

EPIDEMIOLOGI MOLEKULER VIRUS DENGUE DI INDONESIA

DISERTASI



**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Selasa
Tanggal : 28 Nopember 2006
Pukul 10.⁰⁰ WIB**

Oleh :

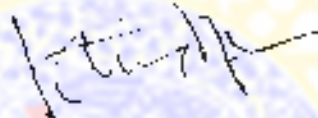
**ARYATI
NIM : 090214923D**

Lembar pengesahan

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL: 6 OKTOBER 2006**

Oleh

Promotor



Prof. Dr. Indro Handoyo, dr., SpPK(K)
NIP. 140 030 034

Ko Promotor I



Prof. Dr. Soegeng Soegijanto, dr., SpA(K), DTM&H
NIP. 140 047 022

Ko Promotor II



Prof. Soetjipto, dr., MS, PhD
NIP. 130 687 606

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Tanggal 2 Oktober 2006

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. Yoes Priyatna Dachlan, dr, MSc

Anggota : 1. Prof. Dr. Indro Handoyo, dr, SpPK(K)
2. Prof. Dr. Soegeng Soegijanto, dr, SpA(K), DTM&H
3. Prof. Dr. Soetjipto, dr, MS, PhD
4. Prof. Kuntoro, dr, MPH, Dr PH
5. Prof. Dr. Indropo Agusni, dr, SpKK(K)
6. Dr. Djoni Djunaedi, dr, SpPD-KPTI

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 7430/JO3/PP/2006
Tanggal : 5 Oktober 2006

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT, Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala Rahmat dan Karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Tanpa pertolongan Allah SWT, saya sebagai makhluk yang lemah ini yang tidak lagi memiliki semangat, tidak mungkin dapat menyelesaikan pendidikan pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Terima kasih tak terhingga serta penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada :

Prof Dr Indro Handoyo, dr, SpPK(K) yang bersedia menjadi Promotor saya, dan telah banyak memberikan perhatian, bimbingan dengan penuh kebijaksanaan dan kesabaran serta selalu membangkitkan semangat saya untuk meneruskan pendidikan doktor ini

Prof Dr Soegeng Soegijanto, dr, DTM&H, SpA(K) sebagai Ko Promotor I yang dengan penuh kesabaran telah mengembangkan wawasan dan pengetahuan tentang penyakit Demam Berdarah Dengue .

Prof Soetjipto, dr, MS, PhD sebagai Ko Promotor II yang disela-sela kesibukannya, beliau telah banyak memberi bimbingan dan arahan tentang proses penelitian di Laboratorium Hepatitis *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga di bidang Biologi Molekuler khususnya pemeriksaan PCR virus Dengue. Beliau juga tidak bosan-bosannya memberi dorongan semangat kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan doktor ini

Pemerintah Republik Indonesia melalui Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dana BPPS dalam mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Kepala Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (Ditbielitiabmas) Dikti Depdiknas RI untuk dana Hibah Pasca tahun 2003-2005 sehingga dana penelitian disertasi saya dapat terbantu.

Rektor Universitas Airlangga, **Prof Dr H Fasih, Apt.** juga mantan Rektor Universitas Airlangga, **Prof Dr Med H Perubito, dr, SpB-TKV**, atas kesempatan yang diberikan kepada saya mengikuti pendidikan Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, **Prof Dr H Muhammad Amiz, dr, SpP(K)**, yang telah memberikan kesempatan kepada saya menjadi mahasiswa Program Pascasarjana Unair serta menggunakan fasilitas untuk menyelesaikan studi Program Doktor.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga, **Prof Dr Mandojo Rukmo, drg, MSc, SpKG** dan mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran **Prof Dr Hj Juliati Hood Alsagaff, dr, MS, SpPA, FIAC**, atas perhatian, arahan, dorongan serta kemudahan dalam penyelesaian administrasi sehingga memperlancar studi saya.

Prof Retno Handayani, dr, MS, PhD sebagai konsultan penelitian untuk bidang biologi molekuler, yang sekaligus telah banyak memberikan perhatian, bimbingan dan dorongan semangat. **Dr Soetopo, drg,** pemberi dukungan dan semangat sehingga saya tergerak untuk menyelesaikan penulisan disertasi ini. **Prof Kuntoro, dr, MPH, DrPH** selaku konsultan metode penelitian dan statistik serta **Prof Dr Marsetio Donosepoetro, dr, SpPK(K)** selaku konsultan.

Prof Morita, MD dari Tropical Medicine Nagasaki University, Jepang yang memberi ijin penelitian, **Shingo Inoue, PhD** koordinator Laboratorium Virologi dan guru saya **Mohammed Alimal Islam, PhD** yang membantu penelitian saya dalam mengkultur virus Dengue, *in-house Elisa*, PCR sampai sekuensing serta teman saya **Maria Carime Parquette, PhD** yang membantu dalam menganalisis sub tipe virus Dengue. Penelitian di Jepang ini di bawah *Memorandum Of Outstanding (MOU)* antara Universitas Airlangga dengan Institute of Tropical Medicine , Nagasaki University, Jepang.

Ketua *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga, **Prof Dr Yoes Priyatna Dachlan, dr, MSc,** atas ijin penggunaan fasilitas laboratorium Hepatitis dan laboratorium Dengue di Tropical Disease Center (*TDC*) Unair untuk penelitian saya Beliau juga yang memberikan jalan agar saya melakukan analisis penelitian akhir di Nagasaki University, Jepang.

Guru dan dosen saya sejak menuntut ilmu di Sekolah Dasar, Sekolah Menengah Pertama, Sekolah Menengah Atas, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Universitas Airlangga, Fakultas Pascasarjana Universitas Airlangga, saya sampaikan penghargaan setinggi-tingginya dan terimakasih sedalam-dalamnya atas segala pendidikan dan bimbingan yang telah diberikan kepada saya. Para sejawat staf Patologi

Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas dorongan semangat untuk menyelesaikan pendidikan doktor ini.

Para pengajar Program Pascasarjana Universitas Airlangga :

Prof Dr Pitono Soeparto, dr, SpA(K) (Alm); Prof H Eddy Pranowo Soedibjo, dr, MPH (Alm) ; Prof Paromo Saryohudoyo, dr; Prof Dr H Josef Glinka SVD; Prof Dr Lasio ; H Fuad Amsyari, dr, MPH, PhD ; Prof Dr Sarmanu, drh, MS ; Prof Dr Subartono Taat Putra, dr, MS ; Siti Pariani, dr, MS, MSc, PhD ; Prof Dr L Dyson, Drs , MA ; Prof H Kuntoro, dr, MPH, Dr PH ; Prof Dr Zainuddin, Apt ; Widodo J Padjiraharjo, dr, MS, MPH ; Prof Dr Sri Sabekti, drh, MS ; Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD ; Dr Fedik Abdul Rantam, drh ; Dr Ni Made Mertaniasih, dr, MS ; Prof Soetjipto, dr, MS, PhD yang telah menambah dan meningkatkan wawasan keilmuan saya selama saya menempuh pendidikan pada Program Pascasarjana Unair.

Para dosen penguji usulan penelitian disertasi :

Prof Dr Indro Bandojo, dr, SpPK(K) : Prof Dr Soegeng Soegijanto, dr, SpA(K), DTM&H ; Prof Soetjipto, dr, MS, PhD ; Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD ; Dr Fedik Abdul Rantam, drh ; Prof H Kuntoro, dr, MPH, DrPH ; Prof Sutiman atas segala koreksi serta asupan perbaikan sehingga penelitian disertasi ini dapat diteruskan.

Ibu Koen Pujati dan saudara **Mochamad Amin, SSi** , yang telah membantu pelaksanaan penelitian di laboratorium TDC Unair, untuk pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* Dengue dan sekuensing nukleotida, **Dr Bimo Aksono, drh** dan saudara **Ali Rohman, Drs, MSi** , atas bantuannya dalam menganalisis hasil sekuensing nukleotida. **Maria Yolanda Probahoesodo, dr, SpPK(K)** yang telah membantu koreksi

bahasa Inggris *summary* dan *abstract*. Saudari **Mudjiati, SE** yang membantu mencatat pembukuan keuangan dana Hibah Pasca tahun 2003-2005

Direktur RSUD Dr Soetomo Surabaya, Direktur RSUD Dr Syaiful Anwar Malang, Direktur RSUD Dr Subandi Jember, Kepala Instalasi Patologi Klinik di RSUD Medan, **Ricke, dr, SpPK** di Medan, **Sophia, dr, SpPK** dan **Lily Kalalo, dr, SpPK** di Aceh, **Trisunu, dr, SpPK** di Batam, **Adi Soedjatmoko, dr, SpPK** di Pontianak, **Rita Dewi, dr, SpPK** di Balikpapan, **Gary, dr, SpPK** di Sampit, **Andriani, dr, SpPK** di Manado, **Meti Mokoginta, dr, SpPK** di Gorontalo, **Dharmawati, dr, SpPK** di Makasar, **Siti Nuryati, dr, SpPK** di Kendari, **Ni Nyoman Mahartini, dr, SpPK** di Jayapura, **Azizah Ariyani, dr, SpPK** di Jakarta, **Brigitte Rina Aninda, dr, SpPK** di Solo, **Umi, dr, SpPK** di Yogyakarta, **Inayanti Bisma, dr, SpPK** di Denpasar dan berbagai dokter serta berbagai pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah mengizinkan dan membantu saya dalam pengambilan sampel darah penderita Demam Berdarah Dengue yang dirawat disana.

Semua penderita yang telah bersedia berpartisipasi menjadi subyek penelitian disertasi saya, tanpa kerelaan Saudara tidak mungkin penelitian ini berhasil. Semoga budi baik Saudara mendapat kelulusan dari Allah SWT. Amin

Mitra kerja saya semua rekan di **Laboratorium Klinik Pramita Dharmawangsa** Surabaya, yang telah membantu dalam pemrosesan sampel penelitian.

Semua teman peserta Program Pascasarjana Universitas Airlangga Program Studi Ilmu Kedokteran 2002-2003 atas kerjasama, saling memberi dorongan dan motivasi. Seluruh pegawai Pascasarjana Unair, terutama Saudari **Siswati** yang telah membantu

menjembatani penyelesaian permasalahan akademik, penelitian dan ikut memberi semangat sehingga saya dapat mencapai tahap akhir.

Kedua orang tua saya Bapak Prof R Hartono, drg (Alm), Ibu Toefiasih, drg, sembah sujud saya haturkan atas segala kasih sayangnya dalam mengasuh, membesarkan dan mendidik saya serta mertua saya Bapak Karwoto dan Ibu Yayuk atas segala doa dan dukungannya. Khususnya untuk almarhum ayah saya, beliau lah yang menjadi figur teladan dan pemacu semangat saya dalam menyelesaikan pendidikan doktor ini.

Suami saya Agoes Roebianto, SE, anak pertama saya Aditya Rezananda (Dio), anak kedua saya Anindya Widyasari (Nino) yang telah mendoakan dan memberi dorongan semangat belajar. Terimakasih pada anak-anakku atas pengertian, bantuan, dorongan semangat dan doa kalian yang tulus. Untuk kalianlah, bunda menyelesaikan pendidikan doktor ini agar kalian lebih bersemangat dalam menimba ilmu.

Semua saudara kandung saya atas doa, dukungan dan motivasinya.

Akhir kata dari lubuk hati yang paling dalam saya mohonkan kepada Allah SWT semoga membalaskan budi baik semua pihak yang telah diberikan kepada saya dan melimpahkan rahmatNya kepada kita semua. Amin.

RINGKASAN

Epidemiologi molekuler banyak dikembangkan untuk mencari berbagai faktor yang diperkirakan menjadi penyebab masih terus berkembangnya prevalensi infeksi virus Dengue di seluruh belahan dunia. Sekuensing dari berbagai regio di dalam genom virus Dengue tersebut penting dilakukan untuk menentukan variasi genetik dan untuk mengkarakterisasi subtype (genotipe) di dalam masing-masing serotipenya.

Penelitian dilakukan pada 19 kota di Indonesia yang terdapat di pulau Sumatera, Batam, Kalimantan, Sulawesi, Papua, Jawa, Bali dan Lombok dari tahun 2003-2005. Pengambilan sample Demam Berdarah Dengue (DBD) dilakukan di Unit Pelaksana Fungsional (UPF) Ilmu Kesehatan Anak dan UPF Ilmu Penyakit Dalam di berbagai rumah sakit. Diagnosis DBD ditegakkan berdasarkan kriteria diagnosis menurut WHO 1997.

Pelaksanaan penelitian serologi dan PCR dikerjakan di laboratorium Dengue dan laboratorium Hepatitis Tropical Disease Center Universitas Airlangga. Pengejaan isolasi kultur virus Dengue, sekvensing DNA dan analisis filogenetik dikerjakan di Laboratorium Virologi, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Jepang. Sebanyak 525 serum penderita DBD dengan kriteria WHO, 1997 dilakukan pemeriksaan IgM dan IgG antiDengue dan didapatkan dominasi infeksi sekunder sebanyak 57,14% (300/525), sedangkan infeksi primer sebanyak 12,57 % (66/525), kondisi *equivocal* sebanyak 4,20% (22/525) dan negatif sebanyak 26,09 % (137/525).

Sejumlah 192 sampel dilakukan *serotyping* dengan metode *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* yang dilakukan di *Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga (Unair)*, terdapat dominasi DEN-2 yaitu sebanyak 65 sampel (65 %) dari 100 sampel positif PCR-nya kemudian diikuti oleh DEN-3 sebanyak 15 sampel (15 %), DEN-4 sebanyak 12 sampel (12 %) dan DEN-1 sebanyak 8 sampel (8 %). Analisis homologi dan analisis filogenetik dilakukan terhadap serotipe DEN-2 dan DEN-3 yang dominan dalam penelitian ini. Isolat dari Jawa Timur yaitu Surabaya, Malang, Pacitan, Jember terdapat homologi senada yang berkisar antara 77,4-97,5% namun terhadap Jakarta-1 dan sampel di luar Jawa (Aceh, Mataram, Batam, Gorontalo) terdapat homologi di bawah 50%. Analisis homologi untuk DEN-3 hanya terbatas pada

3 sampel yang memiliki kualitas elektroferogram yang bagus, yaitu Jayapura, Kendari dan Medan dengan nilai homologi yang cukup baik maupun terhadap referensi (Martinique, Amerika Tengah) yaitu berkisar 83,3%- 92,4% .

Analisis filogenetik terhadap serotipe DEN-2 dari berbagai sampel menemukan adanya 2 *clade* yang berbeda . *Clade* yang pertama menunjukkan sampel dari Surabaya, Malang, Jember, Pacitan, Aceh, Mataram terdapat dalam satu gugusan .*Clade* yang berikutnya terdiri dari sampel Gorontalo, Batam dan Jakarta-1 bersama dengan referensi yang dipakai pada penelitian ini yaitu Jamaica, Venezuela, Mexico dan Thailand.

Melalui proses isolasi virus dengan menggunakan C6/36 *Aedes albopictus cell monolayers* dalam *Eagle's minimal essential medium (E-MEM)* yang telah diperkaya dengan 2% *fetal calf serum (FCS)* dan kemudian dilakukan sekuensing DNA, didapatkan genotipe Cosmopolitan untuk DEN-2 di Gorontalo-2005 dan genotipe I untuk DEN-3 Jakarta-2003 .



SUMMARY

Molecular epidemiology has been developed for finding many factors that may cause the high prevalence of dengue virus infection in the world. Sequencing from various regions inside the dengue virus genome is needed for confirmation of genetic variation and characterization of genotypes in each serotype.

The DHF samples were obtained from the Department of Pediatrics and Internal Medicine from various hospitals in 19 cities of Indonesia comprising Sumatera, Batam, Kalimantan, Sulawesi, Papua, Java, Bali and Lombok from 2003-2005. The DHF diagnosis was based on the 1997 WHO diagnostic criteria.

Scrology and PCR testing were performed in the Dengue and Hepatitis Laboratory of the Tropical Disease Centre Airlangga University. Dengue virus isolation, DNA sequencing and phylogenetic analysis were done in the Virology laboratory, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki, Japan.

IgM and IgG antiDengue testing were performed on 525 DHF sera fulfilling the 1997 WHO criteria showing a majority of secondary infection 57.14% (300/525), primary infection 12.57% (66/525), equivocal 4.20% (22/525) while negative 26.09% (137/525).

Scrotyping using PCR was performed on 192 samples out of 525 sera, resulting in 100 PCR positive samples. From these, 65 samples (65%) showed a majority of DEN-2, followed by 15 samples (15%) DEN-3, 12 samples (12%) DEN-4 and 8 samples (8%) DEN-1.

Homology and phylogenetic analysis were performed to DEN-2 and DEN-3 serotypes which were dominant in this research. Samples from East Java showed similar homology ranging from 77.4% - 97.75% however, Jakarta-1 and samples from outside of Java (Aceh, Mataram, Batam, Gorontalo) showed homology less than 50%. Homology analysis to DEN-3 is limited to only three samples which showed good electropherogram quality, Jayapura, Kendari and Medan showing good homology inter-samples compared to reference (Martinique, French West Indies) ranging from 83.3% - 92.4%.

Phylogenetic analysis to DEN-2 serotype from various samples showed two different clades. The first clade was from samples of Surabaya, Malang, Jember, Pacitan,

Acch, Mataram. The other clade was from Gorontalo, Batam, Jakarta-1 together with the reference (Jamaica, Venezuela, Mexico, Thailand) used in this study.

Dengue virus isolation using C6/36 *Aedes albopictus* cell monolayers in Eagles's minimal essential medium (E-MEM) supplemented with 2% fetal calf serum (FCS) and followed by DNA sequencing, resulted in Cosmopolitan genotype for DEN-2 from Gorontalo 2005 and genotype-I for DEN-3 from Jakarta 2003.



ABSTRACT

Molecular epidemiology is needed to solve the problem for endemic Dengue Hemorrhagic Fever in Indonesia. This research has been carried out consisting of 525 Dengue Hemorrhagic Fever sera, according to the WHO criteria. These sera were collected of 19 cities in Indonesia comprising the islands of Sumatera, Batam, Kalimantan, Sulawesi, Papua, Java, Bali and Lombok from 2003 until 2005.

The immune response profile was as follows 57.14% (300/525) secondary infection, 12.57% (66/525) primary infection, 4.20% (22/525) equivocal and 26.09% (137/525) negative. From 192 PCR samples, 100 (52%) sera were positive, consisting of 65% DEN-2, 15% DEN-3, 12% DEN-4 and 8% DEN-1.

Homology analysis showed nucleotide differences in capsid region DEN-2 serotypes, while DEN-3 serotypes were relatively consistent. Phylogenetic analysis using envelope (E) gene revealed that the Cosmopolitan genotype from Gorontalo in 2005, is currently circulating locally, with the potential to cause a severe hemorrhagic disease. Members of this genotype were closely related to viruses from Malaysia, Singapore, Thailand, Philippines and Australia. The isolate from Jakarta, 2003 showed DEN-3 with genotype-I. This genotype was similar to the isolates from Indonesia 1978, 1985, and also from Thailand 1992, Philippines 1997, Fiji 1992.

These results showed that four serotypes are circulating in Indonesia but have a different distribution in each island, dominated by DEN-2, followed by DEN-3, DEN-4 and DEN-1. Cosmopolitan genotype from DEN-2 was similar to Southeast Asia countries. It was also revealed that genotype-I from DEN-3 showed no change over the years since 1978.

Keywords : DHF, DEN-2 virus, DEN-3 virus, DNA sequencing, homology analysis, phylogenetic analysis

DAFTAR ISI

	halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan.....	iv
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	xii
<i>Summary</i>	xiv
Abstrak	xvi
Daftar Isi.....	xvii
Daftar Tabel.....	xx
Daftar Gambar.....	xxi
Daftar Lampiran.....	xxiii
Daftar Singkatan.....	xxiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan masalah.....	5
1.3 Tujuan	5
1.3.1 Tujuan umum	5
1.3.2 Tujuan khusus	6
1.4 Manfaat	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Virus Dengue.....	8
2.2 Vektor.....	9
2.3 Manifestasi klinis.....	10
2.4 Immunopatogenesis.....	11
2.5 Diagnosis Klinis dan Laboratoris.....	14
2.6 Epidemiologi Molekuler	18
2.6.1 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	21
2.6.2 Sekuensing nukleotida	22
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	
Kerangka Konseptual Penelitian.....	24
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	28
4.2 Populasi, Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel.....	28
4.3 Definisi Operasional Variabel.....	29
4.4 Bahan penelitian.....	31
4.5 Instrumen Penelitian.....	36
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	37
4.7 Prosedur Pengumpulan Data	38

4.7.1 Pengumpulan sampel anak dan dewasa, sesuai kriteria WHO, 1997...	38
4.7.2 Cara Pengolahan Sampel	39
4.7.2.1 Pemeriksaan Serologis.....	39
4.7.2.2 Pemeriksaan Biologi Molekuler Tahap 1.....	46
4.7.2.2.1 Ekstraksi RNA.....	46
4.7.2.2.2 Sintesis cDNA & karakterisasi serotipe dengan RT-PCR dengan menggunakan metode Lanciotti	46
4.7.2.3 Pemeriksaan Biologi Molekuler Tahap 2.....	49
4.7.2.3.1 Karakterisasi Regio Capsid Metode RT-PCR.....	49
4.7.2.3.2 Pemurnian produk cDNA dengan <i>Low Melting Agarose</i>	49
4.7.2.3.3 Pelabelan cDNA.....	51
4.7.2.3.4 Sekuensing nukleotida	51
4.7.2.4 Penentuan genotipe/subtipe.....	52
4.7.3 Pengendalian Mutu (<i>Quality Control</i>).....	53
4.7.3.1 ELISA.....	53
4.7.3.2 PCR.....	53
4.7.3.3 Sekuensing DNA.....	54
4.8 Pengolahan dan Analisis Data serta Evaluasi Hasil Penelitian.....	54
4.9 Alur Penelitian.....	56
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	
5.1 Hasil pola serologis jenis infeksi penderita DBD.....	57
5.2 Hasil pola serotipe virus Dengue.....	63
5.3 Hasil analisis homologi	67
5.4 Hasil analisis filogenetik	71
5.5 Hasil subtipe (genotipe)	78
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Akuntabilitas perangkat/metode yang dipakai.....	79
6.2 Hasil Penelitian.....	82
6.2.1 Hasil pola serologis jenis infeksi penderita DBD di Indonesia	82
6.2.2 Hasil pola serotipe virus Dengue yang terdapat di Indonesia.	84
6.2.3 Hasil analisis homologi dari susunan nukleotida berbagai serotipe pada berbagai daerah di Indonesia.....	89
6.2.4 Hasil analisis filogenetik dari susunan nukleotida berbagai serotipe pada berbagai daerah di Indonesia.	91
6.2.5 Hasil subtipe (genotipe) dari serotipe DEN-2 dan DEN-3 pada isolat Gorontalo-2005 dan Jakarta-2003.	94
6.2.6 Temuan Baru	96
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	98
7.2 Saran	100

DAFTAR PUSTAKA.....	102
LAMPIRAN.....	109



DAFTAR TABEL**halaman**

Tabel 4.1 Primer pada pemeriksaan <i>serotyping</i> RT-PCR Dengue	48
Tabel 5.1 IgM dan IgG yang menunjukkan Pola Serologis Infeksi Primer dan Infeksi Sekunder	59
Tabel 5.2 Pola serotipe virus Dengue pada penderita DBD di 19 kota di Indonesia ..	64
Tabel 5.3 Hubungan serotipe dengan gradasi klinis DBD di Jawa Timur.....	65
Tabel 5.4 Analisis homologi nukleotida dari serotipe DEN-2.....	70
Tabel 5.5 Analisis homologi nukleotida dari serotipe DEN-3.....	71



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Genom virus Dengue dalam sebuah <i>single Open Reading Frame (ORF)</i> ..	9
Gambar 2.2 Spektrum Klinis Infeksi Virus Dengue	10
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	27
Gambar 5.1 Berbagai kota di Indonesia tempat dilakukan penelitian	57
Gambar 5.2 Pola Serologi Infeksi Primer dan Sekunder Dengue pada berbagai kota di pulau Batam dan Sumatra	60
Gambar 5.3 Pola Serologis Infeksi Primer dan Sekunder Dengue pada berbagai kota di pulau Jawa.....	60
Gambar 5.4 Pola Serologis Infeksi Primer dan Sekunder Dengue pada berbagai kota di pulau Bali, Lombok dan Kalimantan.....	61
Gambar 5.5 Pola Serologis Infeksi Primer dan Sekunder Dengue pada berbagai kota di pulau Sulawesi dan Papua.....	62
Gambar 5.6 Profil Serologis Jenis Infeksi Primer dan Sekunder Dengue di 19 kota di Indonesia (diagram batang).....	62
Gambar 5.7 Profil Serologis Jenis Infeksi Primer dan Sekunder Dengue di 19 kota di Indonesia (diagram pie).....	63
Gambar 5.8 Prosentase distribusi serotipe virus Dengue di Indonesia 2003-2005.....	66
Gambar 5.9 Hasil PCR Dengue dari berbagai sampel pasien DBD.....	66
Gambar 5.10 Contoh hasil sekuensing sampel dari kota Kendari.....	68
Gambar 5.11 Analisis filogenetik serotipe DEN-2 regio capsid	72
Gambar 5.12 Analisis filogenetik serotipe DEN-3 regio capsid.....	73

Gambar 5.13 Analisis filogenetik DEN-2 dari isolat Gorontalo-2005 dengan genotipe Cosmopolitan..... 76

Gambar 5.14 Analisis filogenetik Den-3 dari isolat Jakarta-2003 dengan genotipe I .. 77



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Protap (Prosedur Tetap) Pengambilan Darah dan Catatan Medis.....	108
Lampiran 2. Persetujuan Tindakan Medis	116
Lampiran 3. <i>Ethical clearance</i>	119
Lampiran 4. Protokol kerja RT-PCR.....	123
Lampiran 5. Hasil sekuensing nukleotida dari berbagai kota di Indonesia.....	129
Lampiran 6. <i>Multiple alignment</i> nukleotida serotipe DEN-2 dari sampel Jawa Timur (Surabaya, Malang, Jember, Pacitan), Jakarta, Mataram, Aceh, Batam, Gorontalo dan referens (Jamaica, Venezuela, Mexico, Thailand).....	131
Lampiran 7. <i>Multiple alignment</i> nukleotida serotipe DEN-3 dari sampel Jayapura, Kendari, Medan dan referens (Martinique, Amerika Tengah).....	132
Lampiran 8. <i>Sequence Homology Data</i> dari sampel DEN-2.....	133
Lampiran 9. <i>Sequence Homology Data</i> dari sampel DEN-3.....	150
Lampiran 10. Penilaian kualitas <i>electropherogram</i>	151
Lampiran 11. Sekuensing nukleotida serotipe DEN-2 Gorontalo regio E.....	153
Lampiran 12. Hasil sekuensing nukleotida DEN-2 regio envelop menggunakan 2 pasang primer <i>sense</i> dan <i>antisense</i>	155
Lampiran 13. Hasil sekuensing nukleotida DEN-3 regio envelop menggunakan 2 pasang primer <i>sense</i> dan <i>antisense</i>	163
Lampiran 14. Hasil <i>Multiplex PCR</i> menggunakan primer regio envelop.....	171

DAFTAR SINGKATAN

<i>ADE</i>	· <i>Antibody Dependent Enhancement</i>
<i>ADP</i>	<i>Adenosin Difosfat</i>
<i>Ag-Mab-HRP</i>	· <i>Antigen Monoclonal Antibody-Horse Radish Peroxidase</i>
<i>bp</i>	<i>base pair</i>
<i>BT</i>	= <i>Bujur Timur</i>
<i>C</i>	<i>Capsul</i>
<i>cDNA</i>	· <i>complementary DNA</i>
<i>CV</i>	<i>Coefficient Variation</i>
<i>DBD</i>	· <i>Demam Berdarah Dengue</i>
<i>DD</i>	<i>Demam Dengue</i>
<i>DDBJ</i>	· <i>DNA Data Bank of Japan</i>
<i>DIC</i>	· <i>Disseminated Intravascular Coagulation</i>
<i>DNA</i>	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
<i>dNTPs</i>	<i>deoxy Nucleotide Tri Phosphates</i>
<i>DW</i>	= <i>Distilled Water</i>
<i>E</i>	<i>Envelope</i>
<i>EMBL</i>	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
<i>FDP</i>	· <i>Fibrin Degradation Product</i>
<i>HI</i>	<i>Hemagglutination Inhibition</i>
<i>HRP</i>	· <i>Horse Radish Peroxidase</i>
<i>H₂O₂</i>	· <i>hydrogenperoxide</i>
<i>IPTEK</i>	<i>Ilmu Pengetahuan dan Teknologi</i>

KLB	- Kejadian Luar Biasa
L.S	Lintang Selatan
LU	- Lintang Utara
M	<i>Membrane</i>
Mab	<i>Monoclonal Antibody</i>
MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NS	<i>Non-Structural</i>
NTR	- <i>Non-Translated Region</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
prM	<i>pre Membrane</i>
RNA	<i>Ribo Nucleic Acid</i>
RT-PCR	- <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SI	= fase viremia
SSD	Sindrom Syok Dengue
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TE	<i>Tris EDTA</i>
TMB	Tetra Methyl Benzidine
UPE	Unit Pelaksana Fungsional
UTR	= <i>Untranslated Region</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG MASALAH

Saat ini diperkirakan lebih dari 100 juta kasus Demam Dengue (DD) dan lebih dari 250.000 kasus yang berat yaitu Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Sindrom Syok Dengue (SSD) yang terjadi setiap tahunnya di seluruh dunia. Kejadian ini makin mewabah dari tahun ke tahun (dos Santos, 2002 ; Perez, 1998). Di wilayah Asia Tenggara, Indonesia termasuk peringkat kedua setelah Thailand berdasarkan jumlah kasus DBD yang dilaporkan. Selama kurun waktu 20-25 tahun sejak ditemukannya kasus DBD, angka kejadian luar biasa penyakit ini diperkirakan setiap 5 tahun dengan angka kematian tertinggi pada tahun 1968 awal ditemukannya kasus DBD di Indonesia dan angka kejadian penyakit DBD tertinggi pada tahun 1988.

Penyakit ini walaupun banyak terjadi pada kelompok anak, namun terdapat kecenderungan peningkatan jumlah penderita dewasa serta menyebabkan morbiditas dan mortalitas. Umumnya, DBD menyerang anak dan 95% kasus yang dilaporkan berumur kurang dari 15 tahun (Soegijanto, 2004). Kecenderungan peningkatan pada golongan dewasa tampak dalam 5 tahun terakhir (Suroso, 2004). Menurut data kasus DBD di Jawa Timur antara tahun 1996-2000 ada variasi peningkatan kasus dari tahun ke tahun. Pada tahun 2000 dengan jumlah kasus sebanyak 4.224, kasus terbanyak DBD dilaporkan terjadi pada bulan April (404 kasus) dan Mei (449kasus) (Soegijanto, 2004). Di Indonesia telah dilaporkan sebanyak 58.301 kasus tertitung mulai 1 Januari hingga 30 April 2004 dan 658 kematian yang telah tercatat di Departemen Kesehatan. Kasus Demam Berdarah Dengue mencakup 30 propinsi. Kejadian luar biasa ini telah terjadi pada 293 kota dan 17 propinsi (WHO, 2004).

Gambaran klinis penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus Dengue ini sering tidak khas, dapat menyerupai penyakit flu, demam tifoid, leptospirosis, malaria dan lain sebagainya. Manifestasi klinis akibat infeksi virus Dengue ini dapat menyebabkan keadaan yang bermacam-macam, mulai dari tanpa gejala (asimtomatik), demam ringan yang tidak spesifik (*undifferentiated febrile illness*), Demam Dengue (DD) atau bentuk yang lebih berat yaitu Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Sindrom Syok Dengue (SSD) (Hadinegoro . 2001 ;WHO, 1997).

Virus Dengue terdiri dari 4 serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Keempat serotipe virus ini terdapat di Indonesia dan dilaporkan bahwa serotipe virus DEN-3 sering menimbulkan wabah, sedangkan di Thailand penyebab wabah yang dominan adalah virus DEN-2 (Soepijanto. 2004). Virus Dengue termasuk dalam genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, yang terdiri dari 10,700 basa di dalam genomnya. Virus Dengue terdiri dari *single-stranded positive sense RNA (ssRNA sense)*. Di dalam genomnya terdapat sebuah *single Open Reading Frame (ORF)* yang mengkode 2 macam protein yaitu protein struktural dan protein nonstruktural. Protein struktural terdiri dari C (protein inti/capsid core), M (protein membran, termasuk *preMembrane*) dan E (protein envelope) serta 7 macam protein nonstruktural yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 yang ditandai oleh sebuah 5' dan 3' *Non-Translated Region (NTR)* pada kedua ujungnya (Yao. 2002).

Patogenesis terjadinya DBD masih belum jelas diketahui, namun berbagai macam teori seperti hipotesis infeksi sekunder (teori *secondary heterologous infection*), *Antibody Dependent Enhancement (ADE) hypothesis*, teori virulensi virus yang didasarkan pada perbedaan serotipe virus Dengue DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4 masih dianut hingga saat ini. Semuanya dapat ditemukan pada berbagai kasus yang fatal, tetapi berbeda antara daerah yang satu dengan yang lain (Lanciotti, 1994).

Merebaknya kembali penyakit infeksi virus Dengue ini ditentukan oleh banyak faktor antara lain *host, agent* dan lingkungan. Hal ini tidak terlepas dari transpor virus patogen atau terjadi evolusi atau ekologi dari *native pathogen* yang pada awalnya hanya menyebabkan kasus ringan atau bahkan tidak memberikan gejala pada manusia (Messer, 2003).

Epidemiologi molekuler banyak dikembangkan untuk mencari berbagai faktor yang diperkirakan menjadi penyebab masih terus berkembangnya prevalensi infeksi virus Dengue di seluruh belahan dunia. Sekuensing dari berbagai regio di dalam genom virus Dengue tersebut ditunjukkan untuk menentukan variasi genetik dan untuk mengkarakterisasi subtipe (genotipe) di dalam masing-masing serotipenya. Karakterisasi subtipe (genotipe) berguna di dalam epidemiologi molekuler sehingga dapat memonitor distribusi dari genotipe yang bersirkulasi pada daerah endemis (Messer, 2003). Menurut Messer (2003), dalam dua dekade terakhir di Sri Lanka, Afrika Timur dan Amerika Latin terjadinya wabah DBD disebabkan oleh serotipe DEN-3, subtipe III. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa terjadinya evolusi dan transpor virus Dengue yang menyebabkan wabah ini berasal dari daratan India. Wabah di Sri Lanka pada tahun 1989 ini berkorelasi dengan timbulnya varian baru dari DEN-3 subtipe III yang menyebar ke Afrika dan dari Afrika ke Amerika Latin di pertengahan tahun 1990. Pada mulanya DEN-3 subtipe III menyebabkan penyakit yang ringan, namun pada keadaan wabah, secara genetik terjadi perubahan yang menunjukkan adanya peran genetik virus pada DBD. Pada publikasi Igarashi (1999) dilaporkan bahwa di Thailand, terdapat 3 subtipe DEN-2 yang didasarkan pada perbedaan asam amino dari prM, NS1, NS2A, NS3, NS5. Infeksi sekunder subtipe I dapat mengakibatkan Sindrom Syok Dengue (SSD) sedangkan infeksi sekunder subtipe II menyebabkan DBD namun infeksi primernya menyebabkan Demam

Dengue (DD) saja, infeksi subtipe III mengakibatkan Demam Dengue (DD). Watts, 1999 menemukan kenyataan bahwa infeksi sekunder oleh subtipe American DEN-2 tidak akan menyebabkan DBD dan SSD, sebaliknya untuk subtipe Southeast Asian DEN-2 yang akan menyebabkan manifestasi infeksi virus Dengue yang berat di Peru pada wabah di tahun 1995 (Watts, 1999). Hal ini menunjukkan bahwa serotipe dan subtipe virus Dengue dapat menentukan virulensi dari virus Dengue (Igarashi, 1999). Para peneliti lain, misalnya Mota (2002) di Mexico meneliti DEN-4; Santos (2003) meneliti DEN-1 dan DEN-2 di Brazil; Armstrong (2003) meneliti DEN-2 di Texas Amerika maupun Holmes (1999) di Oxford Inggris, menggunakan regio envelop untuk penentuan subtipe maupun dilanjutkan dengan analisis filogenetik. Regio envelop banyak dipakai karena merupakan salah satu regio yang memiliki *higher potential of sequence heterogeneity*, di samping regio C-prM (Chao, 2005). Envelop juga memiliki reseptor tempat berikatan dengan epitop virus Dengue dan merupakan tempat terbaik untuk mengungkap variasi genetik dalam skala global (Twiddy, 2002). Pemahaman patogenesis virus Dengue ini masih sangatlah kurang disebabkan tidak adanya model *invitro* dan *in vivo* yang dapat digunakan untuk pembuktian penyakit Dengue ini. Leitmeyer membentangkan sekuens genom virus Dengue dikaitkan dengan kejadian Demam Dengue maupun Demam Berdarah Dengue. Ia mendapatkan perbedaan determinan pada DBD terletak pada protein E, bagian 5'UTR, 3'UTR, NS4b dan NS5 (Leitmeyer, 1999).

Apabila dicermati interaksi antara *host-agent-environment* dan perkembangan teknologi laboratorium maka kiranya perlu dilakukan penelitian epidemiologi molekuler infeksi virus Dengue yang belum diteliti di Indonesia. Interaksi ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat yang serius pada sisi hubungan antara kondisi geografi suatu daerah dengan tipe virus Dengue yaitu adanya perbedaan serotipe dan

subtipe (genotipe)nya. Penelitian epidemiologi molekuler ini difokuskan pada *agen* virus Dengue berdasarkan berbagai penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa perubahan struktur genetik virus Dengue memiliki kontribusi terhadap *shift*/pergeseran potensi epidemi maupun patogenisitas serotipe virus Dengue (Saldi, 2005). Penggunaan analisis homologi dan analisis filogenetik diharapkan dapat menentukan kekerabatan berdasarkan serotipe dan subtipe yang terdistribusi dan bersirkulasi di berbagai daerah di Indonesia.

1.2. RUMUSAN MASALAH

- 1.2.1. Bagaimana pola serologis jenis infeksi penderita DBD di Indonesia ?
- 1.2.2. Bagaimana pola serotipe virus Dengue yang terdapat di Indonesia ?
- 1.2.3. Bagaimana analisis homologi dari susunan nukleotida berbagai serotipe pada berbagai daerah di Indonesia ?
- 1.2.4. Bagaimana analisis filogenetik dari susunan nukleotida berbagai serotipe di berbagai daerah di Indonesia ?
- 1.2.5. Bagaimana subtipe (genotipe) dari berbagai serotipe virus Dengue di beberapa daerah di Indonesia ?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. TUJUAN UMUM

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk menentukan pola serologis, pola serotipe virus Dengue di beberapa daerah di Indonesia, susunan nukleotida genom virus Dengue, serta subtipe (genotipe) dari serotipe virus Dengue dari berbagai isolat di beberapa daerah Indonesia.

Hal ini sebagai dasar pemetaan serotipe dan subtipe (genotipe) virus Dengue di Indonesia, menentukan jalur transmisi virus Dengue sekaligus menilai kekerabatan di antara berbagai isolat, menentukan varian virus Dengue sekaligus mengantisipasi terjadinya kejadian luar biasa (KLB) akibat adanya serotipe dan subtipe tertentu.

1.3.2. TUJUAN KHUSUS

- 1.3.2.1 Menentukan pola serologis jenis infeksi penderita DBD di Indonesia
- 1.3.2.2 Menemukan pola berbagai serotipe virus Dengue pada beberapa daerah di Indonesia.
- 1.3.2.3 Membuat analisis homologi dari susunan nukleotida berbagai serotipe virus Dengue di berbagai daerah di Indonesia.
- 1.3.2.4 Membuat analisis filogenetik (*phylogenetic tree*) dari susunan nukleotida berbagai serotipe virus Dengue di berbagai daerah di Indonesia.
- 1.3.2.5 Menentukan subtipe (genotipe) dari berbagai serotipe virus Dengue di beberapa daerah di Indonesia

1.4. MANFAAT PENELITIAN

1.4.1. MANFAAT TEORITIS

Penemuan berbagai serotipe yang ada di beberapa wilayah di Indonesia, penentuan subtipe, analisis homologi sekaligus analisis filogenetik dapat menjadi dasar untuk informasi epidemiologi molekuler di Indonesia. Penemuan susunan nukleotida dari virus Dengue serotipe dominan di Indonesia sekaligus subtipe serotipe virus Dengue tersebut yang dikaitkan dengan manifestasi klinis Demam Dengue (DD), Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Sindrom Syok Dengue

BAB 2

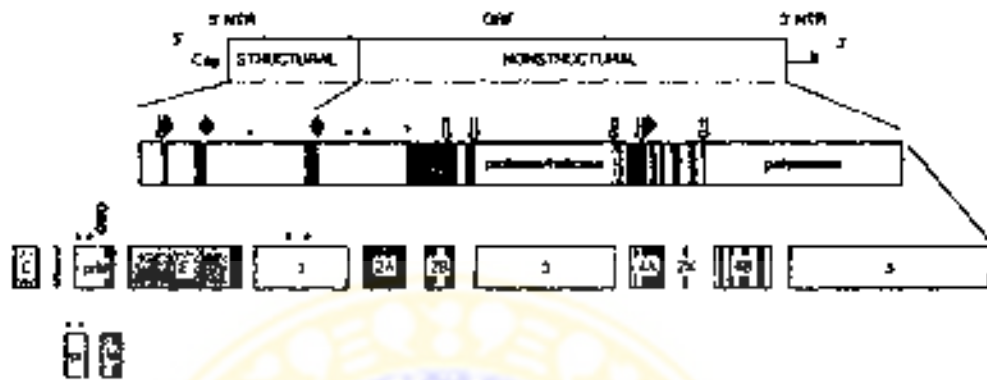
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Virus Dengue

Virus Dengue merupakan virus RNA untar tunggal, genus *Flavivirus*, terdiri dari 4 serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Struktur antigen ke-4 serotipe ini sangat mirip satu dengan yang lain, namun antibodi terhadap masing-masing serotipe tidak dapat saling memberikan perlindungan silang. Variasi genetik yang berbeda pada ke-4 serotipe ini tidak hanya menyangkut antar-serotipe, tetapi juga sub tipe (genotipe) di dalam serotipe itu sendiri tergantung waktu dan daerah penyebarannya. Pada masing-masing segmen *coding*, variasi di antara serotipe dapat mencapai 2,6 - 11,0 % pada tingkat nukleotida dan 1,3 - 7,7 % untuk tingkat protein. Perbedaan urutan nukleotida ini ternyata menyebabkan variasi dalam sifat biologis dan antigenitasnya (Leitner, 1999).

Virus Dengue termasuk dalam genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, yang terdiri dari 10.700 basa di dalam genomnya. Virus Dengue terdiri dari *single-stranded positive sense RNA (ssRNA sense)*. Di dalam genomnya terdapat sebuah *single Open Reading Frame (ORF)* yang mengkode 2 macam proteka yaitu protein struktural dan protein nonstruktural. Protein struktural terdiri dari C (protein inti/capsid core), M (protein membran, termasuk *proteins membrane*) dan E (protein envelop) serta 7 macam protein nonstruktural yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 yang ditandai oleh sebuah 5' dan 3' *nontranslated region (NTR)* pada kedua ujungnya (Yao, 2007). Protein struktural merupakan 25% dari total protein, sedangkan protein nonstruktural merupakan bagian yang terbesar (75%) terdiri dari NS-1 – NS-5. Kemampuan untuk merangsang pembentukan antibodi di antara protein struktural, urutan immunogenitas

tertinggi adalah protein E, yang diikuti oleh protein prM dan C, sedangkan pada protein nonstruktural yang paling berperan adalah protein NS-1 (Leitmeyer, 1999).



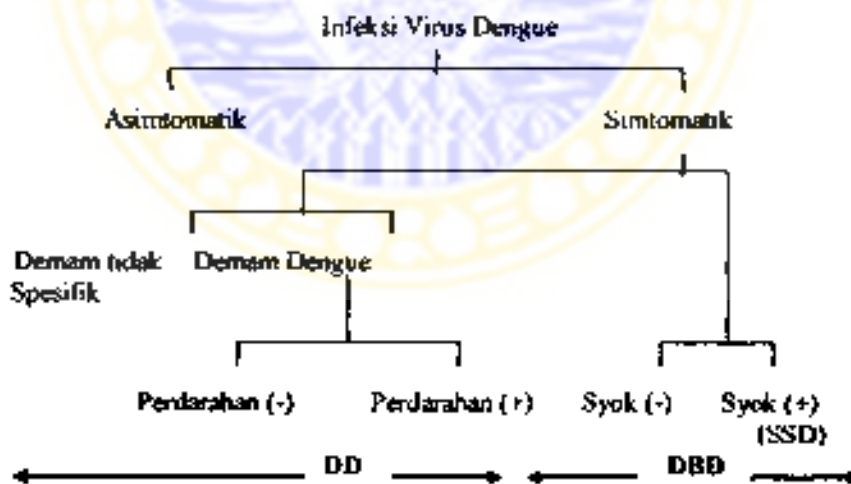
Gambar 2.1 Genom virus Dengue dalam sebuah *single Open Reading Frame (ORF)* (dikutip dari Chambers, 1999)

2.2. Vektor

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus Dengue. Penyakit ini masih merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting, bersifat endemis dan timbul sepanjang tahun. Penyakit ini dapat ditularkan kepada manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis*. Telah dilaporkan oleh lebih dari 100 negara di dunia, bahwa dua juta orang telah terinfeksi dan 10.000 kematian setiap tahunnya telah terjadi. Penyakit ini masih menjadi salah satu penyakit yang *under-reported*

2.3. Manifestasi Klinis

Berdasarkan serotipe virus Dengue dan frekuensi virus Dengue yang menginfeksi manusia maka infeksi virus Dengue dapat dibagi menjadi 2, yaitu infeksi primer dan infeksi sekunder. Kekebalan seumur hidup terhadap *homologous* serotipe muncul setelah infeksi primer. Studi epidemiologi di Asia Tenggara menunjukkan bahwa DBD/SSD banyak terjadi selama infeksi sekunder, oleh serotipe virus yang berbeda dari virus yang menyebabkan infeksi primer. Manifestasi klinis infeksi virus Dengue sekunder lebih berat dibandingkan infeksi primer. Beberapa literatur menunjukkan bahwa infeksi primer hanya menyebabkan suatu keadaan yang disebut *febrile self limiting disease*, sedangkan infeksi sekunder dapat menimbulkan komplikasi yang berat. Atas dasar ini maka sangat perlu membedakan infeksi virus Dengue primer dari yang sekunder untuk menentukan prognosis DBD/SSD yang lebih baik dan tidak hanya sekedar mendeteksi hasil positif atau negatif infeksi virus Dengue (Suroso, 2004).



Gambar 2.2 Spektrum Klinis Infeksi Virus Dengue (dikutip dari WHO, 1997)

2.4. Immunopatogenesis

Berbagai teori immunopatogenesis untuk menetralkan manifestasi klinis infeksi virus Dengue adalah teori virulensi virus, teori immunopatologi, teori antigen antibodi, teori *infection enhancing antibody*, teori mediator, peran endotoksin, peran limfosit, teori trombosit endotel, teori apoptosis (Sutaryo, 2004).

Imunopatogenesis DBD dan SSD masih merupakan masalah yang kontroversial. Dua teori yang masih banyak digunakan untuk menjelaskan perubahan patogenesis pada DBD dan SSD yaitu hipotesis infeksi sekunder (teori *secondary heterologous infection*) dan *Antibody Dependent Enhancement (ADE) hypothesis*. Teori infeksi sekunder menyebutkan bahwa apabila seseorang mendapatkan infeksi primer dengan satu jenis virus, akan terjadi proses kekebalan terhadap infeksi dengan jenis virus tersebut untuk jangka waktu yang lama, tetapi jika orang tersebut mendapatkan infeksi sekunder dengan jenis serotipe virus yang lain, maka terjadi infeksi yang berat. Pada teori kedua (ADE), menyebutkan tiga hal yaitu *antibodies enhance infection*, *T-cells enhance infection* serta limfosit T dan monosit akan melepaskan sitokin yang berkontribusi terhadap terjadinya DBD dan SSD. Singkatnya secara umum ADE dijelaskan sebagai berikut. Jika terdapat antibodi spesifik terhadap jenis virus tertentu, maka antibodi tersebut dapat mencegah terjadinya penyakit, tetapi sebaliknya apabila antibodi yang terdapat dalam tubuh merupakan antibodi yang tidak dapat menetralisasi virus, justru dapat menimbulkan penyakit yang berat. Respons imun humoral diperankan oleh antibodi sedangkan respons imun seluler diperankan oleh MHC (*Major histocompatibility complex*) *class II-restricted CD4+ T cells* dan *class I-restricted CD8+ T cells*. Antibodi terhadap virus Dengue memegang peranan penting dalam mencegah infeksi melalui *serotype-specific neutralizing antibodies* dan *meng-enhance* infeksi Dengue yang dapat berakhir dengan DBD dan SSD melalui

aktivitas *serotype-crossreactive non-neutralizing antibodies* (Djunaedi, 2004 ; Kirane 1992).

Infeksi dari salah satu serotipe virus Dengue menimbulkan imunitas seumur hidup, namun hanya sebagian kecil yang memiliki imunitas silang protektif terhadap infeksi serotipe lain. Pada anak, infeksi virus Dengue sering bersifat subklinis atau dapat menyebabkan penyakit demam yang *self-limited*, namun apabila suatu saat penderita terkena infeksi virus Dengue berikutnya dengan serotipe yang berbeda, penyakit ini akan lebih berat, menjadi Demam Berdarah Dengue ataupun Sindrom Syok Dengue (*anamnestic dengue infection*). Di daerah endemis, penderita yang terdiagnosis Demam Dengue seringkali terbukti menderita infeksi sekunder.

Infeksi primer ditandai dengan timbulnya antibodi IgM terhadap virus Dengue sekitar tiga sampai lima hari setelah timbulnya demam, meningkat tajam dalam satu sampai tiga minggu serta dapat dideteksi sampai tiga bulan. Antibodi IgG terhadap virus Dengue diproduksi sekitar dua minggu sesudah infeksi. Titer IgG ini meningkat amat cepat, lalu menurun secara lambat dalam waktu yang lama dan biasanya bertahan seumur hidup. Pada infeksi sekunder terjadi reaksi anamnestik dari pembentukan antibodi, khususnya dari kelas IgG di mana pada hari ke dua saja, IgG ini sudah dapat meningkat tajam. Pada berbagai penelitian di daerah di mana infeksi primer dan sekunder terjadi keduanya, didapatkan suatu angka signifikan yang menyatakan bahwa pada pasien dengan infeksi sekunder dengue, antibodi IgM tidak terdeteksi dalam waktu lima hari sejak infeksi timbul, bahkan pada beberapa kasus tidak menunjukkan suatu respon hingga hari ke 20.

Pada tubuh seseorang yang mengalami infeksi sekunder oleh serotipe virus yang lain maka akan mengakibatkan proliferasi dan transformasi limfosit untuk memproduksi antibodi IgG dalam jumlah tinggi. Selain itu virus Dengue juga

....

.. 2

berproliferasi dalam limfosit yang bertransformasi tadi sehingga menghasilkan virus dalam jumlah banyak. Hal tersebut akan mengakibatkan terbentuknya antigen-antibodi kompleks (*virus antibody complex*) yang selanjutnya akan mengakibatkan hal sebagai berikut

1. Sistem komplemen mengalami aktivasi yang mengakibatkan dilepaskannya anafilatoksin C3a dan C5a yang menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding pembuluh darah dan merembesnya cairan plasma melalui endotel ke jaringan tubuh sehingga terjadi syok hipovolemik.
2. Agregasi trombosit terjadi, dan kondisi ini menyebabkan ADP terlepas sehingga trombosit mengalami kerusakan metamorfosis. Agregat trombosit ini akan melepaskan vasoaktif amin (histamin dan serotonin) yang akan meningkatkan permeabilitas kapiler dan juga melepaskan PF3 (*Platelet Factor 3*) yang akan merangsang koagulasi intravaskular (DIC). Agregasi trombosit ini akan segera dimusnahkan oleh sistem retikuloendotelial dengan akibat trombositopenia.
3. Proses maturasi megakariosit di sumsum tulang terganggu, yang mengakibatkan trombositopenia dan menekan berbagai faktor pembekuan darah yang dapat mengakibatkan perdarahan.
4. Aktivasi faktor Hageman (faktor XII) terjadi, sehingga menyebabkan terjadinya pembekuan intravaskular yang meluas (DIC). Pada proses ini plasminogen akan menjadi plasmin yang berperan dalam pembentukan anafilatoksin dan penghancuran fibrin menjadi *fibrin degradation product* (FDP). Aktivasi ini juga akan merangsang sistem kinin yang berperan dalam proses meningkatnya permeabilitas pembuluh darah.

Patogenesis utama yang membedakan Demam Berdarah Dengue dari Demam Dengue adalah adanya peningkatan permeabilitas endotel kapiler. Keadaan ini menyebabkan ekstrasvasasi cairan intravaskular ke ekstrasvasular sehingga volume plasma berkurang, akibatnya terjadi hipotensi, hemokonsentrasi, hipoproteinemia, efusi ke rongga serosa, peritoneum, pleura dan perikard dan menimbulkan syok. Syok hipovolemik ini akan mengakibatkan terjadinya anoksia jaringan, asidosis metabolik dan kematian.

2.5. Diagnosis Klinis dan Laboratoris

Diagnosis laboratoris DHD baik pada anak maupun dewasa belum pernah dibedakan secara jelas. Berpijak pada dasar ini dipakai kriteria umum yaitu isolasi virus dengan cara kultur, pemeriksaan serologis dengan mendeteksi antibodi antiDengue, maupun pemeriksaan asam nukleat dari RNA virus Dengue. Cara ini sekaligus dapat mendeteksi jenis serotipe virus Dengue yang diperlukan tidak saja untuk keperluan epidemiologi, namun merupakan salah satu faktor yang mungkin dapat mengarah pada gradasi berat ringannya gejala infeksi virus Dengue.

Seperti telah disebutkan di depan, sangat perlu membedakan infeksi virus Dengue primer atau sekunder untuk menentukan prognosis DBD/SSD yang lebih baik dan tidak hanya sekedar mendeteksi hasil positif atau negatif infeksi virus Dengue (Suroso, 2004)

Konsekuensinya, diperlukan pemahaman prosedur pemeriksaan yang dapat dilakukan secara rutin maupun untuk penelitian, beserta interpretasi hasil uji laboratorisnya

Gejala klasik DD ialah gejala demam tinggi mendadak, terkadang bifasik (*saddle back fever*), nyeri kepala berat, nyeri belakang bola mata, nyeri otot, tulang

atau sendi, mual, muntah dan timbulnya ruam. Ruam berbentuk makulopapular yang bisa timbul pada awal penyakit (1-2 hari) kemudian menghilang tanpa bekas dan selanjutnya timbul ruam merah halus pada hari ke-6 atau ke-7 terutama di daerah kaki, telapak kaki dan tangan. Selain itu, dapat juga ditemukan petekia. Masa penyembuhan dapat disertai rasa lesu yang berkepanjangan, terutama pada penderita dewasa. Telah dilaporkan adanya Demam Dengue yang disertai perdarahan seperti epistaksis, perdarahan gusi, perdarahan saluran cerna, hematuri dan menoragi, pada keadaan wabah.

Gejala klasik DBD ditandai dengan demam tinggi, mendadak 2-7 hari disertai dengan muka kemerahan. Keluhan seperti anoreksia, sakit kepala, nyeri otot, tulang, sendi, mual dan muntah sering ditemukan. Beberapa penderita mengeluh nyeri menelan dengan faring hiperemi, biasanya ditemukan juga nyeri perut di daerah epigastrium dan di bawah tulang iga. Bentuk perdarahan yang paling sering terjadi adalah berupa uji tourniquet (*Rumpel Leede*) positif, kulit mudah memar dan perdarahan pada bekas suntikan intravena atau pada bekas tempat pengambilan darah. Kebanyakan kasus, petekia halus ditemukan tersebar di daerah ekstremitas, aksila, wajah dan palatum mole yang biasanya ditemukan pada fase awal dan demam. Epistaksis dan perdarahan gusi jarang ditemukan, perdarahan saluran cerna ringan dapat ditemukan pada fase demam. Hati biasanya membesar dengan variasi dari *just palpable* sampai 2-4 cm di bawah *arcus costae* kanan (Hadinegoro, 2004).

Sindrom Syok Dengue (SSD) biasanya menyebabkan syok pada saat atau segera setelah suhu turun, antara hari ke-3 sampai hari sakit ke-7. Pasien semula terlihat terangi atau gelisah, kemudian jatuh ke dalam syok yang ditandai dengan kulit dingin-lembab, sianosis sekitar mulut, nadi cepat-Jemah, tekanan nadi <20 mmHg dan

hipotensi. Tanda prognostik baik apabila pengeluaran urine cukup dan nafsu makan telah normal kembali.

Diagnosis infeksi virus Dengue, selain dengan melihat gejala klinis, juga dilakukan dengan pemeriksaan darah di laboratorium. Pada DD, saat awal demam akan dijumpai jumlah leukosit (sel darah putih) normal, kemudian menjadi leukopenia (sel darah putih yang menurun) selama fase demam. Jumlah trombosit pada umumnya normal, demikian pula semua faktor pembekuan, tetapi saat epidemi/wabah dapat dijumpai trombositopenia (jumlah trombosit yang menurun). Enzim hati dapat meningkat ringan. pada DBD, pemeriksaan laboratorium menunjukkan trombositopenia dan hemokonsentrasi.

Pada penelitian prospektif yang dilakukan Thein di Yangon didapatkan data bahwa bila serum dikumpulkan pada masa aktivitas dengue tinggi (tahun 1987) terdapat korelasi antara kadar IgG1 antiDengue penderita fase akut dengan tingkat keparahan penyakit, namun bila serum didapat pada masa aktivitas dengue yang sedang atau rendah (tahun 1990, 1991 dan 1992) kadar IgG1 antiDengue tidak berkorelasi dengan keparahan penyakit (Thein, 2000). Menurut Koraka dan Suharti subkelas kadar IgG antiDengue mempunyai korelasi dengan tingkat keparahan penyakit, yaitu peningkatan IgG1 dan IgG4 merupakan marker resiko terjadinya DBD dan SSD (Koraka, 2001). Saat ini juga terdapat pemeriksaan serologis antigen NS1. Pemeriksaan ini dapat mendeteksi dini infeksi virus Dengue, sebelum antibodi terbentuk. Hal inilah yang diperlukan klinisi tanpa perlu menunggu IgM dan IgG antibodi yang terbentuk, namun kit diagnostik pemeriksaan ini belum ada di Indonesia.

Kriteria WHO, 1997 masih menggunakan kriteria klinis dan laboratoris untuk menegakkan DBD, sebagai berikut.

Kriteria Klinis .

- a. Demam tinggi mendadak, tanpa sebab jelas, berlangsung terus menerus selama 2-7 hari.
- b. Terdapat manifestasi perdarahan ditandai dengan :
 - uji Rumpel Leede/RU *tourniquet* positif,
 - petekiae, ekimosis, purpura,
 - perdarahan mukosa, epistaksis, perdarahan gusi,
 - hematemesis dan atau melena
- c. Pembesaran hati (hepatomegali).
- d. Syok, ditandai nadi cepat dan lemah serta penurunan tekanan nadi, hipotensi, kaki dan tangan dingin, kulit lembab dan pasien tampak gelisah.

Kriteria Laboratoris .

- a. Trombositopenia ($100.000/\mu\text{l}$ atau kurang).
- b. Hemokonsentrasi, dapat dilihat dari peningkatan hematokrit 20% atau lebih, menurut standar umur dan jenis kelamin, atau penurunan hematokrit 20% sesudah terapi cairan.

Pada kasus syok/SSD, selain ditemukan hasil laboratorium seperti DBD di atas, juga terdapat kegagalan sirkulasi ditandai dengan terjadi penurunan demam disertai keluarnya keringat, ujung tangan dan kaki terasa dingin, nadi cepat atau bahkan melambat hingga tidak teraba serta tekanan darah tidak terukur. Seringkali sesaat sebelum syok, penderita mengeluh nyeri perut, beberapa tampak sangat lemah dan gelisah

2.6. Epidemiologi Molekuler

Infeksi virus Dengue telah menjadi masalah kesehatan di dunia khususnya yang banyak menimpa negara tropis dan subtropis, karena terjadi peningkatan jumlah penderita, menyebarkan daerah yang terkena wabah dan manifestasi klinis berat yang merupakan keadaan darurat yaitu Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Sindrom Syok Dengue (SSD) yang dapat menyebabkan kematian.

Indonesia, yang merupakan negara kepulauan memiliki 33 propinsi, yang terletak secara geografis di antara 2 benua (Asia dan Australia) dan 2 samudra (samudra Pasifik dan samudra Hindia). Letak astronomis Indonesia yaitu 6° LU - 11° LS dan 95° BT - 141° BT. Di Indonesia, kasus DBD pertama kali dilaporkan di Jakarta dan Surabaya pada tahun 1968. Di tahun selanjutnya kasus DBD setiap tahun berfluktuasi jumlahnya dan cenderung meningkat, demikian pula wilayah yang terjangkau bertambah luas. Dalam tahun 1997 jumlah kasus yang dilaporkan dari 27 propinsi sebanyak 31.789 orang (angka kesakitan 15,28 per 100.000 penduduk), di antaranya 705 (angka kematian 2,2%) meninggal dunia. Sampai 13 November 1998 dari 27 propinsi jumlah kasus yang dilaporkan 65.968 dengan kematian 1.275 orang (CFR 1,9%) dari 183 Dati II. Sasaran akhir Pelita VI angka kesakitan kurang dari 30 per 100.000 penduduk, sedangkan angka kematiannya tidak melebihi 2,5%. Jumlah kasus DBD pada tahun 1997 tersebut dilaporkan dari 340 Dati II di 27 propinsi (Suroso, 2004). Menurut data kasus DBD di Jawa Timur antara tahun 1996-2000 menunjukkan adanya variasi peningkatan kasus dari tahun ke tahun, hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya musim hujan. Pada tahun 2000 dengan jumlah kasus sebanyak 4.224, kasus DBD terbanyak dilaporkan terjadi pada bulan April (404 kasus) dan Mei (449 kasus) (Soegijanto, 2004).

Masalah yang sedang dihadapi masa kini dalam bidang pengendalian penyakit dan lingkungan adalah transisi demografi dan transisi epidemiologi, serta perubahan lingkungan yang akan sangat berpengaruh terhadap derajat kesehatan masyarakat di Indonesia. Merembanya DBD yang termasuk salah satu *emerging disease* merupakan tantangan yang memerlukan penelitian, pengembangan dan penerangan IPTEK (Menristek, 2006). Penyebab meningkatnya jumlah kasus dan semakin menyebarkan penyakit DBD itu antara lain karena semakin meningkatnya arus transportasi (mobilitas) penduduk dari satu daerah ke daerah lain, sedangkan nyamuk penularnya masih tersebar dan banyak terdapat baik di rumah, sekolah maupun tempat umum lainnya (Suroso, 2004). Masih tingginya prevalensi penyakit DBD, bahkan sampai menimbulkan kejadian luar biasa (KLB), manifestasi klinis yang bervariasi dari ringan sampai berat bahkan menimbulkan kematian (DD, DBD, SSD), perjalanan penyakit akibat infeksi virus Dengue yang sulit diramalkan, immunopatogenesis yang belum diketahui dengan jelas serta belum tersedianya vaksin dengue yang efektif menyebabkan berkembangnya berbagai penelitian mengenai infeksi virus Dengue, khususnya banyak dilakukan pendekatan epidemiologi molekuler.

Epidemiologi molekuler adalah sebuah ilmu yang memfokuskan pada kontribusi potensial berbagai faktor resiko genetik dan lingkungan, yang diidentifikasi melalui level molekuler, baik terhadap etiologi sebagai penyebab, distribusi dan pencegahan penyakit di dalam keluarga dan lintas populasi. Lahan ilmu baru ini merembak pesat, yang merupakan integrasi penelitian biologi molekuler ke dalam epidemiologi tradisional (Hass, 1997)

Aplikasi dari metode epidemiologi molekuler, terutama merupakan kombinasi pendekatan amplifikasi fragmen tertentu genom virus menggunakan teknik

Polymerase Chain Reaction (PCR) dan analisis sekuensing nukleotida. Epidemiologi molekuler saat ini merupakan alat yang sangat penting dan sensitif untuk mempelajari evolusi virus pada level superior terhadap metodologi sebelumnya dan menyediakan sebuah pengertian yang lebih baik dari sebuah hubungan epidemiologi (*epidemiological relationship*). Aplikasi epidemiologi molekuler ini digunakan oleh para peneliti, misalnya Mota (2002) di Mexico meneliti DEN-4; Santos (2003) meneliti DEN-1 dan DEN-2 di Brazil; Armstrong (2003) meneliti DEN-2 di Texas Amerika maupun Holmes (1999) di Oxford Inggris, menggunakan regio envelop untuk penentuan subtype maupun dilanjutkan dengan analisis filogenetik. Penggunaan analisis filogenetik dapat dilakukan dengan menggunakan regio capsid-preMembran (C-prM), Envelop (E) maupun *Nonstructural-3* (NS-3) dan NS-5. Berdasarkan urutan *sequence heterogeneity*-nya, dikatakan NS-3 maupun NS-5 memiliki *sequence heterogeneity* lebih rendah dibandingkan C-prM dan E (Chao et al, 2005). Daerah Envelop memiliki *the higher potential of sequence heterogeneity*; sehingga para peneliti lebih merekomendasikan penggunaan regio E untuk analisis filogenetik, sekaligus untuk menentukan subtype (genotipe) dari serotipe masing-masing virus tersebut. Peneliti lain yaitu Dash, 2004, di India, menggunakan regio C-prM dan serum pasien secara langsung. Beliau meneliti sejak tahapan *serotyping* dan *subtyping* serta menganalisis filogenetik juga dari regio capsid. Beliau menjumpai informasi yang unik dalam pendekatan epidemiologi molekuler ini, ketika membandingkan sekuens berbagai sampel serum dari wilayah di India Utara yaitu genotipe V digantikan oleh genotipe IV serotipe DEN-2 dalam empat dasawarsa. Pemeriksaan molekuler yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pemeriksaan PCR dan teknik sekuensing nukleotida.

2.6.1. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

PCR adalah suatu teknik yang dipakai untuk melipatgandakan asam nukleat baik berupa DNA maupun RNA secara *in vitro* dengan cara enzimatik. Segmen DNA yang diamplifikasi adalah segmen DNA yang terletak di antara 2 bagian yang telah diketahui urutannya yang lazim disebut sebagai primer.

Pada reaksi ini dibutuhkan DNA target (sasaran), sepasang primer, enzim polimerase DNA yang termostabil, bufer reaksi dan alat *thermal cycler* (Sambrook, 1980).

DNA dapat dilipatgandakan dengan prinsip dasar sebagai berikut :

- * 2 rantai DNA merupakan pasangan yang komplementer,
- * pemisahan rantai DNA menjadi rantai tunggal, masing-masing rantai dapat dipakai sebagai cetakan (*template*) untuk mensintesis rantai pasangannya

Proses pelipatgandaan DNA ini terjadi melalui tiga tahap yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi. Pada tahap denaturasi terjadi pada suhu tinggi (90-95°C), di mana rantai ganda DNA terpisah menjadi rantai tunggal. Selanjutnya diikuti dengan penurunan suhu sehingga terjadi penempelan primer (*annealing*) pada DNA target dan diikuti dengan perpanjangan (ekstensi) dari kedua primer tersebut (*forward* dan *reverse primer*) sehingga terbentuk dua rantai ganda DNA baru. Siklus denaturasi, *annealing* dan ekstensi rantai ini diulang beberapa kali, biasanya sekitar 30-35 kali, sampai akhirnya tercapai sejumlah besar DNA yang diinginkan.

Khusus untuk PCR virus Dengue, karena ia merupakan virus RNA, dilakukan proses *reverse* yaitu perubahan RNA menjadi DNA terlebih dahulu, menggunakan enzim *reverse transcriptase*, baru dilakukan proses PCR.

Hasil amplifikasi dengan teknik PCR ini selanjutnya dilakukan evaluasi hasil PCR dengan teknik elektroforesis. Elektroforesis menggunakan agarose 2% dalam

lanutan TBE 0,5% yang mengandung *etidium bromide*. Hasil elektroforesis nukleotida yang sudah dipisahkan dapat dilihat di bawah sinar ultra-violet.

Sesudah dievaluasi dengan elektroforesis, dilakukan pemurnian hasil PCR, pada penelitian ini menggunakan *Low Melting Agarose* (Handajani, 2000). Selanjutnya dilakukan pelabelan DNA dan dilanjutkan dengan teknik sekuensing nukleotida.

Metode PCR untuk deteksi virus Dengue, dikembangkan oleh Lanciotti. Lanciotti memakai sistem *nested PCR* yaitu setelah mengubah RNA menjadi DNA dengan metode *reverse transcription*, selanjutnya dilakukan PCR dua tahap, yang dapat mendeteksi sekaligus mengidentifikasi keempat macam serotipe virus Dengue (Lanciotti, 1992; Miagostovich, 1997).

2.6.2. Sekuensing nukleotida

Sekuensing nukleotida merupakan teknik yang digunakan untuk menentukan urutan nukleotida secara langsung dari suatu fragmen DNA. Umumnya, dengan menggunakan teknik sekuensing nukleotida ini dapat dihasilkan oligonukleotida *single strand* dengan panjang sekitar 500 basa (Handajani, 2003). Mesin untuk sekuensing nukleotida ini semakin berkembang dan sekarang telah ada *sequencer* yang dapat digunakan untuk menentukan urutan nukleotida sampai 1400 nukleotida.

Melalui teknik sekuensing nukleotida baik menggunakan cara kimiawi maupun enzimatis, akan dihasilkan rantai oligonukleotida *single strand* dengan panjang nukleotida dan ujung A, T, G, C yang berbeda-beda. Keempat macam produk oligonukleotida *single strand* dengan ujung dan panjang yang berbeda ini kemudian dijalankan pada gel sekuensing (banyak digunakan adalah gel sekuensing poliakrilamid) yang berdasarkan pada prosedur elektroforesis, selanjutnya dapat

dibaca pola urutan masing-masing nukleotida dengan teknik tertentu (Handayani, 2003).

Dye terminator labeling yaitu bahan yang memberikan fluoresensi digunakan untuk membedakan urutan nukleotida, yaitu menggunakan *ABI PRISMSM dRhodamine terminator cycle sequencing ready reaction kit*. Sekuensing nukleotida ini menggunakan alat sekuensing otomatis *ABI PRISMSM 310 Genetic Analyzer* untuk panjang sekuens sampai 500 nukleotida dan *ABI PRISMSM 3100 Genetic Analyzer* untuk panjang sekuens sampai 1400 nukleotida



Handayani, 2003.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) telah menyebar luas ke seluruh kota di Indonesia, di mana kejadian luar biasa (KLB) sering terjadi di berbagai daerah. Pada tahun 1998 terjadi KLB dengan jumlah penderita 72.133, dengan 1411 kematian (*Case Fatality Rate/CFR = 2%*) dan merupakan KLB terbesar sejak kasus DBD dilaporkan pada tahun 1968 di Indonesia (Menristek, 2006). Pada tahun 2004 terjadi KLB DBD nasional, yang mencakup 30 propinsi terutama menimpa 293 kota di 17 propinsi di Indonesia. Sebanyak 58.301 kasus terhitung mulai 1 Januari hingga 30 April 2004 dan 658 kematian yang telah tercatat di Departemen Kesehatan dengan CFR 1,1% (WHO, 2004).

Gejala infeksi virus Dengue bervariasi dari ringan sampai berat bahkan menimbulkan kematian (DD, DBD, SSD). Perjalanan penyakit akibat infeksi virus Dengue juga sulit diramalkan. Immunopatogenesis terjadinya infeksi virus Dengue hingga manifestasi klinis belum diketahui dengan jelas. Sampai saat ini belum tersedia obat dan vaksin dengue yang efektif. Faktor mobilitas pendudukpun saat ini juga mulai menjadi sorotan *Citobal spread*, baik intra-wilayah/pulau dan antar-wilayah/pulau juga ditengarai menjadi salah satu faktor penyebab. Globalisasi baik informasi, ekonomi dan transportasi merupakan hal yang berpengaruh untuk terjadinya peningkatan kasus DBD (Dachlan, 2000; Messer, 2003; Nukui, 2006).

Bertambah baiknya transportasi, meningkatnya pariwisata dan arus perdagangan, meningkatnya tenaga kerja Indonesia yang bekerja di luar negeri, menyebabkan peningkatan arus manusia antar-daerah dan antar-negara. Seiring

dengan peningkatan arus manusia tersebut, maka arus perpindahan virus Dengue antar-daerah dan antar-negara juga meningkat. Seperti diketahui, serotipe dan sub tipe virus Dengue di beberapa daerah di Indonesia tidak selalu sama, terutama bila dibandingkan dengan yang ada di luar negeri, khususnya dari beberapa negara yang berbatasan dengan Indonesia. Di samping itu, respons imun dari penduduk di beberapa daerah di Indonesia mungkin juga tak sama, sehingga dapat menyebabkan perbedaan manifestasi klinisnya dan kemungkinan terjadinya infeksi campuran dengan beberapa serotipe virus Dengue yang ada di daerah tersebut. Semua ini menunjukkan perlunya pemetaan epidemiologik, baik dari serotipe maupun sub tipe/genotipe virus Dengue di berbagai daerah di Indonesia dan bila perlu dibandingkan dengan filogenetik serotipe yang sama di luar negeri. Usaha ini, baik serotipe maupun sub tipe/genotipe merupakan pemeriksaan biomolekuler, sehingga pemetaan epidemiologik tersebut merupakan pemetaan epidemiologi molekuler. Sejauh ini penelitian semacam ini belum pernah dikerjakan di Indonesia.

Berbagai hal di atas menyebabkan berkembangnya berbagai penelitian infeksi virus Dengue, khususnya pendekatan epidemiologi molekuler yang difokuskan pada *agent* virus Dengue. Epidemiologi molekuler adalah sebuah ilmu yang memfokuskan pada kontribusi potensial berbagai faktor resiko genetik dan lingkungan, yang diidentifikasi melalui level molekuler, baik terhadap etiologi sebagai penyebab, distribusi dan pencegahan penyakit di dalam keluarga dan lintas populasi. Lahan ilmu baru ini merembak pesat, yang merupakan integrasi penelitian biologi molekuler ke dalam epidemiologi tradisional (Hass, 1997).

Terjadinya manifestasi klinis DD, DBD maupun SSD merupakan suatu rangkaian dari interaksi antara *host-agent-environment*. *Host* yang meliputi berbagai faktor seperti usia, status gizi, faktor genetik, dipengaruhi oleh faktor *environment*

(lingkungan) dan faktor *agent*. Faktor *agent* yang merupakan fokus utama penelitian ini, meliputi serotipe manakah yang menginfeksi *host*: penderita tersebut apakah DEN-1 atau DEN-2 atau DEN-3 ataukah DEN-4, atau mungkin *double infection* yang menyebabkan penderita tersebut jatuh pada klinis DD/DBD/SSD. Di samping serotipe, perlu dicari sub tipe (genotipe) apakah yang terdapat di dalam serotipe tersebut, yang diduga berhubungan dengan manifestasi klinis DD, DBD dan SSD. Sub tipe/genotipe dapat ditentukan dengan mencari susunan/urutan nukleotida dari serotipe genom virus Dengue tersebut. Susunan nukleotida yang diketahui kemudian, dilanjutkan dengan melakukan analisis homologi dan filogenetik.

Perkembangan dalam bidang teknologi laboratorium biologi molekuler, memungkinkan untuk dilakukan penelitian epidemiologi molekuler infeksi virus Dengue di Indonesia yang saat ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat yang serius pada sisi hubungan antara kondisi geografi suatu daerah dengan tipe virus Dengue yaitu adanya perbedaan serotipe dan sub tipe (genotipe)nya. Analisis homologi dan filogenetik dalam hal ini diharapkan dapat menentukan kekerabatan berdasarkan serotipe dan sub tipe yang berdistribusi dan bersirkulasi di berbagai daerah di Indonesia. Dalam penelitian ini akan didapatkan *mapping epidemiologi molekuler* virus Dengue di Indonesia

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan pendekatan epidemiologi molekuler. Rancangan penelitian yang digunakan *cross-sectional*.

4.2. Populasi, Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian adalah semua penderita Demam Dengue (DD), Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Sindrom Syok Dengue (SSD) yang memenuhi kriteria penerimaan sampel

Kriteria penerimaan sampel

1. Anak dan dewasa, meliputi laki-laki dan perempuan
2. Pada pemeriksaan klinis dan laboratorium, menurut WHO 1997, menunjukkan adanya DD atau DBD atau SSD
3. Sampel diambil pada fase akut (saat penderita masuk rumah sakit)
4. Bersedia mengikuti penelitian ini dengan menandatangani formulir persetujuan (*informed consent*)

Kriteria penolakan sampel

Adanya keraguan dalam pemeriksaan klinis dan laboratoris

4.2.2. Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada berbagai daerah di Indonesia, yaitu di pulau Jawa, pulau Sumatra, pulau Kalimantan, pulau Sulawesi, Nusa Tenggara Barat dan Papua. Pengambilan sampel tersebut dilakukan di UPF Ilmu Kesehatan Anak dan UPF Ilmu Penyakit Dalam di berbagai rumah sakit tersebut sesuai dengan prosedur tetap (protap) yang terdapat pada lampiran 1. Cara pengambilan sampel dari masing-masing kota di berbagai kepulauan dilakukan melalui 2 macam cara, yaitu dikirim melalui paket udara dalam box bersuhu 4°C dan sampai di TDC dalam 24 jam, dan cara kedua yaitu diambil langsung oleh peneliti ke tempat tujuan.

Pelaksanaan penelitian dikerjakan di laboratorium Dengue dan laboratorium Hepatitis *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga dan laboratorium Virologi di *Tropical Medicine Nagasaki University*, Jepang.

4.3. Definisi Operasional

1. Demam Dengue (DD) (menurut WHO, 1997)

Pemeriksaan klinis ditandai dengan terjadinya peningkatan suhu mendadak, kadang kala disertai menggigil, nyeri kepala, *flushed face*, nyeri bola mata, nyeri otot serta sendi, disertai uji tourniquet positif dengan atau tanpa petekie.

Pada pemeriksaan laboratoris belum terdapat trombositopenia atau hemokonsentrasi.

2. Demam Berdarah Dengue (DBD)

Grade I ditandai dengan adanya demam disertai gejala tidak khas dan satu-satunya manifestasi perdarahan adalah uji tourniquet positif.

Grade II merupakan gejala DBD derajat 1, disertai perdarahan spontan di kulit atau perdarahan lain.

Pada pemeriksaan laboratoris menunjukkan adanya trombositopenia disertai hemokonsentrasi, baik grade I/II

3. Sindrom Syok Dengue (SSD) merupakan DBD grade III dan DBD grade IV.
Grade III ditandai dengan adanya penderita DBD yang mengalami kegagalan sirkulasi. Hal ini ditandai dengan nadi cepat dan lemah (>120 /menit), penyempitan tekanan nadi (<20 mmHg) atau hipotensi, sianosis di sekitar mulut, disertai akral dingin dan lembab serta gelisah.
Grade IV yaitu suatu keadaan di mana penderita DBD dengan renjatan berat, nadi tak teraba, tekanan darah tidak terukur dan dapat disertai penurunan kesadaran
4. Serotipe virus Dengue adalah suatu istilah pembagian tipe virus Dengue, di mana pemeriksaannya menggunakan teknik biologi molekuler RT-PCR dengan metode standar internasional. RT-PCR Dengue menggunakan berbagai primer yang telah didesain khusus sesuai dengan regio di dalam genom virus Dengue tersebut. Terdapat 4 macam serotipe virus Dengue yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4.
5. Subtipe/ genotipe virus Dengue adalah suatu istilah pembagian molekuler di dalam masing-masing serotipe virus Dengue ke dalam klasifikasi *cluster*. Subtipe/genotipe virus Dengue didapatkan dari produk PCR dari serotipe tertentu yang dilanjutkan dengan pemeriksaan sekuensing nukleotida.
Program komputer PAUP 4.0 digunakan untuk melakukan analisis filogenetik untuk mengetahui subtipe/genotipenya.
DEN-1 dikategorikan ke dalam 3-5 macam genotipe, DEN-2 dikategorikan ke dalam 5-6 macam genotipe, DEN-3 ke dalam 4-5 macam genotipe, DEN-4 dikategorikan ke dalam 2 macam genotipe.

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Pengambilan spesimen darah

1. *Syring* steril 5 ml.
2. Kaps alkohol.
3. Sarung tangan
4. Tabung Eppendorf 1,5 ml steril.
5. Label
6. Parafilm.
7. Lembar isian data, Lembar Persetujuan Mengikuti Penelitian (*Informed Consent*) dan Lembar Persetujuan Tindakan Medik.
8. Tabung reaksi

4.4.2 Penentuan IgM dan IgG antiDengue dengan metode ELISA

1. Spesimen serum
2. Kit Dengue Duo IgM & IgG ELISA (Panbio cat.no. DEN-25E)
3. *Yellow tips*.

4.4.3 Ekstraksi RNA

1. Spesimen serum.
2. Kontrol positif.
3. Kontrol negatif (*aquadestilata/DW/Distilled Water*).
4. Larutan Trizol
5. Chloroform
6. Propanol
7. Etanol 70%.

5. Marker *DNA Molecular Weight Marker VIII (0,019-1,11kbp)* dari *pUC BM 21 DNA Hpa II digested (catalog No. 1 336 045)*
6. Parafilm.
7. Film polaroid.

4.4.5 Purifikasi produk PCR

A Purifikasi produk PCR .

1. Produk PCR.
2. CHCl₃
3. Na Asetat pH 5,2
4. Etanol 100% (absolute)
5. Etanol 70%
6. Bufer TE pH 8,0
7. *Yellow dan blue tips steril.*
8. Tabung Eppendorf 1,5 ml steril

B Deteksi hasil purifikasi produk PCR dengan elektrolisis .

1. Hasil purifikasi produk PCR.
2. Gel agarose (biasa) 2% dengan etidium bromide 10 mg/ml.
3. *TBE buffer 0,5x*
 1. *Loading buffer (bromphenol blue dan glycerol).*
 5. Marker *DNA Molecular Weight Marker VIII (0,019-1,11kbp)* dari *pUC BM 21 DNA Hpa II digested (catalog No. 1 336 045).*
6. Akuadesstilata.
7. Parafilm.

8. Film polaroid.

4.4.6 Labeling

1. Hasil purifikasi produk PCR.
2. *Primers sense* D-1
3. *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Amerika).
4. Akuadestilata.
5. *Yellow tips* steril.
6. *Microtube* 200 µl steril.

4.4.7 Purifikasi pro sekuensing DNA

1. *Sequencing mixture*
2. *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) 125 mM
3. Etanol absolut.
4. Etanol 70%
5. *Yellow tips* steril.
6. Tabung Eppendorf 1,5 ml steril
7. *Plastic wrap*
8. *Aluminium foil*.

4.4.8 Sekuensing DNA

1. *Pellet* DNA kering.
2. *Template suppression reagent* (TSR) (Applied Biosystems, Amerika Serikat).
3. *Yellow tips* steril.
4. *Microcentrifuge tubes* steril.

4.5 Instrumen penelitian

1. *Thermal Cycler* .

- ♣ Untuk amplifikasi DNA : PJ 2000 (Perkin Elmer).
- ♣ Untuk *labeling* : GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).
GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer).

2. ABI Prism 310 *Genetic Analyzer* (Perkin Elmer) yang dilengkapi perangkat komputer dan *printer*.

3. ABI Prism 3100 *Genetic Analyzer* (Perkin Elmer) yang dilengkapi perangkat komputer dan *printer*.

4. *Microcentrifuge* : *High Speed Micro Refrigerated Centrifuge* MRX-150 (Tomy)

5. *Freezer* .

- ♣ TDC : Ultra Low [-80°C dan -30°C] (Sanyo).

6. *Transilluminator UVP Chromato-vue* Model NTM-20 dengan kamera polaroid Mamiya RB67 Pro SD 45 mm.

7. *Biosafety Cabinet* : Bio Clean Bench MCV-16BSF (Sanyo).

8. *Waterbath* : Thermo Supplier EZI-80 (Taitec)

9. *Hot air oven* : Thermotec Sterilizer SF-450 (Sibata)

10. Mikropipet 20 µl, 200 µl dan 1.000 µl.

11. *Spin-down machine* . Milipore.

12. *Vorteks* : Genie-2; TME-21 Test Tube Mixer (Advantec).

13. *Refrigerator* . SR-33M (Sanyo), MK-087W (Mitsubishi).

14. Pompa vakum.

15. *ELISA reader* : Humareader Single.

16. *Plate washing equipment* : Humawash

17. Inkubator dengan temperatur 37°C

18. *Reaction plate* dan penutup berwarna gelap.
19. *Absorbent pad*.
20. *Electrophoresis gel apparatus* Mupid (Advance Co. Ltd.).
21. *Tray* dan *comb* untuk pembuatan gel agarose.
22. Timbangan analitik
23. Tabung Erlenmeyer
24. Gelas ukur.
25. *Microwave* (Sanyo).
26. Tabung reaksi.
27. Pinset.
28. Pengukur waktu
29. Rak tabung Eppendorf.
30. Kontainer berisi sodium hipoklorit 5%.
31. *Ice box* dan *ice pack*.
32. Komputer dengan program ClustalX, *Bioblast Alignment Editor* 7.041 version dan *PAUP* 4.0 version.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi Penelitian

Pengambilan sampel pasien DBD dilakukan dalam kurun waktu tahun 2003-2005, pada berbagai daerah di Indonesia, yaitu di pulau Sumatera, Batam, Kalimantan, Sulawesi, Papua, Jawa, Bali dan Lombok. Pengambilan sampel tersebut dilakukan di Unit Pelaksana Fungsional (UPF) Ilmu Kesehatan Anak dan UPF Ilmu Penyakit Dalam di berbagai rumah sakit di 19 kota di berbagai pulau tersebut.

Pelaksanaan penelitian serologi dan PCR dikerjakan di laboratorium Dengue dan laboratorium Hepatitis Tropical Disease Center Universitas Airlangga. Pengerjaan isolasi kultur virus Dengue, sekueasing DNA dan analisis filogenetik dikerjakan di Laboratorium Virologi, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Jepang.

4.6.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dalam kurun waktu dua tahun dua bulan, mulai bulan Oktober 2003 hingga Desember 2005 .

4.7 Prosedur Pengumpulan Data

4.7.1 Pengumpulan sampel anak dan dewasa, sesuai dengan kriteria WHO, 1997.

Pengumpulan sampel pasien DBD berdasarkan kriteria diagnosis menurut WHO tahun 1997 terdiri dari kriteria klinis dan laboratoris.

Kriteria klinis

- a. Demam tinggi mendadak, tanpa sebab jelas, berlangsung terus-menerus selama 2-7 hari.
- b. Terdapat manifestasi perdarahan, termasuk uji tourniquet positif, petekie, ekimosis, epistaksis, perdarahan gusi, hematemesis dan/ atau melena.
- c. Pembesaran hati.
- d. Syok, ditandai nadi cepat dan lemah serta penurunan tekanan nadi, hipotensi, kaki dan tangan dingin, kulit lembab dan pasien tampak gelisah.

Kriteria laboratoris.

1. Trombositopenia ($100.000/mm^3$ atau kurang).

2. Hemokonsentrasi, dapat dilihat dari peningkatan hematokrit 20% atau lebih, menurut standar umur dan jenis kelamin, atau penurunan hematokrit 20% sesudah terapi cairan.

4.7.2 Cara Pengolahan Sampel

Bahan pemeriksaan berupa darah sebanyak 10cc, dipisahkan semuanya kemudian dibagi ke dalam 2 aliquot.

Aliquot 1, dipakai untuk pemeriksaan serologis, yaitu untuk pemeriksaan antibodi IgM dan IgG antiDengue dengan metode *IgM Captured ELISA* dan *IgG Captured ELISA*

Aliquot kedua akan digunakan untuk pemeriksaan biologi molekuler mulai dari ekstraksi RNA, pemeriksaan RT-PCR regio *capsid* yang dilanjutkan sampai sekuensing regio *capsid*, analisis homologi dan filogenetik. Juga dilakukan kultur virus serta RT-PCR kembali dengan primer khusus untuk regio *envelop*, yang dilanjutkan sampai sekuensing regio *envelop*, analisis homologi dan analisis filogenetik untuk mendapatkan subtype/genotype dari masing-masing serotype virus Dengue

4.7.2.1 Pemeriksaan serologis

Pemeriksaan IgM dan IgG antiDengue dengan metode ELISA (kit Panbio Dengue Duo ELISA cat.no. DEN-25E)

IgM antiDengue

Tujuan .

Uji serologi deteksi IgM antiDengue ditujukan untuk melihat ada atau tidaknya IgM antiDengue guna menentukan fase akut infeksi virus Dengue.

Prinsip Dasar Tes.

Antibodi kelas IgM (termasuk IgM antiDengue), yang terdapat di dalam serum penderita, akan berikatan dengan *antihuman IgM* yang telah diletakkan pada fase padat permukaan dalam dinding polistiren sumuran *microtiter plate*. Konsentrat campuran antigen virus Dengue serotipe 1,2,3,4 yang telah dicernakan, diikatkan dengan konjugat antibodi monoklonal berlabel enzim HRP (*Horse Radish Peroxidase*) membentuk kompleks antigen-Mab-HRP. Kompleks antigen-Mab-HRP ditambahkan ke dalam sumuran yang telah terdapat antihuman IgM-IgM (dari serum penderita). Setelah inkubasi, sumuran dicuci dan diberi substrat TMB / H₂O₂ (*Tetramethylbenzidine-hydrogenperoxide*). Bila dalam serum penderita terdapat IgM antiDengue maka kompleks Ag-Mab-HRP akan dukat pada fase padat. Enzim HRP akan memecah substrat berkromogen membentuk produk berwarna biru. Reaksi dihentikan dengan asam, larutan sekarang menjadi kuning. Intensitas warna sejalan linier dengan konsentrasi antibodi IgM antiDengue di dalam serum penderita.

Berbagai bahan yang digunakan (kit Panbio cat. no. DEN-25E)

1. Serum diluent berisi TBS (*Tris buffered saline*) pH 7,2-7,6.
2. Antigen diluent berisi PBS (*Phosphat Buffer Saline*).
3. Bufer pencuci berisi PBS (*Phosphat Buffer Saline*) pH 7,2-7,6 dengan Tween20.
4. Larutan penghenti reaksi berisi *Phosphoric acid* 1M.

Prosedur pemeriksaan .

1. Serum penderita sebanyak 100 ul yang telah diencerkan (10ul serum + 90ul serum diluent), dimasukkan ke dalam sumuran yang telah ditapisi oleh

antihuman IgM. Perlakuan yang sama dilakukan pada serum kontrol. Serum kontrol sebanyak 100 ul yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam sumuran yang telah dilapisi oleh *antihuman IgM*. Perlakuan yang sama dilakukan juga untuk kalibrator sebanyak 3 kalibrator (triplikat). Tutup *microtiterplate*, kemudian inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.

2. Pencucian dilakukan sebanyak 6 kali dengan bufer pencuci.
3. Kombinasi antigen dengue serotipe 1,2,3,4 diencerkan dengan menggunakan *antigen diluent* menjadi 1/250 (10ul antigen : 2,5 ml *antigen diluent*), selanjutnya siapkan larutan kompleks antigen-Mab-HRP (antigen-konjugat berupa kombinasi antigen dengue 1,2,3,4 di atas dengan pelacak berupa antibodi monoklonal berlabel enzim HRP) Larutan kompleks antigen-Mab sebanyak 100 ul dimasukkan ke dalam sumuran di atas. *Plate* ditutup dan diinkubasi selama 1 jam 37°C. Bila dalam serum terdapat IgM anti antiDengue, maka akan terjadi reaksi antihuman IgM-IgM-Antigen-Mab-HRP.
4. Dalam tahapan berikutnya adalah sumuran dicuci sebanyak 6 kali dengan menggunakan bufer pencuci
5. Selanjutnya 100ul TMB dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada temperatur kamar (20-25°C). Substrat berkomogen kemudian akan berubah warna menjadi biru
6. Larutan penghenti reaksi sebanyak 100ul ditambahkan ke dalam sumuran, dan dicampur merata. Warna larutan akan berubah menjadi kuning.
7. Pembacaan absorbans larutan dari setiap sumuran dilakukan dalam 30 menit, menggunakan fotometer pada panjang gelombang 450 nm dengan filter referens 600-650nm.

Penghitungan .

Unit = Absorbans sampel dibagi rerata absorbans *cut-off* kalibrator (triplikat)

Misal : sampel A absorbans = 0,949,

sampel B absorbans = 0,070,

absorbans rerata *cut-off* kalibrator 0,302

Sampel A $(0,949/0,302) = 3,14$ unit

Sampel B $(0,070/0,302) = 0,2$ unit

Interpretasi Hasil Pemeriksaan IgM antiDengue

< 0,9 unit	- negatif	Interpretasi : IgM antiDengue tidak terdeteksi
0,9-1,1 unit	- <i>equivocal</i>	Interpretasi : sampel <i>equivocal</i> sebaiknya diulang atau dilakukan pengulangan serums baru 7-14 hari lagi.
> 1,1 unit	- positif	Interpretasi : IgM antibodi antiDengue terdeteksi

IgG antiDengue**Tujuan .**

Uji serologik untuk deteksi IgG antiDengue ditujukan untuk melihat adanya antibodi IgG antiDengue guna diagnosis fase infeksi sekunder akut terhadap virus Dengue

infeksi sekunder ditandai dengan tingginya kadar IgG antiDengue yang terdeteksi pada 1-2 hari setelah terinfeksi virus Dengue yang berikutnya, yang akan diikuti oleh timbulnya IgM antiDengue pada hari ke3-5

Uji ELISA untuk deteksi IgG antiDengue dalam pemeriksaan ini dikatakan infeksi sekunder bila kadarnya $> 2,2$ unit (setara dengan titer HI = 1:2560)

Prinsip Dasar Tes

Antibodi kelas IgG (termasuk IgG antiDengue), di dalam serum penderita, akan berikatan dengan *antihuman IgG* yang telah dilekatkan pada fase padat permukaan dalam dinding polistiren sumuran *microtiter plate*. Konsentrat campuran antigen dengue serotipe 1,2,3,4 yang telah diencerkan, diikat dengan konjugat antibodi monoklonal berlabel enzim HRP (*Horse Radish Peroxidase*) membentuk kompleks antigen-Mab-HRP. Kompleks antigen-Mab-HRP ditambahkan ke dalam sumuran yang telah terdapat antihuman IgG-IgG (dari serum penderita). Setelah inkubasi, sumuran dicuci dan diberi substrat TMB/ H_2O_2 (*Tetramethylbenzidine-hydrogenperoxide*). Bila dalam serum penderita terdapat IgG antiDengue, maka kompleks Ag-Mab-HRP akan diikat pada fase padat. Enzim HRP akan memecah substrat berkromogen membentuk produk berwarna biru. Reaksi dihentikan dengan asam, larutan berubah warna menjadi kuning. Intensitas warna sejalan linier dengan konsentrasi antibodi IgG antiDengue di dalam serum penderita.

Berbagai bahan yang digunakan (kit Paubio cat. no. DEN-25E).

1. Serum diluent berisi TBS (*Tris buffered saline*) pH 7,2-7,6
2. Antigen diluent berisi PBS (*Phosphat Buffer Saline*).
3. Bufer pencuci berisi PBS (*Phosphat Buffer Saline*) pH 7,2-7,6 dengan Tween20.
4. Larutan penghenti reaksi berisi *Phosphoric acid* 1M.

Prosedur pemeriksaan .

1. Seratus mikroliter serum penderita yang telah diencerkan (10ul serum + 90ul serum diluent), dimasukkan ke dalam sumuran yang telah dilapisi oleh *antihuman IgG*. Perlakuan yang sama dilakukan pada serum kontrol. Larutan

kontrol sebanyak 100ul yang telah dicerkan dimasukkan ke dalam sumuran yang telah dilapisi oleh *antihuman IgG*. Perlakuan yang sama untuk larutan kalibrator sebanyak 3 kalibrator (triplikat). *Microtiterplate* ditutup, kemudian inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.

2. Pencucian dilakukan sebanyak 6 kali dengan bufer pencuci.
3. Kombinasi antigen dengue serotipe 1,2,3,4 dicerkan dengan menggunakan *antigen diluent* menjadi 1/250 (10ul antigen : 2.5 ml *antigen diluent*), selanjutnya siapkan larutan kompleks antigen-Mab-HRP (antigen-konjugat berupa kombinasi antigen dengue 1,2,3,4 di atas dengan pelacak berupa antibodi monoklonal berlabel enzim HRP). Larutan kompleks antigen-Mab-HRP sebanyak 100 ul dimasukkan ke dalam sumuran di atas. *Plate* ditutup dan diinkubasi selama 1 jam 37°C. Bila dalam sumuran penderita terdapat IgG antiDengue, maka akan terjadi reaksi antihuman IgG-IgG-Antigen-Mab-HRP.
4. Tahapan berikutnya adalah sumuran dicuci sebanyak 6 kali dengan menggunakan bufer pencuci.
5. TMB sebanyak 100 ul di masukkan ke dalam masing-masing sumuran, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada temperatur kamar (20-25°C). Substrat berchromogen kemudian akan berubah warna menjadi biru.
6. Larutan penyetop sebanyak 100 ul ditambahkan ke dalam sumuran, dan dicampur merata. Warna larutan akan berubah menjadi kuning.
7. Pembacaan absorbans larutan dari setiap sumuran dilakukan dalam 30 menit, menggunakan fotometer pada panjang gelombang 450 nm dengan filter referens 600-650nm.

Penghitungan .

Unit = Absorbans sampel dibagi rerata absorbans *cut-off* kalibrator (triplikat)

Misal : sampel A absorbans 1,800,

sampel B absorbans 0,300,

absorbans rerata *cut-off* kalibrator 0,600.

Sampel A $(1,800/0,600) = 3,0$ unit.

Sampel B $(0,300/0,600) = 0,5$ unit.

Interpretasi Hasil Pemeriksaan IgG antiDengue

- < 1,8 unit = negatif Interpretasi : tidak terdapat infeksi sekunder dengue .
tes sebaiknya diulang 4-7 hari lagi dengan sampel serum penderita yang baru.
- 1,8-2,2 unit = *equivocal* Interpretasi : sampel sebaiknya dites ulang 4-7 hari lagi
- > 2,2 unit = positif Interpretasi : dugaan infeksi akut sekunder dengue

Pemeriksaan *Captured ELISA* yang digunakan pada penelitian ini, dapat untuk mendeteksi IgM dan IgG antiDengue, sekaligus dapat untuk membedakan infeksi primer dan infeksi sekunder, walaupun hanya memakai serum tunggal.

Penentuan infeksi primer pada penelitian ini ditandai dengan timbulnya IgM antiDengue > 1,1 unit, sedangkan nilai 0,9-1,1 disebut *equivocal* dan dikatakan negatif bila < 0,9.

Penentuan infeksi sekunder ditandai dengan timbulnya IgG antiDengue yang cukup tinggi, yang telah distandansasi untuk infeksi sekunder, setara dengan kadar uji serologis IIE (*Haemagglutination Inhibition*) > titer 1/2560 . IgG antiDengue dikatakan positif bila > 2,2 unit, *equivocal* bila 1,8-2,2 dan negatif bila < 1,8 .

Khusus untuk infeksi sekunder dengue, tetap positif bila IgG antiDengue > 2,2 unit, baik disertai dengan timbulnya IgM yang positif, *equivocal* ataupun negatif Jadi,

asalkan IgGnya positif, tetap dikatakan infeksi sekunder walau tidak diikuti dengan timbulnya IgM.

4.7.2.2 Pemeriksaan Biologi Molekuler Tahap I

4.7.2.2.1 Ekstraksi RNA dari serum penderita DD, DBD dan SSD

Ekstraksi RNA menggunakan larutan Trizol. Serum sampel pasien sebanyak 60ul ditambah dengan *distilled water (DW)* sebanyak 190 ul, kemudian ditambahkan larutan Trizol sebanyak 750 ul yang kemudian dicampur dengan pipeteman berkali-kali dan dikubasikan beberapa menit pada temperatur ruangan. Chloroform sebanyak 200 ul ditambahkan pada campuran dan dibiarkan pada temperatur ruangan selama 5 menit, kemudian disentrifus 12 000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan sebanyak 500ul diambil kemudian ditambahkan 500 ul propanol-2 sama banyaknya ke dalam tabung Eppendorf baru, dilakukan vortex dan dibiarkan pada temperatur ruangan selama 10 menit. Sentrifus dilakukan kembali 12 000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Lapisan supernatan kemudian dibuang perlahan-lahan dengan pipeteman yang cermat agar RNA yang terbentuk tidak ikut terbawa. Etanol 70% sebanyak 1 ml ditambahkan pada endapan di atas lalu divortex dan pada fase ini endapan dapat disimpan atau dilanjutkan kembali dengan sentrifus 12 000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pembuangan lapisan supernatan diulang kembali kemudian dikeringkan dengan *vacuum pump* selama 10 menit. Pellet yang terjadi disuspensikan dengan DW sebanyak 10ul, selanjutnya siap untuk dilakukan pemeriksaan sintesis cDNA dengan cara RT-PCR.

4.7.2.2.2 Sintesis cDNA & karakterisasi serotipe dengan RT-PCR menggunakan metode Lanciotti

Sintesis cDNA dari *messenger RNA*, dilanjutkan dengan karakterisasi serotipe dengan RT-PCR menggunakan metode Lanciotti pada regio capsid dengan

menggunakan primer serotipe spesifik untuk DEN-1,2,3,4 , kemudian produk hasil cDNA PCR dielektroforesis.

RT-PCR (*semnested-Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*)

Pemeriksaan RT-PCR ditujukan untuk mencari serotipe virus Dengue atau yang dikenal dengan istilah *serotyping*. Penentuan serotipe DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, dilakukan dengan memakai primer dan metode dari Lanciotti (Lanciotti,1992).

Prinsip RT-PCR adalah membuat virus Dengue yang untai RNA menjadi DNA oleh adanya enzim *Reverse Transcriptase*, dilanjutkan dengan PCR yang *semnested*, yaitu sesudah di PCR tahap pertama dengan sepasang primer D1 dan D2 (Dengue 1 dan Dengue 2) yang ditujukan untuk menyangg semua infeksi virus Dengue, baru dilakukan *typing dengan semnested* pada tahap kedua yaitu memakai primer D1 dengan keempat TS (*type specific*) yaitu TS1, TS2, TS3, TS4 bersamasama dalam satu tabung Eppendorf 1,5 ml.

Prinsip PCR terdiri atas tiga tahap yaitu denaturasi untai ganda DNA, selanjutnya *annealing* (penempelan) primer pada DNA targetnya, terakhir *primer extension* (pemanjangan primer) dengan adanya DNA polimerase. Hasil DNA yang terjadi merupakan akumulasi eksponensial dari DNA target yang spesifik. sekitar 2^n di mana n adalah jumlah siklus yang diatur dalam proses PCR ini.

Pada penelitian ini PCR tahap pertama dilakukan sebanyak 35 siklus. menggunakan primer D1 dan D2. Suhu dan waktu yang digunakan untuk denaturasi yaitu 94°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 60 detik dan *extension* 72°C selama 2 menit. Pada akhir siklus ke-35 sampel dipertahankan pada suhu 72°C selama 10 menit. kemudian dilanjutkan PCR tahap kedua yang ditujukan untuk *serotyping*, menggunakan primer *type-specific*, yaitu TS1, TS2, TS3, TS4. Pada tahap dua ini,

PCR juga dilakukan sebanyak 35 siklus, dengan suhu dan waktu yang sama seperti pada tahap satu, yaitu untuk denaturasi yaitu 94°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 60 detik dan *extension* 72°C selama 2 menit. Visualisasi proses penggandaan DNA ini dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain dengan gel elektroforesis atau dengan menggunakan *DNA probe*. Pada penelitian ini dipakai gel elektroforesis yang telah diberi *ethidium bromide* untuk pelacak *band* (pita) dari jenis serotipe yang akan dicari yaitu 482 bp untuk DEN-1, 119 bp untuk DEN-2, 290 bp untuk DEN-3 dan 392 bp untuk DEN-4. Kontrol didapatkan dari hasil isolasi virus DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4.

Marker yang digunakan adalah *DNA Molecular Weight Marker VIII plC BM 21 DNA Hpa II digested, plC BM 21 DNA Dra I - Hind III digested cut no. 1 336 043*

Tabel 4.1 *Primer* pada pemeriksaan serotyping RT-PCR dengue (Lanciotti, 1992).

<i>Primer</i>	Sekuens	Posisi genom	Jumlah dlm bp
D1	5'-TCAATAAGCTGAAACGCGCGAGAAAACCG-3'	134-161	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAAAGTCTTCAGGTTC-3'	616-644	511
TS1	5'-CGTCTCAGTGTATCCGGGG-3'	568-586	482
TS2	5'-CGCCACAAGGRCATGAACAG-3'	232-252	119
TS3	5'-TAACATCAATGAGACAGAGC-3'	400-421	290
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	392

Interpretasi hasil pemeriksaan untuk menentukan serotipe

Serotipe virus Dengue yang menginfeksi penderita ditentukan dengan cara membandingkan hasil *band* pita yang diperoleh pada sampel penderita dengan *band* dari kontrol DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4

4.7.2.3 Pemeriksaan Biologi Molekuler Tahap 2 untuk tahapan sekuensing

4.7.2.3.1 Karakterisasi regio capsid metode RT-PCR

Produk cDNA yang telah didapat dari pemeriksaan RT-PCR Tahap 1 selanjutnya dilakukan pemurnian.

4.7.2.3.2 Pemurnian produk cDNA dengan *Low melting agarose*

Pemurnian produk hasil PCR menggunakan metode *Low melting agarose*

Langkah yang dilakukan adalah

1. Gel agarose 2% disiapkan dengan menggunakan Agarose L (*Low melting agarose*) yang mengandung *ethidium bromide* 1 mg/ml.
2. DNA dari hasil PCR di atas sebanyak 5 μ l ditambah dengan *Loading buffer* sebanyak 1 μ l dipanaskan pada suhu 70^oC selama 2-3 menit . Pada saat diaplikasikan, letak lubang yang akan diisi campuran di atas dibuat berselang selang (satu lubang diisi, satu lubang tidak diisi) tanpa marker. Setelah dielektroforesis, hasil elektroforesis dilihat dengan sinar ultra violet gelombang panjang. Selanjutnya pita DNA dipotong dengan menggunakan *cutter* (tetap disinari ultra violet gelombang panjang), dan *cutter* harus selalu ducuci setiap kali akan memotong pita DNA yang lain
3. Potongan gel agarose yang telah mengandung potongan DNA dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml selanjutnya ditambahkan dengan larutan TE .
4. Gel agarose dicairkan dengan pemanasan pada suhu 70^oC selama 10 menit.

5. Phenol (*TNE: saturated phenol*) 300 ul ditambahkan ke dalam gel agarose cair di atas dan dicampur merata dengan cepat menggunakan pipet, selanjutnya divorteks dan disentrifus 12.000rpm selama 5 menit.
6. Supernatan yang terjadi dipindahkan sebanyak 200-250ul pada tabung Eppendorf 1,5 ml yang lain, dan sisanya ditambah dengan phenol (*TNE: saturated phenol*) 300 ul dan dicampur kembali merata dengan cepat menggunakan pipet, selanjutnya divorteks dan disentrifus 12.000rpm selama 5 menit.
7. Supernatan yang terjadi dipindahkan kembali ke dalam tabung Eppendorf yang baru kemudian ditambah dengan 150-200 ul $CHCl_3$, dan divorteks serta disentrifus 12 000 rpm selama 3 menit.
8. Supernatan dipindahkan kembali sebanyak 150-200 ul ke dalam tabung Eppendorf baru dan dilakukan pengendapan ethanol dengan cara menambahkan $1/10 \times$ volume 3M NaAc (pH 5.2) sebanyak 15 ul dan 2 x volume ethanol 100 % sebanyak 300 ul, selanjutnya divorteks dan simpan pada suhu $-20^{\circ}C$ selama 30 menit
9. Sentrifugasi dilakukan pada 14000 rpm selama 10 menit, selanjutnya supernatan dibuang secara hati-hati
10. Pellet (endapan) dicuci dengan ethanol 70% sebanyak 550 ul , kemudian disentrifus pada 12000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang hati-hati
11. Pellet dikeringkan dengan mesin pompa vacuum selama 10 menit, selanjutnya disuspensikan dengan larutan TE sebanyak 10 ul pH 8.
12. DNA dapat disimpan pada suhu $-20^{\circ}C$ dan siap untuk diamplifikasi kembali sebelum masuk alat *sequencer*.

4.7.2.3.3 Pelabelan cDNA

Hasil pemurnian di atas kemudian dilabel dengan primer *sense* (D-1), selanjutnya dilakukan sekuensing nukleotida

4.7.2.3.4 Sekuensing nukleotida dari regio capsid

Hasil pemurnian cDNA dengan menggunakan *Low Melting Agarose* dan pelabelan cDNA dengan menggunakan primer *sense*, dilanjutkan PCR dan sekuensing untuk mendapatkan susunan nukleotida. Susunan nukleotida yang di atas, ditentukan dengan menggunakan *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)* dan alat sekuensing otomatis *ABI Prism⁵⁵ 310 Genetic Analyzer*. Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan bertahap. Untuk *multiple alignment* digunakan program *Clustal X*, dilanjutkan dengan analisis *sequence homology data* yaitu menggunakan program komputer *BioEdit Sequence Alignment Editor* versi 7.0.11 Hasil sekuensing dari penelitian ini dibandingkan dengan data referensi dari berbagai isolat dengue negara lain di dunia. Analisis homologi dipotong pada regio capsid, dengan panjang nukleotida yang proporsional di antara kedua primer. Selanjutnya dilakukan analisis filogenetik dengan menggunakan program komputer *PAUP* versi 4.0 dibandingkan dengan referensi yaitu dari *international DNA data banks* (GenBank, WMBL, DDBJ) juga menggunakan susunan nukleotida hasil sekuensing dengan panjang yang sama di antara kedua primer *sense* dan *antisense*. Kekerabatan intra-serotipe dan juga terhadap referensi, dapat ditentukan dengan analisis filogenetik di antara sesama sampel serotipe yang sama dibandingkan dengan referensi.

4.7.2.4 Penentuan genotipe/subtipe

Selanjutnya pada perwakilan sampel serum DBD dari 19 kota tersebut, dilakukan isolasi kultur virus Dengue, sekuensing DNA. Analisis filogenetik dikerjakan di Laboratorium Virologi, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Jepang. Virus yang tumbuh melalui 2-3 kali pasase dengan menggunakan C6/36 *Aedes albopictus* cell monolayers dalam Eagle's minimal essential medium (E-MEM) yang telah diperkaya dengan 2% fetal calf serum (FCS), mengalami pemeriksaan ELISA untuk menentukan tingginya kadar antigen virus Dengue sampai kadar lebih dari 400 IU/mL. Setelah dilakukan *multiplex PCR* (lihat lampiran 14) menggunakan primer khusus untuk regio envelop (Islam MA, *personal communication*) untuk kepastian serotipe virus Dengue yang tumbuh, dilakukan sekuensing DNA. Penentuan subtipe/genotipe ini digunakan regio envelop. Dua pasang primer *sense* dan *antisense* dari regio envelop yang digunakan menempati posisi 1261 – 2626 (1365 bp) dan 348 – 1451 (1103 bp).

Reaksi sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan *BigDye Dideoxy Terminator sequencing kit* (Applied Biosystems) dan produknya dianalisis menggunakan alat otomatisasi *DNA sequencer ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer*. Berbeda dengan penentuan sekuensing regio capsid, yang memakai alat *DNA sequencer ABI Prism 310*, dengan memakai *DNA sequencer ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* dapat ditentukan sekuens nukleotida regio envelop yang dapat mencapai panjang nukleotida hingga 1400 basa nukleotida. Penentuan sekuens nukleotida regio envelop ini menggunakan 2 pasang primer *sense* dan *antisense* (lihat lampiran 12 dan 13).

Pembentangan sekuens untuk melihat susunan basa nukleotida menggunakan program DNASIS. Hasil sekuens dilakukan *multiple alignment* terhadap berbagai

urutan/sekuens referens DEN-2 untuk serotipe DEN-2 dan demikian pula untuk DEN-3. Semua data sekuens yang dilakukan pada penelitian ini diakses dari GenBank.

Sekuens yang telah dilakukan *multiple alignment* dengan program ClustalX, kemudian dilakukan analisis filogenetik. *PAUP software* versi 4.0 dapat dipakai untuk menentukan *phylogenetic tree*-nya. Berdasarkan *phylogenetic tree* tersebut, kemudian didapat pola genotipe dari masing-masing serotipe.

4.7.3 Pengendalian Mutu (*Quality Control*)

4.7.3.1 ELISA

Pada pemeriksaan ELISA selalu disertakan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil kontrol positif harus memberikan nilai absorbans yang positif dan kontrol negatif harus memberikan nilai negatif. Apabila terdapat penyimpangan, maka pemeriksaan kontrol harus diulang dengan mengevaluasi di mana letak terjadinya penyimpangan, apakah penyimpanan kit reagen, kontrolnya yang rusak atau penyimpangan pada alat. Adapun pemantapan mutu untuk *Coefficient Variation* (CV) pemeriksaan ELISA sangat baik yaitu untuk *intra-assay* 3-10% dan *inter-assay* < 15%.

4.7.3.2 PCR

Ruangan yang dipakai untuk pemeriksaan uji PCR Dengue ini terbagi dalam 3 ruangan yaitu ruangan tempat ekstraksi RNA, ruangan tempat dilakukan amplifikasi DNA dan ruangan untuk pembacaan hasil yang diatur sedemikian rupa sehingga tidak memungkinkan terjadinya kontaminasi. Kontrol positif dan kontrol negatif harus selalu disertakan untuk validasi hasil uji PCR. Kontrol positif meliputi kontrol positif DEN-1 (482 bp), DEN-2 (119 bp), DEN-3 (290 bp), DEN-4 (392 bp) yang didapat

dari hasil isolasi virus DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4 , serta kontrol negatif berupa aquadestilata (DW).

4.7.3.3 Sekuensing DNA

Validasi hasil sekuensing DNA, dilihat dari hasil *electropherogram*-nya. *Electropherogram* yaitu gambar grafik hasil sekuensing DNA , yang kualitasnya baik akan diolah lebih lanjut. Kualitas yang baik dilihat dari gelombang basa nukleotida yang timbul tidak saling bertumpang tindih, dan tidak terdapat basa nukleotida yang meragukan. Penilaian kualitas *electropherogram* juga dapat dilihat dari kemampuan alat *sequencer* dalam menampilkan kualitas kemurnian DNA dari *PCR template* berdasarkan ekspresi sinyal yang tampak (lihat lampiran 10)

4.8 Pengolahan dan Analisis Data serta Evaluasi Hasil Penelitian

Sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan *BigDye Dideoxy Terminator sequencing kit* pada alat otomatisasi DNA *sequencer* ABI Prism 310. *Electropherogram* , sebagai hasil sekuensing DNA , yang kualitasnya baik akan diolah lebih lanjut. Pertama kali dilakukan *multiple alignment* dengan menggunakan program ClustalX, di mana akan terlihat susunan nukleotida yang tertata rapi dan akan tampak urutan nukleotida yang sama ataupun yang berbeda di antara sampel dengan serotipe yang sama (lihat lampiran 6 dan 7). Analisis homologi dilakukan dengan menggunakan program *Biobit Sequence Alignment Editor version 7.0.1* menggunakan komputer, di mana sekuens nukleotida virus Dengue sampel penelitian masing-masing kota pada regio yang sama (epsid) dan panjang nukleotida yang sama, dibandingkan dengan sekuens nukleotida virus Dengue sampel penelitian dari

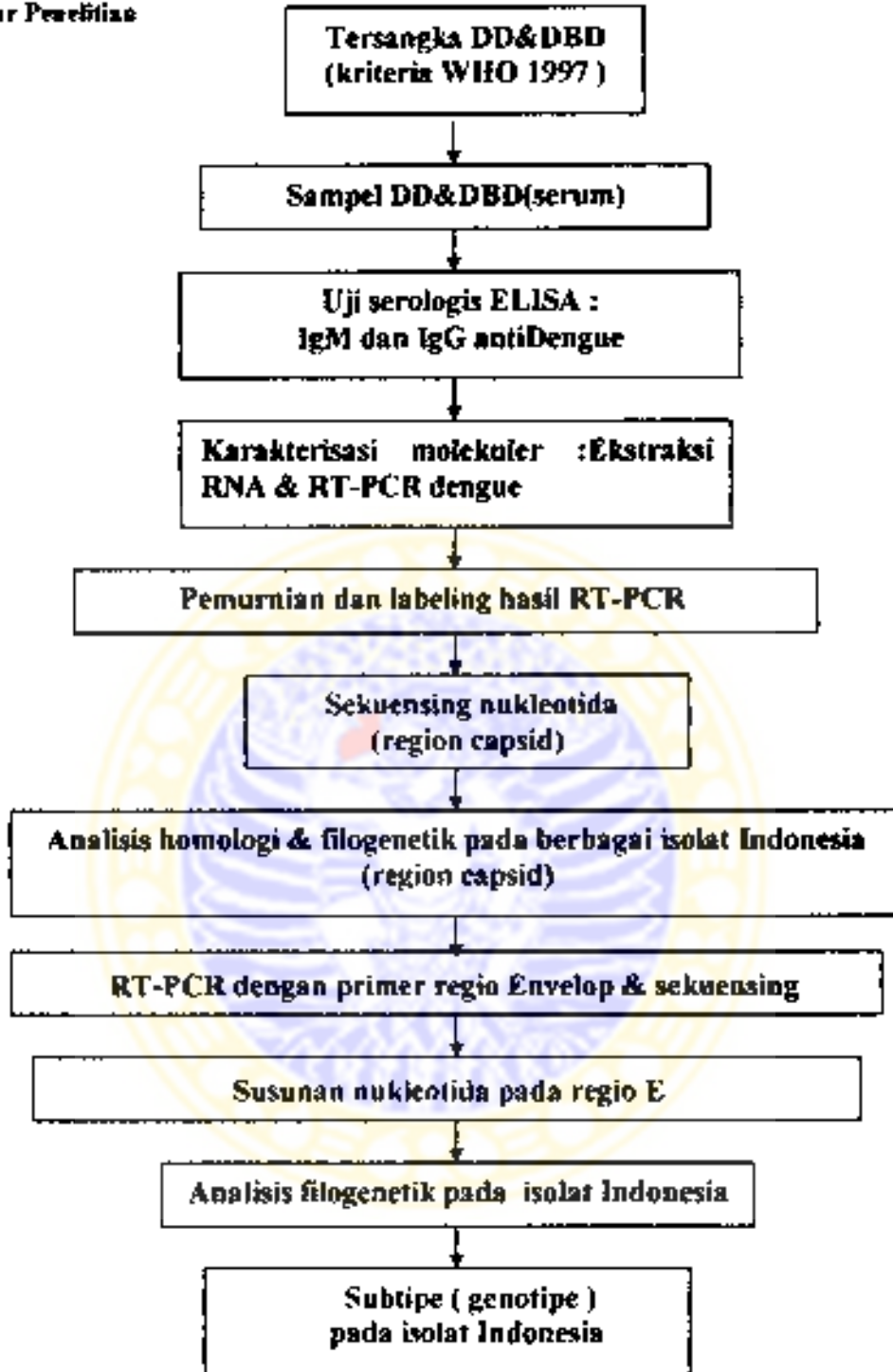
kota yang berbeda serta sekuens virus Dengue referens yang diperoleh dari *international DNA data banks* (GenBank, WMBL, DDBJ).

Analisis filogenetik dilakukan dengan mengkalkulasi kemiripan sekuens nukleotida di dalam regio yang sama. Selanjutnya, *dendrogram/phylogram* atau pohon filogenetik direkonstruksi dengan *clustering algorithm* menggunakan program PAUP versi 4.0 dengan menggunakan komputer. Dalam penelitian ini didapatkan 2 macam pohon filogenetik, yaitu yang pertama adalah pohon filogenetik dari sampel yang berasal dari berbagai kota di Indonesia dibandingkan referens dalam serotipe yang sama, menggunakan regio capsid. Pohon filogenetik yang berikutnya adalah untuk penentuan letak isolat di dalam *cluster group* yang disebut sub tipe/genotipe.

Penentuan sub tipe/genotipe virus Dengue dilakukan dengan cara bertahap, yaitu dimulai dari hasil isolasi virus yang positif, kemudian dilakukan uji PCR dan sekuensing nukleotida dengan menggunakan regio envelop. Hasil sekuensing nukleotida dilakukan *multiple alignment* dengan menggunakan program komputer (*Clustal X software ver. 1.83*). Kalkulasi *evolutionary distances* menggunakan metode *Kimura-3 Parameters*. Analisis filogenetik dilakukan dengan mengkalkulasi kemiripan sekuens nukleotida. Selanjutnya, pohon filogenetik/*phylogram* (*Neighbor Joining tree*) direkonstruksi dengan *clustering algorithm* menggunakan *Phylogenetic analysis using parsimony (PAUP) software* versi 4.0. Semua data sekuens yang dilakukan pada penelitian ini diakses dari *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ)/*European Molecular Biology Laboratory* (EMBL)/*GenBank*.

Berlandaskan pada susunan di dalam *phylogram*, dapat ditentukan jenis sub tipe/genotipe dan masing-masing serotipe virus Dengue.

Berbagai data hasil penelitian lainnya seperti profil serologis jenis infeksi dan hasil PCR diolah, disajikan dan dianalisis dengan statistik deskriptif.

Alur Penelitian

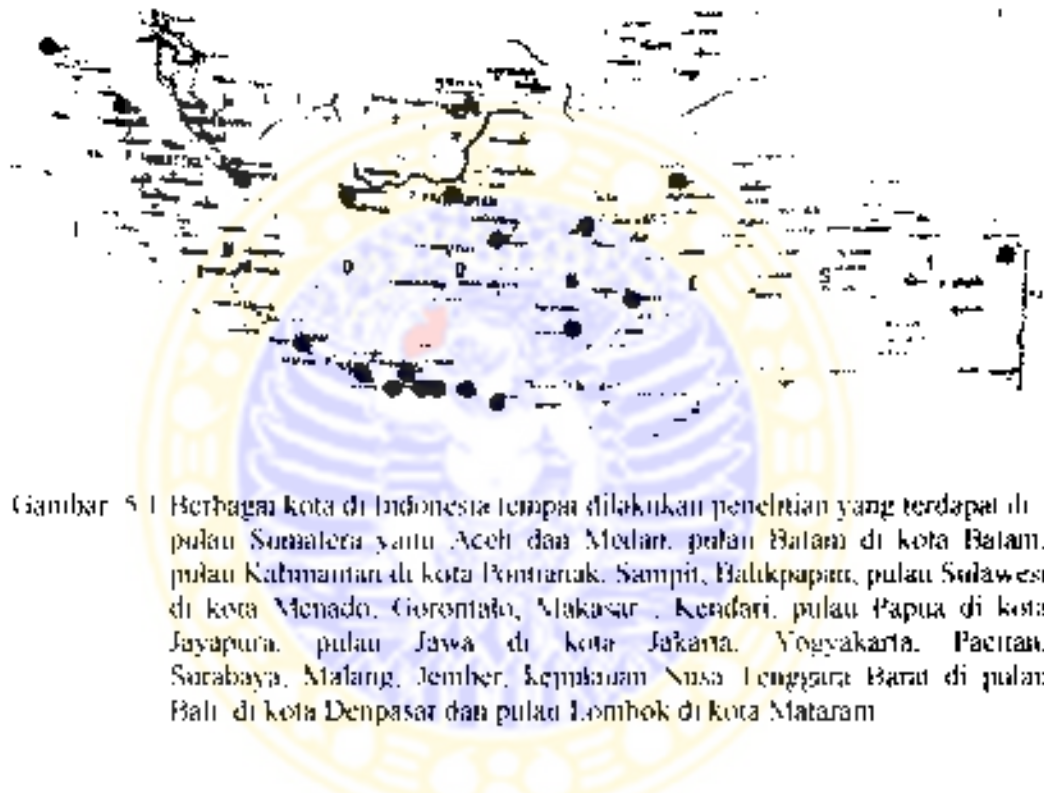
BAB 5

HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian ini difokuskan pada lima pokok temuan utama sebagai berikut

5.1 Hasil Pola serologis jenis infeksi penderita DBD di Indonesia

Penelitian dilakukan terhadap pasien DBD dengan kriteria WHO, 1997 dan telah dilakukan pemeriksaan IgM dan IgG antiDengue. Sampel pasien ini dikumpulkan dari 19 kota di Indonesia dalam kurun waktu tahun 2003-2005.



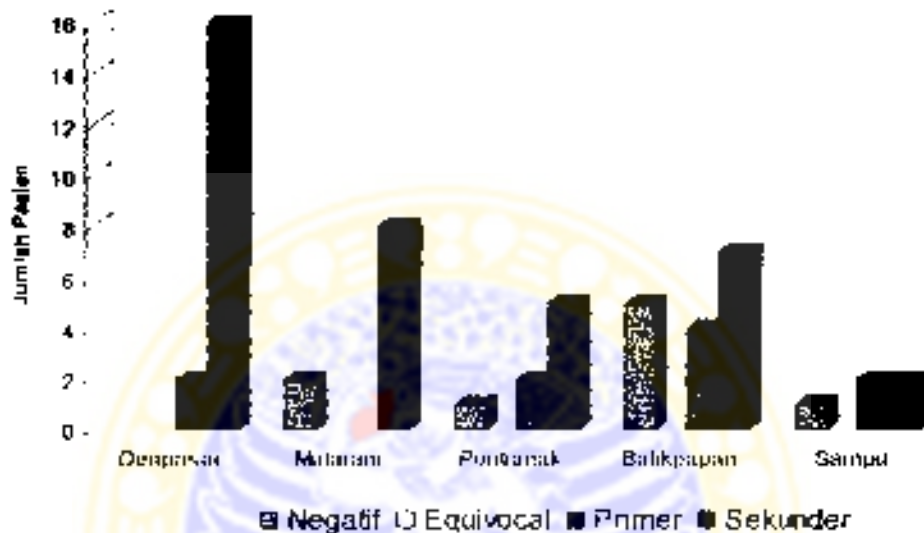
Gambar 5.1 Berbagai kota di Indonesia tempat dilakukan penelitian yang terdapat di pulau Sumatera yaitu Aceh dan Medan, pulau Batam di kota Batam, pulau Kalimantan di kota Pontianak, Sampit, Balikpapan, pulau Sulawesi di kota Makassar, Gorontalo, Kendari, pulau Papua di kota Jayapura, pulau Jawa di kota Jakarta, Yogyakarta, Pacitan, Surabaya, Malang, Jember, Kepulauan Nusa Tenggara Barat di pulau Bali di kota Denpasar dan pulau Lombok di kota Mataram

Dalam penelitian ini telah terkumpul sebanyak 525 serum penderita DBD, yang berasal dari berbagai pulau yaitu pulau Sumatera diwakili oleh Aceh sebanyak 7 sampel dan Medan sebanyak 9 sampel, sedangkan Palembang tidak terdapat sampel karena keberhasilan tidak tercapai dalam menemukan jentik nyamuk *Aedes aegypti*. Pulau Batam yang diwakili oleh kota Batam, dari 2 lokasi rumah sakit didapatkan 7 sampel. Pulau Jawa yang terdiri dari Jawa Barat diwakili oleh Jakarta, yaitu dari 3 lokasi rumah sakit didapatkan 127 sampel. Jawa Tengah yang diwakili oleh

Yogyakarta sebanyak 5 sampel. Terdapat 9 sampel dari Solo, namun karena tidak reliabel maka tidak diikuti dalam sampel penelitian ini. Jawa Timur yang diwakili oleh Pacitan ditemukan sebanyak 28 sampel. Surabaya sebanyak 124 sampel, Malang sebanyak 65 sampel dan Jember 61 sampel. Nusa Tenggara Barat diwakili oleh pulau Bali dan Lombok. Di pulau Bali yang diwakili oleh Denpasar ditemukan sebanyak 18 sampel dan di pulau Lombok yang diwakili oleh Mataram diperoleh sebanyak 10 sampel. Pulau Kalimantan yang diwakili oleh Pontianak ditemukan sebanyak 8 sampel, Sampit 5 sampel dan Balikpapan 16 sampel. Pulau Sulawesi yang diwakili oleh Manado didapatkan 8 sampel, Gorontalo 11 sampel, Makassar 10 sampel dan Kendari 5 sampel. Papua yang diwakili oleh Jayapura didapatkan 6 sampel. Semua sampel serum penderita DBD di atas dilakukan pemeriksaan IgM dan IgG antiDengue dengan metode IgM dan IgG *Captured ELISA*. Hasil pemeriksaan ELISA dari ke 19 kota ini di sajikan di dalam tabel 5.1 dan gambar 5.2 sampai dengan gambar 5.7 . Terdapat 4 macam hasil di dalam penentuan pola serologis ini, yaitu hasil negatif, *equivocal*, infeksi primer dan infeksi sekunder. Hasil *equivocal* adalah nilai unit yang didapat antara hasil negatif dan positif sesuai interpretasi hasil baik IgM antiDengue maupun IgG antiDengue. Hasil *equivocal* yang dijumlah dalam penelitian ini adalah hasil *equivocal* IgM saja, *equivocal* IgG saja maupun gabungan *equivocal* IgM dan IgG antiDengue.

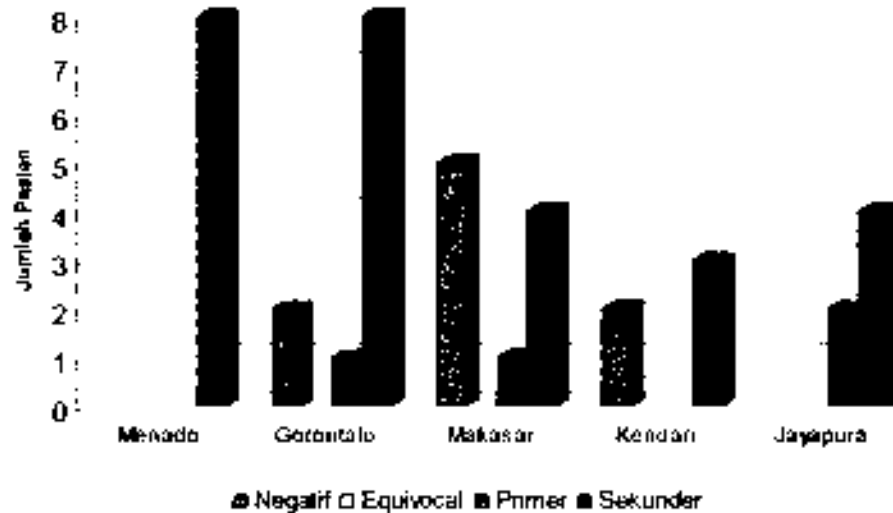
Di pulau Jawa, baik di Jakarta, Surabaya, Malang, Jember dan Pacitan menunjukkan dominasi infeksi sekunder. Di Yogyakarta keseluruhan sampel adalah infeksi sekunder.

Gambar 5.4 Pola Serologis Infeksi Primer dan Sekunder Dengue pada berbagai kota di pulau Bali, Lombok dan Kalimantan



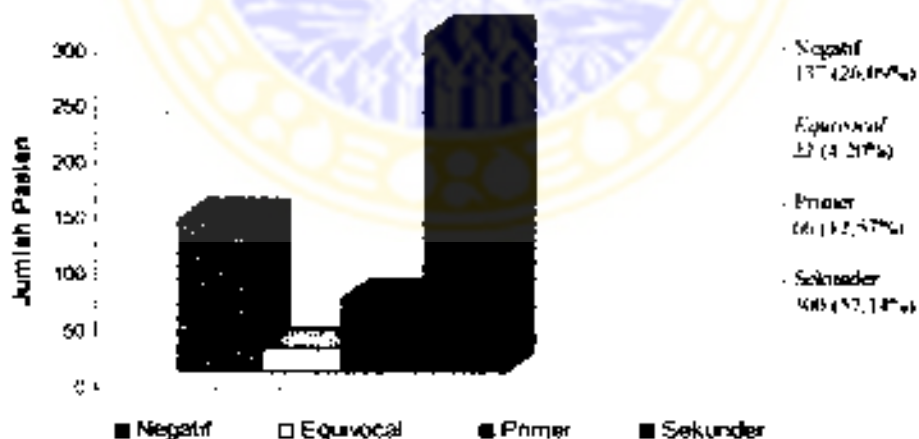
Demikian juga di Denpasar, Mataram, Pontianak dan Balikpapan, pola infeksi virus Dengue didominasi oleh infeksi sekunder, sedangkan di Sampit untuk pola infeksi sekunder sama banyaknya dengan *equivocal*.

Di pulau Sulawesi, yaitu di Manado semua sampel dengan gejala klinis dan laboratoris DDB ini menunjukkan infeksi sekunder, sedangkan di Gorontalo, Makassar dan Kendari walau juga ada hasil negatif namun tetap didominasi infeksi sekunder. Di Papua yang diwakili oleh Jayapura, infeksi virus Dengue dalam bentuk dominasi sekunder namun juga ada infeksi primer.

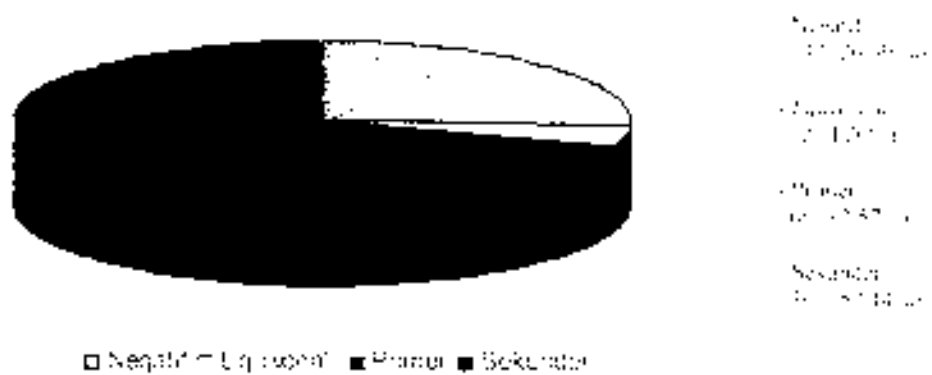


Gambar 5.5 Pola Serologis Infeksi virus Dengue di pulau Sulawesi dan Papua

Secara keseluruhan, pola infeksi yang didapat yaitu dominasi infeksi sekunder sebanyak 57,14% (300/525), sedangkan infeksi primer sebanyak 12,57% (66/525), kondisi *equivocal* sebanyak 4,20% (22/525) dan negatif sebanyak 26,09% (137/525). Hal ini menunjukkan bahwa pola serologis infeksi virus Dengue masih didominasi oleh infeksi sekunder.



Gambar 5.6 Profil Serologis Jenis Infeksi Primer dan Sekunder Dengue di 19 kota di Indonesia (diagram batang)



Gambar 5.7. Profil Serologis Jenis Infeksi Primer dan Sekunder Dengue di 19 Kota di Indonesia (diagram pie)

5.2 Hasil Pola serotipe virus Dengue yang terdapat di Indonesia

Tidak selanjut sampel serum penderita dilakukan pemeriksaan PCR namun secara random sebanyak 192 sampel yang mewakili daerah penelitian dilakukan pemeriksaan PCR. Perwakilan sampel dari berbagai kota yaitu 2 sampel dari Aceh, 2 sampel dari Medan, 2 sampel dari kota Batam, 8 sampel dari kota Pontianak, 3 sampel dari Sampit, 13 sampel dari Balikpapan, 3 sampel dari Manado, 8 sampel dari Gorontalo, 10 sampel dari Makassar, 5 sampel dari Kandangan, 3 sampel dari Jayapura, 16 sampel dari Jakarta, 8 sampel dari Yogyakarta, 13 sampel dari Pacitan, 31 sampel dari Surabaya, 21 sampel dari Malang, 31 sampel dari Jember, 14 sampel dari Denpasar dan 3 sampel dari Mataram.

Tabel 5.2 Pola serotipe virus Dengue pada penderita DBD di 19 kota di Indonesia

KOTA	JUMLAH PENDERITA	SEROTIPE				PCR +
		D1	D2	D3	D4	
Batam	3	-	3	-	1	4
Aceh	2	-	1	1	-	2
Medan	3	-	2	1	1	4
Jakarta	16	-	2	4	-	6
Yogya	5	-	-	-	-	-
Surabaya	31	-	20	4	1	25
Malang	21	-	14	-	3	17
Jember	31	-	5	1	2	8
Pacitan	13	-	8	-	-	8
Denpasar	14	-	1	-	-	1
Mataram	3	-	2	-	-	2
Pontianak	8	-	-	-	-	-
Halkpapan	13	3	3	-	1	7
Sampit	4	4	1	-	-	5
Manado	3	-	1	-	-	1
Gorontalo	6	-	2	-	-	2
Makasar	10	-	-	1	-	1
Kendari	3	1	-	1	-	2
Jayapura	3	-	-	2	3	5
TOTAL	192	8(8%)	65(65%)	15(15%)	12(12%)	100(52%)

Dari 192 perwakilan sampel yang dilakukan PCR, terdapat 100 sampel (52%) yang hasil PCRnya positif, sedangkan 92 sampel (48%) sisanya memberikan hasil PCR negatif. Tampak di sini dominasi DEN-2 mencapai 65 sampel (65%) dari 100 sampel PCR positif, diikuti DEN-3 sebanyak 15 %, DEN-4 sebanyak 12% dan Den-1 (8%). Terdapat hal menarik yaitu terdapat masing-masing 1 penderita di Aceh dan di Surabaya yang di dalam serumnya ternyata hasil PCR *mixed-infection* yaitu DEN-2 dan DEN-3 secara bersama-sama. Klinis penderita tersebut didiagnosis Syok Sindrom Dengue (SSD).

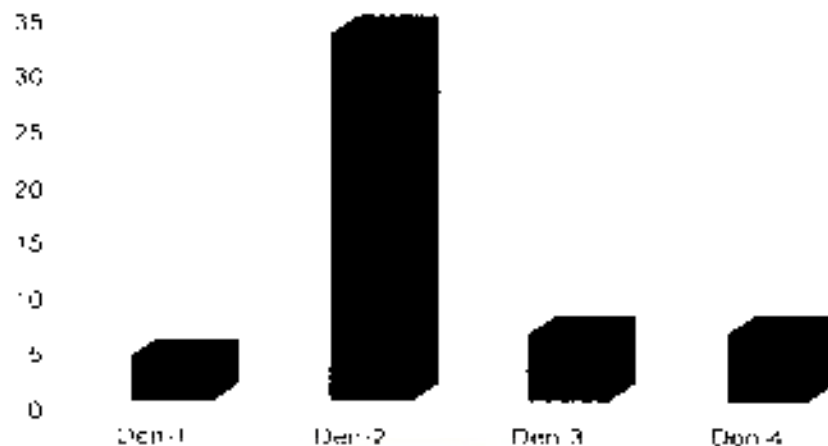
Dari data mengenai gradasi klinis DBD yang berhasil dikumpulkan, dalam penelitian ini diwakili oleh daerah Jawa Timur yaitu kota Surabaya, Malang, Jember, dapat dilihat dalam tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hubungan serotipe dengan gradasi klinis DBD di Jawa Timur (Surabaya, Malang, Jember)

Derajat berat	Surabaya	Malang	Jember	Total
Grade I	5, DEN-2 1, DEN-3	0	1, DEN-2	6, DEN-2 1, DEN-3
Grade 2	2, DEN-2 1, DEN-3	7, DEN-2	5, DEN-2	14, DEN-2 1, DEN-3
Grade 3	2, DEN-2	0	0	2, DEN-2
Grade 4	1, D2&3 1, DEN-4	1, DEN-2	0	1, DEN-2 1, D2&3 1, DEN-4
Total	9, DEN-2 2, DEN-3 1, D2&3 1, DEN-4	8, DEN-2	6, DEN-2	23, DEN-2 2, DEN-3 1, D2&3 1, DEN-4

Terdapat 27 penderita dengan rincian 7 sampel DBD grade I yaitu 6 sampel menunjukkan DEN-2 dan 1 sampel DEN-3, 15 sampel DBD grade II yaitu 14 sampel DEN-2 dan 1 sampel DEN-3, 2 sampel grade III yaitu serotipe DEN-2 dan 3 sampel grade IV yaitu 23 sampel DEN-2, 1 sampel *mixed infection* antara DEN-2 dan DEN-3 serta 1 sampel DEN-4. Hal ini menunjukkan bahwa manifestasi DEN-2 yang dominan dalam penelitian ini, dapat menyebabkan berbagai macam manifestasi klinis gradasi DBD mulai dari grade I sampai dengan grade IV (SSD).

Presentase distribusi serotipe virus Dengue di Indonesia dapat dilihat pada gambar 5.8



Gambar 5.8 Presentase distribusi serotipe virus Dengue di Indonesia tahun 2003-2005 yaitu DEN-1 sebanyak 8% (8/100), DEN-2 sebanyak 65% (65/100), DEN-3 sebanyak 15% (15/100), DEN-4 sebanyak 12% (12/100)



Gambar 5.9 Hasil PCR Dengue dari berbagai sampel pasien DBD

Keterangan gambar

- Lane 1 Marker *DNA Molecular Weight Marker VII (0.019 1,11kbps dan plUCBVI 21 DNA I Ipa II digested) cat. No. 13366451*
- Lane 2 Kontrol positif DEN-1 (482 bp), DEN-2 (119 bp), DEN-3 (290 bp), DEN-4 (392 bp)
- Lane 3 Kontrol negatif
- Lane 4 17 sampel pasien DBD yaitu DEN-2 untuk lane 4, 9, 10, 11, 14, 17, DEN-3 untuk lane 13 dan 16, DEN-4 untuk lane 6

Pada gambar 5.9 di atas adalah contoh hasil pemeriksaan PCR dari beberapa sampel penderita DBD. Kolom kiri berupa marker *DNA Molecular Weight Marker VIII* (0,019-1,11kbp) dari *pUC⁺ BM 21 DNA Hpa II digested* (catalog No. 1 336 045). Kolom kedua berisi kontrol positif DEN-1 (482 bp), DEN-2 (119 bp), DEN-3 (290 bp), DEN-4 (392 bp) yang didapat dari hasil kultur virus Dengue yang positif, selanjutnya kolom ke 3-17 berisi hasil PCR penderita DBD.

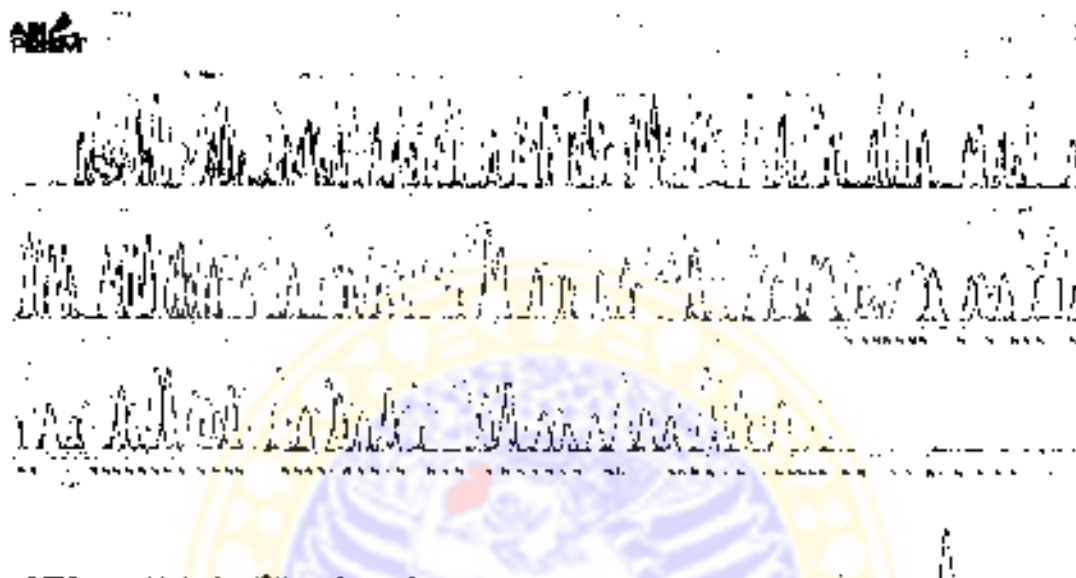
5.3 Hasil analisis homologi dari susunan nukleotida berbagai serotipe pada berbagai daerah di Indonesia

DNA hasil amplifikasi PCR dilakukan pemurnian DNA dan pelabelan DNA, selanjutnya dilakukan sekuensing untuk melihat susunan nukleotida dengan menggunakan *Big Dye Terminator v1.1 Cycle sequencing kit* kemudian dibaca dengan menggunakan mesin *sequencer ABI Prism-310*. Pada penelitian ini kami fokuskan pada analisis nukleotida regio kapsid DEN-2 dan DEN-3 karena merupakan serotipe yang paling dominan dalam penelitian ini.

Sekuensing juga dilakukan pada semua perwakilan serum dari kota yang hasil PCR nya positif, yaitu Aceh, Medan, Batam, Sampit, Balikpapan, Manado, Gorontalo, Makassar, Kendari, Jakarta, Pacitan, Surabaya, Malang, Jember, Denpasar, Mataram dan Jayapura. Terdapat 2 kota di mana semua hasil PCRnya negatif yaitu di Yogyakarta dan Pontianak. Terdapat 17 kota lain yang PCRnya positif, namun tidak semua hasil ini representatif untuk dilakukan homologi.

Dari elektroferogram yang dapat dianalisis, untuk serotipe DEN-2 terdapat 15 isolat yang mewakili daerah Surabaya, Malang, Jember, Pacitan, Jakarta, Mataram, Aceh, Batam, Gorontalo dibandingkan dengan regio kapsid dari isolat referensi yaitu Jamaica, Venezuela, Mexico, Thailand yang juga memiliki serotipe DEN-2. Untuk serotipe DEN-3 terdapat 3 sampel yang kualitas elektroferogramnya bagus yaitu

Medan, Kendari dan Jayapura, dibandingkan dengan Martinique (Amerika Tengah) dari regio capsid. Berbagai sampel dengan serotipe DEN-3 ini dapat dilihat analisis homologinya pada tabel 5.4 dan *multiple alignment*-nya pada lampiran 6.



Gambar 5.10 Contoh elektroferogram hasil sekuensing sampel dari kota Kendari

Gambar elektroferogram di atas adalah dari kota Kendari dimana hasil PCRnya positif dinyatakan DEN-3 dan hasil sekuensingnya pun juga sesuai dengan primer untuk DEN-3. Sampel dari Kendari, Medan dan Jayapura dapat dilihat hasil analisis homologinya pada tabel 5.5. *Multiple alignment* terhadap ketiga kota ini dibandingkan referens Martinique dapat dilihat pada lampiran 7.

Dari hasil sekuensing DNA pada beberapa hasil sampel DEN-2 yang dilakukan analisis homologi, dapat dilihat bahwa isolat dari Jawa Timur yaitu Surabaya, Malang, Pacitan dan Jember terdapat homologi yang berkisar antara 77,4-97,5% (lihat tabel 5.4), namun dibandingkan Jakarta ternyata terdapat perbedaan yang cukup hermakna. Terdapat 2 sampel dari Jakarta yaitu Jakarta-1 dan Jakarta-12. Homologi untuk sampel Jakarta-12 cukup bagus dibandingkan Jawa Timur, yaitu di atas 73%.

namun terhadap Jakarta-1, dan sampel di luar Jawa (Aceh, Mataram, Batam, Gorontalo) terdapat homologi di bawah 50%. Secara kasar, bila dilihat dari tampilan *multiple alignment* di lampiran 6, homologi antar sampel ini terbagi dalam 2 kelompok, yaitu homologi di atas 50% yaitu yang berkisar antara 55,1% - 97,5% dalam kelompok dalam tabel 5.4 berwarna hitam. Untuk kelompok kedua yaitu homologi di bawah 50% yaitu berkisar antara 21,6%-43,2% yang berwarna merah. Perbedaan homologi ini akan tampak jelas, dalam pohon filogenetik pada gambar 5.11. Bila dilihat dari analisis filogenetik, terdapat perbedaan bermakna di antara kelompok Jawa Timur, Jakarta-12 dan kelompok Jakarta-1, Batam dan Gorontalo. Aceh dan Mataram walau memiliki homologi yang tidak tinggi, namun dalam pohon filogenetik masih termasuk dalam *clade* yang sama dengan Jawa Timur dan Jakarta12.



Tabel 5.5 Analisis homologi nukleotida dari serotipe DEN-3

	Martinique (Amerika Tengah)	Jayapura	Kendari	Medan
Martinique (Amerika Tengah)		83,3%	91,8%	90,1%
Jayapura	83,3%		86,4%	87,9%
Kendari	91,8%	86,4%		92,4%
Medan	90,1%	87,9%	92,4%	

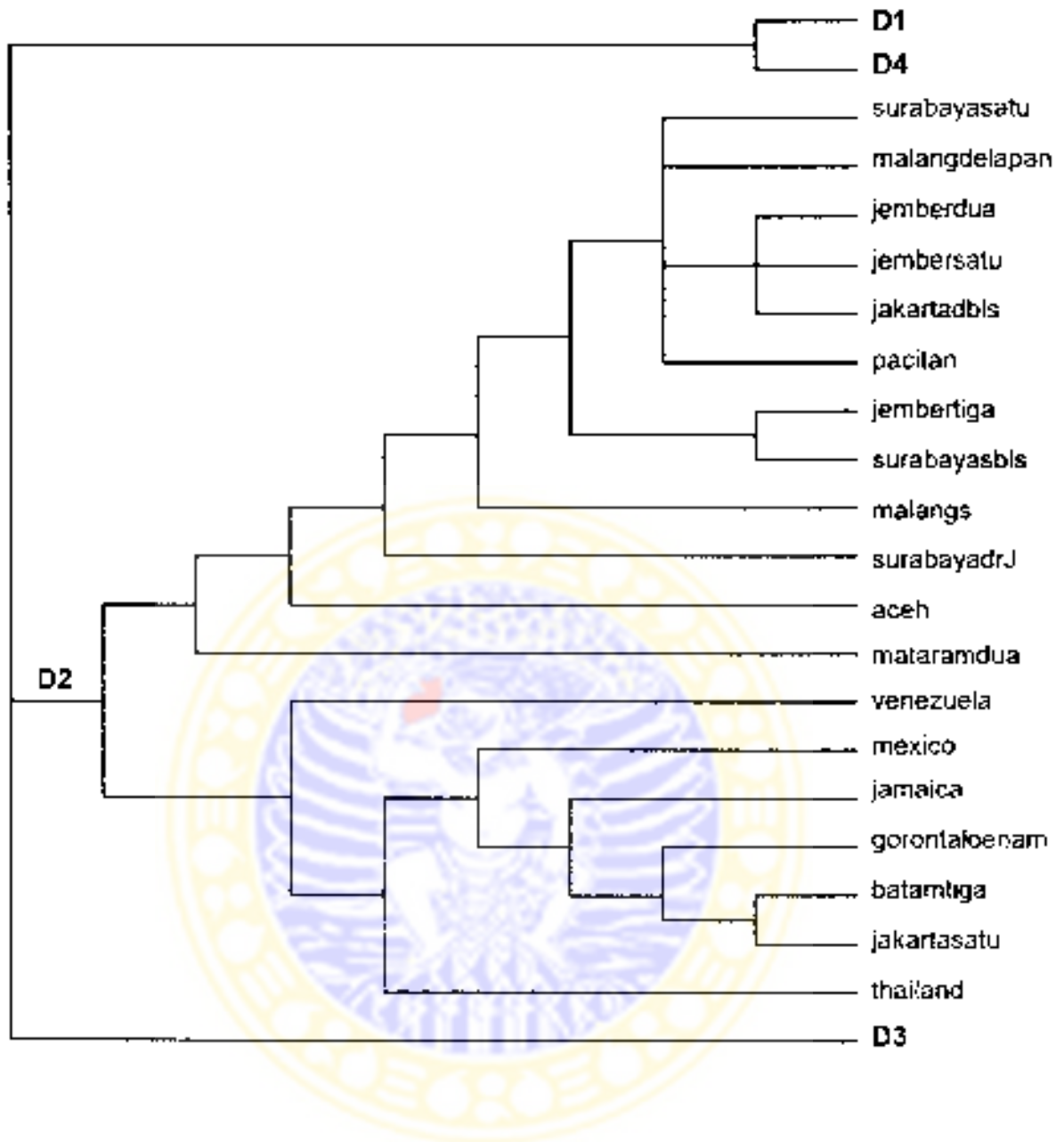
Analisis homologi untuk DEN-3 hanya terbatas pada 3 sampel yang memiliki kualitas elektroferogram yang bagus, yaitu Jayapura, Kendari dan Medan. Untuk ketiga kota ini memiliki homologi yang cukup baik yaitu berkisar 83,3%- 92,4% baik di antara ketiga sampel kota tersebut maupun terhadap referens (Martinique, Amerika Tengah).

Sesudah dilakukan *multiple alignment* (lampiran 6 dan 7) dan analisis homologi nukleotida (lihat lampiran 8 dan 9), kemudian dilakukan analisis filogenetik.

5.4 Hasil analisis filogenetik dari susunan nukleotida berbagai serotipe pada berbagai daerah di Indonesia

5.4.1 Hasil analisis filogenetik diwakili beberapa kota di pulau Jawa (Surabaya, Malang, Jember, Pacitan, Jakarta), Aceh, Mataram, Batam, Gorontalo dengan serotipe DEN-2

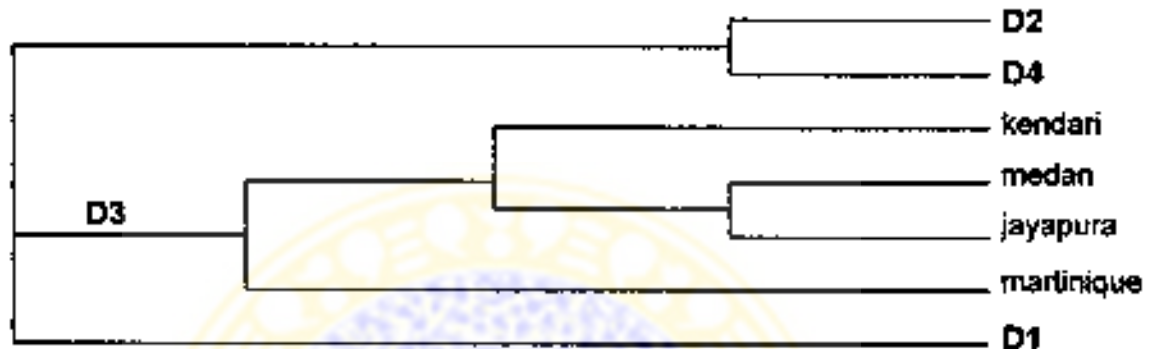
Hasil sekuensing beberapa kota di pulau Jawa yaitu Surabaya, Malang, Pacitan, Jember, Jakarta, Aceh, Mataram, Batam, Gorontalo dengan serotipe DEN-2 di atas, setelah dilakukan pemurnian dan sekuensing DNA menggunakan regio capsid, dilakukan analisis homologi dan analisis filogenetik untuk menilai kekerabatan di antara isolat DEN-2 tersebut, juga kemudian dibandingkan dengan DEN-2 referens (Jamaica, Venezuela, Mexico, Thailand). Tampak pada pohon filogenetik dalam gambar 5.11 bahwa terbagi 2 *clade* di dalam serotipe DEN-2.



Gambar 5.11 Analisis filogenetik serotipe DEN-2 regio capsid dari sampel Jawa Timur (Surabaya, Malang, Jember, Pacitan), Jakarta, Mataram, Aceh, Batam, Gorontalo dan referensi (Jamaica, Venezuela, Mexico, Thailand), sedangkan D1, D3, D4 sebagai *outgroup*.

Clade yang pertama menunjukkan sampel dari Surabaya (Sby-1, Sby-11, Sby-drl, Malang-8, Malang-19, Jember-1, Jember-2, Jember-3, Pacitan, Aceh, Mataram)

menunjukkan dalam satu gugusan , sedangkan *clade* yang berikutnya terdiri dari sampel Gorontalo, Batam dan Jakarta-1 dalam gugusan yang sama. Bahkan yang menarik adalah pada *clade* kedua ini, Batam, Gorontalo dan Jakarta-1 bersama di dalam *clade* yang sama dengan referensi yang dipakai pada penelitian ini yaitu Jamaica, Venezuela, Mexico dan Thailand.



Gambar 5.12 Analisis filogenetik serotipe DEN-3 regio capsid dan sampel Medan, Kendari, Jayapura dan referensi (Martinique) sedangkan D1, D2, D4 sebagai *outgroup*

Untuk pohon filogenetik dari serotipe DEN-3 dengan sampel Medan, Kendari dan Jayapura, tampaknya tidak banyak perbedaan dan tetap di dalam *clade* yang sama

5.4.2 Analisis filogenetik DEN-2 dari isolat Gorontalo-2005 dan isolat Jakarta-2003

Sebanyak 150 sampel dan perwakilan 19 kota di Indonesia ini dilakukan isolasi virus. Dari virus yang tumbuh melalui 2-3 kali pasase dengan menggunakan C636 *Aedes albopictus* cell monolayers dalam Eagle's minimal essential medium (EMEM) yang telah diperkaya dengan 2% fetal calf serum (FCS), dilakukan pemeriksaan ELISA untuk deteksi tingginya kadar antigen virus Dengue sampai kadar lebih dari 400 IU/mL. Setelah dilakukan *multiplex PCR* menggunakan primer khusus untuk regio envelop (Islam MA, *unpublished*) untuk kepastian serotipe virus Dengue

yang tumbuh, kemudian dilakukan sekuensing DNA. Hasil kultur yang tumbuh menunjukkan bahwa terdapat 2 isolat virus yaitu dari Gorontalo yang dikoleksi pada tahun 2005 dan dari Jakarta yang diambil pada tahun 2003.

Penentuan subtipe/genotipe ini dilakukan dengan menggunakan regio envelop. Reaksi sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan *BigDye Dideoxy Terminator sequencing kit* (ABI PRISM) dan produknya dianalisis menggunakan alat otomatisasi *DNA sequencer ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer*. Dengan alat *ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer*, dapat mensekuens panjang regio envelop sampai sebanyak 1400 nukleotida, menggunakan 2 pasang primer *sense* dan *antisense* (lihat lampiran 11). Primer *sense* dan *antisense* yang pertama (untuk serotipe DEN-2) terletak pada posisi 348 dan 1451 yang menghasilkan 1103 bp *product length*. Sepasang primer kedua terletak pada posisi 1261 dan 2626 yang menghasilkan 1365 bp *product length*. Sedangkan untuk serotipe DEN-3 digunakan primer *sense* dan *antisense* yang pertama (untuk serotipe DEN-3) terletak pada posisi 377 dan 1494 yang menghasilkan 1117 bp *product length*. Sepasang primer kedua terletak pada posisi 1316 dan 2528 yang menghasilkan 1212 bp *product length*.

Pembentangan sekuens untuk melihat susunan nukleotida dilakukan dengan menggunakan program DNASIS. Hasil sekuens yang didapat, dilakukan *multiple alignment* terhadap berbagai urutan/sekuens referensi DEN-2 untuk serotipe DEN-2 dan cara yang sama pula dilakukan untuk DEN-3. Semua data sekuens yang dilakukan pada penelitian ini diakses dari GenBank.

Sekuens yang telah dilakukan *multiple alignment* dengan program ClustalX, kemudian dilakukan analisis filogenetik. Poligon filogenetik ditentukan dengan menggunakan *PAUP software* versi 4.0. Berdasarkan poligon filogenetik tersebut, dapat dilihat bahwa isolat Gorontalo dengan serotipe DEN-2 terdapat bersama-sama

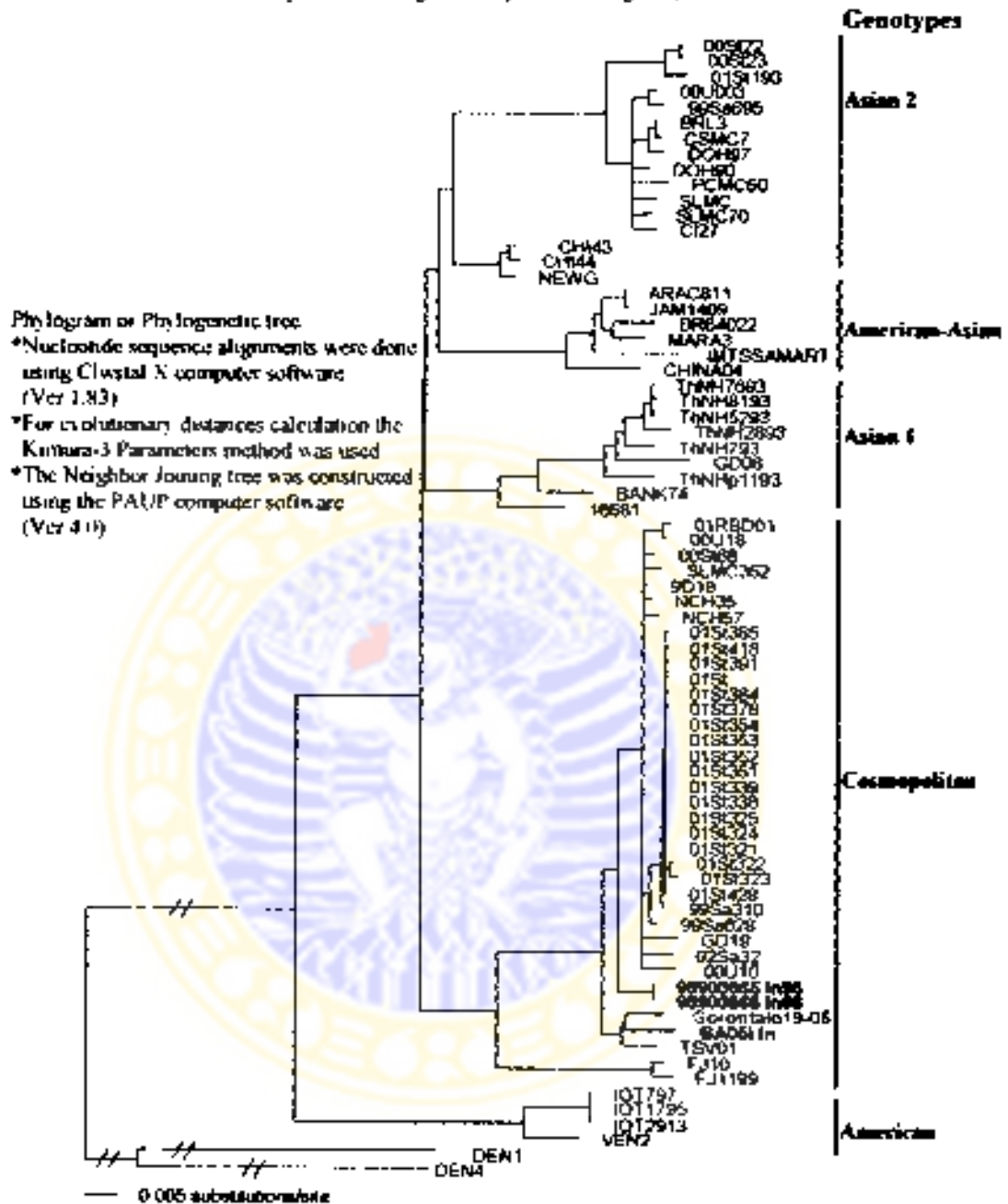
dengan isolat dari negara lain seperti Fiji, Malaysia dan Filipina yang memiliki genotipe yang sama. Hasil yang sama terjadi juga untuk isolat Jakarta dengan serotipe DEN-3 terdapat bersama-sama dengan isolat Thailand, Fiji dan Filipina di dalam genotipe yang sama. Sayangnya, dalam penelitian ini tidak dapat ditentukan analisis filogenetik dari berbagai isolat dari berbagai kota disebabkan karena isolat virus yang tumbuh hanya 2 sampel saja, disebabkan faktor non-teknis.

Hasil analisis filogenetik dapat dilihat pada gambar 5.13 dan gambar 5.14.



Molecular epidemiology of Dengue virus type 2 in Indonesia

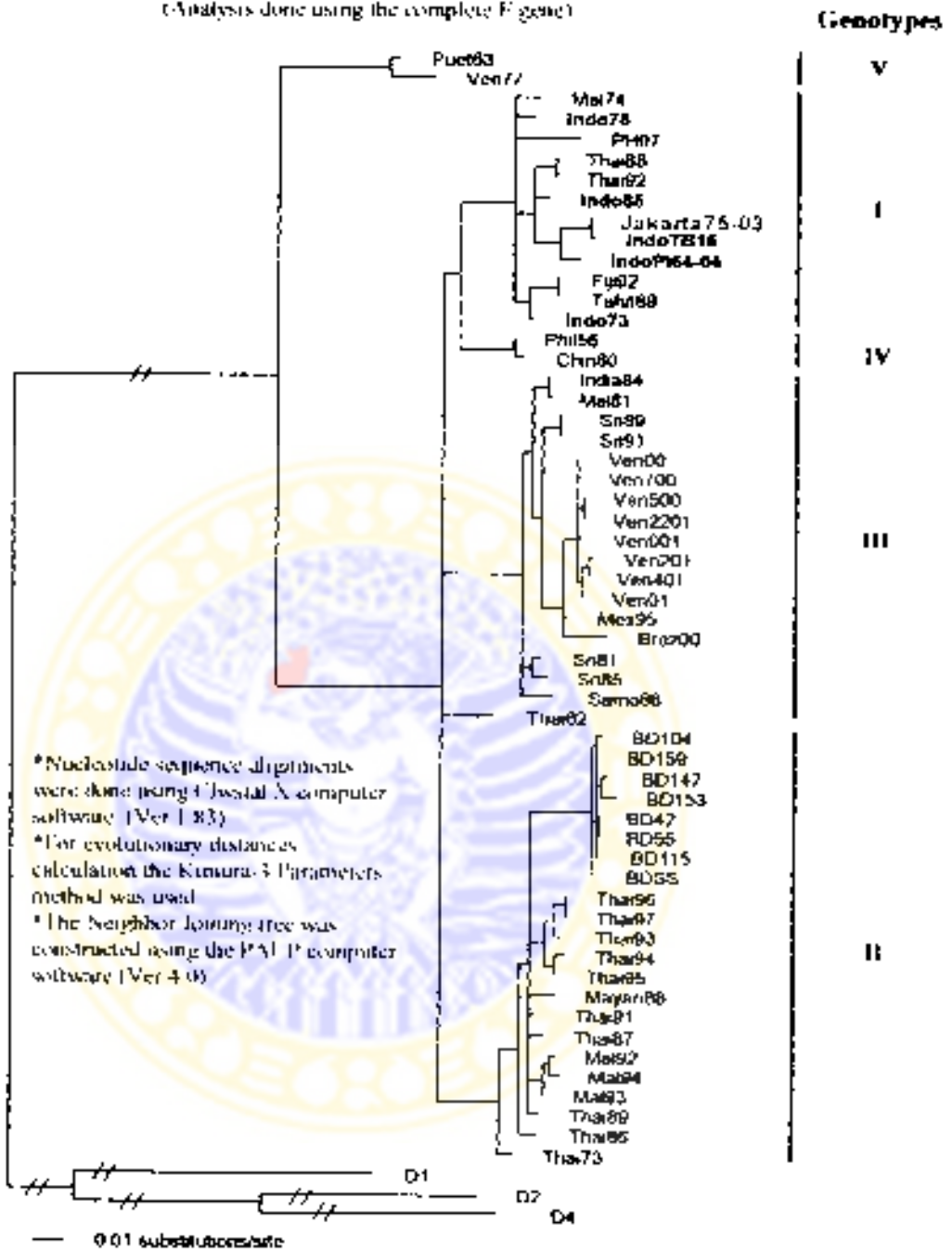
(Analysis done using the complete PrM-E genes)



Gambar 5.13 Analisis filogenetik DEN-2 dari isolat Gorontalo-2005 dengan genotype Cosmopolitan

Molecular epidemiology of Dengue virus type 3 in Indonesia.

(Analysis done using the complete E gene)



Gambar 5.14 Analisis filogenetik DEN-3 dari isolat Jakarta-2003 dengan genotipe 1

5.5 Hasil subtipe (genotipe) dari serotipe DEN-2 dan DEN-3 pada isolat Gorontalo-2005 dan Jakarta-2003

Gambar analisis filogenetik untuk isolat Gorontalo-2005 (gambar 5.12) dengan hasil serotipe DEN-2, menunjukkan bahwa posisi isolat tersebut termasuk di dalam kelompok genotipe Cosmopolitan. Isolat Jakarta-2003 dengan hasil serotipe DEN-3 (gambar 5.13), menunjukkan bahwa posisi isolat tersebut termasuk di dalam kelompok genotipe 1.



BAB 6

PEMBAHASAN

Dalam bab 6 ini, pembahasan akan dibagi menjadi 2 sub-bab sebagai berikut.

6.1 Akuntabilitas perangkat/metode yang dipakai

Sebaik apapun hasil suatu penelitian, namun bila reliabilitas metode yang dipakai tidak memadai atau penggunaannya tidak relevan, maka dari segi ilmiah hasil penelitian yang tampaknya baik tersebut tidak mempunyai nilai yang berarti.

Berpijak pada landasan tersebut, maka sebelum membahas hasil penelitian ini, akan dibahas terlebih dahulu reliabilitas dan relevansi dari metode yang dipakai untuk mencapai tujuan penelitian ini.

6.1.1 Reliabilitas (keandalan) metode yang digunakan

Sampai saat ini pemeriksaan *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) telah banyak dipakai sebagai standar pemeriksaan serologis. Sensitivitas dan spesifisitas diagnostik ELISA tidak diragukan lagi, di atas sensitivitas dan spesifisitas diagnostik uji HI. Penggunaan teknik IgM dan IgG *Captured ELISA* menjamin bahwa tak akan terjadi hasil IgM atau IgG rendah semu (*false low*) yang disebabkan oleh kadar IgG atau IgM yang amat tinggi (Handojo, 2003).

PCR merupakan uji yang sudah dipakai secara luas untuk penentuan asam nukleat dari berbagai kuman, parasit dan virus. Uji PCR dengan metode Lanciotti (1992) telah menjadi rujukan metode PCR untuk deteksi infeksi virus Dengue dari berbagai laboratorium di dunia.

Sekuensing DNA merupakan uji lanjutan setelah didapatkan produk PCR. Keandalan uji ini akan baik hasilnya apabila memperhatikan semua prosedur yang ada, melihat kualitas gelombang (puncak kurva) basa nukleotida yang tampak dan sinyal yang

optimal dan tampilan sekuensing *template DNA* tersebut, seperti yang telah dilaksanakan dalam penelitian ini

Pengambilan sampel dilakukan pada berbagai daerah di Indonesia, yaitu di pulau Sumatera diwakili oleh Aceh dan Medan, pulau Batam oleh kota Batam, pulau Kalimantan diwakili oleh Pontianak, Sampit dan Balikpapan, Sulawesi diwakili oleh Manado, Gorontalo, Makassar dan Kendari, Papua diwakili oleh Jayapura, Jawa diwakili oleh Jakarta, Yogyakarta, Surabaya, Malang, Pacitan, Jember, Nusa Tenggara Barat diwakili oleh pulau Bali dan pulau Lombok dengan sampel dari kota Denpasar dan Mataram.

Pemilihan sampel ini sudah dianggap mewakili masing-masing kota di berbagai pulau yang ada di Indonesia (*purposif sampling*). Nusa Tenggara Timur sudah kami hubungi, namun saat pengambilan sampel tersebut, tidak ada kasus Demam Berdarah Dengue sehingga tidak ada sampel yang mewakili

Pengambilan sampel tersebut dilakukan di UPP Ilmu Kesehatan Anak dan UPP Ilmu Penyakit Dalam di berbagai rumah sakit tersebut sesuai dengan prosedur tetap (protap) yang kami susun. Sampel darah yang berupa serum, disitupan pada suhu 4°C maksimal dalam 1 minggu di tempat pengambilan sampel dan dalam 24 jam sudah sampai di YDC dengan suhu pengiriman 4°C. Serum dibagi dalam 2 aliquot. Pengecekan uji serologis ELISA segera dilakukan dan aliquot yang lain disimpan dalam -70°C sampai dilakukan pengerjaan PCR dan sekuensing dalam waktu maksimal 6 bulan.

Berdasarkan alasan tersebut di atas, maka reliabilitas sampel yang dipakai dalam penelitian ini maupun uji IgM dan IgG *Captured ELISA*, uji PCR, dan sekuensing DNA yang dilakukan pada penelitian ini tidak perlu diragukan lagi.

6.1.2 Relevansi penggunaannya untuk mencapai tujuan penelitian ini

Sampai saat ini, tiga metode dasar utama yang paling banyak digunakan di semua laboratorium di dunia untuk diagnosis infeksi virus Dengue adalah deteksi antibodi spesifik terhadap virus Dengue, isolasi dan karakterisasi virus dan deteksi sekuen genom dengan metode amplifikasi asam nukleat (WHO, 1997).

a. Uji ELISA

Uji *Captured IgM dan IgG ELISA* merupakan tes serologis yang rutin dan paling banyak digunakan saat ini, untuk menggantikan tes *Hemagglutination Inhibition (HI)*. Tes ini cukup sensitif dan spesifik serta tidak membutuhkan sepasang serum akut dan konvalesen seperti halnya dengan uji HI. Penggunaan IgM dan IgG antiDengue, dalam hal ini dapat dipakai untuk membedakan pola jenis infeksi yaitu infeksi primer ataupun infeksi sekunder (Innis et al, 1989). Berpijak pada landasan ini, maka penggunaan uji IgM dan IgG *Captured ELISA* dalam penelitian ini, amat relevan.

b. Uji PCR

Metode Lanciotti banyak digunakan sebagai metode standar dalam penentuan serotipe virus Dengue di banyak negara, antara lain di kawasan Asia Tenggara dan Amerika Latin dan Karibia. Metode Lanciotti menggunakan genom virus Dengue pada regio *capsid* sebagai target dengan menggunakan primer standar D1 dan D2 pada *first Round* dan menggunakan D1 dan *serotype specific* yaitu TS1, TS2, TS3 dan TS4 pada *Second Round*. Jadi penggunaan uji laboratorium untuk mencapai tujuan penelitian ini, seperti yang sering digunakan oleh peneliti di luar negeri, sudah amat relevan, terutama bila diingat bahwa virus Dengue ini merupakan virus RNA.

c. Teknik sekuensing DNA

Sekuensing DNA yang digunakan untuk membentangkan sekuens basa nukleotida di dalam berbagai regio genom virus penyebab penyakit infeksi, banyak dipakai secara

vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler pembuluh darah, berujung dengan *plasma leakage*. Hasil pemeriksaan serologis dalam penelitian ini menunjukkan dominasi infeksi sekunder. Menurut Halstead, infeksi sekunder menunjukkan kecenderungan untuk terjadinya DBD maupun SSD, sehingga penting untuk diwaspadai apabila dijumpai pola infeksi sekunder. Infeksi primer yang dominan di Sampit menunjukkan Sampit bukan daerah endemis DBD, sehingga penderita yang rerata dewasa tersebut terkena infeksi virus Dengue untuk yang pertama kalinya dan tidak memberikan gejala DBD derajat berat. Saat ini telah ada kit diagnostik untuk deteksi antigen NS1 virus Dengue, yang dapat digunakan untuk deteksi dini sebelum antibodi terbentuk, namun sayangnya kit diagnostik ini belum terdapat di Indonesia.

6.2.2 Hasil pola serotipe virus Dengue yang terdapat di Indonesia

Laporan WHO, 2000, menyatakan bahwa seluruh wilayah tropis di dunia telah menjadi hiperendemis dengan keempat serotipe virus secara bersama-sama di berbagai wilayah Amerika, Asia Pasifik dan Afrika.

Epidemiologi molekuler banyak dikembangkan untuk mencari berbagai faktor yang diperkirakan menjadi penyebab masih terus berkembangnya prevalensi infeksi virus Dengue di seluruh belahan dunia. Sekuensing nukleotida dari berbagai regio di dalam genom virus Dengue tersebut penting dilakukan untuk menentukan variasi genetik dan untuk mengkarakterisasi subtipe (genotipe) di dalam masing-masing serotipenya.

Pada tahun 2004 telah terjadi KLB DBD di Indonesia pada bulan Februari dan mencapai puncak pada bulan Maret, penurunan kasus terjadi pada awal bulan April. Kasus mulai meningkat sejak bulan November 2003 dan tetap ada hingga penelitian ini berakhir. Di DKI Jakarta, terdapat 53 sampel DBD yang dilakukan PCR di

Singapore, didapatkan hasil keempat serotipe terdapat di Jakarta, namun didominasi oleh DEN-3 sebanyak 57% (30/53), diikuti DEN-4 sebanyak 20,7% (11/53), DEN-2 sebanyak 13% (7/53) dan DEN-1 5,6% (3/53) (Suwandono, 2004). Hasil di Jakarta ini berbeda dengan hasil PCR di Surabaya dalam penelitian kami. Dari 25 sampel dengan PCR positif, terdapat dominasi DEN-2 sebanyak 80% (20/25), diikuti oleh DEN-3 16% (4/25) dan DEN-4 4% (1/25). Bahkan serotipe DEN-4 di Surabaya yang kami jumpai pada tahun 2005 di ruangan anak, menunjukkan manifestasi DBD derajat 4/Sindrom Syok Dengue (Aryati, 2006). Berbeda dengan hasil penelitian Porter di Bandung pada tahun 2003, dominasi sampel yang didapatkan adalah Demam Dengue dengan serotipe DEN-2, namun yang memberi manifestasi klinis DBD adalah DEN-3.

Hasil PCR sangat dipengaruhi oleh keberadaan virus dalam serum penderita. Hal ini berhubungan erat dengan kejadian viremia pada infeksi virus Dengue. Viremia pada infeksi virus Dengue terjadi sampai lima hari setelah timbulnya panas. Setelah itu virus akan menurun drastis hingga menghilang dari peredaran darah. WHO 1997 juga membenarkan prosedur pengambilan sampel pada fase viremia ini dan menyebut dengan istilah S1.

Pola distribusi serotipe virus Dengue di berbagai wilayah kepulauan di Indonesia, dalam periode tahun 2003-2005 dalam penelitian ini, di Sumatra diwakili Aceh kombinasi DEN-2 dan DEN-3 dalam 1 penderita, sedangkan di Medan terdapat 2 DEN-2, 1 DEN-3 dan 1 DEN-4. Batam juga didominasi DEN-2 (3 sampel) dan 1 DEN-4. Hal ini menunjukkan Medan dan Batam yang merupakan kota di ujung utara Indonesia, mungkin menjadi tempat perpindahan orang maupun vektor nyamuk yang membawa ke tiga serotipe virus Dengue tersebut. Kalimantan diwakili oleh Pontianak, Sampit dan Balikpapan. Sampit yang merupakan kota di pedalaman dan

mayoritas respon imunnya menunjukkan infeksi primer (*unpublished*) ternyata didominasi oleh DEN-1 (4 sampel) sedangkan DEN-2 dan DEN-3 masing-masing 1 sampel. Di Balikpapanpun juga terdapat DEN-2 dan DEN-1 yang sama banyak, sedangkan DEN-4 hanya 1 sampel. Di Pontianak dari 8 sampel dengan respon imunnya infeksi sekunder ternyata hasil PCR negatif. Tampaknya DEN-1 yang terdapat di Kalimantan (Sampit dan Balikpapan), namun tidak terdapat di Sumatra menjadi pertanyaan dari mana serotipe ini berasal, ataukah dari Sarawak yang terletak di utara pulau Kalimantan, hal ini belum dapat dibuktikan. Sulawesi diwakili oleh Manado, Gorontalo, Makasar dan Kendari. Di Manado dan Gorontalo yang terletak di utara, serotipenya adalah DEN-2, senada dengan serotipe DEN-2 yang ada di Filipina. Makasar dan Kendari tidak terdapat DEN-2, namun terdapat serotipe DEN-3, sedangkan di Kendari juga terdapat DEN-1. Hasil dari Jayapura, di propinsi Papua terdapat 2 DEN-3 dan 3 DEN-4. Dominasi DEN-4 di Jayapura tampaknya cukup menarik, karena DEN-4 tidak dijumpai di Sulawesi. Apakah DEN-4 Jayapura berasal dari Papua Nugini, hal ini masih belum dapat dijawab. Hal ini hanya dapat dijawab dengan analisis homologi dan analisis kekerabatan (*phylogenetic tree*) dengan memakai berbagai isolat virus yang berhasil ditumbuhkan untuk dilakukan sekueensing nukleotida regio envelop, yang lengkap dengan 2 pasang primer *sense* dan *antisense*.

Di pulau Jawa, di Jakarta terdapat 2 sampel DEN-2 dan 4 sampel DEN-3. Tampaknya jenis serotipe yang dominan di Jakarta akan lebih jelas apabila jumlah sampel yang dilakukan PCR dalam penelitian ini lebih banyak. Hasil ini tampaknya senada dengan hasil yang didapat oleh peneliti Suwandono, 2004, yang meneliti sampel Jakarta di laboratorium Singapore didapatkan dominasi DEN-3. Di Jogja tidak berhasil didapatkan serotipenya. Di kota ini semua sampel DBD menunjukkan respon imun sekunder. Jawa Timur yaitu Surabaya, didominasi oleh DEN-2 (20

sampel), namun ada 1 sampel yang kombinasi DEN-2 dan DEN-3 yang menunjukkan DBD derajat 4/Sindrom Syok Dengue, juga terdapat 1 sampel DEN-4. Malang, Jenber dan Pacitan juga didominasi DEN-2 walaupun juga terdapat sampel DEN-4. Bali yang diwakili Denpasar dan Lombok yang diwakili Mataram ternyata serotipenya DEN-2. Jadi dari keseluruhan serotipe di 19 kota di Indonesia ini didominasi oleh DEN-2.

Hasil pemeriksaan uji PCR di 19 kota di Indonesia tahun 2003-2005 menunjukkan bahwa mayoritas didominasi oleh DEN-2 walau dalam jumlah kecil juga terdapat DEN-3, DEN-4 dan terakhir adalah DEN-1. Serotipe dominan di Indonesia ini senada dengan hasil temuan serotipe dominan di Malaysia selama 3 dekade, didominasi oleh DEN-2 juga (Chee, 2003). Apakah hal ini disebabkan banyaknya Tenaga Kerja Indonesia (TKI) yang bekerja di Malaysia, hal ini hanya dapat dijawab bila isolat virus Dengue yang tumbuh di kedua negara ini dilakukan analisis homologi dan analisis filogenetik.

Secara umum, untuk menjawab hasil uji PCR yang negatif, mungkin bisa disebabkan oleh beberapa hal.

1. Waktu pengambilan sampel sudah melewati fase viremia (lebih dari 5 hari), sehingga tampaknya pecahan RNA virus Dengue yang ada tidak cukup untuk membenarkan hasil PCR yang positif.
2. Diagnosis yang tidak tepat
3. Terjadi mutasi pada tempat menempelnya primer
4. Adanya hasil negatif semu karena suatu sebab teknis (misalnya: penyimpanan sampel serum yang tidak sesuai dengan suhu penyimpanan dalam waktu yang lama).

Hasil penelitian ini, menunjukkan bahwa terdapat hasil negatif seimbang dengan yang positif (52%) yaitu pada 100 sampel positif PCRnya dari total 192 sampel yang diperiksa. Bila dilihat pada waktu pengambilan sampel, peneliti sudah menggunakan sampel yang sesuai dengan kriteria WHO 1997 yaitu dengan kriteria pengambilan sampel S1. Tidak menutup kemungkinan bahwa pada fase S1 (fase viremia) telah terjadi penurunan viremia sehingga tidak diketemukan virus Dengue yang beredar pada pembuluh darah seperti yang terdapat pada hasil sampel dari Pontianak dan Yogyakarta dengan hasil pola infeksi dominan sekunder.

Kemungkinan kedua yang terjadi adanya mutasi virus pada tempat penempelan primer. Hal ini seperti yang pernah dilakukan oleh Reynes (2003) di Kamboja, mereka melaporkan adanya perubahan susunan nukleotida pada penempelan primer serotipe spesifik TSI, sehingga serotipe DEN-1 tidak terdeteksi. Memodifikasi primer TSI yang dipakai, akhirnya dapat mendeteksi adanya varian serotipe DEN-1.

Kemungkinan ketiga adanya hasil negatif semua yaitu suatu sebab kesalahan teknis misalnya: penyimpanan sampel serum yang tidak sesuai dengan suhu penyimpanan dalam waktu yang lama. Dalam penelitian ini, sangat mungkin penyimpanan dan pengiriman sampel tidak sesuai dengan prosedur yang ada, mengingat penelitian ini mengambil lokasi sampel yang berjauhan dari tempat pemeriksaan, sehingga menyulitkan pemantauan secara langsung, kecuali pada beberapa kota yang langsung dilakukan pengambilan sampel oleh peneliti. Hal ini kemungkinan terjadi pada hasil PCR yang semua sampel menunjukkan hasil negatif dan juga hasil serologis negatif seperti di kota Solo yang tidak diikutkan dalam penelitian ini

Berdasarkan hasil penelitian pola serotipe ini, baik di Jakarta, Surabaya dan semua kota lain di Indonesia, sesungguhnya kecmpat serotipe ini terdapat di Indonesia dan bersirkulasi semakin homogen dengan meningkatnya kemajuan teknologi dan arus transportasi. Perlu dicermati pendapat Armstrong, 2003 bahwa di wilayah Asia Tenggara infeksi sekunder dengan serotipe DEN-2 harus lebih diwaspadai karena kecenderungan timbulnya infeksi yang lebih berat dibandingkan serotipe yang lain. Hal ini kontradiksi dengan penelitian Porter, 2005 yang menyebutkan penelitian kohort di Bandung pada tahun 2003 terhadap karyawan 2 pabrik tekstil, terdapat dominasi serotipe DEN-2 dengan manifestasi Demam Dengue. Peneliti Porter juga menemukan terdapat 4 kasus DBD, dimana 3 kasus disebabkan oleh DEN-3, sedangkan kasus SSD dijumpai pada penderita yang semula terkena DEN-2 namun terkena lagi dengan infeksi sekunder DEN-1. Pada hasil penelitian di tabel 5.3 menunjukkan bahwa serotipe DEN-2 dalam penelitian ini dapat menyebabkan berbagai manifestasi klinis gradasi DBD .

6.2.3 Hasil analisis homologi dari susunan nukleotida berbagai serotipe pada berbagai daerah di Indonesia

Setelah dilakukan pemurnian DNA dan pelabelan DNA, sekuensing untuk melihat susunan nukleotida dilakukan dengan menggunakan alat ABI Prism 310 kemudian dibaca dengan menggunakan *DNA sequencer*. Sekuensing nukleotida sebagai dasar sebelum dilakukan analisis homologi, dilakukan pada semua perwakilan kota yang mendapatkan hasil PCR positif. Setelah sekuensing selesai dan dilakukan pengecekan kualitas sekuens nukleotida yang timbul dan mengukur panjangnya nukleotida yang didapat pada regio yang sama, maka dilakukan pemotongan nukleotida . Pemotongan dilakukan pada regio capsid sesuai dengan primer yang dipakai untuk regio capsid. Pemotongan dilakukan di antara primer sense dan

antisense, dengan panjang yang sama. Untuk DEN-2 didapatkan 70 nukleotida dan untuk DEN-3 didapatkan 216 nukleotida yang dapat dilakukan *multiple alignment* dan *sequence homology* (lihat lampiran 6, 7, 8, 9).

Dari elektroferogram yang dapat dianalisis, untuk serotipe DEN-2 terdapat 15 sampel yang mewakili daerah Surabaya, Malang, Jember, Pacitan, Jakarta, Mataram, Aceh, Batam, Gorontalo dibandingkan dengan regio capsid dari isolat referensi yaitu Jamaica, Venezuela, Mexico, Thailand yang juga memiliki serotipe DEN-2.

Analisis homologi dari sampel Jawa Timur yaitu Surabaya, Malang, Pacitan dan Jember berkisar antara 77,4-97,5% (lihat tabel 5.4), namun dibandingkan Jakarta ternyata terdapat perbedaan yang cukup bermakna. Terdapat 2 sampel dari Jakarta yaitu Jakarta-1 dan Jakarta-12. Homologi untuk sampel Jakarta-12 cukup bagus dibandingkan Jawa Timur, yaitu di atas 73%, namun terhadap Jakarta-1, dan sampel di luar Jawa (Aceh, Mataram, Batam, Gorontalo) terdapat homologi di bawah 50%. Secara kasar, bila dilihat dari tampilan *multiple alignment* di lampiran 6, homologi antar sampel ini terbagi dalam 2 kelompok, yaitu homologi di atas 50% yaitu yang berkisar antara 55,1% - 97,5% dalam kelompok dalam tabel 5.3 berwarna hitam. Untuk kelompok kedua yaitu homologi di bawah 50% yaitu berkisar antara 21,6%-43,2% yang berwarna merah. Perbedaan homologi ini akan tampak jelas, dalam pohon filogenetik pada gambar 5.11. Bila dilihat dari analisis filogenetik, terdapat perbedaan bermakna di antara kelompok Jawa Timur, Jakarta-12 dan kelompok Jakarta-1, Batam dan Gorontalo. Aceh dan Mataram walau memiliki homologi yang tidak tinggi, namun dalam pohon filogenetik masih termasuk dalam *clade* yang sama dengan Jawa Timur dan Jakarta-12.

Hal ini menunjukkan walau sesama serotipe DEN-2, namun terdapat perbedaan nukleotida di dalam genomnya. Hasil ini tentunya akan mempengaruhi berbagai aspek

termasuk pengkajian kembali teori *Antibody Dependent Enhancement* yang menekankan pada infeksi dengan serotipe berbeda, maka akan menimbulkan gejala yang lebih berat. Padahal dari penemuan dalam penelitian ini didapatkan di dalam serotipe DEN-2 yang sama, telah terjadi perbedaan susunan nukleotida di dalam regio capsid yang seharusnya *conserved*. Hal ini juga akan berdampak dalam penentuan untuk pembuatan bahan diagnostik ataupun vaksin. Penentuan homologi ini sebaiknya diulangi kembali dengan memakai regio envelop yang lebih mencerminkan variasi genetik di antara berbagai isolat di dunia, dengan jumlah area nukleotida yang lebih luas sehingga dapat lebih mencerminkan adanya kemungkinan delesi, insersi ataupun mutasi.

Untuk serotipe DEN-3 terdapat 3 sampel yang kualitas elektroferogramnya bagus yaitu Medan, Kendari dan Jayapura, dibandingkan dengan Martinique (Amerika Tengah) dari regio capsid. Berbagai sampel dengan serotipe DEN-3 ini dapat dilihat analisis homologinya pada tabel 5.5 dan *multiple alignment*nya pada lampiran 6. Dalam kajian ini, sampel dari ketiga kota di Indonesia ini memiliki homologi setara yaitu 88,24% - 90, 87% . Dalam analisis filogenetik akan tampak walau homologi ketiga kota ini dekat dengan referensi (Martinique, Amerika Tengah), namun berbeda *clade*-nya. Hal ini menunjukkan bahwa sampel serotipe DEN-3 di Indonesia memiliki susunan nukleotida yang mirip satu dengan yang lain.

6.2.4 Hasil analisis filogenetik dari susunan nukleotida berbagai serotipe pada berbagai daerah di Indonesia

Analisis filogenetik sangat diperlukan untuk menentukan hubungan kekerabatan isolat virus Dengue baik intra-daerah/pulau , inter-daerah/pulau, lintas negara . Pada prinsipnya analisis filogenetik dapat mencerminkan asosiasi lintas

geografi, dimana sangat dibutuhkan untuk negara Indonesia yang terdiri dari beribu kepulauan.

Analisis filogenetik di dalam epidemiologi molekuler sangat berguna untuk memonitor distribusi dari serotipe dan sub tipe/genotipe yang bersirkulasi di daerah endemis (Messer, 2003). Menurut Messer, 2003, dalam dua dekade di Srilanka, Afrika Timur dan Amerika Latin terjadinya wabah DBD disebabkan oleh serotipe DEN-3, sub tipe III. Analisis filogenetik, menunjukkan bahwa terjadinya evolusi dan transpor virus Dengue yang menyebabkan wabah ini berasal dari daratan India. Wabah di Srilanka pada tahun 1989 ini berkorelasi dengan timbulnya varian baru dari DEN-3 sub tipe III yang menyebar ke Afrika dan dari Afrika ke Amerika Latin di pertengahan tahun 1990. Pada mulanya DEN-3 sub tipe III menyebabkan penyakit yang ringan, namun pada keadaan wabah, secara genetik terjadi perubahan yang menunjukkan adanya peran genetik virus pada DBD. Di Thailand, terdapat 3 sub tipe DEN-2 yang didasarkan atas perbedaan asam amino pada prM, NS1, NS2A, NS3, NS5. Infeksi sekunder sub tipe I dapat mengakibatkan Sindrom Syok Dengue (SSD) sedangkan infeksi sekunder sub tipe II menyebabkan DBD namun infeksi primernya menyebabkan Demam Dengue (DD) saja. Sebaliknya infeksi sub tipe III mengakibatkan Demam Dengue (DD). Hal ini menunjukkan bahwa serotipe dan sub tipe virus Dengue dapat menentukan virulensi dari virus Dengue dan manifestasi klinisnya (Igarashi, 1999). Leitmeyer mengutarakan, dengan analisis filogenetik di Amerika, terdapat perbedaan genotipe DEN-2 yang berbeda yaitu genotipe "native" American berasosiasi dengan terjadinya demam dengue (DD), sedangkan genotipe Southeast Asian terjadi pada DBD di 4 negara yang berbeda di dunia (Leitmeyer, 1999).

Para peneliti lain, misalnya Mota (2002) di Mexico meneliti DEN-4; Santos (2003) meneliti DEN-1 dan DEN-2 di Brazil; Armstrong (2003) meneliti DEN-2 di Texas Amerika maupun Holmes (1999) di Oxford Inggris, menggunakan regio envelop untuk penentuan subtype yang dilanjutkan dengan analisis filogenetik. Penggunaan analisis filogenetik dapat dilakukan dengan menggunakan regio capsid-preMembran (C-prM), Envelop (E) maupun *Nonstructural-3* (NS-3) dan NS-5. Berdasarkan urutan *sequence heterogeneity*-nya, dikatakan NS-3 maupun NS-5 memiliki *sequence heterogeneity* lebih rendah dibandingkan C-prM dan E (Chao et al, 2005). Daerah Envelop memiliki *the higher potential of sequence heterogeneity*, sehingga para peneliti lebih merekomendasikan penggunaan regio E untuk analisis filogenetik, sekaligus untuk menentukan subtype (genotipe) dari serotipe masing-masing virus tersebut.

Hasil penelitian yang kami lakukan, terdapat 2 macam analisis filogenetik . Analisis filogenetik yang pertama yaitu terhadap sampel klinik yang dominan dalam penelitian ini yaitu DEN-2 dan DEN-3 yang memiliki hasil elektroferogram yang baik dan dapat dievaluasi. Pada serotipe DEN-2 penelitian ini, terdapat 2 *clade*. *Clade* yang pertama menunjukkan sampel dari Surabaya (Sby-1, Sby-11, Sby-d1), Malang-8, Malang-19, Jember-1, Jember-2, Jember-3, Pacitan, Aceh, Mataram) terletak di dalam satu gugusan . sedangkan *clade* yang berikutnya terdiri dari sampel Gorontalo, Batam dan Jakarta-1 dalam gugusan yang sama. Bahkan yang menarik adalah pada *clade* kedua ini, Batam, Gorontalo dan Jakarta-1 bersama di dalam *clade* yang sama dengan referensi yang dipakai pada penelitian ini yaitu Jamaica, Venezuela, Mexico dan Thailand. Untuk sampel Jawa Timur, memiliki kekerabatan DEN-2 yang sama, juga terhadap salah satu sampel di Jakarta (Jkt-12).Keadaan ini berbeda jauh dengan DEN-2 Jakarta-1. DEN-2 Jakarta-1, Batam dan Gorontalo yang terletak dalam *clade* yang

sama, menunjukkan kedekatan dengan referens yang berasal dari Amerika (Jamaica, Venezuela, Mexico) dan Thailand. Tampaknya ada dugaan kuat bahwa terdapat mobilitas yang berbeda dari penderita dan vektor nyamuk yang berasal dari Jakarta-1, Batam dan Gorontalo yang berhubungan dengan transmisi dan transportasi virus Dengue dibandingkan dengan yang berasal dari sampel Jawa Timur. Aceh dan Mataram terdapat di dalam *clade* yang sama dengan Jawa Timur, namun memiliki nilai homologi yang rendah di bawah 50%. Hal ini menunjukkan tetap terdapat variasi perbedaan nukleotida di dalam genomnya, dengan kekerabatan yang lebih jauh walau di dalam *clade* yang sama dengan Jawa Timur.

Analisis filogenetik yang kedua yaitu yang diambil berdasarkan isolat virus yang tumbuh. Hasil analisis filogenetik yang didasarkan pada isolat virus yang tumbuh Penelitian ini hanya mendapatkan 2 isolat virus yang dapat tumbuh dan mencapai kadar antigen virus > 400 Ehsa Unit , yaitu berasal dari isolat Gorontalo yang dikoleksi pada tahun 2005 dan isolat Jakarta yang dikoleksi pada tahun 2003. Isolat Gorontalo-2005 dengan hasil PCR serotipe DEN-2 menunjukkan posisi isolat yang terdapat bersama-sama dengan isolat dari negara lain seperti Fiji dan Malaysia yang memiliki genotipe Cosmopolitan yang sama. Hasil yang sama terjadi juga untuk isolat Jakarta dengan serotipe DEN-3 terdapat bersama-sama dengan isolat Thailand, Fiji dan Filipina di dalam genotipe I yang sama.

6.2.5 Hasil sub tipe (genotipe) dari serotipe DEN-2 dan DEN-3 pada isolat Gorontalo-2005 dan Jakarta-2003

Analisis genetik untuk mengkategorikan serotipe virus Dengue ke dalam grup molekuler yang tertentu (genotipe atau sub tipe) dibagi menurut serotipenya. DEN-1 dikategorikan ke dalam 3-5 macam genotipe. DEN-2 dikategorikan ke dalam 5-6

macam genotipe, DEN-3 ke dalam 4-5 macam genotipe, DEN-4 dikategorikan ke dalam 2 macam genotipe.

Menurut kriteria Twiddy (2002) , terdapat 5 macam genotipe dari DEN-2, yaitu Asian genotipe 1, Asian genotipe 2, genotipe American/Asian, Cosmopolitan dan American. Menurut Salda, 2005, di Filipina yang endemis DBD, didapatkan genotipe Asian genotipe 2 di tahun 1995, 1996 hingga 1998, namun perlahan diganti oleh genotipe Cosmopolitan di tahun 2001 dan 2002. Pada penelitian ini, dari isolat Gorontalo, didapatkan genotipe Cosmopolitan.

Hasil genotipe/subtipe yang didapat dari isolat Jakarta tahun 2003 adalah serotipe DEN-3 genotipe 1, sedangkan di Gorontalo tahun 2005 ditemukan serotipe DEN-2 genotipe Cosmopolitan. Hasil dari isolat Indonesia tahun 1985 , menunjukkan juga adanya DEN-3 genotipe 1. Jadi dalam hal ini tampaknya dari segi genotipe untuk DEN-3 tidak ada perubahan. Hal yang sama terjadi pada DEN-2 dan isolat Indonesia tahun 1998, di mana ditemukan juga genotipe yang sama yaitu Cosmopolitan (Salda, 2005). Di negara tetangga, Malaysia, ternyata juga ditemukan genotipe Cosmopolitan pada lebih dari 80 isolat DEN-2 nya. Berbeda dengan di Thailand, di mana genotipe Asian-1 justru yang dijumpai dari isolat DEN-2nya.

Analisis filogenetik dari Gorontalo ini erat relasinya dengan isolat dari Malaysia, Singapore, Thailand, Filipina dan Australia. Genotipe Cosmopolitan ini ternyata juga telah dijumpai pada isolat Indonesia 1998, namun tidak disebutkan sumber pengambilan isolat didapatkan dari daerah mana di Indonesia. Hal ini tampaknya menunjukkan bahwa sirkulasi isolat DEN-2 di Indonesia dengan genotipe Cosmopolitan tetap tidak bergeser. Genotipe Cosmopolitan pun ternyata cukup mendominasi DEN-2 di wilayah Asia Tenggara dengan manifestasi klinis penderita yaitu DBD.. tampaknya hal ini tidak terlepas dari transpor patogen antar-negara yang

didukung dengan adanya mobilitas tinggi dan kemajuan teknologi. Berpijak pada genotipe yang ada dari serotipe di masing-masing daerah, setiap tahun, secara reguler berkesinambungan, dapat dilihat pergerakan transmisi virus Dengue lintas geografis.

Secara keseluruhan dari hasil penelitian ini, diharapkan dapat dipakai sebagai landasan pemetaan epidemiologi molekuler virus Dengue di Indonesia. Diharapkan penelitian lanjutan yang reguler dan dilengkapi dengan korelasi keparahan gradasi penyakit infeksi virus Dengue, dapat dipakai untukantisipasi terjadinya KLB DBD yang merebak di semua wilayah di Indonesia. Penelitian lanjutan di kemudian hari, dengan memakai data dasar sekuens nukleotida regio envelop dari berbagai serotipe dan subitipe/genotipe di Indonesia, dapat digunakan untuk sarana diagnostik infeksi virus Dengue yang lebih andal dan kandidat vaksin dengue yang lebih sesuai untuk kondisi penderita DBD di Indonesia

6.2.6 Temuan Baru

6.2.6.1 Pola serotipe dominan dari masing-masing wilayah kota atau berbagai pulau di Indonesia berlainan.

6.2.6.2 Dari hasil analisis homologi dan analisis filogenetik, didapatkan 2 *clade* yang berbeda di dalam serotipe DEN-2. Hal ini menunjukkan bahwa walaupun dari serotipe yang sama, namun ternyata dijumpai variasi nukleotida yang berbeda di dalam regio kapsid yang seharusnya *conserved*. Hal ini menunjukkan perlunya pengkajian ulang untuk teori ADE (*Antibody Dependent Enhancement*) bahwa bila seseorang terinfeksi yang berikutnya dengan serotipe yang sama, apakah tetap terdapat *long-life immunity* mengingat dalam penelitian ini dalam serotipe yang sama yaitu DEN-2 terdapat perbedaan susunan nukleotida yang tentunya akan mempengaruhi terbentuknya respons antibodi.

**6.2.6 3DEN-2 di Gorontalo-2005 memiliki sub tipe (genotipe) Cosmopolitan dan
DEN-3 di Jakarta-2003 memiliki sub tipe (genotipe) I.**



BAB 7

PENUTUP

7.1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari 19 kota di Indonesia pada kurun waktu tahun 2003-2005, yaitu sebanyak 525 serum penderita DBD dengan kriteria WHO, 1997 dan pembahasan yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut .

7.1.1 Pola serologis infeksi . dominasi infeksi sekunder sebanyak 57,14% (300/525), sedangkan infeksi primer sebanyak 12,57% (66/525), *equivocal* sebanyak 4,20% (22/525) dan negatif sebanyak 26,09 % (137/525).

7.1.2 Pola serotipe : dominasi serotipe DEN-2 sebanyak 65% (65/100), diikuti oleh DEN-3 sebanyak 15% (15/100), DEN-4 sebanyak 12% (12/100) dan terakhir DEN-1 sebanyak 8% (8/100) .

DEN-1 yang banyak terdapat di Sampit dan Balikpapan menunjukkan kemungkinan serotipe ini berasal dari utara pulau Kalimantan, DEN-2 dominan di Batam sedangkan DEN-4 yang dominan di ujung Indonesia di bagian timur . Hal ini mungkin dipengaruhi oleh faktor mobilisasi, transmisi, transportasi dan migrasi manusia serta vektor nyamuk beserta faktor lingkungan.

7.1.3 Analisis homologi

Analisis homologi dilakukan terhadap serotipe DEN-2 dan DEN-3 yang dominan dalam penelitian ini. Isolat dari Jawa Timur yaitu Surabaya, Malang, Pacitan, Jember terdapat homologi senada yang berkisar antara 77,4-97,5% namun terhadap Jakarta-1 dan sampel di luar Jawa (Aceh, Mataram, Batam, Gorontalo) terdapat homologi di

bawah 50% . Hal ini menunjukkan walau sesama serotipe DEN-2, namun terdapat perbedaan nukleotida dan asam amino di dalam genomnya.

Analisis homologi untuk DEN-3 hanya terbatas pada 3 sampel yang memiliki kualitas elektroferogram yang bagus, yaitu Jayapura, Kendari dan Medan dengan nilai homologi yang cukup baik maupun terhadap referens (Martinique, Amerika Tengah) yaitu berkisar 83,3%- 92,4% .

7.1.4 Analisis filogenetik

Analisis filogenetik terhadap serotipe DEN-2 dari berbagai sampel menemukan adanya 2 *clade* yang berbeda . *Clade* yang pertama menunjukkan sampel dari Surabaya, Malang, Jember, Pacitan, Aceh, Mararam terdapat dalam satu gugusan. *Clade* yang berikutnya terdiri dari sampel Gorontalo, Batam dan Jakarta-1 bersama dengan referens yang dipakai pada penelitian ini yaitu Jamaica, Venezuela, Mexico dan Thailand. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan nukleotida yang cukup mencolok walau di dalam serotipe DEN-2 yang sama.

Hasil analisis filogenetik terhadap serotipe Den-3 dari sampel Medan, Kendari dan Jayapura, tampaknya tidak banyak perbedaan dan tetap di dalam *clade* yang sama namun berbeda dengan *clade* referens (Martinique, Amerika Tengah).

Hasil analisis filogenetik dari isolat Gorontalo-2005 menunjukkan posisi isolat Gorontalo dengan serotipe DEN-2 terdapat bersama-sama dengan isolat dari negara lain seperti Fiji, Malaysia dan Filipina yang memiliki genotipe Cosmopolitan yang sama. Hasil yang sama terjadi juga untuk isolat Jakarta dengan serotipe DEN-3 terdapat bersama-sama dengan isolat Thailand, Fiji dan Filipina di dalam genotipe I yang sama.

7.1.5 Subtipe/genotipe yang didapatkan berdasarkan hasil filogenetik dari isolat virus yang berhasil tumbuh dalam C6/36 cell line *Aedes albopictus* menunjukkan subtipe/genotipe Cosmopolitan untuk DEN-2 di Gorontalo 2005 dan subtipe/genotipe I untuk DEN-3 di Jakarta 2003.

7.2 SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini maka berbagai saran yang dapat diajukan adalah sebagai berikut .

1. Perlu dilakukan penelitian sekuensing nukleotida dari envelop genom virus Dengue dengan menggunakan dua pasang primer yang lengkap (*sense* dan *antisense*) dari berbagai serotipe isolat hasil kultur, dari masing-masing kota sehingga dapat dilakukan analisis homologi dan analisis filogenetik yang lebih optimal sehingga dapat melengkapi pemetaan epidemiologi molekuler di Indonesia terutama pola subtipe/genotipenya.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengkorelasikan pola serologis, dan pola serotipe terhadap manifestasi klinis infeksi virus Dengue tersebut (DD, DBD) atau SSD) untuk mengantisipasi terjadinya KLB.
3. Perlu dilakukan pemeriksaan serologis antigen Dengue (antigen NS1) untuk deteksi dini sebelum terjadinya pembentukan antibodi baik IgM maupun IgG antiDengue, selain pemeriksaan PCR yang cukup rumit dan mahal harganya.
4. Perlu pengkajian lebih lanjut tentang patogenesis penyakit Demam Berdarah Dengue yang sampai saat ini masih belum jelas dengan membuat pemetaan sekuens nukleotida regio envelop, untuk melihat adanya delesi.

insersi, mutasi virus Dengue atau substitusi nukleotida seperti yang terdapat dalam penelitian ini dengan menggunakan regio capsid terutama untuk serotipe DEN-2. Hasil sekuens nukleotida ini nantinya dapat digunakan untuk pembuatan kit diagnostik dan kandidat vaksin Dengue.



DAFTAR PUSTAKA

- Aaskov J , 2003 . *Dengue viruses forces for change*. Dipresentasikan pada Kongres Virologi Asia Pasifik. Malaysia. November 2003.
- Armstrong Philip M, Rico-Hesse R , 2003 . *Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in Aedes aegypti*. *Am. J Trop. Med. Hyg.* : 68 (5) : 539 - 544.
- Arlama WF, Sembirin L, Murdiyanto U, Lanni F, 1991. *Petunjuk laboratorium . Isolasi, Purifikasi, Digesti dan Amplifikasi DNA, Kursus Singkar PCR*.
- Aryati , 2000 , *Aspek Laboratorium Demam Berdarah Dengue*. Seminar : Demam Berdarah Dengue. TDC Unair, Surabaya : 24 – 28
- Aryati, 2003 *Perkembangan Diagnostik Demam Tifoid dan Demam Dengue/DBD. Makalah Lengkap Seminar Kewaspadaan terhadap Demam pada penyakit Typhus Abdimalis, Demam Dengue/DBD dan Malaria serta Penggunaan test diagnostik laboratorium untuk deteksi dini*. TDC Unair
- Aryati, Ety Retno S, Agung Dwi WW, 2006. *Hubungan serotipe virus dengue dengan respon imun humoral pada penyakit DBD pada anak* . Laporan Penelitian Medical Research Unit (MRI) Unair , April 2006.
- Aryati, Soetjipto, Soedjoko Hariadhi, Fedik Rantam, Soegeng Soegijanto , 2006. *Profil serotipe virus Dengue di Indonesia tahun 2003-2005*. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia (MKTI) Maret* , 17 (1) : 72-80
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Depkes RI, 2004. *Kajian Masalah Keselutan, Demam Berdarah Dengue*.
- Bhakti S, Kazatchkine MD, 1990. *Pathogenesis of Dengue : An Alternative Hypothesis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, Dec; 21 (4) : 652 – 657.
- Bio-Rad brochure *PlateliaTM Dengue NS1 Ag.Infectious Disease Testing*. Bio-Rad Clinical Diagnostics Group.
- Block J, Gibbs AJ, McWilliam AM, Vitarana UT , 1991 . *NS1 gene sequences from eight dengue-2 viruses and their evolutionary relationships with other dengue viruses*. *Arch Virol*, 118 : 209 - 223.
- Cardosa MJ , 1998 . *Dengue Vaccine Design : Issues and Challenges*. *Institute of Health Community Medicine, University Malaysia Sarawak*. *British Medical Bulletin* 54 (2): 395 – 405.
- Chang GJ , 1997 . *Molecular Biology of Dengue Viruses*. In . *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Eds DJ Gubler, G Kuno. American Public Health Association, Washington DC: 175 – 198

- Chao Dy, King CC, Wang WK, Chen WJ, Wu H., Chang GJ, 2005. Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra (research). *Virology Journal* 2:72 : 1-10.
- Chee HY, AbuBakar S, 2003. Phylogenetic Investigation of Dengue Virus Type 2 Isolated in Malaysia. *Dengue Bulletin*, vol 27 : 100-107
- Dachlan YP, 1999. Research, Training and Health Education Program of Dengue Haemorrhagic Fever at the Tropical Disease Center (TDC) Airlangga University, Surabaya, Indonesia. *Proceeding International Seminar on Dengue Fever / Dengue Haemorrhagic Fever*. TDC-Airlangga University, Surabaya, Oct. p.1 – 3.
- Dachlan YP, 2000. Current profile of infectious diseases in Indonesia and the efforts to anticipate it. *Indonesian Journal of Tropical Medicine*, vol 11, No. 1; 40-56.
- Dash PK, Parida MM, Saxena P, Kumar M, Rai A, Pasha ST, Jana AM, 2004. Emergence and Continued Circulation of Dengue-2 (Genotype IV) Virus Strains in Northern India. *Journal of Medical Virology* 74 : 314-322.
- Davis LG, Kuehl WM, Batty JV, 1994. *Basic Method in Molecular Biology*, 2nd. Prentice-Hall International Inc. pp : 199 – 128
- de Paula So et al , 2000. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT - PCR) for rapid detection and identification dengue virus in an endemic regio : a validation study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* : 96 (3) : 266 - 9.
- Djunaedi D, 2004. Respons imun pada infeksi virus Dengue. Dalam : *Buku Kumpulan Makalah Third Basic Molecular Biology Course on Infectious Diseases : Recent Advanced on Molecular Biology of Infectious diseases : From Bench to Clinical Practice*. 3 Oktober 2004. FK Universitas Brawijaya : 58-65
- Domingo C, Palacios G, Niedrieg M, Cabrerizo M, Jabado O, Reyes N, Lipkin WI, Tenorio A , 2004. A new tool for the diagnosis and molecular surveillance of Dengue infections in clinical samples. *Dengue Bulletin* , 28 : 87-95.
- dos Santos FB, Miagostovich MP, Nogueira RMR, Edgil D, Schatzmayr HG, Riley LW, Harris E , 2002 . Complete Nucleotide Sequence Analysis of a Brazilian Dengue Virus type 2 Strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 97(7) : 991 – 5
- Gubler DJ, 1996. Serologic Diagnosis of Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever. *Dengue Buletin*, Vol 210.
- Guzman MG , 2003 . Recombinant vaccine against Dengue virus in Cuba. *Letter*.
- Haas L, 1997. Molecular epidemiology of animal virus diseases. *Journal of Veterinary Medicine* B44 : 257 - 272. <http://viro88.tiho-hannover.de/publ/udvrig97-2.htm>, 5 Maret 2004.

Hadinegoro SR, Soegijanto S, Wuryadi S, Soernso TH, 2000. Tata Laksana Demam Dengue / Demam Berdarah Dengue Pada Anak. Naskah Lengkap Demam Berdarah Dengue, Fak Kedokteran Univ. Indonesia, Jakarta. Hal 81-91.

Hadinegoro SR 1999. Tata Laksana Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue. Depkes RI. Hal 8 - 14.

Hadinegoro SR, Satari HI, 2000. Demam Berdarah Dengue. Naskah Lengkap Pelatihan Bagi Pelatih Dokter Spesialis Anak dan Dokter Spesialis Penyakit Dalam dalam Tatalaksana kasus DBD. FKUI. Hal 60 - 61.

Hadinegoro SRH, Soegijanto S dkk , 2004 . Tatalaksana Demam Dengue/DBD . Penyunting : Sri Rezeki et al. Edisi I tahun 1999. Dalam : Demam Berdarah Dengue : Naskah Lengkap Pelatihan bagi Pelatih Dokter Spesialis Anak & Dokter Spesialis Penyakit Dalam dalam Tatalaksana Kasus DBD. Fakultas Kedokteran UI ; 80 – 135.

Hahn YS, Galler R, Hunkapiller T, Dalrymle JM, Strauss EG , 1988 . Nucleotide sequence of dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flaviviruses. *Virology* 162 (1): 167 - 180.

Halstead SB, 1988. Pathogenesis of Dengue : Challenges to Molecular Biology. *Science*, Jan 29 ; 239 (4839) : 476 - 481.

Halstead SB, 1989. Antibody, Macrophages, Dengue Viruses Infection, Shock and Haemorrhage : A Pathogenetic Cascade. *Res Infect Dis*. May : 11 Halstead SB \$830 - \$839.

Halstead S, Lan NT, Myint TT, Shwe TN, Nisalak A, Kalyanarooj S, Nimmannitya S, Soegijanto S, Vaughn DW, Endy TP , 2002 . Dengue Hemorrhagic Fever in Infants : Research Opportunities Ignored. *Perspectives emerg Infect Dis* vol 8 (12). <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no12/02-0170.htm> . 12 November 2004.

Handajani R, Soetjipto, Lusida MI, Nidom CA, Aksono B , 2000 . Pemurnian "PCR product" pro "DNA Sequencing". Lokakarya Biologi Molekuler. TDC Unair, 26 - 27 Juni 2000.

Handajani R , 2003. DNA Sequencing. Kursus Biologi Molekuler, Gramik FK Unair, Surabaya 7 Juni 2003 : 1 - 12.

Handojo I, 2003. Berbagai macam cara untuk deteksi antigen dalam *Class Capture Assay*. Dalam : Pengantar imunoasai dasar. Airlangga University Press : 146-157.

Hariadhi S, 2005. Pola distribusi serotipe virus Dengue pada beberapa daerah endemik di Jawa Timur dengan kondisi geografi berbeda. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Harris E et al , 2000 . Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med.* ; 63 (1 - 2) : 5 - 11.

Holmes EC, Worobey M, Rambaut A , 1999 . Phylogenetic Evidence for Recombination in Dengue Virus. *Mol. Bio. Evol.* ; 16 (3) : 405 – 409.

Igarashi A , 1999 . Current Problems and Future Challenge of Dengue Virus Infection with special reference to the pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *International Seminar of Dengue Fever/Dengue Hemorrhagic Fever* . October. TDC. Airlangga University, Surabaya, 6 - 9.

Innis BL, A Nisalak , S Nimmannitya , S Kusalerdchariya, V Chongswadi, S Suntayakorn, P Puttisre, CH Hoke, 1989 . An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 40 : 418-427 .

Islam MA, 2005. Personal communication.

Kementerian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia , 2006. Buku Putih. Penelitian Pengembangan dan Penerapan IPTEK Bidang Kesehatan dan Obat tahun 2005-2025. Jakarta, 2006 :16-19.

Kobayashi N, Thayan R, Sugimoto C, Oda K, Zainal S, Vijayamalar B, Sinniah M, Igarashi A , 1999 . Type-3 Dengue viruses responsible for the Dengue epidemic in Malaysia during 1993 - 1994. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* : 60 (6) : 904 – 909.

Koraka P, Suharti C, Setiati E, et al , 2001 . Kinetics of Dengue Virus - Specific Serum Immunoglobulin Classes and Subclasses Correlate with Clinical Outcome of Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. December Vol. 39, No. 12, p. 4332 – 4338.

Kuntarijanto, 1998. Epidemiologi dan Penanggulangan Penyakit DBD di Jawa Timur Tahun 1993 s/d 1997, Naskah lengkap seminar Demam Berdarah Dengue, TDC - Unair. Surabaya, September. Hal. 25.

Kurane J, Innis BL, Hoke CH Jr, Eckels KH, 1995 . T cell activation in vivo by Dengue virus infection. *J Clin Immunol* . 466 19 : 35 - 40.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndame AV , 1992 . Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (3) : 545 - 551.

Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW , 1994 . Molecular evolution and epidemiology of dengue - 3 viruses. *J Gen Virol* ; 75 : 65 -- 75.

Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, 2001. Immuno pathogenesis of Dengue virus infection. *J Biomed sci*, Sept. ; 8 (5): 377 – 388.

Leitneyer KC , 1999 . Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of Virology*, 73 (6) : 4738 – 4747.

Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivanaathan K, de Silva AM , 2003 . Emergence and Global Spread of a Dengue Serotype 3, Subtype III Virus. *Emerg Infect Dis* (serial online) . <http://www.cdc.gov/acidod/EID/vol9no7/03-0038.htm> 3 November 2004.

Moja J, Ramos-Castaneda J, Rico-Hesse R, Ramos C , 2002 . Phylogenetic analysis of the envelope protein (domain III) of dengue 4 viruses. *Salud Publica Mex* : 44 : 228 - 236.

Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooy S, Thisayakorn U, Scot RM, Burke DS, Hoke CH, Innis BL, Vaughn DW. 2003 . Serotype-specific Dengue virus circulation and Dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg*, 68 (2), p 191 - 202

Nukul Y, Tajima S, Kotaki A, Ito M, Takasaki T, Koike K, Kurane I, 2006. Novel Dengue Virus Type 1 from Travelers to Yap State, Micronesia. *Emerging Infectious Disease*, vol 12, no 2 : 343-346

Pang T , 2003 . Vaccines for the prevention of neglected diseases-dengue fever. *Current Opinion in Biotechnology*, 14 : 332 - 336

Parwati SB. 2002. Kewaspadaan Terhadap Gejala Diri Serta Tataaksana Demam Dengue/Demam Berdarah Dengue. Naskah Lengkap Seminar Kewaspadaan Terhadap Demam, Surabaya. hal 3

Perez JGR, Clark GG, Gubler DJ, Renter P, Sanders EJ, Vorndam AV , 1998 . Seminar : Dengue and dengue haemorrhagic fever *The Lancet* . 352 : 974 - 977.

Perikow Y, 2004. Development of Dengue Vaccine. <http://www3.who.sea.org/dengue/Dengue/Bulletin24/ch11.htm>.

Porter KR, Beckett CG, Kosasih H, Tan RL, Alsjahbana B, Rudiman PIF, Widjaja S, Listyaningsih E, Maekroef CN, McArdle JL, Parwati I, Sudjana P, Husni H, Yuwono D, Wuryadi S. 2005. Epidemiology of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in a Cohort of adults living in Bandung, West Java , Indonesia. *J. Trop. Med. Hyg*, 72 (1) : 60-66.

Prida Malasit ,1999. Complement system in the pathogenesis of shock and leakage in Dengue Haemorrhagic Fever and/or Dengue Shock Syndrome. *Proceeding International Seminar on Dengue Fever-Dengue Haemorrhagic TDX* Airlangga University, Surabaya, Oct 28-29th, p. 65

Rantam FA. 1988. Aspek Virologi Demam Berdarah Dengue (DBD) . Naskah Lengkap Seminar Demam Berdarah Dengue. FDC - Unair. Sep. hal. 25.

Ratgono A, Jaeli A, Erdahwati J., Arifin J, Murtini, Budiono S. 2005 . Pola Distribusi Penyakit Infeksi Virus (Dengue, Chikungunya, Polio, Flu burung) di Jawa Timur . Ancaman dan Kebijakan Penanggulangannya. Naskah Seminar mewaspadaai penyakit infeksi virus yang sedang berkecamuk saat ini . Tropical Disease Center Unair. Hal 3.

- Reynes JM, Ong S, Mey C, Ngan C, Hoyer S, Sall AA, 2003. Improved Molecular Detection of Dengue Virus Serotype 1 Variants. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (8) : 3864-3867
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Green S, Rothman AL, Ennis FA , 1998 . Molecular evolution of dengue type-2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* , 58 (1) : 96 - 101.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1980. *Molecular Cloning : A laboratory manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York,
- Samuel S, Koh CL, Pang T, Lam SK , 1990 . Nucleotide and encoded amino acid sequences of the capsid protein gene of three dengue-2 viruses isolated in Malaysia from patients with dengue haemorrhagic fever, dengue shock syndrome or dengue fever. *Nucleic Acids Research* 18 (7) : 1904.
- Sazaly AB, 1999. Induction of Apoptosis in Dengue virus infection. *Proceeding International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic*. TDC - Airlangga University, Surabaya. p. 58.
- Soegijanto S, 1998. *Penatalaksanaan dan Sistem Rujukan Penderita Demam Berdarah Dengue Pada Anak*. Naskah lengkap seminar Demam Berdarah Dengue. TDC Unair, Surabaya hal 61-71.
- Soegijanto S, 1999. *Masalah Penyakit Demam Berdarah Dengue di Indonesia*. Demam Berdarah Dengue. Hal 5.
- Soegijanto S , 2000 . Pola Klinis setiap Serotipe Virus Dengue Seminar : Demam Berdarah Dengue. TDC Unair, Surabaya : 32 - 41.
- Soegijanto S , 2002 . *Prospek Pemanfaatan Vaksin Dengue untuk menurunkan prevalensi di masyarakat*. Dipresentasikan pada Peringatan 90 Tahun Pendidikan Dokter di FK Unair Surabaya
- Soegijanto S , 2004 *Demam Berdarah Dengue. Tinjauan dan Temuan Baru di Era 2003*. Cetakan I. Airlangga University Press Surabaya. Hal 1-10
- Soegijanto S , 2004 . *Demam Berdarah Dengue* Airlangga University Press Surabaya Hal 99
- Suharti C, 2001. *Dengue Haemorrhagic Fever in Indonesia*. Thesis, Katholieke Universiteit Nijmegen Netherlands. P. 11.
- Suhendro, 2004. *Penatalaksanaan Demam Berdarah pada Pasien Dewasa*. Naskah Seminar Kedokteran Tropis, Pusat Kedokteran tropis Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta
- Sumarmo, 1998. *Demam Berdarah (Dengue) pada Anak*. Jakarta. UI-Press.
- Sungkar S, 2005. *Periberantasan Vektor Demam Berdarah Dengue*. *Majalah Kedokteran Indonesia*. No 5 Vol 55. hal 407.

Suroso Th. 1999. Epidemiological Situation of Dengue Haemorrhagic Fever and It's Control in Indonesia. Proceeding International Seminar on Dengue Fever / Dengue Haemorrhagic. TDC – Airlangga University, Surabaya. p. 11-14.

Suroso, Chrishantoro T , 2004 . Informasi Produk PanBio Dengue Fever Rapid Strip IgG dan IgM. Edisi ke-2. PT Pacific Biotekindo Intralab Jakarta. Hal 3-16.

Suroso, Chrishantoro T. 2004. Viremia dan Respon Antibodi. Informasi Produk. Panbio Dengue Duo IgM & IgG Rapid Strip Test. hal 11.

Suroso T, Umar AI , 2004 Epidemiologi dan Penanggulangan Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) di Indonesia saat ini. Penyunting : Sri Rezeki et al. Edisi I tahun 1999. Dalam : Demam Berdarah Dengue : Naskah Lengkap Pelatihan bagi Pelatih Dokter Spesialis Anak & Dokter Spesialis Penyakit Dalam dalam Tatalaksana Kasus DBD. Fakultas Kedokteran UI ; 14-31.

Sutaryo, 1999. Endothelial Cells in Dengue virus infectiott. Proceeding International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic. TDC – Airlangga University, Surabaya. p. 88.

Sutaryo, 2000. Perkembangan Patogenesis Demam Berdarah Dengue. Naskah lengkap Demam Berdarah Dengue, Jakarta. FK UI. Hal 34.

Sutaryo 2004. Dengue, Medika, Fak. Kedokteran UGM, Yogyakarta. Hal 54.

Sutaryo, 2004. Pengelolaan Demam Berdarah Dengue pada Anak. Naskah Seminar Kedokteran Tropis, Pusat Kedokteran Tropis Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta. hal 3.

Sutaryo , 2004 . Perkembangan patogenesis Demam Berdarah Dengue. Penyunting : Sri Rezeki et al. Edisi I tahun 1999. Dalam : Demam Berdarah Dengue : Naskah Lengkap Pelatihan bagi Pelatih Dokter Spesialis Anak & Dokter Spesialis Penyakit Dalam dalam Tatalaksana Kasus DBD. Fakultas Kedokteran UI , 32-43.

Suwandono A, Heriyanto B, Harun S, Muchlustriningsih E , 2004. Survei serologi kejadian luar biasa (KLB) Demam Berdarah Dengue di Jakarta 2004. Dalam : Warta DBD DepKes RI Juni-Juli 2004.

Suwandoyo E. 1998. Demam Berdarah Dengue Pada Orang Dewasa. Gejala Klinik dan Penatalaksanaannya. Naskah lengkap seminar demam bedarah Dengue. TDC – Unair, Surabaya. hal 52 – 58.

ter Meulen J, grau M, Lenz O, Emmerich P, Schmitz H, Oh F, Jaspert R, Niedrig M , 2000 . Isolation and partial characterization of dengue virus type 2 and 4 strains from dengue fever and dengue haemorrhagic fever patients from Mindanao, Republic of the Philippines. Tropical Medicine & International Health vol 5, issue 5 : 325-31.

Thein S , 2000 . Risk Faktors in Dengue Haemorrhagic Fever. Australian Centre for International & Tropical Health Nutrition. School of Population Health. The

University of Queensland Medical School, Herston Brisbane, Queensland Australia.
<http://www.sph.uq.edu.au/acathn>. 14 November 2004.

Tio PH, Prida Malasit, 1995. Anti – Dengue IgG Detection by an Indirect Elisa. South East Asian J Trop Med Public Health, vol 26, no. 4.

Tumbelaka AR, 1999. Diagnosis Demam Dengue/ Demam Berdarah Dengue. Demam Berdarah Dengue, FK UI, hal 73.

Usuku S, Castillo L, Sugimoto C, Noguchi Y, Yogo Y, Kohayashi N , 2001 . Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. Arch Virol , 146 : 1381-1390.

Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, de Uzcategui RC, Holmes EC, Gould EA, 2001 . Molecular epidemiology of Dengue type 2 virus in Venezuela : evidence for in situ virus evolution and recombination

Walker JM, Gingold EB, 1993 Molecular Biology and Biotechnology, 3rd ed. The Royal Society of Chemistry, P. 192 – 196.

Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB, 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. Lancet, 354 : 1431-1434.

WHO dan Depkes RI, 2000. Pencegahan dan Penanggulangan Penyakit Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue.

WHO, 1997. Dengue Haemorrhagic Fever, Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2nd ed. P. 12 -- 47.

WHO, 1997 . Dengue Haemorrhagic Fever : Diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva, 1-84.

WHO, 2004. Dengue fever in Indonesia-update 4. 4 April 2005.

Yao H, Fang M, Zhao W, Duan F, Lin L, Chen C, Guo H , 2002 . Identification of Genetic Variation among Dengue Virus DEN-3 isolates with Heteroduplex Analysis. Dengue Bulletin : 26 : 118-124.

Lampiran 1. Protap (Prosedur Tetap) Pengambilan Darah dan Catatan Medis**PROSEDUR TETAP (PROTAP) PENGAMBILAN DARAH****PERALATAN**

1. Tourniquet
2. Kertas alkohol 70%
3. Semprit steril 10 ml
4. Tabung steril/vacutainer berisi antikoagulan Na sitras (3,8% 0,106M 31,3 g/L $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) atau EDTA 1-2 mg/ml darah atau heparin 15-20 IU/ml darah), bertutup.
5. Tabung steril tanpa anti koagulan, bertutup.
6. Tabung Eppendorf kecil @ 3 ml, 3 buah untuk masing-masing pasien
7. Formulir identitas pasien
8. Kertas label

PROSEDUR PENGAMBILAN

1. Isi formulir identitas pasien.
2. Siapkan peralatan, beri label nama, umur, no. register pada tabung. Untuk tabung steril berisi anti koagulan Na sitras/EDTA/Heparin dikode A, sedang tabung steril tanpa anti koagulan dikode B.
3. Pasang tourniquet pada lengan atas, kemudian pilih vena yang tepat untuk pengambilan darah, biasanya vena mediana cubiti.
4. Lakukan disinfeksi pada kulit di daerah yang akan diambil dengan menggunakan alkohol 70%, biarkan kering.

5. Tusukan jarum ke dalam vena, ambil darah sebanyak 8-10 ml, dibagi dua.
6. Darah 4-5 ml pertama dimasukkan ke dalam tabung steril berisi Na.sitras/EDTA/heparin. Untuk Na.sitras 0,5 ml . darah 4,5 ml (perbandingan 1:9).
7. Darah 4-5 ml berikutnya dimasukkan ke dalam tabung steril tanpa antikoagulan.
8. Lepaskan tourniquet dan cabut jarum dari vena.
9. Segera tekan bekas tusukan dengan kapas kering.

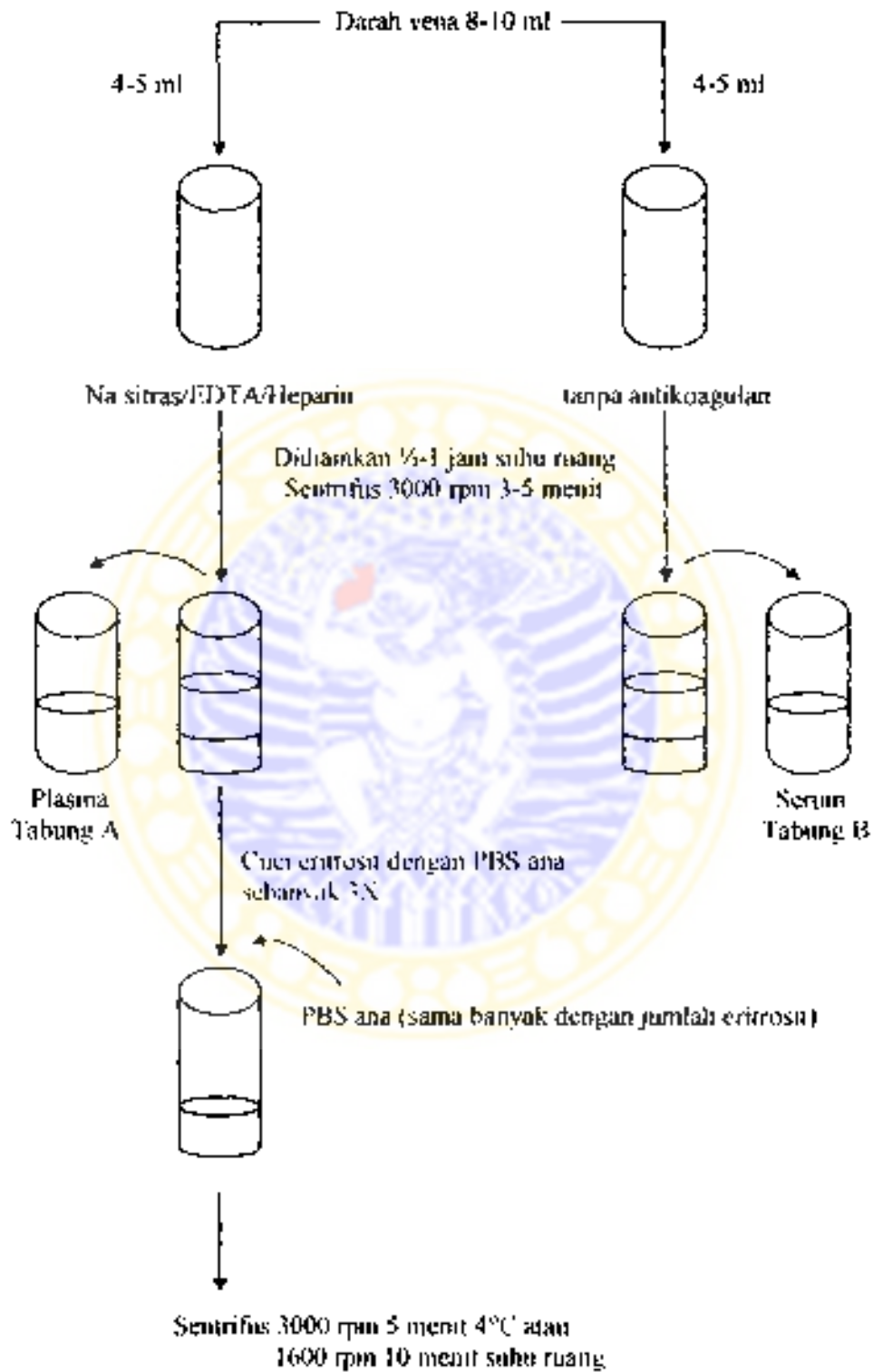
CARA PENYIMPANAN DAN PENGIRIMAN

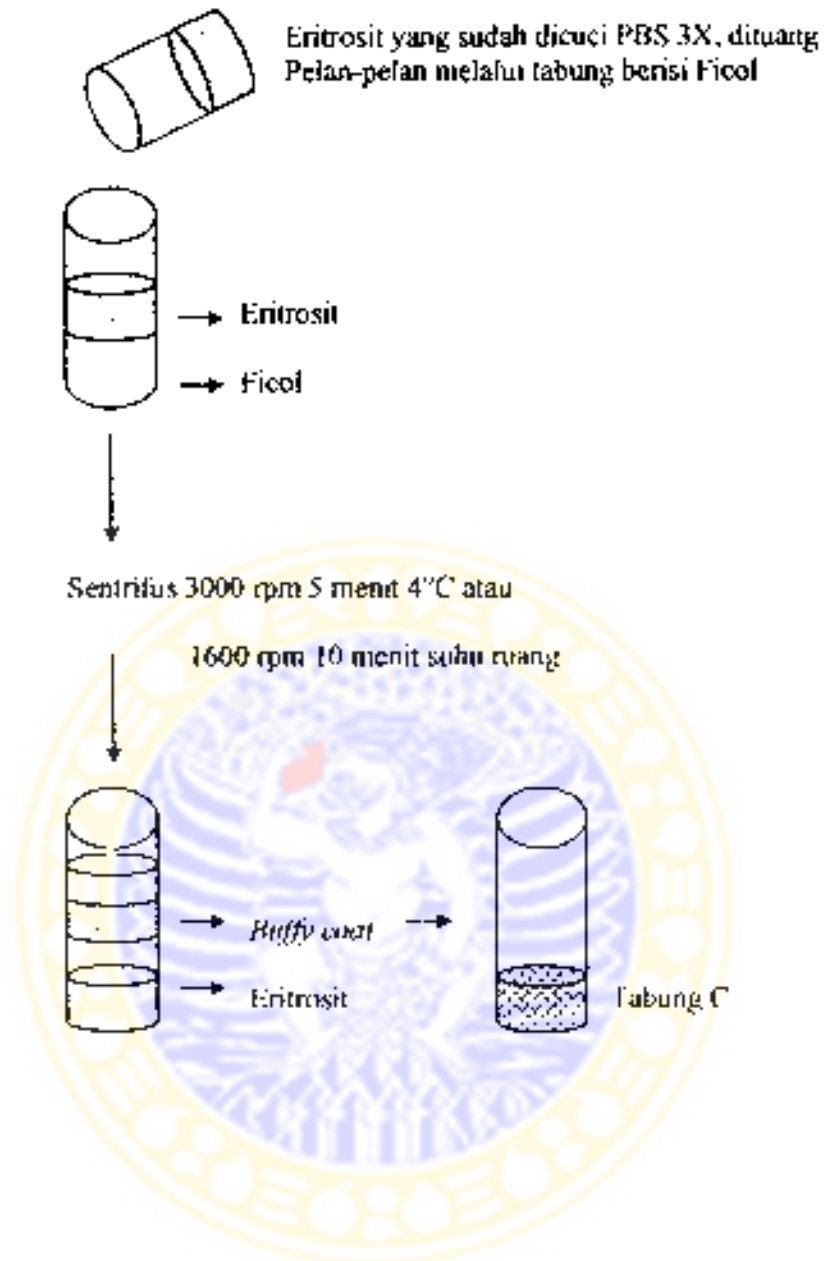
1. Spesimen yang sudah diambil, baik dalam tabung steril Na.sitras/EDTA/heparin (A) maupun tabung steril tanpa anti koagulan (B), setelah 0,5-1 jam, disentrifus 3000rpm, selama 3 menit.
2. Pada tabung A, didapatkan plasma, dimasukkan dalam tabung Eppendorf beri tanda A dan jangan lupa beri label nama, umur, no.register.
3. Tabung B, setelah disentrifus, didapatkan serum, dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf beri tanda B dan jangan lupa beri label nama, umur, no. register.
4. Selanjutnya untuk pemeriksaan PBMC, spesimen dari tabung A yang plasmanya telah dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf, masih terdapat eritrosit. Eritrosit tersebut (pada tabung A) dicuci dengan PBS pH 7,0 ana (jumlah PBS sama banyak= ekuivalen eritrosit) dibolak balik, lakukan sampai 3 kali (sampai supernatant = lapisan atas jernih), ditirana setiap tahap disentrifus (tahap pencucian eritrosit 1-3) 3000rpm 5 menit atau 1600 rpm 10 menit temperatur 10°C/suhu ruang

5. Setelah eritrosit dicuci bersih, eritrosit tersebut dimasukkan ke dalam tabung 10 ml yang telah diberi 3-4 ml ficol lewat dinding pelan-pelan, jangan sampai eritrosit bercampur dengan larutan Ficolnya. Eritrosit akan berada di bagian atas. Kemudian dilakukan sentrifus 3000 rpm 4°C selama 5 menit. Bila tidak memiliki sentrifus 4°C, dapat digunakan sentrifus pada suhu ruang 1600 rpm selama 10 menit.
6. Pisahkan dengan pipet steril lapisan *buffy coat*-nya (yaitu lapisan putih diatas eritrosit) yang berbentuk cincin dan selanjutnya masukkan ke dalam tabung Eppendorf steril, diberi kode C (tabung C ini sekarang berisi PBMC).
7. Baik plasma (tabung Eppendorf A), serum (tabung Eppendorf B) dan PBMC (tabung Eppendorf C) dimana ketiganya telah diberi kode, dimasukkan kedalam tangki liquid nitrogen. Jangan lupa menutup rapat pada ketiga tabung Eppendorf ini dan di-sealed dengan parafilm agar tidak tumpah.
8. Pengiriman tepat di dalam kotak *styro-foam* yang telah diberi *dry-ice* dengan jumlah yang cukup banyak, sehingga diperkirakan suhu di dalam *styro-foam* sekitar 20°C, agar ketiga bahan tersebut tidak rusak.
9. Dikirim ke Tropical Diseases-Center Unair Surabaya

Catatan : Bila darah mengalami lisis, tidak dapat digunakan sebagai sampel.

SKEMA PROSEDUR PENGAMBILAN DARAH





CARA PEMBERIAN KODE

Kode : a/b/c/d/e/f...

Keterangan :

- a. kode area
misal : S - Surabaya
J = Jenber
M -- Malang
SMR = Semarang
BD - Bandung
JKT = Jakarta
BT = Banten
YG = Yogyakarta
BJ = Banjarmasin
MK - Makasar
MN = Manado
MD = Medan
PLB - Palembang
D = Denpasar
MTR - Mataram
- b. no.urut pasien
misal : 001, 002, 003 ... s/d 100
- c. bulan
misal : 06, 07, 08 ...
- d. tahun
misal : 03, 04
- e. jenis kelamin
misal : P = Perempuan, L. Laki-laki
- f. umur (dalam tahun)
cukup jelas

Kode :

CATATAN MEDIS PENDERITA DEMAM BERDARAH DENGUE

RSUD :

Alamat :

Telp

I Data Pribadi Penderita/Keluarga

1. Nama :

2. Umur :

3. Jenis Kelamin :

4. Suku Bangsa : Jawa/Madura/Cina/Arab/India/Lainnya :

5. Pekerjaan :

6. Alamat :

7. Nama Orang Tua :

8. Pekerjaan :

II. Gejala Klinis

- | | | | | |
|---------------------|---|-------------------------|------------------|---|
| 1. Demam | : | (.....°C), hari ke | 11. Hematemesis | : |
| 2. Nyeri abdomen | : | | 12. Melena | : |
| 3. Nyeri kepala | : | | 14. Hepatomegali | : |
| 4. Nyeri otot | : | | 15. Akral dingin | : |
| 5. Mual | : | | 16. Gelisah | : |
| 6. Muntah | : | | 17. Lethargi | : |
| 7. Petekia/purpura | : | | 18. Nadi | : |
| 8. Epistaksis | : | | 19. Tensi | : |
| 9. Pendarahan gusi | : | | | |
| 10. Tourniquet test | : | | | |

III. Pemeriksaan Laboratorium

- | | | | | |
|------------------|---|--|-------------|--------|
| 1. Darah Lengkap | : | | 4. SGPT | : |
| 2. Trombosit | : | | 5. SGOT | : |
| 3. Hematokrit | : | | 6. Serologi | : Ig.G |
| | | | | Ig.M |

IV. Diagnosa Derajat I / II / III / IV

V. Penderita sembuh/meninggal/jama dirawat : hari

.....2003

Dokter Pemeriksa

Lampiran 2. Persetujuan Tindakan Medis

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama :

Umur/Jenis Kelamin :

Alamat :

Bukti diri/KTP/SIM :

PERSETUJUAN

Untuk dilakukan tindakan medis berupa : **pengambilan darah untuk penelitian oleh Soedjoko Hariadhi, dr, MS/Aryati, dr, MS, SpPK/Prof Dr. Soegeng Soegijanto, dr, SpA (K), DTM&H terhadap diri saya sendiri/istri/suami/anak/ayah/ibu saya,** dengan

Nama :

Umur/Jenis Kelamin :

Alamat :

Bukti diri/KTP/SIM :

Dirawat di :

No. Rekam medis :

Yang tujuan, sifat dan perlunya tindakan medis tersebut diatas, serta resiko yang dapat Ditimbulkanya telah cukup dijelaskan oleh dokter dan telah saya mengerti sepenuhnya.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan

..... tanggal..... bulan..... tahun.....

Saksi

Dokter

Yang membuat pernyataan

(.....)

(.....)

(.....)

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

N a m a :

Umur/Jenis kelamin :

A l a m a t :

Bukti diri/KTP/SIM :

dengan ini menyatakan dengan sesungguhnya telah memberikan

PENOLAKAN

Untuk dilakukan tindakan medis berupa : **pengambilan darah untuk penelitian oleh Soedjoko Hariadhi, dr, MS/ Aryati, dr, MS, SpPK/ Prof Dr. Soegeng Soegijanto, dr, SpA (K), DTM&H terhadap diri saya sendiri/istri/suami/anak/ayah/ibu saya** , dengan

N a m a :

Umur/Jenis kelamin :

A l a m a t :

Bukti diri/KTP/SIM :

Dirawat di :

No Rekam medis :

Saya juga telah menyatakan dengan sesungguhnya dengan tanpa paksaan bahwa saya:

- Telah diberikan informasi dan penjelasan serta peringatan akan bahaya, resiko serta berbagai kemungkinan yang timbul apabila tidak dilakukan tindakan medis berupa pengambilan darah.
- Telah saya pahami sepenuhnya informasi dan penjelasan yang diberikan dokter.
- Atas tanggung jawab dan resiko saya sendiri tetap menolak untuk dilakukan tindakan medis yang dianjurkan dokter.

..... (gl)..... bulan..... tahun.....

Saksi

Dokter

Yang membuat pernyataan

{

{

{

Lampiran 3. Ethical Clearance LEMBAR ISIAN

**PANITIA KELAIKAN ETIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
RSUD Dr. SOETOMO
(DIISI OLEH PENELITIAN UTAMA)**

1. Para Peneliti (Nama, title, unit kerja)

Peneliti utama : **Soedjoko Hariasthi, dr, MS, Prodi Keperawatan Depkes
Surabaya**

Peneliti lain :

1. **Prof. Dr. Soegeng Soegijanto, dr. SpA(K), DTM&H**
2. **Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.**
3. **Soetjipto, dr, MSc, PhD**
4. **Aryati, dr, MS, SpPK**

Multisenter :

ya

tidak

2. Judul Penelitian

Pola Distribusi Serotipe Virus Dengue Pada Beberapa Daerah Endemik di Jawa Timur Dengan Kondisi Geografis Berbeda

3. Subyek penelitian :

penderita

non penderita

hewan

Keterangan :

- * Subyek non penderita adalah subyek penelitian yang tidak mendapat manfaat langsung (baik dari spiterapeutik maupun diagnostic) dari penelitian yang dilakukan atas dirinya

4. Jelaskan manfaat penelitian tersebut terhadap pengembangan ilmu dan/atau

Pelayanan kesehatan dan penderita

- a. Manfaat terhadap pengembangan ilmu:

Sebagai dasar pengembangan teoriu tentang penyakit Demam Berdarah Dengue terutama di bidang epidemiologi molekuler sesuai dengan karakteristik geografi daerah.

b. Manfaat terhadap pelayanan kesehatan :

1. Untuk membuat peta pola distribusi serotype virus Dengue berdasar geografi di Jawa Timur.
2. Untuk penyempurnaan penatalaksanaan, pencegahan, pengendalian, Pengobatan penyakit Demam Berdarah Dengue.
3. Untuk penyempurnaan pembuatan vaksin Demam Berdarah Dengue.

c. Bila penelitian ini menggunakan penderita, uraikan untuk mafaat tersebut :

Untuk menemukan hubungan antara karakteristik serotype virus Dengue berdasarkan geograi dengan derajat keparahan penyakit Demam Berdarah Dengue sehingga penatalaksanaan pengobatan / perawatan penderita akan lebih baik.

5. Jelaskan resiko penelitian yang mungkin terjadi pada subyek penelitian

- Hematomom pada lokasi penusukan jarum.
- Pendarahan pada bekas tusukan jarum.

6. Jelaskan prosedur pemantauan yang digunakan untuk keselamatan subyek Penelitian.

- Observasi harian oleh dokter dan perawat.

7. Untuk mencapai azas keadilan, jelaskan cara bagaimana memilih dan memperlakukan subyek penelitian.

1. Penderita yang dipilih sesuai dengan criteria Diagnosa WHO 1997.
2. Yang bersedia diteliti dengan menandatangani lembar persetujuan (informed consent).

8. Jelaskan cara pengamanan tambahan bagi subyek penelitian yang beresiko atau "vulnerable" (seperti misalnya bila subyek penelitian tersebut bayi, anak-anak, ibu hamil dan menyusui, cacat mental, pasien tidak sadar, narapidana, mahasiswa kedokteran dll)

- Observasi harian lebih diperkerat/monitoring oleh dokter/perawat.
- Bila resiko terlalu besar , lebih baik dikeluarkan dan subyek penelitian.

9. Bila penelitian ini menggunakan subyek manusia, jelaskan bagaimana cara memberitahu dan mengajak subyek bila tidak diminta "informed consent" berilah alasan yang kuat mengapa.

Lampirkan : *informed consent* dan penjelasan lisan/tertulis yang diberikan kepada subyek penelitian sebelum menandatangani *informed consent* (bila ada)

- Bila subyek manusia dewasa, diberi penjelasan bahwa pengambilan darah ini merupakan bagian dari prosedur untuk menegakkan diagnosa penyakit.
- Bila subyek manusia anak yang belum bisa diajak bicara tentang penyakit, penjelasan diberikan kepada orang tuanya.

10. Jelaskan cara yang digunakan untuk melindungi keberhasilan subyek penelitian.

- Catatan medis disimpan oleh peneliti.
- Sampel darah tidak ditulis nama penderita, tetapi diganti dengan pemberian kode.

11. Bila penelitian ini menggunakan subyek manusia, jelaskan hubungan pribadi antara peneliti utama dengan subyek yang diteliti.

- Dokter-penderita guru-murid majikan-anak buah
- Lain:

12. Bila penelitian ini menggunakan orang sakit, sebutkan nama dokter/dokter-dokter yang bertanggung jawab terhadap diagnosa dan perawatannya. Bila menggunakan orang sehat jelaskan cara pemeriksaan kesehatannya.

- Dokter yang merawat di rumah sakit setempat dari IRNA Anak, dan IRNA Penyakit Menular Dewasa.

13. Apakah pasien dibebani sebagian atau seluruh biaya penelitian.

- ya tidak

14. Bila penelitian ini menggunakan subyek manusia, apakah subyek mendapatkan

ganti rugi bila ada gejala efek samping? ya tidak

Bila ya, berapa banyak? sesuai biaya yang digunakan untuk pengobatan efek samping akibat prosedur pengambilan darah untuk penelitian.

15. Bila penelitian ini menggunakan subyek manusia, apakah subyek diasuransikan?

ya tidak

16. Apakah rumah sakit dibebani biaya penelitian?

Ya tidak

Surabaya,

Peneliti Utama

Soedjoko Hariadhi, dr, MS.

Mengetahui dan menyetujui
Kepala Laboratorium/UPF

Telah diperiksa dan disetujui tanggal :

Panitia Kelaikan etik

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Ketua

.....

Lampiran 4. Protokol kerja RT-PCR untuk serotyping, pemurnian DNA, pelabelan DNA dan RT-PCR

ANALISIS MOLEKULER VIRUS DENGUE

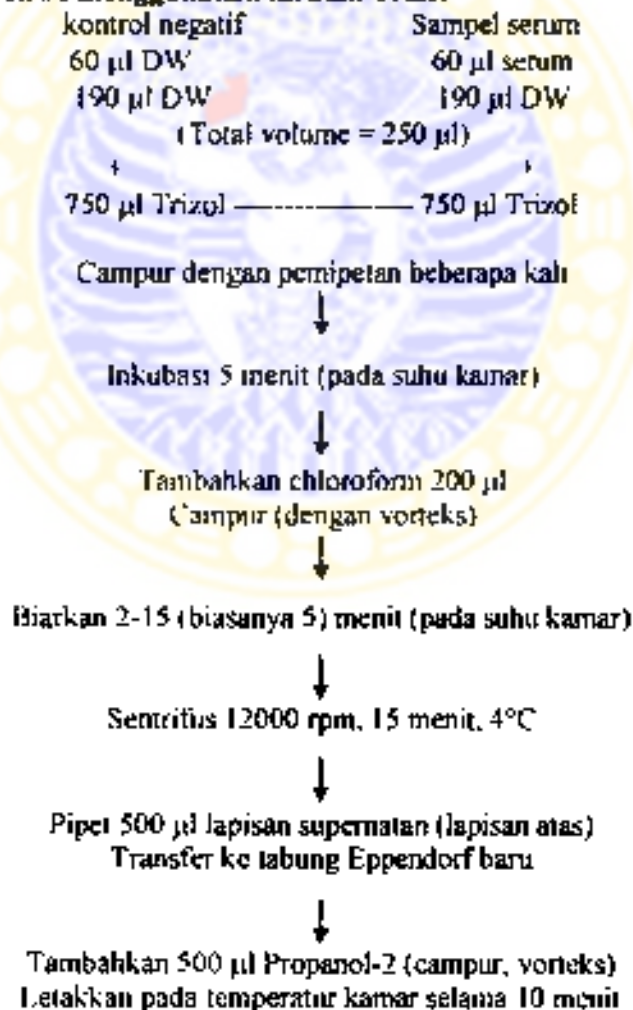
Tujuan pemeriksaan :

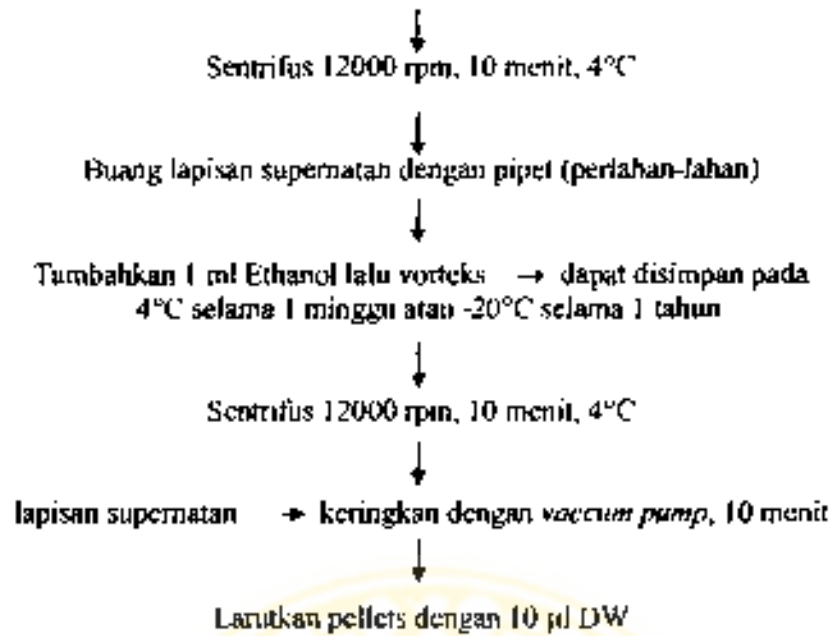
1. Menentukan adanya RNA Virus Dengue pada serum penderita yang menunjukkan hasil pemeriksaan IgM positif.
2. Menentukan tipe/suptipe virus Dengue

Serum penderita yang memberikan hasil pemeriksaan IgM positif selanjutnya dilakukan pemeriksaan secara berturut-turut sebagai berikut : ekstraksi RNA, sintesis cDNA, PCR, elektroforesis, pemurnian *PCR product*, DNA sequencing, analisis homologi untuk menentukan tipe/suptipe virus Dengue. Adapun teknik pemeriksaannya adalah sebagai berikut :

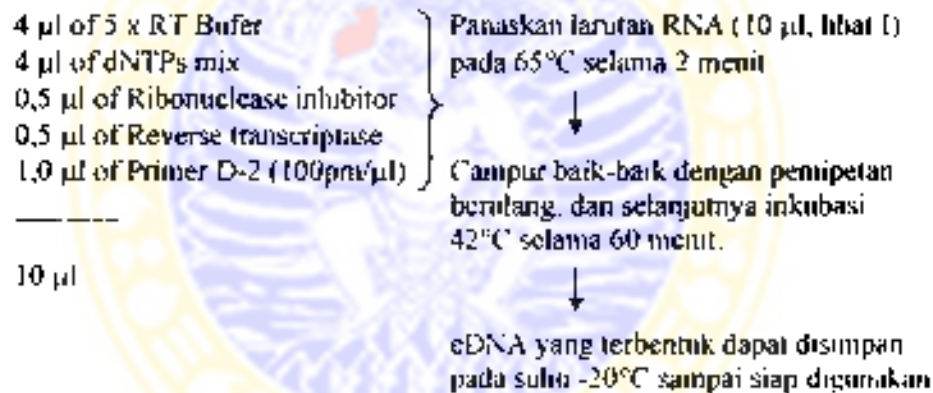
**PROTOKOL DETEKSI
VIRUS DENGUE DALAM SERUM**

1. Ekstraksi RNA menggunakan larutan Trizol





II. REVERSE TRANSCRIPTION untuk menghasilkan cDNA



Setelah sintesis cDNA dilakukan PCR dengan menggunakan primer yang spesifik untuk masing-masing tipe virus Dengue. Primer yang digunakan adalah sebagai berikut :

Primer	Urutan nukleotida primer	Posisi primer	PCR product
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	134-161	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-3'	616-644	511
TS-1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	568-586	482 (D1 & TS-1)
TS-2	5'-CGCCACAAGGCCATGAACAG-3'	232-252	119 (D1 & TS-2)
TS-3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421	290 (D1 & TS-3)
TS-4	5'-CTCTGTTTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	392 (D1 & TS-4)

III. PCR TAHAP I :

Pipet 5 μ l yang terbentuk dan masukkan dalam tabung Eppendorf 0,5 ml.

Tambahkan 76 μ l DW

8 μ l d NTPs mix
9 μ l 10xTth buffer
0,5 μ l Primer D-1 (100 pm/ μ l)
0,5 μ l Primer D-2 (100 pm/ μ l)

94 μ l

Panaskan pada 94 °C selama 5 menit
setelah itu lakukan *spindown* beberapa
detik

Tambahkan 1 μ l of Tth DNA Polymerase (2U/ μ l)
campur baik-dengan pemipetan (72°C)
tambahkan 100 μ l mineral oil

PCR : 94°C → 30 detik
55°C → 60 detik
72°C → 2 menit } 35 cycles

Pada akhir siklus ke 35, pertahankan sampel pada suhu 72°C selama 10 menit.

IV. PCR TAHAP II :

Pipet 5 μ l hasil PCR tahap 1. dan tampung dalam tabung Eppendorf 0,5 ml baru

Tambahkan : 72 μ l DW

2 μ l dNTPs mix
10 μ l 10xTth buffer
2 μ l Primer D-1
2 μ l Primer TS-1 (100 rpm/ μ l)
2 μ l Primer TS-2 (100 rpm/ μ l)
2 μ l Primer TS-3 (100 rpm/ μ l)
2 μ l Primer TS-4 (100 rpm/ μ l)

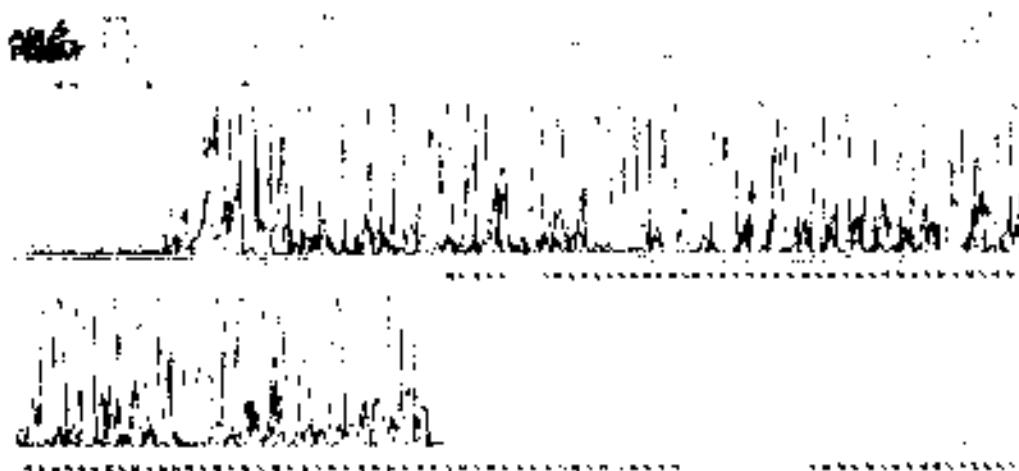
Panaskan pada suhu 94°C selama 5 menit
spindown selama beberapa detik

Tambahkan 1 μ l Tth DNA polymerase (2U/ μ l)
campur baik-baik dengan pipet (72°C)
tambahkan di atasnya 100 μ l mineral oil

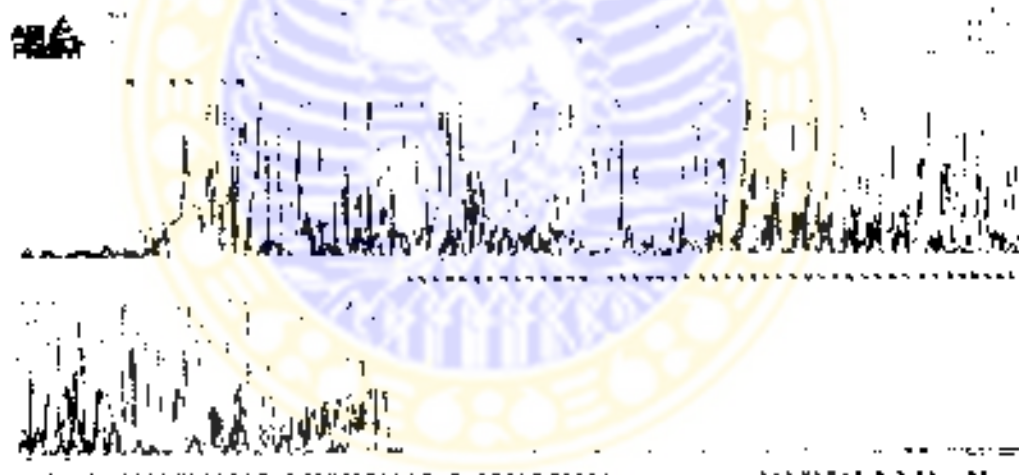
PCR : 94°C → 30 detik
55°C → 60 detik
72°C → 2 menit } 35 cycles

Pada akhir siklus ke 35, pertahankan suhu sampel pada 72°C selama 10 menit

Lampiran 5. Hasil sekuensing nukleotida dari berbagai kota di Indonesia

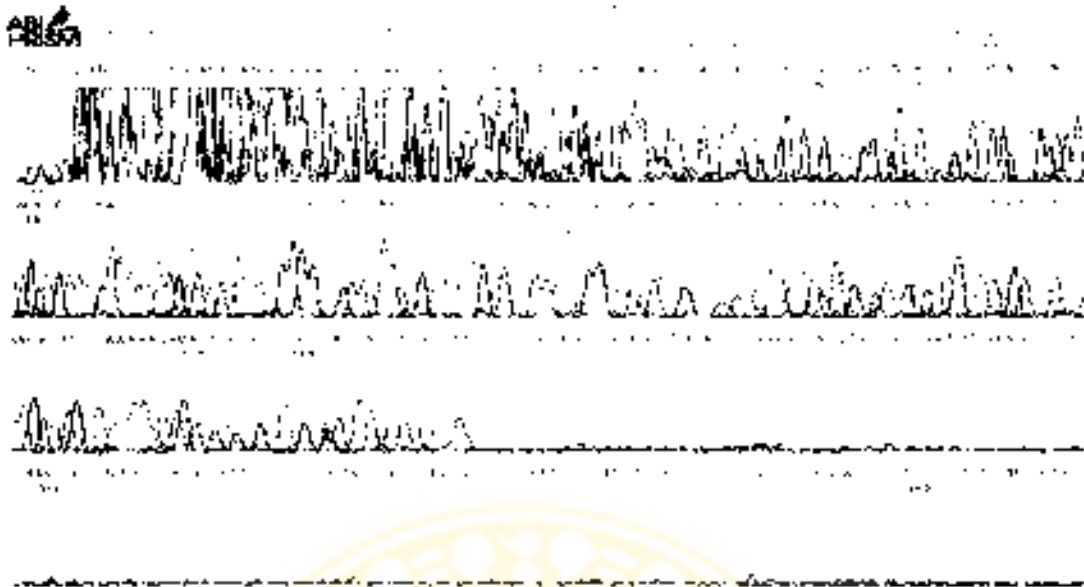


Sekuensing kota Malang DEN-2

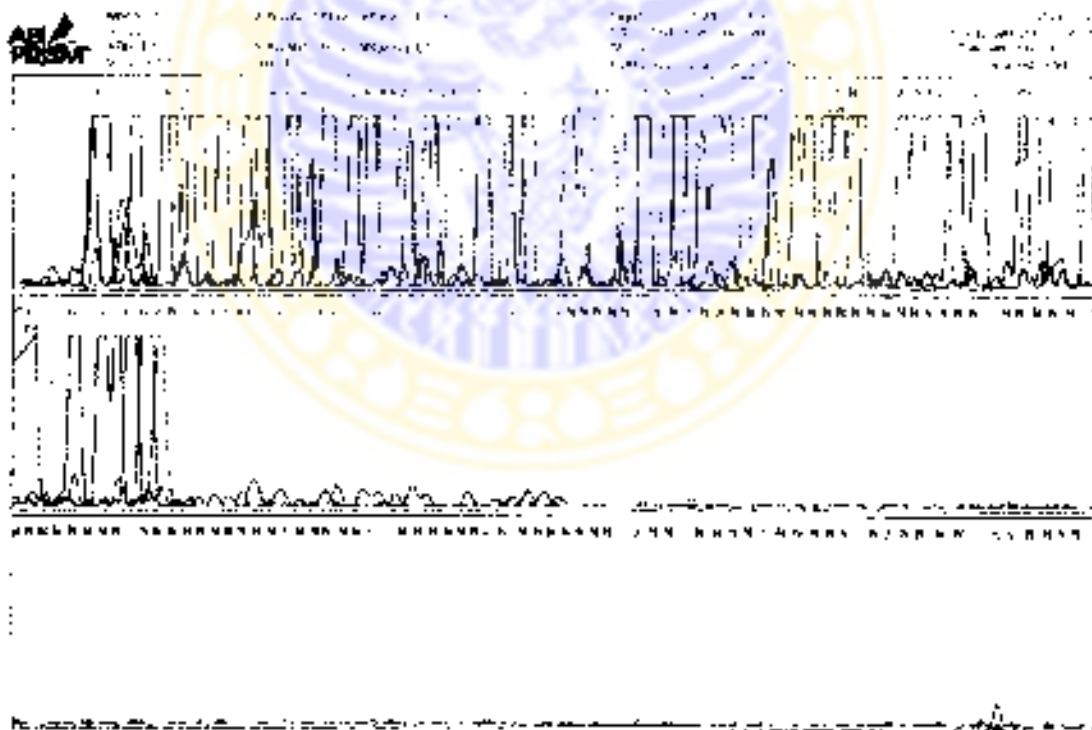


Sekuensing kota Jember DEN-2



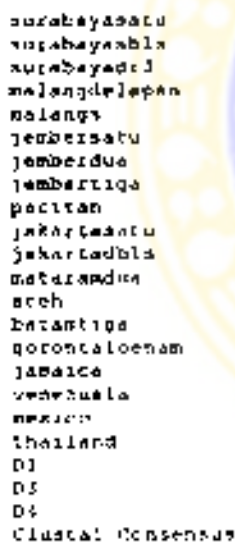
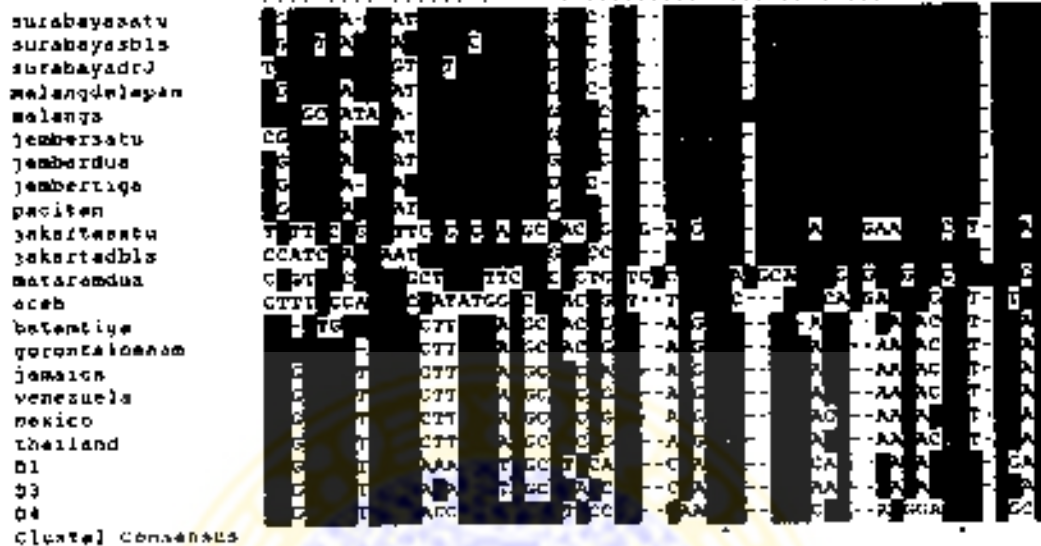


Sekuensing kota Jayapura DEN-3

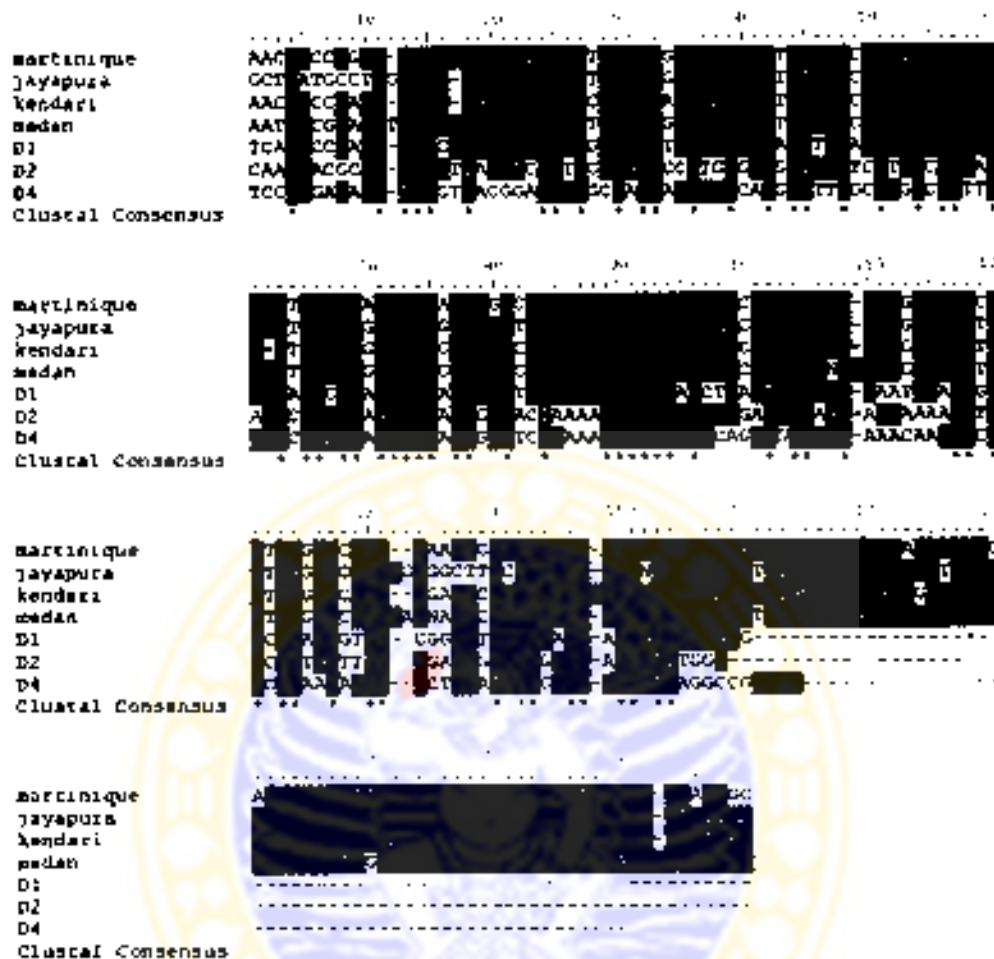


Sekuensing kota Gorontalo DEN-2

Lampiran 6. Multiple alignment nukleotida serotipe DEN-2 dari sampel Jawa Timur (Surabaya, Malang, Jember, Pacitan), Jakarta, Mataram, Aceh, Batam, Gorontalo dan referens (Jamaica, Venezuela, Mexico, Thailand)



Lampiran 7. *Multiple alignment* nukleotida serotipe DEN-3 dari sampel Jayapura, Kendari, Medan dan referens (Martinique, Amerika Tengah)



Lampiran 8. Sequence Homology Data dari sampel DEN-2

Sequence 1: malangs
Sequence 2: jakartadbbs
Identities: 0.822222

Sequence 1: malangs
Sequence 2: jembertiga
Identities: 0.8372093

Sequence 1: malangs
Sequence 2: surabayasatu
Identities: 0.8372093

Sequence 1: malangs
Sequence 2: jembersatu
Identities: 0.8314607

Sequence 1: malangs
Sequence 2: jemberdua
Identities: 0.8314607

Sequence 1: malangs
Sequence 2: pacitan
Identities: 0.8045977

Sequence 1: malangs
Sequence 2: malangdelapan
Identities: 0.8390805

Sequence 1: malangs
Sequence 2: surabayasbbs
Identities: 0.7586207

Sequence 1: malangs
Sequence 2: jakartasatu
Identities: 0.2777778

Sequence 1: malangs
Sequence 2: aceh
Identities: 0.3888889

Sequence 1: malangs
Sequence 2: batamtiga
Identities: 0.2247191

Sequence 1: malangs
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.2555556

Sequence 1: malangs
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.3478261

Sequence 1: malangs
Sequence 2: surabayadrJ
Identities: 0.7471264

Sequence 1: malangs
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.311111

Sequence 1: malangs
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.3000000

Sequence 1: malangs
Sequence 2: mexico
Identities: 0.3000000

Sequence 1: malangs
Sequence 2: thailand
Identities: 0.3000000

Sequence 1: jakartadbis
Sequence 2: jembertiga
Identities: 0.8399805

Sequence 1: jakartadbis
Sequence 2: surabayasatu
Identities: 0.8160920

Sequence 1: jakartadbis
Sequence 2: jembersatu
Identities: 0.9180460

Sequence 1: jakartadbis
Sequence 2: jembertua
Identities: 0.9080460

Sequence 1: jakartadbis
Sequence 2: pacitan
Identities: 0.8275862

Sequence 1: jakartadbis
Sequence 2: pacitan
Identities: 0.8275862

Sequence 1: jakartadb1s
Sequence 2: surabayasb1s
Identities: 0.8275862

Sequence 1: jakartadb1s
Sequence 2: jakartasatu
Identities: 0.2921348

Sequence 1: jakartadb1s
Sequence 2: aeoh
Identities: 0.3820225

Sequence 1: jakartadb1s
Sequence 2: batamtiga
Identities: 0.2613636

Sequence 1: jakartadb1s
Sequence 2: gontaloenam
Identities: 0.2500000

Sequence 1: jakarta1b1s
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.3804348

Sequence 1: jakartadb1s
Sequence 2: surabayad1
Identities: 0.7386364

Sequence 1: jakartadb1s
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.2727273

Sequence 1: jakartadb1s
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.2613636

Sequence 1: jakartadb1s
Sequence 2: mexico
Identities: 0.2613636

Sequence 1: jakartadb1s
Sequence 2: thailand
Identities: 0.2613636

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: surabayasatu
Identities: 0.9753086

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: jembersatu
Identities: 0.3837209

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: jemberdua
Identities: 0.4000000

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: pacitan
Identities: 0.4146341

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: malangdelapan
Identities: 0.4268293

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: surabayasbls
Identities: 0.4268293

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: jakartasatu
Identities: 0.2558140

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: aceh
Identities: 0.2771084

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: batamtiga
Identities: 0.2222222

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.2592593

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: malaramdua
Identities: 0.2307692

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: surabayadrJ
Identities: 0.2857143

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.2048193

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.2048193

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: mexico
Identities: 0.2289157

Sequence 1: jembertiga
Sequence 2: thailand
Identities: 0.2048193

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: jembersatu
Identities: 0.8372093

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: jemberdua
Identities: 0.8588235

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: pacitan
Identities: 0.8795181

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: malangdelapan
Identities: 0.8902439

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: surabayasbls
Identities: 0.7738095

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: jakartasatu
Identities: 0.2471910

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: aceh
Identities: 0.3750000

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: batantiga
Identities: 0.2528736

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.2386364

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.3626374

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: surabayadrj
Identities: 0.7738095

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.2840909

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.2727273

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: mexico
Identities: 0.2727273

Sequence 1: surabayasatu
Sequence 2: thailand
Identities: 0.2727273

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: jemberdua
Identities: 0.9767442

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: pacitan
Identities: 0.8953488

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: maingdelapan
Identities: 0.9418605

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: surabayasbls
Identities: 0.8255814

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: jakartasatu
Identities: 0.2921348

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: aceh
Identities: 0.3932584

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: barantiga
Identities: 0.2758621

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.2727273

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.3956044

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: surabayadrJ
Identities: 0.7701149

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.2840909

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.2840909

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: mexico
Identities: 0.2727273

Sequence 1: jembersatu
Sequence 2: thailand
Identities: 0.2727273

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: pacitan
Identities: 0.9176471

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: malangdelapan
Identities: 0.9647059

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: surabayashls
Identities: 0.8372093

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: jakartasatu
Identities: 0.2921348

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: acch
Identities: 0.3820225

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: batamtiga
Identities: 0.2643678

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.2613636

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.3956044

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: surabayadrj
Identities: 0.7586207

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.2840919

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.2727273

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: mexico
Identities: 0.2727273

Sequence 1: jemberdua
Sequence 2: thailand
Identities: 0.2727273

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: malangdelapan
Identities: 0.9277108

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: surabayasbls
Identities: 0.8192771

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: jakartasatu
Identities: 0.2696629

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: aceh
Identities: 0.3636364

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: batamtiga
Identities: 0.2528736

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.2159091

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.3736264

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: sinabavadrJ
Identities: 0.8117647

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.2500000

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.2386364

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: mexico
Identities: 0.2613636

Sequence 1: pacitan
Sequence 2: thailand
Identities: 0.2386364

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: surabayasbls
Identities: 0.8571429

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: jakanasatu
Identities: 0.2696629

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: aceh
Identities: 0.3750000

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: batamtiga
Identities: 0.2413793

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.2386364

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.3846154

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: surabayadrj
Identities: 0.7857143

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.2727273

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.2613636

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: mexico
Identities: 0.2613636

Sequence 1: malangdelapan
Sequence 2: thailand
Identities: 0.2613636

Sequence 1: surabayasbls
Sequence 2: jakartasatu
Identities: 0.2921348

Sequence 1: surabayasbls
Sequence 2: aceh
Identities: 0.3750000

Sequence 1: surabayasbls
Sequence 2: batamtiga
Identities: 0.2528736

Sequence 1: surabayasbls
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.2386364

Sequence 1: surabayasbls
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.3846154

Sequence 1: surabayasbls
Sequence 2: surabayadrj
Identities: 0.7294118

Sequence 1: surabayasbls
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.2727273

Sequence 1: surabayasbls
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.2727273

Sequence 1: surabayasbls
Sequence 2: mexico
Identities: 0.2727273

Sequence 1: surabayasbls
Sequence 2: thailand
Identities: 0.2727273

Sequence 1: jakartasatu
Sequence 2: aceh
Identities: 0.3295455

Sequence 1: jakartasatu
Sequence 2: batamtiga
Identities: 0.6250000

Sequence 1: jakartasatu
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.6477273

Sequence 1: jakartasatu
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.3736264

Sequence 1: jakartasatu
Sequence 2: surabayadrj
Identities: 0.2584270

Sequence 1: jakartasatu
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.5730337

Sequence 1: jakartasatu
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.5617978

Sequence 1: jakartasatu
Sequence 2: mexico
Identities: 0.5505618

Sequence 1: jakartasatu
Sequence 2: thailand
Identities: 0.5617978

Sequence 1: aceh
Sequence 2: batamiga
Identities: 0.3448276

Sequence 1: aceh
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.3448276

Sequence 1: aceh
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.3186813

Sequence 1: aceh
Sequence 2: surabayadrj
Identities: 0.4318182

Sequence 1: aceh
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.3522727

Sequence 1: aceh
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.3522727

Sequence 1: aceh
Sequence 2: mexico
Identities: 0.3409091

Sequence 1: aceh
Sequence 2: thailand
Identities: 0.3522727

Sequence 1: batamiga
Sequence 2: gorontaloenam
Identities: 0.8375000

Sequence 1: batamiga
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.2967033

Sequence 1: batamtiga
Sequence 2: surabayadrJ
Identities: 0.2758621

Sequence 1: batamtiga
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.7469880

Sequence 1: batamtiga
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.7469880

Sequence 1: batamtiga
Sequence 2: mexico
Identities: 0.6987952

Sequence 1: batamtiga
Sequence 2: thailand
Identities: 0.7319398

Sequence 1: gorontaloenam
Sequence 2: mataramdua
Identities: 0.2637363

Sequence 1: gorontaloenam
Sequence 2: surabayadrJ
Identities: 0.2159091

Sequence 1: gorontaloenam
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.7710843

Sequence 1: gorontaloenam
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.7710843

Sequence 1: gorontaloenam
Sequence 2: mexico
Identities: 0.7228916

Sequence 1: gorontaloenam
Sequence 2: thailand
Identities: 0.7590361

Sequence 1: mataramdua
Sequence 2: surabayadrJ
Identities: 0.3846154

Sequence 1: mataramdua
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.2967033

Sequence 1: mataramdua
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.2857143

Sequence 1: mataramdua
Sequence 2: mexico
Identities: 0.2747253

Sequence 1: mataramdua
Sequence 2: thailand
Identities: 0.2747253

Sequence 1: surabayadrJ
Sequence 2: jamaica
Identities: 0.2727273

Sequence 1: surabayadrJ
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.2840909

Sequence 1: surabayadrJ
Sequence 2: mexico
Identities: 0.2954545

Sequence 1: surabayadrJ
Sequence 2: thailand
Identities: 0.2727273

Sequence 1: jamaica
Sequence 2: venezuela
Identities: 0.9638554

Sequence 1: jamaica
Sequence 2: mexico
Identities: 0.9277108

Sequence 1: jamaica
Sequence 2: thailand
Identities: 0.9638554

Sequence 1: venezuela
Sequence 2: mexico
Identities: 0.9397590

Sequence 1: venezuela
Sequence 2: thailand
Identities: 0.9759036

Sequence 1: mexico
Sequence 2: thailand
Identities: 0.9397590

The identities is generated by BioEdit 7.0.1.1 Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Lampiran 9. Sequence Homology Data dari sampel DEN-3

Sequence 1: martinique
Sequence 2: jayapura
Identities: 0.8325792

Sequence 1: martinique
Sequence 2: kendari
Identities: 0.9178082

Sequence 1: martinique
Sequence 2: medan
Identities: 0.9013453

Sequence 1: jayapura
Sequence 2: kendari
Identities: 0.8642534

Sequence 1: jayapura
Sequence 2: medan
Identities: 0.8789238

Sequence 1: kendari
Sequence 2: medan
Identities: 0.9241071



Lampiran 11. Sekuensing nukleotida serotipe DEN-2 Gorontalo regio K

DMS19

12/1/05

02-Gorontalo019-05

```

10      20      30      40      50      60
TTCATTTAA TCACACGCCA CCGACACCCA CACATCATCG TCAGTAGACA AGAGAAAGGG

70      80      90      100     110     120
AAAAGCTCTC TGTITAAAC AGAGAAAGGG STAAATATGT GTACCCCTCAT GGCATCGAC

130     140     150     160     170     180
CTTGGGAAAG TGTGTGAAGA CACAATCACG TATAATCTGC CICTTCTCAG CCAGAAAGAA

190     200     210     220     230     240
CCAGAGACA TAGACGCTG CTGCAACTC ACGTCTCAT GTGAAAGCTA TGGACATGCC

250     260     270     280     290     300
ACCGCCACAG CAGAAACAG AAGCGAAAAA AGATCAGTGG CACCCCTTCC AACATGCGGA

310     320     330     340     350     360
ATGGACAGGG AGACACGAAC TGAATGATGG ATCTCATCAG AAGGGGGGCG GAATCATGCC

370     380     390     400     410     420
CAGAGAAATG AAACCTGGGT CTTCAGACAT CCAAGCTTCA CCAATATGGC AGAATCTCG

430     440     450     460     470     480
GGATACACCA TAGGAACAG ATATTTCCAA AATGCTCCGA TTTTCTTTC ACTGACAGCT

490     500     510     520     530     540
GTACCTCCCT CAATCATATG CCTTCTGATA GGAATATCAA ATAGAGACTT TGTGGAGGGC

550     560     570     580     590     600
GTTACAGCAG CAAGCTGGCT TGAATAGTCT TGGAAAGTCT CAAGCTGTCG GAGACATATG

610     620     630     640     650     660
GCGAAAAATA AATCAGACTT GGAATTTGAA ATGATAAABA CAGAAAGCAA ACATCCCTCC

670     680     690     700     710     720
ALTCFAAGCA ATATTTGAT ATAGGCAAG ATGAAAGCA CACCAAGCC ACTCCCTCC

730     740     750     760     770     780
TCACACAGAG AACACCTAG CTTAAATGAA GATGAGGCA AAGCTTCCG CTGCAACAC

790     800     810     820     830     840
TCCATGGTAG AATAGGAGG GGAATATGGA TCCGATATAT TTGCAAGGG AGCGATGCGC

850     860     870     880     890     900
ACCTGTCCAA TCTTCACATG CAATAAGAA ATGAAAGCAA AAGCTCTCCA ACTCGAATAC

910     920     930     940     950     960
TTCAGATACA CCACTTCTAT AATCTCTAG TCAATGAGAG AGAATCTAGT CCGAAATGAC

970     980     990     1000    1010    1020
ACAGAAAAAT AAGGCAAGGA ATTTAAAGTA ACCTCACAGA CTTCCATCAC AGAAGCAGAA

1030    1040    1050    1060    1070    1080
CTAAGAGGCT AAGCCACGCT CACCATGGA TCCCTCTCGA GAAAGGGLCT CCACTTCAA

1090    1100    1110    1120    1130    1140
CAGATAGTGT TCTCTCAAT CCAAGAAAG ATTTCTTCTG TGCAGAGGCA ATGCTTCTTA

1150    1160    1170    1180    1190    1200
CACTTCCCTT TACCATGGCT CCCCAGCA GACACCAAG CATCAATTTG CATAGAGAG

1210    1220    1230    1240    1250    1260
GAAACATTTG TCGCTTCAA AATCTCCCAT GCAAGCAAC AGGATCTCTT TGTCTTGGG

1270    1280    1290    1300    1310    1320
CCCAAGAAAG CCGCTATGCA TACACCATC AAGGAGGCA CCGAAATGCA CATCTCATCA

1330    1340    1350    1360    1370    1380
CGAAACTTAC TGTCTCAGG ACATCTTAA TCCAGGCTCA GAAATGATTA ATATATCTC

```


DNA514

02-G+100ca1013-03

12/1/05

```

AAAGGGAATGT CATATCCCA) GGTACAGGGH HAGTTCAAAG TTTGTAAGGA HAFAGGAGAA
    1450      1460      1470      1480      1490      1500
ACACACAGATG CACCAATAGT TATCAGAGTA CAAATGAAAG GCGACCGCTTC TCCGTCCAG
    1510      1520      1530      1540      1550      1560
ATCCCTATCG AAATATAGGA CTGGGAAAGA AGACATGCTT TACGTCCGCT CATACAGTC
    1580      1590      1600      1610      1620
AACCCAAATGG TCACAGAAA AGACAGCCGA GTCAACATAA AGGAGAAAC TCCATCGGA
    1630      1640      1650      1660      1670      1680
CACACCTACA TCAATATAGG AGTACAGCCG GACATACGTA AGCTCAGCTC CTTTAAQAAA
    1690      1700      1710      1720      1730      1740
CGAAGTTCTA TCGCCAAAT GATGAGACA ACAAATGAAU GAGCGAAGAG AATGGGCAAT
    1750      1760      1770      1780      1790      1800
TTAGGGGATA CAGCTCGGA TATGGATCC CTGGGAGGAG TGTTCACATC TATACGAAG
    1810      1820      1830      1840      1850      1860
GGCCTGCAGC AATTCATTGG AGCTATCTAT GGGGCTGCTT TCAATGAGG TCAATGAGG
    1870      1880      1890      1900      1910      1920
ATCAAAATGC FGATAGCAGT CGTCAACACA TGGATAGGAA TGAATTCAGG CAGGAGCTCA
    1930      1940      1950      1960      1970      1980
CTGCTCTGTA CACTAGTAT AGTACGGGTC GTACATTTGT ATTTGGAGT TATGDTGAG
    1990      2000      2010      2020      2030      2040
GCC. . . . .
    
```



156

Applied Biosystems
8140 S. Dixie Ave. #120
Foster City, CA 94404
Tel: 415.924.4700
Fax: 415.924.4701
www.appliedbiosystems.com

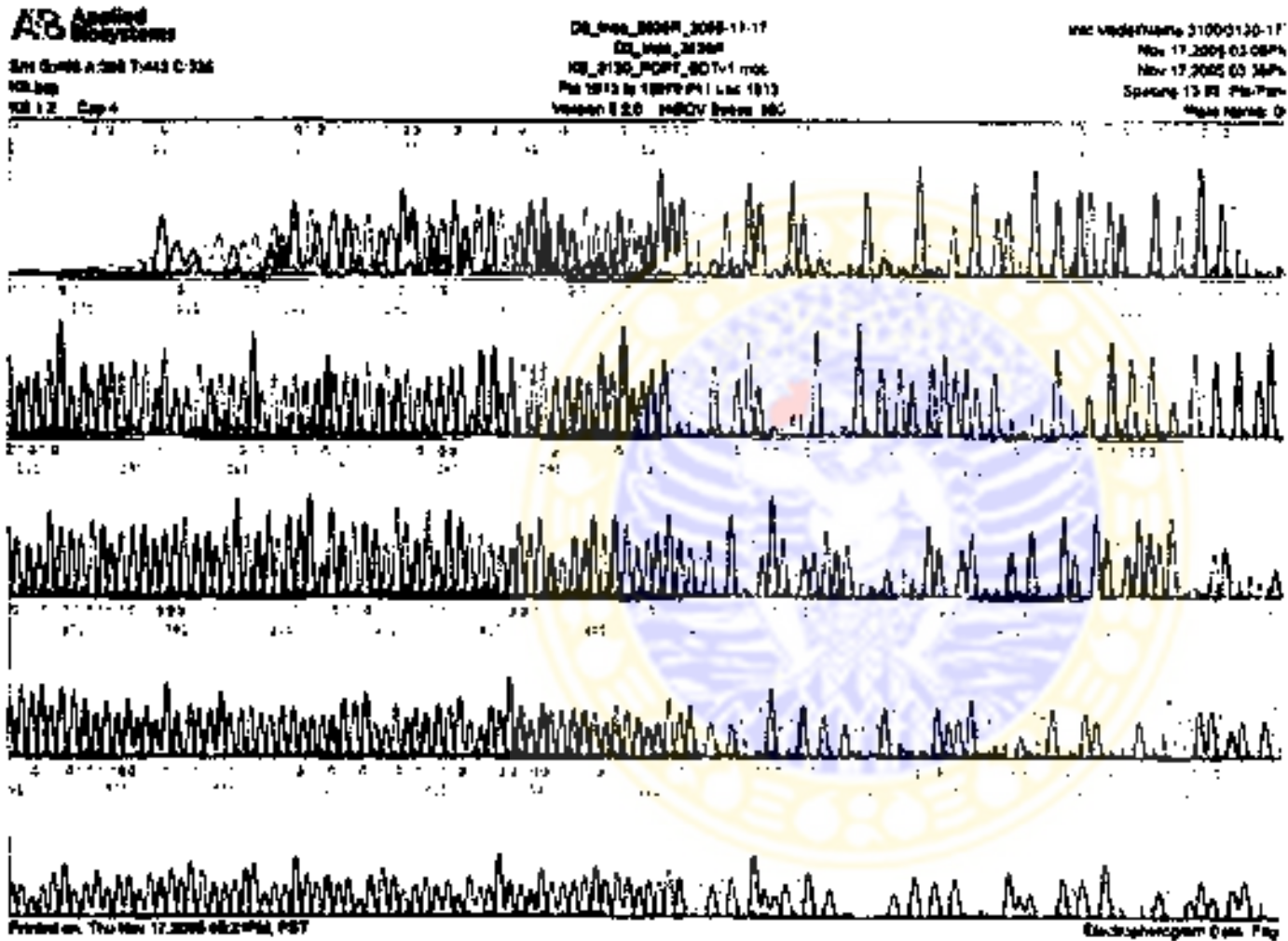
Applied Biosystems
8140 S. Dixie Ave. #120
Foster City, CA 94404
Tel: 415.924.4700
Fax: 415.924.4701
www.appliedbiosystems.com

Applied Biosystems
8140 S. Dixie Ave. #120
Foster City, CA 94404
Tel: 415.924.4700
Fax: 415.924.4701
www.appliedbiosystems.com



Created on Thu Aug 17 2006 06:28:10 PST

Electropherogram Data File



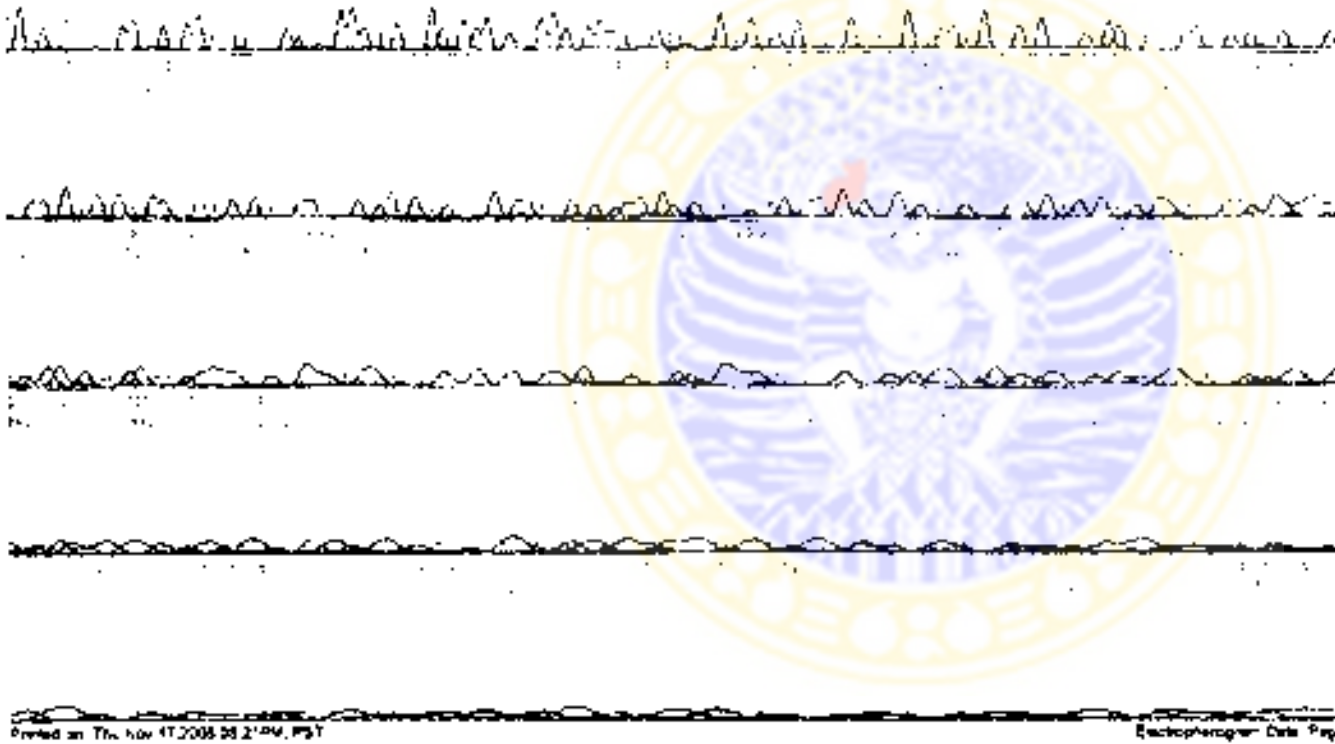
158

AS Applied
Biosystems

SA-D498A-2657-403-0-113
M8 exp
SM 12 Cal 4

CS_Web 26284_2008-11-17
D1_incl_26284
R8_3120_P007_BOT-1.m8b
PUL 1113 12 10NTE Pul Loc 1013
Version 5.20. INFOS: Bases 162

rs: Mode-Normal 3106-3100-11
M4-17 2008 03 07PM
M4-17 2008 03 06PM
Spac Ng 13.68 PulPer
Dgas Name D

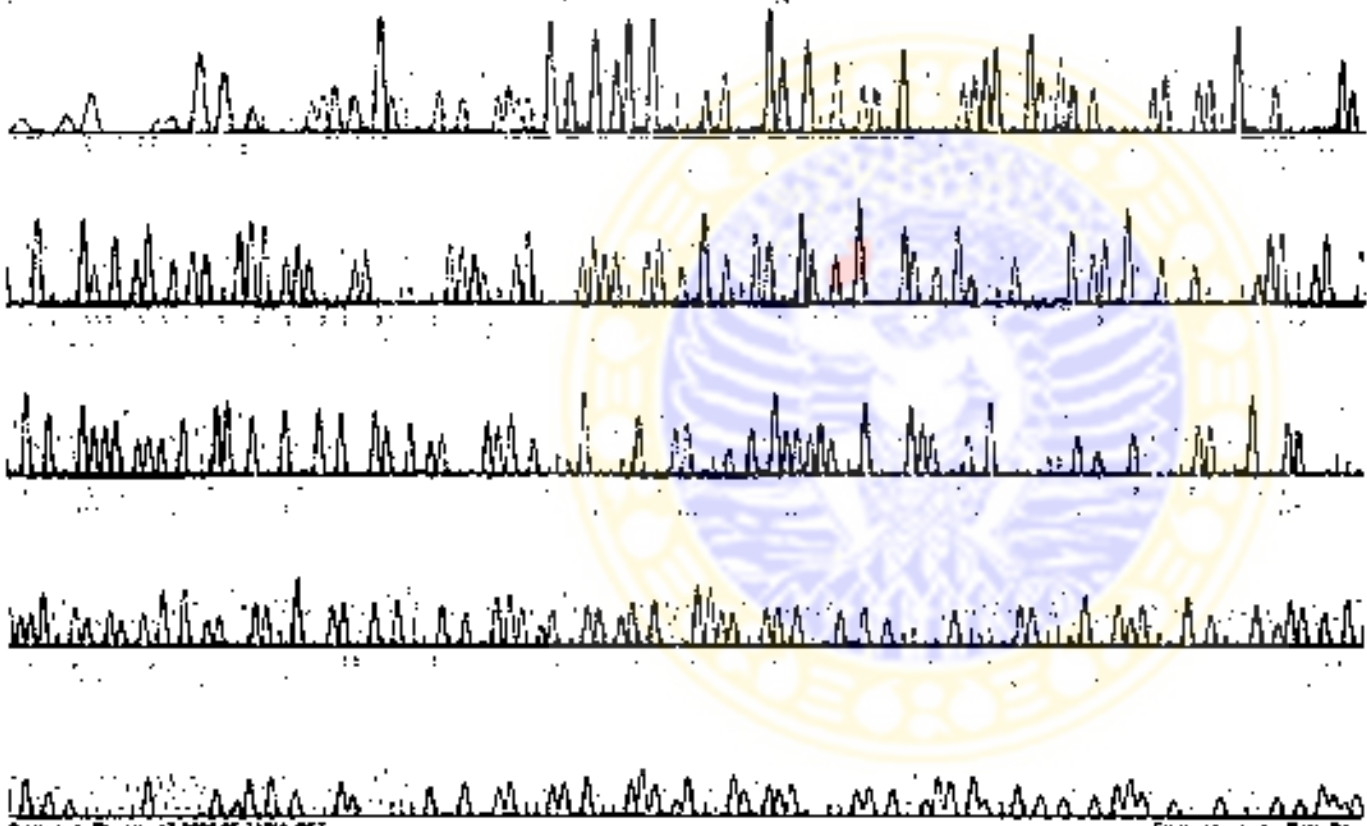


AB Applied Biosystems

S/N Q.350 A 223 T 207 C MP
48 sec
NB 12 Cag 2

D2_in0_440 IM_2005-11-17
D2_in0_1481R
NB_3130_POP3_60T+1.mg0
Pis 1848 to 18806 Pk+1 Loc 1848
Version 3.2.0 M80M Base 048

Mal Medan-Hama 3100-3130-17
Nov 17, 2005 03:03 PM
Nov 17, 2005 03:28 PM
Sequencing 13.87 Pk+1 Per+
Plate Name: D2



Printed on Thu Nov 17, 2005 05:21 PM, PST

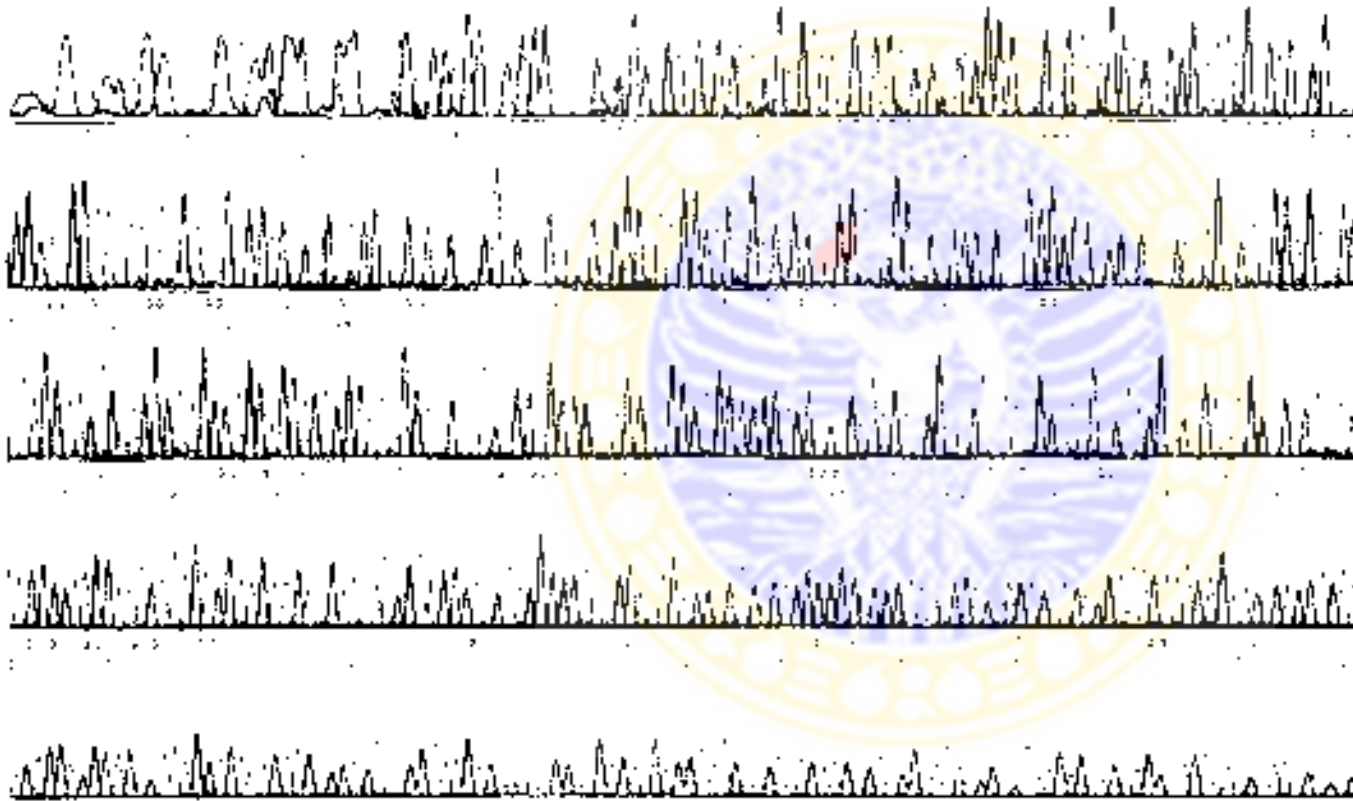
Electropherogram Data Page

AB Applied Biosystems

SN B341 A 2577 264 C 791
48 bp
CP 12 Cal 1

D2_Indo_1911F_2005-11-11
D2_indo_1911F
KB_2132_PCRP_657-1.msp
Pg 1748 of 1587 Pst 1 of 1745
v1.0.0.0 2005-11-11

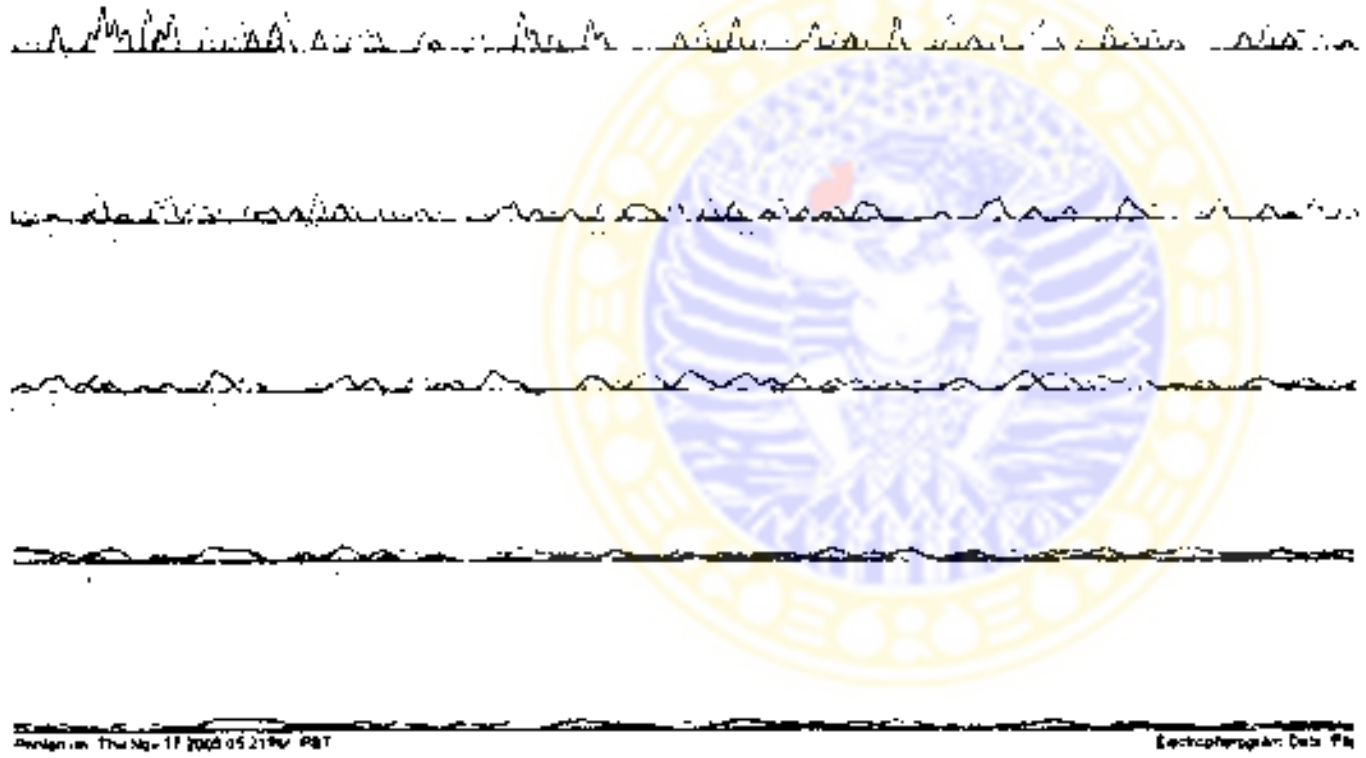
File:ModelName 3100-1-20-173
Nov 17 2005 03:23PM
Nov 17 2005 03:28PM
Splicing 13 15 Pst-Pst
File name: D2



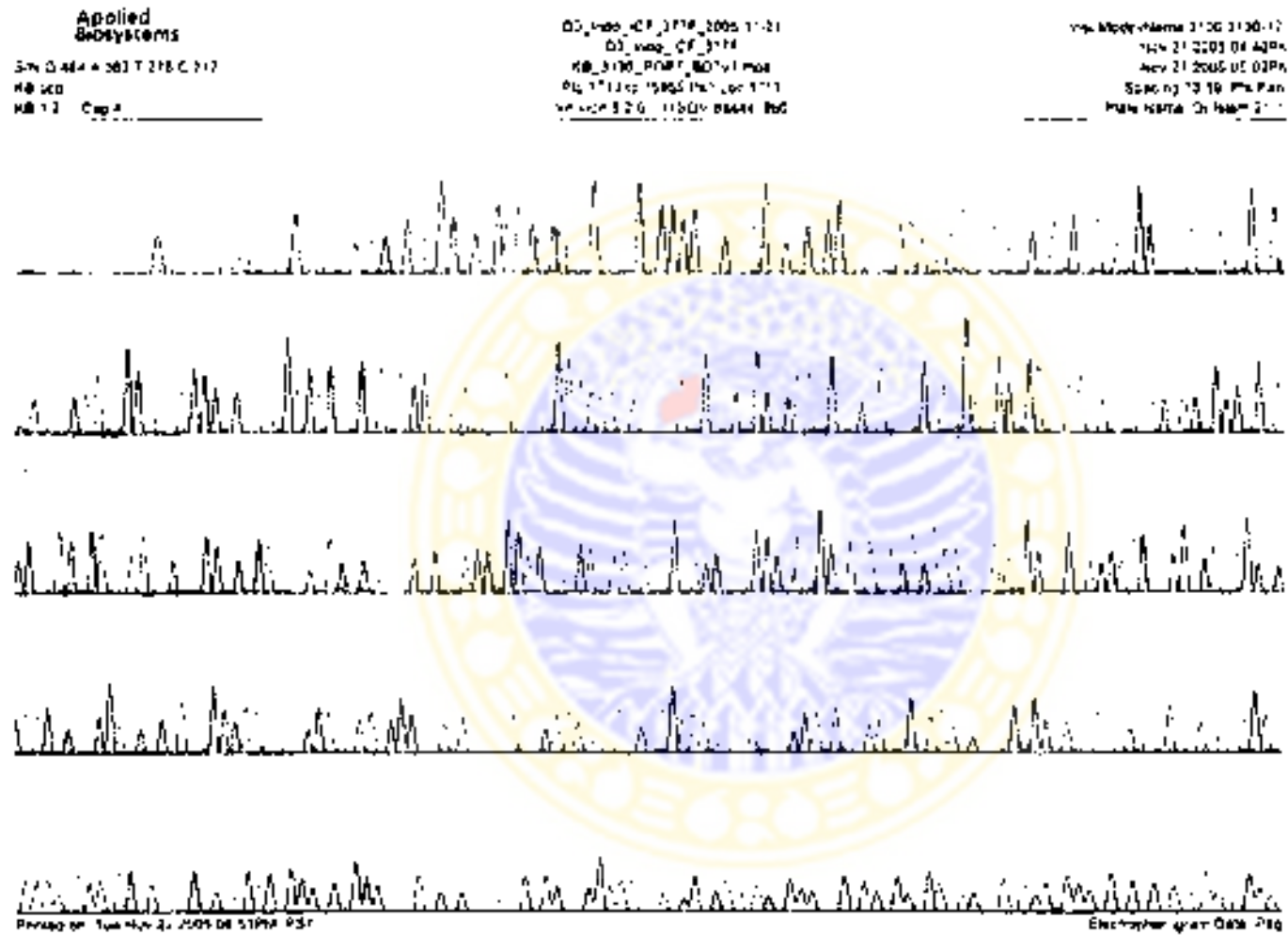
Printed on: Thu Nov 17 2005 03:21PM, PST

Electropherogram Data Page

Applied Biosystems	02_unde_1281P_2005-11-17	ngl klode71leme 2100.3 199-17
Sh D 341 A 357 1 214 C 211	02_unde_1281P	Nov 17 2005 03:58 PM
KB dsp	KB_0130_0507_001v1.msp	Nov 17 2005 03:58 PM
KB 1.3 1740.3	File 1745 15 15811 0x1 1.66 1745	Scaling 15.71 0x1 0x1
	Version 2.0 1740.3 0x1 1745	File Name 0



Lampiran 13. Hasil sekuensing nukleotida DE.N-3 regio envelop menggunakan 2 pasang primer sense dan antisense



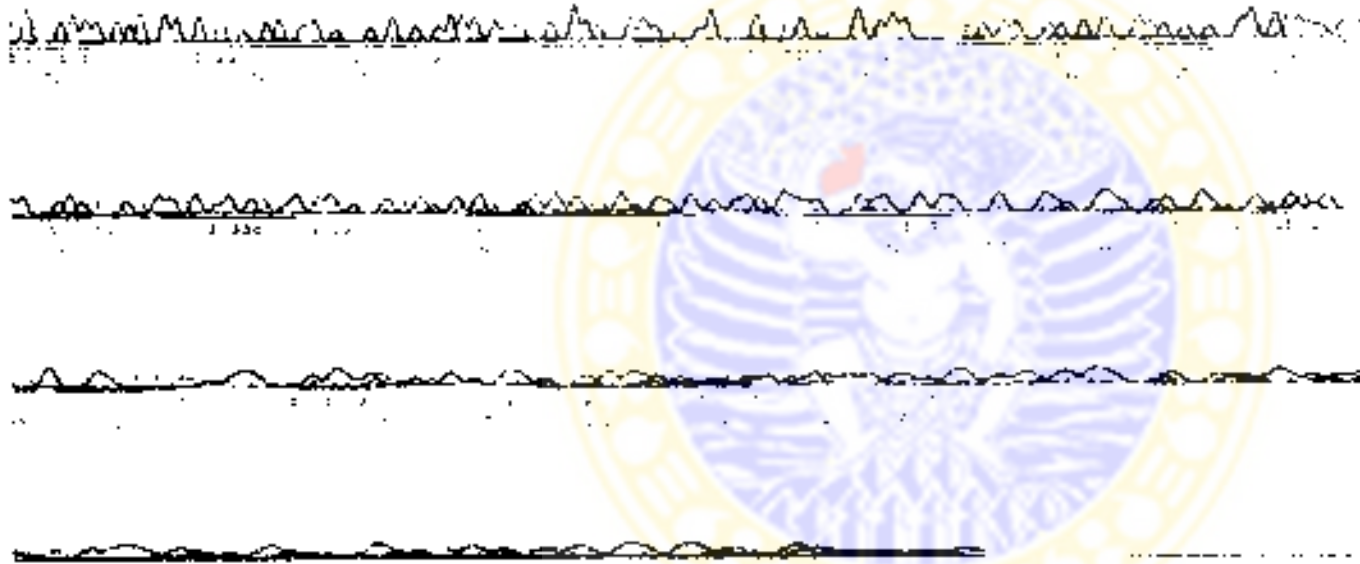
164

Applied Biosystems

SN: 044A 243 T 279 C 242
4860
Ver 1.7 Cap 4

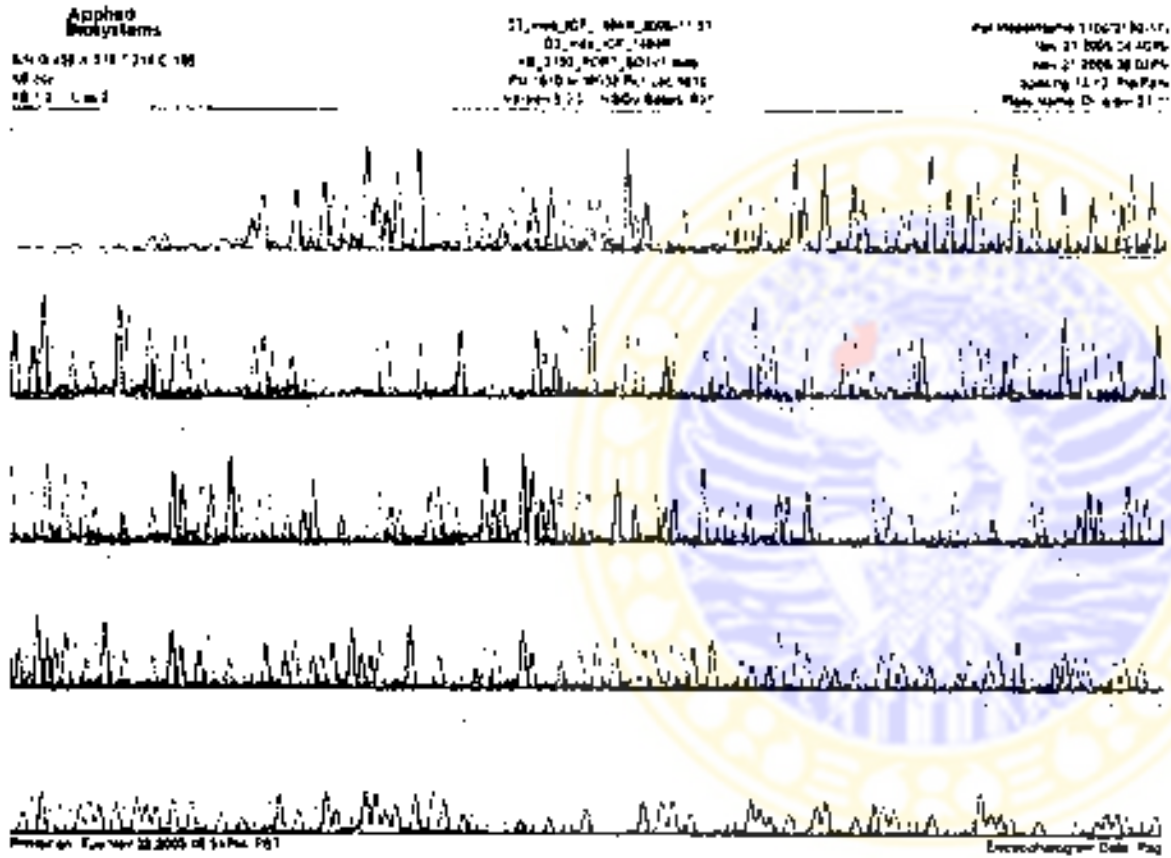
D3_1406_ICF_377F_2005-11-24
D3_1406_ICF_377F
48_3130_P007_001x1.mca
Ply 1713 on 18855 Pk/Loc 1713
Version 5.2.0 MSQR Base 960

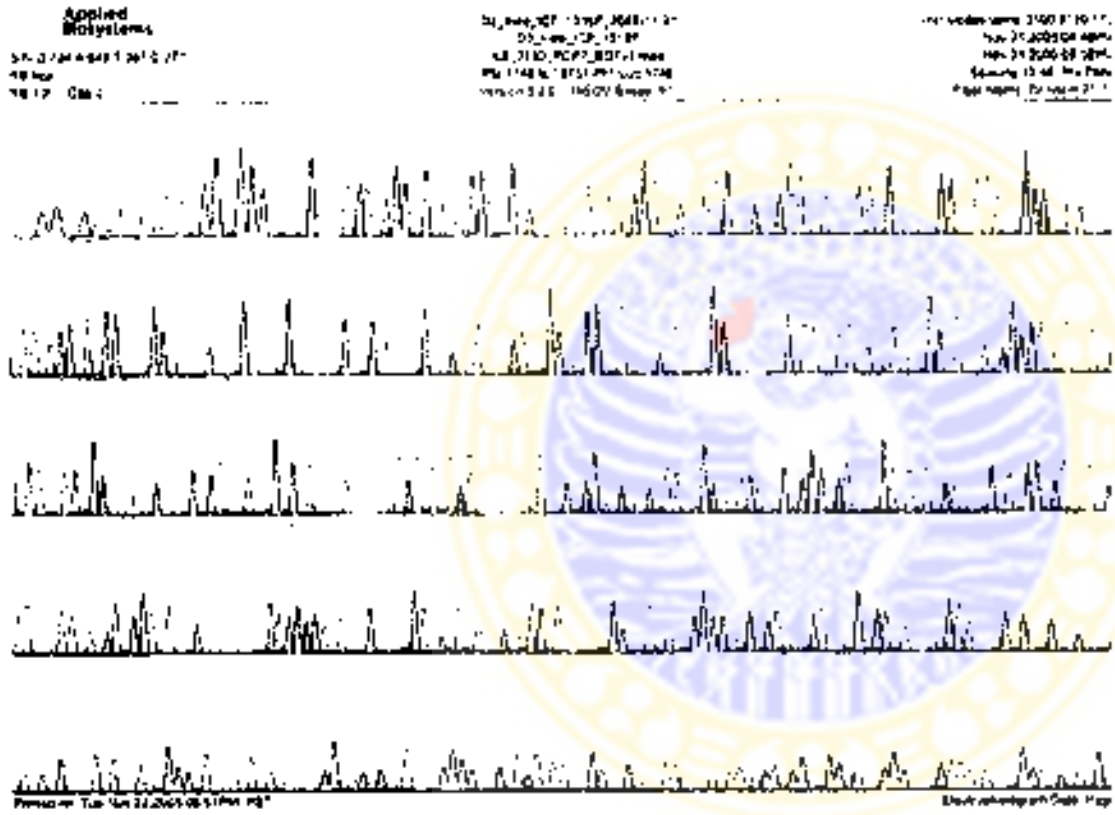
Met ModelName: J106.3130-17
Nov 21 2005 06:48 PM
Nov 21 2005 06:53 PM
Spacing 1.0 30 Pk/Chan
Peak Name: Ch 1406 31.1

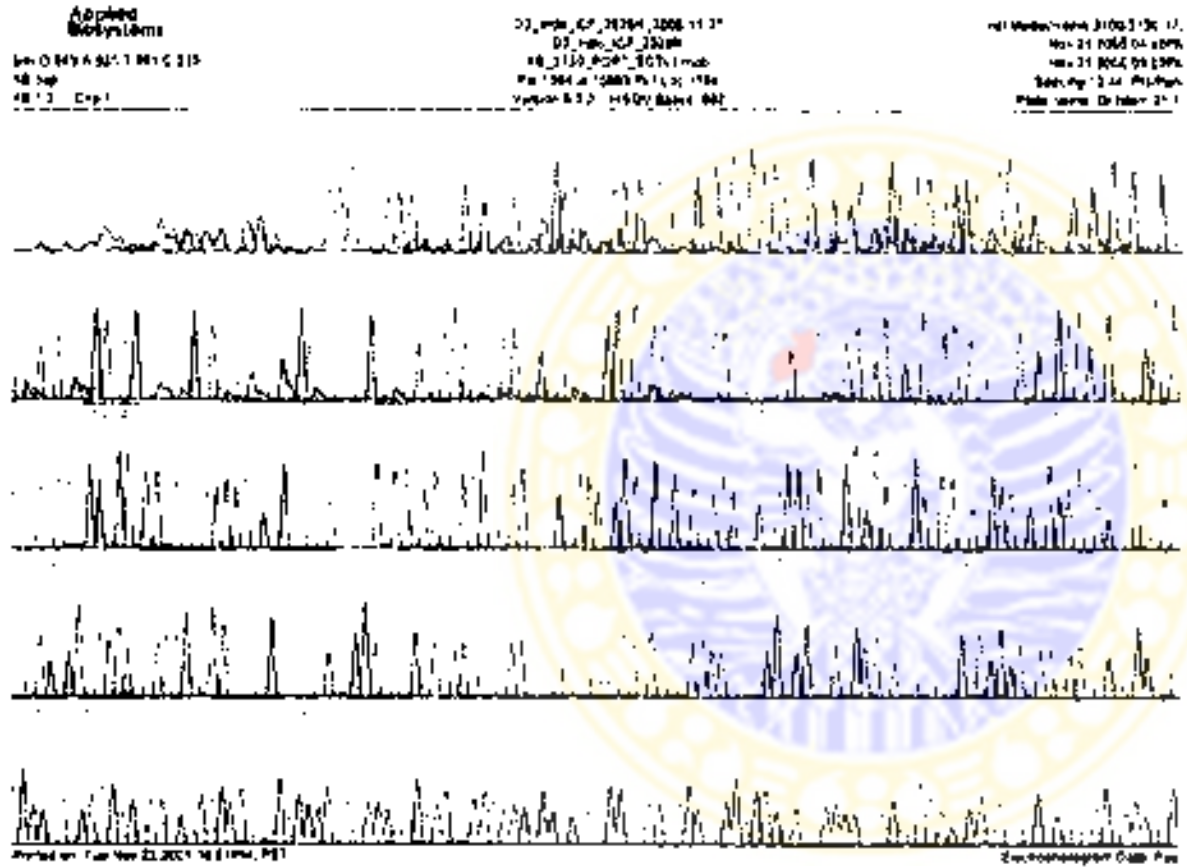


Printed on: Tue Mar 22 2005 06:51 PM PST

Electrocephalogram Data Page







170

<p>App-ed BioSystems</p> <p>EM-C 100 kVolo 1.001 C 100 48 cap 18.7.2007</p>	<p>001_rms JC_28284_2008-11-11 001_vox_RF_3488R 48_1150_P001_001_1.mrb File 150- by 150x12 Pix Log 1254 Largura 528 H-000000000</p>	<p>msi Macintosh 5120.3170-17 Ver 21 2005-04-06M Ver 21 2006-09-07PM Spooling 12 av 000.000 Pasta 10000 10 10000 21 7</p>
---	---	---



Lampiran 14. Hasil *Multiple PCR* menggunakan primer regio envelop



84-85,8bp; D2:98,8bp; 133-200 bp; 194-199 bp

