

DETEKSI VIRUS DEN3 PADA SEMUA STADIUM *Aedes aegypti* (TRANSOVARIAL) DENGAN TEKNIK IMUNOSITOKIMIA SECARA INVITRO

DEN3 VIRUS DETECTION IN ALL STAGES OF AEADES AEGYPTI (TRANSOVARIAL) BY USING IN VITRO IMMUNOCYTOCHEMISTRY TECHNIQUE

¹Adhi Kumoro Setya, ²Ruben Dharmawan

¹adhikuuu@gmail.com, ²rubendharmawan@yahoo.com

DIII Akademi Analis Kesehatan STIKES Nasional

Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret

Intisari

Banyak parasit berbahaya yang ditularkan oleh nyamuk, salah satunya virus dengue penyebab demam berdarah. Penelitian sebelumnya menyebutkan virus dengue secara imunositokimia dapat ditemukan pada *A. aegypti* yang tidak menghisap darah. Prinsip dasar pemeriksaan ini dilakukan berdasarkan suatu teknik penentuan keberadaan (lokasi) antigen dalam sel di jaringan menggunakan reaksi antigen-antibodi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil nilai positif stadium biakan *A. aegypti* skala laboratorium. Virus DEN3 dicampurkan kedalam darah percobaan kemudian diinfeksi secara peroral pada *A. aegypti* betina untuk dibiakan. Semua stadium hasil pembiakan diuji adanya virus DEN3 dari jaringan tubuhnya. Antigen DEN3 dalam tubuh vektor akan berikatan dengan antibodi spesifik dari reagen dan dengan adanya enzim serta substrat kromogen akan memberikan warna coklat pada sel dan granula disekitar sel. Reaksi warna tersebut diperiksa menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan kontrol positif dari biakan DEN3 dan kontrol negatif dari darah normal sebagai pembandingan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa imunositokimia metode SBPC mampu mendeteksi DEN3 di semua stadium metamorfose *A. aegypti* dengan hasil masing-masing stadium yaitu ; telur 82%, larva 89%, pupa 94% dan dewasa 100%. Dari hasil tersebut memperlihatkan bagaimana teknik imunositokimia sebagai metode alternatif yang relatif lebih murah dibandingkan teknik molekular dapat dipakai untuk pendeteksian (*surveillance*) terhadap kejadian DBD yang akan muncul.

Kata kunci: *Aedes aegypti*, virus DEN3, imunositokimia

Abstract

Many dangerous parasites transmitted by the mosquito, one of which is dengue virus which causes dengue fever. The previous study said that in immunocytochemistry, dengue virus can be found in A. aegypti that does not suck blood. The basic principle of this examination was done by a technique of determining the existence (location) of antigen in cells in a tissue using antigen-antibody reaction. The purpose of this study was to determine the result of positive value of A. aegypti breeding stages in laboratory scale. DEN3 virus was mixed into the blood for trial then infected orally on the A. aegypti for breeding. All stages of breeding results was tested for DEN3 virus from the body tissue. DEN3 antigen in the body of the vector will bind with specific antibody from reagent and by the presence of the enzyme and chromogen substrate, it will give a brown color to the cells and granule surrounding the cells. Such color reaction was checked using a light microscope with 400x magnification with the positive control of DEN3 breed and the negative control of normal blood as a comparison. The findings showed that immunocytochemistry with SBPC method was capable of detecting DEN3 at all stages of metamorphosis of A. aegypti with the results of the stage respectively; egg: 82%, larva: 89%, pupa: 94% and adult: 100%. These results showed how immunocytochemistry technique as an

alternative method which is relatively cheaper than molecular technique can be used for surveillance on dengue will appear.

Keywords: *Aedes aegypti*, DEN3 virus, immunocytochemistry

Pendahuluan

Salah satu penyakit arboviral paling penting di dunia saat ini adalah Demam Berdarah Dengue (DBD). Lebih dari 50% dari populasi dunia berada pada risiko penyakit atau endemik DBD (Natasha *et al*, 2013). Terhitung sejak tahun 1968 hingga tahun 2009, *World Health Organization (WHO)* mencatat negara Indonesia sebagai negara dengan kasus DBD tertinggi di Asia Tenggara (Sukowati & Umar, 2010). Pasien DBD dapat mengalami syok yang diakibatkan bocornya plasma. Syok ini disebut *sindrom syok dengue (DSS)* dan sering menyebabkan fatal (Sitio, 2008).

Penyebab DBD adalah golongan virus dari kelompok *B Arthropod Virus (Arbovirosis)* yang sekarang dikenal dengan virus *dengue* dari genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae* (Felipe, 2013). Virus ini mempunyai genom RNA rantai tunggal. Berdasarkan klasifikasinya virus dengue dibagi menjadi empat *serotipe* yaitu DEN 1, DEN 2, DEN 3 dan DEN 4. Infeksi salah satu *serotipe* akan menimbulkan antibodi seumur hidup terhadap *serotipe* yang bersangkutan tetapi tidak ada perlindungan terhadap *serotipe* yang lain (Malavige, 2013). Dari 4 *serotipe* DEN, *serotipe* DEN2 dan DEN3 adalah penyebab wabah demam berdarah di Asia Tenggara termasuk Indonesia (Ditjen PP & PL Depkes RI, 2010).

Keberadaan nyamuk *Aedes aegypti* disekitar kita adalah sudah biasa sebab nyamuk ini bersifat *anthropophilic*, tetapi virus *dengue* yang dibawanya perlu menjadi pertimbangan karena dapat menyebabkan korban jiwa. Kemampuan virus *Dengue (DEN)* untuk mempertahankan keberadaannya di alam dilakukan melalui dua mekanisme, yaitu transmisi horizontal antara vertebrata viremia yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes* dan dengan transmisi vertikal (transovarial) yaitu dari nyamuk betina yang terinfeksi ke generasi berikutnya (Hesmiwati, 2009).

Penelitian tentang *serotipe* virus *dengue* sering dilakukan pada serum penderita DBD, akan tetapi penelitian pada nyamuk *A. species* sebagai vektornya belum banyak dilakukan (Hesmiwati *et al*, 2010). Diagnosa lebih dini sebelum virus ini masuk dalam tubuh manusia adalah sangat penting. Beberapa metode telah banyak dilakukan untuk pendeteksian virus ini. Salah satu metode yang murah tetapi cukup sensitif ialah menggunakan metode imunositokimia. Suatu teknik penentuan keberadaan (lokasi) antigen dalam sel di jaringan menggunakan reaksi antigen-antibodi (Fatchiyah dkk, 2011).

Oleh sebab itu, penelitian ini dirancang untuk mencoba deteksi transovarian virus *Dengue* dari isolat telur, larva, pupa dan dewasa nyamuk *A. aegypti* skala laboratorium sebagai pemeriksaan *surveillance* DBD.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada (UGM) dengan rancangan studi *Pre-test and Post-test Control*. Subyek dari penelitian ini adalah semua stadium *Aedes aegypti* (telur, larva, pupa dan dewasa) hasil pembiakan dari 12 induk yang diinfeksi DEN3 secara peroral dan hasil *squash* jaringan diperiksa dengan teknik imunositokimia *Streptavidin Biotin Peroxidase Complex (SBPC)*.

Alat dan Bahan

Obyek gelas, *cover slip*, *Phosphat Buffer Saline (PBS)*, metanol absolut, H_2O_2 (hidrogen peroksida), antibodi primer (antibodi monoklonal DSSC10 produksi UGM), *Starr Trek Detection Kit* (Biocare Medical) yang mengandung lima reagen yang siap pakai: (i) *Background Sniper (Cat. No. BS966L10)* sebagai *protein blocking solution* yang mengandung serum non imun; (ii) *Trek Universal Link (Cat. No. STU700L10)*, yang mengandung antibodi sekunder berlabel biotin; (iii) *Trek Avidin-HRP Label (Cat. No. STHRP700L10)*, yang mengandung *streptavidin peroxidase conjugate* yang dilabel enzim *horseradish peroxidase (HRP)*, (iv) *Betazoid Diaminobenzidine tetrachloride (DAB) Chromogen (Cat. No. BDB900G5)*, serta (v) *Betazoid DABS substrate Buffer (Cat. No. DS900L10)*, cat Mayer Hematoxylin (*counterstain*), alkohol, *entellan*, kertas *aluminium foil*, tissue, dan minyak imersi.

Tahapan

Persiapan Sampel

Sebanyak 12 ekor *A. aegypti* betina umur 5-7 hari dimasukkan bersama dalam cup. Sampel darah berantikoagulan dicampur dengan suspensi stok virus DEN3 (1:1) pada suhu 28°C selama 10 menit. 1 (satu) tetes dari campuran tersebut dibuat sediaan hapusan pada objek glass untuk dijadikan kontrol positif. Untuk kontrol negatif hasil berasal dari isolat nyamuk yang tidak diinfeksi. Darah yang sudah tercampur dengan virus diinfeksi kepada 12 nyamuk *A. aegypti* betina secara peroral dengan menggunakan membran kulit mencit.

Pembiakan

Dari 12 nyamuk *A. aegypti* yang telah diinfeksi, masing-masing nyamuk di masukan dalam wadah cup yang diberi kertas saring basah dan *A. aegypti* jantan agar berkopulasi. Pembiakan berhasil jika terlihat telur berwarna hitam pada kertas saring. Pemeriksaan DEN3 dalam stadium hasil pembiakan diperoleh dengan cara pengundian. Untuk stadium larva, pupa dan dewasa diperoleh setelah stadium telur terlebih dahulu digenangi air.

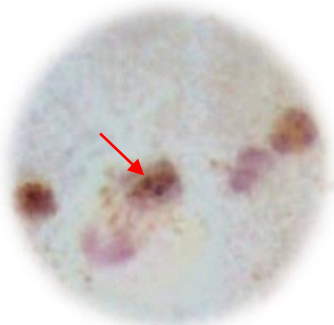
Pemeriksaan imunositokimia

Pemeriksaan ini dilakukan dari isolat jaringan (telur, larva, pupa dan dewasa) yang di *squash* di atas gelas obyek. Prosedur ini dibakukan oleh Umniyati dkk (2008) dengan urutan ; (1) hasil squash/apus difixasidenganmetanol, (2) Penambahan peroxidaseblockingsolution (PBS), (3) Dilanjutkan dengan *prediluted blocking* serum. (4) Penambahan antibodi primer(antibodi monoklonal DSSC10) lalu preparat diinkubasi1 jam padasuhukamar, (5) pencucian dengan PBS 3x, (6) Penambahan *Biotinylated universal secondary antibody*, (7) Pencucian dengan PBS segar, (8) Pemberian streptavidin/peroxidase complex. (9) Dilanjutkan pencucian lagi dengan PBS, (10) Penambahan betazoid DAB chromogen, (11) Setelah kering dilanjutkan dengan pemberian mayer hematoxilinkemudian dicuci dengan air mengalir, (12) dilanjutkan dehidrasi alkohol konsentrasi 100% sekali, (13) Prosedur diakhiri dengan proses *clearing*menggunakanXylenatauXylol sekali.

Hasil dan Pembahasan

Persiapan sampel

Dalam penelitian ini dikondisikan semirip mungkin dengan kondisi penularan secara alami. Nyamuk yang digunakan adalah nyamuk betina umur 5-7 hari dan steril dari kontaminan. Begitu juga sampel darah yang digunakan, darah ini berasal dari mencit yang bebas virus dengue. Darah yang diinfeksi positif mengandung DEN3 yang terlihat setelah dicat secara imunositokimia dan digunakan sebagai kontrol positif.



Gambar 1. Kontrol positif berwarna coklat dari sampel darah yang akan diinfeksi.

Dari hasil tersebut menunjukkan campuran darah dengan virus DEN3 siap untuk diinfeksi. Dalam proses penginfeksian ini dilakukan secara peroral menggunakan membran kulit mencit untuk lebih merangsang nyamuk mau menghisap sampel darah.

Pembiakan

Sebelum dibiakan sendiri-sendiri dalam cup, harus dipastikan betul nyamuk kenyang darah. Hal ini untuk memastikan agar nyamuk dapat bertelur setelah kopulasi. Tanda kenyang darah terlihat dari abdomen nyamuk yang membesar berwarna merah. Setelah itu nyamuk dapat dipisah dalam cup masing-masing. Dari 12 nyamuk yang dikopulasikan semuanya berhasil yang ditandai dengan terdapatnya telur berwarna hitam pada kertas saring. Masing-masing telur tersebut dibiakan dalam air agar menetas menjadi larva, pupa dan dewasa lagi. Dari stadium metamorfosa yang dibiakan waktu yang dibutuhkan untuk bermetamorfose bervariasi ; telur menjadi larva 1-3 hari, larva menjadi pupa 6-8 hari, pupa menjadi dewasa 2-4 hari.

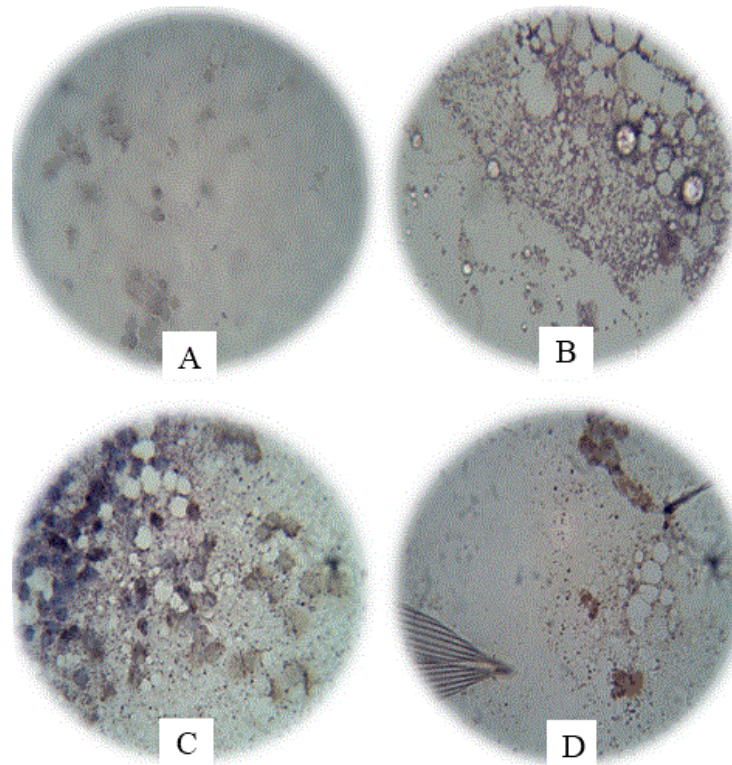
Untuk menjaga agar stadium yang dibiakan mampu bertahan hidup perlu pemberian makan berupa hati ayam pada stadium larva. Dalam penelitian ini, jumlah awal telur sampai stadium akhir pembiakan yang terjadi adalah sama. Hal ini membuktikan bahwa pembiakan yang dilakukan berhasil.

Hasil imunositokimia.

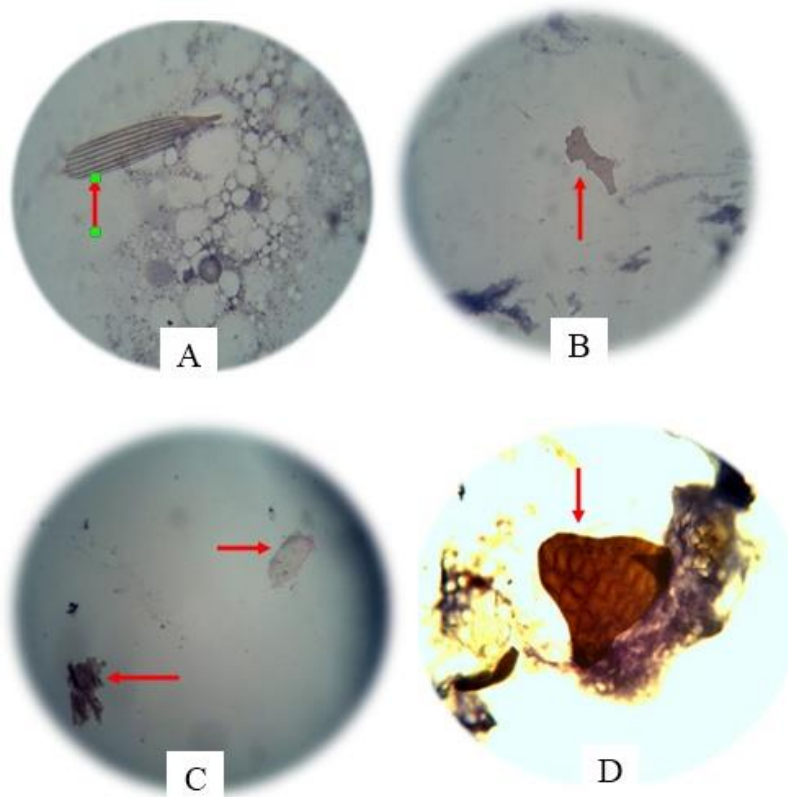
Sampel (telur, larva, pupa dan dewasa) yang diperiksa diperoleh dengan cara pengundian. Dalam pemeriksaan ini tidak semua jaringan dipakai, contoh untuk larva, pupa dan dewasa hanya bagian caput dan toraknya saja yang diperiksa. Hal ini untuk menghindari peroksidase endogen dalam jaringan yang akan ikut bereaksi positif. Sedangkan untuk stadium telurnya hanya jaringan embrio saja yang dipakai, untuk lapisan kitin (dinding) disingkirkan.

Tabel 1. Hasil imunositokimia DEN3 dari stadium-stadium *A. aegypti*

Stadium	Jumlah	Lama inkubasi	Hasil imunositokimia		(%)
			Positif	Negatif	
Telur	17	7-9 hari	14	3	82 %
Larva	19	1-3 hari	17	2	89 %
Pupa	18	5-7 hari	16	2	94 %
Dewasa betina	9	4-6 hari	9	0	100 %



Gambar 2. Hasil positif pemeriksaan imunositokimia memperlihatkan warna coklat pada stadium telur (A), larva (B), pupa (C) dan dewasa (D)



Gambar 3. Unsur pengotor (artefak) pada pengecatan imunositokimia (A). sisik, (B). Kitin, (C). Endapan kotoran dan (D).Cangkang telur

Simpulan

Dari hasil penelitian memperlihatkan bahwa semakin berkembang suatu stadium nyamuk akan menunjukkan semakin tinggi jumlah stadium yang positif dapat menularkan virus DEN3. Hasil negatif tertinggi terjadi pada stadium telur diikuti larva dan pupa. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Yesman (2010) bahwa hasil negatif dikarenakan titer virus dalam sampel masih rendah. Menurut Foote (1959) waktu yang dibutuhkan virus dengue untuk propagasi dalam tubuh vektor adalah minimal 8 hari. Hal ini dipertegas melalui stadium akhir metamorfose (dewasa) yang 100% memberikan hasil positif.

Pada penelitian ini didapatkan beberapa bagian lain dari jaringan yang ikut memberikan hasil positif berwarna coklat. Dimana gambaran-gambaran jaringan ini bukan merupakan hal yang seharusnya dibaca karena akan menyebabkan hasil positif palsu. Berdasarkan hasil percobaan tersebut, teknik imunositokimia yang dibakukan oleh Umniyati dkk (2008) dapat diaplikasikan sebagai prosedur pendeteksian penyakit DBD yang akan muncul dalam rangka *surveillance*.

Ucapan Terimakasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Parasitologi FK Universitas Gadjah Mada Yogyakarta sebagai tempat pelaksanaan yang digunakan dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

Felipe J.C, Carlo F., Iain R.L and Paul R.H. 2013. The Effects of Weather and Climate Change on Dengue. PLOS Neglected Tropical Diseases. Department of Economics, University of California, California.

Fatchiyah, Arumingtyas E.L, Widyarti S dan Rahayu S, 2011. Biologi Molekuler, Prinsip Dasar Analisis. Erlangga, Jakarta.

Hasmiwati dkk, 2010. Deteksi Virus Dengue dari Nyamuk Vektor *Aedes aegypti* di Daerah Endemik Demam Berdarah *Dengue* (DBD) di Kota Padang dengan Metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang.

Imam dkk, 2009. Deteksi Virus *Dengue* pada Telur Nyamuk Dewasa *Aedes species* di Daerah Endemis DBD. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung. Semarang.

Malavige, G.N, Fernando, S.; Fernando, D.J and Seneviratne S.L. 2013. *Dengue* viral infections. Postgrad Med J 2013;80:588–601.

Natasha E.A, Murray, Mikel B.Q and Annelis W.S, 2013. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. Institute of Public Health, University of Heidelberg, Germany; Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University, Singapore. Germany.

Sitio A, 2008. Hubungan perilaku tentang pemberantasan sarang nyamuk dan kebiasaan keluarga dengan kejadian demam berdarah *dengue* di kecamatan medan perjuangan. Universitas Diponegoro. Semarang.

Sukowati S, 2010. Masalah Vektor Demam Berdarah *Dengue* (DBD) dan Pengendaliannya di Indonesia. . Buletin Jendela Epidemiologi. Pusat Data dan Surveilans Epidemiologi Kementerian Kesehatan RI. Vol 2.

Umar, F.A. 2010. Manajemen Demam Berdarah Berbasis Wilayah. Buletin Jendela Epidemiologi. Pusat Data dan Surveilans Epidemiologi Kementerian Kesehatan RI. Volume 2, Agustus 2010.

Umniyati S.R. 2009. Standardization of *immunocytochemical* method for the diagnosis of dengue viral infection in *Aedes aegypti* Linn mosquitoes (Diptera: *Culicidae*). Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Umniyati S.R, Sutaryo, Wahyono D., Artama W.T, Mardihusodo S.J, Mulyaningsih B dan Utoro T, 2008. Application of Monoclonal Antibody DSSC 7 for Detecting Dengue Infection In *Aedes aegypti* Based on Immunocytochemical Streptavidin Biotin Peroxidase Complex Assay (ISBPC). Universitas Gajah mada. Yogyakarta.

WHO. 2009. Dengue Guidelines For Treatment, Prevention and Control.

WHO. 2009. Progress and prospects for the use of imodified mosquitoes to inhibit disease transmission.

