

Transovarial Index Rate (TIR) virus DEN3 dalam stadium metamorfose Aedes aegypti
(Setya, A.K., Sugiyarto, Dharmawan, R.)

Transovarial Index Rate (TIR) virus DEN3 dalam stadium metamorfose Aedes aegypti

(Setya, A.K.^{1,2}, Sugiyarto^{2,3}, Dharmawan, R.^{2,3})

¹Akademi Analis Kesehatan Nasional Surakarta

²Jurusan Biosain Program Pasca Sarjana Universitas Sebelas Maret

³Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret

Korespondensi: Adhi Kumoro Setya

Akademi Analis Kesehatan Nasional Surakarta

Jl. Yos Sudarso 338 Surakarta 57155. Telp. (0271) 644958 Fax. (0271) 665023

e-mail: adhikuuu@gmail.com

ABSTRAK

Aedes aegypti merupakan serangga bersayap dua yang bersifat antropofilik atau menghisap darah manusia. Banyak parasit berbahaya yang ditularkan oleh serangga ini, salah satunya virus dengue penyebab demam berdarah. Penelitian sebelumnya menyebutkan virus dengue secara imunositokimia dapat ditemukan pada *Aedes aegypti* yang tidak menghisap darah. Prinsip pemeriksaan ini dilakukan berdasarkan reaksi antigen dan antibodi yang sesuai. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui nilai *Transovarial Index Rate* (TIR) stadium biakan *A. aegypti* skala laboratorium.

Virus DEN3 dicampurkan ke dalam darah mencit kemudian diinfeksi secara peroral pada *Aedes aegypti* betina untuk dibiakan. Semua stadium hasil pembiakan (telur, larva, pupa dan dewasa) diuji adanya virus DEN3 dari jaringan tubuhnya. Nilai transovarial DEN3 yang dinyatakan dalam TIR di uji dengan teknik imunositokimia metode Streptavidine Biotin Peroxidase Complex (SBPC) dengan antibodi DSSC7. 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 pembanding.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa imunositokimia metode SBPC mampu mendeteksi DEN3 di semua stadium metamorfose *Aedes aegypti* dengan nilai TIR stadium telur 82%, larva 89%, pupa 94% dan dewasa 100%. Dari hasil ini memperlihatkan bagaimana virus DEN3 terpelihara dengan baik di dalam keturunannya.

Kata kunci: *Aedes aegypti*, virus DEN3, *Transovarial Index Rate* (TIR), imunositokimia

1. Pendahuluan

Penyakit akibat virus dengue dari kelompok *B Arthropod Virus (Arbovirosis)* yang ditularkan nyamuk *A. aegypti* masih tetap menjadi masalah kesehatan bagi

masyarakat dunia sampai saat ini. Data dari seluruh dunia menunjukkan Asia menempati urutan pertama dalam jumlah penderita Demam Berdarah Dengue (DBD) setiap tahunnya. Sementara itu, 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). Pemanasan global yang teridentifikasi sekarang ini ditandai meningkatnya suhu serta tingginya curah hujan menyebabkan penyebaran *A. aegypti* dan kasus DBD tidak terkendali. Hal ini sesuai dengan penelitian Felipe (2013) dan didukung oleh Sukowati (2013) bahwa peningkatan suhu membuat metamorfosis *A. aegypti* memendek dan curah hujan yang tinggi membuat semakin banyaknya tempat berkembang biak stadium *acuatic* nyamuk. Hal inilah yang membuat mengapa penyakit DBD susah untuk dihilangkan terlebih di Indonesia.

DBD adalah suatu penyakit yang memiliki presentasi klinis bervariasi dengan perjalanan penyakit dan luaran (outcome) yang tidak dapat diramalkan. Gambaran klinis penderita dengue terdiri atas 3 fase yaitu (1) fase febris, ditandai demam mendadak tinggi 2-7 hari, disertai muka kemerahan, eritema kulit, nyeri seluruh tubuh, mialgia, artralgia dan sakit kepala. (2) fase kritis, terjadi pada hari 3-7 sakit dan ditandai dengan penurunan suhu tubuh disertai kenaikan permeabilitas kapiler dan timbulnya kebocoran plasma yang biasanya berlangsung selama 24-48 jam disertai penurunan hitung trombosit. Pada fase ini dapat terjadi syok. (3) fase pemulihan, terjadi pengembalian cairan dari ekstrasvaskuler ke intravaskuler secara perlahan pada 48-72 jam setelahnya. Keadaan umum penderita membaik, nafsu makan pulih kembali, hemodinamik stabil dan diuresis membaik (Sudjana, 2010).

Sekarang ini dikenal ada 4 serotipe antigen dari virus dengue, yaitu DEN1, DEN2, DEN3 dan DEN4. Struktur antigen

masing-masing serotipe ini sangat mirip satu dengan yang lain, namun antibodi terhadap masing-masing serotipe tidak dapat saling memberikan perlindungan silang. Secara klinik keempat serotipe virus dengue ini mempunyai tingkatan manifestasi yang berbeda, khususnya DEN3. DEN3 merupakan serotipe yang paling banyak di Indonesia dan penyebab kejadian fatal / DBD berat penderitanya (Imam, 2009).

Penelitian tentang serotipe virus dengue sering dilakukan pada serum penderita DBD, sedangkan penelitian pada nyamuk *Aedes sp* sebagai vektornya belum banyak dilakukan (Hesmiwati *et al*, 2010). Begitu dekatnya penyakit dan vektor penularnya dengan kita maka suatu diagnosa lebih dini sebelum virus ini masuk dalam tubuh manusia adalah sangat penting.

Penelitian ini dirancang untuk mencoba deteksi transovarian virus DEN3 dari isolat telur, larva, pupa dan dewasa nyamuk *A. aegypti* skala laboratorium sebagai pemeriksaan coba *surveillance*. Antigen DEN3 yang terdapat di jaringan percobaan di uji dengan teknik imunositokimia metode Streptavidine Biotin Peroxidase Complex (SBPC). Hasil yang didapat dinyatakan sebagai *Transovarial Index Rate (TIR)*

2. Bahan dan Metode

2.1. 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) *TrekAvidin-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 DAB Substrate Buffer* (Cat. No. DS900L10), cat Mayer Hematoxylin (*counterstain*), alkohol, *entellan*, kertas *aluminium foil*, tissue, dan minyak imersi.

3. Cara Kerja

3.1. Persiapan Sampel

Sebanyak 12 ekor *A. aegypti* betina umur 5-7 hari dimasukan bersama dalam cup. Sampel darah berantikoagulan dicampur dengan sespensi 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.

3.2. 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.

3.3 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 tahapan sebagai berikut ; (1) Hasil squash/apus yang diperoleh difixasi dg metanol dingin 3-5 menit, (2) Penambahan peroxidase blocking solution (PBS) 5 menit, (3) Dilanjutkan dengan *prediluted blocking serum* selama 10-15 menit. (4) Penambahan antibodi primer (antibodi monoklonal DSSC10) lalu preparat diinkubasi 1 jam pada suhu kamar, (5) Dicuci dengan PBS 3x masing-masing 2 menit, (6) Penambahan *Biotinylated universal secondory antibody* dilakukan selama 10 menit, (7) Pencucian dengan PBS segar dilakukan 5 menit, (8) Pemberian streptavidin/peroxidase complex selama 10 menit. (9) Dilanjutkan pencucian lagi dengan PBS segar selama 5 menit, (10) Penambahan betazoid DAB chromogen solution 3-5 menit, (11) Setelah kering dilanjutkan dengan pemberian mayer hematoxilin selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir, (12) dilanjutkan dehidrasi alkohol konsentrasi 100% sekali, (13) Prosedur diakhiri dengan proses *clearing* menggunakan Xylen atau Xylol sekali.

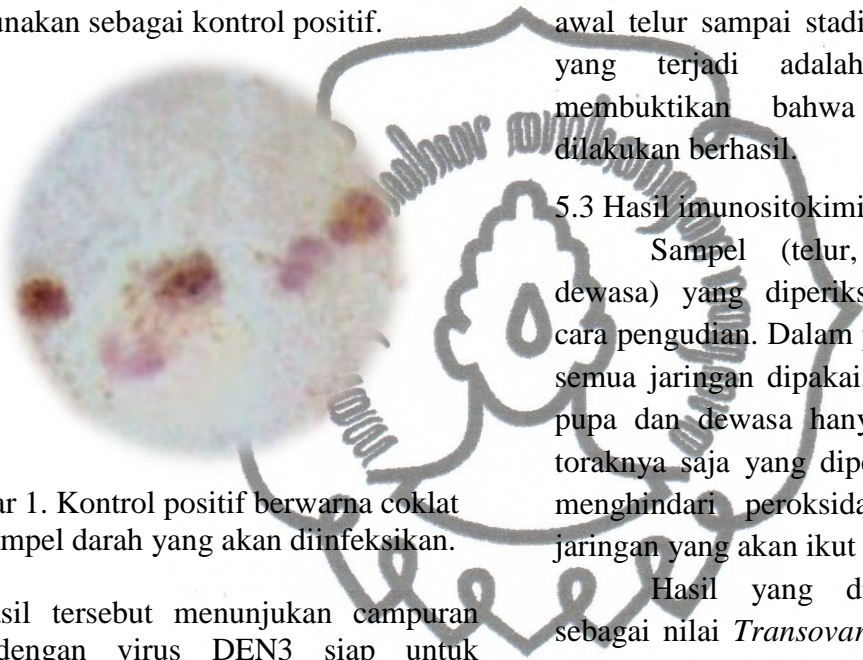
4. Pembacaan hasil imunositokimia

Jaringan yang telah diproses secara imunositokomia hasilnya dibaca secara mikroskopis dengan perbesaran 400x dan 1000x. Hasil positif memberikan warna coklat pada sel dan granula disekitar sel. Sedangkan negatif akan berwarna biru pada sel tersebut. Semua stadium yang diperiksa dinyatakan sebagai *Transovarial Index Rate* (TIR).

5. Hasil dan Pembahasan

5.1. 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 menarik nyamuk mau menghisap sampel darah.

5.2. 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.

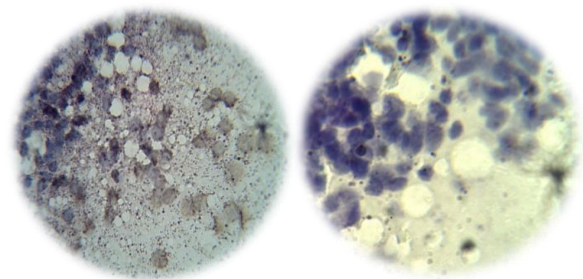
Untuk menjaga agar stadium yang dibiakan mampu bertahan hidup perlu pemberian makan berupa hati ayam pada stadium larva. Dalam penelitian ini, jumlah awal telur sampai stadium akhir pembiakan yang terjadi adalah sama. Hal ini membuktikan bahwa pembiakan yang dilakukan berhasil.

5.3 Hasil imunositokimia.

Sampel (telur, larva, pupa dan dewasa) yang diperiksa diperoleh dengan cara pengudian. 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.

Hasil yang diperoleh dinyatakan sebagai nilai *Transovarial Index Rate* (TIR) dengan rumus :

$$TIR = \frac{\text{Jumlah sampel positif}}{\text{Jumlah sampel yang diperiksa}} \times 100\%$$



Gambar 2. Hasil positif (kiri) dan negatif (kanan) hasil pemeriksaan imunositokimia.

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

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

Dari hasil TIR memperlihatkan bahwa semakin berkembang suatu stadium nyamuk akan menunjukkan semakin tinggi jumlah stadium yang positif dapat menularkan virus DEN3. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Natasha *et al* (2013), Waktu yang diperlukan sejak vektor menghisap darah viremik sampai vektor siap meneruskan rantai penularan disebut masa tunas ekstrinsik dan untuk virus dengue kira-kira 8-10 hari.

6. Kesimpulan

Virus DEN3 terpelihara dengan baik secara transovarial dalam stadium metamorfose *A. Aegypti*. Dengan pemeriksaan imunositokimia metode Streptavidine Biotin Peroxidase Complex (SBPC) keberadaan virus dapat terdeteksi. Proses perubahan dari satu stadium ke stadium lain akan diikuti virus DEN3 untuk bereplikasi memperbanyak diri. Hasil TIR memperlihatkan semakin berkembang stadium *A. aegypti* ke stadium lain maka semakin banyak jumlah yang positif mengandung virus DEN3.

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.
- 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 spesies* di Daerah Endemis DBD. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung. Semarang.
- 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.

- Sudjana P, 2010. Diagnosis Dini Penderita Demam Berdarah *Dengue* Dewasa. Buletin Jendela Epidemiologi. Pusat Data dan Surveilans Epidemiologi Kementerian Kesehatan RI. Vol 2.
- 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.
- Umiyati 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.
- Umiyati 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.