

Dicatat tgl. 27 NOV 1998

No. inventaris 10

Oleh UNIVERSITAS  
GADJAH MADA

Distribusi Virus Dengue 3 Pada nyamuk *Aedes aegypti* Yang Telah Diinfeksi Virus Dengue 3 Secara Oral

Ida Susilawati, Dr. Sutaryo, DSAK ; drh. Sitti Rahmah Umniyati, SU

Universitas Gadjah Mada, 1998 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

- Parasitology  
- *Aedes aegypti*

DISTRIBUSI VIRUS DENGUE 3 PADA NYAMUK  
*Aedes aegypti* YANG TELAH DIINFEKSI  
VIRUS DENGUE 3 SECARA ORAL

KARYA TULIS ILMIAH

Sebagai Salah Satu Syarat  
untuk Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran  
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada



REK. PERPUSTAKAAN  
FK.UGM

Diajukan oleh :

Ida Susilawati  
94/94633/KU/08421

FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA  
1998

X1142

DISTRIBUSI VIRUS DENGUE 3 PADA NYAMUK  
*Aedes aegypti* YANG TELAH DIINFEKSI  
VIRUS DENGUE 3 SECARA ORAL

KARYA TULIS ILMIAH

Sebagai Salah Satu Syarat  
untuk Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran  
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada



Diajukan oleh :

Ida Susilawati

94/94633/KU/08421

FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA  
1998



KARYA TULIS ILMIAH

DISTRIBUSI VIRUS DENGUE 3 PADA NYAMUK  
*Aedes aegypti* YANG TELAH DIINFEKSI  
VIRUS DENGUE 3 SECARA ORAL

Telah disetujui dan disahkan  
Tanggal 10 Juli 1998

Mengetahui

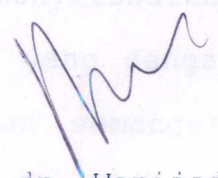
Pembimbing Materi

Pembimbing Metodologi

  
Dr. Sutaryo, DSAK  
NIP : 130514927

  
drh. Sitti Rahmah Umniyati, SU  
NIP : 131283644

Koordinator Jurusan  
Ilmu Kedokteran Pre Klinik

  
dr. Harijadi  
NIP : 130515577

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat, taufik dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga penulis berhasil menyelesaikan karya tulis ilmiah ini. Karya tulis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh derajat sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

Karya tulis ini berhasil penulis selesaikan dengan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis merasa wajib mengucapkan terima kasih terutama kepada :

1. Bapak Dr. Sutaryo, DSAK, sebagai pembimbing materi dan Ibu drh. Sitti Rahmah Umniyati, SU, sebagai pembimbing metodologi yang telah memberikan bimbingan dan saran.
2. Teman - teman tim dengue angkatan 1994 atas kerjasama dan bantuannya selama penelitian.
3. Mas Joko yang sudah membantu penulis selama melakukan penelitian.
4. Bapak dan Ibu tercinta atas doa buat penulis dalam menyelesaikan karya tulis ini.
5. Adik - adik tersayang atas doa dan dorongan semangat buat penulis dalam menyelesaikan karya tulis ini.
6. Sahabat - sahabatku yang dengan ikhlas membantu dan memberi dorongan semangat dalam menyelesaikan karya tulis ini.





UNIVERSITAS  
GADJAH MADA

**Distribusi Virus Dengue 3 Pada nyamuk Aedes aegypti Yang Telah Diinfeksi Virus Dengue 3 Secara Oral**

Ida Susilawati, Dr. Sutaryo, DSAK ; drh. Sitti Rahmah Umniyati, SU

Universitas Gadjah Mada, 1998 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

Penulis sadar masih banyak kekurangan dalam karya tulis ini, untuk itu penulis mengharapkan saran dan kritik demi kebaikan dan kesempurnaan karya tulis ini.

Yogyakarta, Juli 1998

Penulis





|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| II.2. Rancangan Penelitian          | 17     |
| II.3. Alat dan Bahan                | 18     |
| II.4. Jalannya Penelitian           | 19     |
| II.5. Interpretasi Hasil Penelitian | 21     |
| II.6. Validitas dan Reliabilitas    | 23     |
| <br>BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN   | <br>24 |
| III. 1. Hasil Penelitian            | 24     |
| III. 2. Pembahasan                  | 25     |
| <br>BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN    | <br>41 |
| IV.1. Kesimpulan                    | 41     |
| IV.2. Saran                         | 41     |
| <br>DAFTAR PUSTAKA                  | <br>42 |

## DAFTAR TABEL

|          |                                                                                                                                                        |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabel 1. | Kemungkinan hasil pewarnaan <i>streptavidin - biotin complex</i> .....                                                                                 | 21 |
| Tabel 2. | Hasil pewarnaan <i>streptavidin - biotin complex</i> pada jaringan nyamuk non - infeksiif.....                                                         | 24 |
| Tabel 3. | Hasil pewarnaan <i>streptavidin - biotin complex</i> pada jaringan nyamuk infeksiif.....                                                               | 24 |
| Tabel 4. | Hasil pewarnaan <i>streptavidin - biotin complex</i> jaringan nyamuk <i>Aedes aegypti</i> pada kontrol reagen BSA 5%.....                              | 26 |
| Tabel 5. | Jaringan lambung, ovarium dan otak <i>Aedes aegypti</i> dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan <i>streptavidin - biotin complex</i> ..... | 29 |
| Tabel 6. | Jaringan lambung, ovarium dan otak <i>Aedes aegypti</i> dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan <i>streptavidin - biotin complex</i> .....          | 34 |
| Tabel 7. | Jaringan lambung, ovarium dan otak <i>Aedes aegypti</i> infeksiif pada pewarnaan <i>streptavidin - biotin complex</i> .....                            | 39 |

## DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan lambung tidak menunjukkan adanya warna coklat atau merah.....26
- Gambar 2. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan lambung tidak menunjukkan adanya warna coklat atau merah.....26
- Gambar 3. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan ovarium tidak menunjukkan adanya warna coklat atau merah.....27
- Gambar 4. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang diinfeksi dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan ovarium tidak menunjukkan adanya warna coklat.....27
- Gambar 5. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan otak tidak menunjukkan adanya warna coklat atau merah.....28
- Gambar 6. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan otak tidak menunjukkan adanya warna coklat atau merah.....28
- Gambar 7. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan lambung menunjukkan adanya sedikit warna coklat.....29



- Gambar 8. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan lambung menunjukkan adanya warna coklat.....30
- Gambar 9. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan ovarium tetap berwarna biru, tidak berubah menjadi coklat. Sedangkan jaringan sekitarnya kelihatan berwarna coklat.....31
- Gambar 10. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan ovarium menunjukkan adanya titik berwarna coklat dengan jaringan sekitarnya menunjukkan warna coklat dengan intensitas yang lebih kuat.....31
- Gambar 11. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Pada jaringan tampak adanya warna coklat.....32
- Gambar 12. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan otak tampak adanya warna coklat.....33
- Gambar 13. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Warna coklat tidak begitu jelas dan warna biru sangat dominan. Jaringan disekitar lambung tetap berwarna biru.....34
- Gambar 14. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Tampak adanya titik - titik coklat pada lambung.....35

- Gambar 15. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan ovarium tampak sangat biru.....36
- Gambar 16. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Terlihat adanya titik - titik coklat pada ovarium.....36
- Gambar 17. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Terlihat adanya warna coklat pada jaringan otak.....37
- Gambar 18. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Terlihat adanya warna coklat pada jaringan otak.....38



## INTISARI

Nyamuk *Aedes aegypti* berperan sebagai vektor utama virus dengue di Indonesia. Di Indonesia terdapat keempat serotipe virus dan yang paling banyak adalah virus dengue 3. Virus dengue 3 menyebabkan demam berdarah dengue dengan insidensi yang paling tinggi di Indonesia.

Penanggulangan demam berdarah terutama untuk pemutusan rantai penularan yaitu ditujukan pada vektor dan lingkungan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui distribusi virus dengue 3 di dalam tubuh nyamuk *Aedes aegypti* ( dalam jaringan lambung, ovarium dan otak ) pada masa inkubasi 12 hari, merupakan penelitian dasar untuk mengkaji kerentanan nyamuk *Aedes aegypti* terhadap virus dengue 3 dan untuk mengetahui sensitivitas antibodi monoklonal 4E10 dalam mendeteksi adanya antigen virus dengue 3 jika dibandingkan dengan antibodi poliklonal HMAF campuran.

Deteksi virus dengue 3 ini menggunakan antibodi poliklonal HMAF campuran dan antibodi monoklonal 4E10 dan dengan metode pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Dengan deteksi virus dengue di dalam jaringan nyamuk secara dini akan sangat membantu upaya pemberantasan vektor di lingkungan kita.

Pada penelitian ini nyamuk *Aedes aegypti* betina disediakan dalam bentuk preparat irisan jaringan nyamuk (dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi). Nyamuk ini terdiri dari nyamuk infeksi dan nyamuk non infeksi. Preparat irisan jaringan ini dibagi menjadi kontrol reagen (BSA 5%), kontrol positif (AbP HMAF), kontrol negatif (nyamuk non infeksi) dan sampel (AbM 4E10). Masing - masing nyamuk diwarnai secara bersamaan. Pada tahap tertentu dari pewarnaan ini enzim peroksidase akan mengubah kromogen menjadi warna merah. Pewarnaan akan menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya warna merah atau coklat pada jaringan lambung, ovarium dan otak nyamuk. Pengamatan hasil dilakukan dengan mikroskop pada perbesaran 40x, 400 x dan 1000 x.

Dari penelitian diperoleh hasil bahwa pada masa inkubasi 12 hari, virus dengue 3 telah menyebar ke jaringan lambung, ovarium dan otak *Aedes aegypti*. Warna coklat pada kontrol positif lebih tinggi intensitasnya daripada sampel yang menunjukkan tingkat sensitivitas AbP HMAF campuran lebih tinggi daripada AbM 4E10 dalam mendeteksi antigen virus dengue 3 pada jaringan nyamuk *Aedes aegypti*.



## BAB I PENDAHULUAN



### 1.1. Latar Belakang Masalah

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) merupakan salah satu penyakit menular yang disebabkan oleh virus dengue. Virus ini ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Penyakit ini telah tersebar luas di dunia, baik di daerah tropik maupun subtropik. Penyakit ini dapat menjadi endemik maupun pandemi (Hassan, dkk., 1985).

Wabah demam dengue di Eropa meletus pertama kali pada tahun 1784, sedangkan di Amerika Selatan wabah itu muncul diantara tahun 1830 - 1870. Di Afrika wabah demam dengue hebat terjadi pada tahun 1871 - 1873 dan di Amerika Serikat pada tahun 1922 terjadi wabah demam dengue dengan 2 juta penderita.

Istilah *haemorrhagic fever* di Asia Tenggara pertama kali digunakan di Philipina pada tahun 1953, yaitu pada waktu terdapatnya epidemi demam yang menyerang anak disertai manifestasi perdarahan dan renjatan (*shock*). Pada tahun 1956, 1.207 penderita *Philippine haemorrhagic fever* dirawat di rumah sakit Manila dengan angka kematian 6 %. Pada tahun 1958, meletus epidemi serupa di Bangkok. Setelah tahun 1958, penyakit ini dilaporkan berjangkit kembali dalam bentuk

epidemi di beberapa daerah perkotaan di Philipina dan tempat - tempat lain di Asia Tenggara, di antaranya pada tahun 1958 di Hanoi, Vietnam Utara, Malaysia (1962, 1964), Saigon (1965) dan Calcuta (1963) (Hassan, dkk., 1985).

Di Indonesia, wabah demam berdarah dengue pertama kali dilaporkan di Surabaya dan Jakarta pada tahun 1968, dengan jumlah kasus 58 orang, dan 24 diantaranya meninggal. Sejak dilaporkannya kasus DBD pada tahun 1968, penyakit itu telah menjadi endemis di Indonesia, dan kasus dilaporkan setiap tahun. Pada saat ini DBD sudah endemis di kota - kota besar, bahkan sejak tahun 1973 penyakit ini berjangkit di pedesaan. Pada tahun 1973 dilaporkan 10.189 kasus dengan 470 orang yang meninggal. Tahun berikutnya penderita DBD mengalami penurunan jumlah. Sejak tahun 1977, penyakit DBD telah menyebar di seluruh wilayah di Indonesia kecuali Irian Jaya dan Nusa Tenggara Timur. Pada tahun 1983, sekitar 84 persen dari 13.875 kasus dilaporkan dari Jawa, yang merupakan daerah dengan penduduk terpadat (60 persen dari seluruh populasi). Angka kesakitan untuk seluruh wilayah pada tahun 1983 adalah sekitar 8 tiap 100.000 jumlah penduduk. Pada tahun 1987, jumlah kasus tertinggi dilaporkan (22.765 kasus dengan 1039 orang meninggal; case fatality rate 4.6 %) (WHO, 1993).

Mayoritas kasus DBD terjadi pada anak - anak kelompok umur 5 - 14 tahun. Proporsi dari kasus dewasa



( umur lebih dari 15 tahun) menunjukkan trend yang meningkat selama periode 1968 - 1995 (Suroso, 1997).

Tidak terdapat perbedaan yang berarti antara jenis kelamin penderita. Di beberapa negara, angka kematian perempuan dengan DSS lebih tinggi daripada laki - laki dengan DSS. Perbedaan ras juga bisa mempengaruhi jumlah kasus DBD, hal ini terlihat di Singapura dan di Malaysia. Di kedua negara tersebut penyakit DBD lebih banyak terjadi pada orang - orang China daripada ras yang lain (WHO, 1993).

Masalah yang berhubungan dengan dengue meningkat terus karena vektornya yang makin banyak dan tersebar luas, meningkatnya kepadatan penduduk, perpindahan penduduk, sanitasi lingkungan yang buruk dan diagnosa pasien yang terlambat sehingga penanganannya tidak bisa dimulai lebih dini.

Diagnosa yang tepat dan cepat pada masa akut penyakit kepada penderita sangat diperlukan guna pertimbangan terhadap penanganan dan pencegahan keadaan yang lebih parah ataupun berbahaya hingga menimbulkan kematian. Disamping itu deteksi virus pada vektornya sangat diperlukan supaya dapat dilakukan pemberantasan sumber penyakit secara cepat dan tepat (Sutaryo, 1991).

Pada saat ini upaya penanggulangan penyakit DBD hanya dapat dilakukan dengan memutuskan rantai penularan yaitu ditujukan pada vektor dan lingkungannya (Soedarto, 1990). Pada saat ini satu - satunya cara



untuk mencegah DBD adalah dengan memberantas nyamuk penularnya, yaitu nyamuk *Aedes aegypti* yang hidup di dalam dan di luar rumah (Sugito, 1990).

Menurut Soedarto (1990) pemutusan rantai penularan oleh vektor nyamuk dapat dilakukan dengan menghindari atau dengan mengurangi kontak atau gigitan nyamuk, membunuh nyamuk dewasa, membunuh jentik nyamuk dan menghilangkan tempat perindukan nyamuk (source reduction).

## 1. 2. Kepentingan Permasalahan

Nyamuk *Aedes aegypti* berperan sebagai vektor utama virus dengue. Di Indonesia terdapat keempat serotipe virus dengue. Virus dengue serotipe 3 paling banyak menyebabkan terjadinya demam berdarah di Indonesia. Penyakit ini telah banyak mengakibatkan kematian pada anak - anak maupun dewasa. Upaya memberantas nyamuk secara total tidak bisa dilakukan karena jumlah nyamuk yang sangat banyak dan keterbatasan bahan - bahan anti nyamuk, sehingga dirasa perlu untuk mengetahui cara deteksi virus dengue 3 di dalam tubuh nyamuk. Deteksi virus ini akan sangat membantu dalam menentukan daerah dengan nyamuk *Aedes aegypti* infeksi secara lebih dini.

### 1. 3. Tujuan Penelitian

Tujuan Penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui distribusi virus dengue 3 di dalam tubuh nyamuk *Aedes aegypti* ( pada jaringan lambung, ovarium dan otak ) pada masa inkubasi 12 hari.
2. Merupakan penelitian dasar untuk mengkaji kerentanan nyamuk *Aedes aegypti* terhadap virus dengue 3.
3. Untuk mengetahui sensitivitas antibodi monoklonal 4E10 dalam mendeteksi adanya antigen virus dengue 3 jika dibandingkan dengan antibodi poliklonal HMAF campuran.

### 1. 4. Tinjauan Pustaka

#### 1. 4. 1. Demam Berdarah Dengue

Demam berdarah dengue (*dengue haemorrhagic fever*) ialah penyakit yang terutama terdapat pada anak dengan gejala utama demam, nyeri otot dan sendi, yang biasanya memburuk setelah dua hari pertama. Uji *Tourniquet* akan positif dengan atau tanpa ruam disertai beberapa atau semua gejala perdarahan seperti petekia spontan yang timbul serentak, purpura, ekimosis, epistaksis, hematemesis, melena, trombositopeni, masa



perdarahan dan masa protrombin memanjang. hematokrit meningkat dan gangguan maturasi megakariosit.

Sindrom renjatan dengue (*dengue shock syndrom*) ialah penyakit demam berdarah dengue yang disertai renjatan (*shock*) (Hendarwanto, 1987).

WHO (1975) membagi derajat penyakit DBD dalam 4 derajat, yaitu sebagai berikut :

Derajat I : Demam disertai gejala tidak khas dan satu - satunya manifestasi perdarahan adalah uji tornikuet positif.

Derajat II: Derajat I disertai perdarahan spontan di kulit dan atau perdarahan lain.

Derajat III : Ditemukannya kegagalan sirkulasi yaitu nadi cepat dan lembut, tekanan nadi menurun (kurang dari 20 mmHg) atau hipotensi disertai kulit yang dingin, lembab dan penderita menjadi gelisah.

Derajat IV: Renjatan berat dengan nadi yang tidak dapat diraba dan tekanan darah yang tidak dapat diukur (Hassan, dkk., 1985).

#### 1.4.2. Virus dengue

Ada 4 jenis serotipe virus dengue yang berbeda dalam hal sifat antigenisitasnya, yakni DEN 1, DEN 2, DEN 3 dan DEN 4. Virus dengue merupakan *single - stranded enveloped RNA*, dengan diameter  $\pm 30$  nm. Termasuk genus *Flavivirus*, fam. *Flaviviridae* dan grup *Arbovirus B* ( Soesatyo, 1997 ).



Genom dengue virus sekitar 11.000 nukleotida panjangnya. Hasil dari mutasi spontan RNA, variasi topotipe dan nukleotida telah teridentifikasi dalam rantai bersama masing - masing serotipe DEN oleh analisis genom dan studi epitope ( Simons, et all., 1993 ).

Diagnosis klinik dan epidemiologik infeksi virus dengue biasanya tergantung pada isolasi virus dan deteksi antibodi. Bagaimanapun juga prosedur untuk isolasi virus dan identifikasi membutuhkan banyak waktu dan tes serologi sering tidak spesifik ( Simons, et all., 1993 ).

Virion dari virus dengue ekstraseluler terdiri atas protein C ( *capsid* ), M ( *membrane* ) dan E ( *envelope* ), sedang virus intraseluler mempunyai protein Pre - M.

Glikoprotein E ( BM 53 kd ) merupakan epitop penting karena mampu membangkitkan antibodi ( Ab ) spesifik untuk proses netralisasi, mempunyai aktivitas hemagglutinin, berperan dalam proses adsorpsi pada permukaan sel ( *receptor binding* ) dan mempunyai fungsi biologis lain, a.l. untuk fusi membran dan perakitan virion.

Selain ketiga jenis protein struktural ( C, M, dan E ), dijumpai beberapa jenis protein non - struktural (NS) pada sel yang terinfeksi virus. Salah satu diantaranya ialah NS1 yang berperan penting dalam proses *complement - fixation*. NS1 ( BM 39-41 kd )

dengan modifikasi tambahan adanya glikolisis-N, dilaporkan dapat menginduksi Ab spesifik yang bersifat protektif. Ketiga jenis protein struktural ( C, Pre-M dan E ) serta beberapa protein non-struktural ( NS ) disandi oleh genom RNA *positive-strand* sebesar 11 kb ( Soesatyo, 1997 ).

#### 1.4.3. Vektor virus dengue

Vektor utama dengue di Indonesia adalah nyamuk *Aedes aegypti*, di samping ditemukan pula *Aedes albopictus*. *Aedes aegypti* merupakan nyamuk domestik yang banyak ditemukan di dalam rumah atau disekitar rumah sedangkan *Aedes albopictus* merupakan nyamuk yang biasanya berada agak jauh dari manusia. Vektor ini bersarang di bejana - bejana yang berisi air jernih dan tawar seperti bak mandi, drum penampung air, kaleng bekas dan lain - lainnya (Hendarwanto, 1987).

Menurut Fernald dan Shepard (Brown,1982), *Aedes aegypti* termasuk dalam :

|          |                        |
|----------|------------------------|
| Phylum   | : <i>Arthropoda</i>    |
| Klass    | : <i>Hexapoda</i>      |
| Subklass | : <i>Pterygota</i>     |
| Ordo     | : <i>Dyptera</i>       |
| Family   | : <i>Culicidae</i>     |
| Genus    | : <i>Aedes</i>         |
| Spesies  | : <i>Aedes aegypti</i> |

*Aedes aegypti* bersifat antropofilik, senang sekali kepada manusia dan hanya nyamuk betina yang menggigit



dan menghisap darah. Nyamuk betina biasanya menggigit di dalam rumah, namun demikian kadang - kadang juga menggigit di luar rumah, di tempat yang agak gelap. Kebiasaan menghisap darah tersebut berulang dan menghisap darah satu orang atau beberapa orang secara bergantian dalam waktu singkat (Soedarmo, 1983).

Nyamuk *Aedes aegypti* yang tersebar luas di dunia dengan letak antara garis lintang  $40^{\circ}$  LU dan  $40^{\circ}$  LS, hanya mampu hidup pada suhu antara  $8^{\circ}\text{C}$  dan  $37^{\circ}\text{C}$ . Nyamuk dewasa mempunyai bercak - bercak putih keperakan atau putih kekuningan pada tubuh yang berwarna hitam. Di bagian dorsal dari thoraks terdapat bentuk bercak yang khas berupa dua garis sejajar di bagian tengah dan dua garis lengkung di tepinya (Soedarto, 1990).

*Aedes aegypti* berkembang biak melalui proses metamorfosis : telur - larva - pupa - nyamuk dewasa. Proses ini memerlukan waktu 8 sampai 15 hari (Sugito, 1989).

Telur. Nyamuk *Aedes aegypti* suka bertelur di tempat penampungan air di sekitar manusia seperti botol, kaleng, vas bunga, tempat minum burung (WHO, 1972). Bentuk telur mirip dengan telur spesies lainnya terutama telur *Aedes albopictus* (Juwono, 1991).

Pada hari ke - 3 sampai ke - 4 menghisap darah, nyamuk betina mampu bertelur berkisar 300 - 750 butir selama 4 - 5 hari. Bentuknya oval memanjang, hitam,



kecil dan berukuran 0,5 - 0,8 mm. Diletakkan satu - satu pada permukaan air dan menempel pada dinding bejana, biasanya lebih suka di bagian yang lebih gelap (Juwono, 1991). Telur nyamuk akan menetas dalam waktu 24 hingga 72 jam setelah terjadi kontak dengan air yang dipengaruhi juga oleh suhu sekitarnya (Gubler, 1984).

Larva dan pupa. *Aedes aegypti* mempunyai 4 bentuk lingkaran larva instar, dimana tiap instar diakhiri dengan pengelupasan dan penggantian kulit yang disebut *ecdycis*. Perkembangan larva ini tergantung pada suhu air, kepadatan populasi dan ketersediaan makanan, larva akan berkembang hingga menjadi pupa dalam waktu 5 - 7 hari pada suhu antara 24 °C - 39 °C. Larva *Aedes aegypti* lebih sering dijumpai dalam genangan air jernih, namun mereka juga bersifat toleran terhadap air yang keruh, baik yang bersifat asam atau basa.

Larva *Aedes aegypti* tampak memiliki ciri khusus, sehingga larva dapat dibedakan dengan larva jenis lain, yaitu ada satu berkas rambut di seberang pecten pada pipa pernapasan (siphon) dan bentuk sisir yang khas (WHO, 1972).

Larva instar IV dengan cepat menjadi pupa yang bengkok dengan kepala yang besar, sehingga menyerupai bentuk tanda tanya. Pupa sering kali melakukan gerakan menyelam secara cepat dalam serangkaian jungkiran sebagai reaksi terhadap rangsang. Stadium pupa ini berlangsung antara 2 - 5 hari tanpa makan, tetapi dapat

juga berlangsung sampai 10 hari dalam suhu yang rendah, sedangkan di bawah 10 °C tidak terjadi perkembangan. Sewaktu menetas, kulit pupa tersobek oleh gelembung udara dan oleh kegiatan insekta bentuk dewasa untuk melepaskan diri (Brown, 1982).

Nyamuk dewasa. *Aedes aegypti* tergolong nyamuk berukuran kecil apabila dibandingkan dengan nyamuk lain, warnanya hitam dengan belang - belang putih di seluruh tubuhnya, baik di dada, perut, kaki maupun sayapnya. Jenis kelamin sudah dapat dibedakan dengan melihat tipe antena. Nyamuk jantan mempunyai tipe pulmose dan palpi maksilaris sama panjang dengan probosis, sedangkan nyamuk betina mempunyai antena tipe pilose dan palpi maksilaris seperempat panjang probosis (Juwono, 1991).

Makanan nyamuk jantan dan betina umumnya berupa sari tumbuhan atau sering pula nektar. Sedangkan darah diperlukan nyamuk betina untuk perkembangan telurnya (Herms, 1950).

Kemampuan hidup nyamuk *Aedes aegypti* bervariasi, tergantung pada suhu, kelembaban, makanan, dan aktivitas reproduksi. Pada kondisi tanpa makanan dengan kelembaban relatif 100 % serta suhu udara sebesar 10 °C, Nyamuk *Aedes aegypti* mampu hidup selama 30 hari. Dengan suhu yang lebih tinggi dan kelembaban yang lebih rendah kemampuan hidup nyamuk akan menurun (WHO, 1972).



#### 1.4.4. Isolasi virus dengue

Hammon *et al* (1960) melaporkan bahwa virus dengue dapat diisolasi pada mencit. Caranya dengan menyuntikan darah penderita secara intrakutis (virus D 1 dan D 2) atau secara intracerebral (virus D 3 dan D 4) pada mencit. Juga dapat dipakai kultur sel vertebrata seperti *lily laboratory cell monkey kidney* (LLCMK 2) dan *baby hamster kidney* (BHK - 21) (Soedarmo *et al.*, cit., Arnes, 1993).

Dua metode utama untuk isolasi primer *Arbovirus*, inokulasi mencit dan kultur sel vertebrata tersebut, memiliki kemampuan yang terbatas untuk memperoleh virus dengue. Strain virus dengue tidak selalu patogen terhadap mencit dan banyak yang tidak mempunyai CPE (*cytopathic effect*) atau plaque pada kultur sel vertebrata. Oleh karena itu, isolasi dan identifikasi virus dengue adalah sulit dan sering memakan waktu yang lama (Tesh, cit., Arnes, 1993).

Pada tahun 1974, Rosen dan Gubler melaporkan suatu metode isolasi virus, dimana spesimen diinokulasikan langsung pada nyamuk *Aedes albopictus* dewasa. Belakangan digunakan nyamuk tidak menggigit *Toxorhynchites amboinensis* yang lebih aman dan dapat hidup lebih baik. Teknik ini disebut *mosquito inoculation technique*, yang merupakan suatu teknik baru, sensitif, sederhana dan murah.

Tahun 1969, Singh dan Paul untuk pertama kalinya melaporkan isolasi virus dengue pada kultur sel *Aedes albopictus* yang diberi kode C 6 / 36. Sejak itu, berbagai kultur sel nyamuk lainnya telah digunakan untuk maksud yang sama. Biakan jaringan nyamuk *Aedes aegypti*, *A. pseudoscutellaris* (Race, 1979), *A. malayensis* (Varma et al., 1974) dan *Toxorhynchites* (Kuno, 1982) telah terbukti sensitif bagi pertumbuhan virus dengue.

Teknik inokulasi nyamuk lebih sensitif dibandingkan sel C 6 / 36 atau AP - 61 (Tesh, cit., Arnes, 1979).

Titer virus yang diinjeksikan pada *T. amboinensis* biasanya 100 sampai 1000 kali lebih tinggi daripada apa yang ditunjukkan oleh kultur sel nyamuk. Meskipun demikian, teknik kultur sel nyamuk merupakan metode pilihan untuk isolasi virus dengue bagi laboratorium yang tidak memiliki koloni nyamuk atau pengalaman dengan inokulasi serangga. Disamping itu, kultur sel nyamuk memiliki beberapa keunggulan lain, yaitu :

1. Sensitifitas yang jauh lebih baik daripada kultur sel mamalia (Li, 1990) dan kultur sel vertebrata.
2. Relatif mudah ditangani dan dapat tumbuh pada suhu kamar.
3. Bisa dipelihara sampai 14 hari tanpa penggantian media.



#### 1.4.5. Antigen

Antigen adalah suatu substansi yang jika dikenalkan pada tubuh dapat merangsang terbentuknya antibodi. Substansi ini dianggap sebagai benda asing oleh tubuh. Sebagian besar antigen adalah protein. Hanya bagian tertentu dari molekul antigen yang dikenal oleh sistem imun, yang nantinya dapat menstimulir pembentukan antibodi. Bagian ini dinamakan determinan antigenik. Determinan antigeniklah yang menentukan kekhususan reaksi antigen - antibodi. Epitop merupakan determinan antigenik yang telah diketahui sifatnya (Rochmah, 1995).

#### 1.4.6. Antibodi monoklonal

Penggunaan antibodi monoklonal semakin banyak. Berbagai pabrik farmasi dan kimia menawarkan penggunaan antibodi monoklonal untuk aplikasi yang lebih luas seperti tes kehamilan, tes diagnostik, imunositokimia, radio - imuno assay dan lain- lain. Alasan penggunaan antibodi monoklonal adalah

- 1). Antibodi monoklonal mengenal antigennya dengan derajat spesifitas yang tinggi.
- 2). Berbeda dengan antibodi poliklonal, antibodi monoklonal dapat diproduksi dalam jangka waktu yang tidak terbatas, tanpa mengubah spesifitas mereka.
- 3). Produksi antibodi monoklonal relatif sederhana, dapat dihasilkan di banyak laboratorium modern.

Pada produksi antibodi monoklonal, diproduksi satu klon sel untuk merespon satu macam antibodi. Antibodi monoklonal diproduksi dengan adanya fusi sel mieloma dan limfosit yang bersifat dapat menghasilkan antibodi yang konstan dalam jumlah dan spesifikasinya serta immortal. Sedangkan antibodi poliklonal diproduksi dengan adanya respon imun setelah disuntuk antigen. Antibodi poliklonal mampu bereaksi dengan beberapa epitop antigen sasaran. Antibodi poliklonal mempunyai keseragaman bentuk susunan dan sulit distandarisasi sehingga menimbulkan masalah dalam penggunaannya sebagai agen diagnosa. Pada antibodi monoklonal cenderung bereaksi spesifik karena diarahkan untuk mengenal satu epitop antigen, walaupun masih memungkinkan adanya reaksi silang, namun cenderung dalam persentase kecil serta dapat terus diproduksi dengan komposisi antigen yang konstan (Artama, 1992).

#### 1.4.7. Metode pewarnaan *streptavidin - biotin complex*

Pada saat ini metode *streptavidin - biotin* dipakai secara luas dalam imunologi dan ilmu kedokteran diagnostik. Streptavidin merupakan suatu protein yang diisolasi dari *Streptomyces avidinii*, mirip dengan avidin putih telur dalam hal sifat ikatannya dengan biotin (Chiet dan Wolf, 1964).

Dasar utama metode ini adalah ikatan yang luar biasa kuat antara streptavidin dengan biotin. Sistem streptavidin - biotin memberikan sensitifitas yang





lebih tinggi daripada kompleks avidin - biotin konvensional ( Zuo-Rong Shi, dkk., 1988 ). Metode ini dapat digunakan dalam histokimia dan sitokimia untuk lokalisasi dan visualisasi antigen dengan penambahan antibodi primer pada proses pewarnaannya.

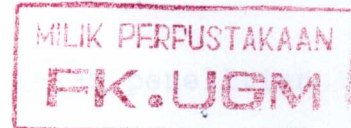
### 1. 5. Hipotesis

Pada penelitian ini diajukan hipotesis sebagai berikut :

- 1) Distribusi virus DEN 3 di dalam tubuh nyamuk *Aedes aegypti* ( lambung, ovarium dan otak ) dapat dideteksi dengan antibodi poliklonal HMAF campuran dan antibodi monoklonal 4 E10.
- 2) Antibodi monoklonal mempunyai sensitivitas yang sama dengan antibodi poliklonal.

## BAB II

### CARA PENELITIAN



#### 1.1. Subyek - Subyek yang Diteliti

Subyek dalam penelitian ini adalah nyamuk *Aedes aegypti*. Syarat - syarat subyek penelitian adalah nyamuk betina dewasa. Nyamuk diambil dari koleksi nyamuk *Aedes aegypti* di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Hal ini dimaksudkan supaya nyamuk *Aedes aegypti* sebelum dipakai di dalam penelitian benar - benar tidak ada kemungkinan terinfeksi virus dengue - 3 dan virus dengue serotipe yang lain. Obyeknya digunakan virus dengue - 3 dari laboratorium NAMRU Jakarta.

#### 2.2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara deskriptif analitik. Subyek - subyek dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu : kelompok perlakuan (diinfeksi virus dengue - 3 peroral ) dan kelompok kontrol (tidak diinfeksi virus ). Nyamuk - nyamuk tersebut disiapkan dalam bentuk sampel irisan jaringan ( dilakukan oleh laboratorium Patologi Anatomi ).



Variabel - variabel yang diteliti dalam penelitian ini terdiri atas variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah masa inkubasi virus dengue - 3 dalam tubuh nyamuk. Sedangkan variabel tergantung adalah distribusi virus dengue 3. Variabel pengganggu terdiri dari sterilitas bahan, ketepatan alat ukur dan reaksi non spesifik.

### 2.3. Alat dan Bahan yang Digunakan

#### 2.3.1. Alat - alat

Pada penelitian ini dipergunakan *slide*, vortex, mikroskop, tabung karton, nampan plastik, *cover slip*, kertas *tissue*, pipet, pipet mikroliter, inkubator 25 °C, sangkar nyamuk, gelas dan kapas.

#### 2.3. 2. Bahan - Bahan

Pada penelitian ini dipergunakan glukosa 10 %, nyamuk *Aedes aegypti* betina, virus dengue 3, darah, dapar fosfat (PBS), air distilat, air ledeng, antibodi monoklonal 4E10 (AbM 4E10), antibodi poliklonal HMAF campuran (AbM HMAF campuran), *perxidase blocking solution*, *serum blocking solution*, *biotinylated second antibody*, konjugat enzim, campuran *subtrate - chromojen*, *hematoxylin*, *aqueous mounting solution*, *bovine serum albumin 5% (BSA 5%)*, larutan xylol, minyak imersi.

## 2. 4. Jalannya Penelitian

### 2.4.1. Ternak nyamuk.

Telur nyamuk *Aedes aegypti* diperoleh dari koleksi telur nyamuk *Aedes aegypti* laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Telur dimasukkan ke dalam panci plastik yang berisi air. Satu sampai dua hari kemudian telur menetas menjadi larva. Stadium larva agar dapat berkembang menjadi stadium pupa diberi makanan dan air panci diganti setiap 3 hari. Setelah berkembang menjadi stadium pupa, dimasukkan ke dalam sangkar nyamuk, 1 - 2 hari kemudian pupa telah berkembang menjadi nyamuk dan diberi makan larutan gula 10 %.

### 2.4.2. Isolasi virus.

Sebanyak 40 ekor nyamuk *Aedes aegypti* dimasukkan ke dalam dua tabung karton (tabung I dan II); yang ditutup dengan kain kasa. Kemudian nyamuk pada salah satu tabung diinfeksi virus dengue - 3 secara oral. Virus diperoleh dari laboratorium NAMRU Jakarta. Setelah itu diinkubasikan selama 12 hari. Pemilihan waktu inkubasi 12 hari karena diperkirakan dalam waktu tersebut virus dengue 3 telah terdistribusi secara merata di dalam tubuh nyamuk *Aedes aegypti*.

Selain itu juga dipersiapkan 20 ekor nyamuk *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3. Nyamuk ini



juga diinkubasikan dalam waktu yang sama dengan nyamuk yang diinfeksi virus dengue 3.

#### 2.4.3. Pewarnaan jaringan nyamuk dengan metode *streptavidin - biotin complex*

Nyamuk non infeksiif dan infeksiif dibuat sediaan yang berupa irisan jaringan nyamuk pada slide. Irisan dibuat di laboratorium Patologi Anatomi.

Tahap - tahap pewarnaan adalah sebagai berikut :

1. Rendam slide dalam *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian cuci dengan PBS tiga kali masing - masing selama 2 menit.
2. Tambahkan 2 tetes atau 100 ul *serum blocking solution* pada tiap irisan. Inkubasikan pada suhu kamar selama 10 menit. Hilangkan atau keringkan solusinya. Tidak perlu dibilas atau dicuci. Langkah ini dapat dihilangkan jika antibodi primer diencerkan dalam cairan berisi 10 % serum non - imun.
3. Berikan 2 tetes atau 100 ul antibodi primer pada tiap irisan. Inkubasikan dalam ruangan yang lembab pada suhu kamar selama 30 - 60 menit. Cuci dengan PBS tigakali selama masing - masing 2 menit.
4. Berikan 2 tetes atau 100 ul *biotinylated second antibody* pada tiap irisan. Inkubasikan pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian cuci dengan PBS tigakali, masing - masing selama 2 menit.

5. Berikan 2 tetes atau 100 ul konjugat enzim pada tiap irisan. Inkubasikan pada suhu kamar selama 5 - 10 menit. Cuci dengan PBS tigakali, masing - masing selama 2 menit.
6. Teteskan 2 tetes atau 100 ul campuran *subtrate chromogen* pada tiap irisan. Inkubasikan pada suhu kamar selama 5 - 10 menit. Cuci dengan air destilat.
7. Warnai slide dengan 2 tetes atau 100 ul *hematoxylin* pada suhu kamar selama 1- 3 menit. Cuci dengan air ledeng.
8. Tambahkan 2 tetes atau 100 ul *aqueous mounting solution* ke slide, kemudian tutup dengan *cover slip*.

## 2.5. Interpretasi Hasil Penelitian

Hasil penelitian berupa distribusi virus dengue - 3. Distribusi virus ( hasil kualitatif ) ditetapkan dengan melihat warna merah atau coklat ketika preparat irisan jaringan lambung, ovarium dan otak diperiksa di bawah mikroskop.

Tabel 1. Kemungkinan hasil pewarnaan *streptavidin - biotin complex*

| Nome<br>r | Kontrol<br>positif | Kontrol<br>negatif | Kontrol<br>reagen | Sampel | Analisa                                          |
|-----------|--------------------|--------------------|-------------------|--------|--------------------------------------------------|
| 1         | -                  | -                  | -                 | -      | Kesalahan prosedur                               |
| 2         | +                  | +                  | +                 | +      | Pewarnaan non -spesifik pada ikatan protein atau |





|   |   |   |   |       |                                                        |
|---|---|---|---|-------|--------------------------------------------------------|
|   |   |   |   |       | aktifitas<br><i>peroxidase</i><br>endogen              |
| 3 | + | + | - | + / - | Kontrol<br>negatif<br>berisi<br>antigen                |
| 4 | - | - | - | +     | Kontrol<br>positif tidak<br>berisi<br>antigen .        |
| 5 | + | - | + | +     | Pewarnaan<br>sampel dengan<br>reaksi non -<br>spesifik |
| 6 | + | - | - | -     | Sampel tidak<br>berisi<br>antigen                      |
| 7 | + | - | - | +     | Sampel berisi<br>antigen                               |

Keterangan :

Kontrol positif: spesimen yang mengandung antigen dan mengalami proses pewarnaan seperti sampel.

Disini dipakai AbP HMAF campuran.

Kontrol negatif: spesimen yang tidak mengandung antigen dan mengalami proses pewarnaan seperti sampel. Disini dipakai nyamuk *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3.

Kontrol reagen : slide tambahan yang diberi serum non - imun selain antibodi primer ( AbM 4E10 / AbP HMAF ). Fungsi kontrol reagen adalah untuk mengetahui adanya ikatan protein non - spesifik atau ikatan non - spesifik dari reagen lain. Disini dipakai BSA 5%.

Sampel : spesimen yang mengandung antigen dengan pemberian AbM 4E10 pada proses pewarnaan.

Spesimen ( slide jaringan ) diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 x, 400 x dan 1000 x.

## 2.6. Validitas dan Reliabilitas

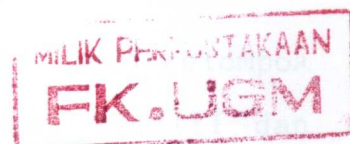
Untuk mendukung validitas dan reliabilitas hasil penelitian maka :

1. Subyek penelitian, *Aedes aegypti*, diambil dari koleksi laboratorium Parasitologi untuk menghindari kemungkinan adanya infeksi virus pada nyamuk sebelum dilakukan penelitian.
2. Pengamatan pada mikroskop dilakukan dengan beberapa tingkat perbesaran ( 40 x, 400 x dan 1000 x) .
3. Pemakaian kontrol reagen *bovine serum albumine* (BSA) 5%.



### BAB III

#### HASIL DAN PEMBAHASAN



#### 3. 1. Hasil Penelitian

Data yang diperoleh dari penelitian ini merupakan data kualitatif yang menunjukkan distribusi virus dengue 3 di dalam jaringan nyamuk *Aedes aegypti*.

Tabel 2. Hasil pewarnaan *streptavidin - biotin complex* pada jaringan nyamuk non - infeksi

| Jaringan | BSA 5%    | HMAF                        | 4E10                            |
|----------|-----------|-----------------------------|---------------------------------|
| Lambung  | 3<br>biru | 3<br>biru-sedikit<br>coklat | 2<br>biru-<br>sedikit<br>coklat |
| Ovarium  | 3<br>biru | 3<br>biru                   | 3<br>biru                       |
| Otak     | 3<br>biru | 3<br>biru<br>kecoklatan     | 3<br>Biru<br>kecoklatan         |

Tabel 3. Hasil pewarnaan *streptavidin - biotin complex* pada jaringan nyamuk infeksi

| Jaringan | BSA 5 %   | HMAF                               | 4E10                               |
|----------|-----------|------------------------------------|------------------------------------|
| Lambung  | 2<br>biru | 2<br>biru<br>kecoklatan            | 3<br>biru agak<br>coklat           |
| Ovarium  | 2<br>biru | 3<br>biru<br>titik-titik<br>coklat | 3<br>biru<br>titik-titik<br>coklat |
| Otak     | 3<br>biru | 3<br>coklat<br>sedikit biru        | 3<br>coklat<br>sedikit<br>biru     |

### 3. 2. Pembahasan

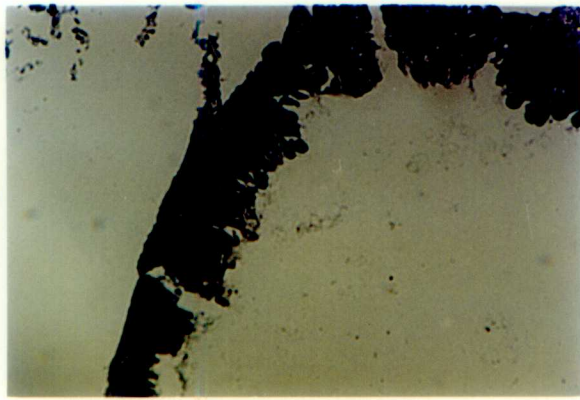
Irisan jaringan nyamuk *Aedes aegypti* pada kelompok kontrol reagen, kontrol negatif, kontrol positif dan sampel mengalami proses pewarnaan yang sama. Hasil pewarnaan positif ditunjukkan dengan adanya warna merah atau coklat pada jaringan, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna merah atau coklat.

Pada pewarnaan dengan metode *streptavidin - biotin complex* akan terjadi ikatan antara antigen virus dengue 3 di dalam jaringan nyamuk (lambung, ovarium dan otak) dengan antibodi primer (HMAF campuran atau 4E10). Penambahan antibodi kedua yang dilabel biotin berfungsi sebagai penghubung antara antibodi primer dengan konjugat streptavidin - peroksidase, sehingga pada saat diberi konjugat streptavidin - peroksidase akan terbentuk ikatan antara streptavidin dengan biotin yang kuat. Enzim peroksidase akan mengkatalisa substrat, hidrogen peroksida, dan mengubah kromogen, aminoetil karbazol, menjadi lapisan yang berwarna merah. Warna merah tersebut menunjukkan lokasi atau keberadaan antigen.

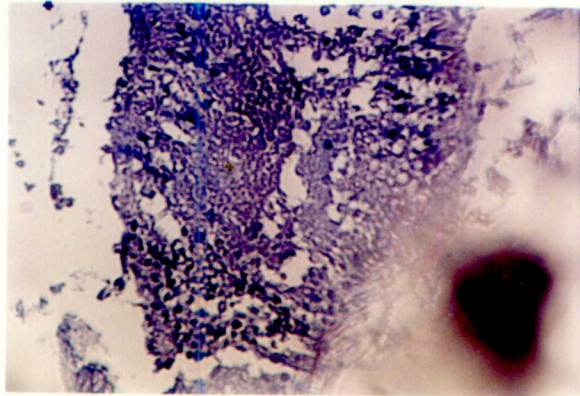
Tabel 4. Hasil pewarnaan *streptavidin - biotin complex* jaringan nyamuk *Aedes aegypti* pada kontrol reagen BSA 5%



| Jaringan nyamuk | Non infektif | infektif |
|-----------------|--------------|----------|
| Lambung         | -            | -        |
| Ovarium         | -            | -        |
| Otak            | -            | -        |



Gambar 1. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan lambung tidak menunjukkan adanya warna coklat atau merah.



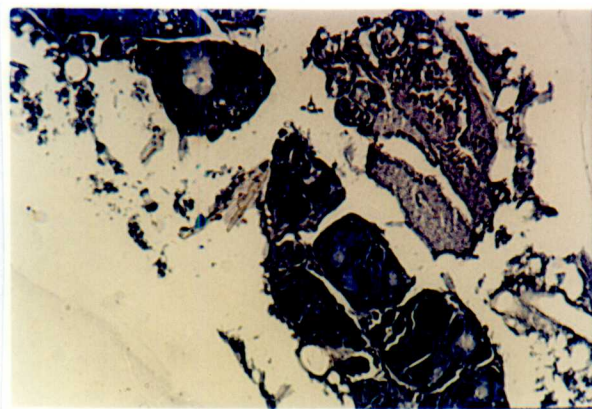
Gambar 2. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan lambung tidak menunjukkan adanya warna coklat atau merah.

Jaringan lambung nyamuk pada kontrol reagen (BSA) menunjukkan warna biru baik pada nyamuk non infektif maupun infektif. BSA akan menggantikan tempat antibodi

antibodi primer. Pada nyamuk non infeksi, jaringan lambung tidak mengandung antigen virus dengue 3. Sebaliknya pada jaringan lambung infeksi mengandung virus dengue 3. Tetapi ternyata hasil pewarnaan tidak menunjukkan perbedaan. Jadi meskipun ada antigen tetap tidak timbul warna merah atau coklat karena antigen tidak bertemu dan berikatan dengan antibodi.



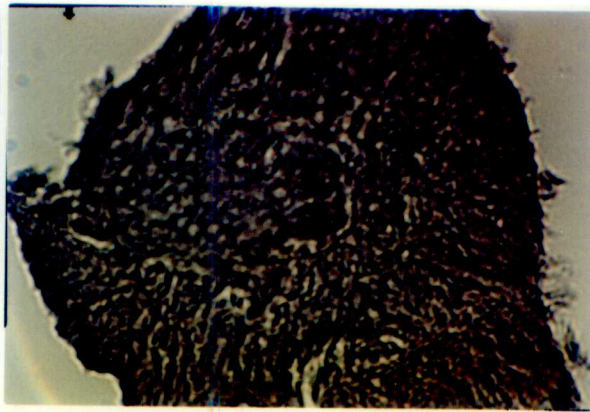
Gambar 3. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan ovarium tidak menunjukkan adanya warna coklat atau merah.



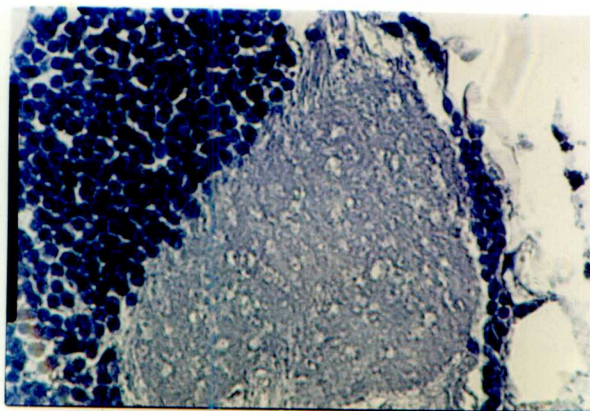
Gambar 4. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang diinfeksi dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan ovarium tidak menunjukkan adanya warna coklat.



Hasil pewarnaan pada kedua ovarium (non infeksi dan infeksi) tidak memperlihatkan warna coklat, tetapi tetap biru. Hal ini terjadi karena pada kedua ovarium tidak ditambahkan antibodi, sehingga tidak terbentuk ikatan antara antigen dengan antibodi. Dan selanjutnya tidak terjadi ikatan antara biotin dengan streptavidin. Tidak ada enzim peroksidase yang mencerna kromogen menjadi endapan merah atau coklat. Sehingga ovarium tetap berwarna biru.



Gambar 5. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan otak tidak menunjukkan adanya warna coklat atau merah.

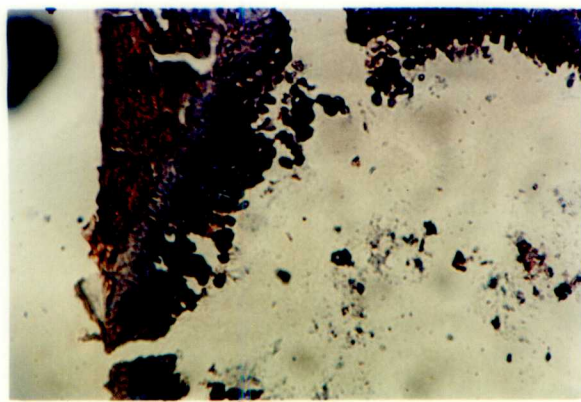


Gambar 6. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian BSA 5% pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan otak tidak menunjukkan adanya warna coklat atau merah.

Pada jaringan otak non infeksi maupun infeksi tidak terjadi perubahan warna kromogen menjadi merah. Hal ini terjadi karena tidak adanya ikatan antara antigen dengan antibodi. Dengan begitu tidak ada ikatan antara streptavidin - biotin dan tidak terjadi perubahan kromogen menjadi warna merah karena tidak adanya peroksidase.

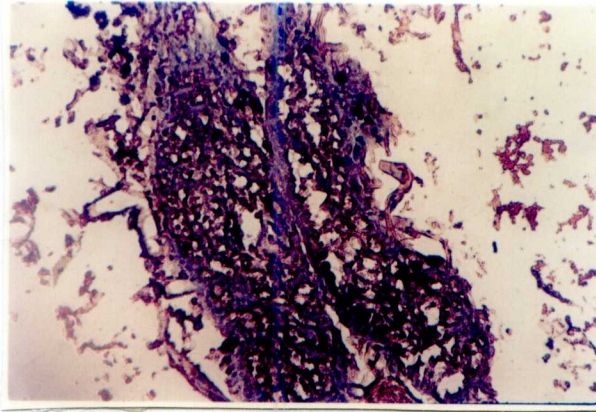
Tabel 5. Jaringan lambung, ovarium dan otak *Aedes aegypti* dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*

| Jaringan nyamuk | Non infeksi | Infeksi |
|-----------------|-------------|---------|
| Lambung         | + / -       | +       |
| Ovarium         | -           | +       |
| Otak            | +           | +       |



Gambar 7. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan lambung menunjukkan adanya sedikit warna coklat.





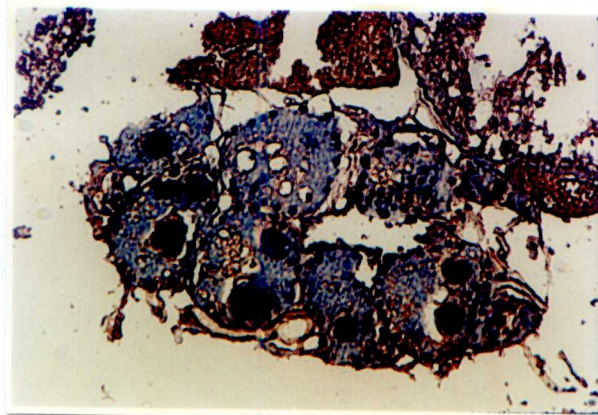
Gambar 8. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan lambung menunjukkan adanya warna coklat.

Dapat dilihat pada tabel 5, kedua lambung menunjukkan hasil yang positif dengan intensitas yang berbeda. HMAF sedikit mengenal jaringan lambung nyamuk sehingga meskipun tidak terdapat virus tetap memberikan warna sedikit coklat oleh karena ada jaringan nyamuk yang dikenal HMAF.

Pada lambung infeksi terlihat adanya warna coklat yang jelas. Hal ini terjadi karena terdapatnya antigen virus dengue 3 di dalam lambung nyamuk, sehingga terjadi lebih banyak ikatan biotin dengan streptavidin dan konsentrasi peroksidase lebih tinggi. Kromogen yang diikat lebih banyak, kemudian kromogen ini akan diubah oleh enzim peroksidase. Semakin banyak jumlah kromogen yang diubah akan memberikan warna coklat yang lebih tinggi intensitasnya. Warna coklat yang terbentuk menunjukkan adanya antigen virus dengue 3.



Gambar 9. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan ovarium tetap berwarna biru, tidak berubah menjadi coklat. Sedangkan jaringan sekitarnya kelihatan berwarna coklat.



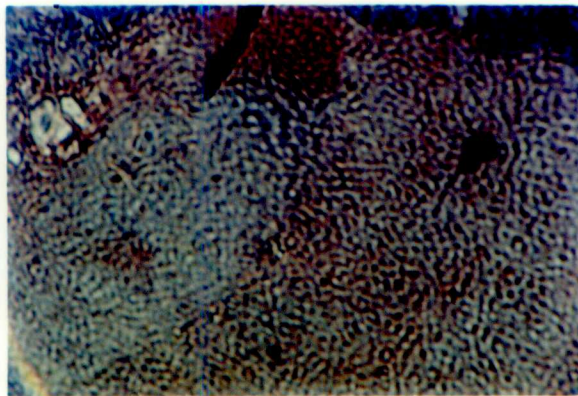
Gambar 10. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan ovarium menunjukkan adanya titik berwarna coklat dengan jaringan sekitarnya menunjukkan warna coklat dengan intensitas yang lebih kuat.

Antibodi poliklonal HMAF campuran tidak mengenal jaringan ovarium nyamuk. Hal tersebut terlihat dari

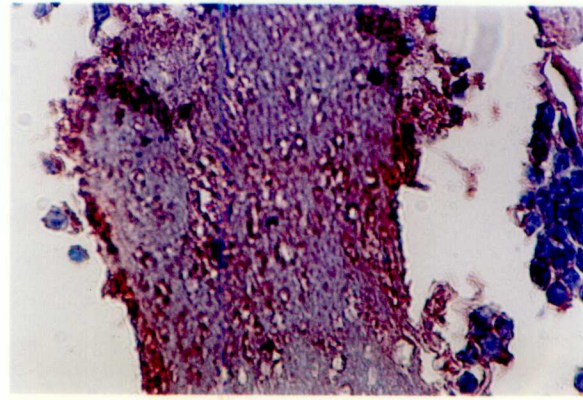


hasil penelitian (tabel 5 dan gambar 9), dimana ovarium nyamuk non infeksi menunjukkan warna biru, tidak ada warna coklat.

Pada nyamuk infeksi (gambar 10) ovariumnya mengandung virus dengue 3 sehingga pada pewarnaan memberikan warna coklat. Terjadinya warna coklat tersebut karena adanya antigen virus dengue 3 yang berikatan dengan antibodi poliklonal. Dengan adanya ikatan antigen virus dengue 3 dengan HMAF maka dengan penambahan antibodi kedua yang dilabel biotin dan konjugat streptavidin - peroksidase akan menyebabkan terjadinya ikatan antara biotin dengan streptavidin. Kromogen yang ditambahkan pada proses pewarnaan akan diubah oleh peroksidase menjadi warna merah.



Gambar 11. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan streptavidin - biotin complex. Pada jaringan tampak adanya warna coklat.



Gambar 12. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbP [HMAF campuran] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan otak tampak adanya warna coklat.

Antibodi poliklonal HMAF mengenal jaringan otak nyamuk. Hal tersebut dapat ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat pada jaringan otak nyamuk non infeksi (gambar 11). Meskipun tidak ada virus dengue 3, jaringan otak nyamuk tetap bisa dikenal antibodi HMAF.

Pada jaringan otak nyamuk infeksi (gambar 12) terbentuk warna coklat. Warna ini terjadi oleh karena adanya antigen virus dengue 3 dan jaringan otak.

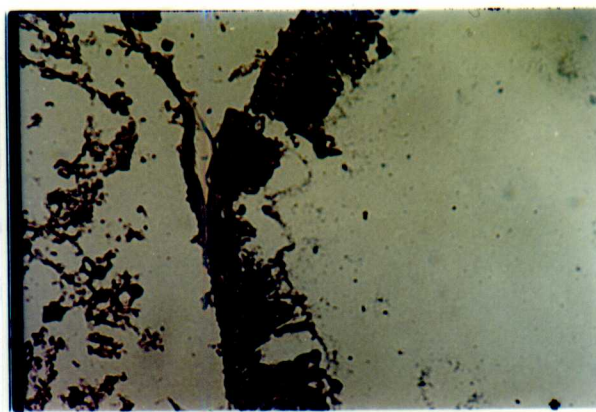
Perbedaan intensitas yang terjadi disebabkan karena adanya beda jumlah ikatan antigen - antibodi antara jaringan otak nyamuk non infeksi dengan infeksi. Pada jaringan otak nyamuk non infeksi tidak terdapat antigen dan hanya jaringannya saja yang dikenal oleh HMAF, sedangkan pada nyamuk infeksi terdapat virus dengue 3 dan jaringan otak. Hal tersebut



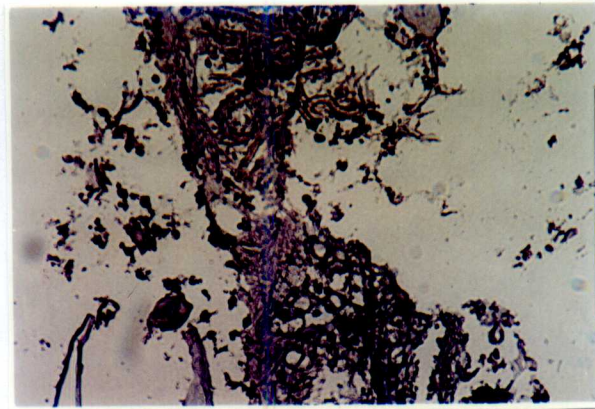
memungkinkan terjadinya ikatan yang lebih banyak antara antigen dengan antibodi primer (HMAF). Dengan begitu pada proses pewarnaan selanjutnya akan lebih banyak mengikat kromogen. Enzim peroksidase akan lebih banyak mengubah kromogen dan menghasilkan warna coklat dengan intensitas yang lebih tinggi.

Tabel 6. Jaringan lambung, ovarium dan otak *Aedes aegypti* dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*

| Jaringan nyamuk | Non infeksi | Infektif |
|-----------------|-------------|----------|
| Lambung         | - / +       | +        |
| Ovarium         | -           | +        |
| Otak            | +           | +        |



Gambar 13. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Warna coklat tidak begitu jelas dan warna biru sangat dominan. Jaringan disekitar lambung tetap berwarna biru.



Gambar 14. Jaringan lambung *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Tampak adanya titik - titik coklat pada lambung.

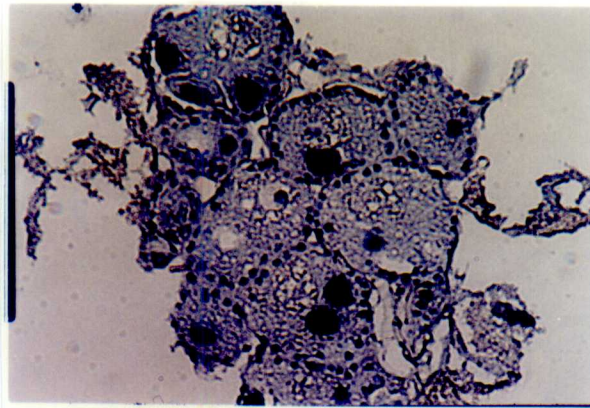
Pada jaringan lambung nyamuk non infeksiif tidak atau sedikit terbentuk warna coklat ( gambar 13). Hal ini menunjukkan bahwa antibodi 4E10 sedikit mengenal jaringan lambung nyamuk sehingga ikatan antara antigen dengan antibodi juga sedikit. Terbentuk sedikit ikatan antara streptavidin dengan biotin karena hanya jaringan lambung nyamuk saja yang terikat antibodi 4E10.

Berbeda dengan jaringan lambung nyamuk infeksiif (gambar 14). Disini terdapat antigen virus dengue 3 dan jaringan lambung nyamuk, sehingga terbentuk ikatan antigen - antibodi yang lebih banyak. Ikatan antigen - antibodi yang banyak meningkatkan jumlah ikatan dengan antibodi kedua dilabel biotin. Ikatan biotin - streptavidin bertambah dan pada akhirnya kromogen yang diubah oleh peroksidase juga bertambah.





Gambar 15. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Jaringan ovarium tampak sangat biru.

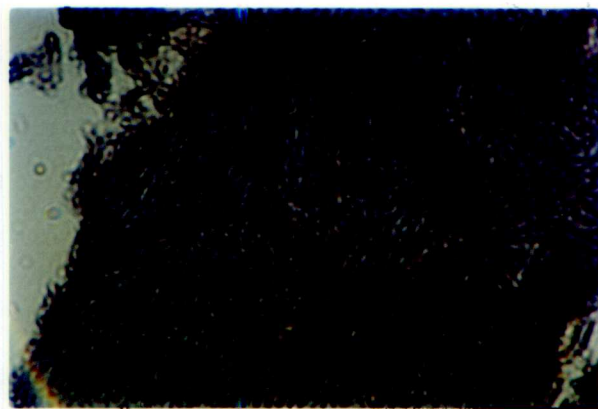


Gambar 16. Jaringan ovarium *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Terlihat adanya titik - titik coklat pada ovarium.

Pada jaringan ovarium nyamuk non infeksiif tidak terbentuk warna coklat (gambar 15). Terlihat jaringan ovarium tetap biru. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi

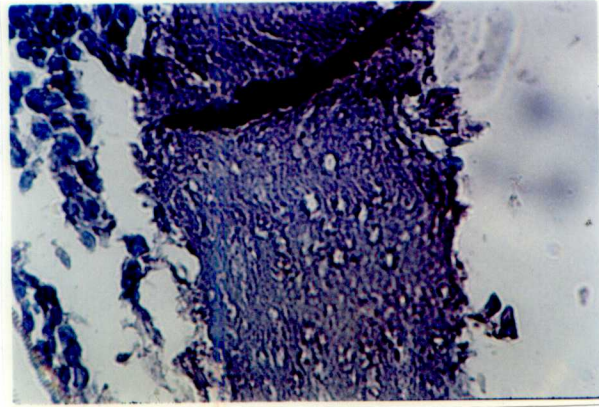
4E10 tidak mengenal jaringan ovarium nyamuk, sehingga tidak terjadi ikatan anatar streptavidin - biotin. Enzimperoksidase tidak mengubah kromogen.

Pada jaringan ovarium nyamuk infeksiif berisi virus dengue 3 sehingga warnanya menjadi coklat dengan intensitas yang agak rendah (gambar 16). Hal tersebut dapat dijelaskan bahwa virus yang sampai pada jaringan ovarium nyamuk hanya sedikit, sehingga yang terikat dengan antibodi monoklonal 4E10 juga sedikit. Dan hal itu akan mengakibatkan sedikitnya ikatan antara biotin dengan streptavidin, sehingga kromogen yang terikat sedikit. Jumlah kromogen yang diubah oleh peroksidase juga sedikit. Ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat dengan intensitas yang agak rendah.



Gambar 17. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang tidak diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Terlihat adanya warna coklat pada jaringan otak.





Gambar 18. Jaringan otak *Aedes aegypti* yang diinfeksi virus dengue 3 dengan pemberian AbM [4E10] pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*. Terlihat adanya warna coklat pada jaringan otak.

Antibodi monoklonal 4E10 mengenal jaringan otak nyamuk. Hal ini dapat dilihat dengan terbentuknya warna coklat pada jaringan otak nyamuk non infeksi (gambar 17).

Pada jaringan otak nyamuk infeksi terbentuk warna coklat dengan intensitas yang sedikit lebih tinggi daripada otak nyamuk non infeksi (gambar 18).

Perbedaan intensitas ini terjadi karena pengaruh keberadaan antigen virus dengue 3 pada otak nyamuk infeksi. Hal ini dapat berakibat meningkatnya jumlah ikatan antara antigen dengan antibodi (4E10). Peningkatan jumlah ikatan antigen dengan antibodi diikuti dengan peningkatan jumlah kromogen yang dapat diikat, sehingga lebih banyak kromogen yang diubah oleh enzim peroxidase, warna yang dihasilkan lebih coklat.

Tabel 7. Jaringan lambung, ovarium dan otak *Aedes aegypti* infeksi pada pewarnaan *streptavidin - biotin complex*

| Jaringan nyamuk | BSA | HMAF | 4 E 10 |
|-----------------|-----|------|--------|
| Lambung         | -   | +    | +      |
| Ovarium         | -   | +    | +      |
| Otak            | -   | +    | +      |

Hasil pewarnaan dengan BSA (kontrol reagen) menunjukkan hasil negatif dengan tidak terbentuknya warna coklat pada jaringan nyamuk, baik lambung, ovarium maupun otak (tabel 7). Hal ini terjadi karena tidak adanya ikatan antigen - antibodi dan tidak terjadi ikatan streptavidin - biotin seperti jika terdapat antibodi.

Jaringan yang diberi antibodi (HMAF atau 4E10) terjadi ikatan antara antibodi dengan antigen. Sehingga pada jaringan dengan HMAF dan 4E10 terbentuk warna coklat.

Warna coklat yang terbentuk pada jaringan dengan HMAF dan jaringan dengan 4E10 berbeda intensitasnya. Perbedaan ini dapat dijelaskan sebagai berikut : pada antibodi poliklonal HMAF mengenal semua epitop protein E antigen sedangkan antibodi monoklonal hanya mengenal satu epitop protein E antigen. Dengan begitu ikatan antara antigen (virus dengue 3) dengan antibodi poliklonal lebih banyak. Dengan banyaknya antigen virus



poliklonal lebih banyak. Dengan banyaknya antigen virus yang diikat maka ikatan dengan antibodi kedua yang dilabel biotin juga lebih banyak. Ikatan biotin - streptavidin lebih banyak. Kromogen dan substrat yang terikat lebih banyak. Enzim peroksidase akan lebih banyak mengubah kromogen menjadi warna merah atau coklat, sehingga intensitas warna coklat pada antibodi poliklonal lebih tinggi daripada antibodi monoklonal.

Perbedaan hasil pewarnaan antara HMAF campuran dengan 4E10 juga terlihat dari warna jaringan di sekitar jaringan utama (lambung, ovarium dan otak). Pada HMAF, jaringan sekitarnya berwarna coklat dengan intensitas yang lebih tinggi daripada jaringan utama, sedangkan pada 4E10, jaringan sekitarnya tidak menunjukkan adanya warna coklat.

Perbedaan hasil pewarnaan ini menunjukkan perbedaan sensitivitas dan spesifitas kedua antibodi. Antibodi HMAF campuran mempunyai sensitivitas yang lebih tinggi daripada antibodi 4E10, tetapi spesifitas antibodi 4E10 lebih tinggi daripada antibodi HMAF.

## BAB IV

### KESIMPULAN DAN SARAN



#### 4. 1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa

1. Pada masa inkubasi 12 hari virus dengue 3 telah terdistribusi ke jaringan lambung, ovarium dan otak.
2. Antibodi poliklonal HMAF campuran lebih sensitif terhadap antigen virus dengue 3 daripada antibodi monoklonal 4E10. Hal tersebut dapat ditunjukkan dengan intensitas warna coklat yang lebih tinggi pada pemberian antibodi poliklonal HMAF campuran.

#### 4. 2. Saran

Saran yang dapat kami ajukan adalah segera dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai deteksi virus dengue 3 di dalam tubuh nyamuk *Aedes* sehingga dapat membantu upaya pemberantasan nyamuk di lingkungan dengan deteksi dini nyamuk infeksi.



DAFTAR PUSTAKA



- Arnes, 1993, *Isolasi dan Identifikasi Antigen Virus Dengue serotipe 1, 2, 3, dan 4 serta Pemanfaatannya sebagai Antigen*, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Artama, W.T., 1992, *Antibodi Monoklonal, Teori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan*, reviewer oleh Djoko Wahyono, PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Brown, H. W., 1982, *Dasar - Dasar Parasitologi Klinik*, Edisi III, PT Gramedia, Jakarta.
- Chaiet, L., Wolf, F.S., 1964, *The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomyces*, Arch Biochem Biophys.
- Gubler, D. J., 1984, *Insect in Disease Transmission, Hunt's Tropical Disease*, Edisi VI, W. B. Saunders, Philadelphia.
- Hassan, R., Alatas, H., Latief, A., Putra, S. T., Napitulu, P. M., Pujiadi, A., Ghazali, M. V., 1985, *Infeksi Virus dengue, Ilmu Kesehatan Anak*, Edisi IV, Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Hendarwanto, 1987, *Dengue, Ilmu Penyakit Dalam*, Jilid I, Edisi II, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Herms, B. W., 1950, *Medical Entomology*, Edisi IV, The Mc Millan, Co., New York.
- Juwono, S. M., 1991, *Petunjuk Praktikum Parasitologi Kedokteran, Helmintologi dan Entomologi*, Jilid II, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Rochmah, N.S., 1995, *Isolasi dan Identifikasi Imunoglobulin G (IgG) Ayam Anti Protein Sub Unit Pili Vibrio cholerae*, Skripsi, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Rodgers, R. P. C., 1993, *Clinical Laboratory Methods for Detection of Antigen and Antibody*, Edisi VIII, Appleton & Lange, San Fransisco.



- Simons, M., Jennings, G., Oprandy, J.J., 1993, A Rapid Membrane Based Immunobinding Assay for Detection of Dengue Virus in Tissue Culture, *SEAMEO-Tropmed Project*, Bangkok, Thailand, Vol. 24, No. 4.
- Soedarmo, S. S. P., 1993, *Demam Berdarah (Dengue) Pada Anak*, Penerbit UI, Jakarta.
- Soedarto, 1989, *Entomologi Kedokteran*, Edisi I, EGC, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Soegito, R., 1989, Aspek Entomologi Demam Berdarah Dengue, *Berbagai Aspek Demam Berdarah Dengue dan Penanggulangannya*, Fakultas Kedokteran UI, Jakarta.
- Soesatyo, M.H.N.E., 1997, Hand out Immunopatologi Infeksi Dengue, *Workshop on Molecular Biology of Dengue Virus*, Yogyakarta.
- Suroso, T., 1997, A Review of Dengue Haemorrhagic Fever and Its Control in Indonesia, *Seminar Recent Advances in Molecular Diagnosis*, Pusat Kedokteran Tropis, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sutaryo, 1991, *Limfosit Plasma Biru, Arti Diagnosis dan Sifat Immunologik pada Infeksi Dengue*, Tesis, UGM, Yogyakarta.
- WHO, 1993, *Monograph on Dengue / Dengue Haemorrhagic Fever*, WHO, New Delhi.
- Zuo-Rong Shi, Steven H. Itkowitz, Young S. Kim, 1988, A comparison of three Immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissue, *J. Histochem Cytochem*, 36(3) : 317-322.





UNIVERSITAS  
GADJAH MADA

**Distribusi Virus Dengue 3 Pada nyamuk Aedes aegypti Yang Telah Diinfeksi Virus Dengue 3 Secara Oral**

Ida Susilawati, Dr. Sutaryo, DSAK ; drh. Sitti Rahmah Umniyati, SU

Universitas Gadjah Mada, 1998 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

