

DETEKSI TRANSMISI TRANSOVARIAL VIRUS DEN-3 PADA NYAMUK *Aedes aegypti* DENGAN TEKNIK IMUNOSITOKIMIA MENGGUNAKAN ANTIBODI DSSE10

Tri Wahono^{1*}, Sitti Rahmah Umniyati²

¹ Loka Litbangkes Pangandaran, Jl. Raya Pangandaran Km.3, 46396, Pangandaran, Indonesia

² Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Jl. Farmako Sekip Utara, 55281, Yogyakarta., Indonesia

Abstract

*Transovarial transmission is a phenomenon as a supporting factor for the maintenance the presence of dengue virus in an area. Vector surveillance is an effort to control dengue disease. In addition to larvae surveillance, viral surveillance carried out on adult *Ae. aegypti* mosquitoes can actually be used for early warning systems for dengue outbreaks. DEN 3 virus antigen detection using streptavidin biotin peroxidase complex (SPBC) immunocytochemical technique is an alternative method for vector surveillance. The study aimed to prove the existence of transovarial transmission by detecting DEN 3 virus antigen in F1 generation mosquitoes from *Ae. aegypti* which has been infected orally. The study design was experimental. Adult *Ae. aegypti* female is infected with DEN 3 virus orally then mosquitoes are allowed to run their gonotrophic cycle. The resulting egg was colonized until becoming adult mosquitoes and DEN 3 virus antigen was detected. Antigen detection using SPBC immunocytochemical technique with DSSE10 monoclonal antibody on mosquito head squash preparation in 4 and 16 days old mosquitoes. The results were analyzed descriptively. Streptavidin biotin peroxidase complex (SBPC) immunocytochemical technique can detect DEN 3 virus antigens indicated by the presence of brown color in the head squash preparation. The presence of the DEN 3 virus antigen also proves the presence of transovarial transmission in infected *Ae. aegypti* mosquitoes which has been infected orally.*

Keywords: *Transovarial, dengue, immunocytochemical, head squash, DSSE10.*

TRANSOVARIAL TRANSMISSION DETECTION OF DEN 3 VIRUS IN *Aedes aegypti* MOSQUITOES WITH IMMUNOCYTOCHEMICAL TECHNIQUE USING DSSE10 ANTIBODY

Abstrak

Transmisi transovarial merupakan fenomena yang berpotensi sebagai faktor pendukung pemeliharaan keberadaan virus dengue di suatu wilayah. Surveilans vektor merupakan upaya yang dilakukan untuk pengendalian penyakit demam berdarah dengue (DBD). Selain surveilans larva, surveilans virus yang dilakukan pada nyamuk dewasa *Ae. aegypti* sebenarnya dapat digunakan untuk sistem kewaspadaan dini terjadinya kejadian luar biasa (KLB) DBD. Deteksi antigen virus DEN-3 menggunakan teknik imunositokimia *streptavidin biotin peroxidase complex* (SPBC) merupakan salah satu alternatif metode untuk surveilans vektor. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan adanya transmisi transovarial dengan cara mendeteksi antigen virus DEN-3 pada nyamuk generasi F1 dari *Ae. aegypti* yang telah diinfeksi secara per oral. Jenis penelitian adalah eksperimental. *Aedes aegypti* betina dewasa diinfeksi virus DEN-3 secara per oral kemudian nyamuk dibiarkan menjalankan siklus gonotropiknya. Telur yang dihasilkan dikolonisasi dan dilakukan deteksi antigen virus DEN-3. Deteksi antigen menggunakan teknik imunositokimia SPBC dengan antibodi monoklonal DSSE10 pada sediaan *head squash* nyamuk *Ae. aegypti* berumur 4 dan 16 hari. Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif. Teknik imunositokimia SBPC dapat mendeteksi antigen virus DEN-3 ditunjukkan

dengan adanya warna coklat pada sediaan *head squash*. Keberadaan antigen virus DEN-3 ini juga membuktikan adanya transmisi transovarial pada nyamuk *Ae aegypti* yang diinfeksi secara per oral.

Kata Kunci: Transovarial, dengue, imunositokimia, *head squash*, DSSE10

Naskah masuk: 10 Agustus 2018; Review tanggal 22 November 2018; Layak Terbit: tanggal 27 November 2018

*Alamat korespondensi penulis pertama : triwahono1983@gmail.com; Telp/Faks: 081219529465

PENDAHULUAN

Penyakit DBD adalah penyakit yang disebabkan oleh virus dengue yang tergolong *arthropod-borne virus*, genus *Flavivirus*, dan famili *Flaviviridae*. Nyamuk *Aedes aegypti* dikenal sebagai vektor utama dan *Ae. albopictus* sebagai vektor sekunder. Berdasarkan sifat antigenisitasnya virus terdiri dari 4 serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4.¹ Virus dengue tersebar di seluruh dunia, serotipe DEN 1,2,3,4 semakin bercampur mengikuti mobilitas manusia. Semua serotipe virus dengue masih endemis di Indonesia dengan serotipe DEN-3 yang paling dominan disusul DEN-2, DEN-1 kemudian DEN-4. Serotipe DEN-2 dan DEN-3 merupakan serotipe yang banyak berhubungan dengan kasus-kasus berat. Di Pulau Jawa DEN-3 merupakan serotipe yang paling dominan.²

Upaya pengendalian DBD sampai saat ini masih tergantung pada pengendalian vektor karena belum ditemukannya terapi kausa yang efektif dan vaksin untuk pencegahan DBD. Pengendalian nyamuk *Ae. aegypti* merupakan hal yang penting dalam pencegahan DBD karena nyamuk ini bisa menjadi *reservoir* maupun *amplifier host* bagi virus dengue.³

Virus dengue mempertahankan keberadaannya di alam melalui dua mekanisme yaitu transmisi horizontal antara vertebrata viremia yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes* dan dengan transmisi vertikal (transovarial) yaitu dari nyamuk betina infeksi ke generasi berikutnya.⁴ Transmisi transovarial virus dengue merupakan fenomena yang penting yang menjadi penyebab bertahannya virus dengue selama periode *interepidemic* di alam.⁵ Periode *interepidemic* adalah periode

waktu yang terjadi antara kasus epidemik suatu penyakit. Transmisi transovarial virus dengue juga berperan dalam meningkatkan dan mempertahankan epidemik dengue.⁶ Tidak seperti negara-negara kontinental dimana terjadi pergantian serotipe dengue pada negara kepulauan seperti Indonesia, transmisi transovarial cenderung memainkan peran utama dalam pemeliharaan keberadaan virus dengue di suatu wilayah.²

Surveilans vektor merupakan upaya yang dilakukan untuk pengendalian penyakit DBD. Surveilans yang dilakukan selama ini masih berpaku pada surveilans larva sedangkan untuk surveilans nyamuk dewasa jarang dilakukan. Surveilans virus yang dilakukan pada nyamuk dewasa *Ae. aegypti* sebenarnya dapat digunakan untuk sistem kewaspadaan dini terjadinya kejadian luar biasa (KLB) DBD.

Metode imunofluoresensi pada sediaan *head squash* nyamuk merupakan metode deteksi virus dengue yang pertama kali dikembangkan oleh Rosen dan Gubler pada tahun 1974. Virus dengue terdeteksi secara mikroskopis di bawah mikroskop fluoresen sebagai granula fluoresen yang menyebar di jaringan otak ataupun sebagai cincin fluoresen di bagian sitoplasma sel dengan menggunakan metode ini. Hasil sel yang positif pada infeksi berat (++++) dapat terdeteksi pada perbesaran 100 kali dan lebih dari 100 sel positif per bidang pandang ditemukan pada perbesaran 400 kali. Infeksi lemah (+) hasil positifnya belum dapat terdeteksi pada perbesaran 100 kali dan baru dapat dideteksi pada perbesaran 400 kali.⁷ Kelemahan dari metode ini adalah preparatnya tidak bisa disimpan dalam waktu yang lama serta membutuhkan alat

yang khusus berupa mikroskop fluorescen untuk proses pengamatannya.

Beberapa tahun terakhir ini beberapa metode baru untuk deteksi virus dengue telah dikembangkan. Metode-metode tersebut terbukti berguna untuk diagnosis dengue *reverse transcriptase - polymerase chain reaction* (RT-PCR) dan imunositokimia *streptavidin biotin peroxidase complex* (SBPC) adalah diantaranya. Metode RT-PCR terbukti cepat dan sensitif dalam mendeteksi adanya virus dengue, serta bermanfaat untuk diagnosis serotipe virus dengue. Metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi RNA virus pada sampel penderita suspek dengue, jaringan autopsi, maupun nyamuk vektor. Kelemahan dari metode ini adalah perlu penanganan khusus untuk ekstraksi RNA, membutuhkan alat yang mahal berupa PCR dan elektroforesis, serta hasil positif palsu bila penanganan preparat kurang teliti.

Teknik imunositokimia SBPC merupakan metode yang menggunakan antibodi sekunder yang dilabel biotin yang dapat mengenal antibodi primer (monoklonal atau poliklonal) dan menggunakan konjugat *streptavidin* yang dilabel enzim *horseradish peroxidase* serta campuran substrat kromogen untuk mendeteksi antigen pada sel atau jaringan dengan sensitifitas yang sangat tinggi, sehingga antigen dengan kadar rendahpun bisa terdeteksi. Teknik imunositokimia SBPC dapat mendeteksi antigen dalam jaringan secara mikroskopis hanya dengan mikroskop cahaya. Teknik imunositokimia SBPC telah terbukti memberikan reaksi spesifik, peka, sah, dan terandalkan untuk mendeteksi virus dengue pada nyamuk *Ae. aegypti* di bawah mikroskop cahaya.^{8,9}

Antibodi primer yang digunakan bisa berbentuk monoklonal ataupun poliklonal. Antibodi monoklonal lebih baik digunakan karena spesifik terhadap antigen tertentu. Antibodi DSSE 10 merupakan antibodi produksi Fakultas Kedokteran UGM. Antibodi DSSE 10 terbukti spesifik terhadap antigen DEN dan tidak bereaksi silang dengan antigen chikungunya. Antibodi DSSE 10 merupakan antibodi hasil dari sel hibridoma fusi antara splenosit mencit imun terhadap antigen DEN-3 strain H-87 dengan

sel myeloma NS-1 dalam medium HAT (*hypoxanthine, aminopterin dan thymidine*).⁹

Teknik imunositokimia SBPC mempunyai berbagai kelebihan dibandingkan dengan teknik diagnostik lainnya. Teknik ini mempunyai sensitifitas yang tinggi sehingga bisa mendeteksi antigen dengan kadar yang rendah. Teknik ini juga tidak memerlukan peralatan khusus dan keahlian tertentu karena hanya menggunakan mikroskop cahaya. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya transaksi transovarial pada nyamuk *Ae. aegypti* yang telah diinfeksi dengan virus DEN-3 secara per oral dengan menggunakan teknik imunositokimia SBPC menggunakan antibodi DSSE10.

METODE

Jenis penelitian adalah penelitian laboratoris dengan rancangan penelitian eksperimental. Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari-Juni 2017. Populasi penelitian adalah seluruh nyamuk *Ae. aegypti* yang telah diinfeksi virus dengue secara per oral. Sampel penelitian adalah telur dan nyamuk dewasa *Ae. aegypti* generasi F1 hasil kolonisasi sampel telur dari nyamuk yang telah diinfeksi virus dengue secara per oral. Sebagai kontrol negatif digunakan nyamuk *Culex quinquefasciatus* sebagai nyamuk non vektor virus dengue.

Konfirmasi serotipe virus dengue

Analisis dengan metode RT-PCR dilakukan untuk konfirmasi serotipe virus yang digunakan. Isolasi RNA virus menggunakan kit ekstraksi RNA *FavorPrep™ Viral Nucleic Acid Extraction Kit II (Favorgen Biotech Inc.)*.

Reaksi RT-PCR dilakukan dengan *kit Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot Start Kit (Thermo Scientific)* dengan tahapan yang digunakan Waggoner. Hasil PCR divisualisasi melalui elektroforesis pada gel agarose 1,5% dengan daya separasi 5 menit pada 50V dan 25 menit pada 100V.¹⁰

Infeksi virus dengue

Infeksi virus dengue dilakukan di laboratorium khusus nyamuk infeksi di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM. Nyamuk yang digunakan adalah nyamuk *Ae. aegypti* lokal yang diperoleh dari daerah Yogyakarta dan telah dibiakkan di laboratorium UGM. Nyamuk *Ae. aegypti* betina yang telah dipuaskan semalam disiapkan dalam kandang nyamuk dan diisi 200 ekor nyamuk. Pakan untuk perlakuan berupa suspensi virus dengue DEN-3, eritrosit orang sehat dan sukrose 10% dengan perbandingan 1:1:1. Suspensi virus dimasukkan tabung *membrane feeding* (kulit mencit segar yang telah dicukur bulunya). Tabung diletakkan dengan posisi terbalik dan menempel ke dalam kasa sehingga nyamuk dapat menghisapnya. Setelah nyamuk cukup kenyang (kurang lebih 3 jam), tabung diambil dan *membrane feeding* yang digunakan di bakar. Hari berikutnya sangkar diberi kapas yang telah diresapkan pada larutan sukrosa 10%. Setelah itu dimasukkan bejana plastik yang telah diberikan air dan ditempel *ovistrip* untuk tempat peletakkan telur. *Ovistrip* dipasang selama kurang lebih 1 minggu.

Pemeliharaan nyamuk

Telur nyamuk *Ae. aegypti* hasil infeksi virus dengue secara per oral dilakukan kolonisasi untuk mendapatkan nyamuk dewasa *Ae. aegypti*. Proses penetasan telur dilakukan dengan cara memasukkan *ovistrip* ke dalam nampan yang berisi air. Telur ditunggu beberapa hari hingga menjadi larva. Pemeliharaan larva dilakukan dalam wadah berupa nampan ukuran 20 x 12,5 x 5 cm dengan kedalaman air lebih kurang 2 cm. Untuk mempertahankan *survival* larva, maka ke dalam nampan diberikan pakan larva yang berupa pelet hati ayam yang dipipihkan, dikeringkan dan disimpan dalam lemari pendingin. Setelah larva menjadi pupa, kemudian pupa dipindahkan dengan pipet bermulut lebar ke dalam sebuah mangkok plastik dan diletakkan dalam sangkar nyamuk hingga nyamuk menjadi dewasa. Setelah nyamuk menjadi dewasa, nyamuk dipelihara dalam sangkar ukuran 35 x 35 x 35 cm dan diberi larutan air sukrose 10% sebagai pakan.

Pembuatan preparat *head squash*

Nyamuk dewasa generasi F1 (umur 4 dan 16 hari) hasil kolonisasi masing-masing 30 ekor dibuat sediaan *head squash*. Sebanyak 10 ekor nyamuk *Culex quinquefasciatus* digunakan sebagai kontrol negatif. Kepala nyamuk dipisahkan dengan menggunakan jarum bedah nyamuk pada kaca preparat. Kepala diletakkan di atas kaca preparat yang telah dilapisi *Poly-L-Lysine* masing-masing 10 kepala tiap preparat. Dengan kaca preparat lain kepala ditekan-tekan dengan menggunakan pensil yang ada penghapusnya. Kaca preparat penutup dan jaringan kasar diambil kemudian dimasukkan ke dalam botol yang berisi alkohol 70%. Preparat dibiarkan mengering pada suhu kamar (25°C) kurang lebih 30 menit. Preparat difiksasi dengan aseton dingin (-20°C) di dalam *freezer* selama 3-5 menit kemudian dikeringkan di *laminar flow hood*. Preparat *head squash* siap untuk diwarnai.

Pewarnaan imunositokimia SBPC

Pewarnaan imunositokimia menggunakan metode yang dikembangkan oleh Umniyati (2009).⁹ kit *Starr Trek Universal HRP Detection Biocare Medical Cat. No. 1 800 799 9499*. Sediaan *head squash* diletakkan di atas rak pewarnaan kemudian difiksasi dengan metanol dingin (-20°C) selama 3-5 menit. Preparat dicuci dibawah air mengalir kemudian dilanjutkan dicuci dengan PBS. Preparat direndam dalam *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar (25°C) selama 5 menit untuk menghilangkan aktivitas *peroxidase endogen* kemudian dicuci dengan PBS selama 2 menit. Preparat diinkubasikan ke dalam *background sniper (Protein blocker)* selama 15 menit pada suhu kamar (25°C).

Antibodi primer (antibodi monoklonal DSSE 10) diencerkan 1:10. Ditambahkan sebanyak 100 µl per preparat (d disesuaikan sampai semua bagian tergenang) kemudian diinkubasikan pada nampan yang lembab pada suhu kamar (25°C) selama 1 jam. Preparat selanjutnya dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama masing-masing 5 menit.

Trekkie universal link sebanyak 4 tetes ditambahkan per preparat kemudian diinkubasikan pada suhu kamar (25°C)

selama 20 menit. Preparat selanjutnya dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama masing-masing 5 menit.

Preparat ditambahkan dengan *TrekAvidin-HRP* pada suhu kamar (25°C) selama 10 menit. Preparat selanjutnya, dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama masing-masing 5 menit.

Betazoid DAB chromogen sebanyak 1 tetes diencerkan dengan 1 ml *betazoid DAB buffer*. Preparat ditambahkan 4 tetes campuran DAB dan diinkubasikan pada suhu kamar (25°C) selama 2-10 menit (semakin tebal preparat waktu inkubasinya semakin lama). Preparat dicuci dengan air mengalir.

Mayer hematoxylin (counterstain) ditambahkan sebanyak 4 tetes dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 3 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir. Preparat kemudian dicelupkan ke dalam alkohol, dibersihkan dan dicelupkan ke dalam xylol. Preparat selanjutnya ditetesi *mounting media* kemudian ditutup dengan kaca penutup. Setelah kering preparat siap

diperiksa di bawah mikroskop pada perbesaran 400 kali dan 1000 kali.

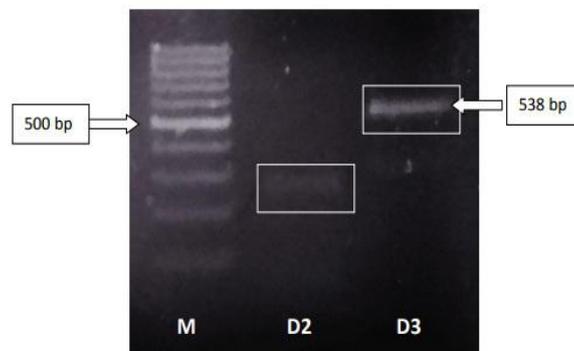
Pemeriksaan mikroskopis

Setelah kering preparat siap diperiksa di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 400 kali dan 1000 kali. Adanya antigen ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada granula dan sitoplasma pada hemosit dari sediaan *head squash*. Hasil negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna coklat atau terlihat warna biru.

HASIL

Uji RT-PCR suspensi virus DEN-3 untuk infeksi per oral.

Suspensi virus DEN-3 yang digunakan didapat dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM. Suspensi virus yang digunakan terdiri dari supernatan kultur sel C6/36 yang telah diinfeksi virus DEN-3. Masa inkubasi virus 6 hari dengan titer 10^6 FFU. Suspensi virus dicampur dengan eritrosit orang sehat dan sukrosa 10% dengan perbandingan 1:1:1. Hasil uji RT-PCR seperti disajikan pada gambar 1.

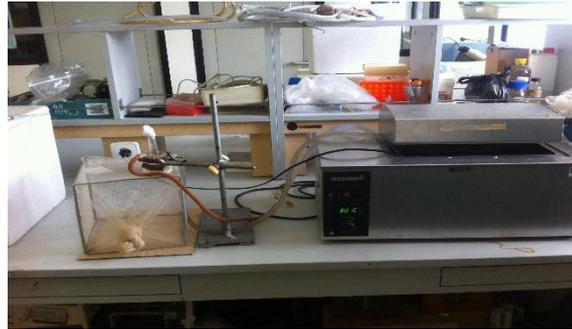


Gambar 1. Hasil uji RT-PCR pada suspensi virus.

Dari hasil uji RT-PCR diperoleh hasil positif virus DEN-3. Pita yang terbentuk sesuai ukuran amplicon untuk DEN-3 yaitu 538 bp. Virus DEN-3 hasil propagasi pada sel C6/36 terkonfirmasi positif dan dapat digunakan untuk infeksi nyamuk *Ae. aegypti*. Infeksi nyamuk dilakukan secara per oral menggunakan metode yang dikembangkan Umniyati.⁹

Infeksi virus DEN-3 secara per oral pada nyamuk *Ae. aegypti*.

Hasil infeksi menunjukkan bahwa dari 200 ekor nyamuk yang diinfeksi virus DEN-3, jumlah nyamuk yang kenyang darah sebanyak 163 ekor, 26 ekor tidak kenyang darah dan 11 ekor mati. Setelah diinkubasikan selama 7 hari nyamuk yang bertahan hidup sebanyak 136 ekor



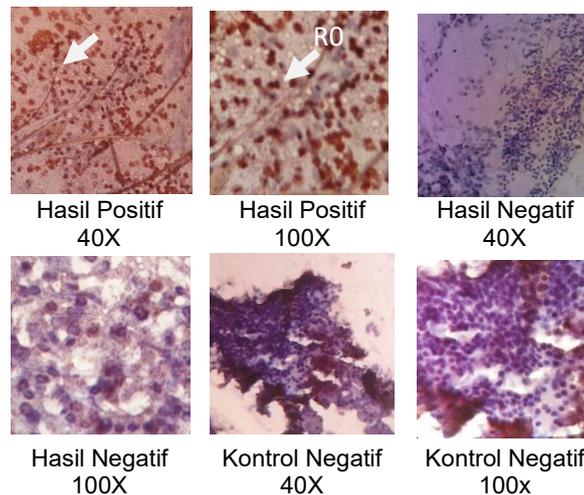
Gambar 2. Infeksi virus DEN-3 pada nyamuk *Ae. aegypti* secara per oral

Pengumpulan telur nyamuk *Ae. aegypti*

Hasil koleksi telur dari empat *ovitrap* yang dipasang masing-masing sebanyak 2247, 2167, 2098 dan 1876 buah telur. Rata-rata jumlah telur yang dihasilkan adalah 52 telur/ekor nyamuk *Ae. aegypti*.

Pemeriksaan mikroskopis

Hasil pemotretan mikroskopis pada sediaan *head squash* nyamuk *Ae. aegypti* dewasa generasi F1 dari telur infeksi disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Gambaran mikroskopis sediaan *head squash* nyamuk *Ae. Aegypti*. R0 : warna coklat pada hemosit (positif)

Deteksi antigen virus DEN-3

Tabel 1. Hasil pemeriksaan antigen DEN-3

Umur nyamuk dewasa	Antigen virus DEN-3			Infection Rate (%)
	Positif	Negatif	Jumlah	
4 hari	10	20	30	33,33
16 hari	12	18	30	40,00

BAHASAN

Deteksi antigen virus DEN-3

Deteksi antigen virus dilakukan dengan pemeriksaan di bawah mikroskop cahaya. Adanya antigen ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada granula dan sitoplasma pada hemosit dari sediaan *head squash*. Hasil negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna coklat atau terlihat warna biru. Hal tersebut sesuai dengan prinsip langkah-langkah dalam pemeriksaan metode imunositokimia.

Rendaman larutan *peroxidase blocking solution* kemudian dicuci dengan PBS berfungsi untuk menghilangkan aktivitas peroksidase endogen. Rendaman *blocking solution* untuk menghindarkan ikatan non spesifik yang mengganggu hasil reaksi. Antigen target kemudian diikat dengan antibodi primer (DSSE 10) yang ditambahkan.

Penambahan antibodi sekunder yang dilabel biotin berfungsi sebagai penghubung antara antibodi primer dengan konjugat *streptavidin-peroxidase*. Konjugat tersebut berfungsi untuk mengikat residu biotin. Penambahan enzim peroksidase dan larutan substrat-kromogen berfungsi memberikan efek warna. Enzim peroksidase akan mengkatalisa substrat, hidrogen peroksida dan mengubah kromogen menjadi deposit warna coklat yang menunjukkan adanya antigen.

Penambahan pewarna hematoxylin untuk menunjukkan hasil negatif. Tidak adanya antigen akan menyebabkan tidak terjadi reaksi dengan reagen sehingga akan mengikat warna biru pada pewarna hematoxylin.¹¹

Deteksi antigen metode imunositokimia pada preparat *head squash* menunjukkan warna coklat pada granula, sitoplasma maupun nukleus hemosit nyamuk *Ae. aegypti*. Berdasarkan mekanisme replikasi, flavivirus seperti virus RNA *strand* positif lainnya melakukan replikasi pada sitoplasma sel inang maupun vektor.¹² Berdasarkan mekanisme replikasi flavivirus pada sitoplasma tersebut seharusnya deteksi antigen virus dengue menunjukkan hasil positif (warna coklat) pada sitoplasma sel (bersifat *cytoplasmic*). Seperti yang disampaikan oleh Rosen dan Gubler bahwa antigen virus dengue ditunjukkan sebagai granula fluoresen yang menyebar di jaringan otak ataupun sebagai cincin fluoresen di bagian sitoplasma sel dengan pemeriksaan imunofluoresensi.⁷

Pada sediaan *head squash* metode imunositokimia selain warna coklat (hasil positif) pada sitoplasma juga ditemukan warna coklat (hasil positif) pada nukleus. Hal ini dikarenakan mekanisme pembuatan preparat yang menggunakan metode *head squash* dilakukan dengan pemencetan preparat sehingga kemungkinan terjadi pecah sel dan cairan sitoplasma menutupi nukleus sehingga menunjukkan warna coklat (hasil positif) pada nukleus.

Derajat infeksi transovarial

Hasil pemeriksaan antigen virus DEN-3 dengan metode imunositokimia SBPC pada sediaan *head squash* nyamuk dewasa *Ae. aegypti* menunjukkan hasil yang positif dengan derajat infeksi transovarial yang bervariasi. Pada sampel nyamuk empat hari diperoleh 33,33% (10 dari 30) sampel positif antigen virus dengue. Sedangkan pada sampel nyamuk umur 16

hari diperoleh 40% (12 dari 30) sampel positif antigen virus dengue.

Transmisi transovarial virus DEN 1-4 telah dibuktikan baik secara laboratorium maupun di alam.^{5,13,14,15} Transmisi transovarial telah dibuktikan baik pada stadium telur, larva dan pupa serta pada stadium nyamuk dewasa *Ae. aegypti*.¹⁶ Transmisi transovarial virus dengue pada nyamuk *Ae. aegypti* dianggap merupakan mekanisme yang sangat penting dalam pemeliharaan dan distribusi virus dengue di alam. Transmisi transovarial merupakan aspek yang sangat penting dalam menjaga virus dengue selama masa *interepidemic* di alam,^{5,14,17} saat kondisi lingkungan tidak memungkinkan untuk terjadinya transmisi horizontal.¹⁸ Umniyati menyatakan bahwa telur-telur yang diletakkan pada akhir musim hujan sebelumnya akan menetas pada awal musim hujan berikutnya, jika telur tersebut berasal dari induk infeksius, maka sebagian telur tersebut berpeluang untuk terinfeksi secara transovarial selama stadium telur yang berlangsung selama berbulan-bulan. Telur yang menetas pada musim hujan berikutnya tersebut berpeluang besar menjadi larva yang infeksius dan selanjutnya menjadi nyamuk yang infeksius virus dengue walaupun belum pernah menggigit dan menghisap darah inang infeksius virus dengue.⁹

Kondisi tersebut berpotensi sebagai faktor pendukung pemeliharaan endemisitas DBD dengan cara pemeliharaan keberadaan virus dengue di suatu wilayah. Nyamuk yang mendapatkan kesempatan untuk menghisap darah inang viraemia sebelum musim kemarau akan meneruskan siklus gonotropiknya dan meletakkan telurnya di suatu tempat. Dalam habitat basah, telur nyamuk tersebut ada yang langsung menetas bila terdapat air. Dalam keadaan habitat hidupnya kering telur masih dapat bertahan hidup antara 3 bulan sampai 1 tahun. Telur itu, akan menetas bila cukup air terutama pada saat musim hujan berikutnya.¹⁹ Telur *Ae. aegypti* mampu bertahan terhadap kekeringan selama 5 bulan pada suhu ruang dengan persentase tetas telur yang menurun setiap bulannya.²⁰

Telur nyamuk *Ae. aegypti* dapat bertahan selama hidup selama masa *interepidemic* dan memulai daur hidup virus antar nyamuk-manusia-nyamuk akan berdampak pada kejadian DBD. Kemampuan nyamuk *Ae. aegypti* mempertahankan dan mentransmisikan virus dengue kepada generasi berikutnya secara transovarial dapat memberikan pola distribusi dan variasi musiman terjadinya insiden DBD pada daerah endemis dengue.

Mekanisme transovarial merupakan fenomena yang penting dalam mempertahankan keberadaan virus selama periode *interepidemic*, maka prioritas kontrol yang harus dilakukan adalah kontrol pada tahap pradewasa dan eliminasi tempat perindukan. Fenomena ini dapat digunakan untuk melengkapi kewaspadaan dini terhadap kejadian luar biasa (KLB) DBD dengan memprediksi keberadaan virus dengue di suatu wilayah dengan deteksi transovarial yang tepat.

KESIMPULAN

Teknik imunositokimia menggunakan antibodi DSSE10 mampu membuktikan adanya transmisi transovarial pada nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi virus DEN-3 secara per oral. Teknik imunositokimia terbukti mampu mendeteksi adanya antigen virus DEN-3 pada nyamuk *Ae. aegypti*. Hasil positif antigen DEN-3 pada koloni F1 nyamuk umur 4 dan 16 hari (33,33% dan 40%) menunjukkan terjadinya transmisi transovarial virus DEN-3 pada nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi secara per oral.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membandingkan hasil deteksi imunositokimia dengan metode deteksi yang lain untuk melihat reliabilitas penggunaan teknik imunositokimia dalam mendeteksi antigen virus dengue. Perlu penelitian lebih lanjut untuk melihat efek transmisi transovarial dapat bertahan sampai berapa lama dan berapa generasi nyamuk *Ae. aegypti*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ucapkan terima kasih ke Badan Pengembangan Dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kemenkes RI yang telah memberikan dana untuk penelitian ini. Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM atas izin pelaksanaan penelitian ini. Para Dosen, staf dan teknisi laboratorium Parasitologi atas bantuan dan bimbingannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Henchal EA, Putnak JR. The Dengue Viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(4):376-396.
2. Satoto TBT, Umniyati SR, Astuti FD, et al. Assessment of vertical dengue virus transmission in *Aedes aegypti* and serotype prevalence in Bantul, Indonesia. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2014;4(2):563-568.
3. Borucki MK, Kempf BJ, Blitvich BJ, Blair CD, Beaty BJ. La Crosse virus: Replication in vertebrate and invertebrate hosts. *Microbes Infect.* 2002;4(3):341-350.
4. Halstead SB. Dengue. *Lancet.* 2007;370(9599):1644-1652.
5. Angel B, Joshi V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. *J Vector Borne Dis.* 2008;45(1):56-59.
6. Lee HL, Rohani A. Transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia. *Dengue Bull.* 2005;29:106-121.
7. Rosen, L.;Gubler D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1974;23(6):1153-1160.
8. Widiastuti D, Umniyati SR WN. Pemeriksaan Virus Dengue-3 Pada Nyamuk *Aedes aegypti* Yang Diinfeksi Secara Intrathorakal Dengan Teknik Imunositokimia Menggunakan Antibodi DSSE10. *Balaba.* 2012;8(1):21-25.
9. Umniyati SR. Teknik Imunositokimia dengan Antibodi Monoklonal DSSC7 untuk Kajian Patogenesis Infeksi dan Penularan Transovarial Virus Dengue serta Surveilans Virologis Vektor Dengue. [disertasi]. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada. 2009.
10. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, et al. Single-Reaction, Multiplex, Real-Time RT-PCR for the Detection, Quantitation, and Serotyping of Dengue Viruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):1-9.
11. Petersen K and Pedersen HC. Immunohistochemical Staining Methods. In: *Education Guide.* Denmark. Dako Denmark ; 2009.
12. Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res.* 2008;80(1):11-22.
13. Vilela APP, Figueiredo LB, dos Santos JR, et al. Dengue virus 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(6):989-992.
14. Le Goff G, Revollo J, Guerra M, et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. *Parasite.* 2011;18(3):277-280.
15. Martins VEP, Alencar CH, Kamimura MT, et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One.* 2012;7(7):1-9.
16. Desiree M, Prasetyowati H. Transmisi transovarial virus dengue pada telur nyamuk *Aedes aegypti* (L .). *Aspirator.* 2012;4(2):53-58.
17. Cruz LCDTA Da, Serra OP, Leal-Santos FA, Ribeiro ALM, Silhessarenko RD, Santos MA Dos. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(1):18-25.
18. Gutierrez-Bugallo, G., Rodriguez-

- Roche, R., Diaz, G., Vazquez, A.A., Alvarez, M., Rodriguez, M., Bisset, J.A., Guzman M. First record of natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* from Cuba. *Acta Trop.* 2017;174:146-148.
19. Supartha IW. Pengendalian Terpadu Vektor Virus Demam Berdarah Dengue, *Aedes aegypti* (Linn.) dan *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera : Culicidae). [Makalah dalam Seminar Dies Unud 2008]. Bali. 2008.
20. Setiyaniingsih R, Alfiah S. Pengaruh Suhu Penyimpanan Terhadap Presentase Tetas Telur *Aedes Aegypti* Di Laboratorium. *J Vektora.* 2014;6:9-12.