

**PEMERIKSAAN VIRUS DENGUE-3 PADA NYAMUK *Aedes aegypti* YANG
DIINFEKSI SECARA INTRATHORAKAL DENGAN TEKNIK
IMUNOSITOKIMIA MENGGUNAKAN ANTIBODI DSSE10**

*Dyah Widiastuti**, *Sitti Rahmah Umniyati***, *Nastiti Wijayanti****

ABSTRACT

Dengue viruses, globally the most prevalent arboviruses, are transmitted to humans by persistently infected Aedes mosquitoes. The most important vector of Dengue virus is the mosquito Ae. aegypti, which should be the main target of surveillance and control activities. Virologic surveillance for dengue viruses in its vector has been used as an early warning system to predict outbreaks. Detection of Dengue virus antigen in mosquito head squash using immunocytochemical streptavidin biotin peroxidase complex (SBPC) assay is an alternative method for dengue vector surveillance. The study aimed to develop immunocytochemical SBPC assay to detect Dengue virus infection in head squash of Ae. aegypti. The study design was experimental. Artificially-infected adult Ae. aegypti mosquitoes of DENV 3 were used as infectious samples and non-infected adult Ae. aegypti mosquitoes were used as normal ones. The immunocytochemical SBPC assay using monoclonal antibody DSSE10 then was applied in mosquito head squash to detect Dengue virus antigen. The results were analyzed by descriptive analysis. The immunocytochemical SBPC assay can detect Dengue virus antigen in mosquito head squash at day 2 postinfection. There are some false positive results found in immunocytochemical SBPC assay.

Key Word: Dengue, immunocytochemistry, DSSE10

PENDAHULUAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu penyakit infeksi yang masih menjadi permasalahan kesehatan di Indonesia. Kasus DBD dilaporkan pertama kali di Indonesia pada tahun 1968 di Surabaya dan Jakarta. Jumlah kasus yang dilaporkan pada waktu itu adalah sebanyak 58 kasus dengan *Case Fatality Rate* (CFR) mencapai 41%¹.

Penyakit ini disebabkan oleh virus *Dengue* yang terdiri dari empat serotipe yaitu *Dengue-1*, *Dengue-2*, *Dengue-3* dan *Dengue-4*. *Dengue-3* diketahui merupakan serotipe yang paling dominan di Indonesia. Berdasarkan hasil survei yang dilakukan pada tahun 1985 di enam kota di Indonesia yaitu Medan, Jakarta, Yogyakarta, Pontianak, Ujung Pandang dan Manado, diketahui bahwa selama periode 1984-1985 dapat diteliti 512 penderita dari keenam kota tersebut, dimana 286 penderita menunjukkan *Haemagglutination Inhibition* (H.I.) test positif. Virus Dengue dapat diisolasi dari 59 orang yang menunjukkan H.I. positif yaitu: 50 % *Dengue-3*; 30 % *Dengue-2*, dan 20% *Dengue-1*, sementara *Dengue-4* tidak terisolasi pada periode ini. Selain itu, *Dengue-3* ditemukan paling

banyak berhubungan dengan kasus-kasus berat².

Vektor utama penular penyakit DBD adalah nyamuk *Aedes aegypti* dan *Ae. albopictus*, namun yang paling berperan dalam penularan adalah nyamuk *Ae. aegypti* karena perilakunya yang senang hidup di dalam dan sekitar rumah, sehingga lebih banyak kontak dengan manusia. Adapun *Ae. albopictus* lebih senang beraktivitas di luar rumah seperti di kebun-kebun, sehingga lebih jarang kontak dengan manusia³.

Surveilans vektor DBD penting dilakukan sebagai salah satu usaha pengendalian penyakit DBD. Namun selama ini kegiatan surveilans vektor DBD masih dititik beratkan pada survei larva. Sedangkan survei nyamuk dewasa yang dilanjutkan dengan pemeriksaan virus Dengue di tubuh nyamuk masih jarang dilakukan. Dengan mengetahui keberadaan virus di tubuh nyamuk vektor maka dapat dijadikan landasan pada Sistem Kewaspadaan Dini (SKD) yang efektif untuk mencegah terjadinya KLB DBD⁴.

Metode yang sering digunakan untuk deteksi virus pada nyamuk antara lain dengan *Indirect Fluorescent Antibody* (IFA) test pada jaringan nyamuk, biasanya otak, kelenjar saliva atau sediaan pencet

* *Laboratorium Bakteriologi Balai Ltbang P2B2 Banjarnegara*

** *Laboratorium Parasitologi FK UGM*

** *Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Biologi UGM*

kepala (*head squash*). Kelemahan dari metode ini adalah preparatnya tidak disimpan dalam waktu yang lama serta membutuhkan alat yang khusus berupa mikroskop fluoresen untuk proses pengamatannya. Beberapa tahun terakhir, telah dikembangkan metode baru untuk diagnosis virus Dengue yang terbukti berguna yaitu Imunositokimia *Streptavidin Biotin Peroxidase Complex* (SBPC).

Metode Imunositokimia diketahui memiliki sensitifitas yang tinggi sehingga antigen dengan kadar rendah bisa terdeteksi. Metode ini memiliki kelebihan karena tidak memerlukan peralatan khusus, yaitu dapat dilakukan hanya dengan mikroskop cahaya yang banyak tersedia di laboratorium-laboratorium, serta tidak memerlukan keterampilan tertentu. Dengan metode Imunositokimia ini, peneliti dapat mengetahui *sub-cellular compartment* yang mengandung antigen. Metode Imunositokimia menggunakan suatu antibodi yang spesifik terhadap protein antigen tertentu yang diekspresikan pada epitop tertentu⁵.

Sehubungan dengan hal itu, Team Dengue UGM telah berhasil memproduksi antibodi monoklonal terhadap virus Dengue antara lain antibodi yang disekresikan oleh sel hibrid (klon) DSSE10. Antibodi ini termasuk kelas IgG1 dan tidak menunjukkan reaksi silang dengan antigen *Japanese Encephalitis* dan *Chikungunya*⁶.

Pengembangan penemuan antibodi monoklonal DSSE10 terus dilakukan dalam mencari terobosan baru untuk menemukan tes diagnostik infeksi Dengue yang efektif, sederhana dan cepat. Salah satu hal yang dapat menunjang pengembangan tersebut adalah karakterisasi antibodi monoklonal ini. Pada penelitian ini dilakukan evaluasi terhadap teknik Imunositokimia menggunakan antibodi monoklonal DSSE10 untuk deteksi infeksi virus Dengue-3 pada Nyamuk *Ae. aegypti*

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Pada penelitian ini telah disediakan populasi nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi secara intrathorakal⁷ dengan virus Dengue-3 sebagai sampel yang infeksius dan nyamuk *Ae. aegypti* koloni laboratorium sebagai sampel nyamuk normal. Kedua kelompok tersebut dideteksi virus dengue-3 dengan teknik imunositokimia pada bagian caput dari setiap ekor nyamuk.

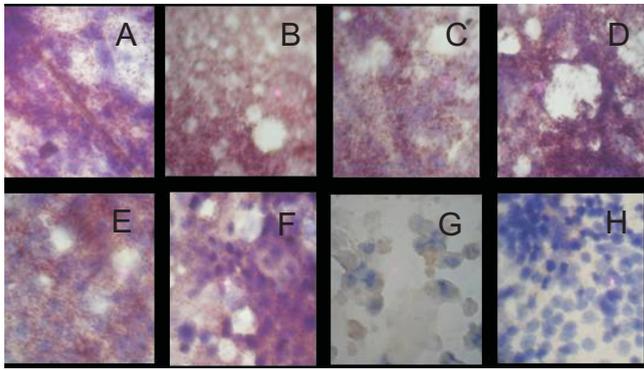
Bagian caput dari setiap nyamuk uji dibuat preparat *head squash*, kemudian difiksasi dengan metanol absolut dingin dan dikeringkan dalam suhu ruang. Setelah kering, preparat dicat dengan metode imunositokimia SBPC. Antibodi primer yang digunakan

adalah antibodi monoklonal DSSE10 1:50. Hasilnya kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya. Uji ini menggunakan sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue-3 sebagai kontrol positif, sedangkan kontrol negatif adalah sediaan sel C6/36 yang tidak diinfeksi virus Dengue, sediaan *head squash* dari nyamuk non vektor (*Anopheles vagus*) yang tidak diinfeksi virus Dengue, dan sediaan *head squash* nyamuk yang diinfeksi virus Dengue-3 yang tidak diberi antibodi primer saat pelaksanaan uji imunositokimia SBPC. Hasil uji imunositokimia SBPC pada sediaan *head squash* disebut positif mengandung antigen Dengue jika terdapat butiran-butiran seperti pasir yang berwarna coklat dan tersebar di antara jaringan otak, sedang disebut negatif jika bagian sitoplasma sel jaringan otak berwarna biru atau pucat dan tidak ada butiran pasir berwarna coklat di sekitar sel-sel jaringan otak.

HASIL

Nyamuk *Aedes aegypti* yang berhasil diinfeksi buatan dengan virus Dengue-3 menggunakan metode *intrathoracic injection* (injeksi intrathorakal) pada penelitian ini berjumlah 46 ekor yang selanjutnya digunakan sebagai sampel infeksius. Sedangkan sampel normal yang berasal dari nyamuk *Ae. aegypti* koloni laboratorium yang tidak diinfeksi dengan virus Dengue-3 berjumlah 35 ekor.

Pemeriksaan mikroskopis terhadap sediaan SBPC *head squash* nyamuk *Ae. aegypti* pada penelitian ini dilakukan menggunakan mikroskop elektrik binokuler pada perbesaran 40x, 100x, 400x dan 1000x. Pada penelitian ini antibodi primer yang digunakan (DSSE10) diencerkan pada konsentrasi 1:50, karena berdasarkan hasil optimasi pengenceran antibodi DSSE10 dengan metode IFAT menunjukkan bahwa antibodi ini mampu mengenali antigen Dengue pada sediaan sel C6/36 mulai konsentrasi 1:50⁶. Hasil pemotretan sediaan mikroskopis imunositokimia SBPC *head squash* nyamuk *Ae. aegypti* disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Foto mikroskopis pada perbesaran 100x10 hasil pengecatan menggunakan metode imunositokimia SBPC dengan antibodi primer DSSE10 (1:50) memperlihatkan reaksi positif pada nyamuk *Ae.aegypti* yang diinfeksi virus Dengue-3 dengan masa inkubasi 2 hari (A), 3 hari (B), 4 hari (C), 5 hari (D), 6 hari (E) 7 hari (F) serta kontrol positif yaitu sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue-3 dengan masa inkubasi 4 hari (DSSE10 1:5) (G) dan reaksi negatif pada kontrol negatif nyamuk *Ae.aegypti* yang tidak diinfeksi virus Dengue (H)

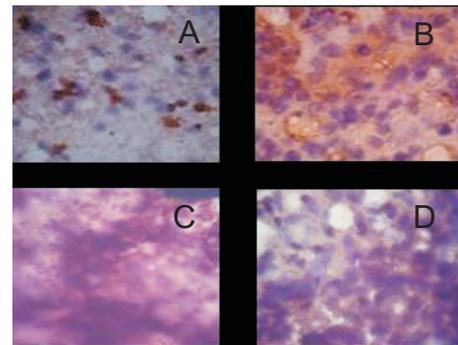
Gambar 1 menunjukkan bahwa pada sediaan *head squash* nyamuk yang diinfeksi virus Dengue-3 terlihat adanya reaksi positif yang berupa butiran-butiran seperti pasir yang berwarna coklat dan tersebar di antara jaringan otak. Sediaan kontrol negatif dan *head squash* nyamuk yang tidak diinfeksi virus Dengue-3 memperlihatkan reaksi negatif berupa sitoplasma sel yang berwarna biru dan tidak ada butiran pasir berwarna coklat di sekitar sel-sel jaringan otak.

Pemeriksaan imunositokimia SBPC dengan antibodi primer DSSE10 (1:50) mampu mendeteksi infeksi virus Dengue-3 mulai masa inkubasi hari ke-2 . Hasil pemeriksaan imunositokimia SBPC pada nyamuk yang diinfeksi virus Dengue-3 disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan Imunositokimia SBPC pada nyamuk *Ae.aegypti* yang diinfeksi intrathorakal dengan virus Dengue-3.

| Inkubasi (hari) | Jumlah sampel | Hasil Imunositokimia SBPC | |
|-------------------|---------------|---------------------------|---------|
| | | Positif | Negatif |
| 0 (nyamuk normal) | 35 | 3 | 32 |
| 1 | 5 | 0 | 5 |
| 2 | 5 | 1 | 4 |
| 3 | 5 | 2 | 3 |
| 4 | 5 | 2 | 3 |
| 5 | 5 | 1 | 4 |
| 6 | 5 | 4 | 1 |
| 7 | 17 | 17 | 0 |

Pada pemeriksaan imunositokimia dalam penelitian ini juga ditemukan beberapa sediaan yang menunjukkan hasil positif palsu (Tabel 1), yaitu sediaan *head squash* dari nyamuk yang tidak diinfeksi virus Dengue-3 namun menunjukkan imunoreaksi positif. Meskipun demikian, secara detil sediaan *head squash* yang memperlihatkan hasil positif palsu tetap dapat dibedakan dengan sediaan yang positif mengandung antigen. Sediaan yang menunjukkan hasil positif palsu disajikan dalam Gambar 2.



Gambar 2. Foto mikroskopis pada perbesaran 100x10 sediaan *head squash* yang menunjukkan hasil positif palsu dari nyamuk yang tidak diinfeksi virus Dengue (A);(C), dan positif antigen dari nyamuk yang diinfeksi virus Dengue dengan masa inkubasi 7 hari (B);(D).

Gambar 2 di atas memperlihatkan bahwa pada sediaan A, juga terdapat bercak-bercak berwarna coklat yang seolah-olah merupakan imuno reaksi positif dari antigen Dengue. Namun bila dibandingkan dengan sediaan B, dapat teramati bahwa bercak coklat pada sediaan A tidak terdapat pada lapisan yang sama dengan sel jaringan otak. Berbeda dengan sediaan B, dimana bercak coklat yang timbul terlihat menempel dengan sel-sel jaringan otak. Sedangkan pada Gambar 2C warna granula coklat yang timbul terlihat tidak spesifik sebagaimana yang timbul pada sediaan yang positif antigen pada gambar 2D.

Pembahasan

Deteksi antigen Dengue pada sediaan *head squash* pertama kali dikembangkan oleh Rosen dan Gubler⁷ dengan berbasis *direct fluorescensce antibody technique* (DFAT). Hasil positif antigen Dengue dapat berupa gambaran granula fluorescens yang menyebar dan adanya fluorescens kehijauan di bagian sitoplasma sel otak. Pada penelitian ini deteksi antigen Dengue-3 pada sediaan *head squash* dilakukan dengan metode imunositokimia SBPC. Gambaran positif antigen yang dihasilkan antara lain berupa granula-granula coklat yang menyebar di sekitar sel-sel otak⁶.

Deteksi antigen Dengue-3 dengan metode imunositokimia SBPC ini menggunakan organ caput dari nyamuk *Ae.aegypti*. Hal yang mendasari adalah adanya reseptor untuk virus Dengue pada sel-sel yang berada di organ caput nyamuk dari genus *Aedes*. Mendoza mengemukakan bahwa dari hasil penelitiannya diketahui reseptor spesifik untuk virus Dengue, yang berupa protein dengan berat molekul 45 kDa ditemukan pada organ caput, thorax dan abdomen dari nyamuk *Ae.aegypti*.⁸

Pada uji imunositokimia SBPC yang dilakukan di penelitian ini, antigen Dengue-3 yang terlokalisir di sel-sel jaringan otak akan berikatan dengan antibodi monoklonal anti dengue DSSE10. Uji klasifikasi berdasarkan metode ELISA menunjukkan bahwa antibodi monoklonal DSSE10 termasuk klas IgG1. Antibodi ini menunjukkan imunoreaktivitas yang kuat terhadap antigen Dengue-1, Dengue-2, Dengue-3, dan Dengue-4, dan tidak menunjukkan reaksi silang dengan antigen *Japanese encephalitis*, maupun antigen Chikungunya berdasarkan metode ELISA⁶.

Adanya antibodi DSSE10 yang berikatan dengan antigen Dengue-3 ini akan dikenali oleh antibodi sekunder berlabel biotin. Selanjutnya dengan penambahan konjugat streptavidin yang dilabel enzim horse radish peroxidase dan larutan substrat kromogen, maka antigen tersebut dapat terdeteksi dengan munculnya granula berwarna kecoklatan di sekitar sel

yang terinfeksi.

Nyamuk betina dewasa dapat terinfeksi virus dari manusia selama aktivitas *blood feeding*. Virus yang teringesti oleh nyamuk betina pertama kali akan bereplikasi di *midgut* kemudian menuju ke *hemocoel* dan *hemolymph* yang memiliki akses ke jaringan nyamuk yang lain. Selanjutnya, virus akan bereplikasi di kelenjar saliva dan setelah beberapa hari nyamuk yang terinfeksi tersebut akan menularkan virus ke manusia yang lain selama proses *blood feeding* berikutnya (Leake).

Hasil positif antigen Dengue-3 dengan deteksi imunositokimia SBPC mulai dapat terlihat pada inkubasi hari ke-2. Hal ini menunjukkan bahwa imunositokimia SBPC dengan antibodi DSSE10 (1:50) dapat mendeteksi antigen Dengue pada nyamuk *Ae.aegypti* secara lebih awal sebelum siklus hidup virus dalam tubuh nyamuk berlangsung secara sempurna. Foote menyatakan bahwa virus Dengue memerlukan masa inkubasi paling sedikit 8 hari di dalam tubuh nyamuk sebelum dapat ditularkan dalam bentuk yang virulen kepada inang manusia.

Pada penelitian ini hasil positif palsu yang ditemukan tidak terlalu banyak (Tabel 1), namun timbulnya hasil positif palsu tetap harus diperhatikan dan dikaji secara lebih dalam untuk menghindari kesalahan dalam identifikasi sediaan hasil pewarnaan imunositokimia. Hasil positif palsu pada uji imunositokimia dapat terjadi karena beberapa faktor, yang pertama adanya reaksi warna yang tidak spesifik yang disebabkan oleh keberadaan peroksidase endogen yang dihasilkan oleh jaringan dan sel normal¹⁰. Pada penelitian ini telah dilakukan usaha meminimalisasi reaksi tersebut dengan menambahkan *peroxidase blocking solution* untuk menghilangkan aktivitas peroksidase endogen, namun kemungkinan pada beberapa sampel aktivitas peroksidase endogen belum dapat dihilangkan sepenuhnya.

Faktor kedua, yang mungkin menjadi penyebab hasil positif palsu, adalah terjadinya ikatan yang tidak spesifik antara komponen streptavidin dengan biotin endogen yang terdapat pada sel^{11,12,13}. Biotin merupakan vitamin yang berperan sebagai koenzim dan terlibat dalam transfer CO₂. Ziegler menyatakan bahwa enzim yang mengandung biotin ditemukan dalam sel-sel neurosekretori pada *corpora cardiaca* dan di otak serangga.

Faktor ketiga yang kemungkinan berpengaruh pada timbulnya hasil positif palsu adalah faktor pencucian. Sediaan *head squash* nyamuk cenderung lebih tebal dan banyak terkontaminasi oleh artifak dari sisa-sisa jaringan, berbeda dengan sediaan apus darah dan kultur sel yang monolayer. Sehingga untuk preparat *head squash* mungkin membutuhkan durasi waktu pencucian

yang lebih lama untuk menghindari timbulnya hasil positif palsu.

Selama ini, surveilan vektor Dengue khususnya di Indonesia hanya didasarkan pada indeks entomologis, sedangkan deteksi virus pada vektor belum banyak dikembangkan. Di sisi lain, deteksi virus Dengue pada tubuh vektor sebetulnya merupakan salah satu bagian yang penting dalam kegiatan survei epidemiologi penyakit Demam Berdarah Dengue.

Uji imunositokimia SBPC dengan antibodi DSSE10 dapat dijadikan salah satu metode deteksi virus pada spesies vektor virus Dengue. Metode ini terbukti akurat dan handal serta memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi untuk mendeteksi virus Dengue-3 pada nyamuk *Ae. aegypti*. Pemeriksaan ini juga relatif lebih mudah dan murah, serta dapat dilakukan di laboratorium sederhana.

Dengan mengetahui tingkat kepadatan dan juga *infection rate* vektor Dengue di suatu area diharapkan dapat membantu dalam menentukan potensi penularan virus Dengue di area tersebut. Selain itu dengan mengetahui *infection rate* pada spesies vektor Dengue juga dapat digunakan sebagai panduan dalam menyusun Sistem Kewaspadaan Dini untuk mencegah KLB Demam Berdarah Dengue.

Kesimpulan

Dari uraian di atas dapat dinyatakan bahwa teknik imunositokimia menggunakan antibodi DSSE10 mampu mendeteksi antigen virus Dengue-3 pada nyamuk *Aedes aegypti* yang diinfeksi secara intrathorakal. Antigen virus Dengue-3 dapat terdeteksi mulai hari ke-2 pasca inokulasi.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kemungkinan penyebab positif palsu misalnya dengan penambahan *biotin blocking kit* atau menambah durasi pencucian pada waktu proses pewarnaan sediaan *head squash*.

Daftar pustaka

1. World Health Organization. Vector Control for Containment of Epidemics. WHO Regional Office for South-East Asia. 2001
2. Wuryadi, S. Surveillance Virus Dengue di Beberapa Kota di Indonesia. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Departemen Kesehatan. Jakarta. 2004
3. Sungkar S. Bionomik *Aedes aegypti*, vektor Demam Berdarah Dengue. Majalah Kedokteran Indonesia; 4 (55): 384-389. 2005.

4. Samuel, P.P and Tyagi, B.K., Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. *Indian J Med Res* 123: 615-628. 2006
5. Haematological Malignancy Diagnosis Service (HMDS). Histology and Immunocytochemistry. Available from: www.hmhs.org.uk/histology.html. 2003.
6. Ummiyati, S.R., Teknik Imunositokimia dengan Antibodi Monoklonal DSSC7 untuk Kajian Patogenesis Infeksi dan Penularan Transovarial Virus Dengue serta Surveilansi Virologis Vektor Dengue, Disertasi untuk derajat Doktor dalam Ilmu Kedokteran, Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2009.
7. Rosen, L., and D.J. Gubler. The use of mosquitoes to detect and propagate Dengue viruses. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 21:1153-1160. 1974.
8. Mendoza, MY., Benito, J.S.S., Mendoza, H.L., Martinez, S.H. and Del Angel, R.M. A Putative Receptor for Dengue Virus in Mosquito Tissue: Localization of a 45-KDA Glycoprotein. *Am.J.Trop.Med. Hyg*; 67(1): 76-84. 2002.
9. Leake, C.J. 1992. Arbovirus-vector interactions and vector specificity. *Parasitol. Today.* (8): 123-7
10. Taylor, C.R., and Shi, S.R. Practical issues: fixation, processing and antigen retrieval. In: C.R. Taylor and Richard J.C. (ed.), *Immunomicroscopy A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist*, 3rd edition, p. 71-74. Elsevier Inc, Philadelphia, USA. 2006.
11. Miller, R.T. True positive vs. false positive staining. *The Focus Immunohistochemistry.* p. 1-2. 2001.
12. Mount, S.L., and Cooper, K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagn Pathol.* 7: 161-167. 2001.
13. Singh, A.P. Use of immunohistochemistry. Available from : <http://boneandspine.com/musculoskeletalpathology/immunohistochemistry/>. 2008.