

SKRIPSI

**MODEL PATOGENESA VIRUS DENGUE SEROTIPE 3
(DEN - 3) PADA KULTUR SEL MONOLAYER
BHK₂₁ CLONE₁₃**



OLEH :

Nur Haryani

MAGETAN - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

**MODEL PATOGENESA VIRUS DENGUE SEROTIPE 3
(DEN-3) PADA KULTUR SEL MONOLAYER
BHK₂₁ CLONE₁₃**

Skripsi, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

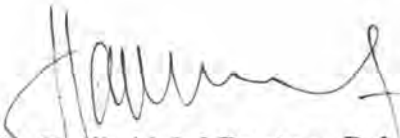
Surabaya

Oleh :

NUR HARYANI

069412129

Menyetujui,
Komisi Pembimbing


Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh
Pembimbing Pertama


Budi Utomo, M.S., Drh
Pembimbing Kedua

*"Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi,
silih bergantinya siang dan malam, bakteri yang berlayar
di laut membawa apa yang berguna bagi manusia,
dan apa yang Allah turunkan dari langit berupa air,
lalu dengan air itu Dia hidupakan bumi sesudah mati (Kering)-nya
dan Dia sebarkan di bumi itu segala jenis hewan,
dan pengisaran angin dan awan
yang dikendalikan antara langit dan bumi;
Sungguh (terdapat) tanda-tanda (ke Esaan dan ke Besaran Allah)
bagi kaum yang memikirkan."*

(Qur'an Surat Al Bagarah Ayat 164)

**MODEL PATOGENESA VIRUS DENGUE SEROTIPE 3
(DEN-3) PADA KULTUR SEL MONOLAYER
BHK₂₁ CLONE₁₃**

Nur Haryani

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perkembangan dan model patogenesis virus DEN-3 dalam kultur sel BHK₂₁ (*Baby Hamster Kidney*) Clone₁₃, sehingga dapat memberikan sumbangan ilmiah tentang terjadinya kerusakan sel yang menyebabkan DSS (*Dengue Shock Syndrome*).

Sel BHK₂₁ Clone₁₃ ditumbuhkan dalam medium MEM (*Minimum Essential Medium*) pada suhu 37°C 5%CO₂. Sebelumnya pada masing-masing media ditambahkan *cover slip* steril supaya sel dapat tumbuh di atasnya, yang nantinya diperlukan untuk pemeriksaan FAT (*Fluorescent Antibody Test*). Sel BHK kemudian diinokulasi dengan virus DEN-3 sebanyak 1 m.o.i. (*multiplicity of infection*). Pengumpulan *cover slip* dilakukan dengan cara memberi selang waktu di dalam inkubator CO₂ yaitu untuk masa inkubasi 2, 6, 12, 24, 48 dan 72 jam pasca inokulasi. Masing-masing *cover slip* difiksasi, kemudian dilakukan uji FAT secara langsung. Selanjutnya sel diperiksa di bawah mikroskop fluoresen untuk melihat dan mengamati model patogenesis yang didapat dari setiap masa inkubasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada masa inkubasi 2 jam sampai 72 jam pasca inokulasi, penyebaran virus di dalam sel semakin meningkat sesuai dengan lamanya masa inkubasi, dan virus DEN-3 tidak menimbulkan adanya CPE, yang berarti virus DEN-3 belum menyebabkan kerusakan pada sel BHK₂₁ Clone₁₃. Pengekspresian protein dimulai pada masa inkubasi 6 jam pasca inokulasi dan mencapai hasil maksimal pada masa inkubasi 48 jam pasca inokulasi.

KATA PENGANTAR

Assalammu 'alaikum.

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan ini yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dalam penulisan yang berjudul **Model Patogenesis Virus Dengue Serotipe 3 (DEN-3) pada Kultur Sel Monolayer BHK₂₁ Clone₁₃** ini, penulis mencoba mempelajari perkembangan dan model patogenesis virus DEN-3 pada kultur sel BHK₂₁ Clone₁₃. Seperti kita ketahui bersama bahwa penyakit DBD (Demam Berdarah Dengue) yang disebabkan oleh virus dengue sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang besar di tanah air kita. Jadi, adanya penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan ilmiah dalam usaha mengembangkan teknik diagnosa yang cepat dan tepat, sehingga kasus DBD dapat ditekan serendah-rendahnya.

Dalam penulisan ini penulis banyak menerima bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang telah diberikan.
2. Bapak Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh selaku pembimbing pertama dan Bapak Budi Utomo, M.S., Drh selaku pembimbing kedua yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk membantu dan memberikan dorongan kepada penulis dalam menyelesaikan tulisan ini.
3. Ibu Rahayu Ernawati, M.Sc., Drh selaku Kepala Laboratorium Virologi dan Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga , yang telah mengijinkan penulis untuk melakukan penelitian di laboratorium tersebut.
4. Direktur *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga, yang telah mengijinkan penulis untuk melakukan penelitian di Laboratorium Dengue.
5. Bapak dan Ibu dosen serta karyawan Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan serta Laboratorium Dengue TDC Universitas Airlangga yang telah membantu dalam penelitian ini.
6. Yang terhormat Ayah, Ibu, Mbak Tuti' dan Adek tercinta atas segala kasih sayangnya, dorongan moril dan materi, juga do'a restunya.
7. Sahabat-sahabat tercinta Erlyn, Mbak Titik, Dina, Demi, Yuni, Tika, Veve serta semua teman-teman yang telah memberikan kritik, saran dan bantuan kepada penulis.

8. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu demi penyempurnaan tulisan ini.

Akhirnya, penulis menyadari masih banyak kekurangan yang terdapat dalam penulisan ini, karena keterbatasan kemampuan dan pengetahuan penulis sehingga tulisan ini masih jauh dari sempurna. Penulis hanya berharap semoga hasil penulisan ini dapat bermanfaat bagi pihak yang berkepentingan.

Semoga Allah SWT selalu memberikan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua. Amin.

Wassalam.

Surabaya, September 1999

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DATAR SINGKATAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Landasan Teori	3
1.5. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Demam Berdarah Dengue (DBD)	5
2.2. Sejarah DBD di Dunia	6
2.3. Sejarah DBD di Indonesia	7
2.4. Virus Dengue	9
2.5. Sifat Biologis pada Kultur Sel	10

2.6. Daya Ikat dan Saat Infeksi Awal Virus Dengue	10
2.7. Isolasi Virus	11
2.8. Patogenesis DBD	13
2.9. Diagnosa Laboratorium	15
BAB III MATERI DAN METODE	16
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.2. Materi Penelitian	16
3.2.1. Bahan Kimia	16
3.2.2. Media	16
3.2.3. Virus Dengue Serotipe 3 (DEN-3)	17
3.2.4. Sel BHK ₂₁ (<i>Baby Hamster Kidney Clone</i> ₁₃)	17
3.2.5. Sel Astrofit	17
3.2.6. Antiserum	17
3.2.7. Peralatan Penelitian	18
3.3. Metode Penelitian	18
3.3.1. Sterilisasi Ruang dan Peralatan	18
3.3.2. Perbanyak Sel Monolayer BHK ₂₁	18
3.3.3. Penanaman Sel BHK ₂₁ pada <i>Cover Slip</i>	19
3.3.4. Inokulasi Virus DEN-3 pada Kultur Sel Monolayer BHK ₂₁	20

3.3.5. Fiksasi Sel	20
3.3.6. Uji <i>Fluorescent Antibody Test</i> (FAT)	21
3.3.7. Pengamatan	22
BAB IV HASIL PENELITIAN	23
BAB V PEMBAHASAN	30
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	37
RINGKASAN	38
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Perkiraan Daerah yang Berpotensi bagi Penyebaran <i>Ae. Aegypti</i>	8
2. Strategi Replikasi Virus Dengue	11
3. Patogenesis Terjadinya Renjatan pada DBD	14
4. Imunofluoresensi dari Sel BHK ₂₁ <i>Clone</i> ₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i. dengan Masa Inkubasi 2 Jam Pasca Inokulasi	25
5. Imunofluoresensi dari Sel BHK ₂₁ <i>Clone</i> ₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i. dengan Masa Inkubasi 6 Jam Pasca Inokulasi	25
6. Imunofluoresensi dari Sel BHK ₂₁ <i>Clone</i> ₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i. dengan Masa Inkubasi 12 Jam Pasca Inokulasi	26
7. Imunofluoresensi dari Sel BHK ₂₁ <i>Clone</i> ₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i. dengan Masa Inkubasi 24 Jam Pasca Inokulasi	26
8. Imunofluoresensi dari Sel BHK ₂₁ <i>Clone</i> ₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i. dengan Masa Inkubasi 48 Jam Pasca Inokulasi	27
9. Imunofluoresensi dari Sel BHK ₂₁ <i>Clone</i> ₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i. dengan Masa Inkubasi 72 Jam Pasca Inokulasi	27
10. Sel BHK ₂₁ Normal	28
11. Imunofluoresensi dari Sel Astrosit yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i. dengan Masa Inkubasi 48 Jam Pasca Inokulasi	28
12. Imunofluoresensi dari Sel Astrosit yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i. dengan Masa Inkubasi 48 Jam Pasca Inokulasi	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan Alir Jalannya Penelitian	43
2. Komposisi Bahan-bahan Kimia yang Digunakan dalam Penelitian	44
3. Beberapa Peralatan untuk Penelitian	46

DAFTAR SINGKATAN

DBD	: Demam Berdarah Dengue
DEN	: Dengue
BHK	: Baby Hamster Kidney
RNA	: Ribonukleic Acid
C	: Capsid
Pre-M	: Pre-Membrane
M	: Membrane
E	: Envelope
NS	: Non Structural
CPE	: Cytopathogenic Effect
ADE	: Antibody Dependent Enhancement
RME	: Receptor Mediated Endocytosis
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
CF-test	: Complement Fixation test
HI-test	: Haemagglutination Inhibition test
N-test	: Neutralization test
PCR	: Polymerase Chain Reaction
FAT	: Fluorescent Antibody Test
PBS	: Phosphat Buffer Saline
FITC	: Fluorescent Isothyocyanat
FCS	: Foetal Calf Serum
MEM	: Minimum Essential Medium
m.o.i.	: multiplicity of infection

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit viral akut yang disebabkan oleh virus dengue. Penyakit ini terutama ditularkan lewat gigitan nyamuk *Aedes aegypti*, sangat patogen pada manusia dan terutama terjadi di daerah tropis. Lebih dari setengah milyar dari 100 negara di dunia mempunyai resiko serius terhadap infeksi virus dengue, dimana minimum 20 juta per tahun manusia terinfeksi virus dengue (WHO, 1997).

Selama hampir dua abad penyakit DBD digolongkan sebagai penyakit ringan yang sejajar dengan demam, pilek, atau diare, yaitu sebagai penyesuaian diri seseorang terhadap iklim tropis. Namun pandangan ini berubah sejak timbulnya wabah DBD di Manila pada tahun 1953-1954 yang disertai renjatan (syok) dan pendarahan gastrointestinal, serta berakhir dengan kematian. Kenyataannya, sekarang DBD merupakan masalah penting di kawasan Asia Tenggara dan Pasifik Barat (WHO, 1997).

Seperti kita ketahui bersama, penyakit DBD sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang besar di tanah air kita. Sejak dilaporkannya pertama kali di sekitar tahun 1968 di Jakarta dan Surabaya (Kho dkk.1969; Partana dkk.1970), penyakit ini semakin menyebar dan meluas ke banyak wilayah di Indonesia dan jumlah kasus semakin meningkat dari tahun ke tahun.

Ada empat serotipe virus dengue yang diketahui menjadi penyebab penyakit DBD di Indonesia, yaitu virus dengue serotipe 1, 2, 3 dan 4 (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). Serotipe yang paling banyak di Indonesia adalah virus DEN-3. Hal ini terbukti dari adanya penelitian beberapa kasus DBD di wilayah Indonesia, seperti di Jakarta, Bantul maupun Pontianak, dimana dari sebagian besar penderita DBD tipe berat maupun yang meninggal berhasil diisolasi virus DEN-3. Virus DEN-3 tidak hanya merupakan serotipe virus yang utama di Indonesia, tetapi juga merupakan tipe yang paling virulen (Sumarmo, 1987).

Usaha-usaha untuk mengatasi masalah penyakit DBD melalui penelitian-penelitian, baik mencari cara diagnosa yang cepat dan tepat, cara terapi yang spesifik dan pengembangan vaksin untuk pencegahan sudah banyak dilakukan. Namun, sampai saat ini hasilnya belum memuaskan sehingga pemberantasan penyakit DBD hanya dapat dilakukan melalui pemutusan rantai penularannya yaitu dengan membasmi nyamuk vektor *Ae. aegypti* (Sumarmo dkk., 1994).

Selaras dengan uraian diatas, dirancang suatu penelitian dengan menggunakan sel monolayer BHK₂₁ (*Baby Hamster Kidney*) Clone₁₃ untuk isolasi virus DEN-3, untuk melihat bagaimana model patogenesis virus tersebut pada kultur sel BHK₂₁ Clone₁₃. Penelitian ini diharapkan dapat membantu memberikan informasi lebih lanjut dalam menegakkan diagnosa penyakit DBD, sehingga penyakit DBD yang relatif sudah lama dikenal di Indonesia dapat didiagnosa dan dikelola secara tepat sehingga angka kesakitan dan kematian dapat ditekan serendah-rendahnya.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas dapat dirumuskan permasalahan dalam penelitian ini, yaitu :

1. Bagaimana perkembangan virus DEN-3 dalam kultur sel BHK₂₁ *Clone*₁₃?
2. Kapan pengekspresian partikel infeksius dari virus DEN-3 dalam kultur sel BHK₂₁ *Clone*₁₃?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui perkembangan dan model patogenesis virus DEN-3 dalam kultur sel BHK₂₁ *Clone*₁₃ sehingga dapat memberikan gambaran tentang proses terjadinya kerusakan sel yang akhirnya menyebabkan DSS (*Dengue Shock Syndrome*).

1.4. Landasan Teori

Virus dengue masuk ke dalam sel melalui endositosis diperantarai reseptor dan replikasi berlangsung di dalam sitoplasma. Replikasi berjalan agak lambat. Virus ini tidak sepenuhnya menghentikan sintesis protein dan RNA pada sel inang mamalia, serta sama sekali tidak menghentikan aktivitas itu pada sel nyamuk (Fenner *et al.*, 1995).

Perakitan virion pada vertebrata dan nyamuk berlangsung pada membran retikulum endoplasma, tetapi virion yang terbentuk dengan sempurna terdapat dalam sisterna dari retikulum endoplasma dan dilepaskan melalui eksositosis (Rice, 1996).

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian tentang model patogenesa virus dengue pada kultur sel BHK₂₁ *Clone*₁₃ ini diharapkan akan dapat memberikan informasi tentang proses terjadinya kerusakan sel serta sebagai sumbangan ilmiah untuk penelitian selanjutnya sehingga reseptor spesifik dari virus dengue dapat dikarakterisasi dan akhirnya dapat dipakai sebagai pegangan dalam mendiagnosa penyakit-penyakit yang diakibatkan oleh *Flavivirus*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Demam Berdarah Dengue (DBD)

Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah manifestasi klinis yang berat dari infeksi oleh *Arbovirus*. Penyakit ini disebabkan oleh virus dengue, dengan *Ae. aegypti* sebagai vektor utama. Vektor lainnya adalah *Ae. albopictus*, *Ae. scutellaris* dan *Ae. polynesiensis*. Virus yang terhisap nyamuk akan mengadakan replikasi di dalam tubuh nyamuk selama 7-14 hari sebelum dapat ditularkan kepada manusia (Soewondo, 1998).

Penyakit DBD telah menyebar di seluruh dunia, terutama di daerah yang beriklim tropis dan subtropis dengan manifestasi klinis yang bervariasi dan angka kematian yang berlainan. DBD mula-mula banyak menyerang anak, tetapi akhir-akhir ini ada kecenderungan menyerang orang dewasa terutama remaja dan dewasa muda (Wibisono, 1992). Manifestasi klinis yang utama dari penyakit DBD dibagi menjadi 4 derajat yaitu derajat 1 demam disertai gejala tidak khas, derajat 2 tanda-tanda derajat 1 disertai perdarahan spontan di bawah kulit atau di tempat lain, derajat 3 kegagalan sirkulasi dan derajat 4 adalah renjatan berat dengan nadi tidak teraba dan tekanan darah tidak teratur (Harsono, 1992). Gejala-gejala diatas timbul karena adanya respon imun abnormal dan kerusakan pembuluh darah serta dipengaruhi oleh faktor-faktor intrinsik dari sifat-sifat virus dengue (Morens *et al.*, 1991).

2.2. Sejarah DBD di Dunia

Epidemiologi dengue dilaporkan pertama kali di Batavia oleh David Bylon tahun 1779 dan disebut sebagai demam lima hari atau *Saddle Back Fever* (Wibisono, 1992).

Istilah DBD seperti yang dikutip Sumarmo, mula-mula dikemukakan oleh Quintos *et al.* tahun 1954 di Manila, yaitu pada waktu terjadi epidemi demam yang menyerang anak-anak disertai manifestasi perdarahan dan renjatan. Mereka menamakannya *Phillipine Haemorrhagic Fever*, untuk membedakan dari epidemi DBD lain yang sedang diselidiki di Korea dan Manchuria (Sumarmo, 1987).

Di Philipina, sampai tahun 1956 baru dikenal virus DEN-1 dan DEN-2, kemudian pada tahun 1960, berhasil menemukan virus dengue sebagai penyebab penyakit *Phillipine Haemorrhagic Fever*, yang akhirnya dinamakan virus DEN-3 dan DEN-4. Penyebab epidemi ini dinamakan virus DEN-3 dan DEN-4 karena selain berhasil diisolasi dari manusia dan *Ae. aegypti*, juga mempunyai sifat virologis yang mirip dan sifat antigen yang erat dengan virus DEN-1 dan DEN-2 (Sumarmo, 1987).

Hampir selama tiga dekade selanjutnya, DBD telah dilaporkan di Cambodia, Cina, India, Myanmar, Malaysia, Singapura, Vietnam dan beberapa kelompok kepulauan Pasifik. Di Amerika, kasus DBD dilaporkan hampir setiap tahun sejak terjadinya ledakan DBD di Cuba tahun 1981, dimana dari 344.203 kasus yang dilaporkan 10.312 pasien dinyatakan sakit berat, 158 meninggal dan kebanyakan masih anak-anak (WHO, 1997). Di Tahiti dan New Caledonia, kejadian pertama kali

DBD terjadi tahun 1989, sedangkan pada tahun 1990 Srilangka juga melaporkan adanya 935 kasus dengan 54 diantaranya meninggal (Kautner *et al.*, 1997).

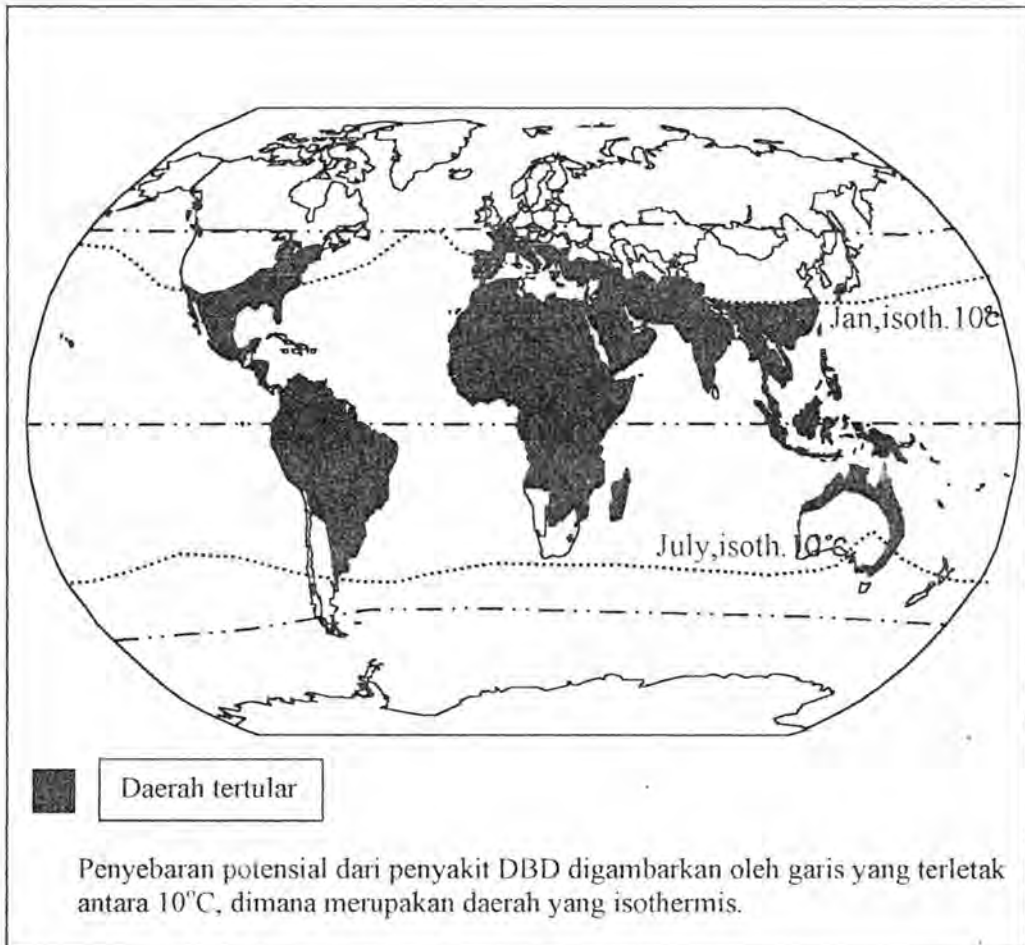
2.3. Sejarah DBD di Indonesia

Di Indonesia, DBD pertama kali dicurigai di Surabaya dan Jakarta pada tahun 1968, tetapi kepastian virologik baru diperoleh tahun 1970. Penyakit ini semakin menyebar luas ke banyak wilayah di Indonesia dan jumlah kasusnya semakin meningkat dari tahun ke tahun. Mula-mula DBD hanya dilaporkan dari kota besar di Jawa saja, tetapi sejak sepuluh tahun terakhir DBD telah dilaporkan dari berbagai kota di luar Jawa bahkan dari tempat yang terisolasi sekalipun. Sampai saat ini, tinggal propinsi Timor Timur yang belum melaporkan adanya penyakit ini (Wuryadi, 1990).

Insiden tertinggi kasus DBD dilaporkan pada tahun 1973 sebanyak 10.189 kasus dan selanjutnya jumlah kasus menurun sampai tahun 1982, kemudian meningkat lagi pada tahun 1983 dan mencapai puncaknya pada tahun 1988 dengan jumlah kasus 47.573. Setelah itu kasus DBD menurun walaupun angka kesakitan masih cukup tinggi. Tahun 1998 kasus DBD kembali meledak dengan jumlah kasus relatif lebih besar dibanding dengan lima tahun sebelumnya (Rantam, 1998).

Dari tahun 1970-1990, lebih dari 90% kasus DBD terjadi pada anak berumur 15 tahun, yang sebagian besar berumur 6-7 tahun (Wibisono, 1992). Tetapi sebaliknya pada tahun 1995, 60% dari semua kasus terjadi pada orang dewasa yang berumur lebih dari 15 tahun dan pada semester pertama (bulan Januari-April 1998)

kejadian kasus DBD di Indonesia yang meninggal sudah mencapai 2,6% dari semua kasus anak sampai orang dewasa (Rantam, 1998).



Gambar 1. Perkiraan Daerah yang Berpotensi bagi Penyebaran *Ae. aegypti*
Sumber : WHO, 1997.

2.4 Virus Dengue

Virus dengue termasuk virus RNA tipe kecil, mempunyai amplop dan merupakan anggota kelompok *arthropoda-borne virus* grup B, yang pada taksonomi baru dimasukkan dalam kelompok *Flavivirus* (Wibisono, 1992). Terdiri dari empat serotipe (DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4) yang serupa, tetapi sifat antigeniknya tidak sama. Infeksi pada salah satu serotipe hanya akan memberikan kekebalan seumur hidup untuk serotipe tersebut, tetapi tidak memberikan kekebalan silang total untuk serotipe yang lainnya, sehingga di daerah endemis dengue seseorang dapat terinfeksi dengan keempat serotipe tersebut (Soewondo, 1998). Melalui uji HI masing-masing serotipe mempunyai reaksi silang yang kuat yang mampu mengaglutinasi sel darah merah kelinci dan angsa, serta patogen untuk bayi tikus (Wibisono, 1992 ; Rantam, 1998).

Struktur virus dengue sferik dengan diameter kurang lebih 60 nm, nukleokapsidnya helikal. Komposisi virionnya terdiri dari 6% RNA, 66% protein, 9% karbohidrat dan 17% lemak (Rantam, 1998). Genomnya tersusun dari tiga protein struktural yaitu C (*capsid*), Pre-M (*pre-membrane*) yang akhirnya terungkap menjadi M (*Membrane*) dan E (*envelope*), serta tujuh protein non struktural (NS) yaitu NS₁, NS_{2a}, NS_{2b}, NS₃, NS_{4a}, NS_{4b}, NS₅ (Kurane dan Ennis, 1992).

Virus dengue dapat berkembang biak didalam tubuh beberapa spesies nyamuk, darah manusia dan kultur jaringan. Virus ini mampu hidup pada suhu 4°C dalam beberapa minggu dan pada suhu -70°C dalam beberapa tahun (Harsono, 1992),

tetapi virus ini bersifat termolabil dan dapat dimusnahkan dalam natrium dioksilat dan dietil ester (Wibisono, 1992).

2.5 Sifat Biologis pada Kultur Sel

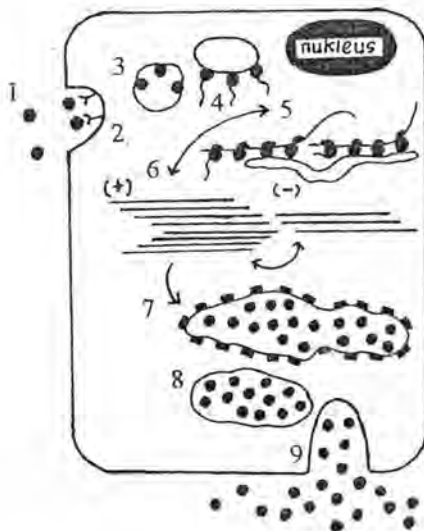
Pada kultur sel, virus dengue dapat menimbulkan *cytopathogenic effect* (CPE), tetapi hal ini tergantung pada tipe sel. Pada sel vertebrata dapat terjadi CPE dan perubahan struktur termasuk vakuolisasi dan proliferasi membran intraseluler, tetapi pada umumnya penginfeksi virus pada sel bersifat sitosidal meskipun pada beberapa virus tidak menunjukkan CPE. Pada biakan sel arthropoda dapat menimbulkan CPE tetapi sebagian besar hanya terlihat adanya sel fusi dan syncytium, sedangkan pada sel nyamuk sering CPE tidak terlihat (Rantam, 1998).

2.6. Daya Ikat dan Saat Infeksi Awal Virus Dengue

Patogenesis infeksi virus dengue sampai sekarang baru sedikit diketahui dan tidak banyak informasi tentang dasar-dasar molekuler tentang pengikatan virus dengue pada target sel. Begitu pula spesifik reseptor seluler glikoprotein pada virion belum teridentifikasi.

Mekanisme yang mungkin dapat diterima untuk saat ini, bagaimana proses daya ikat dan proses awal infeksi virus dengue pada sel adalah tergantung adanya *Antibody Dependent Enhancement* (ADE). Setelah terjadi pengikatan virion diambil oleh *Reseptor Mediated Endocytosis* (RME), akhirnya terjadi fusi secara langsung pada membran plasma. Selanjutnya terjadi pelepasan selubung dari nukleokapsid dan

translasi genom RNA (Rice, 1996). Proses di atas yang berfungsi adalah protein E yang terjadi pada pH rendah karena dapat mendorong fusi virion dengan membran plasma (Rantam, 1998).



Keterangan gambar :

1. Pengikatan
2. Endositosis Diperantarai Reseptor
3. Fusi membran pada pH rendah
4. Pelepasan selubung
5. Translasi dan proses pembentukan poliprotein
6. Replikasi RNA pada membran
7. Pembentukan virion dalam vesikel interseluler
8. Transpor virion yang mengandung glikoprotein matang
9. Fusi vesikel pada membran plasma : virion dikeluarkan

Gambar 2. Strategi Replikasi Virus Dengue
Sumber : Rice, 1996

2.7. Isolasi Virus

Pada otopsi yang dilakukan terhadap pasien-pasien yang meninggal karena kasus DBD, ternyata terserangnya hati merupakan salah satu tanda yang karakteristik dari DBD karena antigen virus dengue lebih banyak ditemukan di dalam sel-sel hepatosit, sel kupffer dan sel endotelial dari lapisan sublobular hati (Innis, 1995). Virus juga telah berhasil diisolasi dari sumsum tulang, otak, jantung, ginjal serta saluran pencernaan (WHO, 1997).

Virus DEN-1 dan DEN-2 berhasil diisolasi dengan menyuntikkan darah penderita DBD pada anak tikus muda secara intrakutan, sedangkan virus DEN-3 dan DEN-4 diisolasi langsung menggunakan anak tikus putih yang disuntik intraserebral dengan darah penderita DBD (Sumarmo, 1987). Selain tikus putih, untuk mengisolasi virus dengue dapat pula dipakai kultur sel LLCMK₂ (*Lili Laboratory Cell Monkey Kidney*), kultur sel nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (sel C₆/36), BHK₂₁ Clone₁₃, sel ginjal kera (sel vero) dan sel arthropod (WHO, 1997).

Menurut Paul (1975), penggunaan kultur jaringan untuk isolasi, harus memperhatikan adanya beberapa variabel, antara lain yang paling peka adalah sterilitas jaringan untuk isolasi. Biasanya dilakukan dengan cara menambahkan preparat antibiotik seperti *Penicillin*, *Streptomycin* dan *Mycostatin*. Disamping itu sensitivitas isolasi tergantung pada serotipe virus, macam kultur jaringan, asal kultur jaringan, jumlah pasase dalam kultur jaringan dan lain-lain (Sumarmo, 1987).

Isolasi virus dengue pada Pusat Penelitian dan Pengembangan Depkes RI dilakukan dengan teknik penyuntikan pada nyamuk *Ae. aegypti* jantan, tetapi sejak tahun 1983 dipakai nyamuk *Toxorhynchites amboinensis*, sedangkan identifikasi virus dilakukan dengan teknik fluoresen. Bahan pemeriksaan adalah darah penderita, jaringan baik melalui biopsi maupun otopsi. Suharyono melaporkan selama tahun 1988 telah mengisolasi keempat serotipe dengue, dimana DEN-3 merupakan serotipe yang dominan (40%), DEN-2 (38%), DEN-1 (11%) dan DEN-4 (4%). DEN-3 merupakan serotipe yang paling banyak berhubungan dengan kasus yang berat dan kematian, sedangkan DEN-4 merupakan serotipe yang paling sedikit

diisolasi dan hanya terdapat pada derajat yang rendah yaitu derajat I dan II. Pada derajat yang lebih berat yaitu derajat IV dengan manifestasi klinik syok semuanya DEN-3, dimana semua kasus dari derajat IV ini meninggal (Wibisono, 1992).

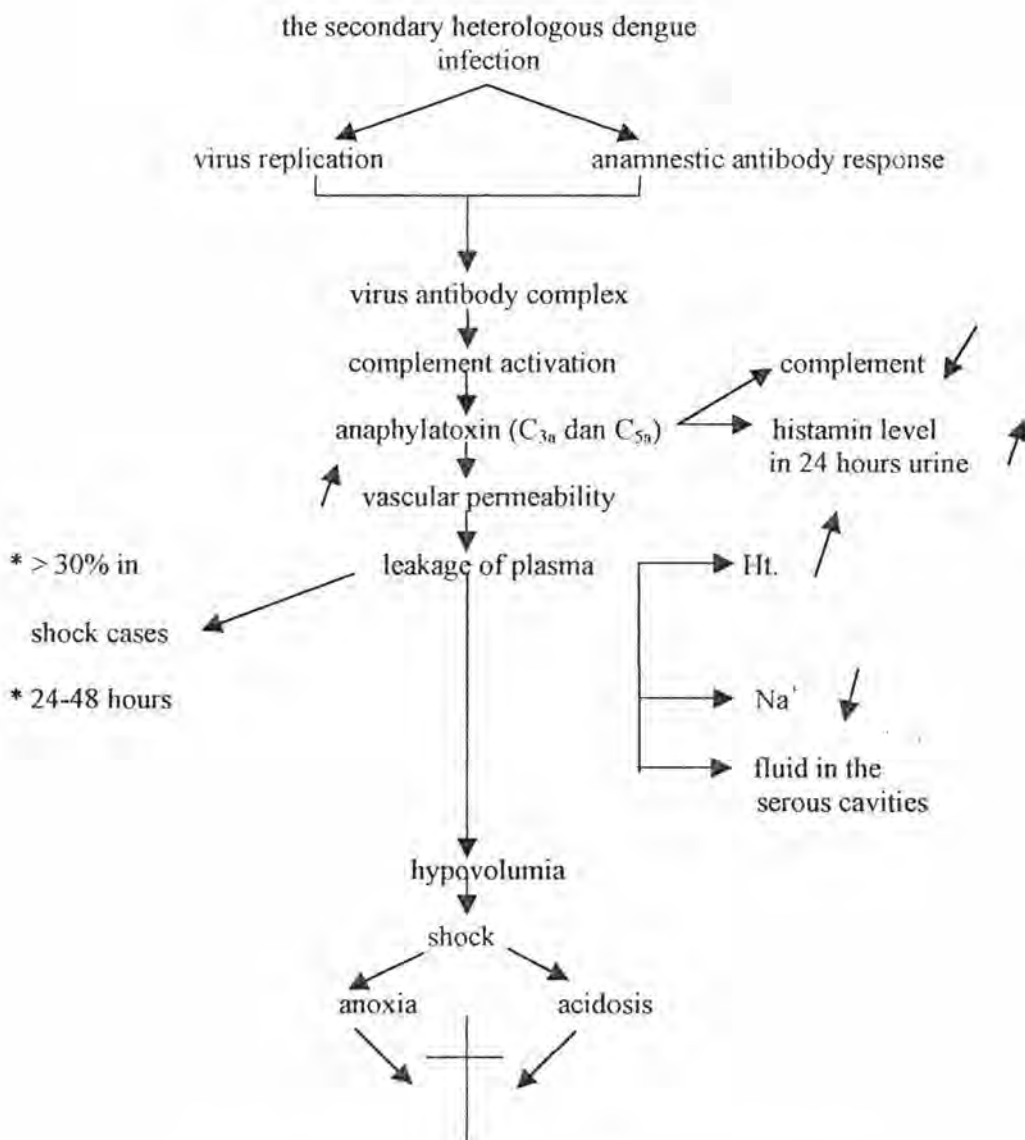
2.8. Patogenesis DBD

Mekanisme sebenarnya tentang patofisiologi, hemodinamika dan biokimia DBD hingga kini belum diketahui secara pasti. Tetapi diduga bahwa proses imunopatologi memegang peranan dalam patogenesis penyakit ini.

Virus masuk ke dalam tubuh melalui gigitan nyamuk dan infeksi pertama kali akan menimbulkan reaksi tubuh yang biasa terlihat pada infeksi oleh virus. Reaksi yang sangat berbeda akan tampak, bila seseorang mendapatkan infeksi berulang dengan tipe virus dengue yang berlainan. Berdasarkan hal itu, timbullah yang disebut *the secondary heterologous infection* atau *sequential infection hypothesis*. Hipotesis ini menyatakan bahwa DBD dapat terjadi apabila seseorang setelah terinfeksi dengue pertama kali mendapat infeksi berulang dengan tipe virus dengue yang berlainan. Didukung oleh beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa hampir semua (90%) kasus DBD, ternyata telah mempunyai kekebalan (IgG) terhadap virus dengue sebelumnya (infeksi primer) (Soewondo, 1998). Adanya reinfeksi ini akan menyebabkan suatu reaksi anamnestic antibodi, sehingga menimbulkan konsentrasi kompleks antigen-antibodi yang tinggi (Wibisono, 1998).

Kompleks antigen-antibodi yang terbentuk akan mengaktifasi sistem komplemen, yang berakibat dilepaskannya C_{3a} dan C_{5a} anafilatoksin. Pelepasan C_{3a}

dan C_{5a} menyebabkan meningkatnya permeabilitas dinding pembuluh darah dan mengalirnya plasma melalui endotel dinding tersebut, dimana keadaan ini sangat berperan terhadap terjadinya renjatan (Suvette, 1977).



Gambar 3. Patogenesis Terjadinya Renjatan pada DBD
 Sumber : Suvette, 1977

2.9. Diagnosa Laboratorium

Penyakit akibat infeksi virus dengue telah lama diketahui, namun diagnosa konfirmatif tetap merupakan masalah karena memerlukan waktu yang cukup lama, proses pemeriksaan yang cukup berbelit, disamping biaya yang cukup mahal.

Deteksi terhadap antigen virus didasarkan kepada interaksi langsung antara virion atau antigen virus, *in situ* pada jaringan dan pada ekskresi atau sekresi, antibodi spesifik yang telah diberi tanda sebelumnya dengan cara tertentu untuk memungkinkan pengenalan interaksi. Uji yang menggunakan metode ini adalah uji ELISA (*Enzym Linked Immunosorbent Assay*), uji immunofluoresensi ataupun uji immunoperoksidase. Antigen virus juga dapat dideteksi melalui prosedur serologis lain yang cepat yaitu uji pengikatan komplemen (*CF-test*), uji hambatan aglutinasi (*HI-test*), uji netralisasi (*N-test*) serta uji Reaksi Rantai Polimerase (PCR) (Fenner *et al.*, 1995). Uji PCR ini sudah mulai banyak digunakan laboratorium untuk mendeteksi virus dengue karena meskipun biayanya mahal tetapi metode ini mempunyai sensitibilitas yang tinggi sehingga diagnosa DBD lebih dapat ditegakkan (Morita, 1999).

Di lain pihak, kemajuan di dalam teknik isolasi virus telah banyak memberi harapan, hanya perlu ditunjang oleh cepat dan tepatnya identifikasi virus penyebabnya (Adi dan Wuryadi, 1990), karena isolasi virus merupakan satu-satunya metode yang dapat mendeteksi dengan mengidentifikasi virus yang tidak diketahui sebelumnya atau bahkan menemukan agen yang sepenuhnya baru (Fenner *et al.*, 1995).

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai tanggal 30 Oktober 1998 sampai dengan 23 Februari 1999, di Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan dan di Laboratorium Virus Dengue *Tropical Disease Center* (TDC), Universitas Airlangga Surabaya.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Bahan Kimia

Tripsin 0,25 %, PBS (*Phosphat Buffer Saline*), alkohol 70%, aseton -70°C , FITC (*Fluorescein Isothiocyanat*), rodamin, antibodi anti dengue, *foetal calf serum* (FCS), gliserin dan aquades.

3.2.2. Media

Media yang digunakan adalah *Minimum Essential Medium* (MEM). MEM merupakan medium dasar yang tersusun dari BSS (*Ballanced Salt Solution* = Larutan Garam Serasi), asam amino essensial dan macam-macam vitamin. Pada media ini juga ditambahkan serum dan antibiotika.

3.2.3. Virus dengue serotipe 3 (DEN-3)

Virus DEN-3 diperoleh dari hasil isolasi darah pasien yang sakit DBD di rumah sakit Dr. Soetomo Surabaya yang merupakan isolat Laboratorium Dengue *Tropical Center Disease* (TDC) dan isolat dari US-NAMRU-2 (*United State Naval Medical Research Unit No.2*).

3.2.4. Sel BHK₂₁ (*Baby Hamster Kidney*) Clone₁₃

Sel BHK₂₁ Clone₁₃ yang didapat dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya ini merupakan *established cell line* yang dibuat dari ginjal anak hamster yang telah dipasase berpuluh-puluh kali dari *Capstick 62*, sehingga sifat selnya tidak mudah berubah lagi.

3.2.5. Sel Astrosit

Sel astrosit yang didapat dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya ini merupakan *established cell line* yang didapat dari otak anak mencit tipe protoplasmik.

3.2.6. Antiserum

Antiserum didapat dari darah kelinci yang telah diinfeksi virus DEN-3 dengan dua kali penyuntikan interval 10 hari masing-masing sebanyak 1 m.o.i. (*multiplicity of infection*) kemudian darah diambil melalui vena telinga, 21 hari setelah penyuntikan untuk mendapatkan titer antibodi tertinggi.

3.2.7. Peralatan penelitian

Petridish (ukuran 6cm dan 9cm), gelas Beker, gelas ukur (50 ml, 100 ml), pipet (1 ml, 5 ml, 10 ml), *multi channel pipette* (0,025 ml; 0,050 ml; 0,100 ml), gelas obyek, *cover slip*, inkubator CO₂, mikroskop inverted, mikroskop fluoresen, sentrifus, tabung sentrifus, *unit steril laminar flow hood*, *water bath*, *autoclave*, *freezer*, lemari es, pemutar magnet, magnet batang dan aluminium foil.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Sterilisasi ruang dan peralatan

Sterilisasi ruang menggunakan campuran larutan formalin 40% dan KMNO₄ (pa). Campuran tersebut diletakkan dalam ruangan yang akan dipakai untuk pelaksanaan penelitian, kemudian ruangan ditutup rapat selama kira-kira 24 jam.

Untuk sterilisasi peralatan yang tahan panas digunakan *autoclave* 121°C . Semua peralatan dibungkus dengan aluminium foil kemudian dimasukkan ke dalam *autoclave* selama 15 menit, sedangkan untuk peralatan-peralatan yang tidak tahan panas seperti inkubator, *laminar flow* disterilisasi dengan menggunakan alkohol 70%.

3.3.2. Perbanyakan sel monolayer BHK₂₁

Sel BHK₂₁ sebelumnya dipelihara dulu dalam medium MEM yang mengandung 10% FCS supaya bisa didapatkan konsentrasi sel seperti yang diharapkan. Perbanyakan ini dilakukan sampai dengan 8 kali pasase.

Setiap perbanyakkan sel BHK₂₁ yang perlu diperhatikan adalah umur sel BHK₂₁, persentase pertumbuhan dan sterilitas bahan. Umur sel yang paling baik adalah tidak lebih dari 48 jam dan persentase pertumbuhan lebih dari 80%. Bila persentase sel tersebut telah tercapai, maka perbanyakkan sel BHK₂₁ bisa dimulai. Caranya, media yang lama dibuang sampai habis, dicuci dengan PBS, setelah itu dilakukan tripsinasi yaitu dengan menambahkan larutan tripsin 0,25% dan dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ selama 5 menit. Kemudian ditambahkan medium MEM, dicampur dengan menggunakan pipet agar sel BHK₂₁ yang bergerombol dapat lepas satu persatu. Suspensi sel tersebut kemudian dibagi menjadi beberapa *petridish* dan masing-masing *petridish* ditambahkan media MEM. Selanjutnya masing-masing *petridish* diberi kode BHK₂₁/no.pasase/tanggal/nama pemilik dan diinkubasikan pada inkubator CO₂ selama 48 jam (Fujita *et al.*, 1997).

Adanya pertumbuhan sel dari tiap-tiap *petridish* diamati secara mikroskopis setiap hari untuk melihat penyebaran sel. Hal ini penting juga untuk mengetahui apakah sel terkontaminasi atau tidak.

3.3.3. Penanaman Sel BHK₂₁ pada *Cover Slip*

Bila persentase BHK₂₁ lebih dari 80% maka sel sudah bisa dipasase lagi. Pada pasase yang ke-9 ini, prosedurnya sama seperti sebelumnya, dimana setelah media lama dibuang dan dicuci dengan PBS, selanjutnya dituangi tripsin 0,25% dan diinkubasikan pada inkubator CO₂ selama 5 menit sehingga semua sel lepas dari dinding *petridish*. Kemudian ditambahkan medium MEM dan dicampurkan dengan

menggunakan pipet sehingga sel lepas satu sama lain. Suspensi sel yang telah dibuat kemudian dibagi ke dalam beberapa *petridish* yang telah berisi *cover slip* steril. Kemudian ditambahkan medium MEM dan digoyang-goyangkan sedikit agar sel bisa tumbuh merata terutama pada daerah *cover slip*. Setiap *petridish* diberi kode dan diinkubasikan kembali pada inkubator CO₂ selama 48 jam (Rantam dkk., 1998).

Kode yang ditulis pada *petridish* diberi tambahan kode lama inkubasi, yang diperlukan nanti pada saat inokulasi virus, berturut-turut adalah 2, 6, 12, 24, 48 dan 72 jam.

3.3.4. Inokulasi virus DEN-3 pada kultur sel monolayer BHK₂₁

Sel BHK₂₁ yang telah memperlihatkan persentase pertumbuhan lebih dari 80% dapat dipakai untuk inokulasi virus. Setiap *petridish* diinokulasi dengan virus DEN-3 ± 300 µl/0,3 ml, terutama pada daerah *cover slip*. Kemudian media biakan yang telah diinfeksi diinkubasikan pada inkubator CO₂. Lama inkubasi sesuai dengan kode yang tertera pada setiap *petridish*, yaitu untuk waktu 2, 6, 12, 24, 48 dan 72 jam. Sebagai pembanding juga dilakukan penginfeksian virus DEN-3 pada sel astrosit, 48 jam pasca inokulasi.

3.3.5. Fiksasi sel

Cover slip dari tiap-tiap *petridish* diambil sesuai dengan lama inkubasi, kemudian dilakukan fiksasi sel. Caranya, *cover slip* diambil dari *petridish* dalam

keadaan steril dengan menggunakan pinset dan jarum. Selanjutnya, *cover slip* direndam dalam aseton -70°C selama 15 menit, *cover slip* diambil dan dikeringkan dengan udara bebas diatas kertas tisu, dengan posisi sel menghadap ke atas. Selanjutnya disimpan dalam suhu -20°C atau langsung dilakukan uji ***Fluorescent Antibody Test*** (Rantam dkk., 1998).

3.3.6. Uji *Fluorescent Antibody Test* (FAT)

Uji FAT yang digunakan adalah *direct* FAT. Caranya, sel pada *cover slip* yang telah difiksasi dicuci dengan PBS yang mengandung 1%FCS selama 15 menit. Selanjutnya *cover slip* diangkat pelan-pelan dengan bantuan pinset dan jarum, diletakkan pada gelas obyek yang sebelumnya telah ditetesi 20 μl antibodi anti dengue pengenceran 1:10, dengan posisi menghadap ke cairan serum. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 45 menit pada keadaan yang basah, yaitu dengan memakai tisu basah sebagai alas gelas obyek.

Selanjutnya, *cover slip* dicuci dengan PBS + 1% FCS selama 15 menit. Sementara itu, disiapkan terlebih dahulu FITC (*Fluorescein Isothyocyanat*) dengan pengenceran 1:80 dan ditetaskan pada gelas obyek sebanyak *cover slip* yang diperiksa, masing-masing 20 μl . Kemudian *cover slip* diletakkan diatasnya dengan posisi sel menghadap ke cairan FITC dan diinkubasikan kembali pada suhu 37°C selama 45 menit dalam keadaan basah. *Cover slip* kemudian dicuci lagi dalam PBS + 1% FCS selama 15 menit dan diletakkan pada gelas obyek yang telah ditetesi

masing-masing 20 µl gliserin. Selanjutnya sel sudah bisa diperiksa dibawah mikroskop fluoresen (Rantam dkk., 1998).

3.3.7. Pengamatan

Sel terinfeksi DEN-3 yang telah diuji FAT, diperiksa di bawah mikroskop fluoresen dan diamati pada setiap masa inkubasi, kemudian gambar diambil dengan pembesaran 40 kali. Adanya penyebaran virus di dalam sel dapat dilihat dari pendar fluoresen yang dipancarkan, dimana untuk pewarnaan isothiocyanat pendar yang dihasilkan berwarna kuning kehijauan, sedangkan untuk pewarnaan rodamin berwarna merah terang. Cara membedakan adanya sel yang terinfeksi dengan artefak, sangat diperlukan adanya ketelitian. Pada sel yang terinfeksi, pendar fluoresen yang dipancarkan sangat terang dan halus, sedangkan pada artefak sinar yang dipancarkan redup dan tidak beraturan.

Adanya pendar fluoresen ini timbul akibat terjadinya ikatan antara antibodi (Ab) yang berlabel FITC atau rodamin terhadap antigen (Ag) virus. Ab berlabel hanya akan berikatan dengan Ag khusus, sehingga fluoresen yang terlihat pada mikroskop fluoresen menunjukkan adanya Ag pada material yang diperiksa (Fenner *et al.*, 1995).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Berdasarkan penelitian yang dilaksanakan, telah didapatkan suatu model patogenesa virus DEN-3 yang diinokulasikan pada sel monolayer BHK₂₁ *Clone*₁₃, dengan masa inkubasi yang berbeda kemudian dilakukan uji FAT langsung dan diperiksa di bawah mikroskop fluoresen. Hasil yang didapat dari penelitian ini ditunjukkan pada gambar 4 sampai 12.

Pada sel yang diinokulasi virus DEN-3 dan diinkubasikan selama 2 jam pasca inokulasi, seperti yang tampak pada gambar 4, ternyata belum didapatkan adanya pendar hijau fluoresen dan sel masih terlihat normal. Begitu pula pada gambar 5, dimana sel telah diinkubasikan selama 6 jam pasca inokulasi, meskipun sudah terdapat pendar hijau fluoresen, tetapi terlihat sel-sel di sekitarnya masih banyak yang sehat. Fluoresen yang ditunjukkan tersebut berupa dua titik terang kehijauan, yang berarti sudah dimulainya penginfeksi virus di dalam sel, meskipun baru sedikit. Jumlah sel yang terinfeksi semakin bertambah banyak dibandingkan sebelumnya, yaitu untuk waktu 12 jam pasca inokulasi (gambar 6), terbukti dengan bertambahnya pendar fluoresen yang ditimbulkan. Kemudian pada sel yang telah diinkubasikan selama 24 jam pasca inokulasi, di dalam satu sel sudah terlihat adanya pendar fluoresen yang agak banyak. Keadaan ini menunjukkan bahwa sel sudah benar-benar sakit karena virus DEN-3 telah berhasil mengadakan replikasi di dalam sitoplasma (gambar 7). Tingkat kesakitan sel ini semakin meningkat pada sel yang diinkubasikan

selama 48 jam pasca inokulasi, seperti yang ditunjukkan pada gambar 8. Saat ini, bentuk sel sudah mulai berubah dan terlihat di dalam satu sel telah terlihat pendar fluoresen yang semakin banyak dan semakin menebal. Virus DEN-3 telah bereplikasi dengan baik sehingga protein dapat diekspresikan secara sempurna. Terlihat juga bahwa seluruh sitoplasma sel memperlihatkan adanya "*cloudy swelling*".

Akhirnya, pada sel yang diinkubasikan selama 72 jam pasca inokulasi menunjukkan semakin berkurangnya pendar hijau fluoresen di dalam sel, sedangkan seluruh sitoplasma masih terdapat "*cloudy swelling*" (gambar 9). Saat ini, sel sudah banyak yang berubah bentuk dan hilangnya sebagian pendar fluoresen tersebut menunjukkan bahwa virus sudah mulai melepaskan diri dari sel dan keluar untuk menginfeksi sel-sel sehat di sekitarnya.

Ternyata, dari semua model patogenesis yang tampak, menunjukkan bahwa virus DEN-3 tidak menunjukkan adanya CPE. Berarti, pada masa inkubasi 2 jam sampai 72 jam virus DEN-3 belum menyebabkan kerusakan pada sel BHK₂₁ Clone₁₃.

Sebagai pembanding, ditunjukkan pada gambar 10, yaitu biakan sel BHK₂₁ yang normal. Kelihatan bahwa sel-selnya tumbuh merata dengan bentuk sel yang panjang. Disertakan pula biakan sel astrosit yang telah diinfeksi virus DEN-3 48 jam pasca inokulasi, juga dengan perlakuan FAT langsung pewarnaan isothiocyanat dan rhodamin (gambar 11 dan 12). Terlihat sel astrosit yang berbentuk bulat-bulat, dimana pada sel yang terinfeksi terlihat pendar-pendar sinar fluoresen yang memenuhi sitoplasma.



Gambar 4
Imunofluoresensi dari Sel BHK₂₁ *Clone*₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i. dengan Masa Inkubasi 2 Jam Pasca Inokulasi, Menunjukkan Sel BHK yang Normal



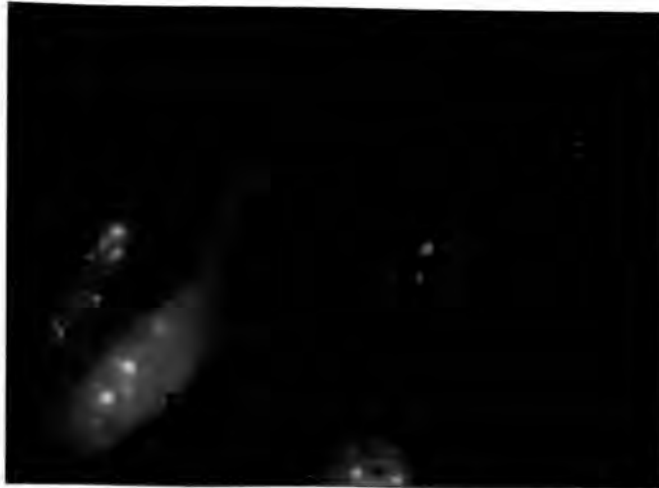
Gambar 5
Imunofluoresensi dari Sel BHK₂₁ *Clone*₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i. dengan Masa Inkubasi 6 Jam Pasca Inokulasi. Antigen Diidentifikasi dari Pendar Fluor dari Isothiocyanat Fluoresen yang Berwarna Hijau Terang
(A: Sel Normal, B: Sel Terinfeksi)



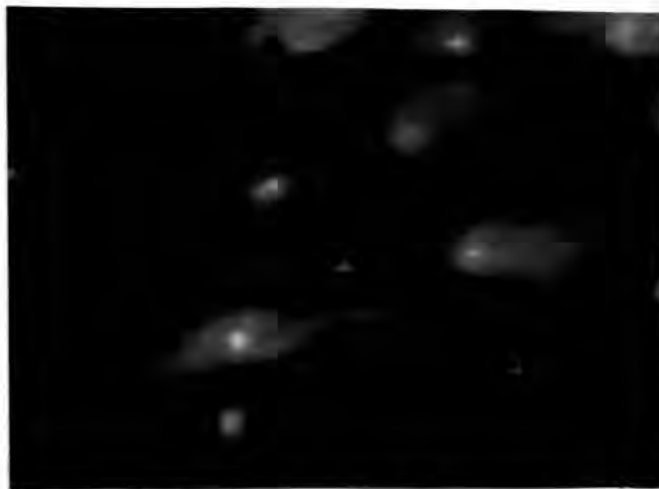
Gambar 6
Imunofluoresensi dari Sel BHK₂₁ Clone₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i.
dengan Masa Inkubasi 12 Jam Pasca inokulasi



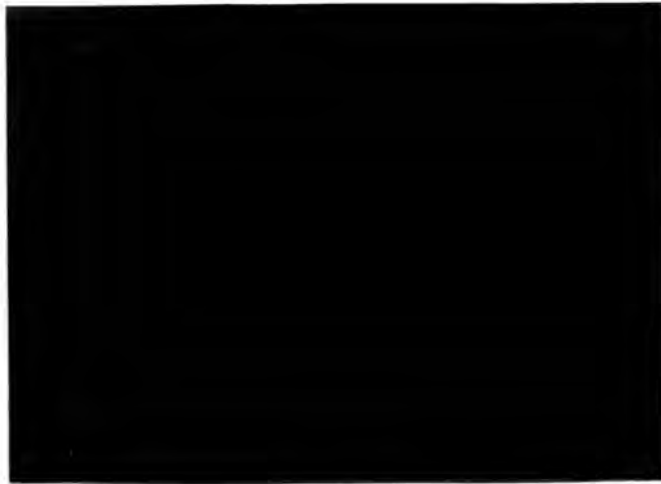
Gambar 7
Imunofluoresensi dari Sel BHK₂₁ Clone₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i.
dengan Masa Inkubasi 24 Jam Pasca inokulasi



Gambar 8
Imunofluoresensi dari Sel BHK₂₁ Clone₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i.
dengan Masa Inkubasi 48 Jam Pasca inokulasi



Gambar 9
Imunofluoresensi dari Sel BHK₂₁ Clone₁₃ yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i.
dengan Masa Inkubasi 72 Jam Pasca inokulasi



Gambar 10
Sel BHK Normal, Terlihat Bentuk Sel Monolayer yang Teratur



Gambar 11
Imunofluoresensi dari Sel Astrosit yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i.
dengan Masa Inkubasi 48 Jam Pasca Inokulasi



Gambar 12
Imunofluoresensi dari Sel Astrosit yang Terinfeksi Virus DEN-3 1 m.o.i.
dengan Masa Inkubasi 48 Jam Pasca Inokulasi. Antigen yang Diidentifikasi dari
Pendar Fluor Rhodamin Fluoresen yang Berwarna Merah terang

BAB V

PEMBAHASAN

Virus dengue sebagai penyebab DBD terdiri dari 4 serotipe yang mempunyai sifat antigenik berlainan. Keempat serotipe ini terdapat di Indonesia dan dilaporkan bahwa tipe virus DEN-3 lebih sering menimbulkan wabah (Sumarmo, 1987). Virus ini sangat patogen dan mempunyai reaksi silang yang kuat satu sama lain dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Menurut Halstead (1984, 1988), DBD terjadi karena adanya ADE (*Antibody Dependent Enhancement*) pada replikasi virus yang terbentuk setelah terjadi kekebalan akibat infeksi virus dengue heterotipik (Despres *et al.*, 1993). Hebatnya penyakit ini juga dihubungkan dengan sifat biologis dari virus dengue (Rosen, 1987 ; Morens *et al.*, 1991)

Virus dengue bereplikasi pada berbagai kultur sel primer dan penerus dari jaringan mamalia, avian dan arthropod (Kuno *et al.*, 1985). Seperti pada sel BHK₂₁, ternyata virus DEN-3 juga dapat tumbuh pada kultur sel astrosit dan bereplikasi dengan baik pada kultur sel tersebut, sehingga membuktikan bahwa virus DEN-3 juga menyerang saraf. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan Depres *et al.* tahun 1993 bahwa virus DEN-3 mempunyai tendensi yang sangat kuat terhadap patogenesisnya yaitu *neurovirulence* dengan target selnya adalah sistem saraf pusat. Kesimpulan ini didapat setelah dilakukan penelitian dengan menginfeksi mice melalui intraserebral, dimana setelah 12 hari diinfeksi DEN-3 akan terjadi neurolisis dengan manifestasi encephalitis.

Adanya reseptor spesifik di dalam sel mungkin akan meningkatkan partikel tropisma sel, yang mengarah pada semakin bervariasinya manifestasi klinis dari DBD. Pelekatan virus pada permukaan sel inang, yang merupakan langkah awal penginfeksian virus dengue belum dapat dikarakterisasi, begitu pula reseptor selular yang spesifik dari virus dengue (Marianneu *et al.*, 1996)

Diketuainya model patogenesis virus DEN-3 pada sel BHK₂₁ Clone₁₃ dapat dijadikan sebagai pengetahuan mengenai proses terjadinya kerusakan sel akibat infeksi virus DEN-3, yang diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai usaha untuk mengembangkan teknik diagnosa laboratorium secara cepat dan tepat sehingga masalah penyakit DBD dapat ditanggulangi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa adanya perbedaan masa inkubasi pada sel-sel yang telah diinokulasi dengan virus DEN-3 berpengaruh terhadap penyebaran virus di dalam sel, yang terus meningkat dengan semakin lamanya masa inkubasi. Adanya tingkatan dalam penyebaran virus ini terjadi karena berlangsungnya proses replikasi virus dengue di dalam sel.

Virus dengue bereplikasi di dalam sitoplasma dan proses awal dari replikasi diawali dengan pelekatan virus pada sel inang. Jadi pada masa inkubasi 2 jam pasca inokulasi, virus diperkirakan baru mengalami tahap pelekatan. Saat ini virus belum dapat dideteksi, sehingga di bawah mikroskop fluoresen sel masih terlihat normal. Fase pelekatan ini sangat penting karena untuk dapat menimbulkan infeksi, partikel virus harus mampu mengikat sel. Ligan yang terdapat pada permukaan molekul yang khusus dari virion akan mengikat reseptor pada membran sel (Fenner *et al.*, 1995).

Menurut Guirakhoo *et al.* (1991), protein virus mempunyai peranan penting dalam melekatkan virus ke membran sel. Lebih lanjut, Anderson *et al.* (1992) mengamati bahwa pengikatan protein E virus dengue pada permukaan sel reseptor berhubungan dengan kerentanan sel terhadap infeksi virus. Kemungkinan lain mengenai proses pelekatan ini adalah akibat gaya elektromagnetik antara bagian-bagian komplementer pada membran sel, yang sangat dipengaruhi oleh perubahan pH dalam medium dan adanya ion-ion Ca dan Mg (Ernawati dan Soelistyanto, 1991).

Setelah terjadi pelekatan dan virion diambil oleh endositosis diperantarai reseptor maka virus akan mengelompok pada celah khlatrin yang masuk ke dalam sitoplasma. Sesudah selubung khlatrin dihilangkan, akan bergabung dengan endosom (merupakan vakuola preliosom yang bersifat asam), yang akhirnya berlanjut dengan pelepasan nukleokapsid virus ke dalam sitoplasma (Rice, 1996).

Setelah pelepasan selubung, maka dengan segera virus akan berikatan dengan ribosom. Hal ini, diperkirakan dialami oleh virus DEN-3 masa inkubasi 6 jam pasca inokulasi. Saat ini, virus yang berhasil menginfeksi sel masih sangat sedikit sehingga protein yang diekspresikan juga sedikit, seperti tampak pada gambar 5.

Jumlah sel yang terinfeksi virus DEN-3 semakin meningkat pada masa inkubasi 12 jam pasca inokulasi, begitu pula protein yang diekspresikan. Tetapi sampai saat ini pun, virus diperkirakan baru mencapai ribosom. Jadi pada masa inkubasi 6 jam dan 12 jam pasca inokulasi, virus diperkirakan baru mencapai ribosom dan belum mengadakan perakitan virion. Hal ini bisa terjadi karena kemampuan setiap virus untuk menimbulkan infeksi pada sel adalah berbeda-beda, tergantung

pada lingkungan di dalam medium misalnya pH ataupun afinitas antara tempat-tempat pelekatan virus dan adanya reseptor. Akibatnya, proses penginfeksi virus pada sel memakan waktu yang berbeda (Ernawati dan Soelistyanto, 1991).

Genom virus dengue terdiri atas satu molekul ssRNA berpolaritas positif. Replikasi meliputi sintesis dari molekul komplementer beruntai negatif, yang selanjutnya bertindak sebagai cetakan dalam sintesis molekul untai positif yang lebih banyak lagi (Rice, 1996).

RNA genom yang terbentuk langsung bertindak sebagai mRNA, sehingga dapat berikatan langsung dengan ribosom tanpa mengalami tahapan transkripsi sebelumnya. Di dalam ribosom dengan segera akan terjadi translasi (Rice, 1996). Hasil translasi adalah terbentuknya protein yang mengakhiri asam nukleat sel, sintesis protein-protein yang mengatur ekspresi dari genom virus dan pembentukan enzim yang dibutuhkan untuk replikasi asam nukleat virus (Fenner *et al.*, 1995). Protein-protein yang terbentuk seperti tiga protein struktur (C, PrM yang akhirnya terungkap menjadi M dan E), dan sejumlah protein tidak berstruktur (NS₁, NS_{2A}, NS_{2B}, NS₃, NS_{4a}, NS_{4B}, NS₅) mempunyai fungsi masing-masing dalam proses replikasi virus selanjutnya (Kurane dan Ennis, 1992).

Proses replikasi ini terus berlanjut dengan tahap perakitan virion. Perakitan berlangsung di dalam membran retikulum endoplasma, namun virion terbentuk dengan sempurna pada sisterna dari retikulum endoplasma (Rice., 1996). Sebelumnya protein viral dan asam nukleat disintesis secara terpisah. Bila sintesis asam nukleat dan protein dimulai, maka perakitan protein kapsid berlangsung di sekeliling asam

nukleat. Tahap selanjutnya adalah pematangan, dimana pada tahap ini terbentuklah partikel-partikel virus baru. Protein dan asam nukleat viral yang baru terbentuk akan bergabung. Selesainya proses pematangan ini ditunjukkan pada biakan sel yang telah diinokulasi virus DEN-3 24 jam pasca inokulasi. Mulai saat ini dan selanjutnya, partikel virus progeni diproduksi secara teratur, sehingga terlihat pada 48 jam pasca inokulasi, replikasi virus dengue terlihat sempurna, begitu pula pengekspresian protein oleh virus progeni juga sudah maksimal. Artinya, saat ini telah dihasilkan ribuan partikel virus, yang terakumulasi dalam lumen retikulum endoplasma (Rice, 1996). Sama halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Murphy *et al.*, seperti yang dikutip oleh Rice (1996), telah digunakan biakan BHK₂₁ yang diinokulasi dengan *St. Louis Encephalitis* (SLE) yang juga merupakan anggota *Flavivirus*, dimana pada pengamatan melalui mikroskop elektron, ternyata pada 48 jam pasca inokulasi, virion SLE terkumpul di dalam sisterna dari retikulum endoplasma.

Virus dengue merupakan virus beramplop. Amplop yang terbentuk selama proses pematangan ini mengandung protein spesifik virus serta sejumlah kecil protein yang berasal dari sel tuan rumah sedangkan lemaknya berasal dari lemak yang berada di dalam dinding sel tuan rumah (Fenner *et al.*, 1995).

Akhirnya, setelah melalui proses perakitan dan pematangan, virus siap untuk dilepaskan. Pelepasan dari tiap virion beramplop ini tidak akan memecah integritas dari membran plasma, sehingga ribuan partikel virus dapat dikeluarkan tanpa menimbulkan kerusakan yang berarti pada sel (Fenner *et al.*, 1995). Proses pelepasan

virus dengue adalah melalui jalan eksositosis, dimana setelah terjadi pendewasaan melalui penguncupan melewati membran kompleks golgi atau retikulum endoplasma kasar, vesikula yang mengandung virus kemudian berpindah menuju membran plasma yang dengannya mereka bergabung. Selanjutnya, virion lepas melalui eksositosis (Wengler and Wengler, 1989 ; Randolph and Stollar, 1990), siap untuk menginfeksi sel disekitarnya. Model patogenesis seperti ini dapat terjadi pada sel yang diinkubasi selama 72 jam pasca inokulasi.

Pada masa inkubasi 48 jam sampai dengan 72 jam pasca inokulasi mulai terlihat adanya perubahan histologi dari sel yang terinfeksi. Perubahan ini kemungkinan terjadi karena pada umumnya infeksi *Flavivirus* pada sel menyebabkan adanya proliferasi retikulum endoplasma, sehingga sel tampak membengkak dan terdapat “ *cloudy swelling*”, dimana perubahan ini akan tampak jelas bila dikaji dengan mikroskop elektron. Meskipun begitu, ternyata sampai masa inkubasi 72 jam pasca inokulasi virus DEN-3 tidak menunjukkan adanya CPE pada sel BHK₂₁ Clone₁₃. Artinya, virus DEN-3 tidak merusak sel tempat mereka bereplikasi meskipun sebenarnya virus dengue merupakan tipe virus pembunuh sel. Hal ini bisa terjadi karena virus ini tidak menghentikan sintesis protein dengan sangat baik sehingga meskipun telah terinfeksi dan melepaskan virion, metabolisme sel secara keseluruhan hanya sedikit terpengaruh dan sel yang terinfeksi ini berlanjut tumbuh dan membelah. Seperti pendapat Venogupal dan Gould (1992), sel kultur juga mempunyai kemampuan untuk pulih kembali dari efek sitopatik akibat infeksi virus dengue dan akhirnya menimbulkan suatu keadaan virus karier yang muncul tanpa

manifestasi sitolitik. Tetapi, untuk jangka waktu tertentu ataupun pada tingkat infeksi lebih lanjut, dapat terjadi perubahan progresif yang akhirnya menyebabkan kematian sel (Marianneu *et al.*, 1996).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Pada masa inkubasi 2 jam sampai 72 jam pasca inokulasi, penyebaran virus DEN-3 semakin meningkat sesuai dengan lamanya masa inkubasi, dan selama masa inkubasi tersebut virus DEN-3 tidak menimbulkan adanya CPE, yang berarti virus DEN-3 belum menyebabkan kerusakan pada sel BHK₂₁ *Clone*₁₃.
2. Pengekspresian protein dimulai pada masa inkubasi 6 jam pasca inokulasi dan mencapai hasil maksimal pada masa inkubasi 48 jam pasca inokulasi.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan mikroskop elektron untuk memastikan dan menentukan secara kompartemen replikasi virus dengue pada sel BHK₂₁.

RINGKASAN

Nur Haryani. Model Patogenesis Virus Dengue Serotipe 3 (DEN-3) pada Kultur Sel Monolayer BHK₂₁ Clone₁₃, di bawah bimbingan Bapak Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh selaku dosen pembimbing pertama dan Bapak Budi Utomo, M.S., Drh selaku dosen pembimbing kedua.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perkembangan dan model patogenesis virus DEN-3 dalam kultur sel BHK₂₁ (*Baby Hamster Kidney*) Clone₁₃, sehingga dapat memberikan sumbangan ilmiah tentang terjadinya kerusakan sel yang menyebabkan DSS (*Dengue Shock Syndrome*).

Sel BHK₂₁ Clone₁₃ ditumbuhkan dalam medium MEM (*Minimum Essential Medium*) pada suhu 37°C 5%CO₂. Sebelumnya pada masing-masing media ditambahkan *cover slip* steril supaya sel dapat tumbuh di atasnya, yang nantinya diperlukan untuk pemeriksaan FAT (*Fluorescent Antibody Test*). Sel BHK kemudian diinokulasi dengan virus DEN-3 sebanyak 1 m.o.i. (*multiplicity of infection*). Pengumpulan *cover slip* dilakukan dengan cara memberi selang waktu di dalam inkubator CO₂ yaitu untuk masa inkubasi 2, 6, 12, 24, 48 dan 72 jam pasca inokulasi. Masing-masing *cover slip* difiksasi, kemudian dilakukan uji FAT secara langsung. Selanjutnya sel diperiksa di bawah mikroskop fluoresen untuk melihat dan mengamati model patogenesis yang didapat dari setiap masa inkubasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada masa inkubasi 2 jam sampai 72 jam pasca inokulasi, penyebaran virus DEN-3 semakin meningkat sesuai dengan

lamanya masa inkubasi, dan virus DEN-3 tidak menimbulkan adanya CPE, yang berarti virus DEN-3 belum menyebabkan kerusakan pada sel BHK₂₁ Clone₁₃. Pengekspresian protein dimulai pada masa inkubasi 6 jam pasca inokulasi dan mencapai hasil maksimal pada masa inkubasi 48 jam pasca inokulasi.

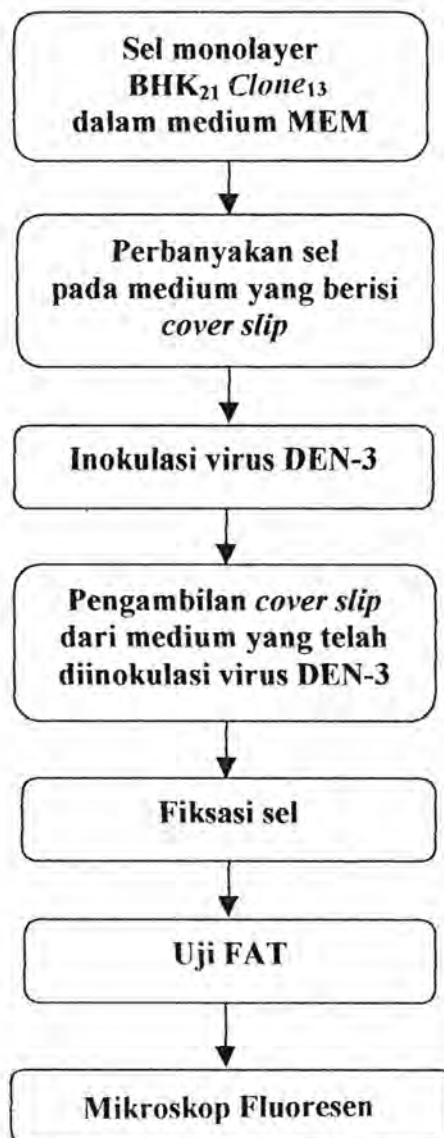
DAFTAR PUSTAKA

- Adi, M. and S. Wuryadi. 1990. *Toxorhynchites* sebagai media isolasi virus dengue. *Cermin Dunia Kedokteran* No. 60, 17-19.
- Anderson, R., A. D. , King and B. L. Innis. 1992. Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. *Journal of General Virology*. 73, 2155-2159.
- Despres, P., M. D. Frenkiel and V. Deubel. 1993. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 196, 209-219.
- Ernawati dan Soelistyanto. 1991. *Virologi Veteriner*. 22-30.
- Fenner, F.J., E.J. Gibbs, F.A. Murphy, R. Rott, M.J. Studdert and D.O. White. 1995. *Virologi Veteriner*. Edisi Kedua.
- Fujita N., S. Hotta, E. Konishi, H. Esaki, Sumarmo and Sujudi. 1997. Dengue hemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia in 1988 ; Isolation of dengue virus from patient whole blood using cell cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(3). 318-321.
- Guirakhoo, F., F. X. Heinz, C. W. Mandi, H. Holzmann and C. Kunz. 1991. Fusion activity of flavivirus ; comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *Journal of General Virology*. 72, 1323-1329.
- Halstead, S.B. 1984. The pathogenesis of dengue ; Molecular epidemiology in infectious disease (The Alexander D. Langmuir Lecture). *Am. J. Epidemiol.* 114, 632-648.
- Halstead S.B. 1988. Pathogenesis of dengue : Challenges to molecular biology. *Science* 239, 476-481.
- Hammon, W.M., A. Rudnick, G.E. Sather. 1960. Viruses associated with epidemic haemorrhagic fever of the Philippines and Thailand. *Science* 131, 1102-3.
- Harsono. 1992. Penemuan dan pengobatan penderita demam berdarah dengue di puskesmas. *Medika* No. 5 Th. 18, 60-68.

- Innis, B. L. 1995. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *In Exotic Viral infection*. Edited by J. S. Porterfield. New York & London: Chapman and Hall. 103-146.
- Kautner, I. , M.J. Robinson and U. Kubnie. 1997. Dengue virus infection : epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and prevention. *Medical Progress. J Pediatrics*. 31, 516-24.
- Kho, L.K., H. Wulur. A. Karsono and S. Thaib. 1969. Dengue haemorrhagic fever in Jakarta. *J. Indones. Med. Assoc.* 19, 419-437.
- Kuno, G., D. G. Gubler, M. Velez and A. Oliver. 1985. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bulletin of the World Health Organization* 63, 279-286.
- Kurane, I. and F.E. Ennis. 1992. Imunity and immunopathology in dengue virus infections. *Seminars in imunology*. Vol. 4, 121-127.
- Marianneau P., F. Megret, R. Oliver, D.M. Morens and V. Deubel. 1996. Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *Journal of General Virology*. 77, 2547-2554.
- Morens, D. M., N. J. Marchett, M. C. Chu and S. B. Halstead. 1991. Growth of dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 644-651.
- Morita, K. 1999. Use of recombinant virus technique in studying dengue virus pathogenesis. Departement of Virology, Institute of Tropical Medicine. Nagasaki University, Nagasaki, Japan.
- Partana, L., J.S. Partana and S. Tharir. 1970. Haemorrhagic fever shock syndrome in Surabaya, Indonesia. *Kobe J. Med. Sci.* 16, 189-201.
- Paul, J. 1975. *Cell and Tissue Culture*. 5th Ed. Aberdeen University Press. 412.
- Randolph, V.B. and V. Stollar. 1990. Low pH-induced cell fusion in *Flavivirus*-infected *Aedes albopictus* cell culture. *J. Gen. Virol.* 71, 1845-1850.
- Rantam, F.A., H. Arwati, Soetjipto and S. Soegijanto. 1998. Pathogenesis model of dengue virus infect cell cultures. Departement of Dengue Haemorrhagic Fever; Departement of Tissue Culture ; Departement of Hepatitis. *In-press*.
- Rantam, F.A. 1998. Aspek virologi demam berdarah dengue. Seminar Demam Berdarah Dengue, 19 September 1998, 23-30.

- Rice, C.M. 1996. Flaviviridae; the viruses and their replication. In : *Field's Virology*, Third Edition. Chapter 30, 932-942.
- Rosen, L. 1987. The Emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 26, 337-343.
- Soewondo, E.S. 1998. Demam berdarah dengue pada orang dewasa. Gejala klinik dan pelaksanaannya. *Folid Medika Indonesiana*. Vol. 33, 38-42.
- Sumarmo. 1987. Dengue haemorrhagic fever in Indonesia. *South East Asian. J. Trop. Med. Public Health*, 18 (3), 45-51.
- Sumarmo, T. Sutrisno, A. Abdul Kadir and I. Lubis. 1994. The epidemiology, control and prevention of DHF in Indonesia. *Cermin Dunia Kesehatan*. 92, 5-10.
- Sumarmo. 1997. Demam berdarah dengue pada anak . UI Press.
- Suvette. 1977. Immunological aspect of dengue hemorrhagic fever : studies in Thailand southeast asian. *J. Trop. Med. Pub. Health*. 18-312.
- Venogupol, K. and F. A. Gould. 1992. Heterologous resistance to superinfection by louping ill virus persistently infected cell cultures. *Arch. Virol.* 125, 251-259.
- Wengler, G., and G. Wengler. 1989. Cell-associated West-Nile *Flavivirus* is covered with E + pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J. Virol.* 63, 2521-2526.
- WHO. 1997. Dengue haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva.
- Wibisono, B.H. 1992. Aspek klinis demam berdarah dengue pada orang dewasa. *Medika No. 11 Th. 18*, 61-70.
- Wuryadi, S. 1990. Isolasi virus dengue dari penderita demam berdarah dengue pada waktu wabah di Jakarta tahun 1988. *Cermin Dunia Kedokteran No. 60*, 27-29.

LAMPIRAN

Lampiran 1**Bagan Alur Jalannya Penelitian**

Lampiran 2

Komposisi bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian :

1. Komposisi Media *Minimum Essential Medium* (MEM)

Metabolik Substrat	m mol dm ⁻³
Arginin	0,6
Cystin	0,1
Glutamin	2,0
Histidin	0,2
Isoleusin	0,4
Leusin	0,4
Methyonin	0,1
Lysin	0,4
Phenyalanin	0,2
Threonin	0,4
Tryptofan	0,05
Tyrosin	0,2
Valin	0,4
Glucosa	5,5

Vitamin

Choline	8,3
Folic Acid	2,3
Inositol	11,0
Nikotinamid	8,2
Panhotenat	4,6
Pyridoxal	6,0
Riboflavin	0,27
Thiamin	3,0

Garam-garam Anorganik

NaCl	116
KCl	5,4
CaCl	1,8
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	1,1
NaHCO ₃	23,8

Indikator	: 5 mg dm⁻³
Serum FCS (Foetal Calf Serum)	: 10%
Antibiotik (Penstrep.)	: 0,5 ml

2. Komposisi Phosphat Buffer Saline (PBS)

NaCl	137	mM (8,0 g)
KCl	2,70	mM (0,2 g)
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	8,0	mM (1,42 g)
KH ₂ PO ₄	1,8	mM (0,24 g)
Aquadest	ad	1000 ml

3. Komposisi Trypsin 0,25%

PBS	100	ml
Trypsin	0,5	g
EDTA	0,07	g

4. Bahan Kimia untuk Uji FAT

Aceton -20°C
 FITC (*Fluorescent Isothyocyanat*), pengenceran 1:80
 Antibodi Anti Dengue, pengenceran 1:20
 PBS
 Foetal Calf Serum (FCS) 1%

Lampiran 3

Beberapa peralatan yang digunakan dalam penelitian



Unit Steril Laminar Flow Hood



Mikroskop Fluoresen