakhir (*World Health Organization*, 2012).

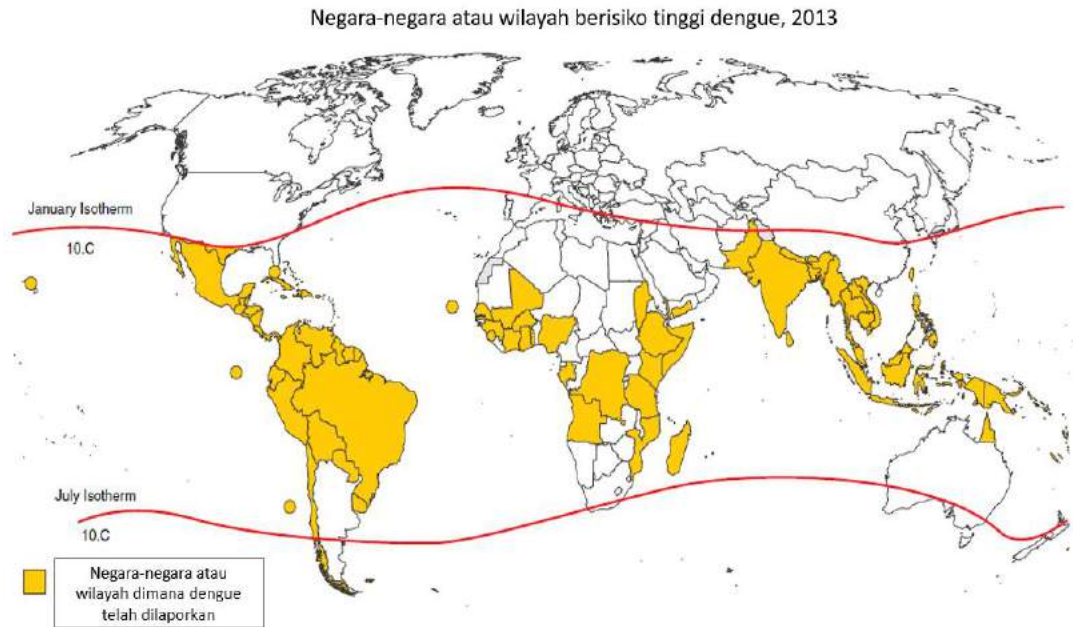
2.2.1 Epidemiologi IVD

Epidemiologi IVD adalah fenomena rumit yang tergantung pada hubungan yang kompleks antara berbagai faktor epidemiologis, yaitu faktor pejamu, faktor agen, faktor vektor, dan faktor lingkungan. Penularan DENV tergantung pada faktor biotik dan abiotik. Faktor biotik termasuk agen (DENV), vektor (nyamuk *Aedes Sp.*) dan pejamu (manusia). Faktor abiotik (lingkungan) meliputi variasi lokal seperti geografi, suhu, kelembaban dan curah hujan. Kompleksitas hubungan antara berbagai faktor ini pada akhirnya menentukan tingkat endemisitas di suatu daerah (*World Health Organization*, 2011, 2015; Cucunawangsih dan Lugito, 2017).

DENV tersebar luas di seluruh daerah tropis. Variasi spasial lokal dalam penularan DENV sangat dipengaruhi tidak hanya oleh curah hujan, suhu, dan distribusi vektor nyamuk utama *Ae. aegypti* tetapi juga akibat urbanisasi atau migrasi yang cepat (Guzman *et al.*, 2016; Cucunawangsih dan Lugito, 2017). Globalisasi, peningkatan perjalanan udara, dan urbanisasi yang tidak terencana telah menyebabkan peningkatan tingkat infeksi dan membantu IVD untuk memperluas distribusi geografis dan demografisnya (Khetarpal dan Khanna, 2016).

Penularan IVD dapat tetap rendah selama periode interepidemiik karena suhu yang ekstrim dengan kelembaban relatif rendah, tetapi selama musim hujan

lingkungan menjadi sangat cocok untuk berkembangbiakan vektor. Suhu dalam kisaran $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, kelembaban relatif sekitar 80% dan genangan air kecil yang tak terhitung jumlahnya menghasilkan kepadatan vektor yang tinggi (*World Health Organization*, 2015).



Gambar 2.7 Beberapa negara yang telah dilaporkan kejadian IVD pada tahun 2013 (*World Health Organization*, 2014).

DENV ditemukan di daerah tropis dan subtropis di seluruh dunia, terutama di daerah perkotaan dan semi-perkotaan (Stanaway *et al.*, 2016). IVD menjadi peringkat pertama sebagai infeksi arbovirus yang paling penting di dunia (*World Health Organization*, 2012). IVD terjadi dalam siklus musiman dan antar tahunan (Stanaway *et al.*, 2016). IVD dapat muncul sepanjang tahun dan menyerang seluruh kelompok umur (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Kasus IVD pada bayi menunjukkan manifestasi klinis IVD yang lebih parah dibandingkan kelompok umur lainnya (Soegijanto *et al.*, 2012).

WHO memperkirakan bahwa 50-100 juta IVD terjadi setiap tahun dan hampir setengah populasi dunia tinggal di berbagai negara endemis IVD (*World Health Organization*, 2012). Sekitar 60 juta IVD simtomatik terjadi per tahun yang mengakibatkan sekitar 10.000 kematian. Kejadian IVD dalam dua dekade terakhir mengalami peningkatan besar dengan jumlah IVD simtomatik lebih dari dua kali lipat setiap 10 tahun antara tahun 1990 hingga tahun 2013 (Stanaway *et al.*, 2016).

Tingkat IR tertinggi terjadi di Asia Tenggara, dengan rata-rata tahunan 34,3 (12,7-75,0) kasus per 1000 penduduk (Stanaway *et al.*, 2016). 1,3 miliar penduduk diperkirakan berada di 10 negara-negara yang termasuk WHO wilayah Asia Tenggara yang juga termasuk wilayah endemis IVD (*World Health Organization*, 2011).

DBD atau SSD adalah salah satu penyebab utama penderita masuk rumah sakit dan kematian pada anak-anak. Insiden dan kematian IVD tertinggi terjadi di Asia Tenggara (Stanaway *et al.*, 2016). Kematian terjadi pada 40-50% pasien DBD dengan syok, tetapi jika pasien ditangani dengan pelayanan intensif yang adekuat, kematian seharusnya terjadi pada <1% dari kasus (Kliegman *et al.*, 2016).

IVD bertanggung jawab sekitar 1,14 juta kasus *disability-adjusted life-years* pada tahun 2013 (Stanaway *et al.*, 2016). IVD juga dihubungkan dengan pengeluaran ekonomi yang signifikan dan diperkirakan bahwa wilayah Asia Pasifik menyumbang lebih dari 50% dari pembiayaan dunia. Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki beban IVD tertinggi di dunia. Total beban ekonomi IVD di Indonesia pada tahun 2015 diperkirakan US \$ 381,15 juta yang

terdiri dari US \$ 355,2 juta untuk kasus yang dirawat di rumah sakit dan US \$ 26,2 juta untuk kasus dengan perawatan rawat jalan (Nadjib *et al.*, 2019).

Indonesia merupakan salah satu negara hiperendemis DENV dengan insiden kasus IVD termasuk di dalamnya DBD di Indonesia yang meningkat tajam selama 45 tahun terakhir. Kasus IVD telah dilaporkan oleh 34 provinsi di Indonesia sepanjang tahun, dan *outbreaks* terjadi secara periodik (Karyanti *et al.*, 2014). *Outbreaks* oleh karena IVD mengakibatkan beban yang besar pada populasi, sistem kesehatan, dan ekonomi di sebagian besar negara tropis di dunia (World Health Organization, 2012).

Tabel 2.1 Data IR dan CFR kasus DBD di 34 provinsi Indonesia pada tahun 2015 hingga tahun 2017 (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017, 2018).

Tahun	Jumlah Kasus DBD	Jumlah Kematian (CFR)	<i>Incidence Rate</i> (IR) per 100.000 penduduk
2015	129.650	1.071 (0,82%)	50,75
2016	204.171	1.598 (0,78%)	78,85
2017	68.407	493 (0,72%)	26,12

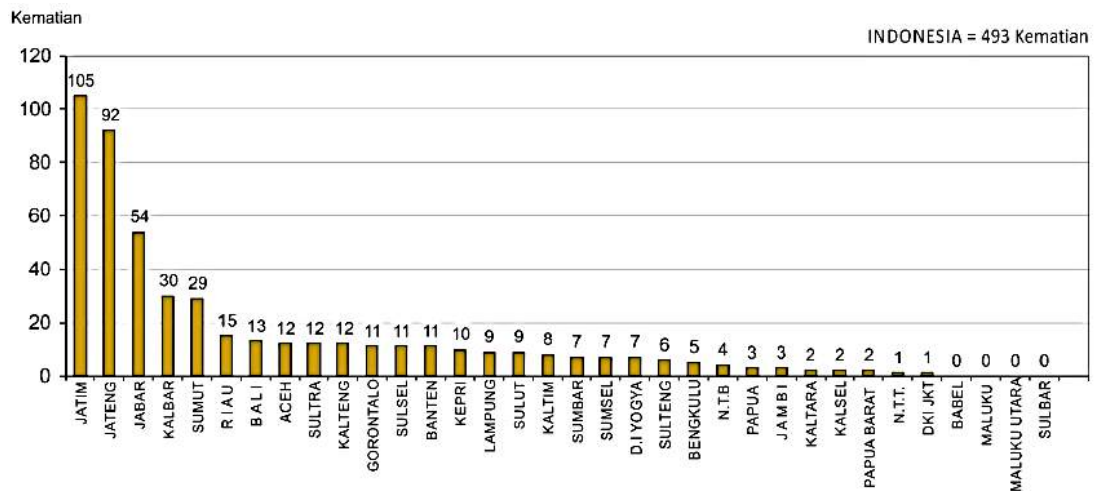
Jumlah kasus DBD di Indonesia pada tahun 2015 sebanyak 129.650 kasus dengan jumlah kematian sebanyak 1.071 orang (0,82%) dengan IR DBD 50,75 per 100.000 penduduk. Jumlah kasus DBD di Indonesia pada tahun 2016 sebanyak 204.171 kasus dengan jumlah kematian sebanyak 1.598 orang (0,78%) dengan IR DBD 78,85 per 100.000 penduduk. Jumlah kasus DBD di Indonesia pada tahun 2017 sebanyak 68.407 kasus dengan jumlah kematian sebanyak 493 orang (0,72%) dengan IR DBD 26,12 per 100.000 penduduk (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017, 2018).

Jumlah kasus DBD dan kematian akibat DBD di Indonesia tahun 2016 meningkat dibandingkan jumlah kasus tahun 2015 dan menurun pada tahun 2017. IR DBD di Indonesia tahun 2016 meningkat dari tahun 2015 dan menurun pada tahun 2017. IR tahun 2017 sudah mencapai target IR nasional yaitu dibawah 49 per 100.000 penduduk. Angka IR DBD di Indonesia tahun 2017 sudah berada dibawah target nasional tetapi di beberapa kabupaten atau kota masih terjadi peningkatan jumlah penderita DBD dibandingkan tahun sebelumnya (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017, 2018).

Provinsi Jawa Timur merupakan salah satu provinsi di Indonesia tahun 2017 dengan jumlah kasus DBD tertinggi yaitu sebanyak 7.838 kasus (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018). Jumlah kasus DBD di Provinsi Jawa Timur tahun 2018 hingga bulan Januari 2019 adalah sebanyak 9.087 kasus (IR sebesar 23,0 per 100.000 penduduk) dengan 93 kematian (CFR sebesar 1,02%) (Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, 2019). Jumlah kasus DBD di Provinsi Jawa Timur tahun 2018 hingga bulan Januari 2019 meningkat dibanding jumlah kasus DBD tahun 2017 (Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur, 2018).

IR DBD Provinsi Jawa Timur pada tahun 2013 adalah 39 per 100.000 penduduk lalu menurun pada tahun 2014 menjadi 24,1 per 100.000 penduduk (Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, 2015). IR DBD Provinsi Jawa Timur meningkat kembali pada tahun 2015 menjadi 54,18 per 100.000 penduduk dan meningkat kembali pada tahun 2016 menjadi 64,8 per 100.000 penduduk. IR DBD di Provinsi Jawa Timur menurun kembali pada tahun 2017 menjadi 20 per 100.000 penduduk. IR DBD Provinsi Jawa Timur tahun 2017 sudah di bawah target

nasional ≤ 49 per 100.000 penduduk. Kasus DBD pada tahun 2017 mengalami penurunan dibandingkan tahun sebelumnya tetapi kewaspadaan terhadap lonjakan kasus pada tahun selanjutnya perlu ditingkatkan (Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur, 2018).



Gambar 2.8 Kematian DBD per provinsi di Indonesia tahun 2017 (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018).

Jumlah kematian tertinggi akibat DBD di Indonesia tahun 2017 terjadi di Provinsi Jawa Timur yaitu sebanyak 105 kematian dengan CFR mencapai 1,34%. Provinsi Jawa Timur mendapat peringkat tertinggi terkait pencapaian CFR di tahun 2017 (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018). Angka kematian akibat DBD di Provinsi Jawa Timur tahun 2017 belum mencapai target yaitu angka harus dibawah atau sama dengan 1% (Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur, 2018). CFR DBD di Jawa Timur tahun 2014 adalah 1,16% lalu meningkat pada tahun 2015 dengan CFR sebesar 1,37% (Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, 2015, 2016).

CFR DBD lebih dari 1% dikategorikan tinggi. Pada beberapa provinsi dengan CFR tinggi masih diperlukan upaya peningkatan kualitas pelayanan

kesehatan dan peningkatan pengetahuan masyarakat untuk segera memeriksakan diri ke sarana kesehatan jika ada gejala DBD sehingga tidak terlambat dalam penanganan. Hal ini menunjukkan bahwa perlu peningkatan diagnosa dini dan tatalaksana kasus DBD di rumah sakit serta sosialisasi tentang penyakit DBD perlu ditingkatkan kematian (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018).

Tabel 2.2 Data IR dan CFR Kasus DBD di Provinsi Jawa Timur pada tahun 2013 hingga tahun 2019 (Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, 2015, 2016; 2018; Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018)

Tahun	<i>Incidence Rate (IR) per 100.000 penduduk</i>	CFR (%)
2013	39	-
2014	24,1	1,16
2015	54,18	1,37
2016	64,8	-
2017	20	1,34
2018 hingga bulan Januari 2019	23	1,02

Kabupaten Jember merupakan salah satu daerah yang berada di wilayah bagian selatan Provinsi Jawa Timur yang memiliki jumlah kasus DBD tahun 2019 sebesar 988 kasus dengan IR sebesar 40,32 per 100.000 penduduk. IR tersebut mengalami peningkatan dari tahun 2018 yaitu 16,8 per 100.000 penduduk. Jumlah kasus DBD di Kabupaten Jember terbaru dari 1 Januari 2020 sampai dengan bulan Mei 2020 sebesar 628 kasus dengan IR 25,71 per 100.000 penduduk (Dinas Kesehatan Kabupaten Jember, 2020).

Tabel 2.3 Data IR dan CFR Kasus DBD di Kabupaten Jember pada tahun 2014 hingga tahun 2020 (Dinas Kesehatan Kabupaten Jember, 2020).

Tahun	Jumlah Kasus DBD	Jumlah Kematian (Orang)	<i>Incidence Rate</i> (IR) per 100.000 penduduk	CFR (%)
2014	868	7	36,34	0,81
2015	962	15	39,96	1,56
2016	511	9	21,12	1,76
2017	405	4	16,67	0,99
2018	389	0	16,8	0
2019	988	7	40,32	0,71
1 Januari 2020 sampai dengan bulan Mei 2020	628	2	25,71	0,32

Jumlah kematian akibat kasus DBD di Kabupaten Jember tahun 2019 sebanyak 7 orang dengan CFR sebesar 0,71%. CFR tersebut mengalami peningkatan dari tahun 2018 yaitu sebesar 0% Puskesmas di Kabupaten Jember dengan jumlah kasus terbanyak pada tahun 2019 berurutan yaitu Puskesmas Patrang (58 kasus), Puskesmas Sumbersari (42 kasus), dan Puskesmas Kaliwates (34 kasus) (Dinas Kesehatan Kabupaten Jember, 2020).

2.2.2 Patogenesis IVD

Patogenesis IVD dipengaruhi interaksi yang kompleks antara faktor virus dan faktor pejamu (Back dan Lundkvist, 2013). Respon imun, latar belakang genetik individu dan karakteristik virus berkontribusi pada IVD yang parah (*World Health Organization*, 2009). Hubungan antara terjadinya DBD dan/ atau SSD dengan IVD sekunder berimplikasi pada sistem kekebalan dalam patogenesis DBD (*World Health Organization*, 2011).

Patofisiologi primer IVD yang parah adalah peningkatan akut permeabilitas vaskuler yang mengarah ke kebocoran plasma ke dalam ruang ekstrasvaskuler, sehingga menimbulkan hemokonsentrasi dan penurunan tekanan darah (Soegijanto, 2006). Kebocoran plasma, hemokonsentrasi dan kelainan pada homeostasis merupakan ciri IVD yang parah (*World Health Organization*, 2009). Perubahan hemostasis pada IVD yang parah (DBD atau SSD) melibatkan tiga faktor yaitu perubahan vaskuler, trombositopeni, dan kelainan koagulasi (Soegijanto, 2006).

Faktor risiko terjadinya IVD parah yang adalah strain virus, *pre-existing anti dengue* (infeksi sebelumnya), antibodi maternal pada bayi, genetik pejamu, usia, risiko tinggi terjadinya infeksi sekunder (risiko tinggi berada di lokasi dengan 2 atau lebih serotipe DENV yang bersirkulasi tinggi secara simultan/ transmisi hiperendemik) (Soegijanto *et al.*, 2015).

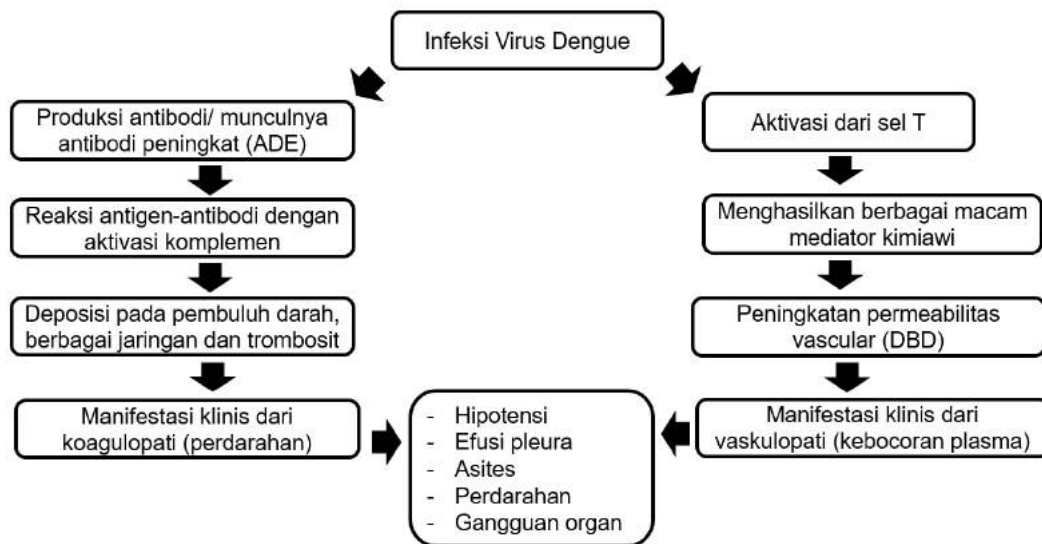
Ciri khas dari DBD adalah peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang mengakibatkan kebocoran plasma (vaskulopati), volume intravaskular yang mengalami vasokonstriksi, dan syok pada kasus yang parah (*World Health Organization*, 2011).

Kebocoran plasma dari DBD yang parah bersifat unik karena ada kebocoran selektif plasma di rongga pleura dan peritoneum dengan periode kebocoran yang pendek (24-48 jam) (*World Health Organization*, 2011). Kebocoran plasma yang luas ke berbagai rongga serosa tubuh, termasuk rongga pleura, perikardial, dan peritoneum, dapat menyebabkan syok yang dalam (Back

dan Lundkvist, 2013). Aktivasi sel endotel dapat memediasi kebocoran plasma (*World Health Organization*, 2009).

Kebocoran plasma dianggap lebih berhubungan dengan gangguan fungsional dari sel endotel daripada akibat kerusakan struktural sel endotel (*World Health Organization*, 2009). Kerusakan struktural endotel menyebabkan perubahan fungsional dalam integritas vaskular. Perubahan fungsional integritas vaskular ditunjukkan dengan masa pemulihan syok yang cepat tanpa gejala sisa dan tidak adanya peradangan pada pleura dan peritoneum (*World Health Organization*, 2011).

Tidak terjadinya lesi destruktif nyata pada vaskuler menunjukkan bahwa perubahan sementara fungsi vaskuler diakibatkan suatu mediator kerja singkat (Soegijanto, 2006). Disfungsi sel endotel diakibatkan oleh aktivasi monosit dan sel T yang terinfeksi, aktivasi sistem komplemen dan produksi dari mediator, monokin, dan sitokin (*World Health Organization*, 2009). Penderita IVD yang stabil dan mulai sembuh menunjukkan absorpsi cairan ekstrasvasi yang cepat dan menimbulkan penurunan hematokrit (Soegijanto, 2006).



Gambar 2.9 Patogenesis IVD (*World Health Organization*, 2015).

Trombositopenia dapat dihubungkan dengan perubahan megakariositopoiesis oleh infeksi pada sel hematopoietik manusia dan gangguan pertumbuhan sel progenitor. Trombositopenia yang terjadi akibat disfungsi trombosit (aktivasi dan agregasi trombosit), peningkatan kerusakan atau peningkatan konsumsi trombosit intravaskular (*World Health Organization*, 2009).

Trombositopenia dan disfungsi trombosit berhubungan dengan koagulasi intravaskular diseminata yang menyebabkan koagulopati dan menyebabkan perdarahan pada DBD (*World Health Organization*, 2009).

2.2.3 Imunopatofisiologi IVD

Kemampuan serotipe DENV yang khas membedakannya dari semua Flavivirus lain yaitu dapat memanfaatkan antibodi Flavivirus heterotipik yang sudah ada sebelumnya pada pejamu untuk meningkatkan keparahan IVD (*World Health Organization*, 2015).

Serotipe DENV (terutama *sequens* dari serotipe DENV) yang menghasilkan infeksi sekunder penting untuk memastikan keparahan penyakit. Keempat serotipe DENV mampu menghasilkan kasus DBD. Selama infeksi berurutan, hanya 2% hingga 4% individu yang menderita penyakit IVD yang parah (*World Health Organization*, 2011).

Perlindungan silang terbatas antara empat serotipe DENV telah memungkinkan empat serotipe DENV untuk hidup berdampingan di wilayah geografis yang sama atau tumpang tindih. Keunikan antigenik dari serotipe DENV bermanfaat dalam evolusi DENV (Back dan Lundkvist, 2013).

Studi di Thailand telah mengungkapkan bahwa urutan infeksi DENV-1/ DENV-2 dikaitkan dengan risiko DBD sebesar 500 kali lipat dibandingkan dengan infeksi primer. Untuk urutan DENV-3/ DENV-2 risikonya 150 kali lipat, dan urutan DENV-4/ DENV-2 memiliki risiko DBD sebesar 50 kali lipat. Tidak ada batasan waktu untuk sensitisasi setelah infeksi primer (*World Health Organization*, 2011).

Teori patogenesis IVD yang berat (DBD/SSD):

1. Teori antigen antibodi

DENV merupakan antigen yang akan bereaksi terhadap antibodi pejamu. Reaksi antigen dengan antibodi akan membentuk kompleks DENV-antibodi (kompleks imun). Kompleks imun DENV menghasilkan anafilatoksin C3A dan C5A yang merupakan mediator yang mempunyai efek farmakologis cepat dan pendek. Peningkatan aktivasi C3A dan C5A bersifat vasoaktif dan prokoagulan pada permukaan sel endotel memediasi peningkatan permeabilitas vaskular

(vaskulopati) sehingga menimbulkan kebocoran plasma dan perdarahan yang dapat berakhir pada syok hipovolemik (Soegijanto, 2006; *World Health Organization*, 2011; Back dan Lundkvist, 2013).

Protein DENV NS1 dihubungkan sebagai modulator jalur komplemen plasma (Back dan Lundkvist, 2013). Antigen NS1 dari DENV telah terbukti dapat berperan dalam mengatur aktivasi komplemen dan permeabilitas pembuluh darah (*World Health Organization*, 2011). NS1 DENV dapat menimbulkan degradasi C4 ke C4B sehingga dapat melindungi DENV dari *complement dependent neutralization* dalam plasma (Back dan Lundkvist, 2013).

2. Teori imunopatologi

Respons imun pejamu memainkan peran penting dalam patogenesis IVD. Variasi individu terjadi pada respons antibodi terhadap DENV (*World Health Organization*, 2015). Respon imun humoral sangat penting untuk mengendalikan infeksi dan diseminasi DENV (Back dan Lundkvist, 2013). IVD pertama kali pada penderita disebut infeksi primer, yang dapat diikuti infeksi dengan serotipe DENV yang berbeda disebut infeksi sekunder (Kliegman *et al.*, 2016).

Penderita yang terinfeksi salah satu serotipe DENV (infeksi primer) menimbulkan pembentukan kekebalan terhadap serotipe DENV tersebut seumur hidup atau jangka panjang (kekebalan homotip), tetapi tidak melindungi terhadap serotipe DENV yang lain (Soegijanto, 2006; Back dan Lundkvist, 2013; Khetarpal dan Khanna, 2016). Antibodi lintas reaktif yang muncul setelah infeksi primer dan perlindungan silang terhadap serotipe heterolog berlangsung selama 3-4 bulan (Back dan Lundkvist, 2013).

Sifat sementara imunitas heterotipik diyakini karena reaksi silang antibodi spesifik protein E virus yang melindungi di atas ambang batas konsentrasi tertentu. Sasaran utama dari respons antibodi terhadap IVD pada manusia adalah prM, protein struktural E, dan protein NS1. Respons antibodi yang lemah terhadap protein NS lainnya, misalnya, NS3 dan NS5, juga telah terdeteksi (Back dan Lundkvist, 2013).

Teori imunopatologi berkembang menjadi teori infeksi sekunder sebagai akibat masuknya DENV heterologous yang berikutnya (Soegijanto, 2006). Infeksi berikutnya (infeksi sekunder) oleh serotipe lain menghasilkan perlindungan jangka pendek (kekebalan heterotipik) menimbulkan risiko berbahaya dan meningkatkan risiko penyakit IVD yang parah (Soegijanto, 2006; Back dan Lundkvist, 2013).

Glikoprotein E merupakan epitop penting pada DENV karena mampu membangkitkan antibodi spesifik untuk proses netralisasi, mempunyai aktivitas hemaglutinin, berperan dalam proses absorpsi pada permukaan sel (*receptor binding*), mempunyai fungsi biologis untuk fusi membran dan perakitan virion (Soegijanto, 2006).

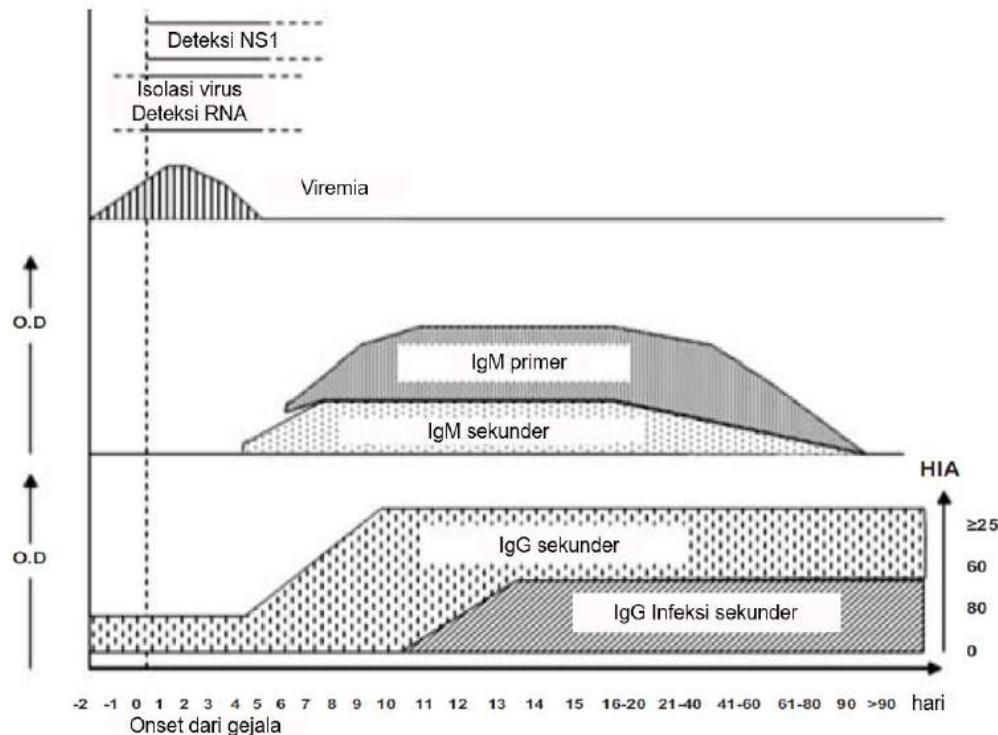
Antibodi memiliki aktivitas netralisasi dan mengenali protein E yang berperan sebagai epitop yang memiliki sifat serotipe spesifik, reaksi silang serotipe, reaksi silang *Flavivirus*. Antibodi netralisasi ini memberikan proteksi terhadap infeksi DENV. Antibodi monoklonal terhadap NS1 dari komplemen DENV dan antibodi poliklonal yang ditimbulkan dari imunisasi dengan NS1 mengakibatkan lisis sel yang terinfeksi DENV (Soegijanto, 2006).

Antibodi terhadap DENV secara *in vivo* dapat berperan dalam dua hal yang berbeda yaitu antibodi netralisasi (*neutralizing antibodies*) memiliki serotipe spesifik yang dapat mencegah infeksi DENV dan antibodi non-netralisasi serotipe memiliki peran reaksi silang yang dapat meningkatkan infeksi (berperan dalam patogenesis IVD yang parah) (Soegijanto, 2006).

Infeksi primer dan sekunder juga dapat dibedakan berdasarkan respon antibodi dari pejamu (*World Health Organization*, 2015). Paparan pertama seseorang terhadap salah satu dari empat serotipe DENV dikenal sebagai infeksi primer. Infeksi primer dapat mengakibatkan infeksi simptomatik atau asimtomatik. Titer antibodi imunoglobulin M (IgM) yang tinggi pada infeksi primer muncul dalam 3-5 hari dan imunoglobulin G (IgG) yang tinggi muncul dalam 6-10 hari setelah timbulnya infeksi (Meng *et al.*, 2015; Kliegman *et al.*, 2016). Kehadiran IgM bersifat sementara, menghilang dalam 2-3 bulan setelah timbulnya penyakit, sedangkan IgG bertahan seumur hidup (Khetarpal dan Khanna, 2016).

IVD yang parah sering dihubungkan dengan infeksi sekunder (*World Health Organization*, 2015). Penderita yang tinggal di daerah hiperendemik DENV (endemisitas tinggi) berisiko mengalami infeksi sekunder (Meng *et al.*, 2015; Kliegman *et al.*, 2016). IVD yang parah (DBD/ SSD) dapat terjadi pada pasien yang menderita IVD pertama kalinya, tetapi sebagian besar kasus DBD terjadi pada pasien dengan infeksi sekunder (*World Health Organization*, 2011). Kasus infeksi sekunder yang berakhir pada kematian hanya sebesar 2-3%. Infeksi sekunder dengan serotipe DENV yang sebelumnya tidak ditemukan, biasanya menghasilkan manifestasi DD (Khetarpal dan Khanna, 2016).

Antibodi spesifik DENV dapat dilihat pada ibu yang memiliki antibodi DENV dan bayinya. Antibodi spesifik DENV yang diturunkan secara maternal memberi perlindungan terhadap IVD sebelum usia 3-4 bulan. Infeksi primer pada bayi berusia antara 4 dan 12 bulan memiliki risiko lebih tinggi terkena IVD yang parah karena antibodi *non-neutralizing* yang diturunkan secara maternal. Risiko IVD yang parah berkurang setelah usia 1 tahun karena konsentrasi antibodi lintas reaktif menurun (Back dan Lundkvist, 2013).



Gambar 2.10 Perkiraan *timeline* dan metode diagnostik IVD (World Health Organization, 2011).

3. Teori *Infection Enhancing Antibody* (ADE)

Pada beberapa penderita ditemukan antibodi yang tidak dapat menetralisasi virus dapat menimbulkan keadaan yang berbahaya. Terdapat dua jenis antibodi DENV yaitu antibodi yang dapat menetralisasi virus secara spesifik

dan antibodi non-netralisasi yang dapat memicu replikasi virus. Teori ini didasarkan pada peran sel fagosit mononuklear yang merangsang terbentuknya antibodi non-netralisasi (Soegijanto, 2006).

Antigen DENV lebih banyak ditemukan pada sel makrofag yang menetap pada jaringan. Antibodi non-netralisasi melekat pada sekeliling permukaan sel makrofag yang beredar dan tidak melekat pada sel makrofag yang menetap di jaringan. Makrofag yang dilekati antibodi non-netralisasi akan memiliki sifat opsonisasi, internalisasi, dan akhirnya sel mudah terinfeksi (Soegijanto, 2006).

Fenomena ADE (*Antibody-Dependent Enhancement*) adalah kondisi dimana antibodi yang sudah ada sebelumnya dari konsentrasi sub-netralisasi bereaksi silang dengan serotipe DENV heterolog yang memfasilitasi infeksi virus dari berbagai sel yang mengandung FcγR (*Fcγ Receptor*) yang terjadi di luar periode perlindungan silang (Back dan Lundkvist, 2013). Selama infeksi kedua dengan serotipe yang berbeda, keberadaan antibodi heterotipik dalam jumlah rendah (yang membentuk kompleks antibodi-DENV) mendorong akses DENV masuk ke monosit melalui reseptor Fc yang mengarah pada peningkatan *viral load* dan peningkatan keparahan IVD (Khetarpal dan Khanna, 2016).

Pemeran utama fenomena ADE adalah antibodi lintas reaktif yang ditimbulkan terhadap *loop* fusi dan prM DENV. *Loop* fusi dan prM DENV memiliki netralisasi yang lemah yang mengarah pada peningkatan infeksi pada konsentrasi rendah (Khetarpal dan Khanna, 2016). Antibodi *non-neutralizing* terhadap protein prM virus berpotensi memediasi ADE (Back dan Lundkvist, 2013).

Partikel DENV yang belum matang (imatur) yang dapat menjadi tidak menular atau kurang menular akan menimbulkan infeksi dalam kombinasi dengan antibodi anti-prM yang memediasi ADE untuk menginfeksi sel pejamu baru (Back dan Lundkvist, 2013).

4. Teori mediator

Teori mediator merupakan kelanjutan dari teori ADE yaitu bahwa makrofag yang terinfeksi DENV mengeluarkan mediator atau sitokin yang memiliki sifat vasoaktif atau prokoagulasi. Sitokin diproduksi oleh banyak sel terutama makrofag mononuklear. Sitokin tidak diproduksi dan tidak terbentuk dalam keadaan normal sehingga tidak dijumpai di dalam plasma (Soegijanto, 2006).

Fungsi dan mekanisme kerja sitokin adalah sebagai mediator pada imunitas alami yang disebabkan oleh rangsangan zat yang infeksius. Sitokin berperan sebagai regulator yang mengatur aktivasi, proliferasi, dan diferensiasi limfosit (Soegijanto, 2006).

Viral load awal yang tinggi menyebabkan ketidakseimbangan transien dan mediator inflamasi terjadi selama IVD yang parah (*World Health Organization*, 2009). Viremia awal yang tinggi atau konsentrasi NS1 yang tinggi dalam darah selama infeksi sekunder berhubungan dengan IVD yang parah (Back dan Lundkvist, 2013). Tingkat *viral load* lebih tinggi pada pasien DBD dibandingkan dengan pasien DD sehingga tingkat protein virus (NS1) juga lebih tinggi pada pasien DBD (*World Health Organization*, 2011).

Tingkat *viral load* berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit IVD seperti jumlah kasus efusi pleura dan trombositopenia. *Viral load* menjadi salah

satu penentu utama keparahan penyakit IVD (*World Health Organization*, 2011). Biomasa DENV akan lebih besar selama infeksi sekunder dibandingkan dengan selama infeksi primer (Back dan Lundkvist, 2013).

Peningkatan masa sel yang terinfeksi akan merangsang respons sel-T dan sitokin yang sebanding dengan stimulus antigenik (Back dan Lundkvist, 2013). Sel T memori lintas reaktif juga dapat berperan dalam memberikan imunitas protektif atau menyebabkan imunopatologi (Khetarpal dan Khanna, 2016).

Beban virus yang lebih tinggi memunculkan respons inflamasi yang lebih besar pada pejamu dan menimbulkan peningkatan kadar sitokin proinflamasi dalam plasma. Sitokin proinflamasi yang terlibat yaitu IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, IFN- γ , TNF- α , dan MCP-1. Pendana aktivasi imunitas (sitokin proinflamasi dan komponen komplemen) bersama-sama dengan perubahan fungsi trombosit, sel dendritik, monosit, dan sel T menunjukkan bahwa respon imun terhadap berbagai komponen DENV dapat berkontribusi untuk proses imunitas yang menghasilkan DBD atau SSD (Back dan Lundkvist, 2013).

Profil sitokin sangat penting terutama selama tahap akut pada IVD. Sitokin proinflamasi dikeluarkan untuk memulai peradangan dan untuk mengontrol replikasi DENV terutama pada tahap awal infeksi. Ekspresi sitokin spesifik dikaitkan dengan infeksi sekunder (Huang *et al.*, 2017).

Peningkatan kadar sitokin proinflamasi dan sitokin vasoaktif sebelum dan pada saat kebocoran plasma pada pasien dengan DBD menunjukkan bahwa produksi sitokin yang berlebihan ('badai sitokin' atau "*cytokine tsunami*") menginduksi peningkatan permeabilitas vaskular (*World Health Organization*,

2011; Back dan Lundkvist, 2013). Pola respon sitokin berhubungan dengan pola pengenalan silang sel T spesifik DENV (*World Health Organization*, 2011).

Respons imun seluler juga penting dalam patogenesis IVD. DENV dapat menginfeksi sel T CD4 dan sel T CD8. Respons imun seluler dapat bersifat protektif atau lintas reaktif mirip dengan mekanisme antibodi spesifik DENV (Back dan Lundkvist, 2013).

Sel T spesifik DENV merespons dengan beragam fungsi efektor, termasuk proliferasi, lisis sel target, dan produksi berbagai sitokin (Bäck dan Lundkvist, 2013). Reaksi silang sel T secara fungsional berkurang dalam aktivitas sitolitiknya tetapi mengekspresikan peningkatan produksi sitokin (*World Health Organization*, 2011).

Sel T CD4 menghasilkan IFN- γ , TNF- α , TNF- β , dan IL -2. Produksi sitokin tipe T-helper-2, seperti IL-4, jarang pada IVD. Sel T CD8 menghasilkan tingkat IFN- γ dan TNF- α yang relatif lebih rendah pada IVD tanpa komplikasi (Back dan Lundkvist, 2013).

Sel pejamu yang diaktifkan dan terinfeksi mensekresikan TNF- α dan NO yang dapat meningkatkan permeabilitas endotel dan meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada sel endotel vaskuler (Back dan Lundkvist, 2013; Huang *et al.*, 2017). TNF- α telah terlibat dalam beberapa manifestasi IVD yang parah termasuk perdarahan (*World Health Organization*, 2011). Gambaran patologis IVD dengan perdarahan yang dimediasi oleh sitokin TNF- α adalah peningkatan permeabilitas kapiler dengan tidak adanya kerusakan morfologis pada endotel

kapiler, perubahan jumlah dan fungsi leukosit, peningkatan hematokrit dan trombositopenia (Back dan Lundkvist, 2013).

Peningkatan sitokin IFN- γ juga dapat menyebabkan kebocoran plasma. Peningkatan kadar IL-6 dan IL-8 berhubungan dengan deregulasi koagulasi dan fibrinolisis pada DBD. Peningkatan kadar IL-10 berkorelasi dengan penurunan kadar trombosit dan penurunan fungsi trombosit. Peningkatan kadar IL-10 dapat berkontribusi pada pengembangan komplikasi perdarahan (Back dan Lundkvist, 2013).

Respons tipe Th1 terkait dengan pemulihan dari infeksi akut. Pasien dengan IVD yang tidak parah sebagian besar memiliki respon tipe Th1. Respons tipe-Th2 dikaitkan dengan eksaserbasi infeksi dan manifestasi klinis yang parah. Regulasi silang Th1 dan Th2 secara berurutan dimediasi oleh IL-10 dan IFN- γ (Back dan Lundkvist, 2013).

Makrofag yang diaktifkan merekrut sel-T CD4 yang menghasilkan *human cytotoxic factor*. Tingkat hCF yang pada gilirannya menginduksi kaskade sitokin yang mengarah ke respons tipe-Th1 atau tipe-Th2. Tingkat hCF dapat meningkat dalam kasus IVD yang parah dan autoantibodi hCF melindungi terhadap penyakit parah. Respon imun bergeser ke respon tipe Th2 keparahan penyakit meningkat, yang ditandai dengan sekresi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan IL-13 (Back dan Lundkvist, 2013).

5. Teori apoptosis

Apoptosis adalah proses kematian sel secara fisiologik yang merupakan reaksi terhadap berbagai stimulan. Proses apoptosis dibagi menjadi dua tahap yaitu

kerusakan inti sel, lalu perubahan bentuk sel dan permeabilitas membran sel. Apoptosis menyebabkan terjadi fragmentasi DNA sel, vakuolisasi sitoplasma, *blebbing*, dan pengikatan granulasi membran plasma menjadi DNA subseluler yang berisi berbagai badan apoptotik (Soegijanto, 2006).

Limfosit T sitotoksik mengisyaratkan protein protease (enzim fragmentin) yang menginduksi apoptosis sel target. IVD menyebabkan limfosit T yang teraktivasi menunjukkan ekspresi T dalam kadar tinggi dan sangat *susceptible* terhadap apoptosis. Pada kasus IVD yang parah ditemukan kerusakan hepar atau ditemukan *councilman bodies* yang menunjukkan adanya proses apoptosis sel hepar (Soegijanto, 2006).

Berikut ini dijelaskan beberapa fase dari perjalanan penyakit IVD menurut WHO tahun 2009.

a. Fase Febris

Pasien biasanya mengalami demam tingkat tinggi secara mendadak. Fase demam akut ini biasanya berlangsung 2-7 hari dan sering disertai dengan wajah *flushing*, eritema kulit, nyeri tubuh menyeluruh, mialgia, artralgia, dan nyeri kepala. Beberapa pasien mungkin menderita nyeri tenggorokan, injeksi faring dan injeksi konjungtiva. Anoreksia, mual dan muntah sering terjadi (*World Health Organization*, 2009).

Pada fase demam awal mungkin sulit untuk membedakan secara klinis demam yang disebabkan oleh DENV dari penyakit demam yang tidak disebabkan oleh DENV. Tes torniket positif dalam fase febris meningkatkan kemungkinan IVD. Kasus IVD yang parah dan yang tidak parah tidak dapat dibedakan melalui

gambaran klinis tersebut. Pemantauan untuk tanda-tanda peringatan dan parameter klinis lainnya sangat penting untuk mengenali perkembangan menuju fase kritis (*World Health Organization*, 2009).

Manifestasi hemoragik ringan seperti *petekie* dan perdarahan membran mukosa (misalnya perdarahan pada hidung dan gusi) dapat terlihat. Pendarahan vagina masif (pada wanita usia subur) dan perdarahan gastrointestinal dapat terjadi selama fase ini tetapi tidak bersifat umum pada semua penderita. Hepar sering teraba membesar dan lunak setelah beberapa hari demam (*World Health Organization*, 2009).

b. Fase kritis

Fase kritis terjadi saat penurunan suhu tubuh (*defervesens*), ketika suhu turun menjadi 37,5°-38°C atau kurang dan tetap di bawah level ini, biasanya pada hari ke 3–7 penyakit, peningkatan permeabilitas kapiler secara paralel dengan peningkatan kadar hematokrit dapat terjadi. Peningkatan paralel sebagai penanda awal dari fase kritis. Periode kebocoran plasma yang signifikan secara klinis biasanya berlangsung 24-48 jam. Leukopenia progresif yang diikuti dengan penurunan jumlah trombosit yang cepat biasanya mendahului kebocoran plasma. Pada titik ini pasien tanpa peningkatan permeabilitas kapiler akan membaik, sementara mereka dengan permeabilitas kapiler yang meningkat dapat menjadi lebih buruk sebagai akibat dari kehilangan volume plasma (*World Health Organization*, 2009).

Tingkat kebocoran plasma pada IVD bervariasi. Efusi pleura dan asites dapat dideteksi secara klinis tergantung pada derajat kebocoran plasma dan

volume terapi cairan. Rontgen thoraks dan USG abdomen dapat menjadi alat yang berguna untuk diagnosis. Tingkat peningkatan di atas hematokrit awal sering mencerminkan tingkat keparahan kebocoran plasma (*World Health Organization*, 2009).

Syok terjadi ketika volume kritis plasma hilang karena kebocoran plasma. Syok sering didahului dengan tanda-tanda peringatan. Suhu tubuh mungkin di bawah normal ketika terjadi syok. Syok yang berkepanjangan menghasilkan hipoperfusi organ yang mengakibatkan kerusakan organ progresif, asidosis metabolik dan koagulasi intravaskular diseminata (DIC) (*World Health Organization*, 2009).

Syok yang berkepanjangan pada gilirannya menyebabkan perdarahan hebat yang menyebabkan hematokrit menurun pada syok berat. Leukopenia biasanya terlihat selama fase kritis, jumlah total leukosit dapat meningkat pada pasien dengan perdarahan hebat. Kerusakan organ yang parah seperti hepatitis berat, ensefalitis atau miokarditis dan / atau perdarahan hebat juga dapat terjadi tanpa kebocoran plasma yang jelas atau syok (*World Health Organization*, 2009).

Syok yang membaik setelah defervesens akan disebut IVD tidak parah. Beberapa pasien berkembang ke fase kritis kebocoran plasma tanpa defervesensi dan, pada pasien ini, perubahan pemeriksaan hitung darah lengkap harus digunakan untuk mengevaluasi timbulnya fase kritis dan kebocoran plasma. Syok yang memburuk akan bermanifestasi dengan berbagai tanda peringatan yang disebut “*dengue with warning signs*”. Kasus-kasus IVD dengan berbagai tanda peringatan mungkin akan pulih dengan rehidrasi intravena yang cepat. Beberapa

kasus akan memburuk menjadi IVD yang parah (*World Health Organization, 2009*).

c. Fase pemulihan

Pasien yang bertahan dari fase kritis yang berlangsung sekitar 24-48 jam mengalami reabsorpsi bertahap cairan kompartemen ekstrasvaskuler terjadi dalam 48-72 jam berikutnya. Keadaan umum pasien akan membaik, nafsu makan kembali, gejala gastrointestinal mereda, status hemodinamik menjadi stabil dan kemudian terjadi diuresis (*World Health Organization, 2009*).

Beberapa pasien mungkin memiliki ruam "*isles of white in the sea of red*" Beberapa mungkin mengalami pruritus menyeluruh. Bradikardia dan perubahan elektrokardiografi sering terjadi selama fase pemulihan. Hematokrit menjadi stabil atau mungkin lebih rendah karena efek dilusi dari cairan yang diserap kembali. Jumlah leukosit biasanya mulai naik segera setelah fase defervesens tetapi pemulihan jumlah trombosit biasanya lebih lambat dari jumlah leukosit (*World Health Organization, 2009*).

Distres pernapasan akibat efusi pleura masif dan asites akan terjadi kapan saja jika cairan intravena berlebihan diberikan. Selama fase kritis dan / atau pemulihan, terapi cairan yang berlebihan dikaitkan dengan edema paru atau gagal jantung kongestif (*World Health Organization, 2009*).

2.2.4 Pemeriksaan laboratoris IVD

Pemahaman mengenai patogenesis IVD mutlak harus dikuasai untuk pemilihan parameter laboratorium dan untuk melakukan interpretasi hasil pemeriksaan laboratorium. Trombositopenia bukan merupakan satu-satunya

pendana DBD dimana sering terjadi diagnosis berlebihan DBD karena dokter klinisi hanya berpatokan pada trombositopenia. Pemeriksaan laboratorium saat ini selain darah lengkap (CBC), idealnya diikuti dengan pemeriksaan LFT yaitu SGOT dan SGPT serta pemeriksaan serologis (Aryati, 2017).

Kehadiran trombositopenia bersamaan dengan hemokonsentrasi membedakan DBD atau SSD dari penyakit lain. Jumlah trombosit normal selama fase demam awal. Penurunan ringan bisa diamati setelahnya. Penurunan jumlah trombosit secara tiba-tiba menjadi di bawah 100.000 terjadi pada akhir fase demam sebelum timbulnya syok atau penurunan demam. Tingkat jumlah trombosit berkorelasi dengan tingkat keparahan DBD. Pada SSD terdapat gangguan fungsi trombosit. Perubahan fungsi trombosit berdurasi pendek dan kembali normal selama masa pemulihan. Pasien yang sering mengobati sendiri dengan obat analgesik seperti parasetamol, NSAID, anti-emetik dan obat lain akan memperburuk fungsi hati dan trombosit (*World Health Organization*, 2011).

Jumlah sel darah putih (WBC) mungkin normal atau dengan neutrofil dominan pada awal fase demam. Penurunan jumlah sel darah putih dan neutrophil terjadi setelah awal fase demam dan mencapai titik nadir menjelang akhir fase demam. Perubahan jumlah sel putih total ($\leq 5.000 \text{ sel / mm}^3$) dan rasio neutrofil terhadap limfosit (neutrofil < limfosit) berguna untuk memprediksi periode kritis kebocoran plasma (*World Health Organization*, 2011).

Temuan prediksi periode kritis kebocoran plasma mendahului trombositopenia atau peningkatan hematokrit. Limfositosis relatif dengan

peningkatan limfosit atipikal umumnya diamati pada akhir fase demam dan menjadi sembuh serta juga terlihat pada DD (*World Health Organization*, 2011).

Hematokrit normal pada fase awal demam. Sedikit peningkatan mungkin karena demam tinggi, anoreksia dan muntah. Tiba-tiba peningkatan hematokrit diamati secara bersamaan atau segera setelah penurunan jumlah trombosit. Hemokonsentrasi atau peningkatan hematokrit sebesar 20% dari *baseline*, misalnya dari hematokrit 35% menjadi $\geq 42\%$ adalah bukti objektif kebocoran plasma (*World Health Organization*, 2011).

Trombositopenia dan hemokonsentrasi adalah temuan konstan pada DBD. Penurunan jumlah trombosit hingga di bawah 100.000 biasanya ditemukan antara hari ke-3 dan ke-10 penyakit. Peningkatan hematokrit terjadi pada semua kasus DBD, terutama pada kasus syok. Hemokonsentrasi dengan hematokrit meningkat 20% atau lebih adalah bukti objektif kebocoran plasma. Perlu dicatat bahwa tingkat hematokrit dapat dipengaruhi oleh penggantian volume awal dan oleh perdarahan (*World Health Organization*, 2011).

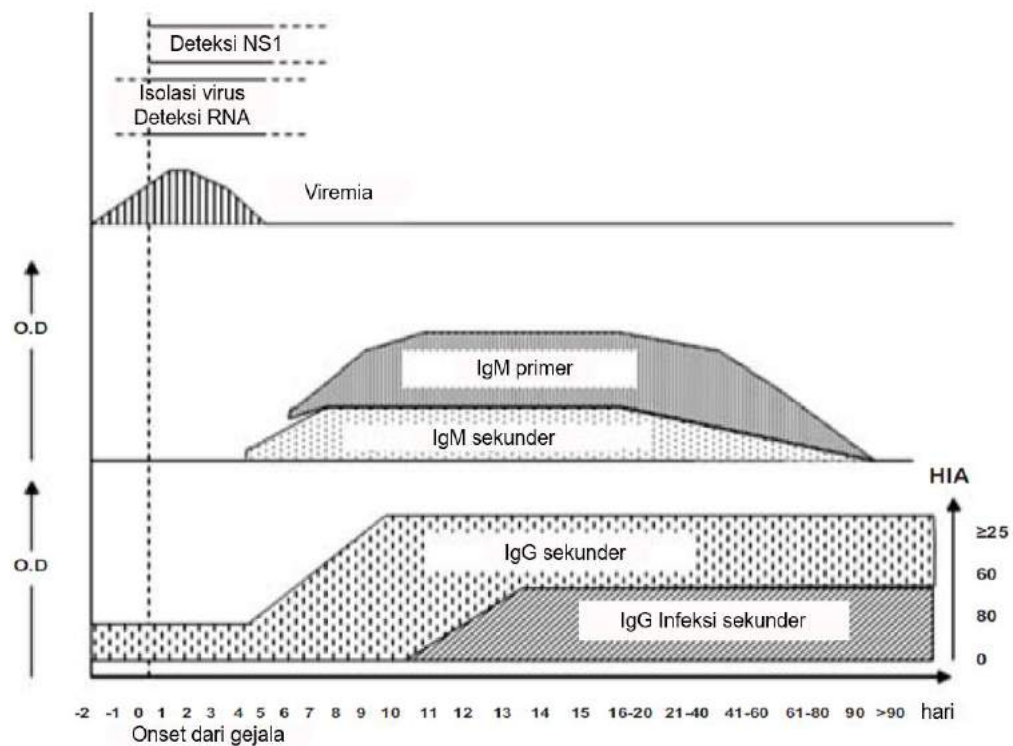
Pada pasien tanpa peningkatan hematokrit yang signifikan sebagai akibat dari perdarahan hebat dan / atau terapi cairan intravena dini, demonstrasi efusi pleura / asites menunjukkan kebocoran plasma. Hipoproteinemia / albuminaemia mendukung adanya kebocoran plasma (sebagai akibat dari kebocoran plasma). Temuan umum lainnya adalah hiponatremia. Hiponatremia sering diamati pada DBD dan lebih parah pada syok. Hipokalsemia (dikoreksi untuk hypoalbuminemia) telah diamati pada semua kasus DBD, kadarnya lebih rendah pada DBD derajat III dan DBD derajat IV. Asidosis metabolik sering ditemukan

pada kasus dengan syok berkepanjangan. Nitrogen urea darah (BUN) meningkat pada syok yang berkepanjangan. Kadar aspartat aminotransferase serum sedikit meningkat (≤ 200 U / L) dengan rasio SGOT:SGPT > 2 . Albuminuria ringan sementara terkadang dapat ditemukan. Perdarahan tersembunyi (*ocult*) sering ditemukan dalam tinja (*World Health Organization*, 2011).

Adanya efusi pleura (rontgen dada atau ultrasonografi) adalah bukti paling objektif dari kebocoran plasma sementara hipoalbuminemia memberikan bukti pendukung. Ini sangat berguna untuk diagnosis DBD pada pasien berikut: anemia, perdarahan hebat, di mana tidak ada hematokrit awal, peningkatan hematokrit $< 20\%$ karena terapi intravena awal (*World Health Organization*, 2011).

Pemeriksaan laboratorium berikut yang tersedia untuk diagnosis konfirmasi demam dengue (DD) dan demam berdarah dengue (DBD): isolasi virus/ deteksi virus (karakterisasi serotipe / genotipe), deteksi asam nukleat virus, deteksi antigen virus, uji berbasis respons imunologis (uji antibodi IgM dan IgG), serta analisis untuk parameter hematologis (*World Health Organization*, 2011).

Periode viremia IVD pada pasien sangat pendek, biasanya terjadi 2-3 hari sebelum timbulnya demam dan demam berlangsung selama 4-7 hari. Selama periode ini DENV, asam nukleat dan antigen virus yang bersirkulasi dapat dideteksi (*World Health Organization*, 2011). Setelah onset IVD, virus dapat terdeteksi dalam serum, plasma, sirkulasi darah dan jaringan lain selama 4-5 hari. Respon antibodi terhadap IVD dapat berbeda antar individu karena dipengaruhi oleh status imun pejamu (Aryati, 2017).



Gambar 2.11 Perkiraan *timeline* dan metode diagnostik untuk mendeteksi infeksi primer dan sekunder (World Health Organization, 2011).

Isolasi virus, asam nukleat atau deteksi antigen dapat digunakan untuk mendiagnosis infeksi selama fase dini penyakit (hingga enam hari sejak onset penyakit). Pada akhir fase akut IVD, metode serologi merupakan pilihan diagnosis. IVD pada penderita yang tidak memiliki riwayat terinfeksi DENV sebelumnya atau mendapatkan imunisasi vaksin *Flavivirus*, penderita tersebut memiliki respon antibodi primer yang ditandai dengan peningkatan antibodi spesifik secara lambat (Aryati, 2017).

Respon antibodi terhadap infeksi terdiri dari munculnya berbagai jenis imunoglobulin; dan isotype imunoglobulin IgM dan IgG memiliki nilai diagnostik dalam IVD (World Health Organization, 2011). Respon antibodi IgM terhadap IVD pertama kali muncul dan terdeteksi pada 50% penderita saat hari ke-3 sampai

ke-5 onset demam, meningkat 80% pada hari ke-5 dan meningkat 99% pada hari ke-10. Titer IgM mencapai puncak 2 minggu setelah onset demam dan menurun secara perlahan selama 2-3 bulan. IgG anti dengue titer rendah pada serum dapat terdeteksi pada akhir minggu pertama dari onset demam, meningkat secara perlahan, dan masih dapat terdeteksi hingga beberapa bulan bahkan bertahan seumur hidup (Aryati, 2017). Antibodi IgM muncul lambat yaitu setelah 5 hari demam yang menyebabkan uji serologis antibodi IgM yang dilakukan selama lima hari pertama demam (manifestasi klinis) biasanya memunculkan hasil IgM negatif (*World Health Organization*, 2011).

Pada IVD sekunder (penderita pernah terinfeksi DENV sebelumnya, atau riwayat terinfeksi *Flavivirus* bukan DENV atau vaksinasi *Flavivirus* bukan DENV), antibodi akan meningkat secara cepat serta bereaksi secara luas terhadap berbagai *Flavivirus*. IgG lebih dominan pada IVD sekunder, dapat terdeteksi pada titer yang tinggi walaupun saat infeksi akut serta dapat bertahan selama 10 bulan. Pada awal fase konvalesens, titer IgM terdeteksi lebih rendah pada IVD sekunder daripada IVD primer dan pada beberapa kasus didapatkan titer IgM yang tidak terdeteksi karena tergantung dari metode uji yang digunakan. IVD primer dan sekunder dapat dibedakan berdasarkan rasio antibodi IgM/IgG (Aryati, 2017).

Konfirmasi laboratorium IVD sangat penting karena gejala klinis yang umum sehingga menyulitkan diagnosis. Metode yang tersedia untuk diagnosis IVD, isolasi virus memiliki hasil tes yang paling spesifik. Fasilitas yang dapat mendukung kultur virus jarang tersedia. Deteksi genom virus atau antigen virus juga dapat membuktikan adanya IVD. Serokonversi antibodi IgM dan IgG

merupakan standar konfirmasi IVD secara serologis. Tanda *probable* IVD yaitu adanya peningkatan serum IgM atau IgG pada pasien suspek IVD (Aryati, 2017).

Pemilihan metode diagnostik yang akan digunakan tergantung pada tujuan pemeriksaan (diagnosis klinis, survei epidemiologi, pengembangan vaksin), fasilitas peralatan dan tenaga laboratorium yang tersedia, biaya pemeriksaan dan waktu pengumpulan sampel (*World Health Organization*, 2011). Keuntungan *rapid test* adalah pengerjaannya mudah dengan hasil yang cepat dibandingkan metode ELISA. Sensitivitas dan spesifitas diagnostik dan setiap *rapid test* komersial perlu diperhatikan berdasarkan aspek *confidence level* (Aryati, 2017).

2.2.5 Komplikasi infeksi DENV

DD dengan perdarahan dapat terjadi sehubungan dengan penyakit yang mendasarinya seperti tukak lambung, trombositopenia berat dan trauma. DBD bukan merupakan kelanjutan dari DD (*World Health Organization*, 2011).

Komplikasi DBD terjadi biasanya dalam kaitannya dengan syok yang dalam / berkepanjangan yang menyebabkan asidosis metabolik dan perdarahan hebat sebagai akibat DIC dan kegagalan multiorgan seperti disfungsi hati dan ginjal. Komplikasi DBD yang sering terjadi yaitu efusi pleura masif yang dapat terjadi saat pemberian cairan yang berlebihan selama periode kebocoran plasma. Efusi pleura menyebabkan gangguan pernapasan, kongesti paru akut dan/ atau gagal jantung. Terapi cairan lanjutan setelah periode kebocoran plasma akan menyebabkan edema paru akut atau gagal jantung, terutama ketika ada reabsorpsi cairan ekstrasvasasi (*World Health Organization*, 2011).

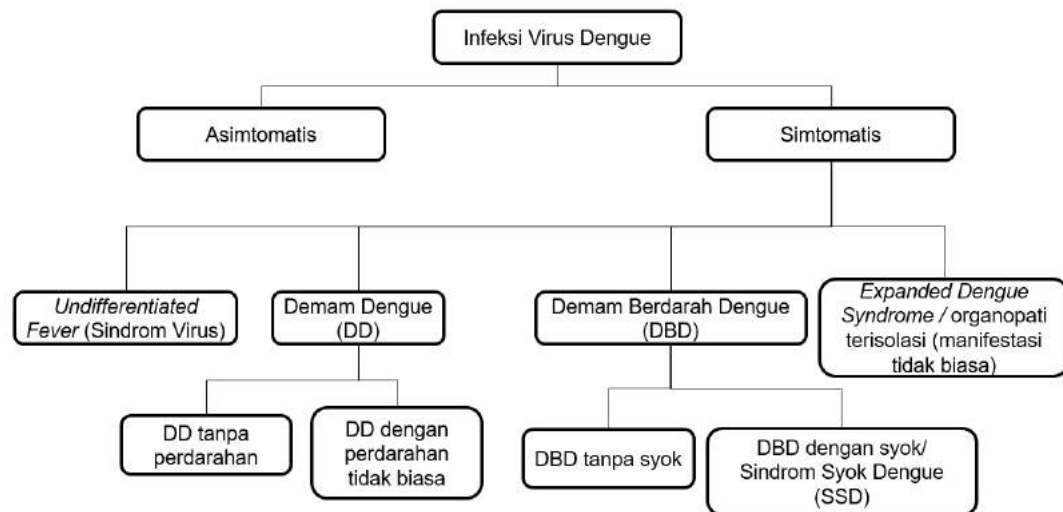
Syok profundus atau syok berkepanjangan dan terapi cairan yang tidak tepat dapat menyebabkan gangguan metabolisme dan elektrolit. Kelainan metabolik sering ditemukan sebagai hipoglikemia, hiponatremia, hipokalsemia dan terkadang hiperglikemia. Gangguan metabolik ini dapat menyebabkan berbagai manifestasi yang tidak biasa, misalnya; ensefalopati (*World Health Organization*, 2011).

2.3 Tingkat Keparahan IVD

Manifestasi klinis akibat IVD sangat bervariasi dan yang ditakutkan yaitu DBD atau SSD. Di masyarakat masih sering terjadi kerancuan antara istilah IVD dengan DBD. Menurut *guideline* WHO 2009, klasifikasi IVD akan berubah menjadi dengue tanpa *warning signs*, dengue dengan *warning signs*, dan *severe* dengue. Klasifikasi IVD WHO 2009 disebabkan karena bervariasinya klinis dan hasil laboratoris hasil IVD di lapangan, sehingga menyulitkan tatalaksana atau manajemen DBD. WHO 2011 tidak lagi membedakan dengue tanpa *warning signs*, dengue dengan *warning signs*, dan *severe* dengue, namun mirip WHO 1997 hanya ditambah *expdaned* dengue *syndrome* (Aryati, 2017).

Manifestasi demam pada IVD didefinisikan sebagai kenaikan suhu tubuh biasanya suhu berada diantara 39 °C dan 40 °C, dan demam bersifat bifasik, berlangsung 5-7 hari pada sebagian besar kasus. Manifestasi ruam pada IVD berupa erupsi kemerahan atau *flushing* yang difus dapat diamati pada wajah, leher, dan dada selama dua atau tiga hari pertama, dan ruam mencolok yang mungkin berupa makulopapular atau *rubelliform* muncul pada sekitar hari ketiga atau keempat. Menjelang akhir periode demam atau segera setelah periode defervesens,

ruam umum memudar dan kelompok petekie lokal dapat muncul di atas dorsum kaki, di kaki, dan di tangan dan lengan. Ruam saat masa penyembuhan (konvalesens) ditandai dengan petekia konfluen di sekitar area kulit normal yang pucat dan tersebar. Gatal pada kulit juga sering muncul sebagai manifestasi (*World Health Organization*, 2011).



Gambar 2.12 Manifestasi klinis IVD (*World Health Organization*, 2011).

Manifestasi hemoragik yaitu manifestasi perdarahan pada kulit dapat dilihat pada tes torniket positif dan/ atau petekie. Pendarahan lain seperti epistaksis masif, hipermenore dan perdarahan gastrointestinal jarang terjadi pada DD dengan komplikasi trombositopenia (*World Health Organization*, 2011). Tingkat keparahan IVD adalah suatu istilah yang menggambarkan variasi manifestasi klinis dan laboratoris yang dihasilkan IVD (*World Health Organization*, 2011). IVD merupakan penyakit sistemik dan dinamis dengan spektrum klinis yang luas (Back dan Lundkvist, 2013). IVD dapat menimbulkan berbagai manifestasi, yaitu asimtomatik dan simtomatik. Manifestasi simtomatik dapat berupa demam non spesifik karena dengue atau *Undifferentiated fever* (sindrom virus), DD, DBD

termasuk SSD dan *expdaned* dengue *syndrome*. DD dan bentuknya yang parah yaitu DBD dan SSD telah menjadi masalah utama kesehatan masyarakat dunia (*World Health Organization*, 2011).

Manifestasi klinis dan tingkat keparahan IVD dipengaruhi oleh beberapa faktor risiko yaitu *strain* virus (serotipe dan genotipe) dan beberapa faktor dari pejamu (usia, latar belakang genetik pejamu, status imunitas (infeksi sekunder oleh serotipe heterolog), dan predisposisi genetik) (*World Health Organization*, 2011; Back dan Lundkvist, 2013).

Interaksi yang kompleks dari faktor-faktor risiko untuk IVD yang parah dapat diilustrasikan sebagai interaksi segitiga yang didominasi oleh tiga faktor risiko utama yaitu faktor pejamu, antibodi spesifik DENV yang sudah ada sebelumnya yang memediasi ADE, dan fitur virus intrinsik yang mempengaruhi virulensi strain. Kontribusi tepat dari setiap faktor risiko dapat bervariasi dari satu kasus ke kasus (Back dan Lundkvist, 2013).

Persentase DBD pada orang dewasa secara umum lebih rendah daripada anak-anak. Orang dewasa dengan DBD memiliki perjalanan penyakit yang serupa dengan pada anak-anak. Beberapa penelitian menyebutkan kebocoran plasma yang kurang parah terjadi pada pasien dewasa. Beberapa negara sebagian besar kematian terlihat pada orang dewasa disebabkan oleh karena terlambatnya pengenalan DBD/ syok dan terlambatnya pemberian transfusi darah sehingga insiden perdarahan pada pasien dewasa lebih tinggi. (*World Health Organization*, 2011).

Tabel 2.4 Klasifikasi dan tingkat keparahan IVD menurut WHO (*World Health Organization, 2011*).

Tingkat Keparahan IVD		Tanda dan Gejala	Hasil Pemeriksaan Laboratoris
<i>Undifferentiated fever</i> (sindrom virus)		- Demam sederhana yang tidak dapat dibedakan dari infeksi virus lainnya. - Ruam makulopapular (muncul pada fase demam atau fase defervesens). - Gejala pernapasan dan pencernaan bagian atas	• Leukosit normal/ leukopenia • Trombosit normal • HCT tidak meningkat • Diagnosis terkonfirmasi: Hasil PCR positif ditemukan serotipe DENV
Demam Dengue: - DD tanpa perdarahan - DD dengan perdarahan tidak biasa		Demam diikuti dua gejala berikut: - Nyeri kepala - Nyeri Retro-orbital - Mialgia - Arthralgia - Nyeri tulang → sering pada pasien dewasa : <i>break bone fever</i> - Ruam - Manifestasi perdarahan : - Torniket positif - Ruam makulopapular: - ptekie, ekimosis, purpura - Anoreksia - Muntah (<i>warning sign</i>) - Nyeri perut (<i>warning sign</i>) - Lemas - Dingin/anyep/mengigil - Hepatomegali - Peningkatan permeabilitas vaskular - Tidak ada bukti kebocoran / kehilangan plasma	• Leukopenia (WBC ≤ 5.000 sel/mm³). • Trombositopenia (<i>Platelet count</i> < 150.000 sel/mm³).
DBD	I (DBD tanpa syok)	Demam dan manifestasi perdarahan (tes torniket positif) dan Ada bukti kebocoran plasma: 1. Hemokonsentrasi peningkatan HCT $\geq 20\%$ dari <i>baseline</i> atau penurunan HCT $\geq 20\%$ sesudah terapi cairan. hemokonsentrasi dapat tidak ditemukan jika terjadi perdarahan masif dan terapi cairan intravena sejak dini. 2. Hipoperfusi 3. Efusi pleura (Foto rontgen thoraks AP) (Bukti paling objektif) 4. Asites (USG abdomen) (Bukti paling objektif) 5. Hipoalbuminemia (Bukti pendukung)	• Trombositopenia < 100.000 sel/mm³ • Peningkatan HCT $\geq 20\%$
DBD	II (DBD tanpa syok)	Sama seperti derajat I ditambah perdarahan spontan: - epistaksis masif - melena/BAB hitam - hipermenore - perdarahan gusi	• Trombositopenia < 100.000 sel/mm³ → Koagulopati • Peningkatan HCT $\geq 20\%$

DBD	III (DBD dengan syok/SSD)	Sama seperti derajat I atau II ditambah kegagalan sirkulasi akibat syok hipovolemik: - hipotensi (sesuai usia) - takikardi (sesuai usia) - nadi lemah - tekanan sistol dan diastol yang sempit (≤ 20 mmHg. Contoh: 100/80mmhg) - kegelisahan - ekstremitas dingin	• Trombositopenia <100.000 sel/mm³ • Peningkatan HCT $\geq 20\%$
DBD	IV (DBD dengan syok/SSD)	Sama seperti derajat III ditambah keadaan syok profundus = syok berkepanjangan: - tekanan darah tidak terdeteksi. - denyut nadi tidak terdeteksi.	• Trombositopenia <100.000 sel/mm³ • Peningkatan HCT $\geq 20\%$ • Gangguan elektrolit = asidosis metabolik • BUN meningkat
<i>Expanded Dengue Syndrome</i>	Organopati terisolasi atau IVD dengan manifestasi tidak biasa	Manifestasi IVD diatas ditambah keterlibatan organ lain: - Otak : kejang-kejang, perubahan kesadaran, transien paresis (kekuatan otot lemah sesaat/waktu tertentu) - Jantung - Hati - ginjal	• Trombositopenia <100.000 sel/mm³ • Peningkatan HCT $\geq 20\%$ • Gangguan elektrolit = asidosis metabolik • BUN, serum kreatinin meningkat • SGOT dan SGPT meningkat • Kelainan elektromedis: CT Scan kepala tanpa kontras abnormal atau EKG abnormal.

Faktor pejamu berikut berkontribusi pada penyakit IVD yang lebih parah dan komplikasinya: bayi dan orang tua, obesitas, wanita hamil, penyakit ulkus peptikum, wanita yang mengalami menstruasi atau perdarahan vagina abnormal, penyakit hemolitik (defisiensi glukosa-6-fosfatase dehidrogenase (G6PD), talasemia, dan hemoglobinopati lain), penyakit jantung bawaan, penyakit kronis (diabetes mellitus, hipertensi, asma, penyakit jantung iskemik, gagal ginjal kronis, sirosis hati), pasien yang menjalani pengobatan steroid atau NSAID (*World Health Organization*, 2011).

Serotipe DENV juga sangat mempengaruhi manifestasi klinis dan *outcome* penyakit. Virulensi DENV berperan sebagai salah satu faktor risiko penting IVD yang parah (Back dan Lundkvist, 2013). Keempat serotipe DENV dengan epidemi

IVD (dengan atau tanpa DBD) telah banyak diasosiasikan dengan tingkat keparahan yang berbeda-beda (*World Health Organization*, 2011).

Strain DENV yang berhubungan dengan IVD yang parah (DBD / SSD) lebih dapat lolos dari antibodi netralisasi (Back dan Lundkvist, 2013). Strain DENV ADE dapat menghasilkan badai sitokin. Badai sitokin diakhir proses selalu menargetkan endotel pembuluh darah, trombosit dan berbagai organ yang mengarah ke vaskulopati dan koagulopati yang bertanggung jawab untuk perkembangan perdarahan dan syok (*World Health Organization*, 2015).

Strain DENV yang virulen (sangat pathogen) akan menghasilkan lebih banyak virus per sel karena mampu meningkatkan kemampuan mereplikasi di sel target utama pada manusia seperti makrofag dan sel dendritik, serta menghasilkan viremia dan respons inflamasi yang lebih tinggi, dibandingkan dengan strain yang kurang patogen (Back dan Lundkvist, 2013).

Penderita yang terinfeksi oleh DEN-1 lebih jarang berkembang menjadi bentuk IVD yang parah. Kebocoran plasma pada infeksi DEN-1 jarang terlihat. DEN-1 dikaitkan dengan manifestasi hemoragik yang lebih ringan (Vicente *et al.*, 2016). Berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan Soegijanto *et al.* yang menyatakan bahwa serotipe DEN-1 lebih menunjukkan penyakit IVD yang lebih parah yaitu SSD dengan infeksi primer (Soegijanto *et al.*, 2012).

Manifestasi klinis IVD lebih ringan disebabkan karena DEN-4. Pada penelitian yang telah banyak dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa kasus yang disebabkan DEN-2 dan DEN-3 dapat menampilkan manifestasi klinis IVD

lebih parah dibandingkan dengan serotipe lainnya (Balmaseda *et al.*, 2006; Soegijanto *et al.*, 2015).

Kasus IVD oleh serotipe DEN-2 memiliki proporsi yang lebih tinggi pada IVD yang parah dibandingkan serotipe yang lainnya. Mekanisme yang terlibat dalam virulensi DEN-2 masih belum jelas (Vicente *et al.*, 2016). Salah satu mekanisme virulensi adalah efek stimulasi DEN-2 pada produksi oksida nitrat (NO). DEN-2 menginduksi produksi NO tertinggi diantara serotipe lainnya. Produksi NO yang tinggi menyebabkan efek toksik dan inflamasi pada proses respon imun, serta menginduksi apoptosis dalam sel pejamu (Valero *et al.*, 2013). Mekanisme virulensi lain yang bertanggung jawab pada peningkatan patogenisitas DEN-2 adalah replikasi virus yang lebih cepat dan efisien dibandingkan dengan serotipe yang lainnya. Sebagai akibatnya, infeksi DEN-2 menunjukkan *viral load* yang lebih cepat tinggi (Vicente *et al.*, 2016).

Vaughn *et al.* (2000) menyatakan bahwa variasi dari tingkat keparahan berhubungan dengan serotipe DENV. Hasil penelitian Vaughn *et al.* (2000) menyatakan bahwa penderita dengan infeksi DEN-2 lebih cenderung menunjukkan manifestasi DBD (66%) atau mengalami IVD yang lebih parah daripada serotipe virus lain (Vaughn *et al.*, 2000).

Hariadhi (2005) melakukan penelitian mengenai pola distribusi serotipe DENV di daerah Jember, Jawa Timur dan melakukan analisis hubungan serotipe tersebut terhadap tingkat keparahan penyakit IVD. Hasil penelitian Hariadhi (2005) pada 31 pasien suspek IVD di Jember menunjukkan hanya 6 pasien dapat dideteksi serotipe DENV yang seluruhnya adalah serotipe DEN-2 (100%) dengan

mayoritas diagnosis klinis penderita menggunakan kriteria WHO 1997 adalah DBD derajat II (76,7%). Hasil analisis statistik penelitian Hariadhi (2005) menunjukkan tidak didapatkan hubungan signifikan antara hasil pemeriksaan klinis dan serotipe DENV pada penderita IVD (Hariadhi, 2005).

Bayi, anak-anak dan orang dewasa yang telah terinfeksi infeksi primer DENV dapat mengalami demam sederhana yang tidak dapat dibedakan dari infeksi virus lainnya yang disebut *undifferentiated fever*. Gejala pernapasan dan pencernaan bagian atas merupakan manifestasi yang umum terjadi pada *undifferentiated fever* (World Health Organization, 2011).

DD paling sering terjadi pada anak-anak dengan usia yang lebih tua, remaja dan orang dewasa. DD merupakan penyakit demam akut tipe bifasik dengan nyeri kepala berat, mialgia, arthralgia, ruam, leukopenia dan trombositopenia. DD biasanya tidak bersifat parah, tetapi bisa menjadi penyakit dengan manifestasi yang tidak tertahankan. Orang dewasa dengan DD memiliki manifestasi yang lebih parah seperti nyeri sangat pada kepala dan otot, nyeri sendi dan nyeri tulang (*break-bone fever*) dibandingkan dengan anak-anak. Depresi, insomnia, dan kelelahan pasca infeksi dapat menyebabkan masa pemulihan lebih lama. Sinus bradikardia dan aritmia selama masa pemulihan lebih sering terjadi pada orang dewasa daripada anak-anak (World Health Organization, 2011).

Perdarahan yang tidak biasa kadang terjadi pada IVD seperti perdarahan saluran cerna, hipermenore dan epistaksis masif. Gejala dan tanda-tanda DD sangat bervariasi dalam frekuensi dan tingkat keparahan. *Outbreak* DD jarang

terjadi di antara masyarakat yang tinggal di daerah endemik DD (*World Health Organization*, 2011).

Diagnosis DD (*probable*) yaitu demam akut dengan dua atau lebih dari yang berikut: nyeri kepala, nyeri retro-orbital, mialgia, artralgia / nyeri tulang, ruam, manifestasi hemoragik, leukopenia ($WBC \leq 5000 \text{ sel / mm}^3$), trombositopenia (jumlah trombosit $< 150.000 \text{ sel / mm}^3$), meningkatnya hematokrit (5 - 10%); dan paling tidak satu dari yang berikut: serologi suportif pada sampel serum tunggal: titer ≥ 1.280 dengan uji penghambatan hemaglutinasi, titer IgG yang sebanding dengan *enzyme-linked immunosorbent assay*, atau positif dalam tes antibodi IgM, dan kejadian di lokasi dan waktu yang sama seperti kasus DD yang dikonfirmasi (*confirmed cases*) (*World Health Organization*, 2011).

Diagnosis DD (*confirmed*) yaitu kasus IVD (*probable*) dengan setidaknya satu dari yang berikut: isolasi DENV dari serum, cairan serebrospinal atau sampel otopsi; peningkatan empat kali lipat atau lebih besar dalam serum IgG (dengan uji penghambatan hemaglutinasi) atau peningkatan antibodi IgM khusus untuk DENV, deteksi DENV atau antigen dalam jaringan, serum atau cairan serebrospinal oleh imunohistokimia, imunofluoresensi atau *enzyme-linked immunosorbent assay*; deteksi urutan genom DENV dengan *reverse transcription-polymerase chain reaction* (*World Health Organization*, 2011).

Diagnosis DBD yaitu hasil tes torniket positif dan leukopenia ($WBC \leq 5000 \text{ sel / mm}^3$) sangat membantu dalam membuat diagnosis dini IVD dengan nilai prediksi positif 70% -80% di daerah endemik IVD. DBD lebih sering terjadi pada anak-anak di bawah usia 15 tahun di daerah hiperendemis, terkait dengan IVD

berulang. Insiden DBD pada orang dewasa meningkat. DBD ditandai dengan onset akut demam tinggi dan dikaitkan dengan tanda-tanda dan gejala yang mirip dengan DD pada fase demam awal. Ada diatesis perdarahan umum seperti tes torniket positif, petekie, mudah memar dan/ atau pendarahan saluran pencernaan pada kasus yang parah. Pada akhir fase demam, ada kecenderungan untuk mengembangkan syok hipovolemik (SSD) karena kebocoran plasma (*World Health Organization*, 2011).

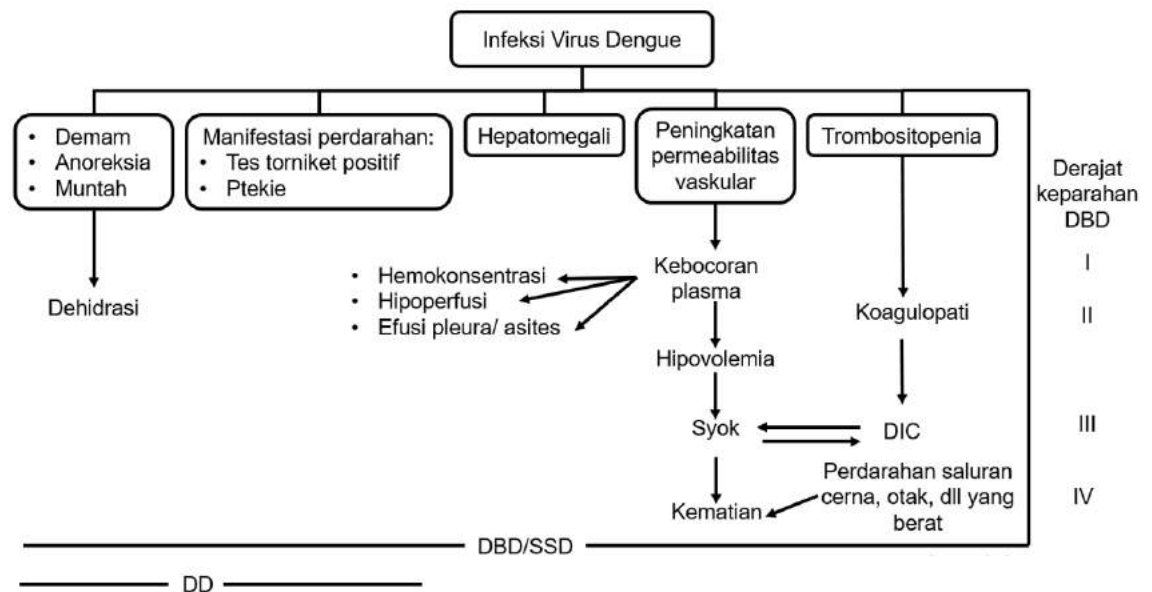
Diagnosis DBD yaitu semua kriteria yang disebutkan berikut: demam tinggi, onset akut, dan terus menerus selama dua sampai tujuh hari; didapatkan manifestasi perdarahan, ditunjukkan oleh salah satu dari yang berikut: tes torniket positif (yang paling umum), petekie; ekimosis atau purpura (di lokasi *venopunctura*), atau perdarahan dari mukosa (perdarahan gusi), perdarahan dari saluran pencernaan (hematemesis dan/ atau melena), perdarahan tempat suntikan atau lokasi lain; jumlah trombosit ≤ 100.000 sel / mm³; bukti objektif kebocoran plasma akibat peningkatan permeabilitas pembuluh darah (*World Health Organization*, 2011).

Bukti objektif kebocoran plasma ditunjukkan oleh salah satu dari berikut ini yaitu hemokonsentrasi (peningkatan hematokrit $\geq 20\%$ dari baseline pasien atau populasi pada usia yang sama atau penurunan hematokrit 20% sesudah terapi cairan), atau bukti kebocoran plasma seperti efusi pleura, asites atau hipoproteinemia/ hipoalbuminaemia. Pembesaran hati (hepatomegali) diamati pada beberapa tahap penyakit pada 90%-98% anak-anak. Frekuensi bervariasi dengan waktu dan/ atau pengamat (*World Health Organization*, 2011).

Manifestasi demam dan perdarahan, ditambah trombositopenia dan hemokonsentrasi atau peningkatan hematokrit, cukup untuk menegaskan diagnosis klinis DBD. Kehadiran pembesaran hati disamping dua kriteria klinis pertama merupakan tanda sugestif dari DBD sebelum timbulnya kebocoran plasma (*World Health Organization*, 2011).

Diagnosis SSD yaitu kriteria untuk DBD diikuti dengan tanda-tanda syok termasuk: takikardia, ekstremitas dingin, pengisian kapiler tertunda, denyut nadi lemah (perfusi jaringan yang buruk), lesu, kulit lembab dan/ atau gelisah, yang mungkin merupakan tanda berkurangnya perfusi otak; tekanan nadi ≤ 20 mmHg dengan peningkatan tekanan diastolik, contoh: 100/80 mmHg; hipotensi berdasarkan usia, didefinisikan sebagai tekanan sistolik < 80 mmHg untuk mereka yang berusia < 5 tahun atau 80 hingga 90 mmHg untuk anak-anak yang lebih tua dan orang dewasa (*World Health Organization*, 2011).

Expanded dengue syndrome adalah manifestasi yang tidak biasa atau atipikal dari pasien dengan keterlibatan organ yang parah seperti hati, ginjal, otak atau jantung yang berhubungan dengan IVD semakin banyak dilaporkan pada DBD dan juga pada pasien IVD yang tidak memiliki bukti kebocoran plasma. *Expanded dengue syndrome* termasuk manifestasi yang jarang terjadi (*World Health Organization*, 2011).



Gambar 2.13 Manifestasi utama dan perubahan patofisiologis IVD (*World Health Organization*, 2011).

2.4 Pemeriksaan molekuler DENV

Pemeriksaan molekuler DENV digunakan untuk deteksi asam nukleat DENV. Genom DENV yang terdiri dari asam ribonukleat (RNA), dapat dideteksi dengan *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). RNA DENV sangat labil (tidak stabil) terhadap panas sehingga spesimen untuk deteksi asam nukleat harus dikendalikan dan disimpan sesuai dengan prosedur yang dijelaskan untuk isolasi virus (*World Health Organization*, 2011).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik biologi molekuler yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan kopi sekuen DNA. Teknik PCR menggunakan metode enzimatis yang diperantarai primer. Prinsip dasar PCR adalah sekuen DNA spesifik diamplifikasi menjadi dua kopi selanjutnya menjadi empat kopi dan seterusnya. Pelipat gndanaan pada PCR membutuhkan enzim spesifik yang dikenal dengan polimerase.

Polimerase adalah enzim yang mampu menggabungkan DNA cetakan tunggal, membentuk untaian molekul DNA yang panjang. Enzim ini membutuhkan primer serta DNA cetakan seperti nukleotida yang terdiri dari empat basa yaitu Adenine (A), Thymine (T), Cytosine (C) dan Guanine (G) (Gibbs, 1990).

Reaksi amplifikasi PCR dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan yang berantai ganda menjadi rantai tunggal, kemudian suhu diturunkan sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada DNA cetakan yang berantai tunggal. Setelah proses *annealing*, suhu dinaikkan kembali sehingga enzim polimerase melakukan proses polimerase rantai DNA yang baru. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya sebagai cetakan bagi reaksi polimerase berikutnya (Hewajuli dan Dharmayanti, 2014).

Metode PCR dibedakan menjadi dua yaitu PCR konvensional dan *real time* PCR. Analisis hasil amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional dilakukan dengan visualisasi di agar elektroforesis. Jumlah DNA yang diamplifikasi dapat dideteksi dan diukur di setiap siklus proses PCR pada *real time* PCR (Hewajuli dan Dharmayanti, 2014).

Kedua prosedur PCR konvensional dan *real time* PCR dimulai dengan isolasi RNA atau DNA dilanjutkan dengan karakterisasi terhadap kemurniannya. Sampel RNA murni diawali dengan tahap *reverse transcriptase* tetapi tahap ini tidak dilakukan apabila sampel berupa DNA murni. Jumlah amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional divisualisasikan dengan menggunakan agar elektroforesis. Penandaan fragmen DNA dengan fluorescent dye dan intensitas pita DNA dapat diukur dengan menggunakan mesin digital densitometri. Hal ini

berbeda pada *real time* PCR, jumlah DNA diukur di setiap siklus proses amplifikasi PCR terutama pada fase eksponensial. Deteksi akumulasi amplifikasi DNA pada PCR *real time* menggunakan probe DNA fluoresen. Walaupun demikian, analisis data hasil kedua prosedur tersebut baik PCR konvensional maupun *real time* memerlukan normalisasi data terhadap acuan yang diketahui untuk menentukan kualitas awal ekspresi target gen (Fraga *et al.*, 2008).

2.4.1 RT-PCR Konvensional

Semua pemeriksaan deteksi asam nukleat termasuk RT-PCR konvensional melibatkan tiga langkah dasar: (i) ekstraksi dan pemurnian (purifikasi) asam nukleat; (ii) amplifikasi asam nukleat; dan (iii) deteksi produk yang teramplifikasi. Hasil positif palsu dapat terjadi, dan ini dapat dicegah dengan isolasi yang tepat dari langkah-langkah pengujian yang berbeda dan mengobservasi ketat prosedur dekontaminasi (World Health Organization, 2011).

2.4.2 *Real time* RT-PCR

Pemeriksaan *real time* RT-PCR merupakan sistem pemeriksaan satu langkah menggunakan pasangan primer dan probe yang spesifik untuk setiap serotipe DENV. Penggunaan probe berfluoresens memungkinkan deteksi produk reaksi secara *real time*, pada mesin PCR khusus, tanpa perlu elektroforesis. Pemeriksaan *real time* RT-PCR dapat berupa “*singleplex*” (mendeteksi hanya satu serotipe pada satu waktu) atau “*multiplex*” (mampu mengidentifikasi keempat serotipe dari satu sampel tunggal). Pemeriksaan *Real-Time* RT-PCR menawarkan manfaat yang sangat tinggi dan karenanya sangat berguna untuk surveilans skala besar (World Health Organization, 2011).

Metode *real-time* RT-PCR telah dikembangkan untuk mendeteksi DENV dalam darah pasien. Deteksi RNA DENV dengan reverse transcriptase PCR (RT-PCR) dalam sampel serum manusia sangat dapat menunjukkan DD akut. DENV dapat dideteksi dalam darah (serum) dari pasien selama kira-kira 5 hari pertama gejala (*Focus Diagnostics*, 2012). *Real-time* PCR dapat lebih sedikit memakan waktu dibandingkan *nested* RT-PCR. *Real-time* PCR juga lebih sederhana dan cocok untuk tes konfirmasi cepat infeksi DENV di laboratorium rujukan (Sasmono *et al.*, 2014).

Terdapat beberapa macam alat dan kit *Real-time* PCR yang sering digunakan di Indonesia seperti *Focus Diagnostics SimplexaTM real-time RT-PCR*, *SYBR Green real-time RT-PCR*, *abTESTM DEN 4 qPCR II Kit*, dan sebagainya (*Focus Diagnostics*, 2012; Saengsawang *et al.*, 2014; Sasmono *et al.*, 2014). Sasmono *et al.* (2014) menunjukkan bahwa tingkat deteksi *focus diagnostics SimplexaTM real-time RT-PCR* yang lebih tinggi, cepat, akurat dan cocok dibandingkan dengan *real-time* RT-PCR konvensional dan *SYBR green real-time RT-PCR* untuk uji diagnostik rutin dan surveilans IVD di Indonesia (Sasmono *et al.*, 2014).

Penelitian Saengsawang *et al.*, 2014 yang mengevaluasi dan membandingkan performa dua pemeriksaan *real-time* RT-PCR menggunakan *nested reverse transcription* (RT)-PCR sebagai metode referensi. Dari 117 hasil pemeriksaan positif *nested* RT-PCR, pemeriksaan dengan kit *abTES DEN 5 qPCR* kit mampu mendeteksi 97.4% dari infeksi DENV, sedangkan kit *innuDETECT Dengue TwoStep* hanya mampu mendeteksi sebesar 44.4%. sensitifitas bervariasi

disebabkan oleh serotipe yang menginfeksi dan stadium dari infeksi. Kit *abTES* dapat berpotensi menggantikan *nested* RT-PCR sebagai pemeriksaan *rapid* diagnosis dari IVD. Pemeriksaan menggunakan kit *abTES* lebih sensitive daripada menggunakan kit *innu-DETECT* assay dan membutuhkan waktu lebih cepat daripada *nested* RT-PCR, menyediakan diagnostik cepat untuk IVD yang dapat membantu saat situasi klinis urgen atau saat terjadi *outbreak* IVD (Saengsawang *et al.*, 2014).

Kit *abTES*™ DEN 4 qPCR II adalah kit multiplex real-time polymerase chain reaction (qPCR) yang digunakan untuk mendeteksi secara simultan DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4 dalam satu tabung reaksi. Kit *abTES*™ DEN 4 qPCR II berisi semua reagen PCR yang diperlukan untuk deteksi empat serotipe RNA DENV secara cepat dan sensitif menggunakan pasangan primer yang sangat spesifik dan *double-dye hydrolysis probes*. Kit *abTES*™ DEN 4 qPCR II mengadopsi satu sistem tabung dan jenis sampel manusia yang direkomendasikan adalah serum dan plasma. Kontrol internal (IC) juga disediakan untuk memeriksa kemungkinan adanya inhibisi dalam proses PCR (AITbiotech, 2018).

Pengujian *real time* RT-PCR menggunakan *abTES*™ DEN 4 qPCR II mengamplifikasi empat target wilayah spesifik serotipe untuk desain primer / probe yang sebagian besar berasal dari *region* yang paling dilestarikan seperti 5'UTR, atau NS1-5. AITbiotech tidak mempublikasikan data mereka secara spesifik untuk sumber referensi (AITbiotech, 2018).

Kondisi proses siklus *real time* RT-PCR ditetapkan dan divalidasi pada mesin ABI 7500/7500 Fast. Fluoresensi yang digunakan untuk pendana yaitu

channel Cy5 (DEN-1), FAM (DEN-2), Texas Red (DEN-3), TAMRA (DEN-4) dan VIC (IC). Beberapa *channel* tersebut harus dipilih dan fluoresensi diukur pada fase *annealing* dari setiap siklus. Sampel akan diinterpretasikan memiliki hasil positif jika sinyal amplifikasi terdeteksi di fluoresensi masing-masing *channel*. Hasilnya dianggap *true* negatif untuk DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4 jika *channel* CY5, FAM, Texas Red, TAMRA negatif dan *channel* VIC positif sebagai kontrol internal reaksi (AITbiotech, 2018).

Sensitivitas dan spesifisitas diagnostik kit abTES™ DEN 4 qPCR II dievaluasi menggunakan 177 sampel klinis adalah DENV-1 (100% dan 100%), DENV-2 (95,1% dan 97,8%), DENV-3 (93,9% dan 96,5%), DENV-4 (92,3% dan 100%) (AITbiotech, 2018). Pemeriksaan *nested* RT-PCR positif, kit abTES™ DEN 4 qPCR II pada 177 kasus tersebut mendeteksi 97,4% IVD (DENV), sedangkan uji *innuDETECT Dengue TwoStep* hanya mampu mendeteksi 44,4%. Sensitivitas dapat bervariasi yang disebabkan serotipe dan tahap infeksi IVD. Kit abTES™ DEN 4 qPCR II memiliki potensi untuk menggantikan *nested* RT-PCR untuk diagnosis cepat infeksi DENV. Kit abTES™ DEN 4 qPCR II lebih sensitif daripada uji *innu-DETECT* dan kurang memakan waktu dibandingkan *nested* RT-PCR sehingga Uji abTES menyediakan diagnosis cepat infeksi DENV yang dapat membantu dalam situasi klinis yang mendesak (Saengsawang *et al.*, 2014).