

**Peran Protein Nonstruktural 1 Virus Dengue terhadap  
Komunikasi Antar Sel Melalui Deteksi Level mRNA Connexin43,  
Caspase-3, dan Viabilitas Sel**



**Tesis ini diajukan sebagai syarat untuk memperoleh  
kelulusan Magister Ilmu Biomedis**

Oleh

Riyanda Indrawan Sani

2208330001

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIS  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA  
MEDAN  
2025**

## LEMBAR PENGESAHAN



MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI, PENELITIAN &  
PENGEMBANGAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH  
SUMATERA UTARA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Gedung Arca No. 53 Medan 20217 Telp. (061) 7350163 – 7333162  
Ext. 20 Fax. (061) 7363488  
Website : [fk@umsu.ac.id](mailto:fk@umsu.ac.id)



## HALAMAN PENGESAHAN

Thesis ini di ajukan oleh:

Nama : Riyanda Indrawan Sani  
NPM : 2208330001  
Prodi/Bagian : Magister Ilmu Biomedis  
Judul Tesis : Peran Protein Nonstruktural 1 Virus Dengue terhadap Komunikasi Antar Sel Melalui Deteksi Level mRNA Comexin43, Caspase-3, dan Viabilitas Sel

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

## DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1

(Assoc. Prof. Dr. dr. Nurfadly, MKT)  
NIDN: 012097003

Pembimbing 2

(dr. Zakhrofi Muzar, M.Si.Med, M.Sc, Ph.D)  
NIDN: 0128068602

Penguji 1

(Assoc. Prof. Dr. dr. Shahrul Rahman, Sp.PD,  
FINASIM)  
NIDN: 0118067303

Penguji 2

(dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THTBKL.,  
Subsp.Rino(K))  
NIDN: 0106098201

Mengetahui

Dekan FK UMSU

(dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THTBKL.,  
Subsp.Rino(K))  
NIDN: 0106098201

Ketua Program Studi Magister Biomedis

(Dr. Emni Purwoningsih, S.Pd., M.Kes)  
NIDN: 0105048103

Ditetapkan di Medan

Tanggal 12 Agustus 2025

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya ucapkan kepada Allah *Subhanahu Wata'ala* karena berkat rahmatNya, saya dapat menyelesaikan tesis ini dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Biomedis pada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Siti Masliana Siregar, Sp.T.H.T.B.K.L., Subsp.Rino(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara dan Penguji I yang telah memberikan arahan dalam melengkapi kekurangan pada tulisan tesis saya ini dan bantuan agar saya dapat lebih maju dan berkembang lagi serta dapat menyelesaikan program studi ini dengan baik.
2. Dr. Emni Purwoningsih, S.Pd., M. Kes selaku Kepala Program Studi Magister Ilmu Biomedis yang telah memberi arahan kepada saya selama saya menempuh Pendidikan Magister Biomedis hingga dapat menyelesaikan program studi ini dengan baik.
3. dr. Isra Thirsty, M.Biomed selaku Sekretaris Program Studi Magister Ilmu Biomedis yang telah memberi arahan kepada saya selama saya menempuh Pendidikan Magister Biomedis hingga dapat menyelesaikan program studi ini dengan baik.
4. Assoc.Prof Dr.dr. Nurfadly, MKT, selaku Dosen Pembimbing I yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan ilmu untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini serta memotivasi untuk saya agar dapat menyelesaikan program studi magister ilmu biomedis ini dengan baik.
5. dr. Zukhrofi Muzar, M.Si.Med, M.Sc, Ph.D, selaku Dosen Pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan ilmu untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini, termasuk memberikan masukan berharga terkait desain penelitian, teknik laboratorium, analisis data, dan ide-ide inovatif dalam pengembangan variabel penelitian.

6. Assoc. Prof. Dr. dr. Shahrul Rahman, Sp.PD, FINASIM selaku Penguji II yang selalu memberikan arahan dan masukan serta dorongan motivasi untuk saya agar dapat menyelesaikan program studi magister ini dengan baik.
7. Orang Tua dan Mertua saya yang selalu memberikan doa dan dukungan moril yang tiada henti selama saya menempuh pendidikan sehingga saya dapat menyelesaikan Pendidikan ini dengan baik.
8. Istri saya dr. Rini Sanusi yang selalu memberikan dukungan tanpa henti selama saya menjalani pendidikan dan menjadi penyemangat saya dalam menyelesaikan tesis ini.
9. Teman-teman saya Tim Pembekalan FK UMSU dan teman Mahasiswa Magister Biomedis FK UMSU yang selalu menjadi tempat berdiskusi bertukar informasi sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.
10. Pihak lain yang telah banyak membantu dalam usaha memperoleh data yang saya perlukan, Laboratorium Terpadu FK UMSU dan UMSU yang telah mendanai penelitian melalui bantuan dana penelitian magister.

Saya menyadari bahwa penulisan tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu kritik dan saran demi kesempurnaan tulisan ini sangat saya harapkan. Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

**PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TESIS UNTUK  
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Riyanda Indrawan Sani

NPM : 2208330001

Fakultas : Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

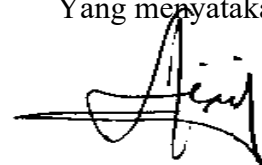
demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas tesis saya yang berjudul “Peran Protein Nonstruktural 1 Virus Dengue terhadap Komunikasi Antar Sel Melalui Deteksi level mRNA Connexin43, Caspase-3, dan Viabilitas Sel”, beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Medan

Pada tanggal: 29 Juli 2025

Yang menyatakan



Riyanda Indrawan Sani

## ABSTRAK

Infeksi Dengue Virus (DENV) yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* dapat menimbulkan gejala mulai dari asimtomatik hingga komplikasi neurologis berat. Protein NS1 DENV diduga berperan dalam patogenesis neurologis melalui mekanisme yang belum sepenuhnya dimengerti. Penelitian ini menganalisis peran NS1 terhadap level mRNA Connexin43 (Cx43) dan apoptosis pada sel PBMC. PBMC diisolasi, distimulasi dengan NS1, lalu dianalisis level mRNA Cx43 dan Caspase-3 menggunakan RT-PCR serta fungsi mitokondria dengan pewarnaan JC-1. Hasil menunjukkan nilai Ct Cx43 kontrol  $31,48 \pm 0,33$  turun menjadi  $24,87 \pm 0,52$  setelah paparan NS1  $1 \mu\text{g/mL}$ . Nilai Ct Caspase-3 juga menurun dari  $31,37 \pm 0,24$  (kontrol) menjadi  $24,58 \pm 0,70$  (NS1  $1 \mu\text{g/mL}$ ). Analisis JC-1 menunjukkan perbedaan signifikan antara kontrol dengan NS1  $1 \mu\text{g/mL}$  (mean=0,21; p=0,022) dan NS1  $5 \mu\text{g/mL}$  (mean=0,20; p=0,028). Temuan ini mengindikasikan bahwa NS1 meningkatkan level mRNA Cx43 dan Caspase-3 serta mengganggu fungsi mitokondria, mendukung hipotesis bahwa NS1 mengganggu komunikasi sel melalui Cx43 dan menginduksi apoptosis via Caspase-3, yang mungkin menjadi mekanisme kerusakan sel pada infeksi DENV. Penelitian ini memberikan dasar untuk pengembangan terapi target jalur Cx43 dan apoptosis dalam penanganan komplikasi dengue.

**Kata kunci:** NS1, Connexin43, Caspase-3, JC-1, PBMC

**ABSTRACT**

*Dengue Virus (DENV) infection, transmitted by Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes, can cause symptoms ranging from asymptomatic to severe neurological complications. The DENV NS1 protein is suspected to play a role in neurological pathogenesis through mechanisms not yet fully understood. This study analyzed the effect of NS1 on Connexin43 (Cx43) expression and apoptosis in PBMCs. PBMCs were isolated, stimulated with NS1, and then analyzed for Cx43 and Caspase-3 gene expression using RT-PCR, as well as mitochondrial function using JC-1 staining. Results showed that the Cx43 Ct value decreased from  $31.48 \pm 0.33$  (control) to  $24.87 \pm 0.52$  after  $1 \mu\text{g/mL}$  NS1 exposure. Similarly, the Caspase-3 Ct value decreased from  $31.37 \pm 0.24$  (control) to  $24.58 \pm 0.70$  (NS1  $1 \mu\text{g/mL}$ ). JC-1 analysis revealed significant differences between control and NS1  $1 \mu\text{g/mL}$  (mean=0.21;  $p=0.022$ ) and NS1  $5 \mu\text{g/mL}$  (mean=0.20;  $p=0.028$ ). These findings indicate that NS1 increases Cx43 and Caspase-3 expression while impairing mitochondrial function, supporting the hypothesis that NS1 disrupts intercellular communication via Cx43 and induces apoptosis through Caspase-3, which may underlie cellular damage in DENV infection. This study provides a foundation for developing targeted therapies focusing on the Cx43 and apoptosis pathways in managing dengue complications.*

**Keywords:** NS1, Connexin43, Caspase-3, JC-1, PBMC

## DAFTAR ISI

<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>i</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>ii</b>
<b>PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TESIS UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xi</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum .....	4
1.3.2. Tujuan Khusus .....	4
1.4. Manfaat penelitian .....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Epidemiologi .....	5
2.2. Dengue Virus (DENV) .....	9
2.3. Protein NS1 .....	12
2.4. Komplikasi Neurologi Infeksi DENV .....	17
2.5. Apoptosis dan <i>Gap Junction</i> .....	21
2.6. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)</i> .....	24
2.7. Kerangka Teori.....	29
2.8. Kerangka Konsep .....	30

2.9.	Hipotesis .....	30
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN .....</b>		<b>31</b>
3.1.	Definisi Operasional .....	31
3.2.	Rancangan Penelitian .....	32
3.3.	Tempat dan Waktu Penelitian .....	32
3.4.	Populasi dan Sampel .....	33
3.5.	Metode Penelitian .....	36
3.5.1.	Kultur sel PBMC .....	36
3.5.2.	Protein NS1 rekombinan .....	36
3.5.3.	Isolasi RNA .....	37
3.5.4.	Viabilitas Sel .....	37
3.5.5.	RT-PCR .....	38
3.5.6.	Metode Analisis Data .....	39
3.5.7.	Alur Penelitian .....	41
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>42</b>
4.1.	Pewarnaan JC-1 .....	42
4.1.1.	Jumlah Sel Monosit .....	42
4.1.2.	Jumlah sel JC-1 .....	43
4.1.3.	Jumlah normalisasi JC-1 ke monosit .....	44
4.2.1.	Konsentrasi RNA pada paparan dan kontrol .....	47
4.2.2.	Level mRNA .....	48
4.2.2.1.	Level mRNA GAPDH .....	48
4.2.2.2.	Level mRNA Connexin43 .....	49
4.2.2.3.	Level mRNA Caspase-3 .....	51
4.3.	Pembahasan .....	52
4.3.1.	Mekanisme Seluler yang Diinduksi NS1 dan Implikasinya pada Disfungsi Monosit .....	52
4.3.2.	Peran NS1 pada Metabolik dan Aktivasi Transkripsi .....	53

4.3.3.	Peningkatan Komunikasi Melalui <i>Gap Junction</i> .....	54
4.3.4.	Amplifikasi sinyal Pro-Apoptosis .....	54
4.3.5.	Implikasi Patofisiologis.....	55
4.3.6.	Keterbatasan dan Arah Penelitian Lanjutan .....	55
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>		<b>56</b>
5.1.	Kesimpulan.....	56
5.2.	Saran.....	56
5.2.1.	Penelitian Lanjutan.....	56
5.2.2.	Optimasi <i>Housekeeping Gene</i> .....	57
5.2.3.	Rekomendasi Uji Klinis pada Manusia.....	57
5.2.4.	Aplikasi dalam Pengembangan Obat dan Tatalaksana .....	57
5.2.5.	Aplikasi sebagai Prediktor Keparahan .....	58
5.2.6.	Studi Komparatif dengan Paparan Lain .....	58
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>59</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>74</b>

**DAFTAR TABEL**

Tabel 3. 1 Definisi Operasional .....	31
Tabel 3.2 Timeline Pnelitian.....	32
Tabel 3.3 Primer RT-qPCR.....	38
Tabel 4. Uji Post-hoc Bonferroni.....	46

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2. 1 Rata-rata kejadian demam berdarah tahunan .....	5
Gambar 2. 2 Struktur Dengue Virus (DENV).....	9
Gambar 2. 3 Struktur DENV yang memiliki 3 protein structural dan 7 protein non structural .....	15
Gambar 2. 4 CT-Scan pasien terinfeksi DENV.....	20
Gambar 2. 5 Peningkatan apoptosis pada sel HeLa yang mengekspresikan Cx43 dibandingkan control .....	22
Gambar 2. 6 Kultur Sel PBMC.....	27
Gambar 3. 1 Grafik power sampel penelitian dengan aplikasi GPower .....	34
Gambar 3. 2 Input data pada aplikasi GPower.....	35
Gambar 3. 3 Hasil analisis data pada aplikasi GPower.....	35
Gambar 3. 6 Protokol Isolasi RNA .....	37
Gambar 4. 1 Jumlah Sel Monosit.....	41
Gambar 4. 2 Jumlah Sel JC-1.....	42
Gambar 4. 3 Pewarnaan JC-1 pada Sel PBMC .....	43
Gambar 4. 4 Normalisasi JC-1 ke Monosit.....	44
Gambar 4. 5 Total RNA dari sampel kontrol dan paparan NS1 .....	47
Gambar 4. 6 Level mRNA GAPDH pada RT-PCR.....	49
Gambar 4. 7 Level mRNA Connexin43 pada RT-PCR.....	50
Gambar 4. 8 Level mRNA Caspase-3 pada RT-PCR .....	52

## DAFTAR SINGKATAN

<b>ADE</b>	: Antibody-dependent enhancement (ADE).
<b>BDNF</b>	: Brain-Derived Neurotrophic Factor
<b>β-ME</b>	: Betamercaptoethanol
<b>CD8</b>	: Cluster of Differentiation 8
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Carbon Dioxide
<b>CSF</b>	: Cerebrospinal Fluid
<b>CT-Scan</b>	: Computed Tomography Scan
<b>DENV</b>	: Dengue Virus
<b>DENV1</b>	: Dengue Virus Serotype 1
<b>DENV2</b>	: Dengue Virus Serotype 2
<b>DENV3</b>	: Dengue Virus Serotype 3
<b>DHF</b>	: Dengue Hemorrhagic Fever
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	: Deoxyribonucleic Acid
<b>Cryo-EM</b>	: Cryo Electron Microscopy
<b>EMT</b>	: Epithelial-Mesenchymal Transition
<b>ER</b>	: Endoplasmic Reticulum
<b>F12</b>	: Ham's F-12 Nutrient Mix (media sel)
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>GAG</b>	: Glycosaminoglycan
<b>GAP-43</b>	: Growth Associated Protein 43
<b>GBS</b>	: Guillain-Barré Syndrome
<b>GDP</b>	: Gross Domestic Product
<b>GJIC</b>	: Gap Junction Intercellular Communication
<b>GJs</b>	: Gap Junction
<b>HEK293</b>	: Human Embryonic Kidney 293 Cells
<b>HUVEC</b>	: Human Umbilical Vein Endothelial Cells
<b>JC-1</b>	: 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'- Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodide (fluorescent dye)
<b>LPS</b>	: Lipopolysaccharide

<b>MAP</b>	: Mitogen-Activated Protein
<b>NTC</b>	: Non-Template Control
<b>NeuN</b>	: Neuronal Nuclei
<b>NRT</b>	: Non-Reverse Control
<b>NS1</b>	: Non-Structural Protein 1
<b>NS2A</b>	: Non-Structural Protein 2A
<b>NS2B</b>	: Non-Structural Protein 2B
<b>NS3</b>	: Non-Structural Protein 3
<b>NS4A</b>	: Non-Structural Protein 4A
<b>NS4B</b>	: Non-Structural Protein 4B
<b>NS5</b>	: Non-Structural Protein 5
<b>PBS</b>	: Phosphate-Buffered Saline
<b>RA</b>	: Retinoic Acid
<b>RLT</b>	: RNA Lysis Tissue (buffer for RNA extraction)
<b>RNA</b>	: Ribonucleic Acid
<b>RPE</b>	: RNA Protecting Elution Buffer
<b>RT-qPCR</b>	: Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>RW1</b>	: RNA Wash Buffer 1
<b>SCF</b>	: Soluble Complement Fixing or Stem Cell Factor
<b>SSP</b>	: Sistem Saraf Pusat
<b>SV2</b>	: Synaptic Vesicle Protein II
<b>SYN</b>	: Synaptophysin
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	: Transforming Growth Factor Beta 1
<b>TLR</b>	: Toll-Like Receptor
<b>TNT</b>	: Tunneling Nanotubes
<b>TUBB3</b>	: Tubulin Beta 3

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Infeksi *Dengue Virus (DENV)* ditransmisikan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* yang terinfeksi. Genom DENV termasuk dalam genus Flavivirus, keluarga Flaviviridae, dengan lima serotipe yang berbeda secara serologis dan genetik, yaitu DENV1-5.<sup>1</sup> Infeksi DENV semakin meningkat seiring dengan fenomena pemanasan global (*climate change*).<sup>2</sup> Penelitian terakhir menunjukkan 100-400 juta orang yang terinfeksi DENV terjadi setiap tahunnya di lebih dari 120 negara, beban di negara-negara yang terkena dampak juga meningkat karena negara-negara di Amerika, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat melaporkan sebagian besar kasus global.<sup>3</sup> Faktor sosial ekonomi juga memiliki pengaruh besar terhadap angka infeksi DENV, dimana angka kejadian infeksi DENV menurun pada negara-negara dengan *Gross Domestic Product GDP* yang tinggi dan memiliki fasilitas dan infrastruktur yang baik.<sup>4</sup>

Sebagian besar kasus infeksi DENV tidak memiliki gejala, dan pada sekitar 25% kasus, dapat terjadi demam dengue ringan.<sup>5</sup> Namun dalam beberapa kasus demam dengue ditandai dengan gejala sakit kepala berat, demam ringan, ruam kulit, nyeri otot dan sendi, mual, serta muntah. Sementara itu, demam berdarah dengue (DBD) bermanifestasi sebagai demam tinggi, hepatomegali, fenomena hemoragik, syok, dan sering disertai gangguan kardiovaskular. Awalnya, DBD dilaporkan terutama menyerang anak-anak di bawah 15 tahun; namun penelitian terkini menunjukkan kejadiannya pada populasi dewasa.<sup>6</sup> Beberapa studi menunjukkan bahwa protein NS1 DENV ditemukan dalam jumlah besar di serum pasien, baik dalam bentuk lipoprotein larut ekstraseluler maupun pada permukaan sel.<sup>7</sup> Kadar protein ini yang tinggi berpotensi berkorelasi dengan keparahan penyakit dan berperan dalam patogenesis DBD.<sup>8</sup> Infeksi oleh satu serotipe dapat memberikan imunitas permanen terhadap serotipe tersebut dan proteksi silang jangka pendek terhadap serotipe lain. Infeksi sekunder heterotipik dilaporkan memiliki kemungkinan tinggi menyebabkan

dengue berat termasuk DBD.<sup>9</sup> Namun demikian hubungan antara NS1 dan tingkat keparahan manifestasi klinis pada DBD masih belum diketahui.

Dalam penelitian lainnya, ditemukan kasus infeksi DENV memunculkan gejala neurologis, hal tersebut terbukti dari munculnya gejala neurologis seperti meningitis, ensepalofati, *Guillain-Barre Syndrome* (GBS) pada pasien terinfeksi DENV.<sup>10,11</sup> Dari kasus infeksi DENV yang mengalami gangguan neurologis, terdapat sebagian kasus (sekitar 0.5-2.1% kasus) mengalami komplikasi berat seperti kebocoran plasma,<sup>12</sup> bahkan manifestasi pada otak yang menyebabkan penurunan kesadaran seperti ensefalopati dan ensefalitis hemoragik.<sup>13,14</sup> Selain itu sebuah laporan kasus ensefalitis pada pasien dewasa membuktikan ditemukannya NS1 dan IgM dengue pada *Cerebrospinal Fluid* (CSF) pasien, dimana DENV2 dan DENV3 menjadi penyebab tersering komplikasi neurologis.<sup>14,15</sup> Komplikasi seperti encephalitis juga ditemukan pada neonatus, dimana ditemukan NS1 pada CSF bayi yang baru lahir dari ibu yang terinfeksi DENV,<sup>16</sup> dari beberapa kasus ditemukan DENV2 adalah serotype dominan dalam penularan vertical.<sup>17</sup>

Genom DENV mengkodekan tiga protein struktural (Env, PreM, Capsid) dan tujuh protein non-struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5)<sup>18</sup> Protein Nonstruktural 1 (NS1) dari DENV telah digunakan sebagai penanda diagnostik awal dan perburukan infeksi DENV.<sup>19</sup> Selain itu, level NS1 dalam darah berhubungan erat dengan tingkat keparahan penyakit pada infeksi DENV.<sup>20</sup> Dalam konteks komplikasi neurologis akibat infeksi DENV, NS1 menjadi penanda yang potensial karena ditemukan di cerebrospinal fluid (CSF).<sup>14</sup> Protein NS1 terbukti dapat mendegradasi protein-protein pada area hubungan antar sel (*cell junctions*), yang meliputi *adherens junction* dan *tight junction*.<sup>21</sup> Penelitian sebelumnya menunjukkan DENV dapat menyebabkan kematian sel (apoptosis) pada sel saraf (neuron), dimana peningkatan jumlah DENV berhubungan dengan tingkat kematian neuron.<sup>22</sup> Mengingat, infeksi DENV menyebabkan peningkatan NS1 dan neuron yang terinfeksi DENV dapat mengalami apoptosis dan GJs adalah area hubungan antar sel yang dapat

menyalurkan sinyal apoptosis antar sel,<sup>23</sup> maka penting untuk dibuktikan apakah NS1 dapat mempengaruhi level protein pada GJs dan menyebabkan apoptosis.

Salah satu protein yang penting dan menjadi struktur utama pada GJs adalah Connexin43 (Cx43). Peningkatan level mRNA Cx43 telah diamati pada banyak penyakit yang berhubungan dengan sistem saraf pusat (SSP).<sup>24</sup> Dalam proses fisiologis dan patologis, peningkatan level mRNA Cx43 dapat meningkatkan level N-cadherin (N-cad), yang diteliti pada kultur sel osteoblast.<sup>25</sup> Dalam penelitian lain didapatkan bahwa penurunan dari level Cx43 dapat meningkatkan viabilitas dari sel, dan mengurangi proses apoptosis akibat pengurangan transmisi sinyal apoptosis melalui GJs.<sup>26</sup> Dari seluruh penelitian sebelumnya terlihat ada kemungkinan hubungan antar sel dapat mempengaruhi apoptosis dan viabilitas sel, oleh karena itu penelitian ini menginvestigasi apakah NS1 dari DENV dapat mempengaruhi level dari connexin pada (GJs) yang berhubungan dengan proses apoptosis dan viabilitas sel.

Penelitian ini bertujuan untuk memahami dan mengintervensi patogenesis DENV melalui modulasi komunikasi antar sel dan apoptosis. Mempelajari efek NS1 terhadap level mRNA Cx43, Caspase-3, dan viabilitas sel, dapat mengidentifikasi target potensial untuk terapi. Jika NS1 terbukti mengganggu fungsi *gap junctions* atau meningkatkan apoptosis melalui aktivasi Caspase-3, maka intervensi yang ditujukan untuk menghambat aksi NS1 dapat dikembangkan sebagai salah satu strategi terapeutik baru, meskipun dibutuhkan penelitian lanjutan untuk membuat formulasi terapi yang efektif dan efisien. Selain itu, pemahaman yang baik tentang mekanisme molekuler ini dapat menjadi sumber informasi pengembangan biomarker baru untuk diagnosis dini dan pemantauan infeksi DENV. Deteksi perubahan level mRNA Cx43 dan Caspase-3 dapat digunakan sebagai indikator penyakit yang lebih sensitif dan spesifik, membantu dalam manajemen klinis pasien, sehingga diharapkan penelitian ini tidak hanya berkontribusi pada pemahaman dasar mengenai patogenesis DENV tetapi juga memiliki potensi aplikasi klinis yang signifikan dalam penanganan dan pencegahan infeksi DENV.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perumusan masalah penelitian ini adalah; “Bagaimana peran NS1 DENV terhadap komunikasi antar sel melalui *Gap Junction* (GJs)?”

## 1.3. Tujuan penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk menilai peran NS1 DENV terhadap komunikasi antar sel melalui *Gap Junction* (GJs).

### 1.3.2. Tujuan Khusus

- 1) Mengetahui peran paparan NS1 terhadap viabilitas sel melalui pewarnaan JC-1
- 2) Mengetahui peran paparan NS1 terhadap GJs melalui level mRNA *housekeeping-gene* GAPDH
- 3) Mengetahui peran paparan NS1 terhadap GJs melalui level mRNA protein pendukung *Connexin43*
- 4) Mengetahui peran paparan NS1 terhadap apoptosis sel melalui level mRNA protein pro apoptosis caspase-3

## 1.4. Manfaat penelitian

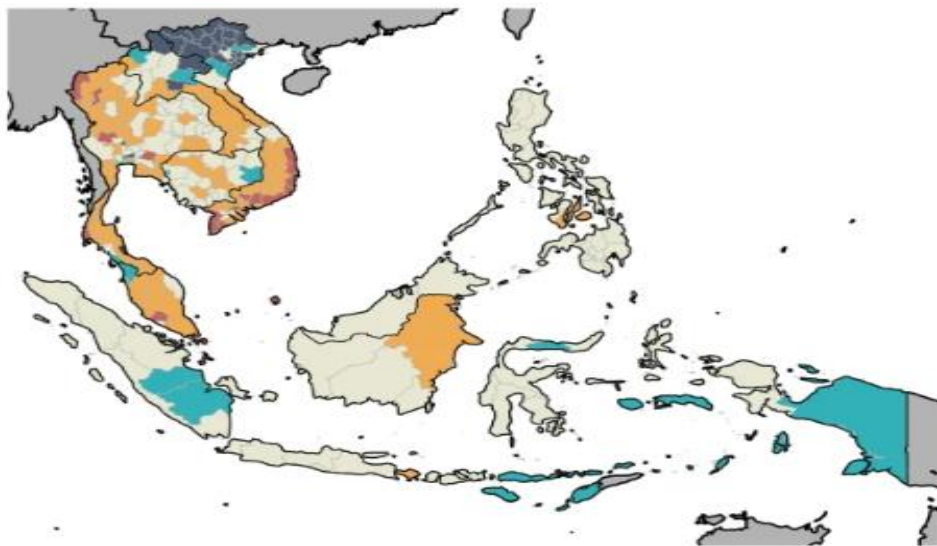
Penelitian ini diharapkan memberikan pengetahuan baru mengenai mekanisme patogenik Protein Nonstruktural 1 (NS1) DENV dalam mempengaruhi komunikasi antar sel, khususnya interaksi NS1 dengan protein Connexin43 dan Caspase-3, yang akan membantu mengklarifikasi jalur molekuler yang terlibat dalam infeksi DENV. Selain menambah pengetahuan tentang peran GJs yang diwakili oleh Connexin43 dalam menjaga integritas seluler dan respons terhadap infeksi virus, penelitian ini juga membuka peluang untuk penelitian lebih lanjut tentang gangguan komunikasi antar sel dan patologi penyakit infeksi. Secara klinis, dengan penelitian lebih lanjut penelitian ini dapat berkontribusi pada pengembangan strategi terapeutik baru untuk mengatasi kerusakan sel akibat infeksi DENV, termasuk pengembangan obat-obatan yang menargetkan jalur komunikasi seluler atau modulasi apoptosis, dimana hal ini dapat membantu pengelolaan pasien yang lebih baik.

## BAB 2

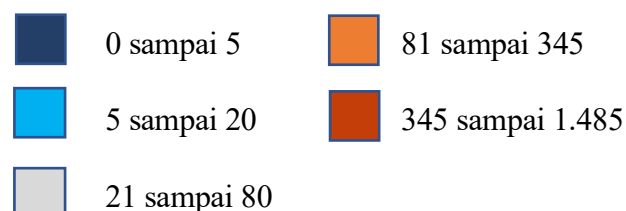
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Epidemiologi

Infeksi DENV pertama kali dilaporkan oleh Benjamin Rush pada tahun 1789 dengan istilah “*Demam Patah Tulang*” karena memiliki gejala artralgia dan myalgia.<sup>27</sup> Saat ini penelitian terakhir menunjukkan 100-400 juta orang yang terinfeksi DENV terjadi setiap tahunnya di lebih dari 120 negara, beban di negara-negara yang terkena dampak juga meningkat, seperti negara-negara di Amerika, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat. Faktor sosial ekonomi juga memiliki pengaruh besar terhadap angka infeksi DENV, dimana angka kejadian infeksi DENV menurun pada negara-negara dengan *Gross Domestic Product* (GDP) yang tinggi dan memiliki fasilitas dan infrastruktur yang baik,<sup>4</sup> namun pada tahun 2000-2007 beban ekonomi tahunan di amerika mencapai 2,1 miliar dollar AS (Amerika Serikat) dan di asean mencapai 950 juta dolar AS.<sup>28,29</sup>



Gambar 2. 1 Rata-rata kejadian demam berdarah tahunan<sup>29</sup>



Proyeksi menunjukkan bahwa *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* kemungkinan besar akan berevolusi di wilayah tropis dan subtropis baru di Amerika Serikat dan Tiongkok, sementara *Aedes aegypti* kemungkinan besar akan berevolusi di wilayah tropis dan subtropis baru di Amerika Serikat dan Tiongkok. *Aedes albopictus* diperkirakan tersebar luas di Eropa, Perancis, Jerman, Amerika Serikat bagian utara, Amerika Selatan bagian utara, dan Afrika Timur.<sup>30</sup> Perubahan lingkungan seperti perubahan iklim dapat mempengaruhi penyebarannya, memerangi perubahan iklim saja tidak akan cukup untuk mencegah penyebaran kedua spesies ini. Penyebaran ini diperkirakan terjadi secara independen dari perubahan lingkungan yang luas. Secara keseluruhan, persebaran kedua spesies ini diperkirakan akan terus berlanjut selama 5 hingga 15 tahun ke depan, terlepas dari perubahan lingkungan.<sup>31</sup> *Aedes albopictus* akan berkembang antara tahun 2030 dan 2050. Proyeksi prevalensi menunjukkan bahwa pada tahun 2050, hampir 50% populasi dunia akan berisiko terkena arbovirus.<sup>30</sup>

Dengue merupakan penyakit virus yang ditularkan melalui nyamuk dan paling penting pada manusia, disebabkan oleh infeksi salah satu dari empat serotipe DENV (DENV-1 hingga DENV-4).<sup>32</sup> Infeksi DENV dapat menimbulkan spektrum manifestasi klinis yang luas, mulai dari sindrom mirip flu ringan yang disebut demam berdarah dengue (DBD), hingga sindrom syok dengue (SSD) yang berpotensi mengancam nyawa. Gejala DBD meliputi demam, mual, muntah, ruam, serta nyeri otot dan sendi, sedangkan pada SSD dapat terjadi perdarahan hebat dan syok yang jika tidak ditangani dapat menyebabkan hingga 20% kasus kematian.<sup>33</sup> Klasifikasi sebelumnya dari Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) membagi kondisi penyakit dengue menjadi tiga kategori: demam tidak terdiferensiasi, DBD, dan demam berdarah dengue (DBD).<sup>34</sup> DBD kemudian diklasifikasikan lagi menjadi empat tingkat keparahan, dengan tingkat III dan IV didefinisikan sebagai SSD. Pada tahun 2009, WHO memperkenalkan klasifikasi kasus yang direvisi, menggantikan klasifikasi sebelumnya dengan kategori dengue probable, dengue tanpa tanda peringatan, dengue dengan tanda peringatan, dan dengue berat.

Dengue merupakan penyakit endemik di lebih dari 100 negara<sup>33</sup> dengan insiden yang meningkat 30 kali lipat dalam 50 tahun terakhir, di mana tingkat insiden tertinggi dilaporkan dari negara-negara Asia.<sup>35</sup> Modernisasi sistem transportasi udara telah memfasilitasi pergerakan DENV dengan mengatasi hambatan geografis dan waktu tempuh, sehingga turut meningkatkan kasus dengue terkait perjalanan.<sup>36</sup> Bukti terkini menunjukkan dengue sebagai penyebab utama demam pada pelancong yang kembali dari Asia Tenggara,<sup>36</sup> dengan kawasan ini secara konsisten menjadi sumber utama infeksi dengue yang didapat selama perjalanan.<sup>37,38</sup>

Indonesia saat ini melaporkan jumlah kasus dengue tahunan tertinggi di Asia, dengan siklus epidemi yang sering terjadi. Pada 2014, seroprevalensi dengue nasional yang disesuaikan mencapai 69,4%, bervariasi dari 33,8% pada kelompok usia 1-4 tahun hingga 89,0% pada kelompok usia 15-18 tahun.<sup>39</sup> Insiden dengue di Indonesia meningkat dalam beberapa dekade terakhir dari 0,05 per 100.000 penduduk pada 1968 menjadi 35-40 per 100.000 penduduk pada 2013. Namun, peningkatan ini mungkin mencerminkan pelaporan kasus yang lebih baik akibat peningkatan pengetahuan dan sistem surveilans yang lebih efektif.<sup>40</sup> Studi terbaru menunjukkan bahwa lebih dari 137 infeksi dengue primer per 1000 anak terjadi setiap tahun di Indonesia, dengan separuh anak terinfeksi DENV setidaknya sekali sebelum usia 5 tahun.<sup>39</sup> Peta risiko dengue global terbaru mengklasifikasikan Indonesia sebagai wilayah dengan risiko sering/terus-menerus bagi pelancong internasional.<sup>37</sup> Indonesia juga secara konsisten diidentifikasi sebagai sumber infeksi DENV pada pelancong,<sup>39</sup> dengan bukti introduksi berbagai garis keturunan DENV.<sup>14,22</sup> Dengan demikian, Indonesia terus berperan sebagai pusat transmisi dan pencampuran DENV.<sup>39</sup>

Sejak laporan pertama dengue di Jakarta dan Surabaya pada 1968, epidemiologi dengue di Indonesia telah mengalami perubahan.<sup>41</sup> Perubahan tersebut meliputi tren wabah demam berdarah dengue (DBD) yang menjadi tidak teratur dengan latar belakang interepidemi yang tinggi, peningkatan usia rata-rata kasus DBD, peningkatan insiden DBD tahunan, serta penurunan tingkat

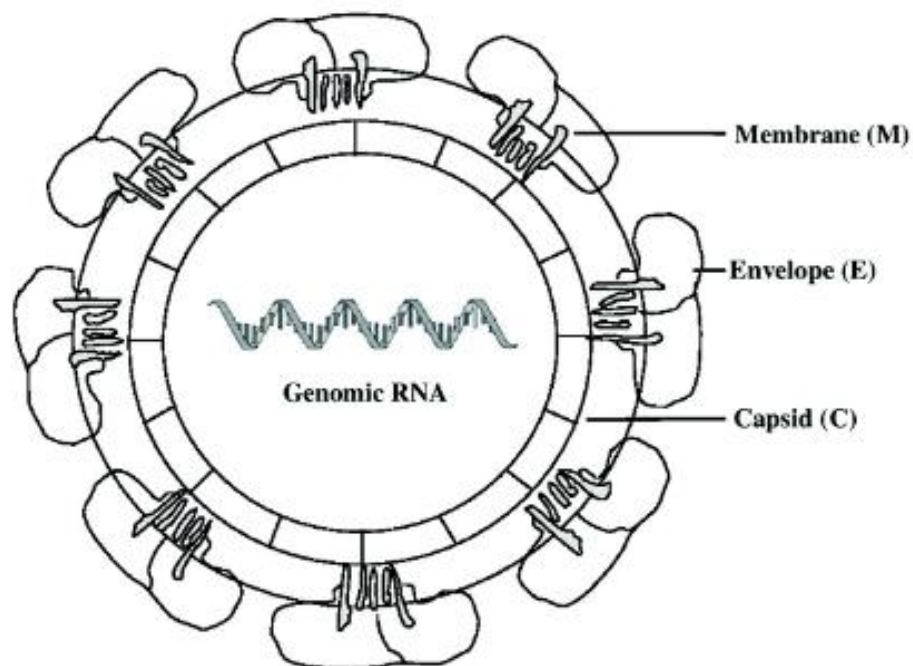
kematian kasus.<sup>41</sup> Berbagai studi telah mengevaluasi faktor-faktor yang mungkin terkait dengan peningkatan insiden atau wabah dengue, termasuk data meteorologis, aktivitas vektor, serta faktor sosio-ekonomi dan lingkungan.<sup>42</sup> Introduksi serotipe, genotipe, dan garis keturunan baru ke suatu negara, diikuti dengan penggantian virus endemik, telah sering dilaporkan untuk semua serotipe.<sup>43</sup> Selain itu, introduksi kelompok virus baru ke populasi yang secara serologis naif berpotensi menyebabkan wabah yang belum pernah terjadi sebelumnya dan dikaitkan dengan manifestasi dengue yang lebih berat.<sup>44</sup> Di Indonesia, studi di beberapa kota menunjukkan bahwa pergantian serotipe, genotipe, dan garis keturunan DENV telah terjadi dan dikaitkan dengan peningkatan insiden dan/atau manifestasi dengue yang lebih berat.<sup>45</sup> Penelitian sebelumnya telah melakukan studi mengenai epidemiologi molekuler dengue di beberapa kota besar Indonesia, termasuk Bali, Jakarta, Jambi, Makassar, Semarang, Sukabumi, Surabaya, dan Purwokerto.<sup>46</sup> Studi serupa juga dilakukan di wilayah lain di Indonesia, baik pada penduduk lokal maupun pelancong yang kembali dari Indonesia.<sup>47</sup>

Dalam beberapa penelitian menunjukkan sebagian kasus infeksi DENV memunculkan gejala neurologis, hal tersebut terbukti dari munculnya gejala neurologis seperti meningitis, encephalofati, myelitis, myositis, and Guillain-Barre Syndrome (GBS) pada pasien dengan diagnosa dengue.<sup>10,11</sup> Dalam sebuah penelitian selama 3 periode di rumah sakit Cipto Mangun Kusumo di Indonesia menunjukkan - bahwa 6% dari 2.441 kasus Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) dengan gejala neurologis menunjukkan manifestasi gangguan sistem saraf pusat (SSP) dan penurunan kesadaran,<sup>48</sup> hal menunjukkan bahwa dengue ensefalopati cukup sering terjadi pada pasien yang terinfeksi dengue dengan gangguan neurologis.<sup>49</sup> Berdasarkan data epidemiologis yang menunjukkan peningkatan signifikan kasus dengue di Indonesia, posisinya sebagai hotspot global penularan DENV, serta temuan manifestasi neurologis yang terkait dengan infeksi dengue, penelitian ini dilakukan untuk lebih memahami dampak infeksi DENV terhadap sistem saraf pusat, khususnya dalam kaitannya dengan integritas sawar darah-

otak dan mekanisme patologis yang mendasarinya. Namun demikian, sampai saat ini belum ada bukti yang jelas hubungan secara langsung mekanisme NS1 mempengaruhi kondisi pasien terutama gangguan neurologis pada pasien dengan infeksi DENV.

## 2.2. Dengue Virus (DENV)

Genom DENV adalah *single positive-stranded ribonucleic acid* (RNA) virus dari famili Flaviviridae; genus Flavivirus.<sup>50</sup> RNA positif disebut demikian karena dapat langsung diterjemahkan menjadi protein. Proses replikasi melibatkan RNA yang berfungsi sebagai cetakan untuk sintesis untai RNA virus baru, yang kemudian digunakan untuk produksi protein. Replikasi cepat ini memungkinkan produksi protein virus dengan cepat. Sampai saat ini, ada 5 tipe serotipe DENV yaitu DENV1-5.<sup>1,51</sup> Dari penelitian sebelumnya didapatkan data bahwa DENV2 adalah serotipe yang paling banyak menyebabkan komplikasi neurologis.<sup>52</sup>



Gambar 2. 2 Struktur Dengue Virus (DENV).<sup>53</sup>

Keberagaman antigenik DENV terwujud dalam empat serotipe berbeda (DEN-1 hingga DEN-4) yang diklasifikasikan berdasarkan variasi pada protein

struktural dan non-strukturalnya. Masing-masing serotipe menunjukkan variasi genetik internal, seperti adanya genotipe A dan B pada DEN-3 yang muncul melalui akumulasi mutasi dan memengaruhi virulensi virus.<sup>54</sup> Infeksi primer oleh suatu serotipe DENV akan membentuk imunitas protektif seumur hidup terhadap serotipe yang sama, namun tidak memberikan perlindungan silang terhadap serotipe lainnya. Fenomena unik terjadi pada infeksi sekunder oleh serotipe berbeda yang justru dapat memicu penyakit lebih berat melalui mekanisme *antibody-dependent enhancement* (ADE).<sup>55</sup> Dinamika epidemiologi dengue menunjukkan pola sirkulasi periodik berbagai serotipe di suatu wilayah selama kurun waktu puluhan tahun. Karakteristik ini menyebabkan terbentuknya imunitas populasi yang tidak sempurna, sehingga penyakit dengue tetap menjadi masalah kesehatan masyarakat yang bersifat endemik dan sulit dieradikasi secara alami.<sup>56</sup>

Virus dengue menyebar antar manusia terutama melalui vektor nyamuk *Aedes*, dengan *Aedes aegypti* sebagai spesies utama penular. Nyamuk ini memiliki karakteristik khas sebagai serangga domestik yang aktif menggigit pada siang hari dan berkembang biak di berbagai wadah air buatan di lingkungan permukiman. Kemampuan adaptasinya yang luar biasa ditunjukkan melalui ketahanan telur yang dapat bertahan dalam kondisi kering selama berbulan-bulan, kemudian segera menetas ketika terkena air. Selain itu, *Aedes albopictus* yang dikenal sebagai 'nyamuk harimau' karena corak tubuhnya yang khas, berperan sebagai vektor sekunder di beberapa wilayah tertentu.<sup>57</sup> Siklus penularan virus dengue dapat dibedakan menjadi tiga pola epidemiologis. Siklus pertama terjadi di ekosistem hutan (siklus enzootik) melibatkan nyamuk *Aedes* dan primata sebagai reservoir alami. Siklus kedua bersifat endemik di daerah pedesaan atau pulau-pulau kecil dengan transmisi terbatas, dimana virus cenderung menghilang seiring berkembangnya kekebalan kelompok. Siklus ketiga dan paling dominan adalah siklus urban/epidemik yang terjadi di kota-kota besar tropis, ditandai dengan wabah periodik yang melibatkan berbagai serotipe virus secara bergantian.<sup>58</sup>

Proses infeksi dimulai ketika virus dari nyamuk terinfeksi masuk ke kulit manusia melalui gigitan. Replikasi primer terjadi pada sel dendritik Langerhans di jaringan subkutan sebelum menyebar ke kelenjar getah bening regional. Selanjutnya, virus menyebar secara sistemik melalui sirkulasi monosit dan makrofag, menginfeksi berbagai organ padat dan sumsum tulang, menyebabkan fase viremia.<sup>59</sup> Infeksi dengue umumnya bersifat self-limiting dengan manifestasi demam dengue (DF) yang sembuh sempurna. Namun pada kasus tertentu dapat berkembang menjadi bentuk berat berupa demam berdarah dengue (DHF) yang ditandai peningkatan permeabilitas vaskular, kebocoran plasma, dan manifestasi perdarahan. Patogenesisnya melibatkan respons imun abnormal berupa badai sitokin yang menyebabkan peningkatan permeabilitas mikrovaskular tanpa disertai proses inflamasi atau vaskulitis, serta gangguan mekanisme regulasi trombosit.<sup>60</sup> Infeksi virus dengue (DENV) terbukti dapat memicu kerusakan endotel dan perdarahan melalui domain III protein envelope (EIII) yang mengaktifkan apoptosis bergantung caspase-3, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penghambatan jalur apoptosis dengan z-DEVD-FMK, kondroitin sulfat B (CSB), atau N-asetil sistein (NAC) berpotensi menjadi strategi terapi untuk mengurangi gejala demam berdarah dengue (DBD).<sup>61</sup> Infeksi DENV juga memicu apoptosis bergantung caspase-3 pada sel manusia yang berkontribusi terhadap patogenesis DBD, sementara sel nyamuk bertahan melalui mekanisme antioksidan dan antiapoptosis, menjelaskan peran nyamuk sebagai vektor efektif.<sup>62</sup>

Genom DENV menghasilkan tiga protein struktural dan tujuh protein non-struktural yang diproduksi dari penyandian poliprotein virus tunggal dan diproses oleh protease sel virus.<sup>63</sup> Dari penelitian sebelumnya didapatkan data bahwa DENV3 adalah serotipe yang paling banyak menyebabkan gejala yang parah.<sup>64</sup> Protein struktural tersebut yaitu C (inti), prM/M (membrane), dan E (envelope), sedangkan protein non-struktural yang dihasilkan adalah NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5.<sup>65</sup> Protein struktural membentuk virion, dan protein nonstruktural berpartisipasi dalam replikasi virus.<sup>66,67</sup> NS1 ditemukan sebagai dimer terikat membran yang sangat stabil dan sebagai

heksamer terikat lipid yang larut dan disekresikan.<sup>68</sup> Dalam sel yang terinfeksi, NS1 disintesis sebagai monomer larut dan dimerisasi setelah modifikasi pasca-translasi di lumen retikulum endoplasma. NS1 yang berhubungan dengan membran ditemukan di kompartemen seluler dan pada permukaan sel.<sup>69</sup> NS1 yang disekresikan diangkut ke permukaan sel dan terakumulasi secara ekstraseluler sebagai heksamer,<sup>70</sup> yang juga berikatan dengan membran sel melalui interaksi dengan glikosaminoglikan tersulfasi spesifik.<sup>71</sup> NS1 yang larut terdapat dalam serum dan cairan tubuh lainnya.<sup>72</sup> Meskipun fungsi katalitik NS1 tidak diketahui, jelas bahwa NS1 penting untuk replikasi RNA virus yang efisien.<sup>68</sup> Protein NS1 juga mengatur permeabilitas endotel dengan cara spesifik jaringan, yang berkorelasi dengan patologi penyakit.<sup>73</sup>

### 2.3. Protein NS1

Sebagai komponen vital flavivirus, protein non-struktural NS1 menunjukkan tingkat konservasi tinggi di antara berbagai anggota genus ini.<sup>74</sup> Virus-virus yang terutama ditularkan melalui gigitan artropoda ini bertanggung jawab atas berbagai penyakit penting secara global, termasuk demam dengue, infeksi West Nile, demam kuning, dan penyakit Zika.<sup>75</sup> Secara struktural, flavivirus merupakan partikel kecil berselubung yang mengandung genom RNA untai tunggal dengan polaritas positif. Genom ini mengkodekan suatu poliprotein besar yang kemudian mengalami proses pemotongan oleh protease virus dan seluler menjadi tiga protein struktural penyusun virion (kapsid, membran, dan envelope) serta tujuh protein non-struktural (NS1 sampai NS5) yang berperan dalam replikasi virus.<sup>76</sup> Keunikan NS1 terletak pada kemampuannya untuk hadir dalam berbagai bentuk molekuler. Dalam sel terinfeksi, protein ini awalnya disintesis sebagai monomer yang kemudian mengalami dimerisasi setelah modifikasi pasca-translasional di retikulum endoplasma. Dimer NS1 yang stabil ini dapat berasosiasi dengan berbagai membran seluler maupun permukaan sel.<sup>77</sup> Selain itu, NS1 juga dapat disekresikan keluar sel dalam bentuk heksamer yang berikatan dengan lipid,<sup>78</sup> dimana bentuk ini mampu berinteraksi dengan komponen permukaan sel seperti glikosaminoglikan tersulfat melalui mekanisme spesifik.<sup>79</sup>

Protein NS1 DENV merupakan glikoprotein 46-kDa yang sangat terkonservasi di antara semua flavivirus.<sup>20</sup> NS1 penting untuk replikasi virus dengan mekanisme yang tidak diketahui yang mungkin melibatkan interaksi dengan NS4A dan NS4B. Awalnya, NS1 diekspresikan sebagai monomer pada sel yang terinfeksi, setelah modifikasi pasca-translasi pada lumen ER, kemudian membentuk homodimer yang terkait dengan membran organel dan membran sel.<sup>20</sup> Meskipun tidak memiliki daerah transmembran, NS1 menempel ke membran sel melalui beberapa jalur. Selain itu, NS1 merupakan satu-satunya protein yang terus menerus disekresi oleh sel inang yang terinfeksi. NS1 disekresikan dalam bentuk heksamer, yang terdiri dari tiga dimer dengan rongga pusat hidrofobik sensitif terhadap deterjen yang membawa muatan ~70 molekul lipid; komposisinya mirip dengan lipoprotein densitas tinggi. Struktur kaya lipid ini dapat membantu NS1 yang disekresikan menempel pada membran sel dengan bergabung dengan glikosaminoglikan (GAGs).<sup>80,81</sup> Namun, mekanisme pasti bagaimana protein NS1 DENV dan komponen virus lainnya berkontribusi terhadap patologi infeksi dan manifestasi klinis yang muncul masih belum sepenuhnya terungkap.

Walaupun tidak memiliki aktivitas enzimatis yang diketahui, NS1 memainkan peran penting dalam mendukung replikasi material genetik virus.<sup>74</sup> Yang lebih menarik, protein ini menunjukkan kemampuan untuk memodulasi permeabilitas pembuluh darah secara selektif sesuai jenis jaringan, yang berkaitan erat dengan manifestasi klinis penyakit.<sup>82</sup> Dari perspektif imunologi, respons antibodi terhadap NS1 dapat memicu kerusakan endotel melalui dua mekanisme utama: reaksi silang dengan komponen sel inang dan pembentukan kompleks imun patogenik yang merangsang produksi autoantibodi terhadap trombosit serta protein matriks ekstraseluler dan mengkativasi jalur apoptosis pada sel.<sup>83</sup> Efek patologis NS1 semakin diperparah oleh kemampuannya dalam mengaktivasi sistem komplemen melalui interaksi dengan antibodi spesifik, baik yang ditujukan terhadap bentuk membran maupun bentuk larutnya.<sup>79</sup> Aktivasi sistem komplemen ini kemudian memicu kaskade patologis yang

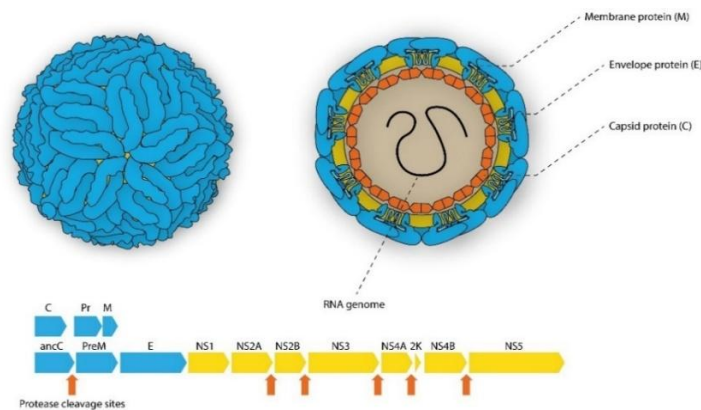
menyebabkan manifestasi khas penyakit berat seperti perdarahan, peningkatan permeabilitas kapiler dan apoptosis pada sel.<sup>79,82</sup> Temuan ini menjelaskan mengapa kadar NS1 dalam sirkulasi sering berkorelasi dengan tingkat keparahan penyakit.<sup>84</sup>

Penelitian mutakhir berhasil mengidentifikasi keberadaan material genetik DENV-RNA dan protein NS1 tidak hanya dalam darah, tetapi juga dalam sampel urin dan saliva pasien. Sebuah penelitian terhadap 14 wisatawan Finlandia yang terinfeksi DF mengungkap pola unik dimana DENV-RNA dalam urin justru dapat bertahan lebih lama dibandingkan dalam sampel serum.<sup>85</sup> Fenomena ini kemudian dikonfirmasi berbagai penelitian lain, membuka peluang baru untuk memperpanjang masa deteksi infeksi hingga fase penyembuhan menggunakan metode molekuler.

Analisis komparatif menunjukkan kadar DENV-mRNA dalam saliva memiliki kesetaraan dengan serum,<sup>85</sup> meski beberapa laporan menemukan sensitivitas lebih rendah namun dengan durasi deteksi lebih panjang.<sup>86</sup> Temuan ini mengindikasikan perbedaan dinamika viral load di berbagai kompartemen biologis. Yang menarik, konsentrasi NS1 urin menunjukkan korelasi signifikan dengan trombositopenia dan proteinuria, sekaligus berasosiasi dengan tingkat viremia serum, menegaskan peran NS1 sebagai penanda utama infeksi aktif dalam urin.<sup>85</sup> Penelitian lain terhadap 96 wisatawan Jepang memperlihatkan keunggulan diagnostik sampel urin dimana NS1 tetap terdeteksi meski sudah tidak terukur dalam serum. Sensitivitas deteksi serum menurun drastis setelah hari ke-10, sementara urin mempertahankan deteksi konsisten (30%) hingga hari ke-14. Pola serupa teramati pada DENV-mRNA urin yang menunjukkan kinerja lebih baik setelah hari ke-11.<sup>87</sup> Analisis lebih mendalam mengungkap korelasi positif antara deteksi NS1 urin dengan keparahan penyakit.<sup>88</sup> Temuan ini mengarah pada dua hipotesis patofisiologis: (1) kebocoran plasma pada DHF, atau (2) replikasi virus langsung di sel ginjal.<sup>89</sup> Namun penting dicatat bahwa semua assay komersial saat ini dikembangkan untuk sampel serum, sehingga validasi lebih lanjut diperlukan untuk aplikasi klinis sampel urin dan saliva. Data

meta-analisis menunjukkan ELISA NS1 urin memiliki spesifisitas sempurna (100%) namun sensitivitas terbatas (20-68%), menekankan perlunya pengembangan metode diagnostik yang lebih optimal.<sup>87</sup>

Protein NS1 diduga dapat mengganggu kaskade koagulasi yang mungkin terjadi melalui gangguan interaksi atau biogenesis partikel lipoprotein endogen. Akumulasi NS1 yang disekresikan dalam serum pasien DHF telah diamati selama fase kritis.<sup>90</sup> Konsentrasi serum NS1 pada pasien DHF dapat mencapai 50 µg/ml, dan konsentrasi tersebut berkorelasi positif dengan tingkat keparahan penyakit. Selama fase pemulihan, NS1 dibersihkan dari sirkulasi melalui efek yang dimediasi antibodi. Protein NS1 yang disekresikan dapat berinteraksi dengan protein komplemen, NS1 pertama kali digambarkan sebagai antigen *Soluble Complement Fixing* (SCF) yang dapat melindungi DENV dari lisis yang bergantung pada komplemen.<sup>79</sup>



Gambar 2. 3 Struktur DENV yang memiliki 3 protein structural dan 7 protein non structural.<sup>91</sup>

Penelitian terbaru telah membuktikan bahwa NS1 memiliki beberapa interaksi yang berbeda, ditemukan adanya penumpukan NS1 sekresi DENV di hati dan sosiasi dengan hepatosit pada tikus yang dipaparkan NS1 melalui intravena.<sup>92</sup> Selain itu, NS1 melalui interaksi dengan glikosaminoglikan (heparan sulfat atau kondrotin sulfat E) atau *Toll Like Receptor* (TLRs) dapat berikatan secara langsung dengan membrane plasma sel epitel dan fibroblastik yang tidak terinfeksi secara in vitro.<sup>93,94</sup> Namun hal yang menarik adalah NS1

memiliki pengikatan sel yang spesifik, dimana NS1 berikatan secara dengan baik pada epitel, mesenkimal sel dan sel darah perifer.

Berbeda dengan infeksi arbovirus lain yang sering menyerang sistem saraf, dengue menunjukkan pola klinis yang unik dengan jarang menyebabkan komplikasi neurologis.<sup>95</sup> Tingkat keterlibatan sistem saraf pusat (SSP) pada pasien dengue ternyata berkorelasi dengan derajat keparahan penyakit, namun menariknya tidak memengaruhi outcome klinis secara signifikan. Mekanisme neuroinvasif DENV masih menjadi teka-teki. Walaupun beberapa penelitian mengindikasikan kemampuan virus untuk secara aktif menembus sawar darah-otak (BBB), bukti konklusif masih kurang. Teori alternatif menyebutkan bahwa virus mungkin melintasi BBB secara pasif melalui mekanisme yang belum sepenuhnya dipahami.<sup>96</sup>

Studi tentang biomarker dengue di cairan serebrospinal (CSF) masih sangat terbatas. Sebuah penelitian inovatif mengevaluasi kinerja uji IgM dan NS1 (Pan-E Dengue Early ELISA) pada sampel CSF pasien dengue dibandingkan kontrol non-dengue yang diperoleh dari otopsi.<sup>84</sup> Hasilnya mengungkap bahwa pada fase viremia, uji NS1 dapat mendeteksi antigen di CSF dengan sensitivitas moderat (50%), lebih rendah dibandingkan sensitivitas di serum yang mencapai 60,4-91,6%. Kombinasi uji NS1 dan IgM meningkatkan akurasi diagnosis, meskipun pola penurunan deteksi NS1 setelah munculnya IgM tetap konsisten seperti yang diamati di serum.<sup>97</sup> Sebuah studi di Brasil menganalisis 209 sampel CSF dari kasus suspek meningitis/meningoensefalitis viral (termasuk 26 kasus fatal) menggunakan berbagai metode termasuk RT-PCR, ELISA NS1, IgM, dan uji cepat IgG. Hasilnya menunjukkan 3,8% sampel (8 kasus) positif DENV, temuan yang konsisten dengan penelitian serupa di Jamaika dan Vietnam.<sup>98</sup> Walaupun masih diperlukan penelitian lebih mendalam, temuan terkini<sup>99</sup> membuka kemungkinan penggunaan kit NS1 serum untuk sampel CSF pada pasien dengue dengan manifestasi neurologis. Strategi kombinasi deteksi IgM dan NS1 tetap direkomendasikan untuk optimalisasi sensitivitas diagnostik.

DENV menginfeksi *host* dengan memanfaatkan sitoskeleton,<sup>100</sup> hal ini telah terbukti dengan analisis sitologi pada saat komunikasi antar sel dan awal internalisasi virus.<sup>101</sup> Terbukti dalam sebuah penelitian bahwa terjadi interaksi secara langsung antara NS1 dan aktin, dimana protein NS1 DENV ditemukan dalam fraksi sitoskeletal sel endotel yang terinfeksi DENV dalam waktu yang relative lambat, hal ini menunjukkan adanya komunikasi antar sel yang terjadi pada infeksi DENV.<sup>102</sup> Dalam terjadinya komunikasi antar sel difasilitasi oleh terowongan yang mengandung banyak aktin yang disebut dengan *Tunneling Nanotubes* (TNT).<sup>103</sup> Penelitian sebelumnya menunjukkan TNT adalah tempat terjadinya transfer langsung sel-sel organel dan molekul sitoplasma dalam saluran membrane tipis yang membentuk jembatan.<sup>104</sup> Penggunaan cryo-EM (*Cryo-Electron Microscopy*), mikroskop cryo-fluoresensi, dan tomografi cryo-elektron kita dapat mengidentifikasi arsitektur dan ultrastructural TNT antar neuron.<sup>105</sup> Penelitian sebelumnya menunjukkan saluran ini dapat digunakan oleh virus dalam transmisi antar sel mereka melalui *gap junction* (GJs), dengan paparan yang minimal terhadap lingkungan ekstraseluler,<sup>106</sup> kondisi ini juga ditemukan pada virus lain dan terjadi pada transfer neuron ke neuron dari kumpulan protein tau patologis pada penyakit neurodegenerative.<sup>107</sup>

#### **2.4. Komplikasi Neurologi Infeksi DENV**

Dengue menempati urutan kedua sebagai penyakit yang ditularkan melalui nyamuk yang paling banyak menginfeksi manusia setelah malaria.<sup>108</sup> Penyakit ini disebabkan oleh empat serotipe virus (DENV1-DENV4) yang memiliki kekerabatan dekat namun berbeda secara antigenik. Nyamuk *Aedes* berperan sebagai vektor penularnya, dengan spektrum manifestasi klinis yang bervariasi dari tanpa gejala hingga kondisi hemoragik yang mengancam jiwa. Organisasi WHO pada tahun 2009 memperbarui panduan klasifikasi dengue dengan memasukkan keterlibatan sistem saraf pusat sebagai kriteria penyakit berat.<sup>108</sup> Dalam beberapa tahun terakhir, terjadi pergeseran pola manifestasi klinis dimana gejala neurologis semakin sering dilaporkan.<sup>109,110</sup> Data epidemiologis menunjukkan prevalensi komplikasi neurologis utama berupa

ensefalopati dan ensefalitis berkisar antara 0,5-6,2% dari total kasus dengue.<sup>110,111</sup>

Laporan kasus manifestasi neurologis DENV telah tercatat di berbagai belahan dunia dengan distribusi usia pasien yang luas, mulai dari bayi 3 bulan hingga lansia 60 tahun.<sup>111,112</sup> Faktor-faktor seperti hipertermia, peningkatan nilai hematokrit, trombositopenia, manifestasi kulit, dan gangguan fungsi hati merupakan prediktor independen komplikasi neurologis.<sup>112</sup> Berbagai gangguan saraf yang dilaporkan meliputi ensefalitis, mielitis, sindrom Guillain-Barré, hingga miositis. Secara serologis, manifestasi ini banyak dikaitkan dengan infeksi DENV-2 dan DENV-3 yang ditemukan pada kasus ensefalitis, meningitis, dan myelitis.<sup>96,113</sup> Temuan menarik juga menunjukkan keberadaan DENV-4 dalam jaringan otak melalui pemeriksaan imunohistokimia serta deteksi pada cairan serebrospinal pasien ensefalitis.<sup>114,115</sup> Patogenesis komplikasi neurologis diduga melalui mekanisme gangguan sistemik multipel yang diinduksi DENV, yang berujung pada ensefalopati.<sup>109,111,113</sup> Meski awalnya dianggap tidak bersifat neurotropik, bukti terbaru menunjukkan kemampuan DENV menginvasi sistem saraf, antara lain melalui deteksi antigen virus di jaringan otak pada kasus fatal,<sup>115</sup> serta konfirmasi keberadaan material genetik virus dan antibodi spesifik dalam CSF pasien ensefalitis.<sup>114</sup>

Protein NS1Ag, suatu glikoprotein esensial untuk replikasi virus, ternyata juga mampu memicu kaskade pelepasan sitokin. Aktivasi dini sel natural killer (NK) akan merangsang diferensiasi sel T helper menjadi sub tipe Th17 dan Th9, yang kemudian membanjiri sistem dengan sitokin proinflamasi seperti interferon-gamma, interleukin-12, IL-4, dan transforming growth factor-beta. Badai sitokin ini merusak integritas BBB, membuka jalan bagi masuknya berbagai mediator inflamasi ke jaringan otak dan memperparah kerusakan neurologis.<sup>116</sup> Dalam perkembangan pemahaman klinis, komplikasi neurologis DENV awalnya dikategorikan berdasarkan mekanisme patogenetiknya menjadi tiga kelompok utama;<sup>116,117</sup> gangguan metabolik (contoh: ensefalopati);<sup>110</sup> invasi virus langsung (termasuk ensefalitis,

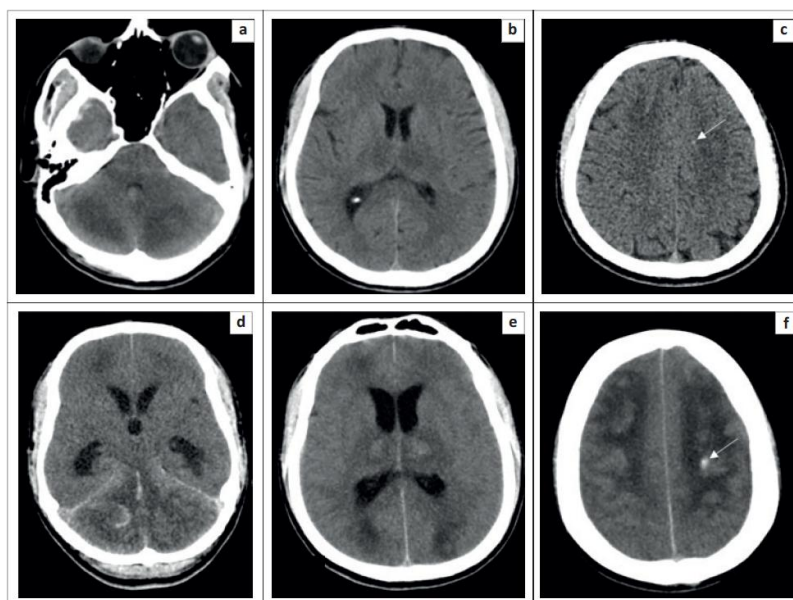
meningitis, miositis, dan mielitis); serta reaksi autoimun (seperti ADEM, neuritis optik, mielitis, dan sindrom Guillain-Barré).<sup>13</sup> Klasifikasi yang lebih mutakhir ditemukan dalam penelitian lain dengan pendekatan yang lebih komprehensif.<sup>118</sup>

Komplikasi neurologi yang dapat terjadi dan memunculkan gejala yang cukup berat adalah ensefalopati, dimana gejala yang muncul adalah demam tinggi, penurunan kesadaran, bahkan sampai kejang.<sup>119</sup> Dalam sebuah kasus infeksi DENV ditemukan komplikasi *subarachnoid haemorrhage* akibat pecahnya aneurisma serebral,<sup>120</sup> pada kasus lain juga didapatkan dimensia yang progresif yang disertai kejang setelah 3 minggu post infeksi DENV.<sup>121</sup> Pada pasien terinfeksi DENV dengan gangguan neurologis didapatkan gambaran *CT-scan* focus perdarahan kecil pada daerah hipodens di serebelar dan subkortikal ventra bilateral, kemudian saat perburukan kondisi pasien didapatkan gambaran peningkatan fokus hemoragik dengan ekstensi intraventrikular, hidrosefalus obstruktif dan edema serebral generalisata (gambar 2.2).<sup>122</sup> Namun, dalam sebuah studi kasus dengue esefalitis didapatkan lesi pada *splenium corpus callosum* yang muncul saat pasien terinfeksi dan menghilang 21 hari setelah onset, hal ini kemungkinan disebabkan oleh reversibilitas edema serebral dan pembersihan virus.<sup>123</sup>

DENV juga dapat menginfeksi neonatus, hal ini terjadi saat ibu mengalami infeksi 10-15 hari sebelum melahirkan, walaupun ibu tidak menunjukkan gejala, namun gejala muncul pada bayi yang dilahirkan.<sup>17</sup> Infeksi DENV juga dapat menyebabkan keluhan yang jarang terjadi seperti ensefalitis yang melibatkan bagian otak seperti thalamus, vermis serebelar, dan preventrikular frontoparietal<sup>124</sup> dan meningkatkan risiko pecahnya kembali aneurisma pada kasus perdarahan subaraknoid dan perdarahan intraventricular akibat dari trombositopenia dan gangguan fungsi trombosit.<sup>125</sup> Dalam definisi dasar neuroinflamasi merupakan mekanisme infeksi otak yang terjadi dalam banyak penyakit *vector-borne*, termasuk DENV. Studi klinis dan eksperimen

mendemonstrasikan bahwa neuroinflamasi memiliki peranan penting dalam infeksi DENV.<sup>126</sup>

Hingga kini, pemahaman tentang proses patologis yang menyebabkan gangguan neurologis pada infeksi DENV masih terbatas. Para ahli meyakini bahwa interaksi kompleks antara faktor virulen virus dan respons imun inang berperan penting dalam memicu berbagai sindrom neurologis terkait dengue. Secara patofisiologis, terdapat tiga mekanisme potensial yang saling berkaitan: (1) invasi langsung virus ke sistem saraf pusat, (2) reaksi autoimun yang tidak terkendali, dan (3) gangguan sistemik yang mempengaruhi keseimbangan metabolik.<sup>127</sup> Meski DENV secara historis dikategorikan sebagai virus non-neurotropik, bukti klinis terbaru menunjukkan fenomena yang bertolak belakang. Deteksi partikel virus dalam cairan serebrospinal, disertai kerusakan struktural pada sawar darah-otak (BBB), semakin memperkuat hipotesis bahwa virus ini sebenarnya memiliki kemampuan neurotropik tertentu.<sup>127</sup>



Gambar 2. 4 CT-Scan pasien terinfeksi DENV

*Keterangan: CT-Scan menunjukkan area hipodens simetris tidak jelas yang pada thalami bilateral, white matter serebelar dan subkortikal frontal bilateral dan materi putih dalam (a – c). Fokus hiperdens kecil terlihat di beberapa wilayah ini (panah putih). CT-Scan berulang dilakukan sehari kemudian, peningkatan hipodensitas dan fokus perdarahan dengan perluasan perdarahan intraventrikular dan akibat obstruksi hidrosefalus (d – f).<sup>122</sup>*

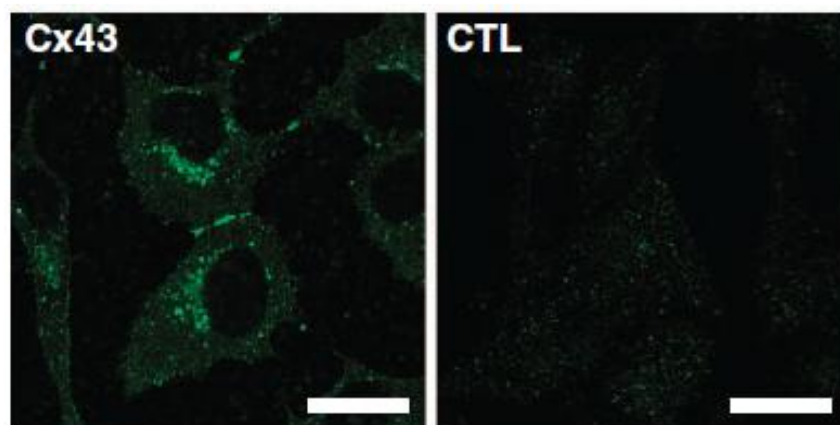
Kebocoran penghalang darah-otak (BBB) yang dipicu oleh peradangan sistemik secara signifikan melibatkan peningkatan ekspresi dan aktivasi hemichannel Cx43 pada sel endotel dan astrosit. Penghambatan Cx43 melalui peptida target (Gap27, Tat-Gap19) atau khelasi kalsium (BAPTA-AM) terbukti efektif mencegah kebocoran BBB dan astrogliosis, menjadikan Cx43 sebagai target terapi potensial untuk mempertahankan integritas BBB selama inflamasi.<sup>128</sup> Connexin 43 (Cx43) memainkan peran penting dalam pembentukan dan fungsi gap junction (GJ) yang krusial untuk komunikasi antarsel, termasuk pada sistem penghalang darah-otak (BBB). Fosforilasi Cx43 dapat memodulasi permeabilitas dan fungsi GJ, yang berdampak signifikan terhadap integritas BBB dalam kondisi fisiologis maupun patologis.<sup>129</sup>

Observasi klinis menunjukkan terlibatnya neuroinflamasi dalam penyakit yang disebabkan DENV, termasuk tanda-tanda sistem sinyal di otak, yang disebut dengue encephalitis. Aktivasi sel mikroglia telah diketahui dalam kasus infeksi DENV pada otak, aktivasi sel mikroglia adalah mekanisme penting dalam proses neuroinflamasi. Selain itu, pada penelitian lain ditemukan adanya sel CD8<sup>+</sup> T yang efektif berada di dalam otak pasien yang terdiagnosis dengue encephalitis.<sup>130</sup> Infeksi DENV dapat memunculkan gejala neurologis dengan cara mempengaruhi sawar darah-otak, dimana hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan otak, hilangnya neuron, dan aktivasi glial.<sup>131</sup> Gangguan pada sawar darah-otak ini memungkinkan masuknya mediator inflamasi dan sel imun ke dalam sistem saraf pusat, memperparah kerusakan saraf. Namun, mekanisme pasti yang menghubungkan infeksi DENV dengan munculnya gejala neurologis masih belum sepenuhnya dipahami.

## **2.5. Apoptosis dan *Gap Junction***

Apoptosis penting untuk organogenesis dan pembentukan sinapsis dalam sistem saraf pusat (SSP) yang sedang berkembang, namun neuron pada otak juga harus terjaga untuk menjalankan fungsi normalnya.<sup>132</sup> Kehilangan atau kematian neuron berlebihan terjadi pada banyak kondisi penyakit atau cedera, seperti stroke, penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson, dan penyakit Huntington.<sup>133</sup>

Modulasi *Gap Junction Intercellular Communication* (GJIC) dapat mempengaruhi pertumbuhan sel dan kelangsungan hidup neuron. Connexin43 (Cx43) merupakan anggota penting dari keluarga protein (GJs) yang didistribusikan secara luas di berbagai jaringan dan organ vertebrata, termasuk manusia. Perubahan level mRNA Cx43 telah diamati pada banyak penyakit yang berhubungan dengan SSP, dan Cx43 dapat meningkat atau menurun pada sel otak yang terluka.<sup>134</sup>



Gambar 2. 5 Peningkatan apoptosis pada sel HeLa yang mengekspresikan Cx43 dibandingkan control.<sup>135</sup>

Cx43 terbukti dapat menginduksi apoptosis pada sel glioblastoma manusia, hal ini terjadi melalui jalur Casp3 dan dikonfirmasi dengan annexin V.<sup>136</sup> Penelitian lain menunjukkan peningkatan apoptosis pada sel HeLa yang mengekspresikan Cx43 dibandingkan sel HeLa yang tidak mengekspresikan Cx43 (kontrol) saat diinduksi oleh streptonigrin dan  $\alpha$ -Fas.<sup>135</sup> Peningkatan level mRNA Cx43 juga ditemukan dalam kultur sel osteoblast yang mengekspresikan N-cadherin yang diinduksi oleh TGF- $\beta$ 1 melalui aktivasi jalur Smad3.<sup>25</sup> Dalam penelitian selanjutnya didapatkan bahwa inhibitor Cx43 pada sel SH-SY5Y dapat mempengaruhi kemampuan sel dalam mengatasi cedera dengan mengurangi komunikasi sel ke sel yang di mediasi Cx43 dan menimbulkan efek neuroprotektif.<sup>137</sup> Cx43 juga meningkat pada *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) yang distimulasi dengan Lipopolisakarida (LPS) kemudian memediasi stress oksidatif dan opoptosis pada sel.<sup>138</sup> Selain peran Cx43 dalam mempengaruhi apoptosis melalui komunikasi antarsel, penelitian

terbaru menunjukkan peran Caspase-3 dalam proses apoptosis pada sel PBMC,<sup>139</sup> namun tidak hanya sebatas apoptosis tetapi juga dalam mekanisme kematian sel yang di akibatkan stress oksidatif dan infeksi.

Penelitian terbaru memperluas pemahaman tentang peran caspase-3 tidak hanya dalam apoptosis tetapi juga dalam mekanisme kematian sel akibat inflamasi dan infeksi. Pada sel PBMC yang dipaparkan suplemen astaxanthin, terjadi peningkatan kadar caspase-3 sebagai respons terhadap modulasi apoptosis.<sup>140</sup> Penelitian lain menunjukkan bahwa caspase-3, sebagai penanda apoptosis utama, secara signifikan lebih tinggi diekspresikan dalam sel PBMC pasien NSCLC dibandingkan dengan jaringan parakanker dan kelompok kontrol sehat, mengindikasikan aktivasi jalur caspase-3 menjadi penanda potensial apoptosis pada sel PBMC.<sup>141</sup> Penurunan level mRNA caspase-3 oleh D4T dalam sel PBMC menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki efek anti-apoptotik yang kuat, didukung oleh peningkatan protein pro-survival (Bcl2) dan aktivasi jalur autofagi. Temuan ini memperkuat peran caspase-3 sebagai penanda kunci apoptosis dalam PBMC dan mengindikasikan potensi terapeutik D4T dalam modulasi kematian sel terprogram dan respon inflamasi.<sup>142</sup> Temuan ini menunjukkan bahwa caspase-3 berfungsi sebagai molekul multifungsi yang dapat terlibat dalam berbagai bentuk kematian sel, termasuk dalam konteks stres akibat anestesi dan infeksi. Hubungan antara Cx43 dan caspase-3 semakin memperkuat konsep bahwa komunikasi antarsel melalui *gap junction* dapat memodulasi berbagai jalur kematian sel termasuk apoptosis. Selain penanda apoptosis klasik seperti aktivasi caspase-3 dan modulasi Cx43, viabilitas mitokondria yang dinilai melalui pewarnaan JC-1 juga menjadi parameter krusial dalam mengevaluasi kematian sel,<sup>143</sup> di mana kemungkinan penurunan potensial membran mitokondria sering berkorelasi dengan tahap awal apoptosis yang dipicu oleh stres seluler.

Hasil penelitian mengkonfirmasi bahwa kematian sel apoptosis dapat dinilai melalui aktivasi caspase-3 dan penurunan potensial membran mitokondria, yang menjadi penanda kunci dalam jalur intrinsik apoptosis pada sel melanoma.<sup>144</sup> Penurunan potensial membran mitokondria yang terdeteksi

melalui pewarnaan JC-1, bersamaan dengan peningkatan aktivitas caspase-3, membuktikan bahwa disfungsi mitokondria merupakan penanda kunci kematian sel apoptosis yang potensial.<sup>145</sup> Penurunan apoptosis pada sel granulosa (GCs) kelompok PCOS-GH, yang ditandai dengan berkurangnya ekspresi Bax, caspase-3, dan caspase-9, sejalan dengan peningkatan potensial membran mitokondria yang diukur melalui pewarnaan JC-1, mengkonfirmasi peran kunci integritas mitokondria dalam regulasi kematian sel.<sup>146</sup> Dalam penelitian lain, pewarnaan JC-1 secara efektif mendeteksi disfungsi mitokondria yang diinduksi triclosan pada sel PBMC manusia yang membuktikan utilitasnya sebagai penanda sensitif untuk menilai gangguan fungsi mitokondria akibat paparan toksik.<sup>147</sup> Pewarnaan JC-1 terbukti sebagai penanda sensitif untuk menilai disfungsi mitokondria dan peningkatan apoptosis pada sel PBMC pasien HIV naif terapi, sehingga memvalidasi perannya sebagai alat evaluasi kerusakan seluler pada kasus infeksi.<sup>143</sup> Hal ini menunjukkan bahwa JC-1 merupakan penanda fungsi mitokondria yang potensial pada PBMC, dengan kemampuan untuk mendeteksi perubahan potensial membran mitokondria secara sensitif dan berkorelasi kuat dengan mekanisme apoptosis, sehingga dapat menjadi alat yang andal dalam evaluasi kesehatan seluler dan respons terhadap berbagai stimulus patologis atau terapeutik.

## **2.6. *Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)***

*Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)* adalah sel darah yang memiliki nukleus bulat seperti limfosit, monosit, atau makrofag. Sel darah ini merupakan komponen penting dalam sistem imun untuk melawan infeksi dan beradaptasi dengan penyusup. Sel-sel ini dapat diekstraksi dari darah utuh menggunakan ficoll, polisakarida hidrofilik yang memisahkan lapisan darah, diikuti oleh sentrifugasi gradien, yang akan memisahkan darah menjadi lapisan atas plasma, diikuti oleh lapisan bawah PBMC, lalu sebagian kecil sel polimorfonuklear (seperti neutrofil dan eosinofil) dan terakhir lapisan bawah eritrosit. Sel PBMC memberikan respons selektif terhadap sistem imun dan merupakan sel utama dalam imunitas tubuh manusia. Sel ini mengandung

beberapa jenis sel seperti limfosit, monosit, atau makrofag. Karena darah tepi adalah tempat terjadinya paparan bahan kimia, PBMC yang sangat penting ini rentan dipengaruhi oleh obat-obatan dan bahan kimia. Inilah sebabnya mengapa ketersediaan PBMC dari darah tepi sangat penting bagi para peneliti yang mempelajari toksisitas obat atau senyawa kimia baru.<sup>148</sup>

Sel PBMC merupakan subpopulasi leukosit yang berperan dalam imunologi selular. Sel-sel ini terdiri dari limfosit dan monosit pada manusia. Persiapan PBMC dari darah untuk kultur sel adalah langkah pertama yang krusial. Teknik isolasi PBMC sudah dikenal dengan baik di banyak laboratorium, dan protokol yang sesuai telah ditetapkan untuk berbagai spesies baik manusia dan mamalia.<sup>149</sup> Aktivasi sel PBMC yang meningkat pada sel dengan infeksi DENV menunjukkan keterkaitan antara peningkatan jumlah PBMC dengan infeksi yang disebabkan oleh DENV.<sup>150</sup> Dalam penelitian virus terutama DENV, sel PBMC telah menjadi pilihan utama sebagai sel yang dapat memberikan gambaran infeksi DENV yang dapat menyebabkan apoptosis.<sup>151</sup> Monosit dan makrofag telah lama dianggap sebagai sel target utama infeksi DENV. Namun, pemulihan DENV atau antigen DENV dari monosit pasien dengue memiliki tingkat keberhasilan yang bervariasi, dalam salah satu penelitian terdahulu dengan PBMC telah terbukti bahwa aktivasi PBMC oleh DENV dapat menyebabkan depotensiasi terapi.<sup>152</sup>

Selain itu, korelasi positif antara apoptosis, kerusakan DNA, dan stres oksidatif ditemukan pada PBMC yang terinfeksi DENV2, yang membuka jalan bagi penentuan hubungan imunopatologis yang masuk akal yang berkontribusi terhadap patogenesis penyakit.<sup>139</sup> Penelitian sebelumnya menunjukkan respon PBMC terhadap infeksi DENV dengan meningkatnya level RNA DENV pada PBMC yang peningkatan jumlahnya berkaitan dengan manifestasi klinis yang muncul pada pasien.<sup>153</sup> Sel PBMC memiliki beberapa subset yang memiliki fungsi yang berbeda, dimana terbukti bahwa subset CD16+ adalah yang paling banyak menghasilkan sitokin pro inflamasi yang dapat memicu proses apoptosis.<sup>154</sup> Dalam penelitian pada anak, terbukti bahwa infeksi DENV pada

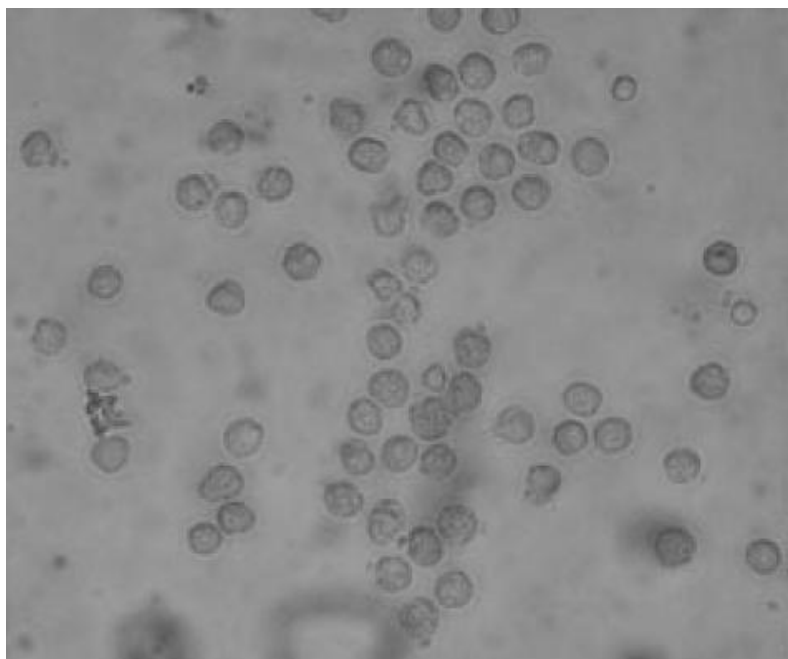
sel PBMC dapat memodulasi sitokin pro inflamasi yang menyebabkan manifestasi yang lebih buruk pada pasien yang terinfeksi DENV.<sup>155</sup> Penggunaan sel PBMC untuk penelitian infeksi DENV juga sudah divalidasi dengan menggunakan *Single Cell RNA Sequencing* (scRNAseq), dimana didapatkan hasil bahwa infeksi DENV eksperimental dan alami memiliki respon yang sama pada kultur PBMC.<sup>156</sup>

Studi terbaru mengungkap peran kritis monosit dalam patogenesis berbagai infeksi virus melalui interaksinya dengan protein non-struktural (NS). Pada infeksi dengue, protein NS1 menunjukkan kemampuan unik dalam memodulasi respons imun melalui interaksi dengan lipid spesifik. Ketika monosit-derived macrophages (MDMs) dari pasien dengue dikultur dengan NS1 dan berbagai lipid, terjadi peningkatan signifikan IL-1 $\beta$  terutama dengan LDL dan penurunan dengan HDL. Lebih menarik lagi, MDMs dari pasien dengan riwayat DHF menunjukkan regulasi negatif gen RPLP2 yang berperan dalam replikasi virus ketika dikultur dengan NS1 dan PAF atau LDL.<sup>157</sup>

Monosit juga berperan dalam mekanisme clearance sel terinfeksi melalui antibodi NS1. Baik IgG maupun IgA spesifik NS1 mampu memediasi fagositosis sel terinfeksi dengue secara Fc $\gamma$ RI- dan Fc $\alpha$ RI-dependent, namun proses ini dihambat oleh keberadaan NS1 soluble yang berfungsi sebagai "immunological chaff".<sup>158</sup> Pada model lain, NS1 dengue terbukti menginduksi aktivasi phospholipase A2 (PLA2) dan produksi prostaglandin (PGE2 dan PGD2) dalam monosit manusia, dengan peningkatan signifikan cPLA2 dan sPLA2 pada 12 jam pertama. Pola sitokin yang dihasilkan menunjukkan peningkatan IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , dan IL-10 yang berkontribusi pada kebocoran vascular.<sup>159</sup> Pada infeksi Zika, monosit yang terinfeksi melepaskan eksosom (M $\phi$  exo ZIKV) yang mengandung RNA virus dan protein E/NS1. Eksosom ini memfasilitasi transmisi virus antarsel dan aktivasi sel naif, menunjukkan peran baru monosit dalam penyebaran virus.<sup>160</sup> Mekanisme serupa juga ditemukan pada norovirus, dimana protein NS1-2 memodulasi berbagai jalur imun termasuk signaling NF $\kappa$ B dan MAPK dalam monosit.<sup>161</sup> Yang menarik, respons

antibodi terhadap NS1 Zika pada manusia didominasi IgG1 dan mampu memediasi ADCC melalui aktivasi sel NK, menunjukkan potensi vaksin berbasis NS1.<sup>162</sup> Efek opsonisasi ini ditunjukkan melalui peningkatan degranulasi NK sel dan lisis sel target yang mengekspresikan NS1.

Kumpulan bukti dari berbagai studi secara konsisten menunjukkan bahwa monosit merupakan sel kunci dalam memediasi berbagai efek patogenik protein NS virus, sekaligus memainkan peran ganda dalam proteksi dan patogenesis.<sup>157-162</sup> Kemampuannya dalam memproses antigen, memproduksi sitokin, melepaskan eksosom, dan berinteraksi dengan sistem komplemen membuat monosit menjadi model ideal untuk mempelajari mekanisme penyakit virus dan pengembangan terapi baru. Temuan bahwa protein NS dari berbagai virus (dengue, Zika, norovirus) menunjukkan efek serupa pada monosit semakin memperkuat validitas pendekatan ini dalam penelitian virologi molekuler.

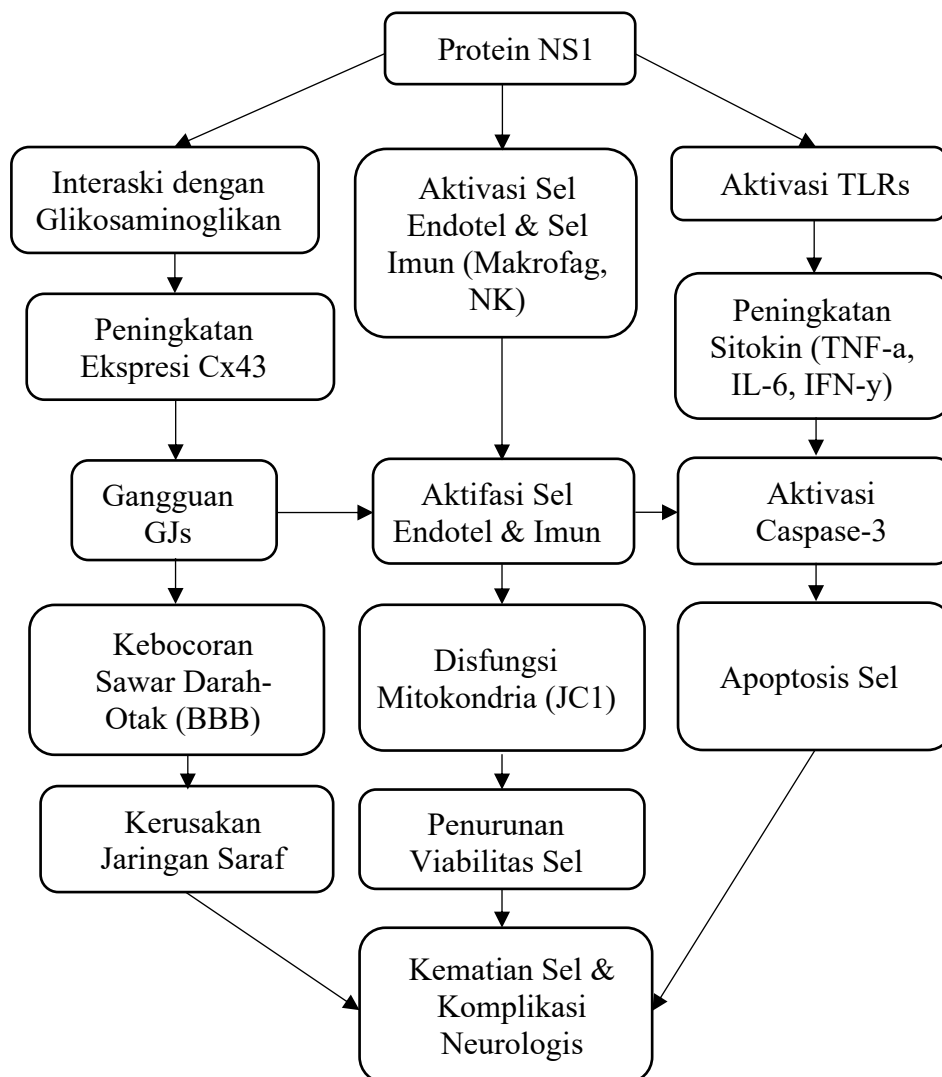


Gambar 2. 6 Kultur Sel PBMC.<sup>151</sup>

Kultur sel PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) menawarkan potensi penelitian yang sangat besar dalam menilai efek NS1 terhadap *gap junction* dan apoptosis sel. Sebagai sel imun yang mudah diisolasi, PBMC

memungkinkan eksperimen *in vitro* yang relevan dengan kondisi fisiologis. Genom DENV diketahui mengganggu komunikasi antar sel melalui *gap junction* yang dapat memengaruhi respon imun, namun efek NS1 secara langsung terhadap *gap junction* pada kultur PBMC belum diketahui dengan jelas. Dengan memanfaatkan kultur PBMC, peneliti dapat memeriksa bagaimana NS1 memodulasi sinyal antar sel, mengganggu homeostasis, dan memicu apoptosis. Studi menggunakan PBMC tidak hanya memberikan wawasan tentang patogenesis virus, tetapi juga dapat membuka jalan bagi pengembangan ilmu baru untuk mencegah disfungsi seluler yang disebabkan oleh infeksi virus.

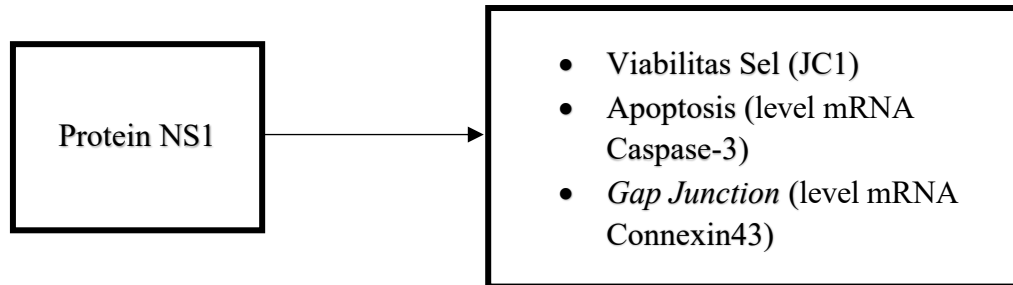
## 2.7. Kerangka Teori



## 2.8. Kerangka Konsep

Variabel Independent

Variabel Dependent



## 2.9. Hipotesis

Paparan NS1 berperan dalam interaksi antar Ssel PBMC melalui *gap junction* yang diukur dengan Cx43, Caspase-3 dan JC-1.

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Definisi Operasional

Dalam penelitian ini yang menjadi variabel bebas adalah protein NS1 Recombinant dan variabel terikat adalah apoptosis sel yang dinilai dengan level mRNA protein pro-apoptosis caspase-3, viabilitas sel yang dinilai dengan pewarnaan sel JC-1, serta GJs yang dinilai dengan level mRNA protein Connexin43. Metode pewarnaan sel adalah dengan JC-1 untuk menilai potensial membran mitokondria dinilai dengan mikroskop fluorescence. Analisis level mRNA protein pro apoptosis caspase-3 dan level mRNA protein Connexin43 dinilai menggunakan metode RT-qPCR.

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala Ukur
<b>NS1</b>	Protein NS1 adalah protein non-struktural dari DENV yang digunakan sebagai perlakuan terhadap sampel.	Mikropipet	Ordinal
<b>Caspase 3</b>	Protein yang berperan dalam apoptosis sel. Protein ini digunakan sebagai penanda apoptosis pada sampel.	RT-PCR	Numerik
<b>Connexin43</b>	Protein yang menjadi komponen terbesar dalam GJs. Protein ini digunakan sebagai penanda GJs pada sampel.	RT-PCR	Numerik
<b>Viabilitas Sel</b>	Viabilitas Sel dinilai melalui potensial membran mitokondria dengan fluoresensi. Pewarnaan JC-1 digunakan untuk menilai viabilitas sel pada sampel.	Mikroskop Fluoresens	Numerik

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

### 3.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan studi eksperimental di laboratorium secara *in vitro* dengan menggunakan kultur sel PBMC yang dipaparkan dengan NS1. Kultur PBMC adalah kultur sel yang berisi monosit, dimana monosit berperan penting pada infeksi DENV. Penelitian ini akan membandingkan kelompok sampel PBMC yang dipaparkan NS1 dengan kelompok sampel kontrol yang tidak dipaparkan NS1 untuk menilai efek NS1 terhadap komunikasi antar sel dan apoptosis yang dinilai melalui ekspresi protein Connexin43 dan Caspase-3 menggunakan RT-PCR, kemudian untuk viabilitas sel dilakukan pewarnaan JC-1 dan dinilai dibawah mikroskop fluoresens.

### 3.3. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Muhammdiyah Sumater Utara dengan memenuhi persyaratan dan standar laboratorium yang berlaku. Pelaksanaan riset direncanakan akan berlangsung dalam waktu 1 Tahun.

No	Kegiatan Penelitian	Bulan ke-1	Bulan ke-3	Bulan ke-5	Bulan ke-7	Bulan ke-9	Bulan ke-11
1	Studi Literatur	✓					
2	Penyusunan Proposal	✓	✓				
3	Pengumpulan Sampel PBMC		✓				
4	Analisis Laboratorium			✓	✓		
5	Analisis Data					✓	✓
6	Pelaporan Hasil						✓

Tabel 3. 2 Timeline penelitian

*Keterangan: Tabel tersebut menyajikan timeline kegiatan penelitian mulai dari studi literatur hingga pelaporan hasil, dengan tanda centang (✓) menunjukkan bulan pelaksanaan setiap kegiatan*

### 3.4. Populasi dan Sampel

#### a. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah sel mononuklear darah perifer (*Peripheral Blood Mononuclear Cells / PBMC*) yang diisolasi dari darah manusia sehat. Populasi target adalah PBMC dari individu manusia sehat untuk menilai peran protein NS1 terhadap level mRNA Cx43, caspase-3, dan viabilitas mitokondria.

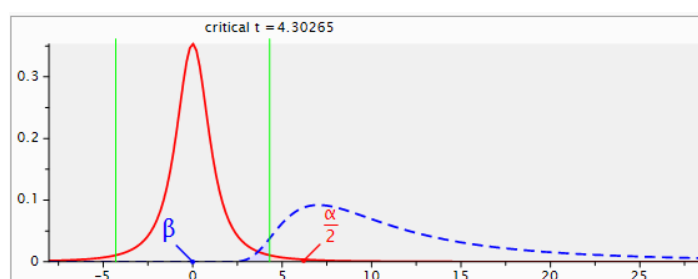
#### b. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel mononuklear darah perifer (PBMC) yang diisolasi dari darah tiga donor sehat ( $N = 3$  replikasi biologis). Setiap sampel PBMC dari masing-masing donor dibagi ke dalam tiga kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (tanpa paparan NS1), kelompok perlakuan dengan paparan NS1 sebesar  $1 \mu\text{g/mL}$ , dan kelompok perlakuan dengan paparan NS1 sebesar  $5 \mu\text{g/mL}$ . Pembagian ini dilakukan untuk menilai viabilitas sel dan mengoptimalkan dosis paparan NS1 menggunakan pewarnaan JC-1. Selanjutnya, untuk analisis level mRNA gen Cx43, caspase-3, dan GAPDH sebagai gen referensi, hanya dua kelompok digunakan, yaitu kontrol dan perlakuan dengan dosis NS1 terpilih berdasarkan hasil optimasi viabilitas sebelumnya. Dalam penelitian ini masing-masing sampel dari kelompok perlakuan dilakukan replikasi teknis sebanyak 3 kali ( $n=3$ ).

#### c. Jumlah sampel

Jumlah sampel penelitian ini didapatkan dengan menggunakan perhitungan aplikasi GPower. Aplikasi GPower adalah perangkat lunak yang digunakan untuk menghitung kekuatan (power) statistik, ukuran sampel, dan ukuran efek untuk berbagai jenis analisis statistik. GPower memungkinkan pengguna untuk memasukkan ukuran efek (effect size), yang merupakan ukuran seberapa besar efek yang diharapkan dalam penelitian, berdasarkan studi sebelumnya atau estimasi yang realistis. Selain itu, pengguna dapat menetapkan tingkat signifikansi ( $\alpha$ ) dan kekuatan yang diinginkan ( $1 - \beta$ ), yang membantu menentukan seberapa

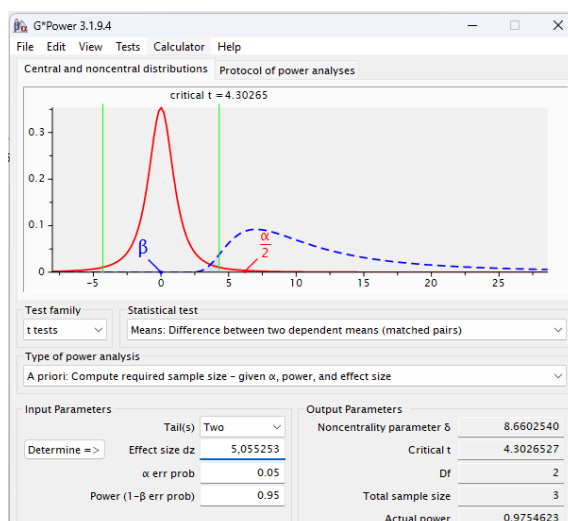
besar risiko yang ingin diambil peneliti dalam menolak hipotesis. GPower juga menyediakan grafik yang menunjukkan hubungan antara ukuran sampel, ukuran efek, dan kekuatan, serta output yang mencakup informasi penting yang dapat digunakan untuk menulis laporan penelitian.<sup>163</sup>



Gambar 3. 1 Grafik power sampel penelitian dengan aplikasi GPower

*Keterangan: Hasil analisis GPower menunjukkan nilai t-kritis 4,30265 dengan distribusi efek perlakuan ( $H_1$ ) bergeser ke kanan. Area biru setelah t-kritis mengindikasikan power statistik yang memadai (>80%) untuk mendeteksi efek jika effect size  $\geq 0,2$*

Untuk menentukan jumlah sampel penelitian menggunakan GPower, dibutuhkan beberapa data yaitu distribusi probabilitas (*tails*), ukuran efek ( $d$ ), tingkat signifikansi ( $\alpha$ ) dan kekuatan ( $1 - \beta$ ). Dalam penelitian ini *tails* yang digunakan adalah *Two-Tails* karena lebih konservatif dan mempertimbangkan kemungkinan perbedaan di kedua arah, sehingga bisa digunakan untuk menyimpulkan apakah ada perbedaan yang signifikan secara statistik, tanpa membuat asumsi tentang arah perbedaannya. Untuk menentukan ukuran efek, digunakan data dari penelitian sebelumnya yang dianalisis menggunakan *effect size calculator* yang juga kita dapatkan dalam paket aplikasi GPower, dari penelitian sebelumnya didapatkan data rata-rata ukuran efek adalah 5,055253.<sup>164-166</sup> Tingkat signifikansi yang digunakan adalah  $\alpha < 0,05$  dimana ini adalah tingkat signifikansi yang paling umum digunakan dalam penelitian biomedis. Kekuatan analisis ditentukan dengan rumu ( $1 - \beta$ ), dimana  $\beta$  adalah probabilitas untuk gagal menolak hipotesis nol yang sebenarnya salah. Kekuatan analisis yang umum digunakan adalah  $1 - \beta = 0,95$  yang artinya 95% kemungkinan untuk mendeteksi efek yang nyata jika efek tersebut benar-benar ada dalam populasi.



Gambar 3. 2 Input data pada aplikasi GPower

Data yang telah terkumpul dapat kita olah ke dalam aplikasi GPower untuk menghitung berapa jumlah sampel yang diperlukan untuk melakukan penelitian dengan power yang cukup. Maka hasil dari perhitungan GPower didapatkan hasil bahwa sampel yang dibutuhkan adalah 3 sampel dengan *Actual Power* = 0.9754623. *Actual Power* adalah probabilitas aktual untuk mendeteksi efek yang nyata jika efek tersebut ada, nilai *Actual Power* = 0.9754623 menyatakan bahwa penelitian ini memiliki kemungkinan tinggi (97,5%) untuk mendeteksi efek yang ada jika efek tersebut benar-benar ada. Ini adalah indikator positif bahwa hasil sebuah penelitian dapat dianggap valid dan dapat diandalkan.

**t tests – Means: Difference between two dependent means (matched pairs)**  
**Analysis:** A priori: Compute required sample size  
**Input:** Tail(s) = Two  
 Effect size dz = 5,055253  
 $\alpha$  err prob = 0.05  
 Power (1- $\beta$  err prob) = 0.95  
**Output:** Noncentrality parameter  $\delta$  = 8.6602540  
 Critical t = 4.3026527  
 Df = 2  
 Total sample size = 3  
 Actual power = 0.9754623

Gambar 3. 3 Hasil analisis data pada aplikasi GPower

### **3.5. Metode Penelitian**

#### **3.5.1. Kultur sel PBMC**

Sel PBMC didapatkan dari darah yang diisolasi dengan menggunakan histopaque dan dimasukkan dalam *micro tube*, kemudian ditambahkan dengan media kultur RPMI+10%FBS sehingga menjadi bentuk sediaan suspensi. Jumlah sel yang terdapat dalam suspensi dihitung dengan menggunakan trypan blue untuk mengetahui berapa jumlah sel PBMC dalam setiap ml suspensi sebelum di masukkan dalam *cryotube*. Suspensi dari setiap sampel kemudian dibagi dalam 6 sediaan *cryotube*, dimana dalam setiap *cryotube* berisi suspensi (500  $\mu$ L ) yang didalamnya terdapat sel sebanyak  $5 \times 10^5$  sel PBMC untuk di simpan dalam freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Untuk melakukan kultur, sel dari setiap sampel dimasukkan dalam sumur *24-well plate*, dimana dalam setiap sumur dimasukkan sejumlah  $5 \times 10^5$  sel PBMC, kemudian setiap sampel dibagi dalam 4 sumur yang terbagi menjadi 2 sumur untuk sampel kontrol pemeriksaan RT-qPCR dan pewarnaan JC-1, kemudian 2 sumur untuk sampel pelakuan dengan pemeriksaan RT-qPCR dan pewarnaan JC-1. Untuk pewarnaan JC-1, sebelum memasukkan sel ke dalam sumur, pada dasar sumur terlebih dahulu diletakkan *round circle glass cover slip* yang sudah di lapisi dengan poly-L-lysine untuk mendukung penempelan kultur sel. Kemudian sel dikultur dalam media RPMI yang dilengkapi dengan 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*). Sel-sel ini diinkubasi dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C}$  yang dilengkapi dengan 5%  $\text{CO}_2$  dan 95% udara lembab selama 24 jam.

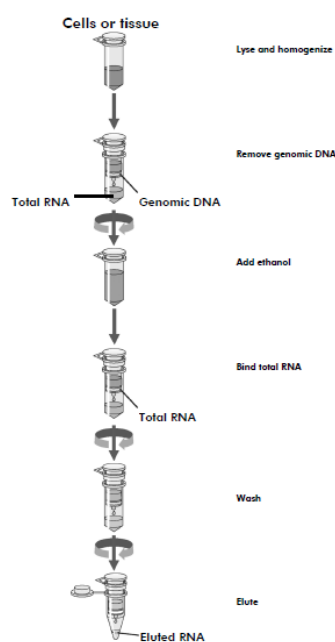
#### **3.5.2. Protein NS1 rekombinan**

Protein NS1 rekombinan dari DENV-2 (AAC59275) yang diperoleh dari MedChemExpress, USA (*United State of America*). Protein ini diproduksi dalam sel HEK293 dengan kemurnian lebih dari 95%, sebagian besar terdiri dari bentuk oligomer sebagaimana dikonfirmasi oleh pewarnaan perak dan uji western blot, dan disertifikasi oleh produsen sebagai bebas dari kontaminan endotoksin. NS 1 kemudian dipaparkan pada kultur sel PBMC untuk selanjutnya dinilai apakah dapat mempengaruhi GJs dan berdampak

pada viabilitas sel dengan menggunakan metode JC-1.

### 3.5.3. Isolasi RNA

Total RNA diekstraksi dari sel PBMC yang menjadi sampel tanpa perlakuan NS1 dan dengan perlakuan NS1. Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan RNEasy Plus Mini Kit yang didapatkan dari Qiagen®, (Nomor Katalog 74134) sesuai dengan protokol yang disediakan oleh pabrikan.



Gambar 3. 4 Protokol Isolasi RNA

### 3.5.4. Viabilitas Sel

Viabilitas sel diukur dengan menilai mitokondria menggunakan uji JC-1 staining yang diamati dibawah mikroskop fluoresens. Proses analisis dilakukan dengan JC-1 staining working solution. Sejumlah  $(10-60) \times 10^4$  kultur sel PBMC diresuspensi dan dicampur dengan larutan pewarnaan JC-1. Lalu diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 15 menit dan kemudian disentrifugasi selama 3-4 menit untuk menghilangkan supernatan. Campuran dicuci sebanyak dua kali dan sel diresuspensi dengan PBS. Sel diamati menggunakan mikroskop fluoresens. JC-1 adalah pewarnaan yang

dapat mengalami perubahan warna fluoresensi tergantung pada potensial membran mitokondria, jika potensial tinggi, JC-1 akan membentuk agregat yang menghasilkan fluoresensi merah, sedangkan jika potensial rendah, JC-1 tetap dalam bentuk monomer yang menghasilkan fluoresensi hijau.

### 3.5.5. RT-PCR

RT-PCR dilakukan dengan menggunakan primer Caspase-3 dan Connexin43 (Cx43) untuk menilai apoptosis, kemudian GAPDH digunakan sebagai *house keeping gene*. RT-PCR dilakukan dengan KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (SigmaAldrich) dalam volume 20  $\mu$ l. Sampel PCR dipanaskan terlebih dahulu hingga 45 °C untuk sintesis cDNA, kemudian dipanaskan 95 °C selama 3 menit untuk mengaktivasi enzim, lalu diikuti oleh 40 siklus 95 °C selama 3 detik dan 60 °C selama 20 detik. Kurva leleh kemudian dibuat dengan pemanasan pada suhu 95 °C selama 1 detik, 65 °C selama 15 detik, dan 55 °C selama 30 detik. Reaksi dilakukan menggunakan AriaMx Real-time PCR System, dan percobaan diulangi tiga kali sebagai ulangan biologis independen. Tingkat mRNA gen-gen ini diukur dengan nilai Ct (siklus ambang batas), dan tingkat level mRNA relatif dihitung dengan metode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  jika *house-keeping gene* stabil.

Simbol Gen	Forward	Reverse
Caspase-3	CTCCTAGCGGATGGGTG CTATTG	TTATTAACGAAAACCA GAGCGCCG
Cx43	CGCTCCCCTCTCGCCTA TGT	CTGGCACGACTGCTGG CTCT
GAPDH	ACAAC TTTGGTATCGTG GAAGG	GCCATCACGCCACAGT TTC

Tabel 3. 3 Primer RT-qPCR

Metode perhitungan  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (perubahan level mRNA relatif) merupakan teknik analisis data yang digunakan dalam eksperimen RT-

qPCR untuk mengukur perubahan relatif level mRNA gen target terhadap kontrol atau gen referensi. Nilai Ct (*Cycle threshold*) adalah jumlah siklus PCR yang diperlukan untuk sinyal fluoresen mencapai ambang batas yang bisa dideteksi. Semakin rendah nilai Ct, semakin banyak target DNA yang ada dalam sampel. Perhitungan  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  dapat mendeskripsikan perubahan level mRNA relatif gen target dibandingkan dengan kontrol. Nilai ini menunjukkan berapa kali lipat level mRNA gen target berubah dalam sampel perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Rumus perhitungan perubahan level mRNA relative adalah  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , dimana untuk menghitungnya kita membutuhkan 2 komponen yaitu nilai  $\Delta Ct$  dan nilai  $\Delta\Delta Ct$ .

Nilai  $\Delta Ct$  (Delta Ct) adalah selisih antara nilai Ct gen target dengan nilai gen referensi (*housekeeping gene*) untuk masing-masing sampel. Gen referensi digunakan sebagai kontrol internal untuk menormalkan variasi dalam jumlah total RNA dan efisiensi reverse transcription. Sehingga rumus untuk  $\Delta Ct$  adalah  $Ct_{target} - Ct_{referensi}$ . Nilai  $\Delta\Delta Ct$  (Delta Delta Ct) adalah selisih antara  $\Delta Ct$  dari sampel yang diuji (perlakuan) dengan  $\Delta Ct$  dari sampel kontrol (non-perlakuan). Rumus yang digunakan untuk menghitung  $\Delta\Delta Ct$  adalah  $\Delta Ct_{perlakuan} - \Delta Ct_{kontrol}$ . Dengan menghitung menggunakan metode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  peneliti dapat melakukan analisis yang sederhana dan cepat untuk menentukan perubahan level mRNA gen relatif dalam RT-qPCR.

### 3.5.6. Metode Analisis Data

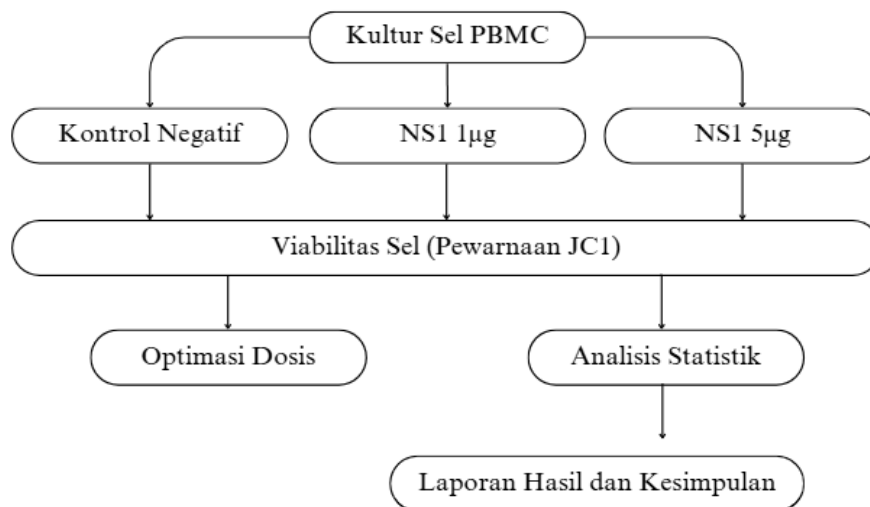
Analisis statistik dalam penelitian ini dilakukan menggunakan *Statistical Program Service Solution* (SPSS) versi 25 untuk Windows (SPSS Inc., Illinois, AS). Untuk mengevaluasi distribusi normalitas data, digunakan uji Shapiro-Wilk dengan tingkat signifikansi 95% ( $p \geq 0,05$ ). Sementara itu, homogenitas varians diuji menggunakan F-Test (*Levene's Test*). Untuk data pewarnaan JC-1 yang melibatkan tiga variabel yaitu kontrol dan perlakuan NS1 1  $\mu g$  dan perlakuan NS1 5  $\mu g$ , normalitas diuji dengan *Shapiro-Wilk*. Jika asumsi terpenuhi, analisis

menggunakan Uji *oneway* ANOVA. Namun, jika data tidak normal, digunakan uji *Kruskall-Wallis* sebagai alternatif non-parametrik. Langkah-langkah ini memastikan bahwa hasil analisis statistik valid dan dapat diandalkan, baik untuk optimasi paparan NS1 pada viabilitas sel (JC-1) maupun evaluasi level mRNA melalui PCR.

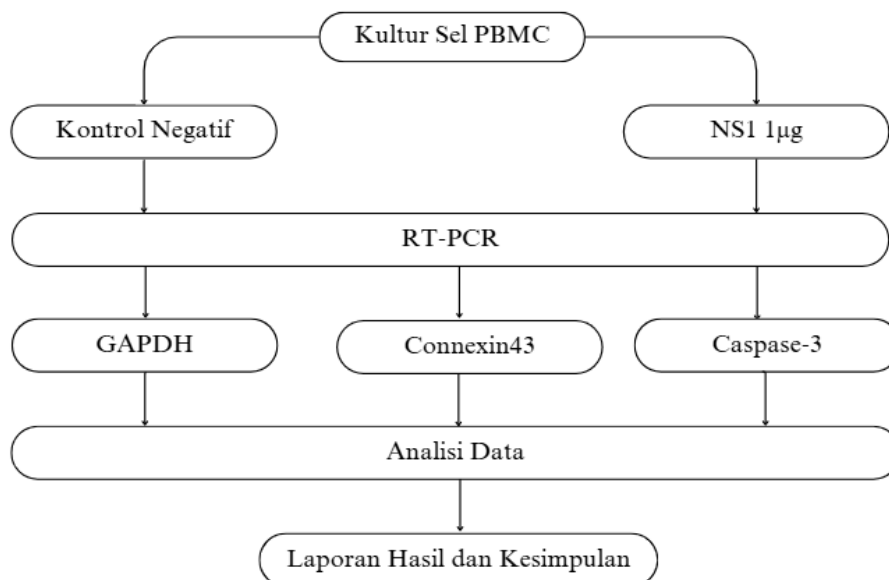
Untuk data PCR yang melibatkan dua variabel yaitu kontrol dan perlakuan, normalitas diuji dengan *Shapiro-Wilk*. Jika asumsi terpenuhi, analisis menggunakan Uji t Berpasangan (Paired t-test). Namun, jika data tidak normal, digunakan uji *Wilcoxon Signed-Rank Test* sebagai alternatif non-parametrik. Langkah-langkah ini memastikan bahwa hasil analisis statistik valid dan dapat diandalkan, baik untuk optimasi paparan NS1 pada evaluasi level mRNA melalui PCR.

### 3.5.7. Alur Penelitian

#### a. Pewarnaan JC-1



#### b. Pemeriksaan RT-PCR



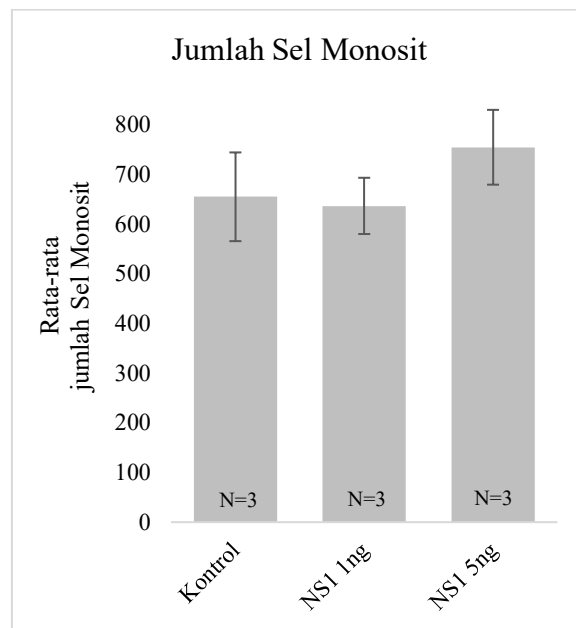
## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Pewarnaan JC-1

##### 4.1.1. Jumlah Sel Monosit

Hasil pengukuran jumlah monosit menunjukkan rata-rata jumlah monosit pada kelompok kontrol sebesar  $654,67 \pm 154,53$  sel/well. Pada kelompok yang diberi paparan NS1  $1 \mu\text{g/mL}$ , rata-rata jumlah monosit mencapai  $636,33 \pm 98,02$  sel/well, sedangkan pada kelompok dengan paparan NS1  $5 \mu\text{g/mL}$  sebesar  $754,33 \pm 134,35$  sel/well.



Gambar 4. 1 Jumlah Sel Monosit

*Keterangan: Jumlah Sel Monosit dari setiap perlakuan yang dinyatakan dalam bentuk mean (N=3) dengan Garis error (error bars) menunjukkan standar error of mean SEM.*

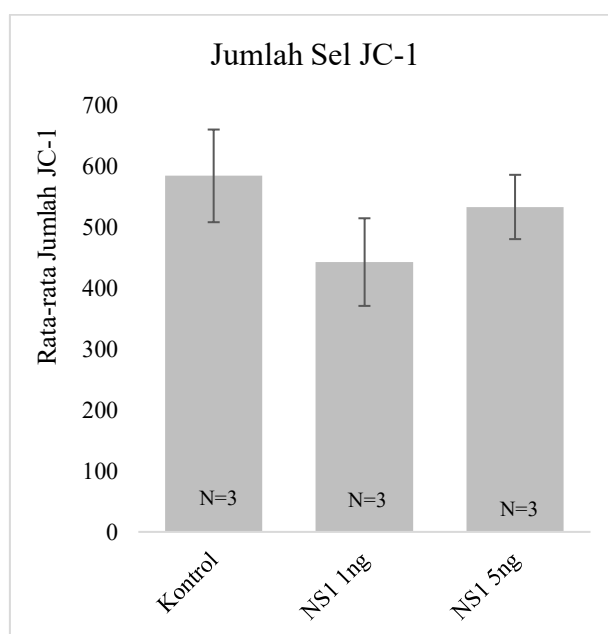
Uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa data pada semua kelompok penelitian terdistribusi secara normal. Nilai signifikansi (Sig.) untuk kelompok kontrol, NS1  $1 \mu\text{g/mL}$ , dan NS1  $5 \mu\text{g/mL}$  berturut-turut adalah 0,223, 0,803, dan 0,451. Untuk Uji homogenitas varians menggunakan uji Levene menunjukkan nilai signifikansi untuk semua metode perhitungan Levene Statistic berada di atas tingkat signifikansi 0,05, dengan rincian sebagai berikut: berdasarkan mean ( $p = 0,543$ ), berdasarkan

median ( $p = 0,937$ ), berdasarkan median dengan derajat kebebasan yang disesuaikan ( $p = 0,937$ ), dan berdasarkan trimmed mean ( $p = 0,582$ ).

Analisis statistik ANOVA menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik antara kelompok-kelompok yang diteliti ( $F(2,6) = 0,719$ ;  $p = 0,525$ ). Nilai *Sum of Squares Between Groups* sebesar 24193,556 dengan derajat kebebasan (df) 2 dan Mean Square 12096,778, sementara *Sum of Squares Within Groups* sebesar 101016,000 dengan df 6 dan *Mean Square* 16836,000. Total *Sum of Squares* adalah 125209,556 dengan df 8.

#### 4.1.2. Jumlah sel JC-1

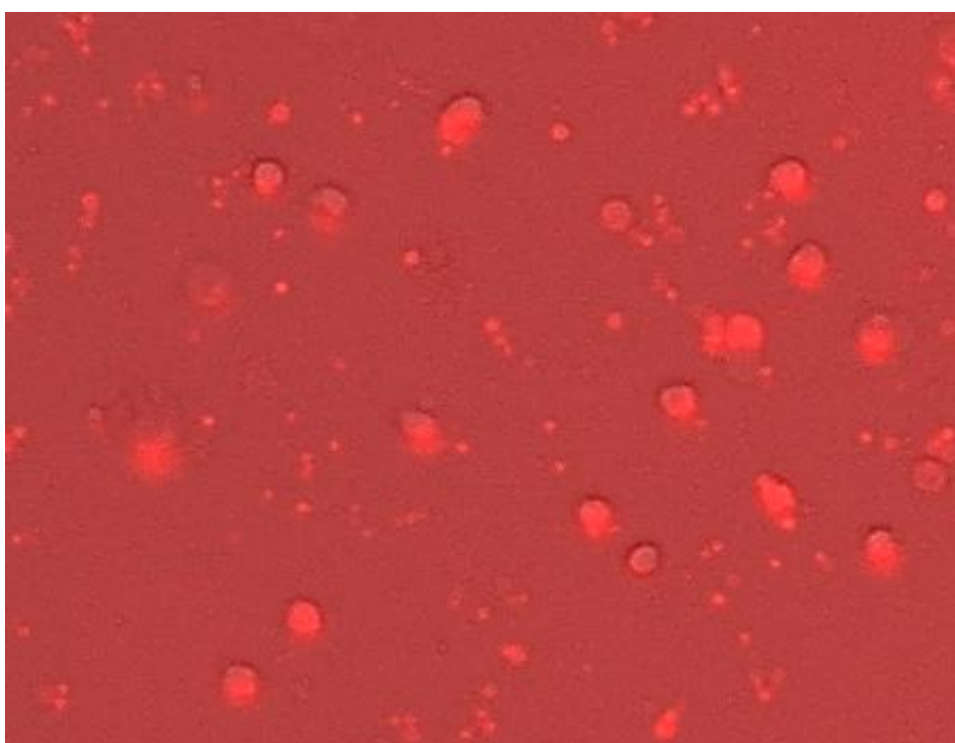
Hasil pengukuran menunjukkan rata-rata jumlah sel JC-1 pada kelompok kontrol sebesar  $583,67 \pm 131,58$  sel/well. Pada kelompok yang diberi paparan NS1 1  $\mu\text{g/mL}$ , rata-rata jumlah sel JC-1 mencapai  $442,33 \pm 124,43$  sel/well, sedangkan pada kelompok dengan paparan NS1 5  $\mu\text{g/mL}$  sebesar  $532,67 \pm 91,31$  sel/well.



Gambar 4. 2 Jumlah Sel JC-1

*Keterangan: Jumlah Sel Monosit yang menunjukkan fluoresensi JC-1 positif dari setiap perlakuan yang dinyatakan dalam bentuk mean (N=3) dengan Garis error (error bars) menunjukkan standar error of mean SEM.*

Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi normal ( $p < 0,05$ ). Analisis statistik non-parametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik antara kelompok-kelompok yang diteliti ( $H = 1,689$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,430$ ). Nilai statistik *Kruskal-Wallis*  $H$  sebesar 1,689 dengan derajat kebebasan 2 dan nilai signifikansi asimptotik 0,430.

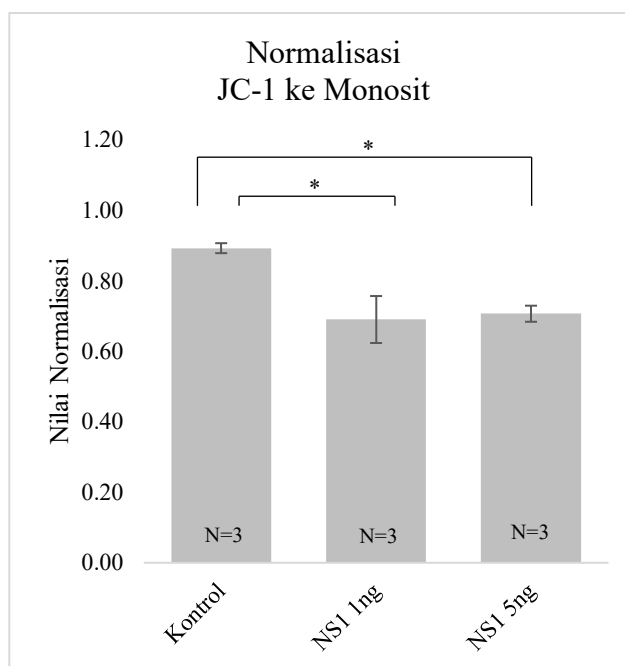


Gambar 4. 3 Pewarnaan JC-1 pada Sel PBMC

*Keterangan: Gambar menunjukkan sel mononuklear darah tepi (PBMC) yang diwarnai dengan pewarna JC-1 dan divisualisasikan menggunakan mikroskop fluoresensi.*

#### 4.1.3. Jumlah normalisasi JC-1 ke monosit

Hasil pengukuran menunjukkan rata-rata normalisasi JC-1 ke Monosit pada kelompok kontrol sebesar  $0,89 \pm 0,01$  sel/well. Pada kelompok yang diberi paparan NS1  $1 \mu\text{g/mL}$ , rata-rata normalisasi JC-1 ke Monosit mencapai  $0,69 \pm 0,07$  sel/well, sedangkan pada kelompok dengan paparan NS1  $5 \mu\text{g/mL}$  sebesar  $0,71 \pm 0,02$  sel/well.



Gambar 4. 4 Normalisasi JC-1 ke Monosit

Keterangan: Data normalisasi JC-1 ke Monosit dinyatakan dalam bentuk mean ( $N=3$ ) dengan Garis error (error bars) menunjukkan standar error of mean SEM ( $*P \leq 0,05$ ).

Uji normalitas *Shapiro-Wilk* terhadap data jumlah sel menunjukkan bahwa seluruh kelompok penelitian memenuhi asumsi distribusi normal. Nilai signifikansi yang diperoleh untuk kelompok kontrol ( $p = 0,780$ ), NS1 1  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0,948$ ), dan NS1 5  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0,637$ ) semuanya berada di atas tingkat signifikansi  $\alpha = 0,05$ . Nilai signifikansi untuk semua metode perhitungan *Levene Statistic* berada di atas tingkat signifikansi  $\alpha = 0,05$ , dengan rincian sebagai berikut: berdasarkan mean ( $p = 0,207$ ), berdasarkan median ( $p = 0,236$ ), berdasarkan median dengan derajat kebebasan yang disesuaikan ( $p = 0,311$ ), dan berdasarkan trimmed mean ( $p = 0,208$ ).

Hasil analisis statistik menggunakan uji ANOVA satu arah menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan secara statistik antara kelompok-kelompok yang diteliti ( $F(2,6) = 10,024$ ;  $p = 0,012$ ). Nilai *Sum of Squares Between Groups* sebesar 0,084 dengan derajat kebebasan (df) 2 dan *Mean Square* 0,042, sementara *Sum of Squares Within Groups* sebesar 0,025 dengan df 6 dan *Mean Square* 0,004. Total *Sum of Squares* adalah

0,109 dengan df 8. Nilai p (Sig.) yang lebih kecil dari 0,05 mengindikasikan bahwa hipotesis nol dapat ditolak, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan mean yang signifikan antar kelompok dalam penelitian ini.

Perlakuan	Sampel	Sig.
Kontrol	NS1 1 $\mu$ g/mL *	.022
	NS1 5 $\mu$ g/mL *	.028
NS1 1 $\mu$ g/mL	Kontrol *	.022
	NS1 5 $\mu$ g/mL	1.000
NS1 5 $\mu$ g/mL	Kontrol *	.028
	NS1 1 $\mu$ g/mL	1.000

Tabel 4. Uji *Post-hoc Bonferroni*

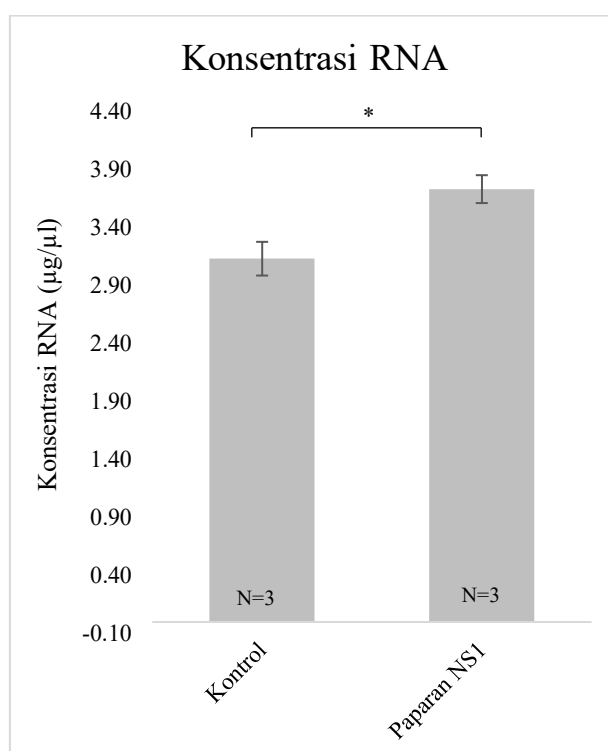
*Keterangan: Hasil uji post-hoc Bonferroni menunjukkan perbedaan signifikan antara sampel kontrol dan perlakuan (\*P $\leq$ 0,05).*

Hasil uji *post-hoc Bonferroni* untuk analisis perbandingan ganda menunjukkan adanya perbedaan mean yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok NS1 1  $\mu$ g/mL (perbedaan mean = 0,21; p = 0,022) dan antara kelompok kontrol dengan NS1 5  $\mu$ g/mL (perbedaan mean = 0,20; p = 0,028), dengan interval kepercayaan 95% masing-masing sebesar [0,036 - 0,384] dan [0,026 - 0,374]. Namun, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antara kelompok NS1 1  $\mu$ g/mL dengan NS1 5  $\mu$ g/mL (perbedaan mean = -0,01; p = 1,000), dengan interval kepercayaan 95% [-0,184 - 0,164]. Nilai p yang kurang dari 0,05 pada beberapa perbandingan mengindikasikan bahwa hipotesis nol dapat ditolak untuk perbandingan tersebut, sementara nilai p = 1,000 antara kelompok NS1 1  $\mu$ g/mL dan NS1 5  $\mu$ g/mL menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok perlakuan tersebut.

## 4.2. RT-PCR

### 4.2.1. Konsentrasi RNA pada paparan dan kontrol

Analisis data konsentrasi RNA menunjukkan perbedaan konsentrasi antara kelompok kontrol dan kelompok yang terpapar protein NS1 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Kelompok kontrol menunjukkan konsentrasi konsentrasi RNA sebesar  $3,13 \pm 0,15$ , sementara kelompok perlakuan NS1 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  menunjukkan peningkatan menjadi  $3,73 \pm 0,12$ . Hasil ini mengindikasikan bahwa paparan protein NS1 pada konsentrasi 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cenderung meningkatkan jumlah konsentrasi RNA secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol.



Gambar 4. 5 Total RNA dari sampel kontrol dan paparan NS1

*Keterangan: Data kuantifikasi konsentrasi RNA disajikan sebagai nilai mean (N=3) dengan garis error (error bars) menunjukkan standar error of mean (SEM) (\* $P \leq 0,05$ ).*

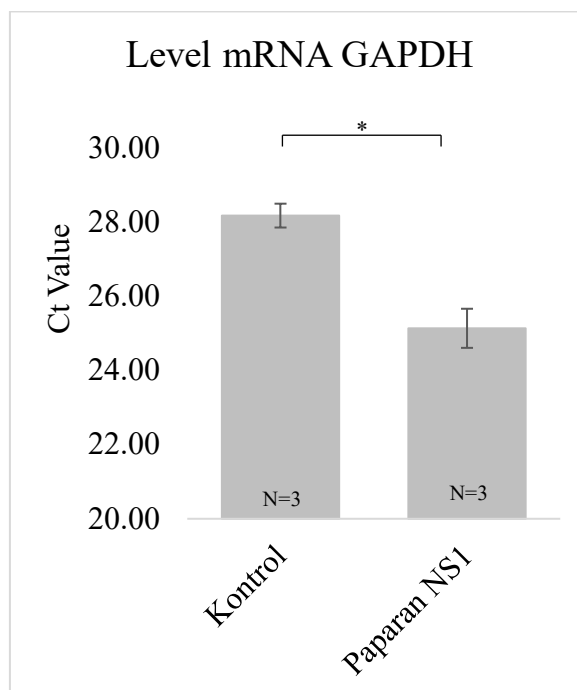
Uji normalitas Shapiro-Wilk terhadap data level mRNA menunjukkan bahwa baik kelompok kontrol ( $p = 0,780$ ) maupun kelompok paparan ( $p = 0,463$ ) memenuhi asumsi distribusi normal, dengan nilai signifikansi di atas  $\alpha = 0,05$ . Berdasarkan uji Levene untuk kesamaan varian,

diperoleh nilai  $F = 0.065$  dengan signifikansi  $p = 0.812$  ( $p > 0.05$ ), yang mengindikasikan bahwa asumsi kesamaan varian terpenuhi (*equal variances assumed*). Pada kondisi ini, diperoleh nilai  $t = -3.182$  dengan derajat kebebasan ( $df$ ) = 4 dan signifikansi dua-arah  $p = 0.033$  ( $p < 0.05$ ). Perbedaan mean antara kelompok sebesar  $-0.600$  dengan standar error perbedaan sebesar  $0.188$ . Interval kepercayaan 95% untuk perbedaan mean berada antara  $-1.123$  hingga  $-0.076$ , yang tidak mencakup nilai nol, sehingga menguatkan kesimpulan adanya perbedaan yang signifikan.

#### **4.2.2. Level mRNA**

##### **4.2.2.1. Level mRNA GAPDH**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol memiliki nilai Ct GAPDH rata-rata sebesar  $28,17 \pm 0,19$ , sedangkan kelompok yang mendapat paparan NS1  $1 \mu\text{g/mL}$  menunjukkan nilai Ct yang lebih rendah yaitu  $25,13 \pm 0,30$ . Penurunan nilai Ct pada kelompok perlakuan ( $25,13$ ) dibandingkan kontrol ( $28,17$ ) menunjukkan peningkatan jumlah transkrip GAPDH, yang dapat merefleksikan perubahan dalam aktivitas metabolik sel atau adaptasi seluler terhadap paparan protein NS1. Uji normalitas *Shapiro-Wilk* terhadap nilai Ct GAPDH menunjukkan bahwa data pada kedua kelompok penelitian terdistribusi secara normal. Nilai signifikansi untuk kelompok kontrol ( $p = 0,480$ ) dan kelompok perlakuan ( $p = 0,473$ ) keduanya berada di atas tingkat signifikansi  $\alpha = 0,05$ , dengan nilai statistik *Shapiro-Wilk* masing-masing sebesar  $0,928$  dan  $0,926$ . Hasil ini mengindikasikan tidak adanya penyimpangan yang signifikan dari distribusi normal pada data nilai Ct GAPDH baik pada kelompok kontrol maupun kelompok yang mendapat perlakuan.



Gambar 4. 6 Level mRNA gen GAPDH pada RT-PCR

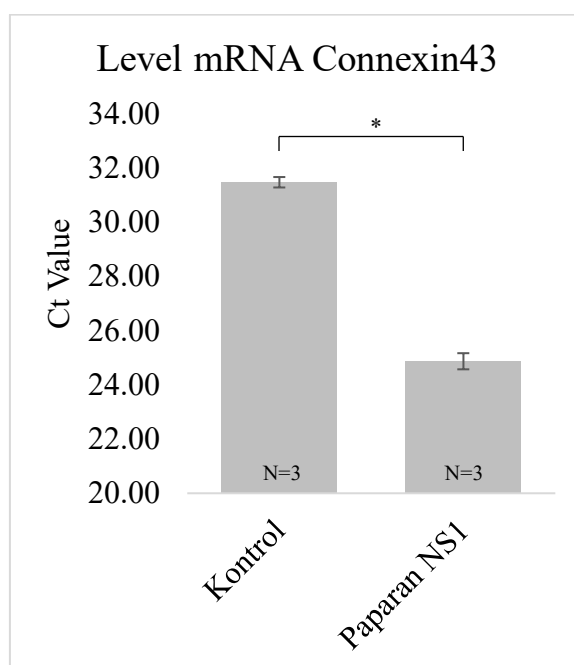
*Keterangan: Data level mRNA gen GAPDH disajikan sebagai nilai mean (N=3) dengan garis error (error bars) menunjukkan standar error of mean (SEM) (\*P≤0,05)*

Analisis statistik dengan uji *Independent Samples Test* menunjukkan bahwa asumsi kesamaan varians terpenuhi, sebagaimana ditunjukkan oleh uji Levene dengan nilai  $F = 1.144$  dan  $p = 0.345$  ( $p > 0.05$ ). Dengan demikian, interpretasi hasil didasarkan pada asumsi varians yang sama (*equal variances assumed*). Uji t mengungkapkan perbedaan yang sangat signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan ( $t(4) = 8.482$ ,  $p = 0.001$ ), dengan perbedaan rata-rata sebesar 3.036 dan kesalahan standar perbedaan 0.358. Interval kepercayaan 95% untuk perbedaan rata-rata berkisar antara 2.042 hingga 4.030, yang tidak mencakup nilai nol, sehingga mengonfirmasi signifikansi statistik hasil tersebut.

#### 4.2.2.2. Level mRNA Connexin43

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol memiliki nilai Ct *Connexin43* rata-rata sebesar  $31,48 \pm 0,33$ , sedangkan kelompok yang mendapat paparan NS1 1  $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan nilai Ct yang lebih rendah yaitu  $24,87 \pm 0,52$ . Perbedaan nilai Ct yang diamati ini

mengindikasikan bahwa paparan protein NS1 secara signifikan memengaruhi level mRNA *Connexin43*. Penurunan nilai Ct pada kelompok perlakuan (24,87) dibandingkan kontrol (31,48) menunjukkan peningkatan jumlah transkrip *Connexin43*, yang merefleksikan potensi peningkatan komunikasi antarsel melalui *gap junction* sebagai respons terhadap paparan protein NS1.



Gambar 4. 7 Level mRNA Gen Connexin43 pada RT-PCR

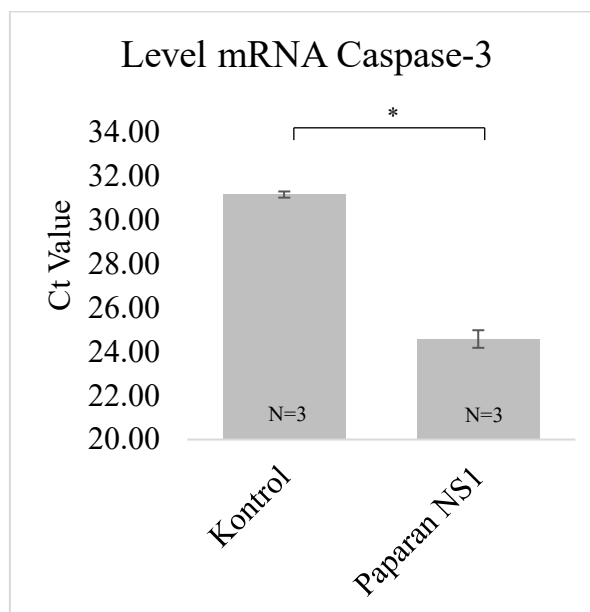
Keterangan: Data level mRNA gen *Connexin43* disajikan sebagai nilai mean ( $N=3$ ) dengan garis error (error bars) menunjukkan standar error of mean (SEM) ( $*P \leq 0,05$ )

Uji normalitas *Shapiro-Wilk* terhadap nilai Ct menunjukkan bahwa data pada kedua kelompok perlakuan terdistribusi secara normal. Kelompok perlakuan 1,00 menghasilkan nilai statistik *Shapiro-Wilk* sebesar 0,812 dengan signifikansi ( $p$ ) 0,144, sedangkan kelompok perlakuan 2,00 menunjukkan nilai statistik 0,979 dengan signifikansi 0,721. Kedua nilai signifikansi tersebut berada di atas tingkat signifikansi  $\alpha = 0,05$ , yang mengindikasikan bahwa tidak terdapat bukti statistik untuk menolak hipotesis normalitas.

Analisis statistik dengan uji *Independent Samples Test* menunjukkan bahwa asumsi kesamaan varians terpenuhi, sebagaimana ditunjukkan oleh uji *Levene* dengan nilai  $F = 0.517$  dan  $p = 0.512$  ( $p > 0.05$ ). Berdasarkan hasil ini, interpretasi dilakukan menggunakan asumsi varians yang sama (*equal variances assumed*). Uji *t* mengungkapkan perbedaan yang sangat signifikan antara kedua kelompok yang dibandingkan ( $t(4) = 18.638$ ,  $p < 0.001$ ), dengan perbedaan rata-rata sebesar 6.603 dan kesalahan standar perbedaan sebesar 0.354. Interval kepercayaan 95% untuk perbedaan rata-rata berkisar antara 5.616 hingga 7.587, yang tidak mencakup nilai nol, sehingga mengonfirmasi signifikansi statistik hasil tersebut.

#### 4.2.2.3. Level mRNA Caspase-3

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol memiliki nilai Ct Caspase-3 rata-rata sebesar  $31,37 \pm 0,24$ , sedangkan kelompok yang mendapat paparan NS1  $1 \mu\text{g/mL}$  menunjukkan nilai Ct yang lebih rendah yaitu  $24,58 \pm 0,70$ . Perbedaan nilai Ct yang diamati ini mengindikasikan bahwa paparan protein NS1 secara signifikan meningkatkan level mRNA Caspase-3. Penurunan nilai Ct pada kelompok perlakuan (24,70) dibandingkan kontrol (31,37) menunjukkan peningkatan jumlah transkrip Caspase-3, yang merefleksikan aktivasi jalur apoptosis sebagai respons terhadap paparan protein NS1. Uji normalitas Shapiro-Wilk terhadap nilai Ct menunjukkan bahwa data pada kedua kelompok penelitian terdistribusi secara normal. Kelompok kontrol menghasilkan nilai statistik Shapiro-Wilk sebesar 0,964 dengan signifikansi ( $p$ ) 0,637, sedangkan kelompok perlakuan menunjukkan nilai statistik 0,980 dengan signifikansi 0,730. Kedua nilai signifikansi tersebut berada di atas tingkat signifikansi  $\alpha = 0,05$ , yang mengindikasikan tidak adanya penyimpangan yang signifikan dari distribusi normal pada kedua kelompok.



Gambar 4. 8 Level mRNA Gen Caspase-3 pada RT-PCR

*Keterangan: Data level mRNA gen Caspase-3 disajikan sebagai nilai mean (N=3) dengan garis error (error bars) menunjukkan standar error of mean (SEM) (\*P≤0,05)*

Analisis statistik dengan uji Independent Samples Test menunjukkan bahwa asumsi kesamaan varians terpenuhi, sebagaimana ditunjukkan oleh uji Levene dengan nilai  $F = 2.431$  dan  $p = 0.194$  ( $p > 0.05$ ). Berdasarkan hasil ini, interpretasi dilakukan menggunakan asumsi varians yang sama (*equal variances assumed*). Uji t mengungkapkan perbedaan yang sangat signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan ( $t(4) = 15.447$ ,  $p < 0.001$ ), dengan perbedaan rata-rata sebesar 6.586 dan kesalahan standar perbedaan sebesar 0.426. Interval kepercayaan 95% untuk perbedaan rata-rata berkisar antara 5.402 hingga 7.770, yang tidak mencakup nilai nol, sehingga mengonfirmasi signifikansi statistik hasil tersebut.

### 4.3. Pembahasan

#### 4.3.1. Mekanisme Seluler yang Diinduksi NS1 dan Implikasinya pada Disfungsi Monosit

Temuan penelitian ini mengungkap mekanisme patogenik protein NS1 virus dengue dalam memodulasi fungsi monosit melalui dua jalur kritis: peningkatan komunikasi antarsel melalui *gap junction* dan induksi

disfungsi mitokondria. Analisis level mRNA menunjukkan bahwa paparan NS1 baik pada konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  maupun 5  $\mu\text{g/mL}$  secara signifikan meningkatkan ekspresi mRNA Cx43 dibandingkan kelompok kontrol, meskipun tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua dosis NS1 tersebut. Selain itu didapatkan peningkatan paralel level mRNA Caspase-3 pada kedua kelompok perlakuan NS1 dibandingkan kontrol, tanpa perbedaan bermakna antara dosis 1  $\mu\text{g/mL}$  dan 5  $\mu\text{g/mL}$ . Analisis level mRNA menunjukkan bahwa paparan NS1 secara signifikan meningkatkan level mRNA Connexin43 (Cx43), komponen struktural utama *gap junction*, yang berperan penting dalam koordinasi respons imun. Peningkatan ini diduga memfasilitasi distribusi sinyal pro-apoptosis antarsel, sebagaimana dibuktikan oleh peningkatan paralel level mRNA Caspase-3, mediator sentral apoptosis. Observasi ini mungkin dapat dijelaskan oleh hasil pewarnaan JC-1 yang menunjukkan trend penurunan potensial membran mitokondria.

#### **4.3.2. Peran NS1 pada Metabolik dan Aktivasi Transkripsi**

Hasil penelitian mengungkapkan bahwa paparan protein NS1 virus dengue menyebabkan peningkatan signifikan dalam konsentrasi total RNA, menunjukkan adanya upregulasi transkripsi global yang konsisten dengan fenomena *reprogramming* seluler yang diinduksi oleh protein virus. Temuan ini dibuktikan oleh penurunan nilai Ct yang nyata pada sampel yang dipaparkan NS1 dibandingkan control. Hal ini membuktikan peningkatan beberapa gen kunci seperti GAPDH, Connexin43, dan Caspase-, yang mengindikasikan peningkatan level mRNA secara substansial. Perubahan ini diduga bertujuan untuk memenuhi kebutuhan energi yang meningkat melalui peningkatan metabolisme glukosa, yang diperlukan untuk mendukung sintesis protein masif dan respons stres seluler selama infeksi. Secara kolektif, data menunjukkan bahwa protein NS1 tidak hanya memodulasi level mRNA spesifik tetapi juga menginduksi transformasi metabolik global pada sel inang, yang dapat berkontribusi pada patogenesis

infeksi dengue melalui mekanisme yang melibatkan disfungsi mitokondria dan peningkatan komunikasi antar sel.

#### **4.3.3. Peningkatan Komunikasi Melalui *Gap Junction***

Penelitian ini mengungkap bahwa paparan protein NS1 virus dengue menyebabkan upregulasi signifikan level mRNA Connexin43, yang memberikan bukti molekuler kuat untuk peningkatan pembentukan *gap junction* antar monosit. Peningkatan level mRNA Connexin43 pada sampel paparan NS1 dibandingkan kontrol menunjukkan adanya upregulasi transkripsi gen yang berperan dalam pembentukan *gap junction*, meskipun translasi ke peningkatan protein fungsional memerlukan konfirmasi lebih lanjut. Mekanisme ini didukung lebih lanjut oleh penurunan simultan potensial membran mitokondria yang terdeteksi melalui pewarnaan JC-1, menunjukkan adanya stres seluler. Temuan ini secara komprehensif mendukung hipotesis penelitian bahwa NS1 mempromosikan pembentukan jaringan komunikasi seluler yang ekstensif, yang berpotensi berfungsi sebagai saluran distribusi untuk sinyal stress seluler. Perubahan terkoordinasi ini, yang terjadi bersamaan dengan peningkatan level mRNA Caspase-3 menunjukkan adanya mekanisme patogenik yang kompleks dimana komunikasi *gap junction* yang ditingkatkan dapat memfasilitasi penyebaran cepat sinyal apoptosis dalam populasi sel imun.

#### **4.3.4. Amplifikasi sinyal Pro-Apoptosis**

Peningkatan terkoordinasi level mRNA caspase-3 bersamaan dengan connexin43 (Cx43) pada sampel paparan NS1 dibandingkan control menunjukkan potensi mekanisme di mana sinyal apoptosis dapat menyebar melalui jaringan *gap junction*. Sebagai caspase eksekutor utama, caspase-3 menghasilkan fragmen proteolitik dan sinyal pro-apoptotik yang, ketika didistribusikan melalui *gap junction*, mampu memperluas respons kematian sel melampaui sel yang awalnya terpapar stimulus apoptotik pada sel PBMC. Fenomena ini menjelaskan mekanisme disfungsi monosit luas yang menjadi ciri infeksi dengue berat.

#### 4.3.5. Implikasi Patofisiologis

Temuan ini mengungkap mekanisme baru di mana protein NS1 dengue mengoordinasikan respons seluler terpadu yang pada akhirnya menyebabkan disfungsi monosit. Komunikasi melalui *gap junction* yang meningkat mungkin bersifat paradoksal, di satu sisi berpotensi memfasilitasi koordinasi respons imun, namun di sisi lain juga dapat menjadi saluran untuk penyebaran sinyal kerusakan seluler. Mekanisme ini berpotensi turut berkontribusi terhadap fenomena immunosupresi dan disfungsi vaskular yang diamati pada infeksi dengue berat, mengingat gangguan fungsi monosit memengaruhi baik imunitas bawaan maupun integritas sawar endotel.

#### 4.3.6. Keterbatasan dan Arah Penelitian Lanjutan

Perubahan terkoordinasi terjadi dalam level mRNA gen, meskipun konsisten dengan hipotesis penelitian ini, sekaligus mengungkap keterbatasan penggunaan gen housekeeping konvensional seperti GAPDH dalam studi yang melibatkan perlakuan NS1. Penelitian selanjutnya perlu dilakukan evaluasi stabilitas *multiple referensi genes* (seperti 18S rRNA,  $\beta$ -actin, HPRT) dalam kondisi paparan NS1. Lebih lanjut, investigasi fungsional yang menguji permeabilitas *gap junction* secara langsung disertai pengukuran kuantitatif transfer sinyal antarsel akan memberikan dasar eksperimental yang lebih kuat untuk memahami mekanisme jaringan komunikasi seluler yang diinduksi oleh NS1.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1. Kesimpulan**

Hasil *preliminary evidence* ini mengungkap bahwa protein NS1 menyebabkan upregulasi terkoordinasi komponen metabolik, struktural, dan pro-apoptosis dalam monosit, yang pada akhirnya meningkatkan komunikasi melalui *gap junction*. Temuan ini menunjukkan mekanisme patogenik potensial yang mendasari disfungsi seluler luas yang menjadi ciri infeksi dengue berat, di mana peningkatan komunikasi antarsel memfasilitasi penyebaran sinyal kerusakan seluler melampaui sel-sel yang awalnya terinfeksi. Secara spesifik, penelitian ini memberikan bukti molekuler bahwa NS1 berperan sebagai faktor patogenik kunci dalam infeksi Dengue melalui dua jalur yaitu gangguan komunikasi antar sel via modulasi Cx43 dan induksi apoptosis melalui aktivasi Casp3. Implikasi klinisnya meliputi potensi pengembangan terapi target yang memblokir interaksi NS1 dengan Cx43 atau Casp3, serta pemanfaatan level mRNA kedua protein tersebut sebagai biomarker prognostik. Temuan ini tidak hanya mendukung hipotesis penelitian yang menyatakan peran NS1 dalam komunikasi antar sel, namun juga memperkaya pemahaman patogenesis DENV tetapi juga membuka peluang baru untuk strategi diagnostik dan terapeutik yang lebih efektif.

#### **5.2. Saran**

##### **5.2.1. Penelitian Lanjutan**

Penelitian mendatang perlu memvalidasi temuan ini dalam model *in-vivo* menggunakan hewan coba yang terinfeksi Dengue. Model ini akan menguji apakah mekanisme modulasi Cx43 dan induksi apoptosis oleh NS1 yang diamati *in vitro* tetap konsisten dalam sistem biologis yang lebih kompleks, sekaligus mengevaluasi dampaknya pada tingkat organ dan sistemik. Selain itu, penting untuk mengeksplorasi interaksi molekuler langsung antara NS1 dengan Cx43 dan komponen jalur apoptosis

menggunakan teknik seperti ko-immunopresipitasi atau mikroskop fluoresensi super-resolusi guna mengidentifikasi target spesifik untuk intervensi terapeutik.

### **5.2.2. Optimasi *Housekeeping Gene***

Perlu dilakukan optimasi pemilihan *housekeeping gene* yang sesuai dan stabil untuk sel *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) melalui validasi level mRNA beberapa kandidat *housekeeping gene* (seperti GAPDH,  $\beta$ -aktin, atau 18S rRNA) dalam kondisi eksperimen yang relevan. Evaluasi stabilitas level mRNA dapat menggunakan metode statistik seperti lain untuk menentukan gen referensi yang paling konsisten, sehingga meningkatkan akurasi normalisasi data level mRNA dalam penelitian selanjutnya. Hal ini penting untuk meminimalkan bias interpretasi hasil, khususnya dalam studi yang melibatkan modifikasi eksperimen atau perlakuan tertentu pada sel PBMC.

### **5.2.3. Rekomendasi Uji Klinis pada Manusia**

Pada tahap translasi klinis, studi longitudinal pada pasien dengue dapat mengukur kadar Cx43 dan Casp3 dalam sampel darah atau cairan serebrospinal sebagai biomarker prediktif keparahan penyakit. Desain studi kasus-kontrol yang membandingkan pasien dengan derajat infeksi berbeda (demam dengue vs. dengue berat) akan membantu menetapkan nilai cut-off untuk aplikasi diagnostik. Penting pula untuk menginvestigasi korelasi antara kadar NS1 serum dengan level mRNA Cx43/Casp3, serta responsnya terhadap terapi eksperimental yang menargetkan jalur ini.

### **5.2.4. Aplikasi dalam Pengembangan Obat dan Tatalaksana**

Temuan ini membuka peluang pengembangan senyawa penghambat spesifik yang menargetkan interaksi NS1-Cx43 atau NS1- \Casp3, seperti peptide mimetic atau antibodi netralisasi. Pendekatan terapi kombinasi yang memadukan antivirus konvensional dengan modulator *gap junction* atau inhibitor kaspase diuji dalam model praklinis. Di sisi klinis, pemantauan rutin level mRNA Cx43/Casp3 dapat diintegrasikan dalam algoritma

tatalaksana dengue untuk identifikasi dini pasien berisiko komplikasi, sementara intervensi nutrisi atau farmakologis yang mendukung kesehatan mitokondria mungkin bermanfaat sebagai terapi adjuvan.

#### **5.2.5. Aplikasi sebagai Prediktor Keparahan**

Temuan peningkatan level mRNA Cx43 dan Casp3 yang diinduksi oleh protein NS1 dapat dikembangkan sebagai dasar untuk alat prediktor keparahan yang lebih sensitif dan spesifik dalam menegakkan diagnosis infeksi Dengue. Pengembangan uji RT-PCR, imunohistokimia atau ELISA berbasis deteksi Cx43 dan Casp3 dalam sampel darah tepi dapat menjadi pendekatan praktis untuk membedakan fase awal infeksi Dengue dari penyakit demam lainnya. Kombinasi pengukuran kadar NS1 dengan level mRNA Cx43/Casp3 dapat meningkatkan akurasi diagnosis, terutama pada pasien dengan gejala ambigu atau fase infeksi yang sulit dideteksi dengan metode konvensional. Validasi lebih lanjut diperlukan untuk menentukan nilai cut-off yang optimal dalam populasi dengan endemisitas berbeda.

#### **5.2.6. Studi Komparatif dengan Paparan Lain**

Perlu diperluas investigasi komparatif terhadap efek protein NS1 dari serotipe DENV berbeda (DENV1-4) maupun virus Flavivirus lain (seperti Zika atau West Nile) terhadap level mRNA Cx43 dan Casp3. Hal ini akan mengidentifikasi apakah mekanisme yang ditemukan bersifat spesifik untuk DENV atau umum pada genus Flavivirus. Selain itu, penting untuk mengevaluasi interaksi antara NS1 dengan faktor lingkungan (seperti demam atau hipoksia) yang mungkin memodulasi dampaknya pada komunikasi sel dan apoptosis.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India.* 2015;71(1):67-70. doi:10.1016/j.mjafi.2014.09.011
2. Barcellos C, Matos V, Lana RM, Lowe R. Climate change, thermal anomalies, and the recent progression of dengue in Brazil. *Sci Rep.* 2024;14(1):5948. doi:10.1038/s41598-024-56044-y
3. Holbrook MR. Historical Perspectives on Flavivirus Research. *Viruses.* 2017;9(5). doi:10.3390/v9050097
4. Colón-González FJ, Gibb R, Khan K, Watts A, Lowe R, Brady OJ. Projecting the future incidence and burden of dengue in Southeast Asia. *Nat Commun.* 2023;14(1):5439. doi:10.1038/s41467-023-41017-y
5. Wilder-Smith A, Ooi EE, Horstick O, Wills B. Dengue. *The Lancet.* 2019;393(10169):350-363. doi:10.1016/S0140-6736(18)32560-1
6. Tantawichien T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever in adolescents and adults. *Paediatr Int Child Health.* 2012;32(sup1):22-27. doi:10.1179/2046904712Z.00000000049
7. Datta S, Wattal C. Dengue NS1 antigen detection: A useful tool in early diagnosis of dengue virus infection. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28(2):107-110. doi:10.4103/0255-0857.62484
8. Malavige GN, Ogg GS. Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology.* 2017;151(3):261-269. doi:10.1111/imm.12748
9. Kuo HJ, Lee IK, Liu JW. Analyses of clinical and laboratory characteristics of dengue adults at their hospital presentations based on the World Health Organization clinical-phase framework: Emphasizing risk of severe dengue in the elderly. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2018;51(6):740-748. doi:10.1016/j.jmii.2016.08.024
10. Lim CS, Kaisbain N, Lim WJ. A Rare Combination: Dengue Fever Complicated With Guillain-Barre Syndrome. *Cureus.* Published online June 25, 2023. doi:10.7759/cureus.40957
11. Prabhat N, Ray S, Chakravarty K, et al. Atypical neurological manifestations of dengue fever: a case series and mini review. *Postgrad Med J.* 2020;96(1142):759-765. doi:10.1136/postgradmedj-2020-137533
12. Calderón-Peláez MA, Velandia-Romero ML, Bastidas-Legarda LY, Beltrán EO, Camacho-Ortega SJ, Castellanos JE. Dengue Virus Infection of Blood–Brain Barrier Cells: Consequences of Severe Disease. *Front Microbiol.* 2019;10. doi:10.3389/fmicb.2019.01435

13. Trivedi S, Chakravarty A. Neurological Complications of Dengue Fever. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2022;22(8):515-529. doi:10.1007/s11910-022-01213-7
14. Singh PK, Sheoran A, Tatarwal P, Singh P, Singh P. Dengue Hemorrhagic Encephalitis in Dengue Epidemic. *J Glob Infect Dis.* 2023;15(1):37-38. doi:10.4103/jgid.jgid\_147\_22
15. Varatharaj A. Encephalitis in the clinical spectrum of dengue infection. *Neurol India.* 2010;58(4):585. doi:10.4103/0028-3886.68655
16. Kalane SU, Gokhale AN, Kalane UD. Dengue Encephalitis in a Newborn. *Indian J Pediatr.* 2021;88(7):716-716. doi:10.1007/s12098-021-03791-9
17. Maheshwari A, Singh S, Amrit A, Alallah J, Boppana S. Neurological Manifestations of Perinatal Dengue. *Newborn.* 2023;2(2):158-172. doi:10.5005/jp-journals-11002-0066
18. Chen HR, Lai YC, Yeh TM. Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *J Biomed Sci.* 2018;25(1):58. doi:10.1186/s12929-018-0462-0
19. Fisher R, Lustig Y, Sklan EH, Schwartz E. The Role of NS1 Protein in the Diagnosis of Flavivirus Infections. *Viruses.* 2023;15(2). doi:10.3390/v15020572
20. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 2013;98(2):192-208. doi:10.1016/j.antiviral.2013.03.008
21. Pan P, Li G, Shen M, et al. DENV NS1 and MMP-9 cooperate to induce vascular leakage by altering endothelial cell adhesion and tight junction. *PLoS Pathog.* 2021;17(7):e1008603. doi:10.1371/journal.ppat.1008603
22. Tripathi S, Sengar S, Shree B, Mohapatra S, Basu A, Sharma V. An RBM10 and NF- $\kappa$ B interacting host lncRNA promotes JEV replication and neuronal cell death. *J Virol.* 2023;97(12):e0118323. doi:10.1128/jvi.01183-23
23. Castellanos JE, Neissa JI, Camacho SJ. La infección con el virus del dengue induce apoptosis en células del neuroblastoma humano SH-SY5Y. *Biomédica.* 2016;36:156. doi:10.7705/biomedica.v36i0.2984
24. Xing L, Yang T, Cui S, Chen G. Connexin Hemichannels in Astrocytes: Role in CNS Disorders. *Front Mol Neurosci.* 2019;12. doi:10.3389/fnmol.2019.00023
25. Yang Y, Liu W, Wei J, Cui Y, Zhang D, Xie J. Transforming growth factor- $\beta$ 1-induced N-cadherin drives cell-cell communication through connexin43 in osteoblast lineage. *Int J Oral Sci.* 2021;13(1):15. doi:10.1038/s41368-021-00119-3

26. Gilleron J, Carette D, Segretain D, Pointis G. Multiple and complex influences of connexins and pannexins on cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2018;1860(1):182-191. doi:10.1016/j.bbamem.2017.06.004
27. Rush B. An account of the bilious remitting fever. *Am J Med*. 1951;11(5):546-550. doi:10.1016/0002-9343(51)90035-6
28. Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA. Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):e2055. doi:10.1371/journal.pntd.0002055
29. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-507. doi:10.1038/nature12060
30. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 2015;4. doi:10.7554/eLife.08347
31. Bhatia S, Bansal D, Patil S, Pandya S, Ilyas QM, Imran S. A Retrospective Study of Climate Change Affecting Dengue: Evidences, Challenges and Future Directions. *Front Public Health*. 2022;10. doi:10.3389/fpubh.2022.884645
32. Brady OJ, Hay SI. The Global Expansion of Dengue: How *Aedes aegypti* Mosquitoes Enabled the First Pandemic Arbovirus. *Annu Rev Entomol*. 2020;65(1):191-208. doi:10.1146/annurev-ento-011019-024918
33. Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet*. 2015;385(9966):453-465. doi:10.1016/S0140-6736(14)60572-9
34. Halstead SB. Dengue. *The Lancet*. 2007;370(9599):1644-1652. doi:10.1016/S0140-6736(07)61687-0
35. Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):712-723. doi:10.1016/S1473-3099(16)00026-8
36. Wilder-Smith A. Risk of Dengue in Travelers: Implications for Dengue Vaccination. *Curr Infect Dis Rep*. 2018;20(12):50. doi:10.1007/s11908-018-0656-3
37. Jentes ES, Lash RR, Johansson MA, et al. Evidence-based risk assessment and communication: a new global dengue-risk map for travellers and clinicians #. *J Travel Med*. 2016;23(6):taw062. doi:10.1093/jtm/taw062
38. Rabinowicz S, Schwartz E. Morbidity among Israeli paediatric travellers. *J Travel Med*. 2017;24(6). doi:10.1093/jtm/tax062
39. Prayitno A, Taurel AF, Nealon J, et al. Dengue seroprevalence and force of primary infection in a representative population of urban dwelling

- Indonesian children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005621. doi:10.1371/journal.pntd.0005621
40. Harapan H, Rajamoorthy Y, Anwar S, et al. Knowledge, attitude, and practice regarding dengue virus infection among inhabitants of Aceh, Indonesia: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):96. doi:10.1186/s12879-018-3006-z
  41. Karyanti MR, Uiterwaal CSPM, Kusriastuti R, et al. The changing incidence of Dengue Haemorrhagic Fever in Indonesia: a 45-year registry-based analysis. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):412. doi:10.1186/1471-2334-14-412
  42. Wijayanti SPM, Porphyre T, Chase-Topping M, et al. The Importance of Socio-Economic Versus Environmental Risk Factors for Reported Dengue Cases in Java, Indonesia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9):e0004964. doi:10.1371/journal.pntd.0004964
  43. Shu PY, Su CL, Liao TL, et al. Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003-2007: geographic distribution and genotype shift. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(6):1039-1046.
  44. Williams M, Mayer S V., Johnson WL, et al. Lineage II of Southeast Asian/American DENV-2 is Associated with a Severe Dengue Outbreak in the Peruvian Amazon. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014;91(3):611-620. doi:10.4269/ajtmh.13-0600
  45. Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, et al. Displacement of the Predominant Dengue Virus from Type 2 to Type 1 with a Subsequent Genotype Shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008–2010. *PLoS One*. 2011;6(11):e27322. doi:10.1371/journal.pone.0027322
  46. Kusmintarsih ES, Hayati RF, Turnip ON, et al. Molecular characterization of dengue viruses isolated from patients in Central Java, Indonesia. *J Infect Public Health*. 2018;11(5):617-625. doi:10.1016/j.jiph.2017.09.019
  47. Shihada S, Emmerich P, Thomé-Bolduan C, et al. Genetic Diversity and New Lineages of Dengue Virus Serotypes 3 and 4 in Returning Travelers, Germany, 2006–2015. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(2):272-275. doi:10.3201/eid2302.160751
  48. Hendarto SK, Hadinegoro R. Dengue Encephalopathy. *Pediatrics International*. 1992;34(3):350-357. doi:10.1111/j.1442-200X.1992.tb00971.x
  49. Niranjan R, Muthukumaravel S, Jambulingam P. The Involvement of Neuroinflammation in Dengue Viral Disease: Importance of Innate and Adaptive Immunity. *Neuroimmunomodulation*. 2019;26(3):111-118. doi:10.1159/000501209

50. Kraemer MUG, Reiner RC, Brady OJ, et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol.* 2019;4(5):854-863. doi:10.1038/s41564-019-0376-y
51. Puccioni-Sohler M, Rosadas C. Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection. *Arq Neuropsiquiatr.* 2015;73(8):698-703. doi:10.1590/0004-282X20150074
52. Hapuarachchi HC, Chua RCR, Shi Y, et al. Clinical Outcome and Genetic Differences within a Monophyletic Dengue Virus Type 2 Population. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121696. doi:10.1371/journal.pone.0121696
53. Roy SK, Bhattacharjee S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Can J Microbiol.* 2021;67(10):687-702. doi:10.1139/cjm-2020-0572
54. Roy SK, Bhattacharjee S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Can J Microbiol.* 2021;67(10):687-702. doi:10.1139/cjm-2020-0572
55. Gwee XWS, Chua PEY, Pang J. Global dengue importation: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):1078. doi:10.1186/s12879-021-06740-1
56. Libraty DH, Young PR, Pickering D, et al. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1165-1168. doi:10.1086/343813
57. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-496. doi:10.1128/CMR.11.3.480
58. Rothman AL. Immunology and Immunopathogenesis of Dengue Disease. In: ; 2003:397-419. doi:10.1016/S0065-3527(03)60010-2
59. Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007;30(5-6):329-340. doi:10.1016/j.cimid.2007.05.010
60. Hasan S, Jamdar SF, Alalowi M, Al Ageel Al Beajji SM. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016;6(1):1-6. doi:10.4103/2231-0762.175416
61. Lien TS, Sun DS, Wu WS, Chang HH. Dengue Envelope Protein as a Cytotoxic Factor Inducing Hemorrhage and Endothelial Cell Death in Mice. *Int J Mol Sci.* 2024;25(19):10858. doi:10.3390/ijms251910858
62. Cheng CC, Sofiyatun E, Chen WJ, Wang LC. Life as a Vector of Dengue Virus: The Antioxidant Strategy of Mosquito Cells to Survive Viral Infection. *Antioxidants.* 2021;10(3):395. doi:10.3390/antiox10030395

63. da Fonseca NJ, Lima Afonso MQ, Pedersolli NG, de Oliveira LC, Andrade DS, Bleicher L. Sequence, structure and function relationships in flaviviruses as assessed by evolutive aspects of its conserved non-structural protein domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;492(4):565-571. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.041
64. Soo KM, Khalid B, Ching SM, Chee HY. Meta-Analysis of Dengue Severity during Infection by Different Dengue Virus Serotypes in Primary and Secondary Infections. *PLoS One.* 2016;11(5):e0154760. doi:10.1371/journal.pone.0154760
65. Fisher R, Lustig Y, Sklan EH, Schwartz E. The Role of NS1 Protein in the Diagnosis of Flavivirus Infections. *Viruses.* 2023;15(2). doi:10.3390/v15020572
66. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. In: ; 2003:23-61. doi:10.1016/S0065-3527(03)59002-9
67. Blitvich BJ, Firth AE. A Review of Flaviviruses that Have No Known Arthropod Vector. *Viruses.* 2017;9(6). doi:10.3390/v9060154
68. Akey DL, Brown WC, Jose J, Kuhn RJ, Smith JL. Structure-guided insights on the role of NS1 in flavivirus infection. *Bioessays.* 2015;37(5):489-494. doi:10.1002/bies.201400182
69. Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology.* 1989;171(1):302-305. doi:10.1016/0042-6822(89)90544-8
70. Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2011;108(19):8003-8008. doi:10.1073/pnas.1017338108
71. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol.* 2011;187(1):424-433. doi:10.4049/jimmunol.1100750
72. Korhonen EM, Huhtamo E, Virtala AMK, Kantele A, Vapalahti O. Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue. *J Clin Virol.* 2014;61(3):353-358. doi:10.1016/j.jcv.2014.08.021
73. Puerta-Guardo H, Glasner DR, Espinosa DA, et al. Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Rep.* 2019;26(6):1598-1613.e8. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.036

74. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. In: ; 2003:23-61. doi:10.1016/S0065-3527(03)59002-9
75. Blitvich BJ, Firth AE. A Review of Flaviviruses that Have No Known Arthropod Vector. *Viruses*. 2017;9(6). doi:10.3390/v9060154
76. Akey DL, Brown WC, Dutta S, et al. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science*. 2014;343(6173):881-885. doi:10.1126/science.1247749
77. Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology*. 1989;171(1):302-305. doi:10.1016/0042-6822(89)90544-8
78. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol*. 1999;73(7):6104-6110. doi:10.1128/JVI.73.7.6104-6110.1999
79. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol*. 2011;187(1):424-433. doi:10.4049/jimmunol.1100750
80. Zhao R, Wang M, Cao J, et al. Flavivirus: From Structure to Therapeutics Development. *Life (Basel)*. 2021;11(7). doi:10.3390/life11070615
81. Payne S. Introduction to RNA Viruses. In: *Viruses*. Elsevier; 2017:97-105. doi:10.1016/B978-0-12-803109-4.00010-6
82. Puerta-Guardo H, Glasner DR, Espinosa DA, et al. Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Rep*. 2019;26(6):1598-1613.e8. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.036
83. Falconar AKI. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol*. 1997;142(5):897-916. doi:10.1007/s007050050127
84. Araújo FMC, Brilhante RSN, Cavalcanti LPG, et al. Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods*. 2011;177(1):128-131. doi:10.1016/j.jviromet.2011.07.003
85. Korhonen EM, Huhtamo E, Virtala AMK, Kantele A, Vapalahti O. Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: Exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue.

- Journal of Clinical Virology*. 2014;61(3):353-358. doi:10.1016/j.jcv.2014.08.021
86. Humaidi M, Tien WP, Yap G, Chua CR, Ng LC. Non-Invasive Dengue Diagnostics-The Use of Saliva and Urine for Different Stages of the Illness. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(8). doi:10.3390/diagnostics11081345
  87. Saito Y, Moi ML, Kotaki A, et al. Detecting Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) in Urine Samples Using ELISA for the Diagnosis of Dengue Virus Infection. *Jpn J Infect Dis*. 2015;68(6):455-460. doi:10.7883/yoken.JJID.2014.441
  88. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Tangnaratchakit K, Yoksan S, Flamand M, Sakuntabhai A. Dengue nonstructural protein 1 antigen in the urine as a rapid and convenient diagnostic test during the febrile stage in patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71(4):467-469. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.020
  89. Andries AC, Duong V, Ly S, et al. Value of Routine Dengue Diagnostic Tests in Urine and Saliva Specimens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0004100. doi:10.1371/journal.pntd.0004100
  90. Chuang YC, Wang SY, Lin YS, Chen HR, Yeh TM. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 2013;20(1):42. doi:10.1186/1423-0127-20-42
  91. Souza LR, Colonna JG, Comodaro JM, Naveca FG. Using amino acids co-occurrence matrices and explainability model to investigate patterns in dengue virus proteins. *BMC Bioinformatics*. 2022;23(1):80. doi:10.1186/s12859-022-04597-y
  92. Alcon-LePoder S, Drouet MT, Roux P, et al. The Secreted Form of Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is Endocytosed by Hepatocytes and Accumulates in Late Endosomes: Implications for Viral Infectivity. *J Virol*. 2005;79(17):11403-11411. doi:10.1128/JVI.79.17.11403-11411.2005
  93. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, et al. Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. *PLoS Pathog*. 2007;3(11):e183. doi:10.1371/journal.ppat.0030183
  94. Modhiran N, Watterson D, Muller DA, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med*. 2015;7(304):304ra142. doi:10.1126/scitranslmed.aaa3863
  95. Khanna A, Atam V, Gupta A. A case of dengue encephalitis with intracerebral hemorrhage. *J Glob Infect Dis*. 2011;3(2):206-207. doi:10.4103/0974-777X.81707

96. Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 2008;267(1-2):36-40. doi:10.1016/j.jns.2007.09.040
97. Dussart P, Petit L, Labeau B, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(8):e280. doi:10.1371/journal.pntd.0000280
98. Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, et al. Neurological manifestations of dengue infection. *The Lancet.* 2000;355(9209):1053-1059. doi:10.1016/S0140-6736(00)02036-5
99. Araújo F, Nogueira R, Araújo M de S, et al. Dengue in patients with central nervous system manifestations, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(4):677-679. doi:10.3201/eid1804.111552
100. Foo KY, Chee HY. Interaction between *Flavivirus* and Cytoskeleton during Virus Replication. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-6. doi:10.1155/2015/427814
101. Hackett BA, Cherry S. Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018;115(16):4246-4251. doi:10.1073/pnas.1720032115
102. Pounsawai J, Kanlaya R, Pattanakitsakul S nga, Thongboonkerd V. Subcellular localizations and time-course expression of dengue envelope and non-structural 1 proteins in human endothelial cells. *Microb Pathog.* 2011;51(3):225-229. doi:10.1016/j.micpath.2011.04.011
103. Gerdes HH, Rustom A, Wang X. Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mech Dev.* 2013;130(6-8):381-387. doi:10.1016/j.mod.2012.11.006
104. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science (1979).* 2004;303(5660):1007-1010. doi:10.1126/science.1093133
105. Sartori-Rupp A, Cordero Cervantes D, Pepe A, et al. Correlative cryo-electron microscopy reveals the structure of TNTs in neuronal cells. *Nat Commun.* 2019;10(1):342. doi:10.1038/s41467-018-08178-7
106. Chang K, Baginski J, Hassan SF, Volin M, Shukla D, Tiwari V. Filopodia and Viruses: An Analysis of Membrane Processes in Entry Mechanisms. *Front Microbiol.* 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00300
107. Abounit S, Wu JW, Duff K, Victoria GS, Zurzolo C. Tunneling nanotubes: A possible highway in the spreading of tau and other prion-like proteins in neurodegenerative diseases. *Prion.* 2016;10(5):344-351. doi:10.1080/19336896.2016.1223003

108. Geneva: World Health Organization; 2009. *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control.*; 2009.
109. Misra UK, Kalita J, Syam UK, Dhole TN. Neurological manifestations of dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 2006;244(1-2):117-122. doi:10.1016/j.jns.2006.01.011
110. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2(1):16055. doi:10.1038/nrdp.2016.55
111. Cam B V, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard ED. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(6):848-851. doi:10.4269/ajtmh.2001.65.848
112. Hendarto SK, Hadinegoro R. Dengue Encephalopathy. *Pediatrics International.* 1992;34(3):350-357. doi:10.1111/j.1442-200X.1992.tb00971.x
113. Ritesh Sahu 1 RV 2, AJ 1, RKG 1, MKS 1, HSM 1, PKS 1, AP 1. Neurologic complications in dengue virus infection: a prospective cohort study.
114. Ramos C, SÁNchez G, Pando RH, et al. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol.* 1998;4(4):465-468. doi:10.3109/13550289809114548
115. Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, Freitas MRG, Puccioni-Sohler M. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: Report of a case. *International Journal of Infectious Diseases.* 2010;14(2):e150-e152. doi:10.1016/j.ijid.2009.03.016
116. Thongrungrat S, Maneekan P, Wasinpiyamongkol L, Prummongkol S. Prospective field study of transovarial dengue-virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. *Journal of Vector Ecology.* 2011;36(1):147-152. doi:10.1111/j.1948-7134.2011.00151.x
117. Teo A, Chua CLL, Chia PY, Yeo TW. Insights into potential causes of vascular hyperpermeability in dengue. *PLoS Pathog.* 2021;17(12):e1010065. doi:10.1371/journal.ppat.1010065
118. Murthy JMK. Neurological complications of dengue infection. *Neurol India.* 2010;58(4):581. doi:10.4103/0028-3886.68654
119. Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J. Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol.* 2013;12(9):906-919. doi:10.1016/S1474-4422(13)70150-9
120. Lo YT, Kalimuddin S, Keong NCH, Lie SA. An unusual case of dengue fever in aneurysmal subarachnoid haemorrhage: diagnosis and management

- nuances. *Br J Neurosurg.* 2023;37(6):1859-1862. doi:10.1080/02688697.2021.1946674
121. Mohammed AP, Koraddi A, Prabhu A, Kotian CM, Umakanth S. Rapidly progressive dementia with seizures: a post-dengue complication. *Trop Doct.* 2020;50(1):81-83. doi:10.1177/0049475519885798
  122. Rangankar V, Kumar D, Kuber R, Kalekar T. Imaging of the neurological manifestations of dengue: A case series. *South African Journal of Radiology.* 2022;26(1). doi:10.4102/sajr.v26i1.2528
  123. Yerremreddy S, Doddapaneni NSP. Reversible Splenial Lesion Syndrome Associated With Dengue Encephalopathy: A Case Report. *Cureus.* Published online November 1, 2023. doi:10.7759/cureus.48109
  124. Hussain T, Rashid Z, Kumar J, Kumar D. Rare case of dengue encephalitis with extensive brain lesions from Pakistan. *BMJ Case Rep.* 2022;15(11):e250271. doi:10.1136/bcr-2022-250271
  125. Lo YT, Kalimuddin S, Keong NCH, Lie SA. An unusual case of dengue fever in aneurysmal subarachnoid haemorrhage: diagnosis and management nuances. *Br J Neurosurg.* 2023;37(6):1859-1862. doi:10.1080/02688697.2021.1946674
  126. Chiappelli F, Santos SME, Caldeira Brant XM, et al. Viral immune evasion in dengue: toward evidence-based revisions of clinical practice guidelines. *Bioinformatics.* 2014;10(12):726-733. doi:10.6026/97320630010726
  127. Malavige GN, Ogg GS. Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology.* 2017;151(3):261-269. doi:10.1111/imm.12748
  128. De Bock M, De Smet M, Verwaerde S, et al. Targeting gliovascular connexins prevents inflammatory blood-brain barrier leakage and astrogliosis. *JCI Insight.* 2022;7(16). doi:10.1172/jci.insight.135263
  129. Zhang M, Wang ZZ, Chen NH. Connexin 43 Phosphorylation: Implications in Multiple Diseases. *Molecules.* 2023;28(13):4914. doi:10.3390/molecules28134914
  130. Haltaufderhyde K, Srikiatkachorn A, Green S, et al. Activation of Peripheral T Follicular Helper Cells During Acute Dengue Virus Infection. *J Infect Dis.* 2018;218(10):1675-1685. doi:10.1093/infdis/jiy360
  131. Calderón-Peláez MA, Velandia-Romero ML, Bastidas-Legarda LY, Beltrán EO, Camacho-Ortega SJ, Castellanos JE. Dengue Virus Infection of Blood–Brain Barrier Cells: Consequences of Severe Disease. *Front Microbiol.* 2019;10. doi:10.3389/fmicb.2019.01435
  132. Naruse I, Keino H. Apoptosis in the developing CNS. *Prog Neurobiol.* 1995;47(2):135-155. doi:10.1016/0301-0082(95)00024-P

133. Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RFC. Parkinson's disease risk factors: genetic, environmental, or both? *Neurol Res.* 2005;27(2):206-208. doi:10.1179/016164105X22057
134. Haupt C, Witte OW, Frahm C. Temporal profile of connexin 43 expression after photothrombotic lesion in rat brain. *Neuroscience.* 2007;144(2):562-570. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.09.054
135. Kameritsch P, Khandoga N, Pohl U, Pogoda K. Gap junctional communication promotes apoptosis in a connexin-type-dependent manner. *Cell Death Dis.* 2013;4(4):e584-e584. doi:10.1038/cddis.2013.105
136. Huang R, Liu Y, Lin Y, et al. Enhanced apoptosis under low serum conditions in human glioblastoma cells by connexin 43 (Cx43). *Mol Carcinog.* 2001;32(3):128-138. doi:10.1002/mc.1072
137. Vicario N, Calabrese G, Zappalà A, et al. Inhibition of Cx43 mediates protective effects on hypoxic/reoxygenated human neuroblastoma cells. *J Cell Mol Med.* 2017;21(10):2563-2572. doi:10.1111/jcmm.13177
138. Ma J wei, Ji D dan, Li Q qian, Zhang T, Luo L. Inhibition of connexin 43 attenuates oxidative stress and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Pulm Med.* 2020;20(1):19. doi:10.1186/s12890-019-1036-y
139. Pan Y, Cheng A, Wang M, Yin Z, Jia R. The Dual Regulation of Apoptosis by Flavivirus. *Front Microbiol.* 2021;12. doi:10.3389/fmicb.2021.654494
140. Wang W, Gao W, Gong P, et al. Neuronal-specific TNFAIP1 ablation attenuates postoperative cognitive dysfunction via targeting SNAP25 for K48-linked ubiquitination. *Cell Communication and Signaling.* 2023;21(1):356. doi:10.1186/s12964-023-01390-z
141. Chen P, Li X, Yu X, Yang M. Ginsenoside Rg1 Suppresses Non-Small-Cell Lung Cancer via MicroRNA-126-PI3K-AKT-mTOR Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2022;2022:1-12. doi:10.1155/2022/1244836
142. La Rosa F, Zoia CP, Bazzini C, et al. Modulation of MAPK- and PI3/AKT-Dependent Autophagy Signaling by Stavudine (D4T) in PBMC of Alzheimer's Disease Patients. *Cells.* 2022;11(14):2180. doi:10.3390/cells11142180
143. Sternfeld T, Tischleder A, Schuster M, Bogner J. Mitochondrial membrane potential and apoptosis of blood mononuclear cells in untreated HIV-1 infected patients. *HIV Med.* 2009;10(8):512-519. doi:10.1111/j.1468-1293.2009.00723.x
144. Castro DTH, Leite DF, da Silva Baldivia D, et al. Structural Characterization and Anticancer Activity of a New Anthraquinone from *Senna velutina* (Fabaceae). *Pharmaceuticals.* 2023;16(7):951. doi:10.3390/ph16070951

145. Baechler BL, Bloemberg D, Quadriatero J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation. *Autophagy*. 2019;15(9):1606-1619. doi:10.1080/15548627.2019.1591672
146. Gong Y, Luo S, Fan P, Zhu H, Li Y, Huang W. Growth hormone activates PI3K/Akt signaling and inhibits ROS accumulation and apoptosis in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020;18(1):121. doi:10.1186/s12958-020-00677-x
147. Ajao C, Andersson MA, Teplova V V., et al. Mitochondrial toxicity of triclosan on mammalian cells. *Toxicol Rep*. 2015;2:624-637. doi:10.1016/j.toxrep.2015.03.012
148. Pourahmad J, Salimi A. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iran J Pharm Res*. 2015;14(4):979.
149. Thanasak J, Tansatit T, Taowan J, Hirunwiroj N, Chitthichanonte S, Wongmack T. The peripheral blood mononuclear cells preparation and the hematology of *Varanus salvator*. *PLoS One*. 2022;17(7):e0269108. doi:10.1371/journal.pone.0269108
150. Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008;376(2):429-435. doi:10.1016/j.virol.2008.03.028
151. Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanarooj S, Pulmanasahakul R, Ubol S. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol*. 2009;53(8):442-450. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00148.x
152. Chen YL, Abdul Ghafar N, Karuna R, et al. Activation of Peripheral Blood Mononuclear Cells by Dengue Virus Infection Depotentiates Balapiravir. *J Virol*. 2014;88(3):1740-1747. doi:10.1128/JVI.02841-13
153. Srikiatkachorn A, Wichit S, Gibbons R V., et al. Dengue Viral RNA Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells Are Associated with Disease Severity and Preexisting Dengue Immune Status. *PLoS One*. 2012;7(12):e51335. doi:10.1371/journal.pone.0051335
154. Wong KL, Chen W, Balakrishnan T, Toh YX, Fink K, Wong SC. Susceptibility and Response of Human Blood Monocyte Subsets to Primary Dengue Virus Infection. *PLoS One*. 2012;7(5):e36435. doi:10.1371/journal.pone.0036435

155. Perdomo-Celis F, Salgado DM, Narváez CF. Selective dysfunction of subsets of peripheral blood mononuclear cells during pediatric dengue and its relationship with clinical outcome. *Virology*. 2017;507:11-19. doi:10.1016/j.virol.2017.04.004
156. Waickman AT, Friberg H, Gromowski GD, et al. Temporally integrated single cell RNA sequencing analysis of PBMC from experimental and natural primary human DENV-1 infections. *PLoS Pathog*. 2021;17(1):e1009240. doi:10.1371/journal.ppat.1009240
157. Dayarathna S, Senadheera B, Jeewandara C, et al. Dengue NS1 interaction with lipids alters its pathogenic effects on monocyte derived macrophages. *J Biomed Sci*. 2024;31(1):86. doi:10.1186/s12929-024-01077-8
158. Waldran MJ, Wegman AD, Bahr LE, Roy NH, Currier JR, Waickman AT. Soluble NS1 Antagonizes IgG- and IgA- Mediated Monocytic Phagocytosis of DENV Infected Cells. *J Infect Dis*. 2023;228(1):70-79. doi:10.1093/infdis/jiad122
159. Silva T, Gomes L, Jeewandara C, Ogg GS, Malavige GN. Dengue NS1 induces phospholipase A2 enzyme activity, prostaglandins, and inflammatory cytokines in monocytes. *Antiviral Res*. 2022;202:105312. doi:10.1016/j.antiviral.2022.105312
160. Martínez-Rojas PP, Monroy-Martínez V, Agredano-Moreno LT, Jiménez-García LF, Ruiz-Ordaz BH. Zika Virus-Infected Monocyte Exosomes Mediate Cell-to-Cell Viral Transmission. *Cells*. 2024;13(2):144. doi:10.3390/cells13020144
161. Adikari TN, Gomes L, Wickramasinghe N, et al. Dengue NS1 antigen contributes to disease severity by inducing interleukin (IL)-10 by monocytes. *Clin Exp Immunol*. 2016;184(1):90-100. doi:10.1111/cei.12747
162. Sanchez Vargas LA, Adam A, Masterson M, et al. Non-structural protein 1-specific antibodies directed against Zika virus in humans mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Immunology*. 2021;164(2):386-397. doi:10.1111/imm.13380
163. Kang H. Sample size determination and power analysis using the G\*Power software. *J Educ Eval Health Prof*. 2021;18:17. doi:10.3352/jeehp.2021.18.17
164. Pignata C, Fiore M, De Filippo S, Cavalcanti M, Gaetaniello L, Scotese I. Apoptosis as a Mechanism of Peripheral Blood Mononuclear Cell Death after Measles and Varicella-Zoster Virus Infections in Children. *Pediatr Res*. 1998;43(1):77-83. doi:10.1203/00006450-199801000-00012
165. Jadali Z, Amiri M, Ravanbakhsh M. Apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with sepsis. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010;53(4):646. doi:10.4103/0377-4929.72013

166. Guo L, Liang Y. Expression of PBMC apoptosis-related factors in patients with chronic hepatitis B and their relationships with clinical prognosis. *Exp Ther Med*. Published online October 12, 2017. doi:10.3892/etm.2017.5299

## LAMPIRAN

### Lampiran 1

### Surat Peminjaman Laboratorium Terpadu



**UMSU**

Unggul | Cerdas | Terpercaya

Bila menjwab surat ini agar disubukan nomor dan tanggalnya

MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI PENELITIAN & PENGEMBANGAN PIMPINAN PUSAT MUHAMMADIYAH  
**UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**

UMSU Terakreditasi Unggul Berdasarkan Keputusan Badan Akreditasi Nasional Perguruan Tinggi No. 174/SK/BAN-PT/Ak.Pp/PT/III/2024  
Jl. Gedung Arca No. 53 Medan, 20217 Telp. (061) - 7350163, 7333162, Fax. (061) - 7363488

<https://fk.umsu.ac.id> [fk@umsu.ac.id](mailto:fk@umsu.ac.id) [umsumedan](#) [umsumedan](#) [umsumedan](#) [umsumedan](#)

Nomor : 1396/II.3.AU/UMSU-08/F/2024  
Lampiran : -  
Perihal : **Peminjaman Tempat Penelitian**

Medan, 15 Rabi'ul Awal 1446 H  
20 September 2024 M

Kepada Yth.  
**Kepala Bagian Lab.Terpadu**  
**Fakultas Kedokteran UMSU**  
di-  
Tempat

*Assalamu 'alaikum warahmatullahi wabarakatuh*

Sehubungan dengan surat permohonan peminjaman tempat untuk melakukan penelitian pada Laboratorium di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, yaitu :

Nama : **Riyanda Indrawan Sani**  
NPM : **2208330001**  
Judul Penelitian : **Peran Protein Nonstruktural 1 Virus Dengue terhadap Komunikasi Antar Sel Melalui Deteksi Ekspresi Protein Connexin43, Caspase-3, dan Viabilitas Sel**

maka kami memberikan izin kepada yang bersangkutan, untuk melakukan penelitian di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Selama proses pemakaian laboratorium, jika terdapat pemakaian alat yang rusak maka akan menjadi tanggungjawab peneliti dan pemakaian Bahan Habis Pakai (BHP) ditanggung oleh peneliti. Peneliti wajib mengikuti peraturan yang berlaku di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

Demikian kami sampaikan, atas perhatian kami ucapkan terima kasih.

*Wassalamu 'alaikum warahmatullahi wabarakatuh*




Dekan,  
  
**dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL(K)**  
NIDN: 0106098201

Tembusan Yth :  
1. Peringgal



## Lampiran 2

### Surat Keterangan Kajian Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA  
FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK**  
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL  
"ETHICAL APPROVAL"  
No : 1359/KEPK/FKUMSU/2024

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :  
*The Research protocol proposed by*

Peneliti Utama : dr. Riyanda Indrawan Sani  
*Principal in investigator*

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara  
*Name of the Institution Faculty of Medicine University of Muhammadiyah of Sumatera Utara*

Dengan Judul  
*Title*


**"PERAN PROTEIN NONSTRUKTURAL 1 VIRUS DENGUE TERHADAP KOMUNIKASI ANTAR SEL MELALUI DETEKSI  
EKSPRESIPROTEIN CONNEXIN43,CASPASE-3 DAN VIABILITAS SEL"**

**" TH ROLE OF DENGUE VIRUS NONSTRUCTURAL PROTEIN 1 IN CELL COMMUNICATION THROUGH THE DETECTION OF  
CONNEXIN43 EXPRESSION CASCAPE-3 AND CELL VIABILITY"**

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah  
3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Resiko, 5) Bujukan / Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan  
7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator  
setiap standar.

*Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable  
Assesment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion / Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Consent, referring to the 2016  
CIOMS Guadelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicator of each standard*

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 19 November 2024 sampai dengan tanggal 19 November 2025  
*The declaration of ethics applies during the periode 19 November, 2024 until November 19, 2025*

Medan, 19 November 2024  
Ketua  
  
Assoc. Prof. Dr. dr. Nurfady, MKT

## Lembar Persetujuan Seminar Hasil

MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI, PENELITIAN &  
PENGEMBANGAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH  
SUMATERA UTARA



**FAKULTAS KEDOKTERAN**

Jalan Gedung Arca No. 53 Medan 20217 Telp. (061) 7350163 – 7333162 Ext.

20 Fax. (061) 7363488

Website : [fk@umsu.ac.id](mailto:fk@umsu.ac.id)



### LEMBAR PERMOHONAN UJIAN SEMINAR HASIL PENELITIAN

Nama : dr. Riyanda Indrawan Sani  
NPM : 2208330001  
Prodi/Bagian : Magister Ilmu Biomedis  
Judul Tesis : Peran Protein Nonstruktural 1 Virus Dengue terhadap  
Komunikasi Antar Sel melalui *Gap Junction*

Disetujui untuk disampaikan kepada panitia ujian  
Medan, 29 Juli 2025

Pemohon

dr. Riyanda Indrawan Sani

NPM : 2208330001

Disetujui dan diketahui oleh

Pembimbing 1,

(Assoc. Prof. Dr. dr. Nurfadly, MKT)

NIDN: 012097003

Pembimbing 2,

(dr. Zukhrofi Muzar, M.Si.Med, M.Sc, Ph.D)

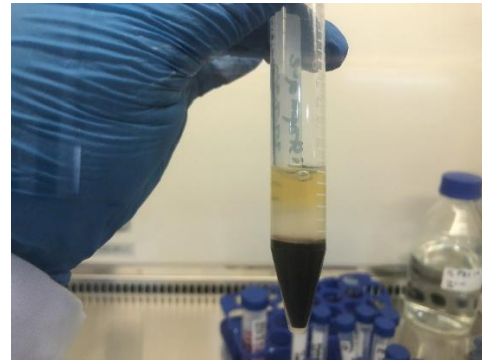
NIDN: 0128068602

### Lampiran 3

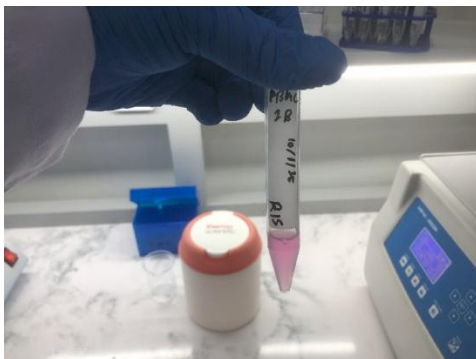
#### Proses Isolasi PBMC & Cryopreservation



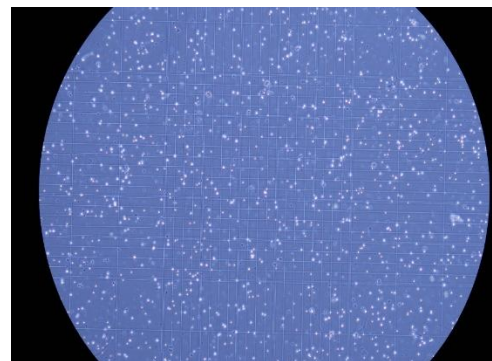
Panambahan Histopaque dengan Darah



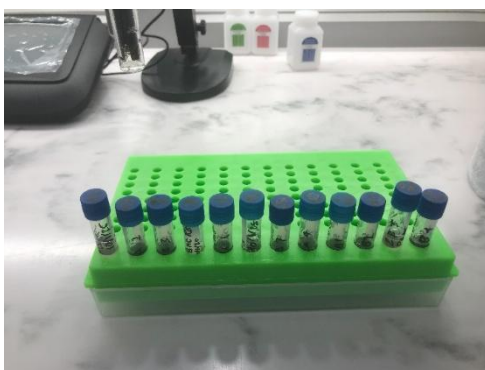
Sampel yang telah di sentrifugasi



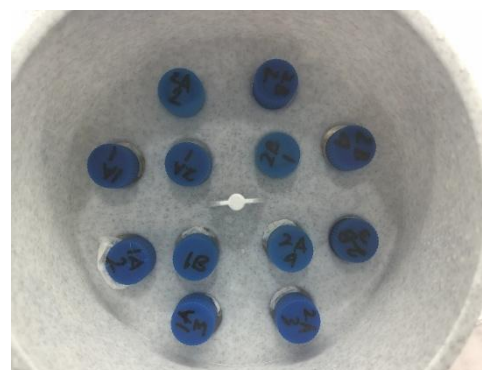
Sel PBMC dalam Medium RPMI-1640



Perhitungan Sel PBMC pada Inverted Mikroskop



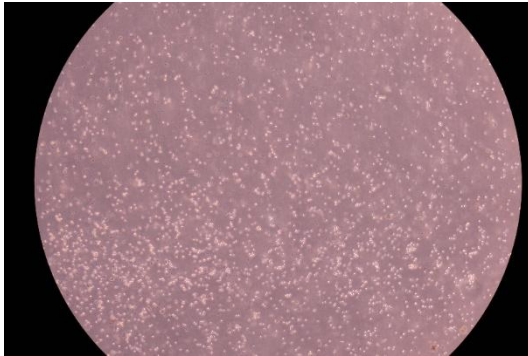
Sel PBMC dalam Cryotube yang siap di bekukan



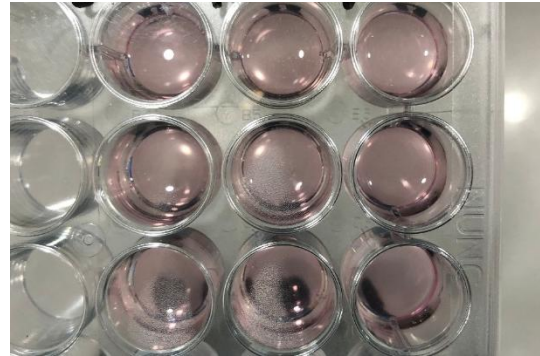
Sel PBMC dalam cryotank

## Lampiran 4

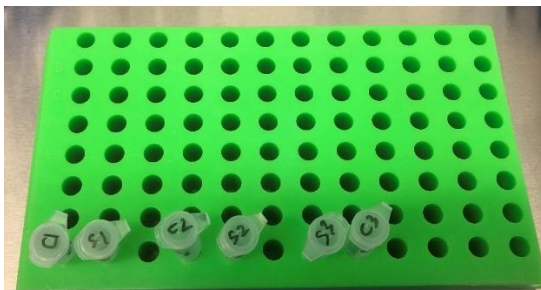
### Paparan NS1 dan pewarnaan JC-1



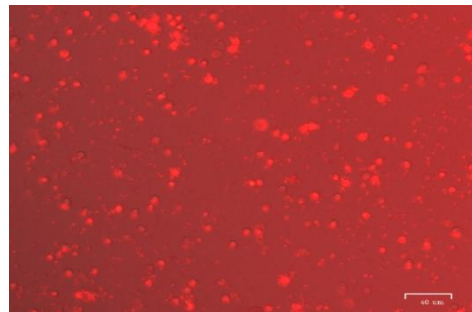
Sel dalam 24-wellplate setelah di kultur



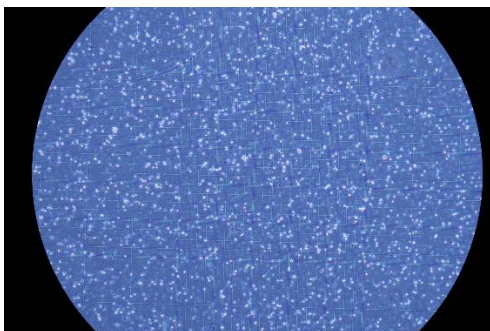
Kultur PBMC saat paparan NS1



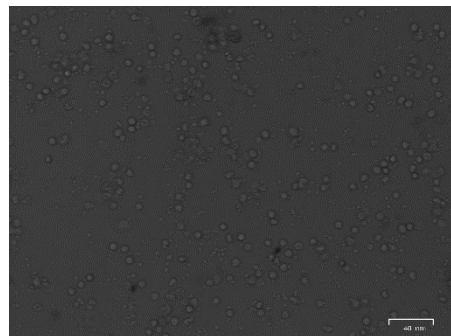
NS1 yang akan di paparkan pada PBMC



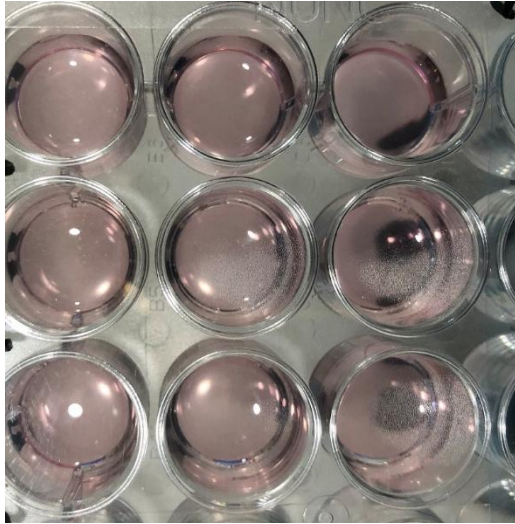
Sel dengan PBM dengan Pewarnaan JC-1 dilihat di mikroskop fluoresence



Perhitungan Sel dengan Naubauer Chamber



Sel dengan PBMC dilihat di mikroskop fluoresence



Sel PBMC saat paparan NS1 untuk Isolasi RNA



Sentrifugasi pada Isolasi RNA



Pemeriksaan konsentrasi dan absorbansi RNA dengan Spektrofotometer NABI UV-Vis



Hasil pengukuran Aborbansi dengan Spektrofotometer NABI UV-Vis



## Lampiran 6

### Data Mentah Pemeriksaan JC1

JUMLAH MONOSIT									
No	C 1	N1 1	N5 1	C 2	N1 2	N5 2	C 3	N1 3	N5 3
Mid	85	152	200	124	81	129	194	185	87
3	83	204	241	82	159	136	124	170	287
6	102	130	139	82	111	94	125	154	141
9	174	89	142	205	91	139	252	127	162
12	104	73	136	91	91	110	137	92	120
Total	548	648	858	584	533	608	832	728	797

Monosit			
Sampel	Kontrol	NS1 1ng	NS1 5ng
Sampel 1	548	648	858
Sampel 2	584	533	608
Sampel 3	832	728	797
mean	654.67	636.33	754.33
stdev	154.63	98.02	130.35
SEM	89.27	56.59	75.26

JUMLAH JC1									
No	C 1	N1 1	N5 1	C 2	N1 2	N5 2	C 3	N1 3	N5 3
Mid	74	77	139	117	56	97	173	158	58
3	78	123	169	76	117	86	107	145	239
6	93	71	76	75	87	56	105	126	95
9	146	53	108	190	57	105	231	91	115
12	90	48	82	80	52	84	116	66	89
Total	481	372	574	538	369	428	732	586	596

JC-1			
Sampel	Kontrol	NS1 1ng	NS1 5ng
Sampel 1	481	372	574
Sampel 2	538	369	428
Sampel 3	732	586	596
mean	583.67	442.33	532.67
stdev	131.58	124.43	91.31
SEM	75.97	71.84	52.72

Normalisasi JC1 ke MONOSIT									
No	C 1	N1 1	N5 1	C 2	N1 2	N5 2	C 3	N1 3	N5 3
Mid	0.87	0.51	0.70	0.94	0.69	0.75	0.89	0.85	0.67
3	0.94	0.60	0.70	0.93	0.74	0.63	0.86	0.85	0.83
6	0.91	0.55	0.55	0.91	0.78	0.60	0.84	0.82	0.67
9	0.84	0.60	0.76	0.93	0.63	0.76	0.92	0.72	0.71
12	0.87	0.66	0.60	0.88	0.57	0.76	0.85	0.72	0.74
Total	0.88	0.57	0.67	0.92	0.69	0.70	0.88	0.80	0.75

Normalisasi JC-1 ke Monosit			
Sampel	Kontrol	NS1 1ng	NS1 5ng
Sampel 1	0.88	0.57	0.67
Sampel 2	0.92	0.69	0.70
Sampel 3	0.88	0.80	0.75
mean	0.89	0.69	0.71
stdev	0.02	0.12	0.04
SEM	0.01	0.07	0.02

## Lampiran 7

### Data Mentah Analisis RNA

Sampel	RNA Conc. (ng/ul)	Ct Value		
		GAPDH	Cx43	Casp-3
C1	2.9	28.07	31.26	31.12
C2	3.1	27.91	31.31	31.44
C3	3.4	28.53	31.86	30.96
S1	3.5	25.56	25.34	25.22
S2	3.8	25.30	24.96	24.70
S3	3.9	24.54	24.32	23.84
mean	3.43	26.65	28.17	27.88
StDev	0.39	1.71	3.64	3.64
SEM	0.16	0.70	1.49	1.49

Sampel	Kontrol	Paparan NS1
Sampel 1	2.9	3.5
Sampel 2	3.1	3.8
Sampel 3	3.4	3.9
Mean	3.13	3.73
StDev	0.25	0.21
SEM	0.15	0.12

## Lampiran 8

### Data Mentah Pemeriksaan RT-PCR

S.No.	Sample Name	Target Name	Ct Value 1	Ct Value 2	Ct Value 3	Average Ct Value
1	C1 GAPDH	GAPDH	29.12	28.87	26.23	28.07
2	C2 GAPDH	GAPDH	26.27	28.97	28.49	27.91
3	C3 GAPDH	GAPDH	28.68	29.37	27.54	28.53
4	S1 GAPDH	GAPDH	24.57	25.21	26.89	25.56
5	S2 GAPDH	GAPDH	26.82	25.75	23.33	25.30
6	S3 GAPDH	GAPDH	22.98	24.68	25.97	24.54

S.No.	Sample Name	Target Name	Ct Value 1	Ct Value 2	Ct Value 3	Average Ct Value
1	C1 Cx43	Cx43	30.59	31.41	31.78	31.26
2	C2 Cx43	Cx43	30.81	31.19	31.92	31.31
3	C3 Cx43	Cx43	32.03	31.88	31.67	31.86
4	C1 Casp3	Casp3	30.95	32.06	30.34	31.12
5	C2 Casp3	Casp3	30.45	32.72	31.15	31.44
6	C3 Casp3	Casp3	30.76	31.64	30.49	30.96

S.No.	Sample Name	Target Name	Ct Value 1	Ct Value 2	Ct Value 3	Average Ct Value
1	S1 Cx43	Cx43	25.89	24.34	25.78	25.34
2	S2 Cx43	Cx43	24.58	25.43	24.87	24.96
3	S3 Cx43	Cx43	24.07	24.22	24.66	24.32
4	S1 Casp3	Casp3	24.56	24.65	26.44	25.22
5	S2 Casp3	Casp3	24.01	25.09	24.99	24.70
6	S3 Casp3	Casp3	23.45	23.54	24.53	23.84

### **GAPDH**

Sampel	Kontrol	Paparan NS1
Sampel 1	28.07	25.56
Sampel 2	27.91	25.30
Sampel 3	28.53	24.54
Mean	28.17	25.13
StDev	0.32	0.53
SEM	0.19	0.30

### **Connexin43**

Sampel	Kontrol	Paparan NS1
Sampel 1	31.26	25.34
Sampel 2	31.31	24.96
Sampel 3	31.86	24.32
Mean	31.48	24.87
StDev	0.33	0.52
SEM	0.19	0.30

### **Caspase-3**

Sampel	Kontrol	Paparan
Sampel 1	31.12	25.22
Sampel 2	31.44	24.70
Sampel 3	30.96	23.84
Mean	31.17	24.58
StDev	0.24	0.70
SEM	0.14	0.40

# Lampiran 9

## Hasil RT-PCR

# PCR Tesis Riyan Report

Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt

Includes: Plate Setup, Thermal Profile, Raw Data Plots, Analysis Criteria, Amplification Plots, Melt Raw Derivative Curve, Consolidated Plots, Tabular Results, Experiment Notes

Instrument Name: New_Instrument	Instrument Type: AriaMx
Firmware Version: 3.1.2202.0901	Serial Number: MY21165217
Software Version: Agilent Aria Software v2.1	Run By: Guest
Last Modified Date: 21 Jun 2025 11:10:32	Run Start Date: 28 Jun 2025 15:15:12
	Elapsed Time: 0 : 55 : 11

Report Generated: 28 Jun 2025

ReportConfidential

Instrument Name: New_Instrument	Experiment Name: PCR Tesis Riyan Hasil
Instrument Type: AriaMx	Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt
	Run Date: 28 Jun 2025 15:15:12

### Plate Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	No RT 22	No RT 22		Unknown 3	Unknown 3	Unknown 3	Unknown 4	Unknown 4	Unknown 4	Unknown 5	Unknown 5	Unknown 5
B	No RT 23	No RT 23		Unknown 6	Unknown 6	Unknown 6	Unknown 7	Unknown 7	Unknown 7	Unknown 8	Unknown 8	Unknown 8
C	No RT 24	No RT 24		Unknown 9	Unknown 9	Unknown 9	Unknown 10	Unknown 10	Unknown 10	Unknown 11	Unknown 11	Unknown 11
D	MTC 25	MTC 25		Unknown 12	Unknown 12	Unknown 12	Unknown 13	Unknown 13	Unknown 13	Unknown 14	Unknown 14	Unknown 14
E	MTC 26	MTC 26		Unknown 15	Unknown 15	Unknown 15	Unknown 16	Unknown 16	Unknown 16	Unknown 17	Unknown 17	Unknown 17
F	MTC 27	MTC 27		Unknown 18	Unknown 18	Unknown 18	Unknown 19	Unknown 19	Unknown 19	Unknown 20	Unknown 20	Unknown 20
G										Unknown 28	Unknown 28	Unknown 28
H										Unknown 21	Unknown 21	Unknown 21

Targets:  SYBR

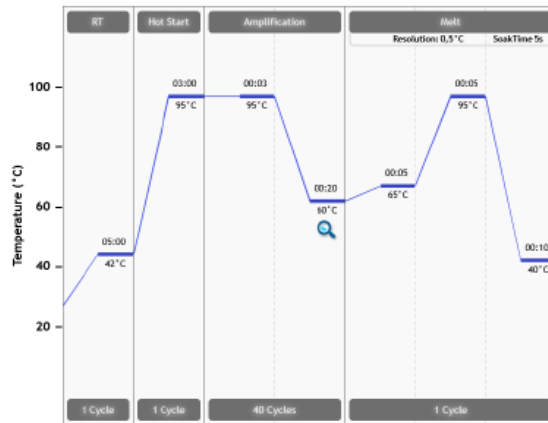
Instrument Name: New\_Instrument  
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: PCR Tesis Riyan Hasil  
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt  
Run Date: 28 Jun 2025 15:15:12

### Thermal Profile

Estimated Runtime: N/A

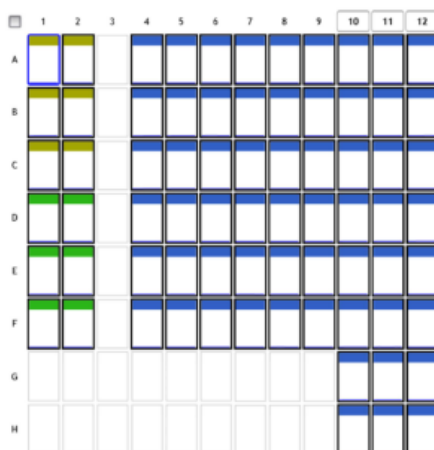
Total Data Collection Points: 40/2700



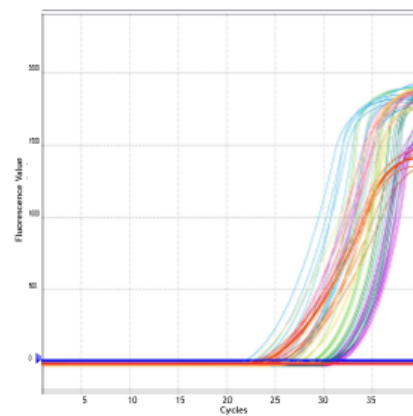
Instrument Name: New\_Instrument  
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: PCR Tesis Riyan Hasil  
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt  
Run Date: 28 Jun 2025 15:15:12

### Raw Data Plots



### Amplification Data



Instrument Name: New\_Instrument  
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: PCR Tesis Riyan Hasil  
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt  
Run Date: 28 Jun 2025 15:15:12

### Analysis Criteria

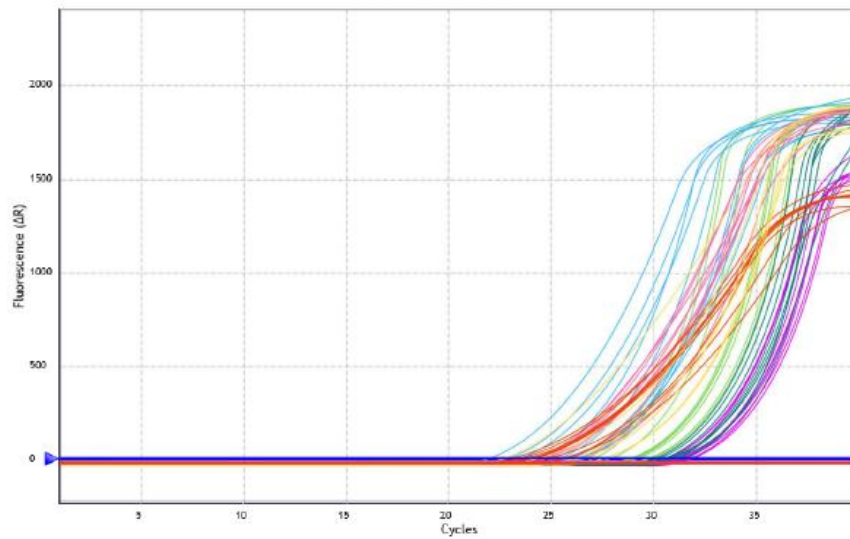
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	No RT 22	No RT 22		Unknown 3	Unknown 3	Unknown 3	Unknown 5	Unknown 5	Unknown 5	Unknown 5	Unknown 5	Unknown 5
B	No RT 23	No RT 22		Unknown 6	Unknown 8	Unknown 6	Unknown 2	Unknown 2	Unknown 2	Unknown 8	Unknown 8	Unknown 8
C	No RT 24	No RT 26		Unknown 9	Unknown 9	Unknown 9	Unknown 18	Unknown 10	Unknown 10	Unknown 11	Unknown 11	Unknown 11
D	WTC 25	WTC 25		Unknown 12	Unknown 12	Unknown 12	Unknown 13	Unknown 13	Unknown 13	Unknown 14	Unknown 14	Unknown 14
E	WTC 26	WTC 26		Unknown 15	Unknown 15	Unknown 15	Unknown 18	Unknown 16	Unknown 16	Unknown 17	Unknown 17	Unknown 17
F	WTC 27	WTC 27		Unknown 18	Unknown 18	Unknown 18	Unknown 18	Unknown 18	Unknown 19	Unknown 20	Unknown 20	Unknown 20
G										Unknown 28	Unknown 28	Unknown 28
H										Unknown 21	Unknown 21	Unknown 21

Targets:  SYBR

Instrument Name: New\_Instrument  
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: PCR Tesis Riyan Hasil  
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt  
Run Date: 28 Jun 2025 15:15:12

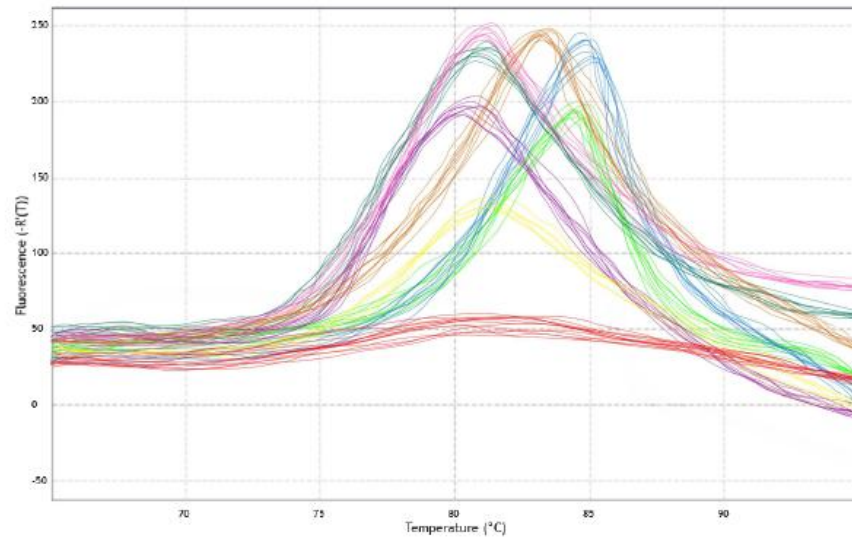
### Amplification Plots



Instrument Name: New\_Instrument  
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: PCR Tesis Riyan Hasil  
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt  
Run Date: 28 Jun 2025 15:15:12

### Melt Raw Derivative Curve

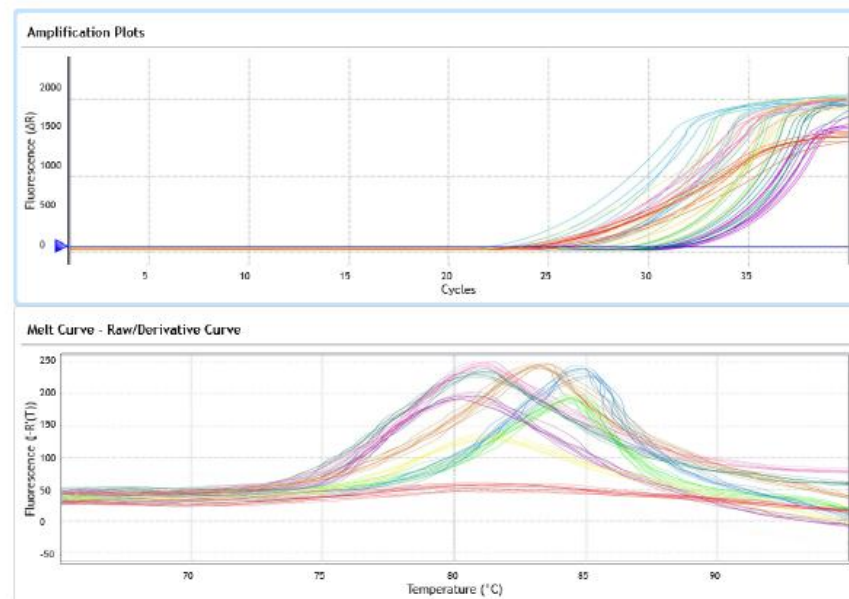


Page 7 of 12

Instrument Name: New\_Instrument  
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: PCR Tesis Riyan Hasil  
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt  
Run Date: 28 Jun 2025 15:15:12

### Graphical Displays



Page 8 of 12

Instrument Name: New\_Instrument  
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: PCR Tesis Riyan Hasil  
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt  
Run Date: 28 Jun 2025 15:15:12

Tabular Results (1 of 3)

Well	Well Type	Well Name	Dye	Cq (ΔR)	Tm Product 1 (-R(T))
A1	No RT	NRT GAPDH	SYBR	No Cq	No Tm
A2	No RT	NRT GAPDH	SYBR	No Cq	No Tm
A4	Unknown	S1 GAPDH	SYBR	24,57	No Tm
A5	Unknown	S1 GAPDH	SYBR	25,21	No Tm
A6	Unknown	S1 GAPDH	SYBR	26,89	No Tm
A7	Unknown	S2 GAPDH	SYBR	26,82	No Tm
A8	Unknown	S2 GAPDH	SYBR	25,75	No Tm
A9	Unknown	S2 GAPDH	SYBR	23,33	No Tm
A10	Unknown	S3 GAPDH	SYBR	22,98	No Tm
A11	Unknown	S3 GAPDH	SYBR	24,68	No Tm
A12	Unknown	S3 GAPDH	SYBR	25,97	No Tm
B1	No RT	NRT Cx43	SYBR	No Cq	No Tm
B2	No RT	NRT Cx43	SYBR	No Cq	No Tm
B4	Unknown	S1 Cx43	SYBR	25,89	No Tm
B5	Unknown	S1 Cx43	SYBR	24,34	No Tm
B6	Unknown	S1 Cx43	SYBR	25,87	No Tm
B7	Unknown	S2 Cx43	SYBR	24,58	No Tm
B8	Unknown	S2 Cx43	SYBR	25,43	No Tm
B9	Unknown	S2 Cx43	SYBR	24,87	No Tm
B10	Unknown	S3 Cx43	SYBR	24,07	No Tm
B11	Unknown	S3 Cx43	SYBR	24,22	No Tm
B12	Unknown	S3 Cx43	SYBR	24,66	No Tm
C1	No RT	NRT Casp3	SYBR	No Cq	No Tm
C2	No RT	NRT Casp3	SYBR	No Cq	No Tm

Instrument Name: New\_Instrument  
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: PCR Tesis Riyan Hasil  
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt  
Run Date: 28 Jun 2025 15:15:12

Tabular Results (2 of 3)

Well	Well Type	Well Name	Dye	Cq (ΔR)	Tm Product 1 (-R(T))
C4	Unknown	S1 Casp3	SYBR	24,56	No Tm
C5	Unknown	S1 Casp3	SYBR	24,65	No Tm
C6	Unknown	S1 Casp3	SYBR	26,44	No Tm
C7	Unknown	S2 Casp3	SYBR	24,01	No Tm
C8	Unknown	S2 Casp3	SYBR	25,09	No Tm
C9	Unknown	S2 Casp3	SYBR	24,99	No Tm
C10	Unknown	S3 Casp3	SYBR	23,45	No Tm
C11	Unknown	S3 Casp3	SYBR	23,54	No Tm
C12	Unknown	S3 Casp3	SYBR	24,53	No Tm
D1	NTC	NTC GAPDH	SYBR	No Cq	No Tm
D2	NTC	NTC GAPDH	SYBR	No Cq	No Tm
D4	Unknown	C1 GAPDH	SYBR	29,12	No Tm
D5	Unknown	C1 GAPDH	SYBR	28,87	No Tm
D6	Unknown	C1 GAPDH	SYBR	26,23	No Tm
D7	Unknown	C2 GAPDH	SYBR	26,27	No Tm
D8	Unknown	C2 GAPDH	SYBR	28,97	No Tm
D9	Unknown	C2 GAPDH	SYBR	28,49	No Tm
D10	Unknown	C3 GAPDH	SYBR	28,68	No Tm
D11	Unknown	C3 GAPDH	SYBR	29,37	No Tm
D12	Unknown	C3 GAPDH	SYBR	27,54	No Tm
E1	NTC	NTC Cx43	SYBR	No Cq	No Tm
E2	NTC	NTC Cx43	SYBR	No Cq	No Tm
E4	Unknown	C1 Cx43	SYBR	30,59	No Tm
E5	Unknown	C1 Cx43	SYBR	31,41	No Tm

Instrument Name: New\_Instrument  
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: PCR Tesis Riyan Hasil  
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt  
Run Date: 28 Jun 2025 15:15:12

Tabular Results (3 of 3)

Well	Well Type	Well Name	Dye	Cq (ΔR)	Tm Product 1 (-R(T))
E6	Unknown	C1 Cx43	SYBR	31,78	No Tm
E7	Unknown	C2 Cx43	SYBR	30,81	No Tm
E8	Unknown	C2 Cx43	SYBR	31,19	No Tm
E9	Unknown	C2 Cx43	SYBR	31,92	No Tm
E10	Unknown	C3 Cx43	SYBR	32,03	No Tm
E11	Unknown	C3 Cx43	SYBR	31,88	No Tm
E12	Unknown	C3 Cx43	SYBR	31,67	No Tm
F1	NTC	NTC Casp3	SYBR	No Cq	No Tm
F2	NTC	NTC Casp3	SYBR	No Cq	No Tm
F4	Unknown	C1 Casp3	SYBR	30,95	No Tm
F5	Unknown	C1 Casp3	SYBR	32,06	No Tm
F6	Unknown	C1 Casp3	SYBR	30,34	No Tm
F7	Unknown	C2 Casp3	SYBR	30,45	No Tm
F8	Unknown	C2 Casp3	SYBR	32,72	No Tm
F9	Unknown	C2 Casp3	SYBR	31,15	No Tm
F10	Unknown	C3 Casp3	SYBR	30,76	No Tm
F11	Unknown	C3 Casp3	SYBR	31,64	No Tm
F12	Unknown	C3 Casp3	SYBR	30,49	No Tm
G10	Unknown	C(+)-Casp3	SYBR	26,06	No Tm
G11	Unknown	C(+)-Casp3	SYBR	25,44	No Tm
G12	Unknown	C(+)-Casp3	SYBR	24,89	No Tm
H10	Unknown	C(+)-Cx43	SYBR	23,47	No Tm
H11	Unknown	C(+)-Cx43	SYBR	27,45	No Tm
H12	Unknown	C(+)-Cx43	SYBR	27,67	No Tm

## Lampiran 10

### Uji Statistik JC-1

#### Tests of Normality

Sampel	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Sel Kontrol	.219	3	.	.987	3	.780
NS1 1ng	.179	3	.	.999	3	.948
NS1 5ng	.253	3	.	.964	3	.637

a. Lilliefors Significance Correction

#### Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah Sel	Based on Mean	2.074	2	6	.207
	Based on Median	1.854	2	6	.236
	Based on Median and with adjusted df	1.854	2	2.701	.311
	Based on trimmed mean	2.063	2	6	.208

#### ANOVA

Jumlah Sel

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.084	2	.042	10.024	.012
Within Groups	.025	6	.004		
Total	.109	8			

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Sel  
Bonferroni

(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	NS1 1ng	.21000*	.05292	.022	.0360	.3840
	NS1 5ng	.20000*	.05292	.028	.0260	.3740
NS1 1ng	Kontrol	-.21000*	.05292	.022	-.3840	-.0360
	NS1 5ng	-.01000	.05292	1.000	-.1840	.1640
NS1 5ng	Kontrol	-.20000*	.05292	.028	-.3740	-.0260
	NS1 1ng	.01000	.05292	1.000	-.1640	.1840

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Lampiran 11

### Uji Statistik level mRNA Cx43

Tests of Normality							
Perlakuan		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ct_Value	1,00	.358	3	.	.812	3	.144
	2,00	.233	3	.	.979	3	.721

a. Lilliefors Significance Correction

Group Statistics					
Perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ct_Value	Control	3	31.4767	.33292	.19221
	Treatment	3	24.8733	.51549	.29762

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Ct_Value	Equal variances assumed	.517	.512	18.638	4	.000	6.60333	.35429	5.61966	7.58700
	Equal variances not assumed			18.638	3.421	.000	6.60333	.35429	5.55041	7.65625

Independent Samples Effect Sizes					
		Standardizer <sup>a</sup>	Point Estimate	95% Confidence Interval	
				Lower	Upper
Ct_Value	Cohen's d	.43392	15.218	5.139	25.506
	Hedges' correction	.54383	12.142	4.100	20.351
	Glass's delta	.51549	12.810	1.876	24.689

a. The denominator used in estimating the effect sizes.

Cohen's d uses the pooled standard deviation.

Hedges' correction uses the pooled standard deviation, plus a correction factor.

Glass's delta uses the sample standard deviation of the control group.

## Lampiran 12

### Uji Statistik level mRNA gen Casp3

#### Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ct Value Control	.253	3	.	.964	3	.637
Treatment	.231	3	.	.980	3	.730

a. Lilliefors Significance Correction

#### Group Statistics

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ct Value Control	3	31.1733	.24440	.14111
Treatment	3	24.5867	.69695	.40238

#### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Ct Value	Equal variances assumed	2.431	.194	15.447	4	.000	6.58667	.42641	5.40277	7.77056
	Equal variances not assumed			15.447	2.485	.002	6.58667	.42641	5.05562	8.11771

#### Independent Samples Effect Sizes

		Standardizer <sup>a</sup>	Point Estimate	95% Confidence Interval	
				Lower	Upper
Ct Value	Cohen's d	.52224	12.612	4.200	21.179
	Hedges' correction	.65453	10.063	3.351	16.899
	Glass's delta	.69695	9.451	1.279	18.268

a. The denominator used in estimating the effect sizes.

Cohen's d uses the pooled standard deviation.

Hedges' correction uses the pooled standard deviation, plus a correction factor.

Glass's delta uses the sample standard deviation of the control group.

## Lampiran 13

### Uji Statistik level mRNA gen GAPDH

Tests of Normality							
Sampel	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Ct_Value	Control	.289	3	.	.928	3	.480
	Treatment	.290	3	.	.926	3	.473

a. Lilliefors Significance Correction

Group Statistics				
Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ct_Value	Control	3	28.1700	.32187
	Treatment	3	25.1333	.53003

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Ct_Value	Equal variances assumed	1.144	.345	8.482	4	.001	3.03667	.35802	2.04265	4.03069
	Equal variances not assumed			8.482	3.298	.002	3.03667	.35802	1.95346	4.11988

Independent Samples Effect Sizes					
		Standardizer <sup>a</sup>	Point Estimate	95% Confidence Interval	
				Lower	Upper
Ct_Value	Cohen's d	.43848	6.925	2.075	11.790
	Hedges' correction	.54956	5.526	1.656	9.407
	Glass's delta	.53003	5.729	.540	11.195

a. The denominator used in estimating the effect sizes.

Cohen's d uses the pooled standard deviation.

Hedges' correction uses the pooled standard deviation, plus a correction factor.

Glass's delta uses the sample standard deviation of the control group.