

PENELITIAN | RESEARCH

Infeksi Virus Dengue pada Nyamuk *Aedes aegypti* Menggunakan *Artificial Blood Feeding* dan Deteksi Virus Dengue Menggunakan Teknik Molekular

Dengue Virus Infection in Aedes aegypti using Artificial Blood Feeding and Virus Detection Using Molecular Technique

Endang Srimurni Kusmintarsih^{1*}, Medina Fadli Latus Syaadah¹, R. Tedjo Sasmono², Edy Riwidiharso¹

¹ Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Jl. dr. Suparno 63, Purwokerto 53122, Indonesia

² Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jl. Diponegoro 69, Jakarta, Indonesia

Abstract. *Artificial blood-feeding using the parafilm-M membrane can be used as an alternative solution and substitute live animals as a source of blood. This method is not only be used for blood-feeding but also to infect the dengue virus (DENV) to mosquitoes. This study was aimed to determine the effectiveness artificial blood feeding using parafilm-M membrane in Aedes mosquitoes originated in Indonesia and determine the positivity of mosquitoes infected by Indonesia DENV-1. DENV-1 was isolated from patient and propagated in Vero cell culture. The feeding was done in cardboard cups after mosquitos have been starved for 4-17 hours before being fed with human blood. A conical 50ml tube was prepared, and a hole was created in the tube lid. The tube opening was covered with parafilm. Glycerol was added into conical tube and heated in water bath for an hour at 55°C. A mixture of blood and DENV-1 was made with concentration of 10%. Detection of DENV in blood-fed mosquitos was carried out by using Simplexa Dengue Real-Time RT-PCR assay. The results showed that the prevalence of blood-fed mosquitoes reached 66.67% with fasting period for 17 hours. Blood feeding mosquitoes are affected by duration of fasting period, blood-feeding time, and attractants from human skin rubbed into parafilm-M membrane. The prevalence of blood-fed Ae. aegypti infected by DENV was 20.83%. This study provides information on the effectiveness of artificial parafilm membrane blood-feeding in a laboratory setting that will be useful for vector control study in Indonesia.*

Keywords: *Artificial Blood Feeding, Aedes aegypti, Real Time RT-PCR*

Abstrak. *Artificial blood feeding menggunakan membran parafilm-M dapat menjadi solusi alternatif untuk menggantikan hewan hidup sebagai sumber darah. Artificial blood feeding membran parafilm-M tidak hanya dapat digunakan sebagai metode pemberian pakan darah, tetapi dapat juga digunakan sebagai cara untuk menginfeksi virus dengue (DENV) ke nyamuk. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas nyamuk yang mengisap darah atau kenyang darah menggunakan metode artificial blood feeding membran parafilm-M dan mengetahui positivities nyamuk kenyang darah yang terinfeksi oleh DENV-1. Virus yang diinfeksi berasal dari pasien dan dipropagasi di kultur sel Vero. Pemberian pakan darah dilakukan pada gelas karton dan nyamuk dipuaskan selama 4-17 jam sebelum diberi pakan darah. Conical tube 50 ml disiapkan dan tutup tube dilubangi dan dilapisi dengan membran parafilm. Kemudian glycerol 100 % dimasukkan ke dalam conical tube dan dihangatkan dalam water bath selama satu jam dengan suhu 55 °C. Campuran darah dan virus dibuat dengan konsentrasi virus 10 %. Deteksi virus dengue dilakukan menggunakan teknik real time RT-PCR Simplexa Dengue. Hasil penelitian menunjukkan prevalensi nyamuk yang kenyang darah mencapai 66,67 % dengan lama puasa 17 jam. Nyamuk yang mengisap darah dipengaruhi oleh lama puasa nyamuk, waktu pemberian pakan darah, dan atraktan. Prevalensi nyamuk Ae. aegypti yang kenyang darah yang terinfeksi virus dengue yaitu 20,83%. Penelitian ini memberikan informasi kegunaan artificial blood feeding dengan membran parafilm yang dapat dipakai sebagai metode alternatif pemberian pakan darah di laboratorium yang akan bermanfaat dalam pengendalian vektor nyamuk.*

Kata Kunci: *Artificial Blood Feeding, Aedes aegypti, Real Time RT-PC*

Naskah masuk: 20 September 2018 | Revisi: 04 Juni 2019 | Layak terbit: 26 November 2019

¹ Korespondensi: endang.kusmintarsih@unsoed.ac.id | Telp/Faks: +62 281 638 794/+62 281 631 700

PENDAHULUAN

Aedes aegypti merupakan vektor primer dari virus dengue (DENV) yang menyebabkan penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD). Nyamuk *Ae. aegypti* termasuk ke dalam *family* Culicidae yang memiliki ciri khas garis hitam putih pada bagian badan dan kepalanya serta garis putih yang melingkari kakinya.¹ Nyamuk *Ae. aegypti* jantan mengisap sari tumbuhan sebagai sumber makanan sedangkan nyamuk betina mengisap darah.² Sumber darah dapat berasal dari hewan vertebrata seperti domba, mencit, dan hewan vertebrata yang lain, namun, *Ae. aegypti* bersifat antropofilik sehingga lebih menyukai darah manusia.³

Pemberian pakan darah untuk nyamuk betina sangat penting untuk kolonisasi dan pemeliharaan nyamuk, yang sering digunakan untuk penelitian penyakit yang ditularkan oleh vektor. Pemberian pakan darah pada awalnya menggunakan umpan manusia atau binatang, sangat umum menggunakan guinea pig dan rodensia, Meningkatnya kesadaran pada kesejahteraan satwa dan keketatan dalam peraturan yang mengatur para ilmuwan dalam menggunakan hewan untuk penelitian. Ditambah dengan ketidaknyamanan menggunakan hewan sebagai sumber darah mendorong mencari cara lain untuk pemberian pakan darah yang murah dan mudah dengan menggunakan artificial/membrane buatan.^{4,5,6,7} metode pemberian pakan darah *artificial* menggunakan alat untuk menempatkan darah dan penghangat agar darah tetap hangat menyerupai hewan hidup.⁸ Hewan hidup yang digunakan dalam pemberian pakan darah alami dapat dilakukan jika telah mendapatkan persetujuan dari komite bioetika. Komite bioetika mengatur mulai dari metode dalam memberi anestesi atau melumpuhkan hewan sebelum pemberian pakan darah, sampai metode euthanasia setelah penelitian selesai. Meskipun metode ini dapat digunakan, terdapat beberapa kondisi dimana metode ini tidak boleh digunakan. Seperti pada penelitian yang membutuhkan infeksi virus atau bakteri, maka tidak dianjurkan menggunakan metode pemberian pakan darah alami.⁹ Selain itu, terdapat beberapa aspek yang perlu dipertimbangkan. Pertama, terkait dengan kesejahteraan hewan penelitian.¹⁰ Prinsip 3 R (*Reduction, Refinement, Replacement*) perlu diperhatikan dalam pelaksanaan penelitian. Kedua, terkait dengan kemungkinan penularan penyakit.¹¹ Ketiga, terkait dengan pemeliharaan hewan yang membutuhkan biaya dan waktu yang lebih.¹²

Artificial blood feeding dapat menjadi solusi alternatif dalam pemberian pakan darah untuk menggantikan hewan hidup sebagai sumber darah. *Artificial blood feeding* dapat menggunakan kulit dari beberapa jenis hewan seperti tikus, kelinci, ayam sebagai membran untuk menempatkan darah. Penggunaan kulit hewan dalam metode *artificial blood feeding* agak sukar. Oleh sebab itu, diperlukan bahan lain untuk menggantikan kulit hewan. Parafilm-M dapat menggantikan kulit hewan sebagai membran dalam *artificial blood feeding*. Parafilm-M bersifat elastis dan tipis menyerupai kulit manusia. Selain itu, bahan ini sering digunakan di laboratorium dan mudah didapat.¹³ Sehingga penelitian ini menggunakan membran parafilm-M dalam metode *artificial blood feeding*. *Artificial blood feeding* membran parafilm-M tidak hanya digunakan sebagai metode pemberian pakan darah, tetapi juga dapat digunakan sebagai cara untuk menginfeksi virus dengue ke nyamuk. Oleh karena itu, dilakukan pemberian pakan darah yang dicampur dengan kultur virus dengue. Virus dengue yang digunakan berasal dari hasil kultur di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman. Deteksi virus dengue dilakukan dengan menggunakan teknik molekuler yaitu *Simplex Dengue assay* yang merupakan metode *Real Time RT-PCR* dapat mendeteksi serta menentukan serotipe virus dengue secara akurat dan cepat.¹¹

BAHAN DAN METODE

Kultur Virus Dengue Menggunakan Vero Cell

Vero cell sebanyak 2×10^6 ditanam pada *flask* T-25 menggunakan 5 ml medium kultur (Minimum Essential Medium/MEM dengan 5 % Fetal bovine serum/FBS dan 1% antibiotik dan anti jamur). Dua *flask* T-25 digunakan, satu untuk mengkultur virus dan yang lain untuk kontrol negatif. Sel yang ditanam dipastikan tersebar merata pada *flask* T-25 dan diinkubasi pada suhu 37 °C dan 5 % CO₂ selama 1 hari. Sel yang tumbuh pada *flask* T-25 diamati menggunakan mikroskop dan dipastikan *confluency cell* mencapai 80-90%. Medium kultur dibuang dan diganti dengan 2,8 ml medium inokulasi (MEM dengan 2% FBS). Untuk kontrol negatif diganti dengan 3 ml medium inokulasi. Kultur virus DENV-1 yang ditambahkan pada *flask* T-25 sebanyak 200 µl. Sedangkan untuk kontrol negatif tidak ditambahkan kultur virus. Sel yang terinfeksi virus dan kontrol negatif diinkubasi pada suhu 37 °C dan 5% CO₂ selama 1 minggu. Kemudian sel diamati di bawah mikroskop. Sel yang terinfeksi menunjukkan *cytopathic effect* yang menandakan bahwa infeksi

telah berjalan. Medium inokulasi dipindahkan ke dalam *tube* 15 ml dan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 400 rpm sedangkan untuk kontrol negatif dibuang. Supernatan yang dihasilkan dan disimpan pada temperatur -80 °C.

Rearing Nyamuk *Ae. aegypti*

Nyamuk *Ae. aegypti* betina dewasa yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari *rearing* telur *Ae. aegypti*. Telur nyamuk didapatkan dari Loka Litbang P2B2 Ciamis, Jawa Barat. Nyamuk dewasa umur 3 hari diberi makan glukosa 10%, dan dipuasakan selama 4-17 jam sebelum dilakukan pemberian pakan darah.

Artificial Blood Feeding Membran Parafilm-M

Nyamuk dipindahkan dari kandang ke dalam gelas karton dan dipuasakan dari larutan glukosa dengan waktu yang berbeda antara 4-17 jam sebelum diberi pakan darah. *Conical tube* 50 ml disiapkan dan tutup *tube* dilubangi. Kemudian glycerol 100 % dimasukan ke dalam *conical tube* dan dipanaskan dalam *water bath* selama satu jam dengan suhu 55°C. Campuran darah dan virus dibuat dengan konsentrasi virus 10 % yaitu sebanyak 1350 µl darah dicampur dengan 150 µl virus dengue. Campuran darah dan virus diletakkan dalam *tube* dan disimpan dalam suhu 37°C selama 5-10 menit. Kemudian parafilm-M disiapkan dengan menggosokkan ke kulit manusia dan direkatkan pada bagian luar tutup *conical tube* yang telah dilubangi. Campuran darah dan virus diletakkan di bagian dalam tutup *conical tube* yang telah direkatkan dengan membran parafilm-M (Gambar 1). Kemudian *conical tube* yang sudah berisi darah dan glycerol 100% diletakkan di atas cup yang berisi nyamuk, sesuai dengan metode yang sebelumnya sudah dipublikasikan¹⁰. *Feeding* dilakukan selama 3 jam. Nyamuk *fed* dipisahkan dan dipelihara selama 3-7 hari.

Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA dari nyamuk dilakukan menggunakan kit QIAmp Viral RNA kit dari Qiagen. Nyamuk dimasukkan ke dalam tube yang berisi *ceramic beads* dan 400 µl PBS+FBS media, kemudian dimasukkan ke dalam *Magna Lyser* dengan kecepatan 6.000 rpm selama 2 x 90 detik kemudian, disentrifuge lagi dengan kecepatan 13.000 rpm (16200 g) selama 5 menit. *Lysate* yang dihasilkan dimasukan sebanyak 140 µl ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml yang berisi 560 µl buffer AVL, 5,6 µl *carrier RNA* dan 5 µl *RNA internal control*. Sisa *lysate* yang dihasilkan, disimpan dalam mikrosentrifuga pada suhu -

80°C. Kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 15 detik dan inkubasi dalam suhu ruang selama 10 menit. Disentrifuge selama lima detik untuk menghilangkan tetesan di dalam tutup tabung mikrosentrifuga. Kemudian ditambahkan ethanol 90% sebanyak 560 µl dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 15 detik. Kemudian 630 µl larutan yang dihasilkan pada tahap sebelumnya dimasukkan ke dalam QIAamp Mini Spin Column pada *collection tube* ukuran 2 ml dan disentrifuge dengan kecepatan 8.000 rpm (6200 g) selama 1 menit. Pindahkan QIAamp Mini Spin Column pada *collection tube* 2 ml yang baru dan buang *collection tube* yang berisi filtrat. Tahap ini diulang sebanyak dua kali. Selanjutnya ditambahkan 500 µl buffer AW1 dan disentrifuge dengan kecepatan 8.000 rpm (6200 g) selama 1 menit. Pindahkan QIAamp Mini Spin Column pada *collection tube* ukuran 2 ml yang baru dan buang *collection tube* yang berisi filtrat. Selanjutnya ditambahkan 50 µl buffer AVE dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 8.000 rpm (6200 g) selama 1 menit. RNA disimpan pada suhu -8°C.

Deteksi Virus Dengue dengan Simplexa Real Time RT-PCR

Simplexa Dengue RT-PCR kit (Focus Diagnostics) digunakan untuk mendeteksi infeksi DENV pada nyamuk. *Reaction mix* disiapkan sesuai dengan jumlah reaksi yang dibutuhkan. Sebanyak 40 µl HS Master Mix (DNA polymerase, buffer, dan dNTPs), 5 µl Simplexa Dengue 1&4 Primer Mix dan 5 µl *Reverse Transcriptase* dicampurkan ke dalam tabung mikrosentrifuga. Setiap *reaction mix* dihomogenkan dengan *pipetting* 8-10 kali secara perlahan. Kemudian sentrifuge selama 5 detik untuk menghilangkan tetesan di dalam tutup tabung. Setiap *reaction mix* dimasukan ke dalam *well* pada *universal disc*. *Reaction mix* Dengue 1&4 dimasukkan terlebih dahulu ke dalam *well* pada *universal disc*. Selanjutnya pada *spoke* yang baru dimasukkan *reaction mix* Dengue 2&3 ke dalam *well* pada *universal disc*. Volume *reaction mix* yang dimasukkan ke setiap *well* adalah 5 µl. *Well A* pada *spoke* 1 dimasukan *molecular control* sebagai *positive control*. Kemudian RNA sampel dimasukkan ke dalam *well* selanjutnya. *Well* terakhir pada *spoke* terakhir dimasukkan *non-template control* sebagai *negative control*. *Disc* ditutup dengan *Universal Disc Cover Tape*. Kemudian *Universal Disc* dimasukkan ke dalam *thermal cycle*. Hasil dianalisis dengan menggunakan software

bawaan mesin 3M. Gen target amplifikasi untuk DENV-1 yaitu gen NS5, DENV-2 gen NS3, DENV-3 gen NS5 dan untuk DENV-4 gen capsid.

HASIL

Pada penelitian ini, dilakukan beberapa kali *artificial feeding* menggunakan parafilm sebagai membrane. Dari seluruh eksperimen, total jumlah nyamuk yang mengisap darah sebanyak 24 ekor dari 69 ekor sampel nyamuk. Prevalensi nyamuk yang mengisap darah dari seluruh sampel nyamuk yaitu 34,78 %. Prevalensi tertinggi nyamuk yang mengisap darah pada setiap pemberian pakan darah mencapai 66,67% pada pemberian pakan ke 3 dengan lama puasa 17 jam dan prevalensi terendah yaitu 10% pada

pemberian pakan ke 1 dengan lama puasa 7 jam. Data prevalensi nyamuk yang kenyang darah selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Setelah nyamuk kenyang darah, dilakukan pemeliharaan nyamuk selama 7 hari. Kemudian untuk mengetahui apakah infeksi DENV-1 berhasil dilakukan dan virus bisa berkembang di tubuh nyamuk, dilakukan pemeriksaan RT-PCR untuk mendeteksi keberadaan virus. Hasil RT-PCR menunjukkan prevalensi nyamuk kenyang darah yang terinfeksi virus dengue mencapai 20,83% dari jumlah total nyamuk kenyang darah 24 ekor dan jumlah nyamuk kenyang darah yang positif terinfeksi DENV sebanyak 5 ekor yaitu pada nyamuk *Ae. aegypti* 1, 2, 13, 18, dan 19 (Tabel 2).

Tabel 1. Prevalensi Nyamuk *Ae. aegypti* yang kenyang darah

Pemberian Pakan Darah ke	Lama Puasa (Jam)	Jumlah Nyamuk	Jumlah Nyamuk Fed	Persentase (%) yang feed	Waktu Pemberian Darah
1	7	10	1	10	13:30 WIB
2	4	9	4	44,44	10:00 WIB
3	17	12	8	66,67	10:00 WIB
4	17	10	5	50	10:00 WIB
5	5	9	1	11,11	12:30 WIB
6	16	10	3	30	11:00 WIB
7	16	9	2	22,22	11:00 WIB
Total		69	24	34,78	

Tabel 2. Deteksi Virus Dengue Pada Nyamuk yang kenyang darah

No	Nyamuk	Nilai Ct (cycle treshhold)	Jenis Curva	Positif	Negatif
1	<i>Ae. aegypti</i> 1	31,1	Valid	√	
2	<i>Ae. aegypti</i> 2	32,3	Valid	√	
3	<i>Ae. aegypti</i> 3	0	Tidak		√
4	<i>Ae. aegypti</i> 4	0	Tidak		√
5	<i>Ae. aegypti</i> 5	0	Tidak		√
6	<i>Ae. aegypti</i> 6	0	Tidak		√
7	<i>Ae. aegypti</i> 7	0	Tidak		√
8	<i>Ae. aegypti</i> 8	0	Tidak		√
9	<i>Ae. aegypti</i> 9	0	Tidak		√
10	<i>Ae. aegypti</i> 10	0	Tidak		√
11	<i>Ae. aegypti</i> 11	0	Tidak		√
12	<i>Ae. aegypti</i> 12	0	Tidak		√
13	<i>Ae. aegypti</i> 13	33,1	Valid	√	
14	<i>Ae. aegypti</i> 14	0	Tidak		√
15	<i>Ae. aegypti</i> 15	0	Tidak		√
16	<i>Ae. aegypti</i> 16	0	Tidak		√
17	<i>Ae. aegypti</i> 17	0	Tidak		√
18	<i>Ae. aegypti</i> 18	33	Valid	√	
19	<i>Ae. aegypti</i> 19	32,6	Valid	√	
20	<i>Ae. aegypti</i> 20	0	Tidak		√
21	<i>Ae. aegypti</i> 21	0	Tidak		√
22	<i>Ae. aegypti</i> 22	0	Tidak		√
23	<i>Ae. aegypti</i> 23	0	Tidak		√
24	<i>Ae. aegypti</i> 24	0	Tidak		√
Total				5	19

PEMBAHASAN

Tabel 1 menunjukkan bahwa keberhasilan nyamuk mengisap darah melalui *artificial blood feeding membran parafilm-M* sejumlah 34,78%. Data tersebut menunjukkan bahwa *artificial blood feeding* dengan membran parafilm-M dapat digunakan untuk pemberian pakan darah pada nyamuk yang dikembangkan di laboratorium sebagai pengganti hewan hidup bila melakukan penelitian menggunakan infeksi mikroorganisme seperti virus atau bakteri. Namun untuk meningkatkan jumlah nyamuk yang mengisap darah perlu memperhatikan berbagai hal, diantaranya nyamuk perlu dipuaskan dengan jangka waktu tertentu, ketika hewan merasa lapar, penurunan kadar insulin dalam tubuh akan mendorong hewan untuk lebih aktif mencari dan mendapatkan makanan.¹⁴

Lama puasa mempengaruhi nyamuk untuk mengisap darah karena kondisi nyamuk yang lapar dan kekurangan nutrisi menyebabkan nyamuk cenderung lebih tertarik dengan pakan darah yang disediakan. Pada masa puasa paling lama yaitu 17 jam, positivitas nyamuk yang kenyang darah mencapai 66,67% dan 50%. Pada masa puasa nyamuk paling pendek yaitu 4 jam, positivitas nyamuk yang kenyang darah mencapai 44,44%. Meskipun masa puasa nyamuk paling pendek, *blood feeding rate* lebih tinggi dibandingkan dengan positivitas pada pemberian pakan lain yang masa puasanya lebih lama yaitu pemberian makan ke 1, 5, 6, dan 7. Hal ini dapat disebabkan oleh faktor lain yaitu waktu pemberian pakan darah.

Waktu pemberian pakan darah juga mempengaruhi nyamuk dalam mengisap darah. Nyamuk betina aktif mengisap darah pada pagi hari jam 08.00-12.00 dan mencapai puncak aktivitas pada jam 09.00-10.00 serta pada sore hari jam 15.00-18.00 dan mencapai puncak aktivitas pada jam 17.00-18.00.¹⁵ Pada pemberian pakan darah ke 2 dilakukan pada jam 10.00, ketika nyamuk sedang aktif mencari makan. Begitu juga pada pemberian pakan darah ke 3 dan 4 dilakukan pada jam 10.00, menghasilkan positivitas lebih tinggi (44,44%, 50%, dan 66,6%), Pada pemberian darah pukul 11.00 menghasilkan positivitas lebih rendah dibandingkan pemberian pukul 10.00 yaitu 30 % dan 22, %, namun lebih tinggi dibandingkan pemberian pakan darah pukul 12.00 lebih. Pemberian pakan darah yang memiliki positivitas nyamuk yang mengisap darah paling rendah, yaitu pada pemberian pakan darah ke 1 dan 5 dilakukan pada jam 13.00 dan 12.30 hanya menghasilkan 10 % dan 11,11%, waktu tersebut merupakan nyamuk dalam fase istirahat, sebagaimana pernyataan¹⁶, yang menyatakan

bahwa masa istirahat *Ae. aegypti* yaitu pada jam 13.00-14.00. Hasil tersebut menunjukkan bahwa waktu pemberian pakan darah lebih menentukan positivitas nyamuk mengisap darah dibandingkan masa puasa.

Faktor lain yang dapat mempengaruhi nyamuk dalam mengisap darah yaitu atraktan yang menempel pada membran parafilm-M. Atraktan pada kulit akan menempel pada membran parafilm-M ketika digosokan ke kulit. Membran parafilm-M yang akan dipergunakan untuk *artificial blood feeding*, digosokan ke kulit yang berkeringat. Keringat pada kulit akan membantu penempelan atraktan pada parafilm-M. Saat kulit berkeringat, mikroorganisme yang hidup alami pada kulit manusia menghasilkan senyawa kimia yang membantu nyamuk dalam mencari inang untuk mengisap darah. Salah satu atraktan yang dihasilkan yaitu asam laktat.¹⁷

Prevalensi nyamuk kenyang darah yang terinfeksi virus dengue mencapai 20,83% dari jumlah total nyamuk kenyang darah 24 ekor dan jumlah nyamuk kenyang darah yang positif terinfeksi virus dengue 5 ekor yaitu pada nyamuk *Ae.aegypti* 1, 2, 13, 18, dan 19. Hasil positif deteksi virus dengue menggunakan *real time* RT-PCR, ditentukan oleh nilai Ct lebih dari 0 dan kurang dari 40 serta jenis kurva merupakan kurva amplifikasi yang valid. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2. Pada kelima ekor nyamuk yang positif terinfeksi virus dengue, memiliki nilai Ct lebih dari 30. Nilai Ct yang tinggi menunjukkan titer virus dengue yang rendah, sebaliknya nilai Ct yang rendah menunjukkan titer virus dengue yang tinggi. Hasil penelitian sebelumnya tentang efikasi sumber makanan darah dan metode *artificial blood feeding* dalam rearing *Ae. aegypti* menunjukkan bahwa tabung konikal konvensional, glycerol, dan Parafilm-M direkomendasikan sebagai Teknik membran feeding yang efektif dan murah.¹⁰ Penelitian berikutnya tentang deteksi transmisi horizontal virus dengue pada nyamuk *wild Ae. aegypti* di kota di Manado menghasilkan 5 sampel positif dari 41 sampel yang diamati dengan uji imunohistokimia.¹⁸ Namun deteksi DNA dan serotipe virus dengue dilakukan dengan teknik RT-PCR di Bogor dengan sampel sejumlah 100, tidak terdeteksi pada sampel nyamuk.¹⁹

Infeksi DENV pada nyamuk dipengaruhi oleh sistem imun yang dimiliki oleh nyamuk dalam melawan DENV dan respon imun setiap nyamuk dalam melawan virus berbeda setiap individunya. Virus masuk bersama dengan darah yang dihisap kemudian akan masuk dan menginfeksi sel epitel pada *midgut*. Pada *midgut* virus akan melewati *peritrophic matrix* sebagai pertahanan fisik

nyamuk. Kemudian virus akan tersebar ke seluruh tubuh melalui *hemolymph*. Virus akan melewati sistem imun selular seperti fagositosis oleh hemosit dan sistem imun humoral dengan penghambatan replikasi virus oleh peptida antimiroba. Virus menyebar melalui *hemolymph* kemudian akan menginfeksi bagian lain seperti *fat body*, kepala dan kelenjar ludah.²⁰ Deteksi DENV pada *Ae. aegypti* bisa dilakukan ketika DENV sudah berkembangbiak dalam tubuh nyamuk sehingga jumlah virus yang ada cukup tinggi untuk bisa dideteksi, terutama menggunakan metode RT-PCR. Dalam penelitian ini, nyamuk yang terinfeksi DENV secara artificial bisa dideteksi keberadaan virusnya setelah 7 hari pemeliharaan.

Keuntungan utama dari penggunaan membrane parafilm dan tabung conical plastic seperti pada penelitian ini di antaranya kemudahan untuk membuat *blood feeder* tsb, dibandingkan dengan penggunaan *glass feeder* atau teknologi yang lebih canggih yakni Hemotek yang terkadang sulit didapatkan dan mahal harganya. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan alternatif metode *blood feeding* yang sederhana dan dapat digunakan di Indonesia.

KESIMPULAN

Blood feeding nyamuk menggunakan parafilm dan tabung conical terbukti dapat diaplikasikan untuk pemberian pakan darah nyamuk di Indonesia dan juga dapat digunakan sebagai cara untuk menginfeksi virus dengue ke nyamuk. Positivitas nyamuk *Ae. aegypti* yang mengisap darah yaitu 34,78 %. Positivitas nyamuk *Ae. aegypti* yang mengisap darah pada setiap pemberian pakan darah paling tinggi mencapai 66,67% dengan lama puasa 17 jam. Sedang positiivitas nyamuk kenyang darah yang terinfeksi virus dengue yaitu 20,83%. Keberhasilan *artificial blood feeding* membran Parafilm-M ditentukan oleh waktu pemberian pakan, lama puasa, dan atraktan dari manusia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kami sampaikan kepada LPPM Universitas Jenderal Soedirman yang mendanai penelitian ini dan Laboratorium Dengue, Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta yang telah membantu kegiatan penelitian ini, serta Loka Litbang P2B2 Ciamis, Jawa Barat yang telah menyediakan telur nyamuk *Ae. aegypti*.

KONTRIBUSI PENULIS

Peran penulis pada artikel ini yaitu ESK sebagai kontributor utama. MFS, RTS, dan ER sebagai kontributor anggota. Kontribusi penulis dapat dilihat pada rincian berikut:

Konsep	: ESK
Kurasi Data	: ESK, RTS
Analisis Data	: RTS, MFS
Investigasi	: MFS
Metodologi	: ESK, RTS
Manajemen Proyek	: ESK, ER
Sumber Daya	: ESK, RTS, MFS
Pemrograman	: ESK, RTS
Pengawasan	: ESK, RTS
Validasi	: ESK, RTS
Visualisasi	: ER
Menulis-Pembuatan Draft	: ESK
Menulis-Mengkaji & Mengedit	: ESK

DAFTAR RUJUKAN

1. Andrew J, Bar A. Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Adult Mosquito. 2013; 3 (1) : 52-69.
2. Nikbakhtzadeh MR, Buss GK, Leal WS, Oliveira PL. Toxic Effect of Blood Feeding in Male Mosquitoes. 2016; 7 (January): 1-7.
3. Crawford JE, Alves JM, Palmer WJ, Day JP, Sylla M, Ramasamy R, et al. Population genomics reveals that an anthropophilic population of *Aedes aegypti* mosquitoes in West Africa recently gave rise to American and Asian populations of this major disease vector. 2017; 1-16.
4. Nations U. Guidelines For Routine Colony Maintenance. 2017; 1-18.
5. Ote M, Kanuka H. A highly secure method for rearing *Aedes aegypti* mosquitoes. 2018; 1-7.

6. Tan C, Wong PJ, Li MI, Yang H, Chong C, Lee LK, et al. Membrane feeding of dengue patient's blood as a substitute for direct skin feeding in studying Aedes -dengue virus interaction. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016; 1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1469-6>
7. Gunathilaka N, Ranathunge T, Udayanga L, Abeyewickreme W. Efficacy of Blood Sources and Artificial Blood Feeding Methods in Rearing of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) for Sterile Insect Technique and Incompatible Insect Technique Approaches in Sri Lanka. *Biomed Res Int*. 2017; 2017.
8. Luo Y. A novel multiple membrane blood-feeding system for investigating and maintaining Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes. *J Vector Ecol*. 2014; 39 (2): 271–7.
9. Resnik DB. DISEASE-RESISTANT MOSQUITOES. 2015; 14 (1): 37–46.
10. Costa-da-Silva AL, Navarrete FR, Salvador FS, Karina-Costa M, Ioshino RS, Azevedo DS, et al. Glytube: a conical tube and parafilm M-based method as a simplified device to artificially blood-feed the dengue vector mosquito, Aedes aegypti. Costa-da-Silva AL, Navarrete FR, Salvador FS, Karina-Costa M, Ioshino RS, Azevedo DS, et al. Glytube: a conic. *PLoS One*. 2013; 8 (1): e53816.
11. Sasmono RT, Aryati A, Wardhani P, Yohan B, Trimarsanto H, Fahri S, et al. Performance of Simplexa dengue molecular assay compared to conventional and SYBR green RT-PCR for detection of dengue infection in Indonesia. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e103815.
12. Baughman T, Peterson C, Ortega C, Preston SR, Paton C, Williams J, et al. A highly stable blood meal alternative for rearing Aedes and Anopheles mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11 (12): e0006142.
13. Culicidae D. Multiple Blood Feeding and Host-Seeking Behavior in Aedes Multiple Blood Feeding and Host-Seeking Behavior in Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera : Culicidae). 2013; (July).
14. Cator LJ, Pietri JE, Murdock CC, Ohm JR, Lewis EE, Read AF, et al. Immune response and insulin signalling alter mosquito feeding behaviour to enhance malaria transmission potential. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2015; (March): 1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep11947>
15. Sylvestre G, Gandini M, Maciel-de-freitas R. Age-Dependent Effects of Oral Infection with Dengue Virus on Aedes aegypti (Diptera : Culicidae) Feeding Behavior , Survival , Oviposition Success and Fecundity. 2013; 8 (3): 1–8.
16. Ngugi HN, Mutuku FM, Ndenga BA, Musunzaji PS, Mbakaya JO, Aswani P, et al. Characterization and productivity profiles of Aedes aegypti (L .) breeding habitats across rural and urban landscapes in western and coastal Kenya. 2017; 1–12.
17. Gonzales KK, Rodriguez SD, Chung H, Kowalski M, Vulcan J, Moore EL, et al. The Effect of SkitoSnack, an Artificial Blood Meal Replacement , on Aedes aegypti Life History Traits and Gut Microbiota. 2018; (March): 1–14.
18. Trovancia G. Deteksi transmisi virus dengue pada nyamuk wild Aedes Aegypti betina di Kota Manado. 2016; 4.
19. Fadilla Z, Hadi UK, Setiyaningsih S. Bioekologi vektor demam berdarah dengue (DBD) serta deteksi virus dengue pada Aedes aegypti (Linnaeus) dan Ae. albopictus (Skuse) (Diptera : Culicidae) di kelurahan endemik DBD Bantarjati , Kota Bogor Bioecology of dengue haemorrhagic fever vectors and dengue virus. 2015; 12 (1): 31–8.
20. Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. 2015; 3741–67.

