



**DETEKSI INFEKSI *ARBOVIRAL* PADA SAMPEL AKUT DAN
CONVALESCENCE RSUDWANGAYA, DENPASAR BALI**

SKRIPSI

**Disusun untuk melengkapi syarat
guna memperoleh gelar Sarjana Sains**

ARANIY FADHILAH

3425122227

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
JAKARTA**

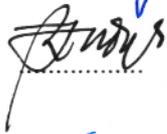
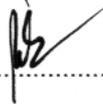
2016

PERSETUJUAN PANITIA UJIAN SKRIPSI

**DETEKSI INFEKSI ARBOVIRAL PADA SAMPEL AKUT DAN
CONVALESCENCES RSUD WANGAYA, DENPASAR, BALI.**

Nama : Araniy Fadhilah

No. Reg : 3425122227

Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab Dekan : <u>Prof. Dr. Suyono, M.Si</u> NIP. 19671218 199303 1005		8/8/2016
Wakil Penanggung Jawab Pembantu Dekan I : <u>Dr. Muktiningsih Nurjayadi</u> NIP. 19640511 198903 2 001		3/8/2016
Ketua : <u>Dr. Reni Indrayanti, M.Si</u> NIP. 19621023 199803 2 002		8/8/2016
Sekretaris / Penguji I : <u>Dr. Rusdi M. Biomed</u> NIP. 19650917 199203 1 001		4/8/2016
Anggota Pembimbing I : <u>Dr. Rini Puspitaningrum, M. Biomed</u> NIP. 19681004 200112 2 001		1/8/2016
Pembimbing II : <u>Dr. Ir. I Made Artika, M. App. Sc.</u> NIP. 19630117 198903 1 001		1/8/2016
Penguji II : <u>drh. Atin Supiyani, M. Si.</u> NIP. 19780914 200604 2 001		4/8/2016

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 29 Juli 2016

LEMBAR PERSETUJUAN PERBAIKAN SKRIPSI

**DETEKSI INFEKSI ARBOVIRAL PADA SAMPEL AKUT DAN
CONVALESCENCE RSUD WANGAYA, DENPASAR, BALI**

Nama : Araniy Fadhilah

No. Reg : 3425122227

	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Ketua*	: <u>Dr. Reni Indrayanti, M.Si</u> NIP. 19621023 199803 2 002		3/8/2016
Sekretaris / Penguji I	: <u>Dr. Rusdi M. Biomed</u> NIP. 19650917 199203 1 001		4/8/2016
Anggota			
Pembimbing I	: <u>Dr. Rini Puspitaningrum, M. Biomed</u> NIP. 19681004 200112 2 001		1/8/2016
Pembimbing II	: <u>Dr. Ir. I Made Artika, M. App. Sc.</u> NIP. 19630117 198903 1 001		1/8/2016
Penguji II	: <u>drh. Atin Supiyani, M. Si.</u> NIP. 19780914 200604 2 001		4/8 2016

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 29 Juli 2016

*Ketua disesuaikan yaitu: Kaprodi Pend Biologi atau Dosen Senior

ABSTRAK

ARANIY FADHILAH. Deteksi Infeksi Arboviral pada Sampel Akut dan Convalescences RSUD. Wangaya, Denpasar, Bali.

Studi ini bertujuan mengidentifikasi introduksi *Arbovirus* jenis baru yang mungkin menginfeksi sampel terduga infeksi *arboviral* dari RSUD Wangaya, Denpasar, Bali sebagai usaha membuat data *surveillance*. Infeksi *arbovirus* (*arthropod-borne virus*) akibat DENV, CHIKV, dan JEV, merupakan infeksi viral patogenik dengan gejala klinis serius yang sangat mudah menyebar. Denpasar, Bali adalah tempat yang diestimasi paling heterogen dan menjadi tolak ukur apabila terdapat introduksi viral baru (*emerging virus*) di Indonesia. Serum darah akut (0-7 hari *onset*) dan *convalescence* (>10 hari *onset*) dikoleksi dan diuji dengan metode RT-PCR dan MAC ELISA. Hasil menunjukkan tidak terdapat introduksi arboviral baru pada koleksi sampel. Sebanyak 23.07% kasus terinfeksi oleh *Flavivirus* endemik Indonesia dan 76.93 % kasus sisanya yang tidak terinfeksi *Arbovirus* dan merupakan indikasi terdapat infeksi lain selain *Arbovirus* pada spesimen tersebut. Metode RT-PCR dan MAC ELISA sebagai metode deteksi materi genetik virus dan presensi antibodi spesifik virus dapat digunakan dan berperan besar dalam membantu penegakkan keakuratan diagnosis. Data *surveillance* penderita infeksi arboviral di Bali secara berkala dibutuhkan sebagai indikator distribusi patogenik *Arbovirus* ke dalam dan luar Indonesia dan dalam membuat dasar peraturan pemberantasan penyakit.

Kata kunci : *Emerging Virus*, Infeksi arboviral, Dengue, Japanese Encephalitis, MAC ELISA, RT-PCR, RSUD.Wangaya Denpasar

ABSTRACT

ARANIY FADHILAH. Arboviral Detection on Acute and Convalescences Sample from RSUD. Wangaya, Denpasar, Bali.

This study aims to identify new types of *Arbovirus* which might be infected samples of suspect arboviral infections from RSUD Wangaya, Denpasar, Bali and as an effort to make the data *surveillance*. Arboviral infections (arthropod-borne virus) as a result of DENV, CHIKV, and JEV, are a pathogenic viral infection with serious clinical symptoms and are very easily spread. Denpasar, Bali is the place that estimated as the most heterogeneous and become a benchmark if there is a viral introduction (emerging viruses) in Indonesia. Acute blood sera (0-7 days of onset) and convalescence sera (> 10 days of onset) were collected and tested by the method of RT-PCR and ELISA MAC. The results showed that there was no new arboviral introduction to samples collection. A total 23.07% of cases were infected by *Flavivirus* endemic to Indonesia and 76.93% of the remaining cases were not infected by *Arbovirus* with an indication other pathogenic agents present in the specimen. RT-PCR method and MAC ELISA should be highly considered due to their main role in helping accuracy of diagnosis. Data *surveillance* of arboviral infections in Bali suggested to be made regularly as an indicator of the distribution of pathogenic *Arbovirus* inside and outside Indonesia and as a references in making disease control regulations.

Keywords : *Emerging Virus*, arboviral infection, Dengue, Japanese Encephalitis, MAC ELISA, RT-PCR, RSUD.Wangaya Denpasar

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Ta'ala, karena atas rahmat dan kasih sayang-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.

Penulis menyadari bahwa terwujudnya skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

Kedua orang tua, Ayah Faisal dan Bunda Dina, Abang Fakhriy Muhammad, Jidah Lulu, dan Mbak Ira, yang senantiasa memberikan doa dan semangat, serta memberi dukungan baik moril maupun materil kepada penulis.

Ibu Dr. Rini Puspitaningrum, M. Biomed dan Bapak Dr.Ir.I Made Artika, M.App.Sc. selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan, motivasi, masukan serta kesabaran untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Bapak Dr. Rusdi, M.Biomed dan Ibu drh. Atin Supiyani, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberi kritik, masukan, dan saran kepada penulis dalam penulisan skripsi ini.

Ibu Dr.Dalia Sukmawati, M.Si selaku dosen Pembimbing Akademik (PA) dan Ibu Dr. Reni Indrayanti, M.Sc selaku Ketua Program Studi Biologi FMIPA UNJ yang telah membantu menyemangati dan mendukung secara moral selama penulisan skripsi ini.

Khin Saw Myint, MD.,PhD., Aditya Perkasa, S.Si., Ageng Wiyatno, S.Si., Chairin Nisa Ma'roef, M.Sc., Frilasita A. Yudhaputri, M.Sc., dan Aghnianditya Kresno Dewantari, sebagai rekan kerja di Emerging Virus Research Unit- Eijkman Institute yang telah membantu selama penulis bekerja di laboratorium selama penelitian tugas akhir ini.

Teman-temanku, Artur Sokolovsky, M.Sc., Ahmed Yasin Güney, B.Sc., Wisnu Shambara, S.Si., Sunni Medina, Samantha Walls, Monika Sihombing, Bangkit Mandela, Annida Citra, Dwi Oktaviani, S.Si., Lita Citra Dewi, Taris Shabrina, Rahma Amalia, Tiara Arisenda, Afifah Izzati, Annisa Firdausi, Riza, Himatul, Nurul Family, Pratiwi, Rurin Chaerunnissa, Novita Tania, Albertus Wisnu, Detya Indrawan, Johan Susanto Jaya, dan Dyah Ayu Pangestika. Terimakasih atas pertemanan kita dan atas semangat serta dukungan moral kepada penulis selama masa perkuliahan dan dalam melaksanakan tugas akhir.

Sahabat seperjuangan di Jurusan Biologi FMIPA UNJ, khususnya kelas Biologi Reguler 2012 dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu dalam penyelesaian tugas akhir ini.

Kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak sangat penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pembaca dan dapat digunakan sebaik-baiknya.

Jakarta, Juli 2016

Araniy Fadhilah

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA BERPIKIR DAN HIPOTESIS	
PENELITIAN	5
A. Kajian Pustaka	5
1. Arbovirus dan Emerging Virus	5
2. Infeksi Arboviral di Indonesia	14
3. Infeksi Arboviral di Bali	15
4. <i>Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	17
5. <i>IgM Antibody Captured- Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (MAC-ELISA).....	19
B. Kerangka Berpikir.....	21
C. Hipotesis Penelitian.....	23
BAB III METODE PENELITIAN	24
A. Tujuan Operasional.....	24
B. Tempat dan Waktu Penelitian	24
C. Metode Penelitian.	24

D. Prosedur Penelitian	24
1. Alat dan Bahan	24
a. Alat	24
b. Bahan	25
2. Cara Kerja	27
a. Identifikasi molekuler	
1) Ekstraksi RNA Viral	27
2) Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) dan Elektroforesis gel agarosa	28
b. Identifikasi serologikal	
1) Japanese Encephalitis (JE) IgM Antibody Captured- Enzyme Linked Immunosorbent Assay	30
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	34
A. Kelompok 1	37
B. Kelompok 2	44
C. Kelompok 3	52
D. Kelompok 4	57
 BAB V PENUTUP	64
A. Kesimpulan	64
B. Implikasi	65
C. Saran	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN	74
SURAT KEASLIAN SKRIPSI	
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	

DAFTAR GAMBAR

No.	Halaman
1. Siklus transmisi virus Chikungunya	7
2. Pathogenesis virus Chikungunya	10
3. Siklus Transmisi Japanese Encephalitis.....	12
4. Protokol RT-PCR <i>Alphavirus</i> dan <i>Flavivirus</i>	30
5. Alur Prosedur MAC-ELISA	33
6. Hasil uji molekuler RT-PCR <i>Alphavirus</i> dan <i>Flavivirus</i> kelompok 1	39
7. Hasil uji molekuler RT-PCR <i>Alphavirus</i> dan <i>Flavivirus</i> kelompok 3....	52

DAFTAR TABEL

No.	Halaman
1. Hasil positif uji serologi JE MAC-ELISA pada sampel kelompok 1	40
2. Hasil positif uji serologi JE MAC-ELISA kelompok 2	46
2.A. Hasil uji <i>Seraconversion</i> dengan MAC ELISA	49
3. Hasil negatif uji serologi pada sampel kelompok 3.....	53

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Halaman
1.	75
2.	82
3.	86
4.	89

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Badan Penelitian dan Pengembangan Dinas Kesehatan Republik Indonesia (2013) menyebutkan bahwa di Indonesia penyakit digolongkan menjadi penyakit menular dan penyakit tidak menular. Salah satu penyakit menular non-*neglected* (tidak terabaikan) atau disingkat PMNN merupakan penyakit dan infeksi yang disebabkan oleh virus. Infeksi viral membutuhkan konsentrasi dan perhatian khusus karena virus memiliki keragaman yang luas dan menginfeksi semua jenis kehidupan seluler. Penyakit infeksi viral menular tetap menjadi penyebab utama kematian karena dua alasan :

- a. Munculnya penyakit infeksi viral baru (*emerging virus*), dan
- b. Munculnya kembali penyakit infeksi viral menular lama (*re-emerging virus*).

Infeksi viral yang menjadi perhatian di Indonesia antara lain adalah *Dengue*, *Malaria*, *Chikungunya*, HIV/AIDS, *Pneumonia* dan *Hepatitis*. *Dengue* dan *Chikungunya* merupakan infeksi viral endemik dan ditransmisikan oleh serangga, salah satunya adalah nyamuk dari genus *Aedes* serta termasuk kedalam golongan penyakit infeksi *arboviral*(*arthropod-borne virus*). Penyakit yang ditransarmisikan oleh nyamuk, kutu, dan serangga ini menyebabkan *febrile illness*, gejala klinis

serius, menular, tidak mudah disembuhkan, dan penyebarannya sulit dikendalikan. Nyamuk sebagai vektor utama membutuhkan air yang menggenang dan iklim tropis seperti Indonesia untuk berkembang biak. Salah satu tempat distribusi *Arbovirus* yang meluas dan beragam adalah di Provinsi Bali, khususnya kota Denpasar.

Denpasar merupakan kota yang diestimasi sebagai tempat paling heterogen berdasarkan keragaman penduduknya yang terdiri dari penduduk lokal dan pendatang. Dari segi epidemiologi, pendatang yang berkunjung ke Bali berperan sebagai *host/* distributor patogen termasuk arbovirus dari dalam dan keluar Bali. Kondisi kota Denpasar yang heterogen dan lingkungannya yang mendukung perkembangbiakan *Arbovirus* membuat kota ini diprediksi sebagai satu tolak ukur apabila terdapat introduksi *Arbovirus* baru di Indonesia. Kendati demikian, data *surveillance* infeksi arboviral di Denpasar tidak pernah dilaporkan.

Studi ini dilakukan sebagai usaha membuat data *surveillance* dalam mempelajari epidemiologi arboviral dan dalam mengamati kemungkinan ada atau tidaknya introduksi *arboviral* yang baru di Indonesia. Penelitian ini merupakan salah satu riset kolaboratif antara *Emerging Virus Research Unit* (EVRU)- Lembaga Eijkman dengan Universitas Warmadewa yang memiliki RSUD Wangaya sebagai Rumah Sakit yang menunjang studi dan penelitiannya. Studi mengenai *Arbovirus* ini sangat penting secara klinis karena terdapat lebih dari 2.5 miliar manusia hidup di daerah endemik *Arbovirus*. Data *surveillance* secara

kontinyu sangat diperlukan sebagai acuan dalam memantau penyebaran dan kerentanan masyarakat terhadap infeksi arboviral, serta menjadi dasar penetapan kebijakan terkait pemberantasannya.

Fokus penelitian terletak pada spesies *Arbovirus* yang satu genus dengan Dengue yakni *Flavivirus*, dan *Arbovirus* yang satu genus dengan chikungunya yakni *Alphavirus*. Hal ini berdasarkan fakta bahwa *Flavivirus* dan *Alphavirus* merupakan arboviral yang endemik di pulau Bali khususnya Denpasar. Sampel serum darah akut dan *convalescence* terduga infeksi arboviral dikoleksi oleh tenaga ahli di RSUD Wangaya, Denpasar, Bali. Sampel serum darah kemudian diuji secara molekuler dengan *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dan secara serologi dengan metode Japanese Encephalitis *IgM Antibody Captured- Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (MAC ELISA).

Metode RT-PCR digunakan untuk mendeteksi ekspresi materi genetik viral selama fase akut viremia yang terdapat dalam sampel dengan cara mentranskripsi balik RNA viral didalam spesimen dengan memanfaatkan enzim *reverse transcriptase*. Presensi antibodi Immunoglobulin M (IgM) yang merupakan *biomarker* (penanda) spesifik adanya introduksi agen patogenik baru didalam tubuh individu diuji dengan menggunakan metode MAC ELISA. Kedua metode ini digunakan untuk memverifikasi apabila terdapat suatu introduksi *arboviral* baru pada koleksi sampel.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat introduksi infeksi *arboviral* baru pada sampel RSUD Wangaya, Denpasar, Bali
2. Apa saja jenis *arboviral* yang menginfeksi dan terdapat pada sampel akut RSUD Wangaya, Denpasar, Bali
3. Berapa banyak jumlah infeksi *arboviral* pada sampel RSUD Wangaya, Denpasar Bali.

C. Tujuan

1. Untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya introduksi *arboviral* baru pada koleksi sampel RSUD Wangaya, Denpasar, Bali.

D. Manfaat

1. Memberikan informasi dan data terbaru mengenai infeksi *arboviral* endemik Denpasar maupun apabila ada introduksi *arboviral* baru
2. Data yang ada juga diharapkan bermanfaat dalam memajukan studi epidemiologi penyakit di Denpasar, Bali, dan menjadi acuan penting dalam penetapan kebijakan pemberantasan penyakit-penyakit nasional.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA BERFIKIR DAN HIPOTESIS

A. Kajian Pustaka

1. *Arbovirus* dan *Emerging Virus*

Epidemiologi dan pathogenesis viral memerlukan perhatian dan studi khusus. Berdasarkan Carter (2007), virus memiliki keragaman yang luas dan menginfeksi semua jenis kehidupan seluler baik prokaryot maupun eukaryot. Dinas Kesehatan Republik Indonesia (2013) menyatakan bahwa infeksi viral yang menjadi perhatian dan termasuk kedalam katagori PMNN (*Penyakit Menular Non-Neglegted*) antara lain adalah Dengue, Malaria, Chikungunya, HIV/AIDS, Pneumonia dan Hepatitis. Dengue dan Chikungunya ditransmisikan oleh serangga salah satunya adalah nyamuk dari genus *Aedes* dan termasuk kedalam golongan penyakit infeksi *arboviral*.

Moreli dan Costa (2013), dan Dash, *et al.* (2013) menyatakan bahwa *Arbovirus* atau *Arthropod-borne virus* adalah sebuah grup besar virus yang terdiri dari virus-virus yang menginfeksi arthropoda dan bersifat *hematophagus*. *Arbovirus* juga memiliki siklus hidup yang kompleks dimana *arbovirus* membutuhkan inang seperti burung dan mammalia serta vektor seperti nyamuk atau serangga lainnya. Pada umumnya, transmisi diawali dengan replikasi virus dalam tubuh nyamuk. Nyamuk kemudian akan menginfeksi inangnya dan bersirkulasi di dalam inang lain.

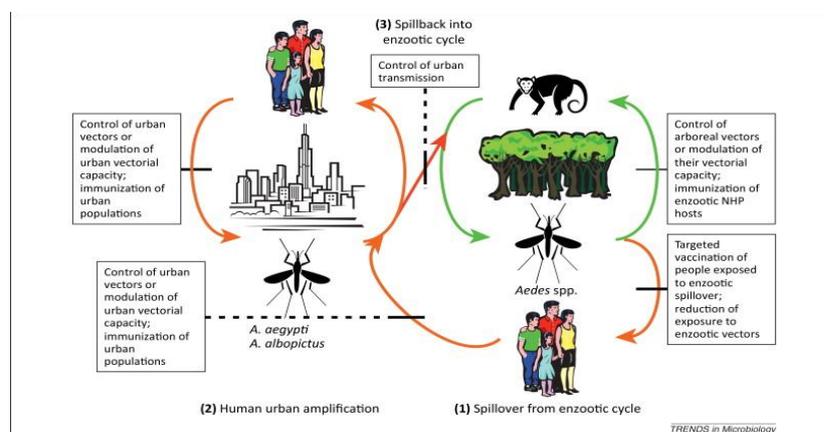
Sirkulasi ini disebut sebagai *spillover* dan menginfeksi manusia atau hewan domestik yang merupakan inang insidental atau inang akhir. Weaver dan Reisen (2012) menambahkan bahwa *Arbovirus* terdiri dari beragam virus RNA. Terdapat beberapa famili *Arbovirus* seperti Togaviridae (genus *Alphavirus*), Flaviviridae (genus *Flavivirus*), Bunyaviridae (genus *Bunyavirus*, *Nairovirus*, dan *Phlebovirus*), Reoviridae (genus *Orbivirus*), Rhabdoviridae (genus *Vesiculovirus*) dan Orthomyxoviridae (genus *Thogotovirus*). Setiap virus tersebut memiliki tipe genome RNA dan mekanisme replikasi yang berbeda-beda. *African swine fever virus* merupakan satu-satunya *Arbovirus* dengan materi genetik berupa DNA.

Dash, *et al.* (2013) menyatakan bahwa negara-negara di Asia Tenggara lebih rentan terhadap penyakit *Arbovirus* karena jumlah penduduk yang berlebih dan ekonomi yang terbelakang. *Family* Togaviridae, Flaviviridae, dan Bunyaviridae adalah tiga *family Arbovirus* yang menjadi perhatian utama di Asia tenggara dan memiliki korban terbanyak. Sekitar 17 juta penduduk dunia meninggal setiap tahun akibat infeksi *Arbovirus*.

Menurut Jose, *et al.* (2009), *Family* Togaviridae, terdiri atas dua genera yaitu *Alphavirus* dan *Rubivirus*. *Rubivirus* terdiri atas satu anggota yaitu virus *Rubella*. Sementara itu *Alphavirus* merupakan kelompok virus *enveloped, spherical*, memiliki rantai ssRNA positif, dan bertanggung jawab pada mayoritas penyakit infeksi viral pada manusia dan hewan.

Anggota kelompok *Alphavirus* meliputi virus *Chikungunya*, virus *Sindbis*, virus *Semliki Forest*, virus *Venezuelan Equine Encephalitis*(VEE) dan virus *Ross River*. *Alphavirus* dapat menyebabkan penyakit *arthritis* atau radang sendi dan *encephalitis* pada manusia serta secara kontinyu patogenesisnya mengancam kesehatan masyarakat global bila terus terdistribusi.

Menurut Weaver (2015), *Arbovirus* dari genus *Alphavirus* seperti Chikungunya bersirkulasi dalam siklus enzootik yang ditemukan pada hewan (Gambar 1). Siklus enzootik ini terjadi antara nyamuk dan *non-human primates*. Nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* merupakan vektor utama, sementara *non-human primates* merupakan *reservoir* dan *amplifier* untuk perkembangbiakan virus ini.



Gambar 1. Siklus transmisi virus Chikungunya (Sumber : Weaver, Scott. C. 2015 [http://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(13\)00054-1](http://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(13)00054-1), diterjemahkan sesuai aslinya)

Transmisi melalui siklus enzootik dapat berpindah (*spillover*) ke manusia yang tinggal atau bekerja di dekat dengan siklus tersebut. Epidemik dapat terjadi apabila nyamuk yang terinfeksi pergi ke

pusat perkotaan satu sampai empat hari semana masa inkubasi *asimptomatik*.

Schwartz dan Albert (2010) melanjutkan bahwa transmisi virus chikungunya dimulai dari gigitan nyamuk. Viral pathogenesis chikungunya (Gambar 2) dimulai ketika seseorang mengalami fase akut penyakit 2 s.d. 4 hari pasca paparan. Gejala dikarakterisasi oleh adanya demam tinggi (*febrille illness*), ruam makular dan arthralgia. Arthralgia kronis menyebabkan morbiditas jangka panjang pada penderita infeksi virus chikungunya. Arthralgia dapat terjadi karena virus Chikungunya sulit dihilangkan oleh makrofag di sendi sehingga merangsang inflamasi berkelanjutan. Arthralgia kronis pada pasien chikungunya dapat berlangsung sampai dengan 3 tahun. Rougeron, *et al.* (2014) menambahkan bahwa terdapat beberapa laporan mengenai gejala tambahan lain pada infeksi chikungunya seperti *myokarditis*, gelembung berisi air pada kulit (*extensive bullous skin lesion*), dan encephalopathy pada neonatal terjadi belakangan ini.

Menurut Schwartz & Albert (2010), onset atau paparan penyakit sampai timbulnya gejala pada infeksi chikungunya berkaitan dengan naiknya titer viral antigen. Naiknya titer viral antigen memicu adanya respon dari sistem imun pada individu yang prinsipnya adalah melindungi tubuh dari invasi patogen yang masuk. Playfair dan Chain (2013) menambahkan bahwa immunitas terhadap infeksi dapat berupa respon imun *innate* (alami) dan respon imun adaptif (diperoleh). Respon imun

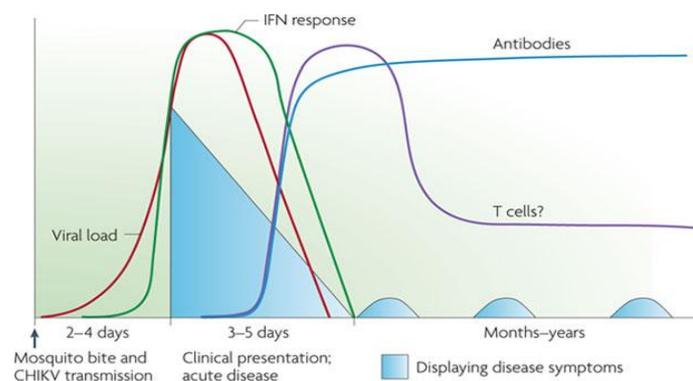
innate muncul terlebih dahulu dan merupakan pertahanan tubuh utama terhadap substansi asing. Komponen sistem imun *innate* meliputi penghambat fisik dan biokimia seperti sel epitel dan produknya, sel-sel fagosit, dendritik, dan sel *natural killer* (NK), serta substansi-substansi lain seperti interferon, protein darah, dan sel limfoid lainnya.

Menurut Abbas (2015), respon imun adaptif memerlukan stimulasi dari kehadiran patogen yang meningkatkan kemampuan pertahanan terhadap mikroba yang spesifik. Respon imun adaptif berbeda dengan *innate* dalam hal membedakan substansi (spesifitas) dan kemampuan untuk merespon. Respon imun adaptif menanggapi substansi asing lebih efektif meskipun terdapat pajanan terhadap substansi yang sama berulang kali (memori). Komponen dalam respon imun adaptif yang memungkinkan kemampuan tersebut antara lain limfosit dan produk sekresinya yaitu antibodi. Substansi asing, dalam hal ini adalah arboviral yang dapat memulai respon imun spesifik atau dikenali oleh antibodi dan disebut sebagai antigen.

Menurut Abbas (2015), respon imun *innate* dan adaptif terhadap virus bertujuan untuk menghentikan infeksi dan mengeliminasi sel yang terinfeksi. Respon imun terhadap antigen arboviral antara lain adalah melalui mekanisme sel sitotoksik, interferon, dan melalui pembentukan antibodi. Mekanisme utama sistem imun *innate* terhadap virus adalah inhibisi infeksi oleh interferon tipe 1 dan eliminasi sel terinfeksi oleh sel NK. Respon imun adaptif berkaitan dengan mediasi infeksi viral oleh

antibodi. Antibodi antiviral berikatan dengan selubung viral atau *capsid* sehingga mencegah virus masuk ke dalam sel. Antibodi menghalangi virus berikatan dan masuk ke dalam sel inang dan dengan sitotoksik T limfosit mengeliminasi infeksi dengan cara membunuh sel yang terinfeksi virus. Sebagian besar sitotoksik T limfosit yang spesifik terhadap virus adalah sitotoksik T limfosit CD8+. Antibodi merupakan sebuah pertahanan yang efektif dalam melawan virus saat virus berada dalam fase ekstraseluler.

Schwartz & Albert (2010) melanjutkan bahwa naiknya titer viral antigen chikungunya akan memicu aktivasi dari sistem imun bawaan (*innate immune system*), yang ditandai dengan dibentuknya interferon tipe I (Gambar 2). Pasien diestimasi keluar dari fase viremia 1 minggu setelah infeksi dan pada waktu tersebut bukti adanya bentuk imunitas adaptif yang spesifik dapat terdeteksi. Imunitas adaptif spesifik yang menjadi *biomarker* dan terbentuk akibat adanya introduksi virus baru dalam tubuh individu adalah IgM yang terdeteksi saat fase akut selesai (pada fase *convalescences*).



Nature Reviews | Microbiology

Gambar 2. Pathogenesis Virus Chikungunya (Sumber : Schwartz & Albert 2010 http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n7/fig_tab/nrmicro2368_F3.html, diterjemahkan sesuai aslinya)

Menurut Schmaljohn dan McClain (1996), genus *Arbovirus* lainnya yaitu *Flavivirus* merupakan anggota dari *family* Flaviviridae yang secara luas memiliki potensi patogenik dan memiliki mekanisme dalam menimbulkan penyakit pada manusia. Terdapat tiga katagori yang dipertimbangkan dalam menentukan patogenitas *Flavivirus* :

1. Infeksi yang berasosiasi dengan *sindromencephalitis* (prototipe : *St. Louis Encephalitis*)
2. Infeksi yang berasosiasi dengan demam-*arthralgia-rash* (prototipe : Dengue)
3. Infeksi yang berasosiasi dengan *hemorrhagic fever* (prototipe : *yellow fever*).

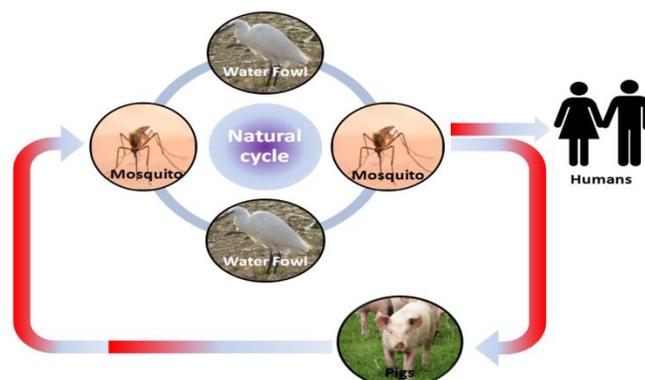
Secara umum, gejala yang ditimbulkan antara lain *febrile illness*, nyeri sendi, nyeri otot, adanya bercak merah pada kulit, beberapa kasus dilaporkan adanya *trombocytopenia*, *nausea*, hingga encephalitis. Di Indonesia, infeksi flaviviridae yang paling umum berdistribusi adalah infeksi yang berasosiasi dengan demam-*arthralgia-rash*, contohnya adalah demam berdarah (*Dengue*) dan *Japanese Encephalitis*.

Menurut Gupta dan Rao (2011), Penyakit Japanese Encephalitis adalah salah satu infeksi virus yang memiliki angka mortalitas tinggi yaitu 30-50% dan menjadi masalah kesehatan di Asia. Menurut Ghosh dan Bosu (2009), Japanese encephalitis adalah penyakit endemik di Indonesia, khususnya Bali yang pada awalnya merupakan penyakit yang baru muncul (*emerging*). Penyakit ini disebabkan oleh virus Japanese

Encephalitis (JEV) yang memiliki waktu inkubasi 5 s.d. 15 hari. Infeksi Japanese Encephalitis dikategorikan menjadi 4 tahap yaitu tahap prodromal, akut, sub akut dan *convalescences*. Tahap prodromal dan akut terjadi selama 2 sampai dengan 3 hari.

Menurut Saxena, *et al.* (2013), Virus Japanese Encephalitis dan Dengue mengalami siklus zoonotik yang melibatkan nyamuk, beberapa vertebrata dan manusia sebagai inang akhir (Gambar 3). *Culex tritaeniorchynus* dan *Culex gelidus* merupakan vektor utama. Vektor tersebut berkembang biak di sawah, sungai dan air menggenang. Babi dan burung berperan sebagai penampung (*reservoir*) dan agen perbanyak (*amplifier*) arboviral.

Virus Japanese Encephalitis pada manusia akan berkembang dan bereplikasi di kelenjar getah bening, sedangkan invasi sistem saraf pusat terjadi melalui darah yang terinfeksi. Menurut Sendow dan Bahri (2005), penularan Japanese Encephalitis dari manusia ke manusia jarang terjadi. Meskipun demikian, transmisi melalui darah dan transplantasi dapat terjadi (Saxena, *et al.* 2013).



Gambar 3. Siklus Transmisi Japanese Encephalitis (Sumber : Saxena, *et al.*2013, diterjemahkan sesuai dengan aslinya)

Dash *et al.* (2013) lebih lanjut menjelaskan bahwa manifestasi klinis pada infeksi Japanese Encephalitis (JE), Dengue, dan *arboviral* lainnya diinisiasi oleh adanya demam/ *febrile* illness yang berlangsung selama 3 s.d. 15 hari pasca paparan virus. Selanjutnya, akan terdapat gejala lanjutan yang melibatkan sakit kepala, mual, muntah, *myalgia*, sampai encephalitis, sakit di persendian, nyeri otot, dan lain sebagainya.

Depaquit (2010) menyatakan bahwa *Arbovirus* diketahui bertahan hidup di lingkungan melalui siklus antara *host* dan vektor arthropoda selama terjadi transmisi. Pfeffer dan Dobler (2010) menambahkan bahwa *Arbovirus* telah menyebar melalui perdagangan binatang dan migrasi. Hubungan antara arthropoda dan hewan hingga introduksi pada hewan lain memainkan peranan penting pada introduksi *Arbovirus*. Transmisi siklus viral antara vektor arthropoda, manusia dan hewan vertebrata juga mempengaruhi tingkat ketahanan hidup virus tersebut.

Kemampuan virus yang menyebar secara cepat menimbulkan suatu fenomena baru di beberapa wilayah termasuk Indonesia tentang *emerging* dan *re-emerging virus*. Howard dan Fletcher (2012) meringkas bahwa *emerging virus* adalah sesuatu yang digunakan untuk mendeskripsikan kemunculan infeksi viral baru yang sebelumnya belum dikenali atau bisa juga sebagai suatu bentuk infeksi yang telah dikenali sebelumnya namun muncul pada relung ekologi baru melalui perubahan yang signifikan dalam patogenesisnya. Kemunculan virus (*viral emergence*) memiliki tahapan yakni menginfeksi hewan secara langsung,

menginfeksi manusia secara langsung, menginfeksi manusia melalui hewan sebagai host/ inang, ataupun menginfeksi manusia melalui penularan dari manusia lain.

2. Infeksi Arboviral di Indonesia

Menurut Rosenberg, R. (2013) dan Dash, *et al.* (2013), *Arbovirus* yang berdistribusi di Indonesia dan Asia Tenggara dan tergolong sebagai *emerging* dan *re-emerging* virus, merupakan virus dengan rantai tunggal RNA (*single-stranded* RNA/ ssRNA). Contoh dari *Arbovirus* yang ini adalah virus *dengue* (DENV), virus *yellow fever*, virus *japanese encephalitis* (JEV), virus *chikungunya* (CHIKV), dan virus *West Nile* (WNV).

Daerah penyebaran utama *Arbovirus* di Indonesia adalah pada provinsi yang memiliki area perkembangbiakan nyamuk (*mosquitos' breeding area*), seperti persawahan dan tempat penampungan air yang didukung oleh curah hujan tinggi. Beberapa provinsi tersebut adalah Bali, Jambi, Riau, Pulau Jawa, Sumatera Barat, Kalimantan Barat, dan Sulawesi (Caballero- Anthony *et al.* (2015)).

Weaver & Reisen (2012) menambahkan bahwa Japanese Encephalitis memiliki jangkauan yang luas dan mengancam lebih dari 3 miliar penduduk di Asia. Japanese Encephalitis (genus *Flavivirus*) merupakan penyebab utama viral encephalitis di Indonesia dan dunia. Infeksi Dengue, Japanese Encephalitis dan Chikungunya merupakan tiga

contoh arboviral yang endemik, *emerging*, dan *re-emerging* di Indonesia dan perlu diwaspadai

3. Infeksi Arboviral di Bali

Provinsi Bali terkenal sebagai destinasi utama pariwisata Indonesia. Provinsi ini memiliki ibukota Denpasar yang merupakan kota terpadat di Bali dengan jumlah penduduk (WNI dan WNA) dalam sensus terakhir (2011) mencapai 629,588 jiwa.

Bidang pariwisata yang maju membawa dampak negatif bila ditinjau dari segi epidemiologi. Turis yang berkunjung ke Bali dari berbagai negara dapat menjadi *host* bagi distribusi patogen termasuk virus-virus baru keluar dan masuk ke Bali. Hal ini terbukti dari penelitian dan studi sebelumnya dimana menurut Yoshikawa dan Kusriastuti (2013), turis dan pendatang merupakan faktor penting bagi penyebaran dengue dan chikungunya di kepulauan Bali yang merupakan situs pariwisata populer di Indonesia. Meskipun demikian data *surveillance* penderita infeksi arboviral di Bali khususnya kota Denpasar tidak pernah dilaporkan secara kontinyu.

Yoshikawa dan Kuriastuti (2013) memaparkan bahwa pada tahun 2010, provinsi Bali melaporkan adanya 12.490 kasus demam berdarah/ Dengue Haemorrhagic Fever (DHF). Terdapat 20% kasus demam berdarah tahunan jepang yang merupakan import dari pulau Bali. Whelan *et al.* (2012) juga menemukan adanya homologi virus dengue dari pariwisataawan yang kembali dari pulau Bali dan pada kasus luar biasa di

teritori utara pada September 2010. Homologi ini mencapai 100 persen yang diimplikasikan pada kedua genotipe I dan IV.

Ernst, *et al.* (2015) mengemukakan bahwa serotype virus dengue 2 (DENV2) ditemukan di Australia Barat antara maret 2010 dari turis Australia yang kembali dari Bali. Di sisi lain, kejadian luar biasa disebabkan oleh terbawanya nyamuk sebagai vektor oleh turis tersebut. Nakamura, *et al* (2012) juga mencatat bahwa terdapat 61% pariwisatawan yang mengunjungi bali antara maret s.d. agustus 2010 dengan membawa kasus demam berdarah sekembalinya ke Jepang.

Pavli dan Maltezou (2015) juga mengulas bahwa selain dengue, Japanese Encephalitis juga ditransmisikan oleh nyamuk *Culex* kepada pariwisatawan pada area endemik. Japanese encephalitis (JE) telah ditemukan pada turis Eropa yang mengunjungi daerah pedesaan. Hills *et al* (2010) juga menyatakan bahwa Pulau Bali berkontribusi sekitar 15% pada penyebaran JE ke beberapa dalam rentang waktu 1973 s.d. 2008. Penyebaran Japanese Encephalitis dinyatakan berasosiasi dengan kunjungan ke daerah pedesaan.

Yoshikawa dan Kusriastuti (2013) juga menyatakan bahwa pada tahun 2010 terdapat 53.899 kasus infeksi chikungunya yang dilaporkan terjadi di Bali. Selanjutnya, terdapat juga kasus infeksi chikungunya yang terjadi di Jepang yang didatangkan dari turis yang baru kembali dari Bali pada Januari 2011. Wölfel *et al.* (2015) menemukan bahwa mutasi genom

A226 V terjadi di virus chikungunya diindikasikan berasal dari Bali. Virus termutasi ini menginfeksi turis Jerman pada tahun 2005.

Lingkungan dan kondisi kehidupan di Denpasar, Bali menunjang perkembangbiakan nyamuk sebagai host *Arbovirus* maupun *Arbovirus* itu sendiri. Pfeffer dan Dobler (2010) menyatakan bahwa *Japanese encephalitis* secara zoonotik ditransmisikan pada siklus antara bebek, babi, nyamuk *Culex*, nyamuk *Aedes*, dan manusia. Lingkungan kehidupan masyarakat Denpasar yang heterogen, adanya babi dan unggas sebagai host *amplifier* yang dilepas-liarkan hidup berdampingan dengan manusia, dan adanya areal persawahan/ tampungan air menjadikan Denpasar sebagai tempat sempurna bagi perkembangbiakan dan penyebaran *Arbovirus*. Kerentanan terhadap infeksi arboviral ini tidak dibarengi dengan adanya data *surveillance* secara berkala yang berfungsi untuk memantau epidemiologi infeksi arboviral yang terdistribusi di Denpasar.

4. Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Freeman, *et al.* (1999) menyatakan bahwa *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) adalah salah satu teknik variasi dari *Polymerase Chain Reaction* yang digunakan untuk mendeteksi ekspresi RNA. Prinsip kerja RT-PCR adalah memanfaatkan enzim *reverse transcriptase* pada RNA template untuk di transkripsi secara terbalik menjadi cDNA yang kemudian akan di amplifikasi menjadi jutaan kopi DNA oleh enzim polimerase.

Patel *et al.* (2013) menyatakan bahwa RT PCR *Flavivirus* menggunakan primer *forward* dan *reverse* yang dapat digunakan untuk berbagai jangkauan luas *Flavivirus*. Deteksi RT PCR dengan primer *Flavivirus* merupakan penggunaan umum dalam deteksi *Arbovirus*. Primer adalah oligonukleotida pendek yang memungkinkan pemanjangan utas DNA. Primer *forward Flavivirus* memiliki orientasi templat (TACAACAT... basa apapun). Primer *reverse Flavivirus* memiliki orientasi anti templat (TCCA...basa apapun).

Sensitivitas penggunaan primer *Flavivirus* berlaku setelah pengenceran serial 10x RNA virusnya serta dapat dikonfirmasi tanpa post amplifikasi. Senyawa dNTP (*di Nucleotide Tri Phosphate*) merupakan senyawa yang menyediakan energi dan gugus fosfat dalam fosforilasi. Oleh karena itu dNTP dapat menginduksi polimerisasi molekul DNA yang lebih panjang oleh enzim DNA polimerase. Air distilasi ganda (ddH₂O) digunakan sebagai pelarut berdasarkan sifatnya yang hampir tidak memiliki ion lain sehingga dapat mencegah kontaminasi selama PCR dan inhibisi enzim DNA Polimerase (Dietrich *et al.* 2013).

Menurut Araujo *et al.* (2012), prinsip karakterisasi genus *Flavivirus* adalah menggunakan genom utas tunggal positif RNA sepanjang 11 kb. Genom ini tersusun oleh *open reading frame* (ORF) serta diapit oleh *untranslated region* (UTR) pada terminus 5' ke 3'. Utas ORF mengkode kapsid (C), membran (M), amplop (E) serta tujuh protein non struktural (NS) yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5. Dalam

penelitian ini, primer *Flavivirus* universal digunakan berdasarkan kemampuannya untuk mendeteksi spektrum luas *Flavivirus*.

Selain RT-PCR, metode uji Protein NS1 (*Non-Structural 1*) juga spesifik terhadap infeksi serotipe virus dengue pada fase akut antara 24-93%. Pada infeksi sekunder, sensitivitas deteksi NS1 menurun sekitar 20% dibandingkan infeksi primer. Metode deteksi NS1 secara immunologis dilakukan dengan Sandwich ELISA menggunakan antibodi IgM. Protein NS 1 dikode dan akan muncul di serum darah pada hari dalam minggu pertama infeksi.

5. MAC-ELISA

Menurut Martin, *et al.* (2000) pengujian yang mendeteksi IgM/immunoglobulin M spesifik viral sangat bermanfaat karena pengujian ini mendeteksi antibodi yang diproduksi selama masa-masa awal dari gejala klinis introduksi penyakit viral. Metode *IgM Antibody Captured-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (MAC-ELISA) merupakan pengujian yang dapat mendeteksi IgM dengan sensitivitas tinggi dan dapat diterapkan pada sampel dalam bentuk serum dan CSF (*Cerebrospinal Fluid*).

Metode MAC-ELISA menyediakan alternatif yang berguna untuk mendokumentasikan respon serologikal berupa *immunofluorescence*. Metode MAC-ELISA merupakan metode yang paling umum digunakan dalam diagnostik laboratorium pemeriksaan serologi. Pengujian berdasarkan metode *capturing/* menangkap antibodi IgM manusia pada

plate mikrotitter menggunakan anti-human IgM antibodi yang ditambahkan dengan antigen viral spesifik.

Antigen yang digunakan untuk pengujian merupakan derivat dari protein kapsid (*envelope protein*) dari virus tersebut. Menurut Mardekian dan Roberts (2015), Goodman, *et al.* (2014), dan Martin, *et al.*(2000), pengerjaan deteksi antibodi IgM dengan MAC ELISA merupakan bentuk deteksi yang pengerjaannya mudah, biaya dan bahan serta infrasutrukturnya murah, dan tidak membutuhkan keahlian sertifikasi.

Pengujian MAC ELISA (IgM *Antibody Capture- Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) merupakan *indirect* ELISA berdasarkan prinsip adanya penangkapan antigen oleh antibodi yang sebelumnya *coated* pada *plate*. Buffer karbonat/ bikarbonat pH 9.6 digunakan sebagai *coating buffer* berdasarkan sifatnya yang mampu menjaga protein antibodi dalam muatan negatifnya untuk dapat *coating* dalam plate polistirena. Sifat PBS pada pH 7.2 akan menjaga protein dalam *near native condition* sehingga pencucian tidak akan melepaskan yang sudah *coating* (Moon *et al.* 2010). Liu *et al.* (2014) menggunakan ekstraksi antigen dengan sukrosa dan aseton berdasarkan sifat homeostasis glukosa dan fiksasi aseton. Sukrosa akan menimbulkan gradien densitas pada ekstrak jaringan atau sel. Di sisi lain, aseton digunakan dalam ekstraksi ini karena dapat melakukan fiksasi terhadap immunoglobulin.

Menurut Namekar *et al.* (2013), uji MAC ELISA (IgM *Antibody Capture- Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) memiliki sensitivitas yang

tinggi dalam deteksi dengue dan arboviral lainnya karena pada fase onset (hari ke 3 sampai 5) anti IgM dengue memiliki konsentrasi yang tinggi di serum darah. Selain itu pada infeksi dengue sekunder, titer antibodi IgM lebih rendah dibandingkan pada saat infeksi primer tetapi mekanisme kinetika pengikatan antibodi dan antigen masih serupa.

Dalam prosedur pengerjaan MAC-ELISA serum yang mengandung antibodi diencerkan 400 kali dengan buffer pencuci. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan substansi sejenis protein selain immunoglobulin yang terdapat spesimen agar tidak menempel pada plate. Microtiter plate diinkubasi dengan IgM selama 1 jam pada 37°C. Kemudian serum dan IgM dalam microtiter diinkubasi sebelum ditambahkan IgM spesifik viral yang telah dilabeli *horseradish peroxidase*. Senyawa 3,3',5,5' *tetrametilbenzidin* (TMB) ditambahkan sebelum dibaca pada 450 nm. Reagen TMB merupakan kromogen yang membentuk warna hijau telur asin akibat reaksinya dengan residu etil asetat (Huhtamo, *et al.* 2010 dan Hermann, *et al.* 2014).

B. Kerangka Berfikir

Infeksi *Arbovirus (Arthropod Borne Virus)* merupakan infeksi viral berbahaya yang memerlukan perhatian dan studi yang berkelanjutan secara tersendiri. Infeksi viral yang disebarkan oleh serangga ini menimbulkan gejala klinis serius dan penyebarannya tidak mudah dikendalikan. Topografi dan iklim indonesia yang tropis, bersuhu hangat,

dan bercurah hujan tinggi dinilai merupakan tempat yang sempurna bagi perkembangbiakan serangga yang berperan sebagai host penyebaran viral patogenik ini.

Kota Denpasar di Provinsi Bali diestimasi sebagai tempat paling heterogen karena merupakan salah satu “gerbang” Pariwisata Indonesia. Wisatawan lokal dan mancanegara yang datang mengunjungi daerah ini berperan dalam mendistribusikan *Arbovirus* dari dan ke dalam wilayah tersebut. Kehidupan masyarakat dan lingkungan Denpasar juga dinilai mendukung perkembangbiakan nyamuk/ serangga, seperti tersedianya irigasi dan wadah penampungan air. Selain itu terdapat host *amplifier Arbovirus* seperti babi dan unggas yang dilepas-liarkan hidup berdampingan dengan manusia. Faktor-faktor ini melatarbelakangi dan menjadikan Denpasar berkontribusi banyak terhadap distribusi dan perkembangan *arboviral*. Denpasar dianggap sebagai tempat yang menjadi penanda/ *marker* apabila terdapat introduksi arboviral jenis baru di Indonesia.

Arboviral yang terdistribusi di Denpasar, Bali antara lain adalah dari genus *Alphavirus* dan dari genus *Flavivirus*. Kendati demikian data *surveillance* distribusi arboviral maupun jumlah penderita tidak pernah dilaporkan secara berkala. Padahal epidemiologi *arboviral* di Bali meluas ke berbagai penjuru dunia. Untuk mempelajari kemungkinan ada atau tidaknya introduksi *arboviral* yang baru ke Indonesia dilakukanlah studi ini sebagai usaha awal membuat data *surveillance* infeksi arboviral di

Denpasar, Bali. Sampel serum dari pasien terduga terinfeksi arboviral di koleksi di RSUD Wangaya, Denpasar, Bali. Deteksi infeksi arboviral dilakukan secara molekuler dan serologikal menggunakan metode RT-PCR dan MAC ELISA. Tujuannya adalah untuk mendeteksi komponen materi genetik virus yang terekspresi dalam spesimen dan presensi antibodi spesifik antigen (IgM) yang mungkin terekspresi sebagai *marker* seseorang terintroduksi oleh virus baru.

C. Hipotesis Penelitian

Terdapat introduksi infeksi *arboviral* baru dan beberapa infeksi *arboviral* umum seperti Dengue, Japanese Encephalitis, dan Chikungunya pada sampel dari RSUD. Wangaya, Denpasar berdasarkan analisis molekuler (deteksi DNA) dan serologi (IgM).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tujuan Operasional

1. Memperoleh RNA viral dari sampel serum
2. Mengamplifikasi sekuens/ urutan spesifik dari *Arbovirus* yang mungkin terdapat dalam sampel
3. Mengidentifikasi dan mendeteksi presensi antibodi IgM sebagai penanda adanya introduksi arboviral baru.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Emerging Virus Research Unit (EVRU) Lembaga Biologi Molekuler Eijkman pada Bulan Maret 2016 s.d. Juni 2016.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian berupa metode deskriptif dengan teknik pengujian menggunakan RT-PCR dan MAC ELISA.

D. Prosedur Penelitian

1. Alat dan Bahan

- a. **Alat** : Thermocycler [BioRad C-1000], microtube 1.5 mL, PCR tube, Inkubator 37°C, BSC [Nuair], mikropipet

multichannel [Eppendorf], mikropipet [BioRad], mesin ELISA reader [Infinite 200, TECAN], rak, ice pack, cooler box, dan sentrifuge [Thermofisher 21R], kantung ziplock/ *container*, *paper towel*, Plate ELISA [Immulon II HB- flat bottomed 96 well], waste container, Alkohol 70%.

b. Bahan :

- 1) Sampel : Sebanyak 104 sampel serum akut terduga terinfeksi arboviral dikoleksi oleh RSUD. Wangaya, Denpasar pada periode September 2015 s.d. Maret 2016. Koleksi sampel berdasarkan gejala klinis yang terlihat seperti *febrile illness* lebih dari 3 hari, sakit kepala, dan nyeri otot/ persendian. Beberapa dari 104 sampel tersebut memiliki sampel yang dikoleksi kembali apabila pasien masih mengalami gejala klinis setelah lebih dari 7 hari onset (lewat dari masa akut). Jumlah spesimen yang dikoleksi kembali adalah sebanyak 40 sampel dan menjadi sampel *convalescences* yang diuji secara serologikal dengan metode MAC ELISA.

Preservasi sampel dilakukan dengan prosedur yang berlaku yakni sentrifugasi untuk memisahkan sel dan serum darah, lalu penyimpanan dalam *cryovial* untuk selanjutnya disimpan di dalam temperatur -80°C (*cryopreservation*) agar serum tetap dalam kondisi baik. Pengiriman sampel dari Denpasar, Bali menuju Eijkman Institute, Jakarta juga dilakukan berdasarkan protokol yang

berlaku dimana pengiriman sampel menggunakan *cryobox* dan sampel berada diantara *dry-ice* agar suhu tetap terjaga. Di Eijkman Institute, sampel disimpan di dalam freezer -80°C sebelum akhirnya di proses untuk pengujian seperti tahap ekstraksi dan isolasi virus.

- 2) Ekstraksi RNA Viral : Kit QIAmp RNA Viral Extraction (250), dan *Ethanol absolute 96%*
- 3) RT-PCR : QIAGEN One Step RT-PCR Kit, Primer *Alphavirus* dan *Flavivirus* Forward 25 μM , Primer *Alphavirus* dan *Flavivirus* Reverse 25 μM .
- 4) MAC ELISA

Bahan yang diperlukan untuk metode MAC ELISA antara lain :

- a) *Coating buffer* : Buffer Karbonat/ bikarbonat pH 9.6 (1.59 gram Na_2CO_3 + 2.93 gram NaHCO_3 dilarutkan dalam 1 L air *nanopure* yang telah di sterilisasi).
- b) *Wash buffer* : *Phosphat buffered saline* (PBS) pH 7,2 ditambah 0,05% Tween20.
- c) *Blocking buffer* : PBS/ 5% Skim Milk/ 0,5% Tween20
- d) *Stop solution* : H_2SO_4 1M
- e) *Coating antibody*: Goat anti-human IgM
- f) *Viral antigen* : *Sucrose-aceton extracted suckling mouse brain viral antigen, non infectious, previously titrated*
- g) *Normal antigen* : *Sucrose-aceton extracted suckling mouse brain antigen from mock-infected animals.*

- h) *Detecting antibody conjugate* : *Horseradish peroxidase conjugated monoclonal antibody, previously titered.*
- i) *Substrate* : *3,3',5,5' tetramethylbenzidinebase (Enhanced K-Blue TMB substrate) Neogen Corp. Cat#308175, dan*
- j) *Kontrol* : *Tested antibody positive dan antibody negative human*

2. Cara Kerja

a. Identifikasi molekuler

1) Ekstraksi RNA viral

Ekstraksi RNA viral dilakukan berdasarkan protokol QIAGEN [QIAmp viral RNA mini kit (250)]. Prinsipnya adalah lisis sel, RNA *binding/* pengikatan RNA dengan ethanol absolute, washing/ pencucian dengan wash buffer, dan elusi RNA.

- a) 560 μ L AVL buffer RNA Carrier dicampurkan dengan 140 μ L sampel didalam tabung mikro 1.5 mL.
- b) Setelah inkubasi selama 10 menit, campuran ditambah dengan 560 μ L ethanol absolut. Campuran divortex agar homogen lalu ditampung dalam *spin column* dan disentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm.
- c) Filtrat didalam *collection tube* dibuang dan 500 μ L washing buffer (AW1 buffer) ditambahkan kedalam *coloumn*.

- d) Sentrifugasi dilakukan pada 8000 rpm selama 1 menit, kemudian filtrat didalam *collection tube* dibuang kembali kemudian 500 μ L AW2 buffer ditambahkan kedalam *coloumn*.
- e) Sentrifugasi dilakukan pada 14000 rpm selama 3 menit. Untuk membuang wash buffer yang mungkin masih tersisa di dalam *coloumn*, sentrifugasi dilakukan lagi selama 1 menit pada 8000 rpm.
- f) RNA yang terdapat dalam *coloumn* dielusi dengan menggunakan 60 μ L AVE Buffer.

Berdasarkan protokol, diestimasi lebih dari 90% RNA viral dapat terekstraksi. Ekstrak kemudian disimpan dalam -80°C untuk penyimpanan jangka panjang atau dapat langsung dijadikan RNA template pada identifikasi molekuler.

2) Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) dan Elektroforesis Gel Agarosa

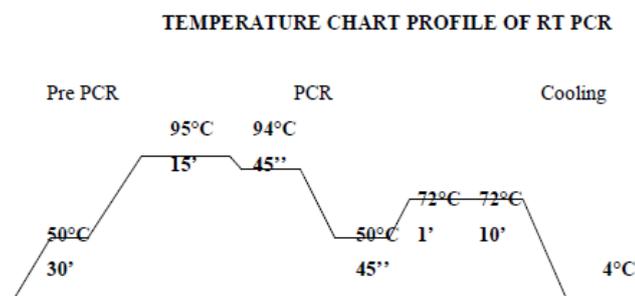
Preparasi reagen untuk ekstraksi RNA viral dan RT-PCR dilakukan di Biosafety Cabinet Class II dan pada kondisi bebas asam nukleat. Reagen RT PCR terdiri atas PCR Buffer, 10 μ M dNTP, 25 μ M Primer *Flavivirus* (*Forward* dan *Reverse*), enzyme mix, dan ddH₂O. Untuk 1 reaksi RT-PCR dibutuhkan volume master mix sebagai berikut :

<u>Reagen</u>	<u>Volume 1 reaksi (uL)</u>
RNA template	: 5
5x PCR Buffer	: 5
10 mM dNTP Mix	: 1
25 uM Primer Fwd	: 1
25 uM Primer Rvs	: 1
Enzyme Mix	: 1
<u>ddH₂O</u>	<u>:11</u>
	25 uL

RT PCR dilakukan di *Thermocycler* (mesin PCR) dimana setiap sampel terdiri dari 20 μ L reagen dicampur dengan 5 μ L RNA. Dalam satu kali pengujian akan terdapat sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif. RT- PCR dijalankan dengan protokol selama 35 cycles. Selama PCR, denaturasi dilakukan pada 94°C selama 45 detik, *annealing* dilakukan pada 50°C selama 45 detik, dan tahap *extension* atau elongasi dilakukan pada 72°C selama 1 detik. Siklus PCR dihentikan oleh tahap ekstensi pada 72°C selama 10 menit dan tahap pendinginan pada 4°C. Total waktu yang diperlukan untuk reaksi PCR ini adalah 2 jam dan 53 menit.

Elektroforesis gel agarose dilakukan pada konsentrasi gel agarose 1.5%. 1.45 gram bubuk agarose gel dilarutkan dalam 90mL buffer TBE. Campuran ini dipanaskan dengan *microwave* selama 1 s.d. 1,5 menit hingga homogen sepenuhnya. Setelah itu didinginkan hingga suhu mencapai 40°C. Kemudian ditambahkan 14,5 μ L SYBRsafe pewarna DNA. Campuran tersebut ditempatkan

dalam *gel caster* dengan sisir untuk membentuk *well* atau sumur dan ditutup dengan aluminium foil hingga gel mengeras. Setelah gel terbentuk, produk PCR ditempatkan masing-masing ke dalam sumur gel, dengan sumur paling terakhir diisi dengan DNA ladder sebagai marker/penanda panjang basa DNA. Elektroforesis dijalankan selama 30 menit, pada 100 volt. Hasil elektroforesis gel agarose dibaca dengan sinar UV dalam perangkat gel documentation dengan software Quantity one 1-D analysis.



Gambar 4. Protokol RT-PCR *Alphavirus* dan *Flavivirus* (Sumber : Dokumen Pribadi)

b. Identifikasi Serologikal

1) JE IgM Antibody Captured- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (MAC ELISA)

Prosedur pengerjaan *IgM Antibody Capture Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* mengikuti protokol dari U.S. Central Disease Control (U.S. CDC). Cara kerjanya adalah sebagai berikut :

- a) Dengan spidol kecil, *plates* diberi nama dan tanggal menggunakan kode yang sesuai untuk setiap sampel dan kontrol. Identifikasi wilayah setiap sampel di dalam *plate*. *Plate* harus selalu

ditempatkan dalam keadaan tertutup didalam lingkungan yang lembab selama masa inkubasi kecuali saat tahap *coating*. Untuk menciptakan suasana lembab selama masa inkubasi, plate ditempatkan dalam *ziplock* besar atau didalam sebuah wadah tertutup dengan tissue yang telah dibasahkan dengan air secukupnya.

- b) Tahap *coating* : bagian dalam dari setiap *well plate* dilapisi dengan 75 μL goat anti-human IgM yang didilusikan pada 1 : 2000 dalam coating buffer pH 9.6 yang telah dibuat sebelumnya. Kemudian plate ditutup dan diinkubasi 4°C semalaman. *Coating antibody* dikeluarkan dan dibuang diatas towel/ tissue tebal.
- c) Tahap *blocking* : setiap bagian didalam *well plate* dilapisi dengan 200 μL *blocking buffer* yang telah dibuat sebelumnya. Plate diinkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit.
- d) Plate dicuci *plate* dengan *wash buffer* sebanyak 5x menggunakan mesin otomatis pencuci plate. Plate harus diisi hingga bagian atas setiap siklus pencucian ($\pm 300 \mu\text{L}$)
- e) Setiap well dalam plate ditambahkan dengan 50 μL serum pasien yang telah didilusi sebelumnya dengan perbandingan 1:400 dalam *wash buffer*. Plate diinkubasi selama 1 jam pada 37°C dalam wadah lembab. Kemudian well dicuci sebanyak 5x
- f) Viral antigen dan normal antigen didilusikan dalam *wash buffer* dengan perbandingan 1 : 320. Setiap well di lajur kiri

ditambahkan dengan 50 μ L serum viral antigen dan 50 μ L normal antigen ditambahkan untuk well di lajur kanan. *Platedi*inkubasi pada 4°C selama 1 malam dalam wadah lembab. Kemudian *plate* dicuci sebanyak 5x.

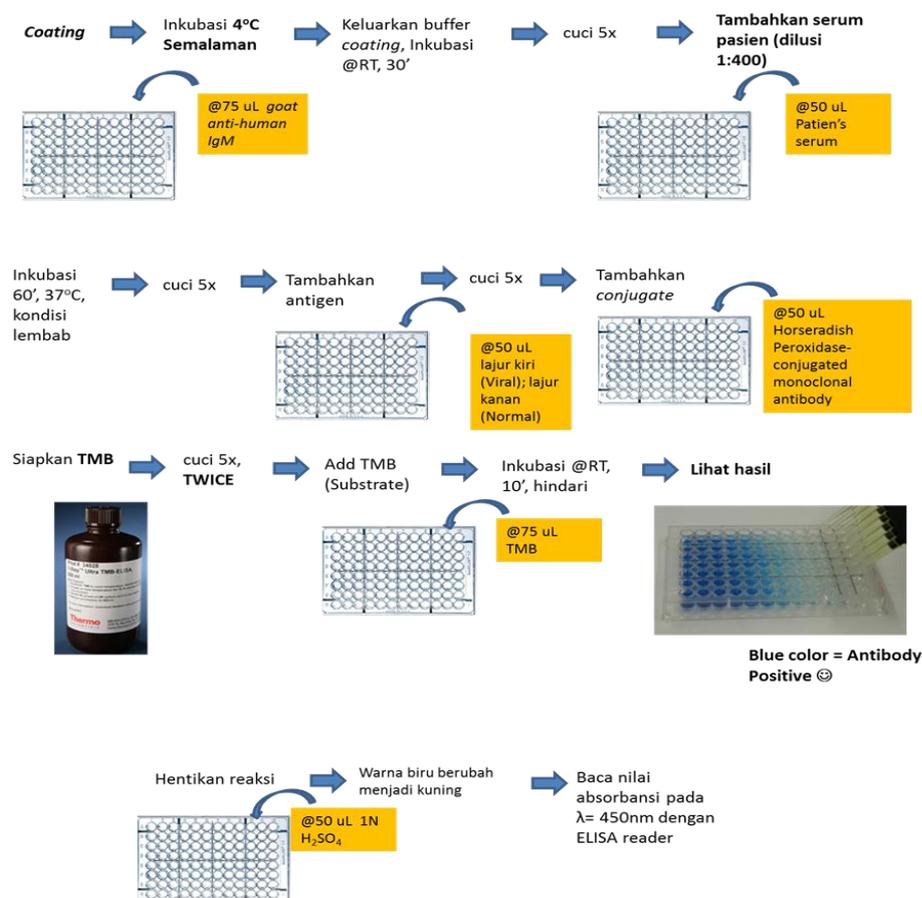
- g) setiap well ditambahkan dengan 50 μ L *horseradish peroxidase conjugated monoclonal antibody*. Inkubasi lalu dilakukan selama 1 jam dalam wadah lembab pada suhu 37°C.
- h) Mesin *plate reader* atau pembaca plate dihidupkan hingga siap digunakan. Siapkan TMB dan hitung jumlah yang diperlukan. Plate dicuci sebanyak 10 kali.
- i) Setiap well ditambahkan dengan 75 μ L TMB substrate. Segera tutup plate dengan *aluminium foil* dan letakkan di tempat gelap agar terhindar dari cahaya. Inkubasi TMB dilakukan dalam temperatur ruangan selama 10 menit. Warna biru akan muncul pada plate yang positif mengandung antibodi IgM.
- j) 50 μ L *stop solution* ditambahkan kedalam setiap well. Warna biru akan berganti menjadi warna kuning. Plate dibaca pada filter 450 nm filter menggunakan *plate reader*. Hasil yang terbaca merupakan nilai OD (Optical Density), hasil harus divalidasi terlebih dahulu dengan rumus :

$$\frac{\text{Rerata nilai OD serum kontrol positif direaksikan dengan antigen viral (P)}}{\text{Rerata nilai OD serum kontrol negatif direaksikan dengan antigen viral (N)}}$$

Hasil dikatakan valid apabila nilai P/N menunjukkan lebih besar atau sama dengan 2.0 ($P/N \geq 2.0$). Untuk menentukan spesimen mengandung IgM terhadap antigen viral dilakukan perhitungan P/N :

$$\frac{\text{Rerata OD spesimen direaksikan dengan antigen viral (P)}}{\text{Rerata OD serum kontrol negatif direaksikan dengan antigen viral (N)}}$$

Spesimen dianggap positif apabila nilai P/N lebih besar atau sama dengan 3.0. Nilai P/N yang berada diantara 2.0 dan 3.0 merupakan nilai Ekuivokal yang memerlukan komparasi data lainnya. Secara singkat, prosedur MAC ELISA dijelaskan pada gambar dibawah :



Gambar 5. Alur prosedur MAC ELISA (Sumber : Dokumen Pribadi)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 104 sampel terduga infeksi arboviral hasil koleksi RSUD Wangaya Denpasar Bali merupakan sampel akut dan 40 diantaranya memiliki sampel *convalesences* (Lampiran 1). Sampel serum darah yang dikoleksi merupakan bagian cair dari darah setelah darah membeku. Serum darah diambil sebagai spesimen karena sampel serum merupakan bentuk paling baik jika ingin melakukan analisa terhadap infeksi viral. Berdasarkan Guder (2002), serum dianggap sebagai standard emas (*gold standard*) yang masih memiliki sisa matriks untuk beberapa pengujian.

Serum merupakan bagian yang bebas dari protein pembekuan darah namun masih mengandung metabolit hasil dari proses pembekuan darah. Serum merupakan sampel yang lebih bersih dibandingkan plasma darah karena bebas dari sel dan platelet. Sel-sel darah dan platelet terjebak oleh aktivitas fibrin selama proses pembekuan darah (*clotting process*) yang berlangsung sekitar 15 s.d 30 menit.

Komponen di dalam serum darah antara lain antigen, antibodi, hormon, dan berbagai substansi eksogenik yang berasal dari mikroorganisme maupun senyawa obat. Berdasarkan Yu, *et al.* (2011), didalam plasma darah terdapat juga protein (albumin, globulin dan fibrinogen), glukosa, faktor pembekuan dan metabolit.

Isolasi virus dari serum darah dilakukan berdasarkan siklus viremia dan kandungan antibodi/ antigen yang ada dalam serum. Tujuan isolasi RNA pada penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat materi genetik virus. Berdasarkan Huhtamo *et al.* (2010), selama fase akut viremia, virus akan mengkode antigen untuk disekresikan ke dalam serum darah. Selain itu, isolasi virus dilakukan dari serum berdasarkan berat jenis virus yang jauh lebih rendah dibandingkan sel darah dan komponen plasma. Setelah mendapatkan isolat RNA, spesimen diuji secara molekuler dengan metode RT-PCR.

Pada sampel klinis berupa sampel-sampel yang berada dalam fase akut viremia, RT-PCR memiliki sensitivitas tinggi hingga 93%. Metode ini dinilai merupakan metode yang cepat dan akurat untuk dilakukan pada pemeriksaan infeksi viral (Steininger, *et al.* 2002). Berdasarkan Siregar *et al.* (2011), pada deteksi infeksi *Arbovirus*, dimana virus memiliki materi genetik berupa RNA, metode RT-PCR digunakan karena memanfaatkan prinsip kerja enzim *reverse transcriptase* yang dapat mentranskripsi balik RNA *template* menjadi utas kopi DNA. Setelah kopi DNA didapatkan, prinsip PCR konvensional akan berjalan seperti biasa dan terbentuk jutaan DNA. Setelah utas DNA tergandakan, elektroforesis agarosa baru dapat dilakukan jika volume jumlah utas DNA telah mencapai 7 μ L.

Fokus penelitian ini terletak pada virus-virus dari golongan genus *Alphavirus* dan *Flavivirus*. Virus-virus yang satu genus dengan Dengue (genus *Flavivirus*) maupun yang satu genus dengan Chikungunya

(*Alphavirus*) merupakan virus yang endemik di daerah tropis Indonesia khususnya di Bali. Selain itu lingkungan Denpasar menunjang perkembangbiakan virus tersebut sehingga anggota genus tersebut dijadikan fokus dan prioritas pengamatan pada penelitian.

Pengujian pada penelitian ini menggunakan RT-PCR genus *Arbovirus* (*Alphavirus* dan *Flavivirus*) yang didukung oleh uji serologi pada sampel *convalescences* berupa uji absorbansi untuk melihat presensi ikatan antigen dan antibodi Japanese Encephalitis dengan menggunakan metode MAC ELISA. Hasil uji keduanya digunakan sebagai data primer. Selain itu digunakan juga data sekunder sebagai perbandingan dan pendukung data primer yakni pengujian NS1 (protein non-struktural 1) dan RT-PCR dengue yang dilakukan oleh staf ahli laboratorium biologi molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Warmadewa, Denpasar.

Metode NS1 dan RT-PCR dengue merupakan metode *presumptive* pertama dalam *rapid test* yang dilakukan untuk deteksi arboviral terduga dengue. Metode NS1 merupakan metode spesifik untuk mengetahui infeksi akibat virus dengue. Berdasarkan Johnson, *et al.* (2005), Protein non-struktural 1 (NS1) dari genom virus dengue telah menjadi alat yang berguna untuk deteksi infeksi dengue pada fase akut.

Antigen dengue NS1 telah dideteksi dan ditemukan pada pasien yang terinfeksi DENV pada fase akut 1-18 hari pertama sejak paparan hingga menimbulkan gejala (*onset*). Pada penelitian ini, NS1 dilakukan

terlebih dahulu untuk memprediksi apakah sampel terinfeksi virus dengue atau *non-dengue*.

Merupakan hal yang penting untuk mengetahui hasil uji NS1. Apabila hasil Uji NS1 adalah negatif, terdapat kemungkinan adanya introduksi arboviral baru *non-dengue*, mengingat dengue merupakan infeksi arboviral yang sudah endemik di Indonesia.

Hasil uji *presumptive* NS1 yang negatif akan menggiring kepada deteksi-deteksi lanjutan seperti RT-PCR dengue atau RT-PCR genus *Arbovirus* (*Alphavirus* dan *Flavivirus*). Hal ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya introduksi *Arbovirus* baru ke Indonesia. Analisis hasil pengujian molekuler RT-PCR dan pengujian serologi dengan JE MAC-ELISA menghasilkan 4 (empat) kelompok hasil, antara lain :

A. Kelompok 1 : Hasil uji molekuler RT-PCR positif dan uji serologi MAC ELISA positif pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya, Denpasar nomor 1 s.d. 104

Hasil uji molekuler RT-PCR dan uji serologi antibodi JE dengan MAC ELISA pada sampel terduga infeksi arboviral nomor 1 s.d. 104 memiliki 15 sampel yang positif terinfeksi *Flavivirus* berdasarkan pada dua pengujian. Sampel-sampel tersebut adalah sampel nomor 8, 9, 14, 20, 26, 34, 35, 36, 42, 43, 56, 71, 73, 92, dan 101. Diantara sampel-sampel

tersebut, spesimen yang memiliki sampel *convalescences* adalah nomor 9, 14, 20, 26, 35, 36, 56, 71, dan 101.

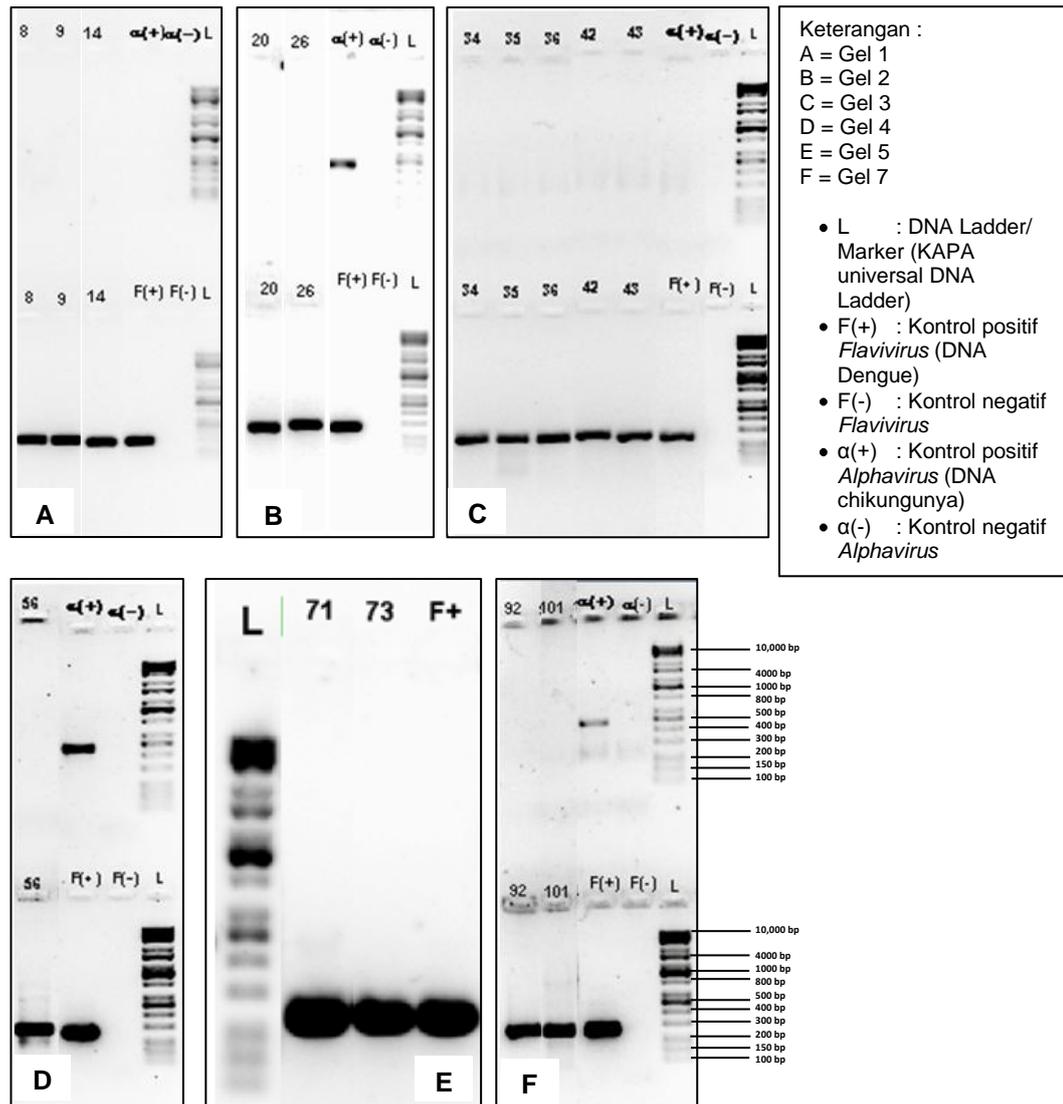
Hasil uji molekuler dan serologi terdapat pada gambar 6 dan Tabel 1. Hasil uji molekuler yang positif ditandai dengan adanya *band/* pita yang terpisah oleh perbedaan muatan listrik selama proses elektroforesis (Gambar 6A s.d. F). Panjang *band* yang teramplifikasi dengan metode RT-PCR dibandingkan dengan *marker* atau penanda dari KAPA universal DNA ladder. Tujuannya adalah untuk mengetahui panjang pasang basa (*base pair* atau disingkat bp) pada produk amplifikasi hasil RT-PCR.

Berdasarkan hasil pembacaan dan perbandingan dengan menggunakan skala pada DNA *marker*, panjang band yang teramplifikasi (*amplicon*) untuk spesimen yang terinfeksi *Flavivirus* berada diantara 200 s.d. 300 bp. Sementara itu untuk *Alphavirus*, pita marker terletak pada ukuran sekitar 500 bp (Gambar 6). Kontrol positif yang digunakan untuk *Alphavirus* adalah RNA virus chikungunya dan kontrol positif untuk *Flavivirus* adalah RNA virus dengue.

Berdasarkan uji serologi (Tabel 1), nilai absorbansi pada deteksi kolorimetri selama proses ELISA bervariasi. Sebanyak 8 sampel memiliki nilai P/N positif dan 1 sampel memiliki nilai P/N yang ekuivokal. Nilai P/N yang positif terdapat pada sampel nomor 9, 14, 20, 26, 35, 56, 71, dan 101. Sementara nilai ekuivokal terdapat pada sampel nomor 35.

Analisa hasil uji molekuler dan serologikal yang positif pada 15 sampel tersebut adalah kemungkinan besar spesimen terinfeksi oleh virus

dengue (DENV). Hal ini juga didukung oleh adanya hasil uji NS1 dan hasil uji RT-PCR dengue pada sampel yang terbukti positif yang terlihat pada Tabel 1 dengan semua serotipe dengue yang menginfeksi adalah Dengue-3 (D3/ DENV-3).



Gambar 6. Hasil uji molekuler RT-PCR *Alphavirus* dan *Flavivirus* yang positif pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya, Denpasar kelompok 1.

Tabel 1. Hasil positif uji serologi IgM Japanese Encephalitis (JE) dengan metode MAC ELISA dan data sekunder pada sampel terduga infeksi arboviral kelompok 1

No	MAC ELISA		NS1	RT-PCR Dengue	Deteksi Serotipe
	Hasil	Nilai P/N			
8			+	+	D3
9 *	POS	3.79	+	+	D3
14 *	POS	3.98	+	+	D3
20 *	POS	13.21	+	+	D3
26 *	POS	5.49	-	+	D3
34			+	+	D3
35 *	POS	3.73	+	+	D3
36 *	EQU	2.38	+	+	D3
42			+	+	D3
43			+	+	D3
56 *	POS	6.04	-	+	D3
71 *	POS	5.49	-	+	D3
73			-	+	D3
92			-	+	D3
101 *	POS	3.57	-	-	-

Keterangan :

* : Sampel convalescences

NEG : Negatif/ tidak mengandung antibodi IgM JE. Jangkauan arti negatif apabila nilai P/N dibawah 2.00

POS : Positif mengandung antibodi IgM JE. Jangkauan arti positif apabila nilai P/N lebih dari 3.00

EQU : *Equivocal*/ ekuivokalitas menunjukkan nilai P/N yang *borderline*. Jangkauan nilai ekuivokal apabila nilai P/N antara 2.00 s.d. 3.00

NS1 : Uji protein non-struktural 1 (NS1) sebagai metode *presumptive* untuk verifikasi infeksi dengue akut

RT-PCR Dengue : *Reverse transkriptase*-PCR Dengue merupakan salah satu pengujian molekuler yang mengamplifikasi sekuens gen dengue dan termasuk kedalam salah satu rapid test untuk memverifikasi infeksi dengue fase akut pada spesimen

MAC ELISA : Metode serologi dengan memanfaatkan ikatan antigen-antibodi dan enzim untuk mendeterminasi adanya presensi antibodi spesifik viral infeksius pada spesimen dengan mengamati nilai serapan sinar ultraviolet-visual pada uji kolorimetri.

Nilai P/N : Nilai nisbah hasil bagi nilai rerata OD (*Optical Density*) spesimen yang direaksikan dengan antigen viral (P) dengan rerata OD serum kontrol negatif yang direaksikan dengan antigen viral (N)

Sampel nomor 101 memiliki hasil yang unik pada awal analisa. Pengujian molekuler dengan RT-PCR *Flavivirus* menunjukkan hasil positif (Gambar 6F) dan hasil uji serologi pada tabel 1 yang juga positif dengan nilai P/N sama dengan 3.57. Meskipun demikian terdapat hasil negatif pada RT-PCR dengue dan uji NS1 (Tabel 1) yang dilakukan sebelumnya dan merupakan metode presumptive sebagai data sekunder penelitian. Kenyataan ini membawa sampel 101 pada deteksi lanjut. Deteksi lanjutan didasarkan oleh pengujian primer yang tidak didukung oleh hasil uji sekunder menyebabkan adanya praduga bahwa sampel nomor 101 terinfeksi oleh *Flavivirus* non-dengue.

Deteksi lanjutan bertujuan untuk memverifikasi praduga tersebut, mengingat dengue merupakan infeksi arboviral yang endemik di Bali dan Indonesia. Adanya hasil negatif pada RT-PCR dengue membawa praduga bahwa mungkin terdapat introduksi *Flavivirus* baru pada sampel nomor 101. Deteksi lanjutan adalah dengan melakukan *sequencing* atau pengurutan genom pada produk RT-PCR sampel nomor 101. *Sequencing* dilakukan oleh tenaga ahli dari bagian *sequencing service* Lembaga Eijkman. Hasil sekuensing sampel tersebut adalah Dengue Virus serotipe 3 (DENV-3).

Hasil negatif kedua pengujian RT-PCR dengue dan NS1 serta hasil positif pada uji RT-PCR *Flavivirus* merupakan indikasi bahwa RT-PCR *Flavivirus* terbukti lebih sensitif dibandingkan RT-PCR spesifik virus. Sensitifitas RT-PCR *Flavivirus* yang lebih tinggi dikarenakan RT-PCR

Flavivirus menggunakan primer yang urutan basanya terdapat dalam satu genus virus. Sehingga RT-PCR *Flavivirus* memiliki jangkauan lebih luas dalam mendeteksi kehadiran materi genetik satu spesies virus dalam genus yang sama yang terekspresi di dalam spesimen.

Metode RT-PCR dipilih karena metode ini mudah, akurat, dan singkat untuk mengamplifikasi fragmen RNA virus yang dijadikan cetakan untuk transkripsi balik (*reverse transcription*) sehingga terbentuk fragmen DNA target dalam jumlah ribuan kali lebih banyak dibandingkan RNA cetakannya. Dalam pengujian dan verifikasi infeksi arboviral perlu dipertimbangkan untuk melakukan metode RT-PCR genus virus atau RT-PCR spesifik virus sebagai salah satu metode dalam *rapid test*. Metode RT-PCR yang mudah dan terbukti lebih sensitif dibandingkan uji NS1 dapat dipertimbangkan untuk menjadi suatu alat dalam penegakan diagnosis pada kasus-kasus terduga infeksi arboviral.

Elektroforesis gel agarosa dilakukan pada konsentrasi gel sebesar 1.5%. Hal ini karena rentang panjang DNA yang teramplifikasi dan ingin dipisahkan oleh muatan listrik selama elektroforesis berlangsung berada dalam rentang ukuran dibawah 3000 bp. Berdasarkan Stellwagen, NC. (1992), penggunaan agarose diaplikasikan menurut rentang ukuran DNA (*DNA size range*) pada sampel. Penggunaan konsentrasi agarose berbanding terbalik dengan rentang ukuran DNA. Saat rentang ukuran DNA besar, konsentrasi gel agarosa dibuat kecil, begitu pula sebaliknya. Stellwagen, NC (1992) juga menambahkan jika ukuran rentang DNA

adalah antara 1000 s.d. 30,000 bp maka persentase gel adalah 0.5%. Gel 1% digunakan untuk DNA dengan rentang 500 s.d. 10,000 bp. Jika rentang ukuran DNA adalah 200 s.d. 3000 bp maka digunakan gel agarosa dengan persentase 1.5%. Gel agarose 2.0% digunakan untuk rentang DNA sebesar 50 s.d. 2000 bp.

Sampel nomor 9, 20, 26, 56, dan 71 memiliki hasil positif pada pengujian RT-PCR Dengue, NS1, dan MAC ELISA (Tabel 1). Hal ini sedikit membingungkan pada awalnya karena protein NS1 merupakan protein khas virus dengue dimana protein tersebut akan berada pada serum darah beberapa hari awal fase viremia. Di sisi lain IgM JE merupakan antibodi terhadap *Japanese Encephalitis*.

Hasil ini merupakan implikasi dari terjadinya suatu reaktivitas silang (*cross reactivity*) antibodi dalam uji imunologis serologis *Flavivirus*. Ini merupakan rintangan umum untuk membedakan setiap *Flavivirus* secara spesifik. Dalam pengujian ini, antibodi monoklonal tikus IgM anti-dengue memiliki sifat epitop yang dapat berikatan pada domain II *Flavivirus* lain seperti *Japanese Encephalitis* (Lin, *et al.* 2012). Adanya kemungkinan terjadi reaktivitas silang pada uji serologi membuat analisa dan penentuan jenis virus yang menginfeksi suatu spesimen secara tepat tidak bisa hanya mengandalkan satu jenis pengujian saja.

B. Kelompok 2 : Hasil Uji RT-PCR negatif dan Hasil uji serologi JE MAC-ELISA positif pada sampel terduga infeksi arboviral nomor 1 s.d. 104

Hasil uji molekuler RT-PCR yang negatif dan hasil uji serologi antibodi JE dengan MAC ELISA yang positif pada sampel terduga infeksi arboviral nomor 1 s.d. 104 terdapat pada sampel nomor 11, 13, 44, dan 48. Keempat sampel tersebut memiliki sampel *convalesence* yang diuji secara serologi menggunakan metode MAC ELISA. Hasil uji serologi dengan metode MAC ELISA dan data sekunder terdapat pada Tabel 2.

Sampel nomor 11 dan 13 memiliki hasil uji negatif untuk RT-PCR *Flavivirus*. Hasil ELISA memiliki nilai masing-masing 2.93 dan 2.1 yang berarti nilainya ekuivokal/ *borderline* (nilai P/N antara 2.00- 3.00). Nilai yang ekuivokal menunjukkan presensi antibodi sehingga memiliki nilai absorbansi terhadap deteksi kolorimetri dengan sinar UV-visual selama ELISA.

Adanya presensi antibodi IgM Japanese Encephalitis (JE) pada sampel negatif RT-PCR *Flavivirus* dan negatif RT-PCR dengue mengindikasikan kedua sampel tersebut terinfeksi *Flavivirus* non-dengue. Meskipun sampel nomor 11 memiliki hasil positif pada pengujian NS1, besar kemungkinan sampel tersebut tidak terinfeksi dengue. Hal ini dikarenakan pada pengujian yang lebih sensitif yaitu RT-PCR Dengue hasilnya adalah negatif.

Sampel nomor 44 dan 48 memiliki hasil negatif pada uji molekuler RT-PCR *Flavivirus* namun memiliki hasil positif pada uji serologi JE IgM Antibody Captured- ELISA. Nilai P/N untuk kedua sampel ini masing-masing adalah 8.07 dan 11.47 (Tabel 2). Data sekunder berupa uji NS1 dan RT-PCR dengue memiliki hasil negatif.

Analisa hasil negatif pada RT-PCR dan hasil positif pada MAC ELISA pada sampel nomor 11, 13, 44, dan 48 mengindikasikan bahwa keempat sampel tersebut kemungkinan besar terinfeksi oleh virus Japanese Encephalitis (JEV). Keberadaan viral dalam bentuk materi genetik virus yang terekspresi dalam sampel tidak terdeteksi secara molekuler dikarenakan pasien kemungkinan besar telah berada pada fase akhir viremia.

Infeksi Japanese Encephalitis memiliki masa viremia yang singkat yakni hanya berkisar 4 hari sehingga deteksi secara molekuler pada akhir masa viremia sukar dilakukan. Berdasarkan Hickmann, *et al.* 2011, Infeksi Japanese Encephalitis diketahui singkat yakni berkisar 3 s.d. 5 hari dan titer virus pada fase viremia juga rendah sehingga sulit untuk mendeteksi infeksi berdasarkan hasil uji molekuler saja. Pada sampel nomor 11, 13, 44, dan 48 materi genetik viral tidak berhasil di amplifikasi melalui metode PCR akibat jumlah DNA yang tidak memadai serta infeksi sudah melawati masa viremia.

Japanese encephalitis merupakan penyakit infeksi *Arbovirus* yang disebabkan oleh virus Japanese Encephalitis yang pada tahun 2009

diperkirakan merupakan *emerging virus* di Indonesia. Hal ini didasarkan oleh pernyataan Ghosh dan Bosu (2009) yang menyatakan bahwa Japanese encephalitis adalah penyakit endemik di Indonesia, khususnya Bali, dan pada awalnya merupakan penyakit yang baru muncul (*emerging*).

Tabel 2. Hasil positif uji serologi IgM Japanese Encephalitis (JE) dengan metode MAC ELISA dan data sekunder pada sampel terduga infeksi arboviral kelompok 2

No	MAC ELISA		NS1	RT-PCR Dengue	Deteksi Serotipe
	Hasil	Nilai P/N			
11 *	EQU	2.93	+	-	-
13 *	EQU	2.1	-	-	-
44 *	POS	8.70	-	-	-
48 *	POS	11.47	-	-	-
91 *	EQU	2.47	-	+	+

Keterangan :

* : Sampel convalescences

NEG : Negatif/ tidak mengandung antibodi IgM JE. Jangkauan arti negatif apabila nilai P/N dibawah 2.00

POS : Positif mengandung antibodi IgM JE. Jangkauan arti positif apabila nilai P/N lebih dari 3.00

EQU : *Equivocal*/ ekuivokalitas menunjukkan nilai P/N yang *borderline*. Jangkauan nilai ekuivokal apabila nilai P/N antara 2.00 s.d. 3.00

NS1 : Uji protein non-struktural 1 (NS1) sebagai metode *presumptive* untuk verifikasi infeksi dengue akut

RT-PCR Dengue : *Reverse transkriptase*-PCR Dengue merupakan salah satu pengujian molekuler yang mengamplifikasi sekuens gen dengue dan termasuk kedalam salah satu rapid test untuk memverifikasi infeksi dengue fase akut pada spesimen

MAC ELISA : Metode serologi dengan memanfaatkan ikatan antigen-antibodi dan enzim untuk mendeterminasi adanya presensi antibodi spesifik viral infeksius pada spesimen dengan mengamati nilai serapan sinar ultraviolet-visual pada uji kolorimetri.

Nilai P/N : Nilai nisbah hasil bagi nilai rerata OD (*Optical Density*) spesimen yang direaksikan dengan antigen viral (P) dengan rerata OD serum kontrol negatif yang direaksikan dengan antigen viral (N)

Deteksi keberadaan IgM viral spesifik non-dengue juga diperlukan sebagai data serologi. Deteksi kolorimetri dilakukan dengan sinar ultraviolet-visual selama ELISA untuk memperoleh absorbansinya. Nilai P/N pada absorbansi memiliki jangkauan untuk infeksi yang negatif, ekuivokal dan positif. Dalam penelitian ini nilai P/N negatif adalah kurang dari 2.00, ekuivokal antara 2.00-3.00, dan positif jika nilai P/N lebih dari 3.00.

Nilai ini juga merupakan fungsi dari aviditas antibodi yang menyatakan ikatan antara antigen dan antibodi. Besar atau kecilnya nilai P/N tidak menunjukkan dan tidak berkorelasi dengan jumlah titer antibodi di dalam suatu spesimen. Apabila nilai P/N tinggi tidak berarti titer antibodi dalam suatu spesimen juga tinggi. Konfirmasi dan penghitungan titer antibodi IgM spesifik Japanese Encephalitis hanya dapat dilakukan dengan metode *Plaque Reduction and Neutralization Test* (PRNT).

Hasil pengujian antibodi ekuivokal terhadap infeksi virus dilakukan dengan IgM ELISA berdasarkan sifatnya sebagai indikator infeksi akut. Setelah 2 sampai 3 bulan pasca infeksi virus, tingkat IgM akan menurun menuju di bawah jangkauan positif. Berdasarkan Murray, *et al.* (2013), Persistensi (keberadaan) antibodi IgM diindikasikan selama 1- 8 tahun setelah infeksi sebelumnya. Pada tahun pertama pasca infeksi kenaikan level IgM merupakan indikasi respon antibodi berulang. Pada *Flavivirus* lain seperti virus hepatitis C, IgM merupakan indikator replikasi virus. Oleh karena itu ekuivokalitas IgM adalah indikator bahwa pasien pernah

mengalami infeksi sebelumnya dalam kurun waktu belum lama atau pasien berada pada akhir fase viremia dan antibodi IgM baru terbentuk.

Sampel nomor 91 memiliki hasil negatif deteksi RT-PCR *Flavivirus* dan MAC ELISA memiliki hasil ekuivokal 2.47 (Tabel 2). Hasil positif terdapat pada data sekunder yakni dengan RT-PCR dengue. Hal ini mengindikasikan kemungkinan besar sampel tersebut terinfeksi virus dengue. Meskipun demikian, sampel yang positif NS1 dan RT-PCR dengue namun negatif pada pengujian RT-PCR *Flavivirus* dan MAC ELISA harus diuji ulang. Hal ini dikarenakan pengujian laboratorium untuk data primer dan sekunder dilakukan oleh individu yang berbeda dan banyak faktor yang mempengaruhi kualitas pengujian. Boleh jadi terdapat kesalahan pada salah satunya, misalnya terjadi kontaminasi saat melakukan salah satu jenis pengujian. Untuk waktu mendatang, konfirmasi yang akan dilakukan pada sampel tersebut yakni berupa pengujian ulang dengan metode RT-PCR dengue untuk mendapatkan hasil valid apakah sampel terinfeksi dengue atau tidak.

Konfirmasi keberadaan JE IgM pada sampel terduga terinfeksi Japanese Encephalitis yang merupakan infeksi arboviral non-dengue dilakukan melalui uji *seroconversion*. *Seroconversion* merupakan istilah yang digunakan untuk menjelaskan terjadinya pembentukan antibodi yang dapat dideteksi (*detectable*) yang merupakan respon dari adanya agen infeksius (antigen- arboviral) yang memasuki tubuh individu. Uji *seroconversion* dilakukan dengan metode MAC ELISA dengan melihat

dan membandingkan nilai absorbansi (P/N) pada sampel akut dan *convalesences* dari nomor yang sama. Apabila nilai P/N sampel *convalesences* lebih tinggi dibandingkan sampel akut maka dapat diprediksi tidak terjadi kesalahan selama pengujian. Hasil uji seraconversion terlihat dari Tabel 2.A dimana hasil menunjukkan bahwa sampel akut memiliki nilai P/N lebih rendah dibandingkan dengan nilai sampel *convalesences*. Hal ini karena pada sampel akut antibodi yang terbentuk masih sedikit (titer antibodi diperkirakan rendah) sehingga nilai absorbansi yang ditunjukkan melalui nilai P/N juga kecil.

Tabel 2.A. Hasil uji *Seraconversion* dengan MAC ELISA

Nomor sampel	Nilai P/N	
	Akut	<i>Convalesences</i>
11	1.26	2.93
13	1.00	2.08
38	1.33	6.30
44	4.14	8.70
48	6.81	11.47
91	1.18	2.47
101	2.15	3.57

Keterangan :

Nilai P/N : Nilai nisbah hasil bagi nilai rerata OD (*Optical Density*) spesimen yang direaksikan dengan antigen viral (P) dengan rerata OD serum kontrol negatif yang direaksikan dengan antigen viral (N)

Berdasarkan Tabel 2.A, hasil uji pada sampel nomor 11 dan 13 memiliki nilai P/N sebesar 2.93 dan 2.1 untuk sampel *convalesences*. Nilai P/N untuk sampel akut masing-masing 1.26 dan 1.00. Sampel *convalesence* memiliki nilai yang ekuivokal, sementara sampel akutnya

bernilai negatif. Hal ini mengindikasikan kedua sampel berada pada akhir masa akut dan awal masa *convalescences*.

Sampel nomor 38 memiliki nilai P/N yang positif yakni 6.30, dan nilai P/N sampel akutnya adalah sebesar 1.33. Meskipun nilai P/N sampel *convalescences* positif, hasil uji serologi pada sampel nomor 38 dianggap negatif (*false positive*) karena nilai OD antara serum yang direaksikan dengan viral antigen dan serum yang direaksikan dengan normal antigen memiliki nilai yang hampir sama (Lampiran 3.C). Hal ini diduga terjadi karena ada suatu substrat atau zat yang berikatan dengan *conjugate* dan bereaksi dengan TMB sehingga nampak seperti positif. Perbedaan nilai P/N yang jauh antara sampel akut dan *convalescence*-nya juga merupakan indikasi sampel nomor 38 bukan terinfeksi oleh Japanese Encephalitis. Selain itu faktor yang dapat juga terjadi adalah adanya kesalahan *pipetting* sewaktu melakukan pengujian dengan metode MAC ELISA.

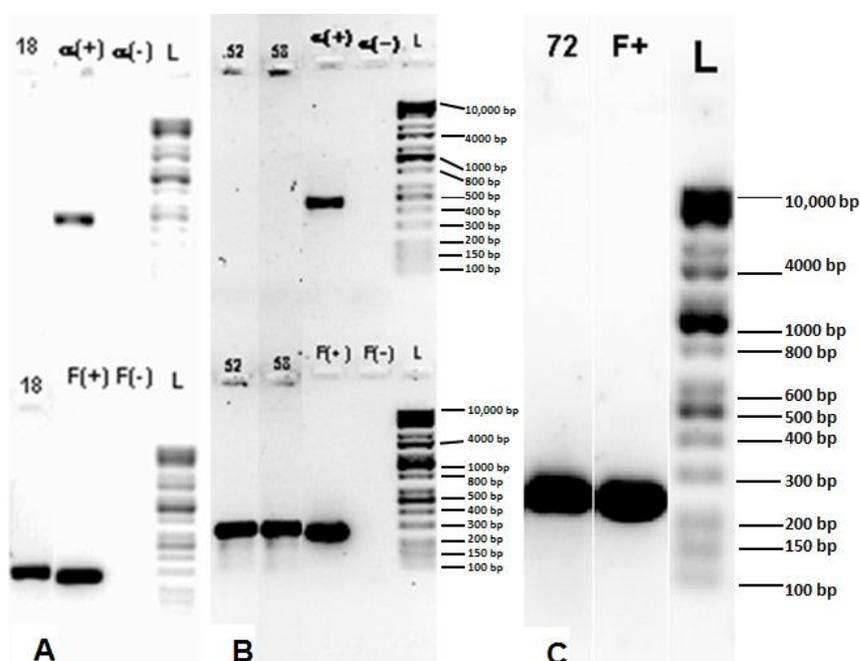
Uji laboratorium untuk deteksi arboviral diperlukan untuk mendukung keakuratan diagnosis. Menurut Martin, *et al.* (2000), untuk infeksi Japanese encephalitis lebih tepat jika diagnosa dilakukan dengan menggunakan JE-IgM capture ELISA (MAC ELISA) dari CSF atau serumnya darahnya. Hal ini karena fase viremia Japanese Encephalitis sangat rendah dan singkat. IgM spesifik JE virus dapat terdeteksi dari spesimen kurang lebih 7-9 hari pasca onset.

Keadaan lingkungan dan populasi di Denpasar sangat mendukung penyebaran Japanese Encephalitis. Padatnya penduduk Denpasar oleh penduduk asli maupun pendatang serta bertambahnya populasi seiring dengan berjalannya waktu menyebabkan penyebaran Japanese Encephalitis dapat diprediksi akan bertambah dan meluas. Hal ini didukung oleh rujukan referensi dimana menurut Ghosh dan Bosu (2009) dan Erlanger, *et al* (2009), penyebaran Japanese Encephalitis maupun arboviral lainnya sangat berkorelasi dengan kepadatan penduduk, ledakan populasi dan perubahan iklim.

Japanese Encephalitis sangat mungkin menjadi infeksi arboviral yang tidak lagi *re-emerging* namun akan menjadi endemik di Indonesia. Adanya curah hujan yang tinggi, temperatur yang hangat, wilayah pertanian dan irigasi serta peternakan babi menjadikan Bali sebagai tempat yang sempurna untuk perkembangbiakan *Culex tritaeniorhynchus* maupun *Aedes* sp. yang berperan sebagai vektor *Arbovirus*. Adanya unggas dan babi yang dilepas-liarkan dan hidup berdampingan dengan manusia menjadikan infeksi arboviral akan lebih cepat menyebar. Hal ini dikarenakan keduanya adalah inang perbanyak (*amplifier host*) *Arbovirus*.

C. Kelompok 3 : Hasil uji molekuler RT-PCR positif dan uji serologi MAC ELISA negatif pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya, Denpasar nomor 1 s.d. 104

Hasil uji molekuler RT-PCR yang positif dan hasil uji serologi antibodi JE dengan MAC ELISA yang negatif pada sampel terduga infeksi arboviral nomor 1 s.d. 104 terdapat pada sampel nomor 18, 52, 58, dan 72. Keempat sampel tersebut memiliki hasil negatif dengan nilai P/N dibawah 2.00 pada pengujian presensi antibodi IgM Japanese Encephalitis dengan metode MAC ELISA. Hasil uji molekuler yang positif dan uji serologi dengan metode MAC ELISA yang negatif serta data sekunder terdapat pada Gambar 7 dan Tabel 3 berikut :



Gambar 7. Hasil positif pada uji molekuler dengan RT-PCR *Alphavirus* dan *Flavivirus* pada sampel terduga infeksi *Arbovirus* kelompok 3.

Tabel 3. Hasil negatif uji serologi IgM Japanese Encephalitis (JE) dengan metode MAC ELISA dan data sekunder pada sampel terduga infeksi arboviral kelompok 3

No	MAC ELISA		NS1	RT-PCR Dengue	Deteksi Serotipe
	Hasil	Nilai P/N			
18 *	NEG	1.92	+	+	D3
52 *	NEG	1.62	-	+	D3
58 *	NEG	1.35	-	+	D3
72 *	NEG	1.13	-	+	D3

Keterangan :

* : Sampel convalescences

NEG : Negatif mengandung antibodi IgM JE/ tidak terdapat ikatan antibodi dan antigen viral. Jangkauan arti negatif apabila nilai P/N kurang dari 2.00.

POS : Positif mengandung antibodi IgM JE. Jangkauan arti positif apabila nilai P/N lebih dari 3.00

EQU : *Equivocal*/ ekuivokalitas menunjukkan nilai P/N yang *borderline*. Jangkauan nilai ekuivokal apabila nilai P/N antara 2.00 s.d. 3.00

NS1 : Uji protein non-struktural 1 (NS1) sebagai metode *presumptive* untuk verifikasi infeksi dengue akut

RT-PCR Dengue : *Reverse transkriptase*-PCR Dengue merupakan salah satu pengujian molekuler yang mengamplifikasi sekuens gen dengue dan termasuk kedalam salah satu rapid test untuk memverifikasi infeksi dengue fase akut pada spesimen

MAC ELISA : Metode serologi dengan memanfaatkan ikatan antigen-antibodi dan enzim untuk mendeterminasi adanya presensi antibodi spesifik viral infeksius pada spesimen dengan mengamati nilai serapan sinar ultraviolet-visual pada uji kolorimetri.

Nilai P/N : Nilai nisbah hasil bagi nilai rerata OD (*Optical Density*) spesimen yang direaksikan dengan antigen viral (P) dengan rerata OD serum kontrol negatif yang direaksikan dengan antigen viral (N)

Berdasarkan gambar 7 A-C dan Tabel 3, terdapat 4 sampel yang termasuk kedalam kategori 3. Hasil positif *Flavivirus* menurut uji RT-PCR terdapat pada sampel nomor 18, 52, 58, dan 72 dengan panjang pita *amplicon* masing-masing adalah terdapat diantara 200 s.d. 300 bp.

Sampel-sampel tersebut memiliki nilai P/N dibawah 2.00 yang masing-masing untuk sampel nomor 18, 52, 58, dan 72 nilainya adalah 1.92, 1.62, 1.35, dan 1.13. Hal ini memiliki arti antibodi dalam spesimen berikatan secara lemah dengan antigen viral Japanese Encephalitis yang diberikan selama prosedur MAC ELISA. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh sampel masih dalam fase awal convalescence atau sampel berada dalam fase akhir akut sehingga antibodi yang terbentuk masih rendah.

Data sekunder pada Tabel 3 menunjukkan bahwa sampel nomor 52, 58, dan 72 negatif pada pengujian NS1 namun positif pada pengujian RT-PCR dengue. Seperti penjelasan sebelumnya, hal ini membuktikan bahwa RT-PCR dengue lebih sensitif terhadap pengujian dan verifikasi infeksi dengue pada suatu spesimen dibandingkan dengan uji NS1.

Hasil analisa berdasarkan pengujian molekuler dan serologi yang didukung oleh data sekunder mengindikasikan bahwa sampel terduga infeksi arboviral kategori 3 terinfeksi oleh virus Dengue. Semua sampel yang terdeteksi terinfeksi virus dengue terbukti terinfeksi dengue-3 (DENV-3) berdasarkan uji deteksi serotipe dengue yang dilakukan oleh staf ahli Universitas Warmadewa dan yang dilakukan oleh staf ahli Lembaga Eijkman bagian *sequencing service*. Meskipun tidak mendapatkan laporan khusus secara tertulis mengenai gejala klinis spesifik yang muncul pada setiap pasien, berdasarkan literatur serotipe dengue dibedakan berdasarkan manifestasi klinis yang muncul.

Perbedaan manifestasi klinis dari setiap serotipe tersebut berkaitan dengan pendarahan (hemorragik) dan dengue shock syndrome. Gejala spesifik infeksi DENV- 3 menimbulkan manifestasi gastrointestinal seperti nausea, nyeri abdomen, muntah dan diare. Selain itu myalgia juga disebabkan oleh DENV-3.

Semua sampel positif dengue terinfeksi oleh DENV-3, namun tidak menutup kemungkinan dalam satu individu dapat terinfeksi oleh lebih dari satu serotipe secara bersamaan. Studi sebelumnya membuktikan adanya infeksi bersamaan antara serotipe dengue DENV-2 dan DENV-3 pada satu individu (Lardo. *et al.* 2016). Infeksi bersamaan ini akan menimbulkan manifestasi klinis berupa nyeri perut berkepanjangan dan muntah-muntah. Selain itu manifestasi klinis berupa disfungsi hati ringan sampai menengah yang ditandai dengan peningkatan konsentrasi enzim alanin transferase dan aspartat aminotransferase dalam serum darah. Manifestasi klinis lain dari infeksi bersamaan ini ditimbulkan pada paru- paru berupa efusi pleura, batuk- batuk dan hemoptysis.

Kemampuan penularan dengue secara beberapa serotipe sekaligus merupakan implikasi dari adaptasi *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* sebagai vektornya yang dapat bertelur di lingkungan yang berbeda dengan sebelumnya. Kewaspadaan dan kesadaran akan penularan dengue wajib ditingkatkan baik pada masyarakat maupun pada instansi pemerintahan terkait kesehatan masyarakat sehingga penyebaran dengue dan *Arbovirus* lain dapat dikontrol kemudian diberantas.

Soo *et al.* (2016) menyatakan bahwa infeksi sekunder virus dengue lebih parah dibandingkan infeksi primer. Penguatan antibodi terjadi pada infeksi sekunder sehingga menimbulkan respon imun yang lebih kuat. Infeksi konkuren (bersamaan) akan lebih parah dibandingkan infeksi sekunder akibat peningkatan level viremia yang menginduksi peningkatan sitotoksistas oleh leukosit serta peningkatan konsentrasi sitokin. Infeksi konkuren dengan dua serotipe tidak memiliki interval waktu antara infeksi primer dan sekunder. Dalam kasus ini, kedua infeksi baik primer ataupun sekunder memiliki keparahan yang sama. Secara umum infeksi sekunder dilakukan oleh virus dengue serotipe DENV-2 di kawasan Asia Tenggara.

Virus Dengue serotype 3 (DENV-3) yang menginfeksi semua spesimen positif dengue berasal dari Asia Tenggara dan menurut literatur menimbulkan infeksi yang lebih laten dan tersembunyi dibandingkan DENV-1 dan DENV-2. Yung *et al* (2015) menyatakan bahwa infeksi lebih laten diindikasikan dari median jumlah trombosit pada infeksi DENV-1, DENV-2 dan DENV-3 masing- masing adalah 128, 141.5, dan 114 dalam 10⁹/ L. Infeksi DENV-3 juga menimbulkan jumlah leukosit yang lebih rendah dibandingkan serotipe yang lain.

D. Kelompok 4 : Hasil uji molekuler RT-PCR negatif dan uji serologi MAC ELISA negatif pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya, Denpasar nomor 1 s.d. 104

Sampel-sampel yang termasuk ke dalam tiga kelompok 1 s.d. 3 diatas merupakan sampel positif terinfeksi *Flavivirus*. Jumlah sampel yang terinfeksi *Flavivirus* sebanyak 24 sampel antara lain adalah sampel nomor 8, 9, 11, 13, 14, 18, 20, 26, 34, 35, 36, 42, 43, 44, 48, 52, 56, 58, 71, 72, 73, 91, 92, dan 101. Sebanyak 20 sampel diantaranya positif terinfeksi virus dengue. Sampel yang terinfeksi virus dengue adalah sampel nomor 8, 9, 14, 18, 20, 26, 34, 35, 36, 42, 43, 52, 56, 58, 71, 72, 73, 91, 92, dan 101. Sebanyak 4 sampel lainnya yakni sampel nomor 11, 13, 44, dan 48 terinfeksi virus Japanese Encephalitis.

Persentase sampel positif terinfeksi *Flavivirus* berdasarkan uji molekuler RT-PCR genus virus dan uji serologi keberadaan antibodi Japanese Encephalitis dengan MAC-ELISA adalah sebanyak 23.07% ($24/104 \times 100\%$).

Kelompok 4 merupakan kategori untuk kumpulan sampel yang memiliki hasil negatif untuk kedua pengujian, baik pengujian molekuler RT-PCR maupun pengujian presensi antibodi IgM dengan MAC ELISA. Sampel-sampel yang termasuk kedalam kategori 4 adalah sampel nomor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 39, 40, 41, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 57, 59,

60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, dan 104.

Sebanyak 70 sampel tersebut merupakan sampel yang negatif terinfeksi *Arbovirus* berdasarkan uji molekuler RT-PCR dan uji serologi JE IgM dengan MAC ELISA. Persentase sampel negatif dari kedua hasil pengujian adalah sebanyak 76.9%. Hasil uji menyatakan bahwa sampel yang negatif tidak memenuhi syarat sebagai sampel positif karena tidak terdapat *amplicon* yang terbentuk melalui metode RT-PCR atau nilai P/N pada pengujian ELISA menunjukkan nilai dibawah 2.0.

Sampel yang terduga infeksi arboviral bisa jadi ternyata terinfeksi oleh patogen lain non-arboviral ataupun patogen non-viral. Hal ini dikarenakan infeksi arboviral tidak selalu menunjukkan gejala yang spesifik. Hal ini didukung oleh Sutherland *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa secara umum, gejala yang ditimbulkan oleh infeksi *arboviral* biasanya non-spesifik yang dapat mengarahkan pada kesalahan diagnosis. Kemungkinan lainnya adalah adanya fase viremia yang singkat pada infeksi arboviral yang rata-rata hanya berkisar 7 hari menyebabkan gejala infeksi tidak terlihat jelas karena pasien biasanya baru akan pergi mengunjungi dokter setelah lebih dari 3 s.d. 4 hari mengalami demam (*febrille illness*).

Kemungkinan ketiga adalah terdapatnya beberapa gejala infeksi yang disebabkan oleh patogen lainnya yang mirip dengan infeksi

arboviral. Infeksi arboviral seperti Dengue merupakan infeksi yang endemik di Indonesia khususnya di Bali, setiap pasien atau individu dengan gejala klinis *febrille illness*, disertai mual, muntah, nyeri sendi dan otot banyak diasumsikan terinfeksi Dengue (*Dengue suspect*).

Sebanyak 76,9% kasus negatif dari keseluruhan sampel terduga terinfeksi arboviral membutuhkan pengujian khusus lainnya untuk memverifikasi jenis patogen yang menginfeksi spesimen tersebut. Hasil pengujian yang negatif pada 76.97% spesimen koleksi terduga infeksi arboviral merupakan bukti adanya indikasi keberadaan patogen lain selain *Arbovirus* yang menginfeksi spesimen tersebut. Patogen lain yang mungkin berpotensi menginfeksi spesimen bisa jadi merupakan virus golongan non arboviral seperti Virus Herpes, Rabies, Influenza, dan lain sebagainya yang kemungkinan masih banyak terdistribusi di Kepulauan Bali. Kemungkinan infeksi lain disebabkan juga oleh patogen yang non-viral seperti infeksi bakteri yang memiliki gejala klinis menunjukkan *febrille illness*.

Kerancuan dalam membedakan infeksi Dengue dan Japanese Encephalitis juga merupakan hal yang juga biasa terjadi. Hal ini disebabkan oleh gejala keduanya yang hampir mirip. Infeksi Japanese Encephalitis juga sulit dibedakan dengan dengue karena jarang memperlihatkan gejala yang khusus dan spesifik. Gejala umum penyakit Japanese Encephalitis diantaranya adalah demam, sakit kepala, sakit punggung, pegal-pegal, dan *anorexia*. Saxena *et al* (2013) juga

menambahkan bahwa Japanese encephalitis menyebabkan kerusakan neurologis permanen dan berkelanjutan namun tahap awal paparan/ tahap awal infeksi Japanese Encephalitis sering kali *asimptomatik*, sehingga gejala pada penderita terabaikan.

Halstead dan Jocabson (2003) menyatakan bahwa Individu hanya akan diduga terinfeksi JE apabila terdapat bukti adanya infeksi neurologis (seperti meningitis, encephalitis, dan *flaccid acute paralysis*). Tingkah laku abnormal hingga sakit mental juga dapat terlihat pada anak-anak dan dewasa yang terinfeksi Japanese Encephalitis. Seseorang juga hanya akan terduga terinfeksi JE apabila pernah mengunjungi wilayah endemik JE di Asia tenggara atau wilayah pasifik barat. Gejala demam tinggi dan menggigil pada Japanese Encephalitis sering disalah artikan sebagai infeksi Dengue.

Pasien dengan Japanese Encephalitis akan terlihat dengan gejala demam yang disertai menggigil. Tahap akut hingga subakut terjadi selama 3-4 hari ditandai dengan demam tinggi, tremor, hipertonia, *cogwheel rigidity* dan pada beberapa kasus terdapat paralisis otot respiratori. Japanese Encephalitis biasa terjadi pada anak-anak dibawah umur 15 tahun namun tidak menutupi infeksi pada orang dewasa (Unni, *et al.* 2011). Hal ini dibuktikan dari sampel nomor 11, 13, dan 44 yang masing-masing berusia 11 tahun, 4 tahun dan 3 tahun, dan sampel nomor 44 yang berusia 20 tahun (Lampiran 1).

Berdasarkan data, dari total uji tidak terdapat infeksi *Alphavirus*. Hal ini merupakan suatu fenomena bahwa pada sampel-sampel yang diambil kebetulan tidak ada pasien yang terinfeksi *Alphavirus* yang biasanya adalah virus Chikungunya. Meskipun demikian, pada penduduk Indonesia khususnya di kota Denpasar, Bali tetap terdapat resiko besar terinfeksi chikungunya. Hal ini karena padatnya penduduk Denpasar, tersedianya areal persawahan dan genangan air sebagai sarana perkembangbiakan nyamuk sebagai vektor utama, dan adanya mammalia (Babi) dan primata non-manusia sebagai host amplifier *Arbovirus* yang hidup bersisian dengan manusia.

Berdasarkan Thiberville *et al* (2013), Infeksi chikungunya pada tahap akut dicirikan sebagai demam tinggi, sakit kepala dan mudah lelah. Gejala ini banyak disamakan juga dengan dengue. Sehingga banyak terjadi kesalahan prognosis. Peluang kesalahan dapat terjadi apabila pada pasien tidak terlihat gejala klinis khusus seperti poliartralgia yang merupakan karakteristik utama infeksi chikungunya. Poliartralgia dilaporkan terdapat pada 87 – 98% kasus.

Ruam pada bagian ekstremitas, badan dan wajah terbentuk setelah 5 hari infeksi. Diare, muntah dan mual juga terjadi pada tahap akut infeksi chikungunya. Sementara itu, seperti juga penderita dengue, penderita chikungunya biasanya tidak akan langsung mengunjungi rumah sakit atau puskesmas sesaat setelah mengalami gejala awal seperti demam. Mereka baru akan mengunjungi rumah sakit untuk mendapat pengobatan setelah

3-5 hari mengalami demam sehingga deteksi serologi (CHIK IgM ELISA) menjadi alternatif dalam kasus tersebut.

Menurut Kemenkes RI (2012), upaya pengendalian penyakit seperti dengue, japanese encephalitis dan chikungunya dilakukan melalui program pemantauan, diagnosis dan pencegahan. Program pemantauan, diagnosis dan pencegahan dengue telah berkembang di Indonesia. Berbeda dengan Japanese encephalitis dan Chikungunya yang belum memiliki program pemantauan, diagnosis dan pencegahan tersendiri.

Kedua penyakit tersebut dikhawatirkan akan meningkat karena faktor lingkungan, sanitasi, pola hidup masyarakat dan juga cuaca. Oleh karena itu kemampuan diagnosis, deteksi, dan pemantauan perlu dikembangkan untuk mengendalikan penyebaran penyakit tersebut. Uji molekuler dengan metode RT-PCR dan uji serologi dengan metode MAC ELISA sangat perlu dipertimbangkan untuk dikembangkan di Indonesia yang berguna sebagai alat untuk membantu penegakan diagnosis penyakit terkait infeksi arboviral.

Siklus viremia pada penelitian ini berguna untuk menentukan metode deteksi yang tepat berdasarkan jenis sampel. Pengujian dilakukan dengan mendeteksi virus utuh, komponen viral (asam nukleat) atau respon imun inang terhadap virus tersebut. Untuk fase viremia (<7 hari onset) dapat dilakukan metode RT-PCR, Real Time PCR, ataupun isolasi virus dalam sel kultur untuk mendapatkan komponen viral, maupun virus utuh. Untuk sampel *convalescence*, digunakan metode yang mendeteksi

respon imun terhadap antigen arboviral. MAC ELISA didesain spesifik untuk mendeteksi IgM. IgM akan bertahan beberapa bulan dalam tubuh sebagai marker adanya infeksi setelah fase akut. Selain itu, IgM lebih sedikit mengalami reaksi silang (*cross reaction*) apabila dibandingkan dengan IgG sehingga deteksi IgM sangat berguna dalam penentuan apakah terdapat introduksi viral dalam tubuh individu.

Bantuan dan dukungan pemerintah kepada Rumah Sakit dan institusi riset mutlak dibutuhkan sehingga deteksi *Arbovirus* dengan metode RT-PCR dan NS1 sebagai metode *rapid test* dan MAC ELISA dapat dikembangkan di Indonesia. Metode-metode ini dapat digunakan untuk mendukung keakuratan diagnosis sehingga penanganan yang tepat untuk setiap pasien dapat diberikan. Riset yang berkesinambungan juga penting untuk dilakukan dalam rangka memantau introduksi arboviral baru yang mungkin akan muncul dan mengancam kesehatan penduduk nasional.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat introduksi arboviral baru pada kumpulan sampel terduga infeksi Arboviral RSUD. Wangaya, Denpasar, Bali.
2. Terdapat empat kategori hasil pengujian, yaitu :
 - a. Kategori 1 : Hasil pengujian molekuler RT-PCR positif dan hasil pengujian serologi MAC-ELISA positif. Analisa sampel-sampel yang termasuk kedalam kategori ini adalah terinfeksi virus Dengue (DENV).
 - b. Kategori 2 : Hasil pengujian molekuler RT-PCR negatif dan hasil pengujian serologi MAC-ELISA positif. Analisa sampel-sampel yang termasuk kedalam kategori ini adalah terinfeksi virus Japanese Encephalitis (JEV).
 - c. Kategori 3 : Hasil pengujian molekuler RT-PCR positif dan hasil pengujian serologi MAC ELISA negatif. Analisa sampel-sampel yang termasuk kedalam kategori ini adalah terinfeksi virus Dengue (DENV), dan
 - d. Kategori 4 : Hasil kedua pengujian negatif. Analisa sampel-sampel yang termasuk kedalam kategori ini adalah tidak terinfeksi arboviral.

3. Dari keempat kategori, terdapat 24 sampel (23,07%) yang positif terinfeksi Arboviral menurut hasil deteksi secara molekuler maupun serologikal, sisanya sebesar 76,93% merupakan hasil negatif yang mengindikasikan sampel tidak terinfeksi arboviral.
4. Dari 24 kasus positif, 20 kasus merupakan infeksi virus Dengue dengan semuanya terinfeksi DENV-3 yang merupakan infeksi dengue yang berasal dan endemik di Asia Tenggara, khususnya Indonesia. Empat kasus lainnya merupakan Infeksi Japanese Encephalitis.

B. Implikasi

Implikasi penelitian ini adalah akan diadakan studi berkelanjutan akan pendataan infeksi arboviral di Denpasar, Bali. Penelitian lanjutan merupakan usaha kontinyu dalam membuat data *surveillance* di Denpasar, Bali yang merupakan titik acuan apabila terdapat introduksi arboviral baru di Indonesia. Data hasil keberlanjutan studi diharapkan menjadi acuan bagi pemerintah dan pihak-pihak terkait untuk melihat dan memantau kerentanan masyarakat terhadap infeksi arboviral dan dalam membuat kebijakan pencegahan atau pengendalian infeksi arboviral. Penelitian ini memberikan bukti bahwa dalam mendeteksi penyakit arboviral yang gejala klinisnya seringkali tidak khas, teknik deteksi viral dengan *rapid test* molekuler (RT-PCR dan NS1), dan uji presensi antibodi spesifik secara serologikal amatlah penting dilakukan. Hal ini karena kedua bentuk

pengujian tersebut merupakan alat bantu dalam penegakkan keakuratan diagnosa. Dengan adanya keterlanjutan dari studi ini dimasa yang akan datang diharapkan epidemiologi penyakit akibat infeksi arboviral di Indonesia khususnya Denpasar, Bali dapat berada dibawah pengawasan tenaga medis dan kementerian kesehatan Indonesia (Kemenkes RI).

C. Saran

Dari penelitian ini, penulis menyarankan agar :

1. Studi epidemiologi penyakit infeksi arboviral di Bali tetap dilanjutkan secara berkesinambungan sebagai usaha memantau penyebaran infeksi viral dan membuat data *surveillance* referensi infeksi arboviral di pulau Bali.
2. Pengambilan data hendaknya lebih menyeluruh di Denpasar, Bali sehingga sampel lebih banyak dan lebih beragam. Sampel yang lebih banyak dan tidak hanya dari satu Rumah Sakit diharapkan dapat membantu menaikkan probabilitas didapatkannya introduksi arboviral baru ke Indonesia.
3. Adanya kerjasama yang baik antara peneliti dan pihak pemerintah dari kementerian kesehatan di Denpasar, Bali. Hal ini agar terjadi kesinambungan antara hasil riset dengan peraturan pemerintah.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman. & S.Pillai. 2015. *Cellular and Molecular Immunology 8th ed.* Philadelphia : Elsevier Saunder.
- Amin N, Pupo M, Aguilar A, Vazquez S, Caballero Y, Ochoa R, Guzman MG, Acosta A. 2016. Recognition of Multiple Antigen Peptide Containing Sequence from Mimotope of the Dengue Type 3 Virus NS4B Protein by Human Antibodies. *Asian Pacific J of Trop Med* 9 (2): 130- 133.
- Araujo JMG, Gomes GM, Faria NRC, Araujo ESM, Filippis AMB, Santos FB, Schatzmayr HG, Nogueira RMR. 2012. Evaluation of Generic RT-Nested-PCR for Detection of Flaviviruses in Suspected Fatal Cases of Dengue Infection, Rio de Janeiro, Brazil. *J of Virological Methods* 186: 167- 170.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2012. *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan Penyakit Tidak Menular.* Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Berlioz- Arthaud A, Marfel M, Durand AM, Ogawa T. 2005. Evaluation of a New Anti Dengue Virus Igm Particle Agglutination Kit in ihe Context of Pacific Islands. *Dengue Bulletin.* 29: 1- 9.
- Caballero- Anthony M, Cook ADB, Amul GGH, Sharma A. 2015. *Health Governence and Dengue in South East Asia.* Singapore : Center for Non Traditional Security Studies.
- Caron M, Grard G, Paupy C, Mombo IM, Nso BBB, Kassa FRK, Nkoghe D, Leroy EM. 2013. First Evidence of Simultaneous Circulation of Three Different Dengue Virus Serotype in Africa. *J PloS One* 8 (10): e78030.
- Carter, John B. Saunders, Venetia. A. 2007. *Virology Principles and Application.* John England : Wiley & Sons Ltd.
- Dash AP, Bhatia R, Sunyoto T, Mourya DT. 2013. Review Article: Emerging and Reemerging Arboviral Diseases in South East Asia. *J Vector Bourne Diseases.* 50: 77- 84.
- Dash, M., I.Mohany & S. Pahi. 2011. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus : Do We Really Need It ?. *Indian Journal of Medical Science.* 65(3) : 83-91

- Depaquit, J., Grandadam M., Fouque F., 2010. Arthropod-Borne Viruses transmitted by Phlebotomine Sandflies in Europe : A Review. *Euro surveillance*. 15(10).
- Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, Meller S, Kristiansen G. 2013. Improved PCR Performance Using Template DNA from Formalin- Fixed and Parafin- Embedded Tissues by Overcoming PCR Inhibition. *J PloS One* 8 (10): e77771.
- Erlanger, T.R., S.Weisser, J. Keiser, J. Utzinger & K. Weidenmeyer. 2009. Past, Present, and Future of Japanese Encephalitis. *Emerging Infectious Disease*. 15 (1) : 1-7.
- Ernst T, McCarthy S, Chindlow G, Luang- Suarkia D, Holmes EC, Smith DW, Imrie A. 2015. Emergence of a New Lineage of Dengue Virus Type 2 Identified in Travellers Entering Western Australia from Indonesia 2010- 2012. *PLOS One Neglected Tropical Diseases*. 9 (1): 1- 15.
- Ghosh, D. & A. Bosu. 2009. Japanese Encephalitis- A Pathological and Clinical Perspective. *PloS Neglected Tropical Disease*. 3(9) : 1-7.
- Goodman, C.H., B.J Rusella, J.O. Veleza, *et al.* 2014. Development of an Algorithm for Production of Inactivated Arbovirus Antigens in Cell Culture. *Journal of Virological Methods*. 208 : 66-78
- Guder, W.G. *et al.* 2002. *Use of Anticoagulan In Diagnostic Laboratory Investigations & Stability of Blood, Plasma, and Serum Samples*. WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2. Geneva, Switzerland. WHO-World Health Organization.
- Gupta, N. & P.V.L. Rao. 2011. Transcriptomic Profile of Host Response in Japanese Encephalitis Virus Infection. *Virology Journal*. 8 (1) : 92.
- Halsey ES, Marks MA, Gotuzzo E, Fiestas V, Suarez L, Vargas J, Aguayo N, Madrid C, Vimos C, Kochel TJ, Laguna- Torres A. 2012. *J PloS One*. 6 (5): e6138.
- Halstead, S. & J. Jacobson. 2003. Japanese Encephalitis. *Advances in Viral Research*. 61 : 103-138.
- Hermann LL, Thaisomboonsuk B, Poolpanichupatham Y, Jarman RG, Kalayanarooj S, Nisalak A, Yoon IK, Fernandez S. 2014. Evaluation of a Dengue NS1 Antigen Detection Assay Sensitivity and Specificity for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection. *J PloS One*. 8 (10): e3193.

- Hickmann CJ, Hyde TB, Sowers SB, Mercader S, Mc Grew M, Williams MJ, Beeler JA, Audet S, Kiehl B, Nandy R, Tamin A, Bellini WJ. 2011. Laboratory Characterization Of Measles Virus Infection In Previously Vaccinated And Unvaccinated Individuals. *J Infect Diseases* 204: 549- 558.
- Hills SJ, Griggs AC, Fischer M. 2010. Japanese Encephalitis in travellers from non endemic countries 1973- 2008. *American J of Trop Med and Hygiene*. 82(5): 930- 936.
- Howard CR, Fletcher NF. 2012. Review Article: Emerging virus diseases: can we ever expect the unexpected?. *Emerging Microbes and Infections*. 1(46): 1-11.
- Huhtamo E, Hasu E, Uzcategui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, Vapalahti O, Piiparinen H. 2010. Early diagnosis of dengue in travellers: Comparasion of a novel real- time PCR, NS 1 antigen detection and serology. *J of Clinical Virology*. 47: 49-53.
- Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, Vazquez S, Cartoizian E, Pelegrino JL, Artsob H, Guzman MG, Olliaro P, Zwang J, Guillern M, Kliks S, Halstead S, Peeling RW, Margolis HS. 2014. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS 1 antigen and antidengue virus IgM antibody. *J PloS One*. 9 (11): e113411.
- Jose, Joyce., Snyder, Jonathan E., *et al*. 2009. A Structural and Functional Perspective of Alphavirus Replication and Assembly. *Future Microbiol*. 9(4): 837-856.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI). 2012. Profil *Kesehatan Indonesia Tahun 2011*. Kemenkes RI 2012 : 492 hlm.
- Lardo S, Utami Y, Yohan B, Tarigan SMMU, Santoso WD, Nainggolan L, Sasmono RT. 2016. Concurrent infections of dengue viruses serotype 2 and 3 in patient with severe dengue from Jakarta, Indonesia. *Asian Pacific J of Trop Med*. 9 (2): 134- 140.
- Lin HE, Tsai WY, Liu IJ, Li PC, Liao MY, Tsai JJ, Wu YC, Lai CY, Lu CH, Huang JH, Chang GJ, Wu HC, Wang WK. 2012. Analysis of epitopes on dengue virus envelope protein recognized by monoclonal antibodies and polyclonal human sera by a high throughput assay. *J PloS One*. 6 (1): e1447.

- Litzba N, Klade CS, Lederer S, Niedrig M. 2010. Evaluation of serological test systems assessing the immune response to Japanese Encephalitis vaccination. *J Plos One*. 4 (11): e883.
- Liu Y, Zhou J, Yu Z, Fang D, Fu C, Zhu X, He Z, Yan H, Jiang L. 2014. Tetravalent recombinant dengue virus like particles as potential vaccine candidates: immunological properties. *BMC Microbiology*. 14 (223): 1-13.
- Lum, F.M. & L.F.P. Ng. 2015. Cellular and Molecular Mechanism of Chikungunya Pathogenesis. *Antiviral Research*. 120 : 165- 174.
- Mardekian, S.K. & A.L. Roberts. 2015. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed Research International*: 1-8
- Martin, DA., Muth, DA., Brown,T., Karabatsos, N., dan Roehrig, JT. 2000. Standardization of Immunoglobulin M capture enzyme linked immunosorbent assays (MAC-ELISA) for routine diagnosis of arboviral infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 : 1823-1826.
- Moon HJ, Park JE, Yoon H, Cruz DJM, Kim CJ, Shin HJ. 2010. Development of novel recombinant hemagglutinin neuramidase elisa (rHN- ELISA) for evaluation of humoral immunity in chicken vaccinated against Newcastle disease virus (NDV). *J of Animal and Veterinary Advances*. 9 (23): 2932- 2939.
- Moreli ML, Costa VG. 2013. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of Arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. *Virology Discovery*. 1(1): 1-8.
- Murray KO, Garcia MN, Yan C, Gorchakov R. 2013. Persistence of detectable of immunoglobulin M antibodies up to 8 years after infection with west Nile virus. *American J Trop Med Hygiene*. 89 (5): 996- 1000.
- Nakamura N, Arima Y, Shimada T, Matsui T, Tada Y, Okabe N. 2012. Incidence of dengue virus infection among Japanese travellers 2006 to 2010. *WPSAR*. 3 (2): 1-7.
- Namekar M, Ellis EM, O'Connell M, Elm J, Gurary A, Park SY, Imrie A, Nerurkar VR. 2013. Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M capture enzyme- linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue virus infection. *J of Clinical Microbiology*. 51(9): 3102- 3016.

- Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, Sall AA, Niedrig M. 2013. Development of one step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of Flavivirus. *Virology Journal*. 10 (58): 1-11.
- Pavli A, Maltezou HC. 2015. Travel- acquired Japanese encephalitis and vaccination considerations. *J of Infection in Developing Countries*. 9(9): 917- 924.
- Pfeffer M., &Dobler G. 2010. Review: Emergence of zoonotic Arboviruses by animal trade and migration. *Parasites and Vectors*. 3(35): 1- 15.
- Playfair, J & Chain, B. 2013. *Immunology at a Glance 10th ed*. Wiley Blackwell, West Sussex: 120hlm.
- Rosenberg R, Johansson MA, Powers AM, Miller BR, 2013. Search strategy has influenced the discovery rate of human viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110: 13961–13964.
- Rosenberg, Ronald, Lederman, Jeremy P., Myint, Khin Saw Aye, *et al.* Isolation of Zika Virus From Febrile Patients Indonesia. DOI <http://dx.doi.org/10.3201/eid2205.151915>
- Rosenberg, Ronald. March 2015. Detecting the Emergence of Novel, Zoonotic Viruses Pathogenic to Human. *Cell Mol Life Sci*. 72(6) : 1115-1125. Doi : 10.1007/s00018-014-1785-y.
- Rougeron, V., I.Sam., Caron, D. Nkoghe, E.Leroy & P. Roques. 2015. Chikungunya, a Paradigm of Neglected Tropical Disease that Emerged to be a New Health Global Risk. *Journal of Clinical Virology*. 64 : 144-152.
- Saxena, S.K., S. Tiwari, R. Saxena, A.Marthur & M.P.N. Nair. 2013. Japanese Encephalitis virus : the Complex Biology of an Emerging Pathogen. *InTech*: 162- 180.
- Schuh, A.J., H.Guzman, R.B. Tesh & A.D.T. Barrett. 2013. Genetic diversity of Japanese Encephalitis Virus Isoates Obtained from Indonesian Archipelago Between 1974-1987. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 3 (7) : 479-488.
- Schwartz, O. & M.L. Albert. 2010. Biology and Pathogenesis of Chikungunya Virus. *Nature Reviews. Microbiology*. 8(7) : 491-500.
- Sendow. I & S. Bahri. Perkembangan Japanese Encephalitis di Indonesia. *Wartazoa*. 15(3) : 111-118.

- Siregar AR, Wibawa T, Wijayanti N. 2011. Early detection and serotyping of dengue virus by using reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT- PCR) 2 Primers. *Indonesian J of Biotechnol.* 16(2): 71-75.
- Soo KM, Khalid B, Ching SM, Chee HY. 2016. Meta-analysis of dengue severity during infection by different dengue virus serotypes in primary and secondary infections. *J Plos One*: 10 (1371): e0154760.
- Stellwagen NC, Holmes DL. Electrophoresis. 1990; 11:649–652. [PubMed: 2289466].
- Sutherland L, Cash AA, Huang Y-J S, Sang RC, Malhotra I, Moormann AM, King CL, Weaver SC, King CH, La Beaud AD. 2011. Short Report: Serologic evidence of arboviral infections among humans in Kenya. *Am J of Trop Med Hyg.* 85(1): 158- 161.
- Thiberville, S.D., N.Moyen., *et al.* 2013. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis, and therapy. *Antiviral Research.* 99(3) : 345-370.
- Tiwari, S., S.V.P. Chitti, *et al.* 2012. Japanese Encephalitis Virus : an Emerging Pathogen. *American Journal of Virology.* 1(1) : 1-8
- Unni, S.K., D. Ruzek., C. Chhatbar., R.Mishra., *et al.* 2011. Japanese Encephalitis Virus : From genome to infectome. *Microbes and Infection.* 13(4) : 312-321.
- Weaver, S.C. & N.L. Forrester. 2015. Chikungunya : Evolutionary history and Recent Epidemic Spread. *Antiviral Research.* 120 : 32-39.
- Weaver, S.C. & W.K. Reisen. 2010. Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Research.* 85(2) : 1-36.
- Weaver, S.C., J.E. Osario, *et al.* 2012. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Review of Vaccine.* 11(9) : 1087-1101.
- Whelan P, Nguyen H, Hajkowicz K, Davis J, Smith D, Pyke A, Krause V, Markey P. 2012. Evidence in Australia for a case airport dengue. *Plos One Neglected Infectious Disease.* 6 (9): 1-4.
- Wölfel S, Vollmar P, Poluda D, Zange S, Antwerpen MH, Löscher T, Dobler G. 2015. Complete genome sequence of a chikungunya virus imported from Bali to Germany. *Genome Announcement ASM.* 3(2): 1.

- Yoshikawa MJ, Kusriastuti R. 2013. Surge of dengue virus infection and chikungunya fever in Bali 2010: The burden of mosquito borne infection diseases as tourist destination. *Trop Med Health*. 41(2): 67 – 78.
- Young HS, Dirzo R, Helgen KM, McCauley DJ, Biletter SA, Kosoy MY, Osikowicz LM, Salkeld DJ, Young TP, Dittmar K. 2014. Declines in large wildlife increase landscape- level prevalence of rodent- borne disease in Africa. *PNAS Journal*. 10 (1043): 1-6.
- Yu Z, Kastenmueller G, Belcredi P, Moeller G, Prehn C, Mendes J, Wahl S, Romisch- Margl W, Ceglarek U, Polovnikov A, Dahmen N, Prokisch H, Xie L, Li Y, Wichmann HE, Peters A, Kronenberg F, Suhre K, Adamski J, Illig T, Sattler RW. 2011. Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *J Plos One*. 6 (7): e21230.
- Yung CF, Lee KS, Thein TL, Tan LK, Gan VC, Wong JGX, Lye DC, Ng LC, Leo YS. 2015. Dengue serotype specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe diseases in adults, Singapore. *Am J Trop Med Hyg*. 92 (5): 999- 1005.
- Zaitseva E, Yang S-T, Melikov K, Pourmal S, Chernomordik L. 2010. Dengue virus ensure its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PloS One*. 6 (10): 1- 14.

LAMPIRAN

Lampiran I. Tabulasi Data Hasil Uji Molekuler RT-PCR genus *Alphavirus* dan *Flavivirus*, Hasil Uji Serologi JE IgM dengan metode MAC ELISA, dan Data Sekunder Presumptive test (RT-PCR Dengue dan Uji NS1) pada Sampel Terduga Infeksi Arboviral RSUD Wangaya, Denpasar, Bali.

NO	KODE SAMPEL	SEX	UMUR	UJI NS1	ISOLASI RNA	DEN RT-PCR	DETEKSI SEROTIPE	SEROTIPE	Flavivirus RT-PCR	Alphavirus RT- PCR		JE IgM (In conv. Sera)	
										Alphagroup	CHIKV	POS/NEG/EQU	P/N Value
1	WGY 131	P	2 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
2 *	WGY 132	P	8 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.39
3	WGY 133	L	17 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
4	WGY 134	L	17 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
5	WGY 135	P	37 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
6	WGY 136	P	27 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
7 *	WGY 137	L	15 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.27
8	WGY 138	L	17 tahun	+	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	ND	ND
9 *	WGY 139	P	21 tahun	+	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	POS	3.79
10	WGY 140	P	61 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
11 *	WGY 141	L	11 tahun	+	√	√	—		Neg	Neg	ND	EQU	2.93
12	WGY 142	L	4 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
13 *	WGY 143	L	4 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	EQU	2,1
14 *	WGY 144	L	45 tahun	+	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	Neg	3.98

NO	KODE SAMPEL	SEX	UMUR	UJINS1	ISOLASI RNA	DEN RT-PCR	DETEKSI SEROTIPE	SEROTIPE	Flavivirus RT-PCR	Alphavirus RT- PCR		JE IgM (In conv. Sera)	
										Alphagroup	CHIKV	POS/NEG/EQU	P/N Value
15 *	WGY 145	L	35 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.60
16 *	WGY 146	L	81 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.15
17	WGY 147	L	3 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
18 *	WGY 148	L	65 tahun	—	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	Neg	1.92
19	WGY 149	P	30 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
20 *	WGY 150	L	19 tahun	+	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	POS	13.21
21	WGY 151	P	21 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
22 *	WGY 152	L	9 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.56
23	WGY 153	P	5 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
24 *	WGY 154	P	41 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.49
25 *	WGY 155	L	3 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.30
26 *	WGY 156	P	13 tahun	—	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	EQU	5.49
27 *	WGY 157	L	6 tahun	+	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.85
28 *	WGY 158	L	69 tahun	+	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.62
29	WGY 159	L	14 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
30	WGY 160	L	7 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
31	WGY 161	L	48 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND

NO	KODE SAMPEL	SEX	UMUR	UJINS1	ISOLASI RNA	DEN RT-PCR	DETEKSI SEROTIPE	SEROTIPE	Flavivirus RT-PCR	Alphavirus RT- PCR		JE IgM (In conv. Sera)	
										Alphagroup	CHIKV	POS/NEG/EQU	P/N Value
32	WGY 162	P	3 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
33	WGY 163	L	25 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
34	WGY 164	P	26 tahun	+	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	ND	ND
35 *	WGY 165	L	28 tahun	+	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	Neg	3.73
36 *	WGY 166	P	32 tahun	+	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	Neg	2.38
37	WGY 167	P	4 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
38 *	WGY 168	L	48 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	
39	WGY 169	P	19 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
40	WGY 170	P	15 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
41	WGY 171	L	48 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
42	WGY 172	L	32 tahun	+	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	ND	ND
43	WGY 173	P	15 tahun	+	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	ND	ND
44 *	WGY 174	L	3 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	POS	Acute : 4.14; conv : 8.70
45	WGY 175	L	1 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
46	WGY 176	L	1 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
47 *	WGY 177	P	86 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	
48 *	WGY 178	P	20 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	POS	Acute : 6.81; conv : 11.47

NO	KODE SAMPEL	SEX	UMUR	UJINS1	ISOLASI RNA	DENRT-PCR	DETEKSI SEROTIPE	SEROTIPE	Flavivirus RT-PCR	Alphavirus RT- PCR		JE IgM (In conv. Sera)	
										Alphagroup	CHIKV	POS/NEG/EQU	P/N Value
49	WGY 179	L	27 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
50 *	WGY 180	P	42 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.00
51 *	WGY 181	L	32 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.06
52 *	WGY 182	P	32 tahun	—	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	Neg	1.62
53 *	WGY 183	P	8 bulan	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.51
54	WGY 184	L	73 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
55	WGY 185	P	47 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
56 *	WGY 186	L	20 tahun	—	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	POS	6,04
57	WGY 187	L	25 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
58 *	WGY 188	L	8 tahun	—	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	Neg	1.35
59	WGY 189	P	2 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
60 *	WGY 190	L	1 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.13
61 *	WGY 191	P	46 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.50
62 *	WGY 192	P	31 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.07
63 *	WGY 193	P	5 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.85
64	WGY 194	L	1 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
65	WGY 195	L	7 bulan	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND

NO	KODE SAMPEL	SEX	UMUR	UJINS1	ISOLASI RNA	DENRT-PCR	DETEKSI SEROTIPE	SEROTIPE	Flavivirus RT-PCR	Alphavirus RT- PCR		JE IgM (In conv. Sera)	
										Alphagroup	CHIKV	POS/NEG/EQU	P/N Value
66 *	WGY 196	P	30 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	0.96
67	WGY 197	L	3 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
68	WGY 198	P	19 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
69	WGY 199	P	30 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
70	WGY 200	L	5 bulan	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
71 *	WGY 201	P	46 tahun	—	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	POS	5,49
72 *	WGY 202	P	13 tahun	—	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	Neg	1.13
73	WGY 203	P	18 tahun	—	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	ND	ND
74	WGY 204	L	1 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
75	WGY 205	P	7 bulan	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
76 *	WGY 206	P	1 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.08
77	WGY 207	L	75 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
78	WGY 208	L	31 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
79	WGY 209	L	52 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
80	WGY 210	P	7 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
81	WGY 211	L	20 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
82	WGY 212	L	8 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND

NO	KODE SAMPEL	SEX	UMUR	UJINS1	ISOLASI RNA	DENRT-PCR	DETEKSI SEROTIPE	SEROTIPE	Flavivirus RT-PCR	Alphavirus RT- PCR		JE IgM (In conv. Sera)	
										Alphagroup	CHIKV	POS/NEG/EQU	P/N Value
83 *	WGY 213	L	28 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.37
84	WGY 214	P	7 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
85	WGY 215	L	7 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
86	WGY 216	L	16 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
87	WGY 217	L	15 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
88	WGY 218	P	12 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
89 *	WGY 219	P	1 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.85
90	WGY 220			—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
91 *	WGY 221			—	√	√	+	D3	Neg	Neg	ND	Neg	Acute : 1.18; conv : 2.47
92	WGY 222	L	19 tahun	—	√	√	+	D3	POS	Neg	ND	ND	ND
93	WGY 223	L	6 tahun		√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
94	WGY 224	L	7 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
95	WGY 225	P	7 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
96 *	WGY 226	P	4 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	Neg	1.11
97	WGY 227	L	3 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
98	WGY 228	L	52 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
99	WGY 229	L	7 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND

NO	KODE SAMPEL	SEX	UMUR	UJI NS1	ISOLASI RNA	DEN RT-PCR	DETEKSI SEROTIPE	SEROTIPE	Flavivirus RT-PCR	Alphavirus RT- PCR		JE IgM (In conv. Sera)	
										Alphagroup	CHIKV	POS/NEG/EQU	P/N Value
100	WGY 230	L	12 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
101 *	WGY 231	L	24 tahun	—	√	√	—		POS	Neg	ND	ND	Acute : 2.15; conv : 3.57
102	WGY 232	L	3 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
103	WGY 233	P	7 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND
104	WGY 234	P	5 tahun	—	√	√	—		Neg	Neg	ND	ND	ND

Keterangan :

* : Sampel convalescences

ND : Tidak tersedia

POS : Positif mengandung antibodi IgM JE. Jangkauan arti positif apabila nilai P/N lebih dari 3.00

EQU : *Equivocal*/ ekuivokalitas menunjukkan nilai P/N yang *borderline*. Jangkauan nilai ekuivokal apabila nilai P/N antara 2.00 s.d. 3.00

NEG : Negatif mengandung antibodi IgM JE/ tidak terdapat ikatan antibodi dan antigen viral. Jangkauan arti negatif apabila nilai P/N kurang dari 2.00.

NS1 : Uji protein non-struktural 1 (NS1) sebagai metode *presumptive* untuk verifikasi infeksi dengue pada fase akut

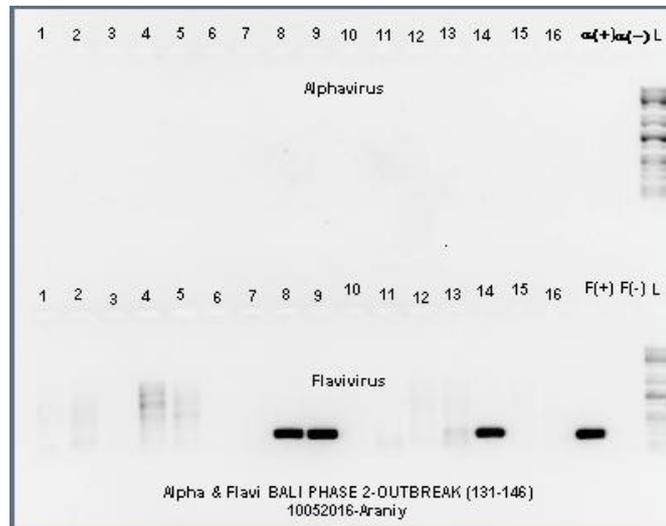
RT-PCR Dengue : *Reverse transcriptase*-PCR Dengue merupakan salah satu pengujian molekuler yang mengamplifikasi sekuens gen dengue dan termasuk kedalam salah satu rapid test untuk memverifikasi infeksi dengue fase akut pada spesimen

Flavivirus/ Alphavirus RT-PCR : Reverse Transcriptase- PCR genus *Flavivirus* yang merupakan pengujian molekuler yang mengamplifikasi sekuens gen satu genus *Flavivirus*. Merupakan metode yang lebih akurat dalam deteksi molekuler untuk infeksi arboviral karena mencakup anggota dalam genus.

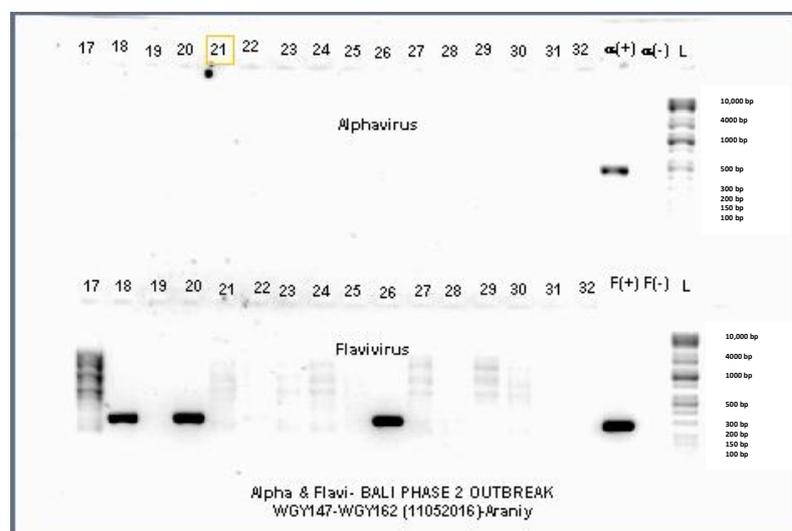
MAC ELISA : Metode serologi dengan memanfaatkan ikatan antigen-antibodi dan enzim untuk mendeterminasi adanya presensi antibodi spesifik viral infeksius pada spesimen dengan mengamati nilai serapan sinar ultraviolet-visual pada uji kolorimetri.

Nilai P/N : Nilai nisbah hasil bagi nilai rerata OD (*Optical Density*) spesimen yang direaksikan dengan antigen viral (P) dengan rerata OD serum kontrol negatif yang direaksikan dengan antigen viral (N)

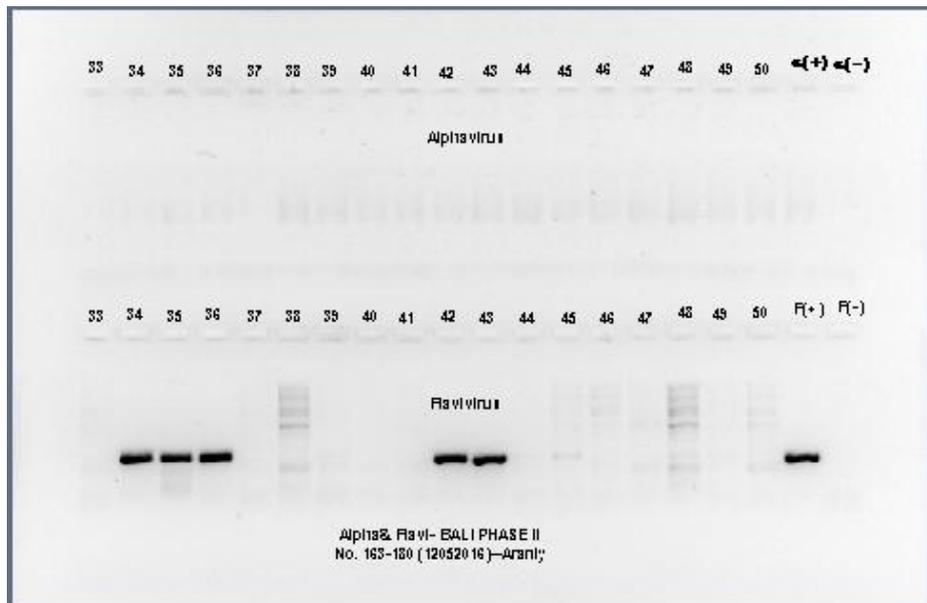
LAMPIRAN 2. Hasil Uji Molekuler RT-PCR *Flavivirus* dan *Alphavirus* pada Sampel Terduga Infeksi *Arbovirus* RSUD Wangaya Denpasar Bali nomor 1 s.d. 104 (WGY 131 s.d. WGY 234).



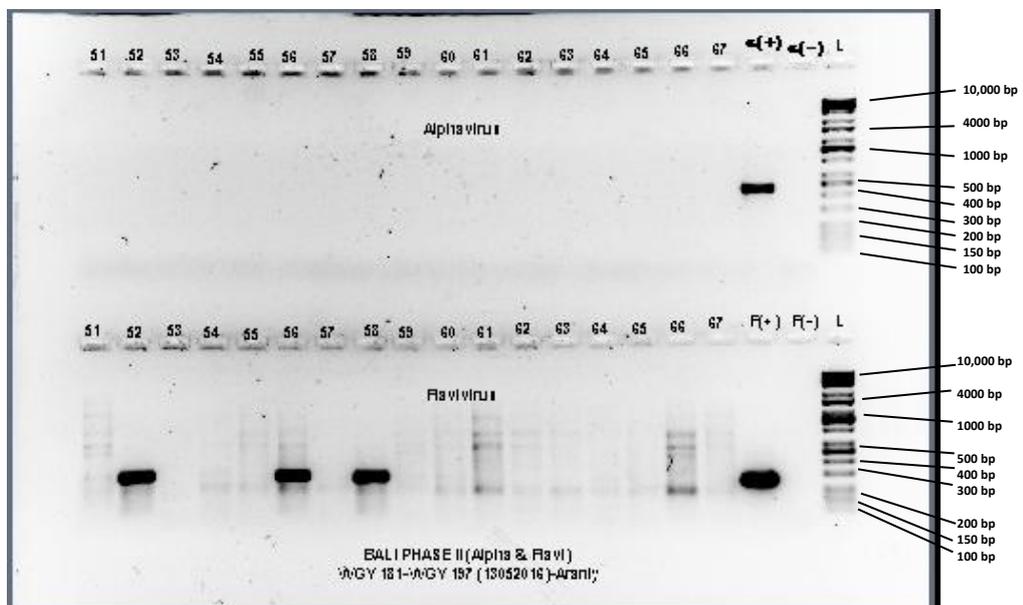
Lampiran 2.A. Dokumentasi gel hasil elektroforesis uji molekuler RT-PCR *Alphavirus* dan *Flavivirus* pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya Bali nomor 1 s.d. 16 (WGY 131 s.d. 146)



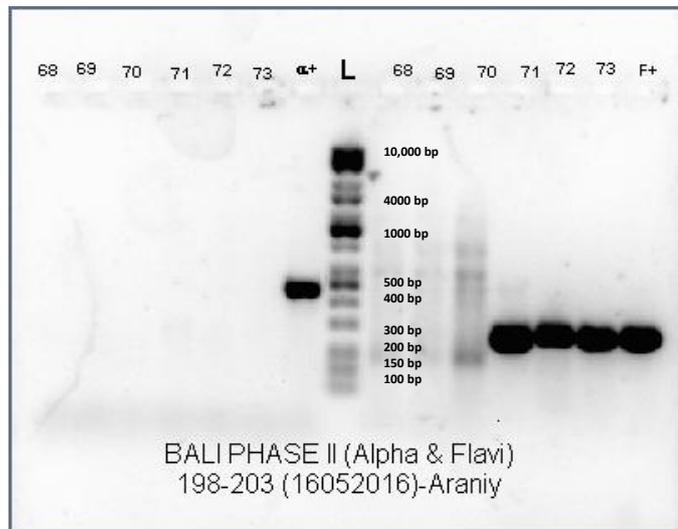
Lampiran 2.B. Dokumentasi gel hasil elektroforesis uji molekuler RT-PCR *Alphavirus* dan *Flavivirus* pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya Bali nomor 17 s.d. 32 (WGY 147 s.d. 162)



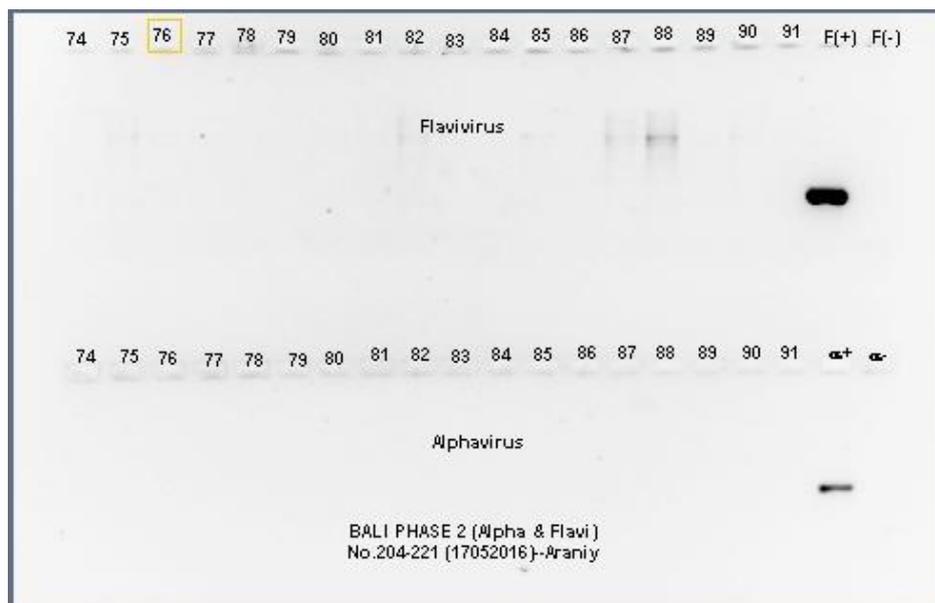
Lampiran 2.C. Dokumentasi gel hasil elektroforesis uji molekuler RT-PCR *Alphavirus* dan *Flavivirus* pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya Bali nomor 33 s.d. 50 (WGY 163 s.d. 180).



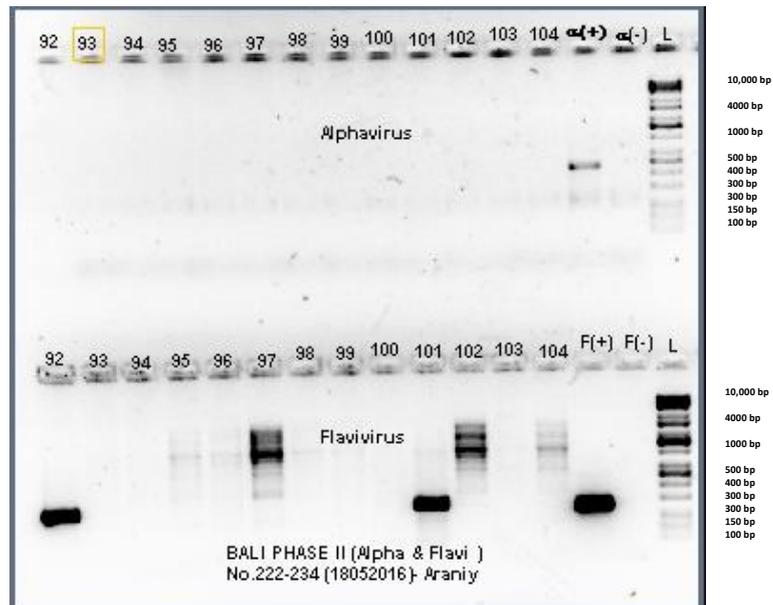
Lampiran 2.D. Dokumentasi gel hasil elektroforesis uji molekuler RT-PCR *Alphavirus* dan *Flavivirus* pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya Bali nomor 51 s.d. 67 (WGY 181 s.d. 197)



Lampiran 2.E. Dokumentasi gel hasil elektroforesis uji molekuler RT-PCR *Alphavirus* dan *Flavivirus* pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya Bali nomor 68 s.d. 73 (WGY 198 s.d. 203)



Lampiran 2.F. Dokumentasi gel hasil elektroforesis uji molekuler RT-PCR *Alphavirus* dan *Flavivirus* pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya Bali nomor 74 s.d. 91 (WGY 204 s.d. 221)



Lampiran 2.G. Dokumentasi gel hasil elektroforesis uji molekuler RT-PCR *Alphavirus* dan *Flavivirus* pada sampel terduga infeksi arboviral RSUD Wangaya Bali nomor 92 s.d. 104 (WGY 222 s.d. 234)

Lampiran 3.B. Hasil uji serologi JE MAC ELISA pada Sampel Convalescences (WGY 178 s.d. WGY 226)

Application: Tecan i-control	Tecan i-control, 1.5.14.0											
Device: infinite 200	Serial number: 810005486											
Firmware: V_2.11_04/08_InfiniTe (Apr 4 2008/14.07.11)	Serial number of connected stacker:											
Date: 06/03/2016												
Time: 3:33:46 PM												
System	D7NKSRI5											
User	D7NKSRI5\deli											
Plate	96 Flat Bottom [Immulon 2HB adjusted .pdfx]											
Plate-ID (Stacker)												
Shaking (Linear) Duration:	10 s											
Shaking (Linear) Amplitude:	1 mm											
Wait (Time)	0:00:20											
Label: Label1												
Mode	Absorbance											
Wavelength	450 nm											
Bandwidth	10 nm											
Number of Flashes	25											
Settle Time	0 ms											
Start Time:	06/03/2016 3:34:16 PM											
OD VALUE												
<>	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal
A	0,35	0,08	0,11	0,11	0,11	0,11	0,41	0,07	0,14	0,14	0,05	0,04
B	0,33	0,08	0,12	0,11	0,11	0,11	0,43	0,07	0,14	0,14	0,05	0,04
C	0,08	0,07	0,45	0,07	0,08	0,07	0,09	0,08	0,11	0,09	0,41	0,08
D	0,08	0,07	0,47	0,08	0,08	0,07	0,09	0,08	0,12	0,09	0,41	0,08
E	0,08	0,08	0,10	0,07	0,14	0,13	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,07
F	0,08	0,08	0,10	0,08	0,14	0,14	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,07
G	0,12	0,09	0,09	0,08	0,07	0,07	0,11	0,08	0,04	0,04	0,04	0,04
H	0,13	0,09	0,09	0,08	0,07	0,07	0,10	0,08	0,05	0,05	0,04	0,04
End Time:	06/03/2016 3:35:32 PM											
Plate layout												
<>	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal
A	WGY 178		WGY 183		WGY 191		WGY 201		WGY 219		Blank	
B												
C	WGY 180		WGY 186		WGY 192		WGY 202		WGY 221		Pos	
D												
E	WGY 181		WGY 188		WGY 193		WGY 206		WGY 226		Neg	
F												
G	WGY 182		WGY 190		WGY 196		WGY 213		Blank		Blank	
H												

Keterangan :

OD Value : Sampel positif mengandung JE IgM(P/N >3.0)
: sampel positif JE IgM dengan nilai Ekuivokal
: Nilai Optical Density, merupakan nilai serapan spesimen terhadap deteksi kolorimetri dengan sinar UV-Visual selama MAC ELISA dalam panjang gelombang 450 nm

Mean OD : Nilai rata-rata OD

Plate Layout : Skema/ letak setiap sampel pada *Plate*

P/N Value : Nilai nisbah hasil bagi nilai rerata OD (*Optical Density*) spesimen yang direaksikan dengan antigen viral (P) dengan rerata OD serum kontrol negatif yang direaksikan dengan antigen viral (N)

Mean OD											
Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal
0,34	0,08	0,12	0,11	0,11	0,11	0,42	0,07	0,14	0,14	0,05	0,04
0,08	0,07	0,46	0,08	0,08	0,07	0,09	0,08	0,12	0,09	0,41	0,08
0,08	0,08	0,10	0,08	0,14	0,14	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,07
0,12	0,09	0,09	0,08	0,07	0,07	0,11	0,08	0,04	0,04	0,04	0,04

P/N value					
Viral	Normal	Viral	Normal	Viral	Normal
4.43	1.51	1.50	5.49	1.85	0.60
1.00	6.04	1.07	1.13	1.52	5.39
1.06	1.35	1.85	1.08	1.11	1.00
1.62	1.13	0.96	1.37	0.59	0.55

Lampiran 3.C. Hasil uji serologi JE MAC ELISA PairingSeraconversion Sampel Akut dan Convalescences Pada Sampel Terduga Infeksi Arboviral

Application: Tecan i-control	Tecan i-control , 1.5.14.0											
Device: infinite 200	Serial number: 810005486											
Firmware: V_2.11_04/08_InfiniTe (Apr 4 2008/1 MAI, V_2.11_04/08_InfiniTe (Apr 4 2008/14.37.11)												
Date: 08/06/2016												
Time: 12:34:50 PM												
System	D7NKSRI1S											
User	D7NKSRI1S\deli											
Plate	ThermoFischer Scientific-Nunclon 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol Catalog No.: 269620/269787/439454/442404/475094 [NUN9											
Plate-ID (Stacker)												
Shaking (Linear) Duration:	10											
Shaking (Linear) Amplitude:	1											
Wait (Time)	0:00:10											
Label: Label1												
Mode	Absorbance											
Wavelength	450											
Bandwidth	10											
Number of Flashes	25											
Settle Time	0											
Start Time 6/8/2016 12:35:10 PM												
OD VALUE						MEAN OD						
<>	viral	Normal	viral	Normal	viral	Normal	viral	Normal	viral	Normal	viral	Normal
A	0,997500002	0,0705	0,5912	0,0483	0,0618	0,0597	0,9965	0,07155	0,59185	0,04605	0,05975	0,05995
B	0,995500028	0,0726	0,5925	0,0438	0,0577	0,0602						
C	0,213400006	0,065	0,1007	0,0435	0,8361	0,0717	0,21465	0,071	0,10245	0,0432	0,8364	0,07145
D	0,215900004	0,077	0,1042	0,0429	0,8367	0,0712						
E	0,316199988	0,1284	0,1894	0,1188	0,0874	0,058						
F	0,304500014	0,1288	0,1846	0,1159	0,0863	0,0606	0,31035	0,1286	0,187	0,11735	0,08685	0,0593
G	0,362699986	0,0861	0,1122	0,0707	0,0392	0,0394						
H	0,35589999	0,0827	0,1194	0,071	0,0431	0,0372	0,3593	0,0844	0,1158	0,07085	0,04115	0,0383
End Time: 6/8/2016 12:36:25 PM												
Plate Layout						P/N Value						
<>	viral	Normal	viral	Normal	viral	Normal	viral	Normal	viral	Normal	viral	Normal
A	WGY 178C		WGY 178		BLANK		11,47		6,81		0,69	
B												
C	WGY 221C		WGY 221		Pos		2,47		1,18		9,63	
D												
E	WGY 231C		WGY231		Neg		3,57		2,15		1,00	
F												
G	WGY 174		WGY 168		WGY 143		4,14		1,33		1,00	
H												

Keterangan :



: Sampel positif mengandung JE IgM(P/N >3.0)

: sampel positif JE IgM dengan nilai Ekuivokal

OD Value

: Nilai Optical Density, merupakan nilai serapan spesimen terhadap deteksi kolorimetri dengan sinar UV-Visual selama MAC ELISA dalam panjang gelombang 450 nm

Mean OD

: Nilai rata-rata OD

Plate Layout

: Skema/ letak setiap sampel pada Plate

P/N Value

: Nilai nisbah hasil bagi nilai rerata OD (*Optical Density*) spesimen yang direaksikan dengan antigen viral (P) dengan rerata OD serum kontrol negatif yang direaksikan dengan antigen viral (N)

Lampiran 4. Surat Pernyataan Keaslian Skripsi

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan dibawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jakarta,

Nama : Araniy Fadhilah
No. Registrasi : 3425122227
Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul "Deteksi Infeksi Arboviral pada Sampel Akut dan *Convalescences* RSUD.Wangaya, Denpasar, Bali" adalah :

1. Ditulis dan diselesaikan oleh saya sendiri berdasarkan hasil penelitian yang saya lakukan dari bulan Maret 2016 s.d. Juni 2016 di *Emerging Virus Research Unit Laboratory*- Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta.
2. Bukan merupakan duplikasi skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya dan dalam kesadaran penuh. Saya bersedia menanggung akibat yang timbul apabila pernyataan ini tidak benar

Jakarta, Juli 2016

Pembuat Pernyataan,



Araniy Fadhilah
NIM. 3425122227

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



ARANIY FADHILAH. Dilahirkan di Jakarta, 5 Desember 1993 dan merupakan anak kedua dari dua bersaudara pasangan Amir Faisal dan Dina Sakinah Anies. Penulis merupakan wanita muda menyelesaikan pendidikan formal 12 tahun di SDN Menteng 03, SMPN 216, dan SMAN 68 Jakarta kemudian melanjutkan pendidikan jenjang perguruan tinggi di Jurusan Biologi FMIPA UNJ berdasarkan minat besarnya pada genetika dan biologi molekuler.

Penulis ikut serta dalam serangkaian pendidikan non formal untuk mengasah kemampuan dan meningkatkan mutu diri sebagai individu muda yang memiliki niat berbakti untuk negeri. Pendidikan non formal yang telah diselesaikan antara lain pendidikan bahasa Inggris (Higher Intermediate Level) di LIA Pramuka (2011) dan kursus-kursus terkait ilmu biomedis seperti training “Biosafety and Biosecurity” yang diselenggarakan oleh IHVCB-UI.

Penulis mendapatkan beasiswa penuh dari Universitas Justus von Liebig, Giessen, Jerman pada bulan Juli s.d. Agustus 2014 untuk mengikuti kuliah singkat bertemakan “*Biotechnology, Intellectual Property, and Linking Laws*” termuat dalam program *International Summer University*. Melalui program tersebut ilmu dan wawasan penulis akan bioteknologi serta ilmu hukum yang terkait dengan ilmu pengetahuan alam menjadi terasah. Penulis juga belajar akan pentingnya membaur dan terbiasa dengan pola hidup yang multikultural.

Pelatihan terbaru yang diikuti oleh penulis pada masa akhir perkuliahan di UNJ adalah menjadi peserta yang diundang untuk mengikuti training isolasi virus Zika oleh *Department Virology, United States Armed Forces Research Institute of Medical Science (U.S. AFRIMS)*, Bangkok, Thailand pada bulan Maret 2016. Selama training penulis dilatih hingga mahir dalam melakukan isolasi, inokulasi dan

propagasi virus Zika serta dilatih untuk melakukan kultur sel, pewarnaan sel, hingga perhitungan antigen dan antibodi dalam spesimen melalui teknik PRNT dan *Plaque Assay*.

Penulis sangat menikmati proses belajar dan bekerja di Laboratorium. Penulis dapat melakukan teknik laboratorium mikrobiologi dasar seperti Perhitungan mikrobial, uji presumtif dan konfirmasi untuk *E.coli* dan *coliform* bacteria, teknik pewarnaan, pengenceran, sterilisasi dan inkubasi.

Teknik laboratorium biologi molekuler yang dapat dilakukan oleh penulis antara lain adalah Real Time PCR, RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction) untuk deteksi *Arbovirus* dan Non-*Arbovirus*, Sintesis cDNA, IgM Antibody Captured- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (MAC ELISA), Electrophoresis dan Gel Documentation, DNA whole genome isolation, Viral RNA extraction, Gel Purification dan presipitasi, Cell culture (Mammalian and Insects cells), Isolasi virus dan inokulasi virus dalam sel kultur, *Plaque Assay*, *Plaque Reduction and Neutralization Test* (PRNT), perhitungan titer antigen dan antibodi, subkultur dan perhitungan sel, serta penggunaan instrumen seperti sentrifuge, spektrofotometer, ELISA reader, mikroskop, ds.Kendati demikian, kemampuan bekerja di laboratorium yang dimiliki oleh penulis masih sangat membutuhkan pelatihan demi performa hasil yang maksimal.

Pengalaman kerja penulis dimulai sejak penulis masih menjadi siswa di Sekolah Menengah Pertama. Terhitung sejak September 2007 s.d. 2015 penulis aktif menjadi tenaga pengajar private untuk siswa SD, SMP dan SMA di daerah Jakarta Pusat. Kemudian, bermula dari Praktik Kerja Lapangan tahun 2015 yang berlanjut menjadi penelitian skripsi, terhitung Mei 2016 s.d. sekarang, penulis bekerja sebagai Junior Research Assistant (RA) di Emerging Virus Research Unit (EVRU)- Eijkman Institute Jakarta.