

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Definisi Demam Berdarah Dengue

Demam berdarah dengue adalah infeksi virus sistemik yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes* kepada manusia dan dapat mengancam jiwa. Virus dengue (DENV) merupakan kelompok dari empat flavivirus yang berbeda secara serologis (Lee *et al.*, 2022). Virus dengue (DENV 1-4) disebarkan terutama oleh *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* yang jangkauan geografisnya terus meluas. Penyakit ini berpotensi dapat menginfeksi semua individu dan berakibat fatal (Angela *et al.*, 2014). Penyakit dengue dapat menyebabkan infeksi tanpa gejala atau penyakit demam yang tidak dapat dibedakan (Chuang *et al.*, 2013). Setiap serotipe berbeda secara antigen yang artinya mereka menghasilkan antibodi heterolog. Infeksi pada satu serotipe akan menghasilkan antibodi penetral terhadap serotipe tersebut. Perlindungan silang dari serotipe lain tidak bersifat jangka panjang atau sebaliknya infeksi heterotipik dapat menyebabkan penyakit yang parah (Uno & Ross, 2018).

2. *Ganoderma lucidum*

a. Definisi

Ganoderma lucidum (*Lingzhi*) merupakan jamur kayu yang termasuk ke dalam *basidiomycete* yang tersebar di daerah tropis dan subtropis dimanfaatkan sebagai obat-obatan di Cina, Jepang, Korea dan negara-negara Asia lainnya (Wu *et al.*, 2024).



Sumber : (Surahmaida, 2018)

Gambar 2.1 *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum memiliki nama lokal yang berbeda diberbagai negara misalnya di Jepang disebut *Reishi* yang berarti potensi spiritual, di Tiongkok disebut *Lingzhi* yang berarti jamur dewa, dan di Korea disebut *Youngzhi* yang berarti jamur keabadian (Ekiz *et al.*, 2023).

b. Klasifikasi

Kingdom	: Fungi.
Filum	: Basidiomycota.
Kelas	: Basidiomycetes.
Ordo	: Polyporales.
Famili	: Ganodermataceae.
Genus	: Ganoderma.
Spesies	: <i>Ganoderma lucidum</i> (Sheikha, 2022).

c. Morfologi

Ganoderma lucidum biasanya berwarna merah tua, coklat kemerahan atau hitam kemerahan. Warna kuning lebih tampak di bagian tepinya. Daging jamur biasanya berwarna coklat kekuningan sampai coklat tua. *Lucidum* berasal dari bahasa latin yang berarti cerah yang mana dikaitkan dengan penampilan jamur yang berkilau. Struktur *Ganoderma lucidum* memiliki bentuk seperti kipas, berbentuk ginjal atau setengah lingkaran (Ekiz *et al.*, 2023).

d. Kandungan *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum mengandung kelompok senyawa kimia triterpenoid, polisakarida, protein, asam amino, nukleosida, alkaloid, steroid, lakton, lektin, asam lemak, dan enzim dengan aktivitas farmakologis yang kuat telah diisolasi dari miselia dan tubuh buah. Triterpenoid yang memiliki sifat terapeutik yang cukup besar dan sangat signifikan yang bersifat antibakteri, antijamur, antivirus, penambah kekebalan tubuh, antikanker, antitumor, antioksidan, antiradang, dan antihipertensi menjadikan jamur ini sebagai pangan fungsional yang terkenal (Oke *et al.*, 2022).

Triterpen merupakan jenis senyawa organik yang berasal dari unit isoprena dan kelompok senyawa alami yang lebih besar disebut terpan. *Ganoderma lucidum* mengandung berbagai triterpenoid termasuk lanostan C30, C24, C25 C27, pentasiklik C30. Triterpen bermanfaat sebagai antitumor,

antiinflamasi, antioksidan, antihepatitis, antimalaria, hipoglikemik, antimikroba dan anti-HIV (Kou *et al.*, 2022). Lebih dari dua ratus triterpenoid ditemukan dalam tubuh buah, spora, dan miselia *Ganoderma lucidum*. Triterpenoid terkandung dalam tubuh buah kering *Ganoderma* (Xia *et al.*, 2014).

Senyawa triterpenoid yang diperoleh dari *Ganoderma lucidum* telah diteliti sebagai zat antivirus terhadap beberapa virus patogen termasuk HIV dan virus dengue (DENV). Penelitian *in vitro* terhadap *ganodermanontriol* (salah satu triterpenoid kuat) menunjukkan bahwa *ganodermanontriol* dapat menghambat protein DENV NS3, sehingga *ganodermanontriol* dapat berfungsi sebagai terapi terhadap penyakit DENV (Bharadwaj *et al.*, 2019).

Komponen bioaktif lainnya *Ganoderma lucidum* memiliki sifat antimutagenik, antitumor, meningkatkan kekebalan tubuh dan antioksidan. Protein LZP-1, LZP-2, DAN LZP-3 yang diekstraksi dari buah dan spora *Ganoderma lucidum* bersifat mitogenik. Protein Zhi-8 yang diisolasi dari misel menunjukkan kemampuan untuk memperkuat sistem kekebalan tubuh. Peptida bioaktif seperti lektin, ribonuklease, dan lakase. Serta sumber enzim seperti lisozim, superoksida dismutase, dan enzim protein yang sangat penting untuk pertahanan tubuh terhadap penyakit dan proses metabolisme juga ditemukan dalam jamur ini. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa *Ganoderma lucidum* memiliki sifat antihepatotoksik dan terdapat sumber beta-keroten, vitamin C, dan vitamin E (Ekiz *et al.*, 2023).

3. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan metode memisahkan sejumlah besar komponen kimia dalam sampel bahan alam dalam pelarut. Prinsip yaitu didasarkan pada distribusi pelarut dalam pelarut (Riasari *et al.*, 2022). Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik atau memisahkan senyawa dari campuran atau simplisianya. Berbagai metode ekstraksi yang telah diketahui. Setiap metode memiliki keuntungan dan kelemahan. Sifat senyawa, pelarut yang digunakan, dan alat yang tersedia dipertimbangkan saat memilih metode. Proses dalam melakukan ekstraksi, struktur bahan, suhu,

dan tekanan harus diperhatikan (Hujjatusnaini *et al.*, 2021). Pilihan metode ekstraksi bergantung pada jenis metabolit aktif yang akan diekstraksi atau diambil. Metanol, etanol, dan etil asetat adalah beberapa pelarut organik yang bersifat polar yang dapat digunakan untuk maserasi. Setiap pelarut memiliki kelebihan yang sangat berbeda. Hasil metabolit sekunder yang diperoleh juga sangat dipengaruhi oleh penggunaan pelarut ini. Selain itu, para peneliti sering menggabungkan berbagai pelarut. Misalkan campuran etanol dan air (Sudarwati & Fernanda, 2019). Proses penguapan dan pengeringan adalah teknik yang ada pada proses ekstraksi. Kedua teknik ini bertujuan agar memperoleh ekstrak yang stabil dan terjamin (Hujjatusnaini *et al.*, 2021).

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia menurut cara yang cocok di luar pengaruh cahaya matahari langsung. Ada beberapa jenis ekstrak yaitu ekstrak cair, ekstrak kental, dan ekstrak kering (BPOM, 2023). Ekstrak merupakan sediaan kental yang didapat dengan mengekstraksi suatu senyawa aktif yang berasal dari simplisia tanaman menggunakan pelarut yang sesuai (Hujjatusnaini *et al.*, 2021).

Metode ekstraksi ada tiga yaitu metode ekstraksi tradisional telah digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk mengekstrak minyak dari bahan alam. Metode ekstraksi tradisional dibagi menjadi dua metode panas dan dingin. Metode ekstraksi panas meliputi sokletasi, refluks, digesti, dekokta, dan infusa. Sedangkan metode ekstraksi dingin meliputi maserasi dan perkolasi. Metode ekstraksi modern menggunakan teknologi canggih dan peralatan laboratorium untuk meningkatkan efisiensi dan kualitas ekstraksi. Metode ekstraksi modern dibagi menjadi ekstraksi arus berlawanan, ekstraksi ultrasonik, dan ekstraksi cair superkritis. Metode ekstraksi minyak atsiri adalah minyak yang diekstrak dari bagian tanaman yang mengandung senyawa aroma dan memiliki kegunaan aromaterapi atau industri kosmetik. Metode ekstraksi minyak atsiri meliputi destilasi, pengepresan, ekstraksi dengan pelarut organik, enfleurasi (ekstraksi dengan lemak dingin) dan ekstraksi dengan maserasi (lemak panas) (BPOM, 2023).

Metode ekstraksi yang biasa dipakai ketika melakukan penelitian adalah maserasi, perkolasi, dan refluks. Maserasi merupakan cara yang paling sederhana dan banyak digunakan. Simplisia atau bubuk kasar dan pelarut yang sesuai dimasukkan dalam wadah inert yang ditutup rapat pada suhu kamar (Mukhtarini, 2014). Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif (Sudarwati & Fernanda, 2019). Perkolasi merupakan prosedur perkolasi senyawa bioaktif alami dalam persiapan ekstrak cairan menggunakan alat perkulator. Metode ini bertujuan agar zat tertarik semua baik yang tahan terhadap panas ataupun tidak (Willian & Pardi, 2022). Refluks merupakan cara yang simpel dengan rendemen yang cukup tinggi dan metode yang murah. Refluks berarti pelarut yang diputar kembali secara kontinyu melalui pengkondensasian berulang pada sebuah alat kondensor. Pelarut yang berbentuk uap mengembun di kondensor sebelum kembali ke wadah dan tetap dalam reaksi. Metode ini digunakan untuk menghasilkan senyawa anorganik (Nugroho, 2017).

4. Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Tikus putih (*Rattus novergicus*) atau dikenal juga dengan nama *Norway Rat* adalah hewan percobaan yang umum digunakan dalam penelitian ilmiah. Sebagian besar sifat hewan ini diketahui, mudah dipelihara, dan cukup cocok untuk berbagai studi. Sistem reproduksi, sistem saraf, penyakit (seperti diabetes dan kanker), dan kecemasannya mirip dengan manusia. Ini disebabkan oleh kesamaan DNA dan ekspresi gen dengan 98% gen manusia serupa dengan gen tikus (Rejeki *et al.*, 2018). Berikut diuraikan klasifikasi sistem orde tikus.

Kingdom : Animalia.
Filum : Chordate.
Kelas : Mamalia.
Ordo : Rodentia.
Famili : Murinane.
Genus : *Rattus*.
Spesies : *Rattus novergicus* (Aisyah *et al.*, 2023).

Tikus putih (*Rattus novergicus*) merupakan hewan yang dijadikan sampel penelitian karena murah dan mudah dipelihara biasanya yang dewasa berumur antara 40 sampai 60 hari. Tikus

putih jantan yang dewasa memiliki berat badan 300-400 g sedangkan betina berkisar 250-300 g. Tikus putih yang biasa digunakan dalam penelitian ada galur Wistar (tikus albino), Sprague-Dawley (tikus albino pertumbuhan lebih cepat dari Wistar), Long-Evans (tikus berkerudung lebih kecil dari Wistar atau Sprague-Dawley) (Wahyurianto, 2022). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) mempunyai batas lama hidup hanya mencapai umur 3,5 tahun dengan kecepatan tumbuh 5 g per hari, lebih cepat dewasa, dan lebih cepat berkembang biak. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) mempunyai kepekaan terhadap pendengaran, sentuhan, dan penciuman tetapi mempunyai penglihatannya tidak terlalu baik. Kelenjar hardarian merupakan kelenjar yang mensekresi lipid dan pigmen porfirin. Sekresi meningkat dengan adanya stres dan penyakit (Rejeki *et al.*, 2018).

5. Metode Imunohistokimia (IHC)

Imunohistokimia adalah proses yang menggunakan antibodi untuk mengidentifikasi protein tertentu pada jaringan atau sel. Marker yang biasanya dilekatkan pada antibodi menunjukkan lokasi di mana antibodi terikat dengan protein tertentu. Ada dua metode dasar identifikasi antigen dengan imunohistokimia yaitu metode langsung (*direct method*) merupakan metode pengecatan satu langkah yang hanya menggunakan satu antibodi berlabel dan tidak langsung (*indirect method*) merupakan metode yang menggunakan dua macam antibodi (antibodi primer dan antibodi sekunder) (Guerin, 2023).

Imunohistokimia merupakan metode untuk mendeteksi apakah antigen tertentu ada dalam sel tertentu tetapi juga memungkinkan identifikasi lokasi mikro anatomi (seluler) dari antigen tersebut. Kualitas pewarnaan imunohistokimia bergantung pada integritas interaksi antibodi-antigen dan sejauh mana antigen yang sesuai telah dipertahankan selama fiksasi dan pemrosesan jaringan. Pada kontrol positif hanya sel yang diharapkan dapat mengekspresikan antigen yang menunjukkan hasil positif. Sedangkan semua sel dan elemen struktural lainnya harus negatif (Hawes *et al.*, 2020). Prinsip imunohistokimia didasarkan adanya antibodi primer yang berikatan dengan antigen spesifik membentuk kompleks antibodi-antigen karena adanya substrat dan kromogen lalu enzim mengkatalisis terbentuknya

warna di tempat pengikatan antibodi-antigen (Sinobiological, 2023).

Pewarnaan imunohistokimia yang dikembangkan oleh Umniyati, 2009 terdapat beberapa komponen yang ada dalam pewarnaan imunohistokimia yang pertama larutan *peroxidase blocking solution* dicuci dengan PBS berfungsi untuk menghilangkan aktivitas peroksidase endogen. Inkubasi preparat dengan *background sniper solution* (protein *blocker*) berfungsi untuk memblokir protein yang tidak spesifik yang ada pada sel atau jaringan dimana yang berpotensi mengganggu ikatan antigen dan antibodi. Rendaman *peroxidase blocking solution* untuk menghindari ikatan non spesifik yang mengganggu hasil reaksi dan antigen target diikat dengan antibodi primer DSSE 10. Pemberian antibodi sekunder yang dilabel biotin berfungsi sebagai penghubung antara antibodi primer dengan konjugat *streptavidin peroxidase* bertujuan untuk mengikat residu biotin. Pemberian enzim peroksidase dan larutan substrat kromogen bertujuan untuk memberikan efek berwarna. Enzim peroksidase akan mengkatalisa substrat, hidrogen peroksidase (H_2O_2) dan mengubah kromogen menjadi deposit warna coklat yang menunjukkan adanya antigen. Penambahan hematoksilin bertujuan sebagai hasil negatif dimana tidak adanya antigen sehingga tidak terjadi reaksi dan akan mengikat warna biru. Antibodi primer monoklonal DSSE 10 adalah antibodi hasil dari sel hibridoma fusi antara splenosit mencit imun terhadap antigen DEN-3 strain H-87 dengan sel *myloma* NS-1 dalam medium HAT (*hypoxanthine, aminopterin dan thymidine*). DSSE 10 termasuk dalam kelas IgG1. *Streptavidin peroxidase complex* (SBPC) (*TrekAvidinHRP reagent*) sebagai antibodi sekunder yang dilabel biotin yang mengenal antibodi primer dan menggunakan konjugat *streptavidin* berlabel enzim *horseradish peroxidase* serta campuran substrat kromogen untuk mendeteksi antigen pada sel atau jaringan dengan sensitifitas yang sangat tinggi karena bisa mendeteksi antigen dengan kadar yang rendah (Wahono & Umniyati, 2018).

Biotin adalah vitamin yang berperan sebagai koenzim atau dapat berikatan kovalen dengan antibodi primer untuk menghasilkan konjugat biotinylated yang bila ditambahkan pada

suatu jaringan akan muncul pada lokasi antigen di jaringan. Kromogen sebagai bahan atau kit yang mengandung reagen yang cocok untuk segala tipe prosedur pewarnaan. Kromogen *diaminobenzidine* (DAB) berfungsi untuk menghasilkan hasil reaksi dengan warna coklat yang dapat dilihat dengan mikroskop cahaya. H_2O_2 berfungsi untuk meminimalkan munculnya warna *background* yang dapat mengganggu pengamatan. Alkohol absolut dan *xylol* berfungsi untuk menghilangkan parafin yang pada jaringan. Inkubasi diawal dengan suatu antibodi primer spesifik untuk mencari antigen dan diinkubasi lagi dengan antibodi sekunder yang spesifik dari antibodi primer bertujuan untuk mengikat antigen target (Rahayu & Auerkari, 2015). *Diaminobenzidine* (DAB) merupakan pewarna yang paling banyak digunakan untuk meningkatkan kontras pada produk *brown reaction*. Enzim peroksidase yang terikat pada antigen target akan bertindak sebagai katalis untuk reaksi kimia pada DAB untuk mengubahnya menjadi produk oksidase berwarna coklat. DAB yang memberikan warna coklat membentuk lapisan pelindung yang akan menutupi lapisan kompleks imun pertama secara efektif untukantisipasi reaksi silang (Pertiwi, 2015).

Metode imunohistokimia melihat perubahan warna sel leukosit sebab antigen virus dengue yang terlokalisir dalam sel pada sediaan darah akan berikatan dengan antibodi monoklonal DSSE 10 dan dikenali antibodi sekunder (biotin) serta konjugat streptavidin dan larutan substrat kromogen yang ditambahkan dapat mendeteksi sitoplasma berwarna coklat di sekitaran sel yang terinfeksi. Hasil negatif ditandai dengan sitoplasma berwarna biru karena penambahan Hematoksilin sebagai *counterstain* (Mosesa *et al.*, 2016).

Pengikatan antigen-antibodi ditunjukkan dengan reaksi histokimia berwarna yang terlihat dengan mikroskop cahaya atau *fluoresen* (Vara & Miller, 2013). Hasil imunositokimia pada apusan darah tebal menunjukkan leukosit positif yang mengandung antigen DEN-3 terlihat sitoplasma berwarna coklat karena menyerap warna DAB-*chromogen* dan inti tetap berwarna biru. Sedangkan leukosit negatif sitoplasmanya berwarna biru karena menyerap warna Hematoksilin (Sulistiyawati & Umniyati, 2016).

Imunohistokimia adalah metode tambahan yang penting bagi ahli patologi dalam pekerjaan diagnostik rutin serta dalam penelitian dasar dan klinis termasuk eksplorasi biomarker karena imunohistokimia memungkinkan konfirmasi ekspresi molekul target dalam konteks lingkungan mikro. Imunohistokimia merupakan metode yang penting untuk validasi dalam penemuan biomarker yang menghasilkan obat yang sesuai dan metode imunohistokimia bukan metode baru tetapi telah menjadi teknik yang luas digunakan dalam penelitian serta diagnosa selama beberapa dekade (Kim *et al.*, 2016).

6. Struktur Virus Dengue

Virus dengue adalah virus RNA untai tunggal dari genus *Flavivirus* berdiameter 50 nm, berbentuk bola dan ikosahedral, Famili *Flaviviridae*. Virus dengue memiliki empat serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4 (Suwandono, 2019). Virus dengue memiliki genom RNA *pistive sense* berukuran 11 kb yang mengkode tiga protein struktural yaitu protein kapsid (C), premembran atau membran (prM/M), dan protein *envelope* (E) membentuk komponen virion dan tujuh protein non struktural (NS1, NS2A/B/ NS3, NS4A/B, NS5) berperan pada replikasi virus (Rachmayanti, 2015). Protein kapsid (C) adalah protein yang responsif terhadap penempelan nukleokapsid yang berinteraksi dengan RNA. Protein membran (M) adalah protein yang berkaitan dengan membran glikoprotein yang merupakan bagian dari nukleokapsid dan membantu protein *envelope* untuk mencapai bentuk matur virion virus dan berfungsi untuk membedakan respon antibodi terhadap antivirus. Protein *envelope* (E) adalah protein yang berada pada permukaan virus dan berfungsi menentukan penempelan virus pada sel host sepanjang reseptor sel. Protein *envelope* (E) mempunyai 3 domain yaitu domain struktural (I), domain dimmers (II), dan domain ikatan (III) (Nugraheni *et al.*, 2016).

Genom RNA virus dan protein kapsid membentuk nukleokapsid yang berkembang di retikulum endoplasma (ER). Nukleokapsid ini berhubungan dengan prM dan E serta membawa lipid dari inang untuk membentuk virion yang belum matang. Virion dengue yang belum matang memiliki permukaan kasar masing-masing terdiri dari trimer E yang terkait dengan protein

prM. Partikel virus yang belum matang dipindahkan dari vesikel ke aparatus golgi selama proses pematangan. Virion mengalami glikosilasi dalam lingkungan asam jaringan trans-Golgi (TGN), pembelahan prM dimediasi oleh furin di M. Struktur dimer yang belum matang E mempertahankan interaksi dengan pr dan M setelah berkembang dari sel melalui proses eksositosis pH netral lingkungan ekstraseluler memisahkan E dan prM, membentuk virion matang yang dapat menginfeksi sel baru. Genom RNA virus dengue juga mengkode tujuh protein nonstruktural yang penting untuk replikasi virus: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5 (Wang *et al.*, 2021).

Genom virus mengkode satu poliprotein yang dapat diolah menjadi protein struktural dan nonstruktural (NS). Empat dari tujuh protein nonstruktural, NS2A, NS2B, NS4A dan NS4B merupakan protein membran. NS3 atau NS5 adalah protein yang tidak mengandung aktivitas enzimatik apa pun namun berperan penting dalam replikasi virus melalui interaksi dengan protein virus atau inang untuk mengatur jalur penting dan aktivitas enzimatik. Lokasi protein-protein pada membran sel dan peran fungsionalnya dalam replikasi virus menjadikannya target penting untuk pengembangan antivirus (Li & Kang, 2022).

Protein E adalah antigen utama yang melawan sistem kekebalan inang yang dapat menghasilkan antibodi penetralisir. Protein E memainkan peran penting selama internalisasi virus yang dimediasi endosom dengan mendorong perlekatan pada sel inang dan fusi ke membran sel. NS1 adalah satu-satunya protein yang disekresi secara terus menerus oleh sel inang yang terinfeksi. Selama fase kritis telah diamati bahwa serum pasien DBD/DSS mengandung banyak NS1 yang disekresikan. NS1 berperan dalam kebocoran vaskular dengan cara bergantung pada TLR4 dan independen. Sel T CD8+ spesifik DENV lebih tinggi pada pasien demam berdarah daripada sel T CD4+ spesifik DENV. Aktivitas sel T CD8+ terutama menargetkan NS3 dan NS5 daripada NS1. Dominasi epitop CTL pada protein NS3 menunjukkan bahwa itu berfungsi untuk melindungi virus dari replikasi. Secara keseluruhan NS1 dan NS3 dianggap sebagai target untuk terapi demam berdarah dan calon vaksin kecuali E (Wang *et al.*, 2021).

7. Infeksi Virus Dengue

DENV akan menargetkan sel dendritik dan makrofag pada hari pertama infeksi. DENV memasuki sel target melalui endositosis yang dimediasi chathrin dan pH rendah dalam kompartemen endosom yang memungkinkan fusi antara DENV dan membran endosom. Bantuan dari lingkungan endosom yang asam, genom RNA dilepaskan dari nukleokapsid yang tidak dilapisi ke dalam sitoplasma untuk menjalani pemrosesan dan replikasi protein (Kato & Hishiki, 2016). Genom RNA bertindak sebagai mRNA dan mengalami translasi untuk menghasilkan protein virus. Replikasi genom RNA terjadi pada membran intraseluler yang diinduksi virus yang dikenal sebagai kompleks replikasi yang terdiri dari RNA virus, protein virus, dan faktor sel inang. Kompleks yang terbentuk pada membran retikulum endoplasma (ER) membantu melindungi produk replikasi dari pengenalan sistem imun bawaan inang (Pierson & Diamond, 2020).

Proses setelah pembentukan nukleokapsid partikel DENV mulai berkumpul ketika bertunas ke dalam lumen ER sebagai partikel DENV yang belum matang. Sepanjang jalur sekresi dalam jaringan trans-Golgi (TGN), pematangan DENV memerlukan pembelahan protein pra-membran/membran (prM/M) menjadi protein M melalui aksi protease serin mirip furin untuk melepaskan DENV di dalamnya bentuk matang dan menular. prM akan menutup loop fusi hidrofobik dengan terus berikatan dengan dimer E setelah pembelahan bertujuan untuk menghindari membran DENV prematur menyatu dengan sel inang sebelum partikel virus terlepas dari sel yang terinfeksi. prM akan terlepas dari permukaan partikel virus setelah DENV yang matang dilepaskan ke ruang ekstraseluler (Kok *et al.*, 2023).

Virus kompleks antigen-antibodi akan menyebabkan aktivasi sistem komplemen pelepasan C3a dan C5a. Aktivasi C3 dan C5 meningkatkan permeabilitas dinding pembuluh darah dan memungkinkan plasing masuk dari ruang intravaskular ke ruang ekstraseluler. Replikasi virus juga dapat menyebabkan hipotensi dan kehilangan natrium yang dapat menyebabkan syok hipovolemik. Perdarahan yang disebabkan oleh rapuh pembuluh darah karena trombositopenia atau disfungsi platelet, infeksi virus

di sel endotelial, dan konsentrasi sitokin yang tinggi yang mengganggu integritas vaskular (Masykur, 2022).

8. Mekanisme Respon Imun Terhadap Infeksi Virus Dengue

Virus dengue masuk dalam tubuh melalui gigitan nyamuk. Inisiasi respon imun adaptif spesifik virus dengue dimulai setelah infeksi ke dalam sel dendritik yang belum matang (sel langerhans) pada kulit. Sel-sel ini mengalami pematangan dan bermigrasi ke kelenjar getah bening mengaktifkan sel TCD4+ dan TCD8+. Sel efektor dari imunitas bawaan dan adaptif melepaskan sitokin memperkuat respon inflamasi lokal. Selama infeksi virus ketika glikoprotein pada permukaan virus dikenali oleh senyawa imun mengarah pada pembentukan memori dengan memicu sistem imun adaptif. Respon humoral dan seluler terhadap glikoprotein yang sangat antigenik ini akan memberikan respon antivirus yang efektif. Target utama antibodi penetralisir adalah protein DENV E, preM/M dan NS1. Domain III *envelope* (E) virus adalah target utama antibodi penetralisir yang penting dalam perlindungan terhadap infeksi. Infeksi alami dengan serotipe apa pun menghasilkan kekebalan jangka panjang terhadap serotipe homolog (infeksi primer) namun menimbulkan kekebalan jangka pendek terhadap serotipe heterotipik (infeksi sekunder). Antibodi penetral bersifat protektif sedangkan antibodi subnetralisasi reaktif silang secara efektif berperan dalam keparahan penyakit. Imunokompleks virus-antibodi memfasilitasi masuknya virus ke dalam sel kekebalan yang mengandung reseptor Fcy (FcyR) menyebabkan viral load lebih tinggi dan akibatnya berakibat buruk melalui mekanisme yang disebut peningkatan bergantung antibodi (ADE) (Santos & Azeredo, 2022).

Respon imun yang diketahui berperan dalam patogenesis virus dengue antara lain :

- a. Pembentukan antibodi adalah bagian dari respons humoral dan bertanggung jawab atas netralisasi virus, sitolisis yang dimediasi komplemen, dan sitotoksitas yang dimediasi antibodi. Antibodi dengue mempercepat penyebaran virus pada monosit atau makrofag. Keadaan ini dikenal sebagai peningkatan bergantung pada antibodi (ADE).
- b. Limfosit T baik T-helper (CD4) dan T-sitotoksik (CD8) berperan sebagai respons imun seluler terhadap virus dengue.

Limfosit T-helper: TH 1 menghasilkan limfokin, interferon gamma, dan interleukin-2 (IL-2). Limfosit T-helper TH 2 menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10.

- c. Monosit dan makrofag memiliki peran fagositosis virus melalui opsonisasi antibodi tetapi fagositosis ini meningkatkan replikasi virus dan sekresi sitokin oleh makrofag.
- d. Aktivasi komplemen oleh kompleks imun (kekebalan) akan terbentuknya C3a dan C5a (Wowor, 2015).

Respon imun bawaan pejamu bertindak sebagai pertahanan lini pertama dalam mengendalikan replikasi virus selama infeksi dengue sebelum menghasilkan respon imun adaptif. Sel-sel sistem kekebalan bawaan mengenali patogen melalui PRR (*Pattern Recognition Receptors*). TLR digabungkan untuk mendeteksi komponen virus tertentu dan menginduksi produksi IFN dan sitokin proinflamasi lainnya. Tindakan efektor sel-sel ini terutama menghasilkan respons antivirus, namun respons yang tidak seimbang dapat menyebabkan patogenesis penyakit. DENV mampu menghindari respon imun bawaan inang, khususnya respon tipe I. Penghindaran respon imun bawaan inang replikasi virus yang lebih besar terjadi pada sel target dan akibatnya sel imun bawaan di rekrut dan menghasilkan mediator inflamasi dengan cara yang lebih buruk menyebabkan kerusakan dan disfungsi endotel dan banyak organ. Produksi mediator inflamasi yang berlebihan menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang dapat menyebabkan kebocoran cairan dan manifestasi demam berdarah yang parah (John & Rathore, 2019).

9. Mekanisme Antivirus Dengue

Antivirus terhadap DENV menargetkan faktor perlekatan inang atau reseptor sel, protein struktural dan nonstruktural DENV, replikasi virus, pematangan virus, dan perakitan virus. Antivirus yang dirancang untuk menargetkan faktor perlekatan inang atau reseptor sel mungkin mencegah pengikatan dan perlekatan protein virus DENV dengan sel inang serta menghambat masuknya DENV ke dalam sel inang. Antivirus yang menargetkan protein struktural DENV mungkin mengganggu pengikatan DENV ke sel inang serta mencegah

masuknya virus ke dalam sel inang (Lee *et al.*, 2023). Antivirus bekerja dengan cara mengganggu proses penempelan virus pada sel inang dengan cara merusak reseptor ataupun berperan sebagai analog (menyerupai) reseptor (Septiana, 2020). Antivirus yang menargetkan protein nonstruktural DENV dengan mengganggu replikasi virus karena protein ini merupakan komponen penting dari mesin replikasi DENV. Antivirus mengurangi produksi salinan RNA dan translasi virus dengan menekan ekspresi protein virus DENV selama pasca infeksi, serta antivirus mempengaruhi proses perakitan, pematangan, dan pelepasan virus (Lee *et al.*, 2023).

Protease virus terbukti memiliki fungsi sebagai target penghambatan replikasi yang baik. Protease virus memotong rantai polipeptida yang diterjemahkan menjadi protein fungsional yang lebih kecil dengan menghambat protease maka partikel virus yang belum matang tidak akan mampu berubah menjadi virion matang dan menghambat replikasi virus. Protein NS5, NS3, dan NS2B memainkan peran utama dalam aktivitas enzimatik untuk infeksi DENV sehingga dijadikan target antivirus. Fase infeksi DENV dimana translasi genom virus akan menghasilkan poliprotein yang mengandung tiga protein struktural dan tujuh protein nonstruktural. Poliprotein akan dipecah menjadi protein individu selama pematangan virus oleh protease inang (signalase dan furin) di sisi luminal retikulum endoplasma serta oleh protease serin virus (protease NS2B-NS3) di sisi sitoplasma untuk memastikan keberhasilan replikasi dan pematangan virus. DENV NS3 mengandung protease mirip trypsin dan memerlukan kofaktor NS2B agar aktif untuk membelah poliprotein DENV pada triad katalitik Ser-His-Asp (Chew *et al.*, 2017). Protein NS3 memiliki aktivitas RNA-triphosphatase (RTP), nucleoside triphosphatase (NTPase), dan heliks yang memberikan kemampuan pada NS3 dan NS5 untuk berkontribusi penting pada replikasi RNA. Ujung C-terminal protein NS3 memiliki tiga sifat enzimatik: 5' RNA-triphosphatase (RTP), nucleoside triphosphatase (NTPase), dan helicase. NS3 membentuk kompleks dengan NS5 dan membantu replikasi melalui pelepasan RNA virus dan defosforilasi sebelum pembatasan 5' ujung (Nanaware *et al.*, 2021). Protein NS2B terletak di hulu domain

pro-tease NS3 dan berfungsi sebagai kofaktor dalam mendorong perubahan konformasi NS3. Kompleks NS2B/NS3 bertanggung jawab atas pemrosesan proteolitik poliprotein DENV pada NS2A/NS2B, NS2B/NS3, persimpangan NS3/NS4A dan NS4B/NS5 (Lim *et al.*, 2021). NS3 merupakan target penting untuk menyaring kandidat obat dan evaluasi kemanjuran karena kemampuannya untuk membelah berbagai bagian prekursor poliprotein dan partisipasinya dalam replikasi virus (Silva *et al.*, 2019).

NS3 memainkan peran enzimatik dan nonenzimatik dalam perakitan protein flavivirus. NS3 dipisahkan menjadi dua domain fungsional: domain protease terminal N yang memerlukan kofaktor untuk berfungsi dengan baik dan domain terminal C yang mengandung aktivitas RNA triphosphatase dan helicase. Kofaktor protease NS2B adalah protein transmembran integral kecil dan penting untuk pelipatan dan fungsi protease NS3 yang tepat melalui fungsi enzimatiknya. NS3 berperan dalam perakitan virion karena mutasi yang kompeten dalam replikasi dan bagaimana tepatnya mutasi ini mempengaruhi perakitan virion belum sepenuhnya dijelaskan (Barnard *et al.*, 2021).

Mekanisme antivirus dari *Ganoderma lucidum* melibatkan pemblokiran enzim virus dengan mengganggu sintesis asam nukleat atau tidak langsung meningkatkan efek imunostimulan. *Ganoderma lucidum* memiliki senyawa triterpen seperti ganoderiol, ganodermanontriol, dan senyawa turunan asam ganoderma yang menunjukkan aktivitas melawan virus (Ziaja *et al.*, 2023). *Ganoderma lucidum* merangsang reaksi imun seluler dan humoral dengan meningkatkan produksi sel T, sitokin (interleukin-2, interleukin 1 γ , interferon- γ , dan tumor *necrosis factor*- γ), monosit, dan makrofag (Ekiz *et al.*, 2023).

Inhibitor protease memainkan peran penting dengan mengikat secara selektif pada protease virus dan menghentikan pembelahan proteolitik protein prekursor yang diperlukan untuk partikel virus menular (Ahmad *et al.*, 2024). Mekanisme spesifik antivirus masih belum jelas, sehingga memerlukan penelitian lebih lanjut (Ziaja *et al.*, 2023).

B. Landasan Teori

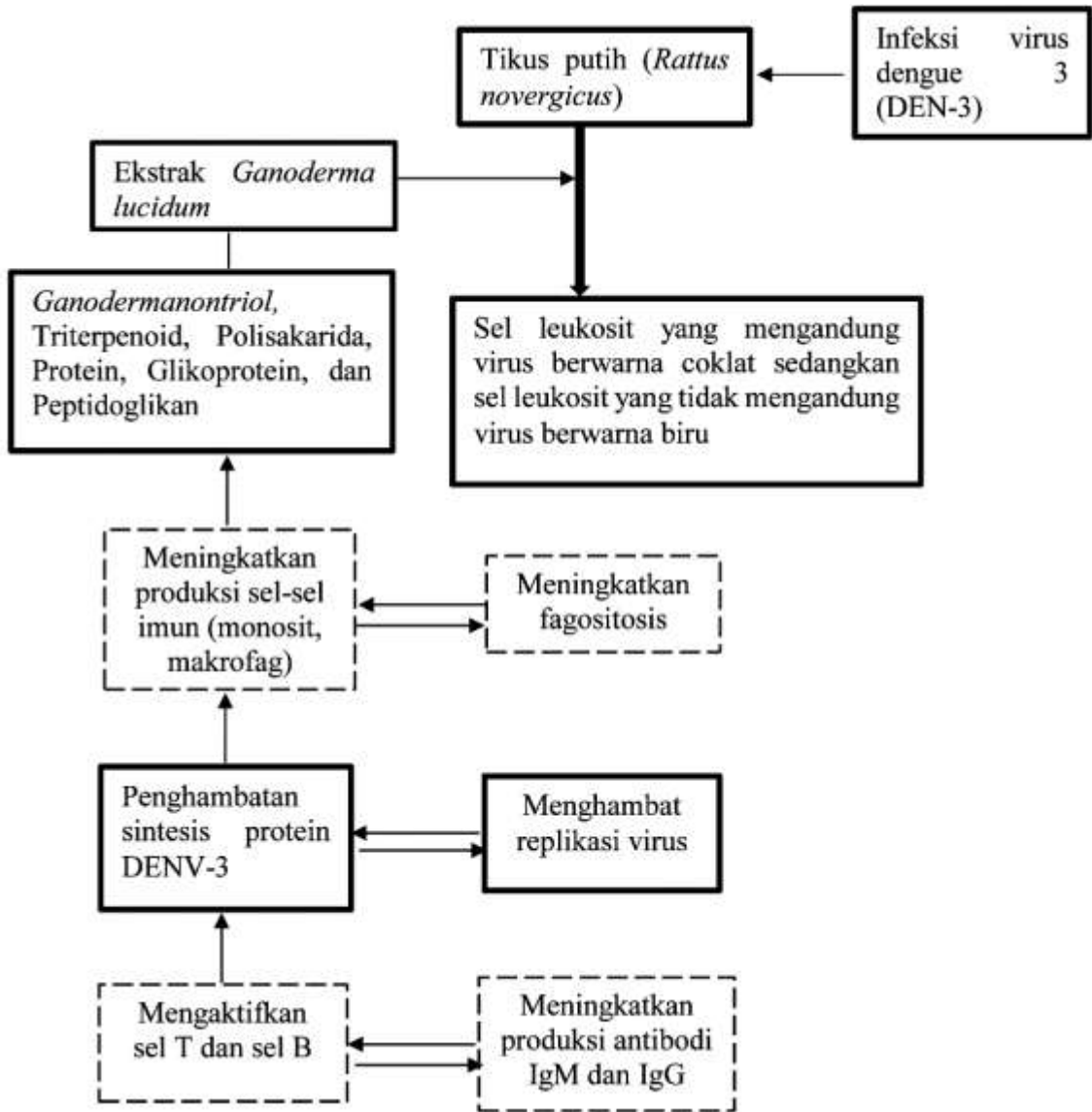
Demam berdarah dengue merupakan infeksi virus dengue yang termasuk virus RNA positif beruntai tunggal dari keluarga Flaviviridae yang terdiri dari empat serotipe yang disebarkan oleh *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (Khanam *et al.*, 2022). Infeksi DENV bersifat ringan atau tanpa gejala dan sekitar 5% kasus berkembang menjadi penyakit parah yang terutama disebabkan oleh infeksi berurutan dengan serotipe DENV yang berbeda (Lim *et al.*, 2023). Virus dengue memiliki struktur kompleks dengan berbagai protein struktural (C, prM dan E) dan tujuh protein nonstruktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5). Mekanisme imunitas virus dengue melibatkan sel dendritik dan makrofag, serta mekanisme respons imun kompleks yang melibatkan produksi antibodi, limfosit T, monosit, makrofag, dan aktivasi komplemen (Pierson & Diamond, 2020). Gangguan respon imun berkontribusi terhadap perkembangan dan keparahan penyakit dengan membatasi pembersihan virus dan menyebabkan peradangan parah yang kemudian menyebabkan demam berdarah dengue dan sindrom syok dengue. Kemampuan DENV untuk menginfeksi berbagai macam sel kekebalan, termasuk monosit, makrofag, sel dendritik, sel mast, serta sel T dan B, akan semakin mengganggu regulasi fungsi antivirus sel-sel tersebut dan mengakibatkan penyebaran virus (Khanam *et al.*, 2022). Respon imun terhadap infeksi virus dengue mencakup pembentukan antibodi, respons seluler, dan peran sel sistem kekebalan bawaan dalam mengendalikan replikasi virus. Sel-sel sistem kekebalan bawaan mengenali patogen melalui PRR dan menginduksi produksi interferon (IFN) dan sitokin proinflamasi lainnya. Infeksi DENV penghindaran respon imun bawaan dapat menyebabkan replikasi virus yang lebih besar dan kerusakan endotel yang menyebabkan manifestasi demam berdarah yang parah (John & Rathore, 2019).

Protein NS3 merupakan protein DENV terbesar kedua dan memiliki berbagai aktivitas enzimatis seperti 5-RNA triphosphatase, nucleoside triphosphatase (NTPase), helicase, dan serine protease. Domain ATPase/helicase dan RNA tri-fosfatase di wilayah terminal-C yang penting untuk virus replikasi dan pembatasan RNA (Lim *et al.*, 2021). Protein NS3 memainkan peran enzimatis dan nonenzimatis dalam perakitan protein flavivirus NS3

dipisahkan dengan dua domain fungsional (Barnard *et al.*, 2021). Protein NS3 membentuk kompleks dengan NS5 dan membantu replikasi melalui pelepasan RNA virus dan defosforilasi sebelum pembatasan 5 ujung (Nanaware *et al.*, 2021).

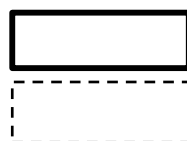
Ganoderma lucidum memiliki dua domain kunci yang berperan dalam aktivitas antivirusnya yang terdiri dari domain protease di terminal-N yang membelah poliprotein virus menjadi protein individu yang terpisah dan domain helikase RNA di terminal-C dengan peran penting dalam replikasi dan sintesis RNA virus (Lee *et al.*, 2023). *Ganoderma lucidum* atau *Lingzhi* adalah jamur kayu yang mempunyai khasiat sebagai obat dan digunakan secara luas di berbagai negara Asia. Jamur ini mengandung senyawa bioaktif seperti triterpenoid, polisakarida, protein, asam amino, dan enzim. Senyawa bioaktif tersebut memiliki sifat antivirus terhadap beberapa virus patogen seperti virus dengue. Senyawa triterpenoid dari *Ganoderma lucidum* yaitu *ganodermanontriol* menunjukkan kemampuan untuk menghambat protein DENV NS3, sehingga jamur ini berpotensi sebagai terapi potensial untuk penyakit DENV (Bharadwaj *et al.*, 2019). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) digunakan sebagai hewan percobaan dalam penelitian karena sifatnya yang mirip dengan manusia dan mudah dipelihara (Wahyurianto, 2022). Metode imunohistokimia (IHC) digunakan untuk mengidentifikasi protein tertentu pada jaringan atau sel. Imunohistokimia merupakan metode untuk mendeteksi apakah antigen tertentu ada dalam sel tertentu. Pengikatan antigen-antibodi ditunjukkan dengan reaksi histokimia berwarna coklat yang terlihat dengan mikroskop cahaya (Vera & Miller, 2013).

C. Kerangka Pikir Penelitian



Gambar 2.2 Kerangka Pikir Penelitian

Keterangan :



Variabel yang diteliti
Variabel yang tidak diteliti