UNIVERSITAS INDONESIA

OPTIMASI UJI IMUNOFLUORESENSI UNTUK MENDETEKSI DAN MEMBEDAKAN SEROTIPE VIRUS DENGUE

SKRIPSI

KRESNA MUTIA
0606069930

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2011

UNIVERSITAS INDONESIA

OPTIMASI UJI IMUNOFLUORESENSI UNTUK MENDETEKSI DAN MEMBEDAKAN SEROTIPE VIRUS DENGUE

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

KRESNA MUTIA
0606069930

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,

dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk

telah saya nyatakan dengan benar.

Nama	**: Kresna Mutia**
NPM	**: 0606069930**
Tanda Tangan	**:**
Tanggal	**: 28 Juni 2011**

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh	:
Nama	: Kresna Mutia
NPM	: 0606069930
Program Studi	: Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi	: Optimasi Uji Imunofluoresensi untuk Mendeteksi dan Membedakan Serotipe Virus Dengue

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Tedjo Sasmono, Ph.D. ( )

Pembimbing : Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. ( )

Penguji : Dra. Setiorini, M.Kes. ( )

Penguji : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. ( )

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 28 Juni 2011

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya, serta junjungan Nabi besar Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Selama penyelesaian skripsi ini, tentunya penulis banyak mendapat bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Tedjo Samono, Ph.D. dan Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku Pembimbing I dan II. Terima kasih atas segala bimbingan, arahan, nasihat, serta ilmu yang bermanfaat, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Dr. Abinawanto, Dra. Setiorini, M.Kes., dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc., selaku Penguji serta Dr. Dadang Kusmana, M.S. selaku Ketua Sidang, yang banyak memberikan saran serta perbaikan yang bermanfaat selama penulisan skripsi.
3. Dra. Ratna Yuniati, M.Si. selaku Penasehat Akademis dan Dra. Retno Lestari, M.Si. yang banyak memberikan bantuan, doa, semangat, dan perhatian kepada penulis. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi, Dra. Nining B.P., M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi. Seluruh civitas akademis dan nonakademis Departemen Biologi FMIPA UI, Mbak Asri Martini, Ibu Ida, dan Ibu Rusmalina. Terima kasih atas bantuan dan ilmu yang diberikan kepada Penulis selama di Biologi.
4. Laboratorium Novartis Eijkman Hassanudin Clinical Initiative (NEHCRI), Novartis Institute for Tropical Disease (NITD) dan Lembaga Biologi Molekul Eijkman yang telah banyak membantu selama penelitian.
5. Ayah dan Ibu, Saudara-saudariku tercinta Fitri, Ismi, Dina, Lisa, Erik, Mas Erry yang selalu memberikan doa restu, kasih sayang, dan dukungan material maupun moral yang tak akan terbalas dengan apapun. Keponakan tersayang Quinsha dan Vito yang senantiasa memberikan keceriaan yang tulus bagi penulis.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

6. Sahabat: Lydia M., Selvia L., Jennifer J.T., Galuh I.M.S, Ardi S., Bangkit S., Legina A., Oka A., Prety I.A., Nidya S., Nurmalasari, Suci W., Indria P.M., Asri S., Munfaridha, Mardhatilah, Mardlotilah, Patricia C., Pramita I.P, Eko B., Indah P.U, Kak Asmi, M. Iqbal, Rika P., Agriana A., Betty, Eko W., Rahmat, Henny N., Sholia H, Ade S., Anggi S., dan seluruh teman-teman Felix (*Federation of biology 0'six*). Terimakasih atas kecerian, persahabatan, doa, dan bantuan yang diberikan selama ini. Terima kasih kepada Arief F. Rizki yang terus memberikan semangat dan dukungan kepada penulis. Terima kasih kepada Anggi Puspa (Bio05), B. Yohan, Mbak Yuli, Boni F. Sebayang, R. Indah, Fajar M., dan Retno A, atas segala bantuan dan saran yang diberikan selama penelitian.

Akhir kata penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

We can't help everyone, but everyone can help someone
Ronald Reagan

Depok, Juni 2011

Penulis

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai civitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama	: Kresna Mutia
NPM	: 0606069930
Program Studi	: Biologi S1 Reguler
Departemen	: Biologi
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya	: Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **HAK Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Optimasi Uji Imunofluoresensi untuk Mendeteksi dan Membedakan Serotipe Virus Dengue

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantukan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 28 Juni 2011
Yang menyatakan

(Kresna Mutia)

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

ABSTRAK

Nama : Kresna Mutia
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Optimasi Uji Imunofluoresensi untuk Mendeteksi dan Membedakan Serotipe Virus Dengue

Optimasi uji imunofluoresensi untuk mendeteksi dan membedakan serotipe virus dengue telah dilakukan. Berdasarkan hasil, galur sel Vero76 merupakan sel terbaik untuk visualisasi dengan konsentrasi optimum antibodi primer yaitu 3,5 µg/ml untuk 4G2 (Anti *Flavivirus*), 3,8 µg/ml untuk 15F3 (Anti DEN1), 4,1 µg/ml untuk 3H5 (Anti DEN2), 4,4 µg/ml untuk 5D4 (Anti DEN3), dan 5,8 µg/ml untuk 1H10 (Anti DEN4), antibodi sekunder FITC sebesar 10 µg/ml, dan 7 µg/ml untuk antibodi dilabel Alexa Fluor. Uji sensitivitas menunjukkan bahwa uji imunofluoresensi mampu mendeteksi virus hingga 10^{-3} (0,001) *plaque forming unit* (PFU)/ml. Uji spesifisitas menunjukkan antibodi monoklonal yang diproduksi spesifik terhadap setiap serotipe.

Kata kunci : Antibodi monoklonal; imunofluoresensi; optimasi; virus dengue
xiv + 92 halaman : 29 gambar; 4 tabel
Daftar Referensi : 72 (1975--2011)

ABSTRACT

Name : Kresna Mutia
Study Programme : Reguler Biology S1
Title : Optimization of Immunofluorescence Assay for Detecting and Serotyping Dengue Virus

Optimization of immunofluorescence assay (IFA) for detecting and serotyping dengue virus had been done. The results showed that Vero76 cell line was the best cell for visualization, with optimum concentration for primary antibody was 3.5 µg/ml for 4G2 (Anti *Flavivirus*), 3.8 µg/ml for 15F3 (Anti DEN1), 4.1 µg/ml for 3H5 (Anti DEN2), 4.4 µg/ml for 5D4 (Anti DEN3), and 5.8 µg/ml for 1H10 (Anti DEN4), while for FITC-labelled secondary antibody was 10 µg/ml, and 7 µg/ml for Alexa Fluor-labeled antibody. The sensitivity showed that IFA were able to detect viruses up to 10^{-3} PFU/ml. The specificity assay demonstrated that the monoclonal antibodies were specific to each serotype.

Key words : Dengue virus; immunofluorescence; monoclonal antibody; optimization
xiv + 92 pages : 29 pictures; 4 tables
Bibliography : 72 (1975--2011)

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS iii
HALAMAN PENGESAHAN iv
KATA PENGANTAR v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS vii
ABSTRAK viii
ABSTRACT ix
DAFTAR ISI x
DAFTAR GAMBAR xiii
DAFTAR TABEL xiv
DAFTAR LAMPIRAN xiv

1. PENDAHULUAN 1

2. TINJAUAN PUSTAKA 4
2.1 Virus Dengue 4
2.2 Manifestasi Klinis Infeksi Virus Dengue 5
2.3 Transmisi dan Siklus Replikasi Virus Dengue 6
2.3.1 Transmisi Virus Dengue 6
2.3.2 Siklus Replikasi Virus Dengue 8
2.4 Diagnosis Laboratorium Virus Dengue 9
2.4.1 Isolasi dan Identifikasi Virus 9
2.4.2 Deteksi Antigen Virus 9
2.4.3 Deteksi Asam Nukleat Virus 10
2.4.3.1 Visualisasi Hasil Amplifikasi RNA Virus Dengue 11
2.5 Imunofluoresensi untuk Mendeteksi Virus Dengue 11
2.6 Kultur Sel 13
2.6.1 Sel *Baby Hamster Kidney* (BHK21) 12
2.6.2 Sel Vero 14
2.6.3 Sel C6/36 14
2.7 Antibodi Monoklonal 14
2.8 Purifikasi Antibodi Menggunakan Protein G 16
2.9 Pengukuran Konsentrasi Antibodi dengan Metode Bradford 17
2.10 Western *Immunoblotting* 17
2.10.1 *Sodium Dedocul Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) 18
2.11 P*laque Assay* untuk Mengukur Titer Virus Dengue 19

3. METODE PENELITIAN 21
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian 21
3.2 Alat 21
3.3 Bahan 22
3.3.1 Sampel 22

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

3.3.2 Bahan Kimia....22
3.3.3 Medium dan *Buffer* 23
3.4 Cara Kerja....23
3.4.1 Produksi Antibodi Monoklonal....25
3.4.1.1 Purifikasi Antibodi 26
3.4.1.2 *Bradford Protein Assay* 27
3.4.1.3 *Sodium Dedocyl Sulphate Acrylamid Electrophoresis* (SDS-PAGE) 27
3.4.1.4 Pelabelan Antibodi 28
3.4.2 Persiapan Sel 28
3.4.2.1 Subkultur 29
3.4.3 Propagasi Virus 29
3.4.3.1 *Plaque Assay* 30
3.4.4 Western *Blotting*....31
3.4.5 Ekstraksi RNA dari Supernatan Kultur Sel Virus Dengue 33
3.4.6 *Reverse Transcription* PCR (RT-PCR)....33
3.4.6.1 *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Deteksi dan *Typing* DENV 34
3.4.6.2 Elektroforesis Hasil PCR Untuk Deteksi dan *Typing* Virus Dengue....35
3.4.7 Prosedur Uji Imunofluoresensi 35
3.4.8 Optimasi Uji Imunofluoresensi....37
3.4.8.1 Pemilihan Sel....38
3.4.8.2 Optimasi Konsentrasi Antibodi 38
3.4.8.3 Uji Sensitivitas dan Spesifisitas....39
3.4.8.4 Imunofluoresensi untuk *multiple infection*....39
3.4.8.5 Uji Aktivitas Virus 40

4. HASIL DAN PEMBAHASAN 40
4.1 Produksi dan Purifikasi Antibodi Monokonal untuk Optimasi Uji Imunofluoresensi 40
4.1.1 Pengukuran Konsentrasi Antibodi Monoklonal dengan Metode Bradford....40
4.1.2 Separasi Antibodi Monoklonal dengan SDS-PAGE....43
4.1.3 Uji Spesifisitas Antibodi Monoklonal Terhadap Virus Dengue dengan Metode Western *Blotting*....44
4.2 Kultur Sel untuk Uji Imunofluoresensi 46
4.3 Propagasi Virus Dengue pada Sel C6/36....47
4.3.1 Deteksi dan Penentuan Serotipe Virus Dengue dengan RT-PCR...48
4.3.2 Pengukuran Titer Virus Dengue Hasil Propagasi Menggunakan *Plaque Assay* 50
4.4 Optimasi Uji Imunofluoresensi 52
4.4.1 Hasil dan Analisis Pemilihan Sel untuk Uji Imunofluoresensi....53
4.4.2 Titrasi Antibodi Sekunder untuk Uji Imunofluoresensi....55
4.4.2.1 Analisis Titrasi Antibodi Sekunder untuk Uji Imunofluoresensi Tidak Langsung....55
4.4.2.2 Analisis Titrasi Antibodi Primer untuk Uji Imunofluoresensi Langsung 58

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

4.5 Uji Sensitivitas Imunofluoresensi Langsung dan Tidak Langsung.....60
4.6 Uji Spesifisitas Imunofluoresensi Langsung dan Tidak Langsung 64
4.7 Analisis Uji Imunoflluoresensi untuk *Multiple Infection* 72
4.8 Analisis Aktivitas D3-H87 75

5. KESIMPULAN DAN SARAN 79
5.1 Kesimpulan.....79
5.2 Saran 79

DAFTAR REFERENSI 80

LAMPIRAN.....87

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1(1)	Struktur Virus Dengue	4
Gambar 2.1(2)	Diagram Poliprotein Virus Dengue	5
Gambar 2.2.	Manifestasi Klinis Infeksi Virus Dengue	6
Gambar 2.3.1	Transmisi Virus Dengue	7
Gambar 2.3.2	Replikasi Virus Dengue	8
Gambar 2.5.	Metode Imunofluoresensi	12
Gambar 2.7.	Skema Produksi Antibodi Monokonal	16
Gambar 3.4.	Skema Cara Kerja Penelitian	24
Gambar 3.4.7	Tahap Kerja Uji Imunofluoresensi	36
Gambar 4.1.1	Kurva *Standar Bovine Serum Albumin* (BSA)	42
Gambar 4.1.2	Hasil *Sodium Dedocyl Sulphate Acrylamid Electrophoresis* (SDS-PAGE)	43
Gambar 4.1.3	Hasil Western *Blotting* Supernatan Virus Dengue Menggunakan Antibodi Monoklonal	45
Gambar 4.3.1	Hasil amplifikasi PCR Deteksi dan Penentuan Serotipe Virus Dengue	49
Gambar 4.3.2	Hasil Pengukuran Titer Virus Dengue Menggunakan *Plaque Assay*	51
Gambar 4.4.1	Hasil Optimasi Infeksi Virus Dengue pada Berbagai Sel	54
Gambar 4.4.2.1	Hasil Optimasi Titrasi Antibodi Sekunder FITC	57
Gambar 4.4.2.2	Hasil Titrasi Antibodi yang Dilabel Alexa Fluor	59
Gambar 4.5(1)	Hasil Uji Sensitivitas Uji Imunofluoresensi Tidak Langsung dengan Antibodi Primer 4G2 dan Antibodi Sekunder FITC *goat anti mouse IgG*	61
Gambar 4.5(2)	Hasil Uji Sensitivitas Uji Imunofluoresensi Langsung dengan 4G2-Alexa Fluor	62
Gambar 4.5(3)	Hasil RT-PCR Supernatan Uji Sensitivitas Imunofluoresensi	64
Gambar 4.6(1)	Hasil Uji Sensitifitas Antibodi Monoklonal 4G2	65
Gambar 4.6(2)	Hasil Uji Sensitifitas Antibodi Monoklonal 4G2Alexa Fluor	66
Gambar 4.6(3)	Hasil Uji Sensitifitas Antibodi Monoklonal Spesifik Menggunakan Imunofluoresensi Tidak Langsung	68
Gambar 4.6(4)	Hasil Uji Sensitifitas Antibodi Monoklonal Spesifik Alexa Fluor	69
Gambar 4.6(5)	Hasil Uji Sensitifitas Antibodi Monoklonal Untuk D3-H87	71
Gambar 4.7(1)	Hasil Imunofluoresensi untuk *Multiple Infection*	73
Gambar 4.7(2)	Hasil Imunofluoresensi untuk *Multiple Infection*	74
Gambar 4.8(1)	Hasil Uji Aktivitas Virus Dengue Selama 7 Hari	76
Gambar 4.8(2)	Hasil Deteksi untuk Supernatan Uji Aktivitas Harian Virus Dengue Menggunakan RT-PCR	78

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

DAFTAR TABEL

Tabel 3.4.6 Komponen *Master Mixture* RT-PCR 33
Tabel 3.4.6.1. Komponen *Master Mixture* PCR untuk Deteksi dan *Typing* DENV 34
Tabel 4.1.1(1) Absorbansi Protein Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA).....41
Tabel 4.1.1(2) Konsentrasi Antibodi Monoklonal 41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Larutan, Medium, dan *Buffer* yang Digunakan Dalam Penelitian 87
Lampiran 2. Perhitungan *Multiplicity of Infection* (MOI) 89
Lampiran 3. Perhitungan Jumlah Sel untuk Uji Imunofluoresensi 92

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

BAB 1
PENDAHULUAN

Infeksi virus dengue merupakan masalah kesehatan yang muncul dan menyebar sejak abad ke-18. Lebih dari 2,5 milyar populasi dunia di daerah tropis dan subtropis beresiko terinfeksi virus dengue. Setiap tahun dilaporkan 50--100 juta orang terinfeksi oleh virus dengue dan menyebabkan kematian. Tingginya prevalensi infeksi dengue disebabkan kesalahan penanganan serta belum ditemukannya vaksin maupun pengobatan yang tepat (Gibbons & Vaughn 2002: 1563; WHO 2009: 3).

Infeksi virus dengue di Indonesia dilaporkan pertama kali pada tahun 1968 di Surabaya dan Jakarta. Sejak 1997 kasus infeksi virus dengue di Indonesia terjadi setiap tahun dan diikuti dengan pergeseran usia penderita. Sebelumnya mayoritas penderita dengue adalah anak berusia di bawah 15 tahun, namun saat ini orang dewasapun dapat terinfeksi. Pergeseran usia penderita disebabkan vektor virus dengue terdapat hampir di seluruh Indonesia (Lubis 1991: 1; Soedarmono 2004: 5; Suroso 2004: 5).

Infeksi virus dengue dapat menimbulkan beberapa manifestasi klinis (Henchal & Putnak 1990: 378). Manifestasi yang ditimbulkan dipengaruhi oleh daya tahan tubuh penderita. Manifestasi tersebut berupa demam dengue (*dengue fever*/DF), demam berdarah dengue (*dengue hemorrhagic fever*/DHF), dan sindroma renjatan dengue (*dengue shock syndrome*/DSS) (Porter *dkk.* 1997: 997; Gubler 1998: 485--487).

Virus dengue menginfeksi manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes* spp. Virus dengue tersebut merupakan anggota genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae* yang memiliki *positive-strand RNA genomes,* dan dilindungi oleh nukleokapsid berbentuk ikosahedral (Henchal & Putnak 1990: 378; Voyles 2002: 31--32). Berdasarkan perbedaan antigenisitasnya, virus dengue dibedakan menjadi empat serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4 (Jessie *dkk*. 2004: 1411; WHO 2009: 14).

Infeksi virus dengue tidak selalu diakibatkan oleh satu serotipe virus. Infeksi bersamaan oleh beberapa serotipe berbeda (multi-infeksi/*multiple*

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

infection) telah dilaporkan di beberapa negara. Kasus *multiple infection* pertama kali dilaporkan di Puerto Rico pada tahun 1982. Dua tahun kemudian kasus *multiple infection* terjadi di Kaledonia Baru dan pada tahun 2000 terjadi di Taiwan Selatan (Wang *dkk.* 2003: 89--90).

Peningkatan prevalensi infeksi tunggal maupun *multipe infection* menyebabkan perlu dilakukannya pengawasan terhadap virus dengue. Pengawasan penting dilakukan untuk mengetahui serotipe virus yang bersirkulasi di suatu tempat dalam waktu tertentu. Pentingnya mengetahui serotipe yang bersirkulasi dikarenakan satu dari empat serotipe virus dengue dapat menjadi faktor resiko penting untuk menimbulkan manifestasi klinis yang lebih berat (Laroño-pino *dkk*. 1999: 725).

Saat ini pengendalian terhadap infeksi virus dengue sepenuhnya mengandalkan pengawasan terhadap vektor yang dititik beratkan terhadap pengawasan serta eliminasi tempat perindukan larva maupun nyamuk dewasa (Gubler 1998: 488--491; Kao *dkk*. 2005: 6--10). Berdasarkan hal tersebut, diperlukan pengembangan uji laboratorium untuk mengetahui virus yang bersirkulasi. Pengembangan didasari oleh sistem pengawasan (*survaillance system*) yang dapat memberikan peringatan dini (*early warning*) untuk memerkirakan timbulnya epidemik. Sistem pengawasan tersebut biasanya dilakukan dengan isolasi virus yang diikuti dengan identifikasi serotipe (Harris *dkk*. 1998: 2634).

Identifikasi serotipe virus dengue umumnya dilakukan dengan metode *Reverse-Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Metode tersebut relatif mudah dan murah jika dibandingkan dengan ELISA atau metode lainnya. Akan tetapi metode tersebut terkendala dengan tingkat sensitivitasnya yang rendah dan bervariasi untuk sampel dengan titer virus yang rendah serta berbeda serotipe. Selain itu metode RT-PCR tidak dapat menyediakan virus aktif untuk karakterisasi biologi virus selanjutnya. Oleh sebab itu isolasi virus dengue yang diikuti dengan uji imunofluoresensi masih menjadi *gold standard* atau uji terbaik dalam mendeteksi dan menentukan serotipe virus dengue (Kao *dkk*. 2005: 5--6).

Uji imunofluoresensi dipilih berdasarkan keungulan yang dimiliki. Uji imunofluoresensi mampu menyediakan virus dalam keadaan aktif yang dapat

digunakan untuk karakterisasi biologi selanjutnya (Kao *dkk*. 2001: 3672). Uji imunofluresensi juga mampu mendeteksi titer virus yang rendah dan memvisualisasikan 1--10 sel yang terinfeksi (Kao *dkk*. 2005: 6). Uji tersebut merupakan metode yang sederhana dan cepat untuk dilakukan dengan tingkat kepercayaan yang tinggi. Uji tersebut juga mampu mendeteksi kemungkinan terjadinya *multiple infection* oleh serotipe virus dengue yang berbeda (Samuel & Tyagi 2006: 617--620).

Uji imunofluoresensi merupakan metode untuk memeriksa adanya antibodi atau antigen dengan menggunakan label fluoresens yang akan berpendar jika dilihat di bawah mikroskop ultraviolet (Baratawidjaja 2006: 494). Uji imunofluoresensi dapat membedakan serotipe virus dengue dengan antibodi monoklonal yang spesifik terhadap masing-masing serotipe virus dengue (Kao *dkk*. 2001: 3672). Uji imunofluoresensi dapat digunakan sebagai *gold standar* apabila terjadi epidemik di suatu daerah tertentu.

Laboratorium Novartis-Eijkman-Hasanuddin Clinical Research Initiative (NEHCRI) di Lembaga Eijkman, sedang mengembangkan uji imunofluoresensi untuk mendeteksi infeksi tunggal dan *multiple infection* oleh virus dengue. Uji imunofluoresensi dilakukan dengan menggunakan antibodi monoklonal hasil kultur sel hibridoma. Antibodi tersebut akan digunakan untuk uji imunofluoresensi langsung dan tidak langsung. Uji imunofluoresensi tidak langsung akan menggunakan antibodi monoklonal sebagai antibodi primer dan antibodi sekunder yang dilabel FITC. Imunofluoresensi langsung akan menggunakan antibodi monoklonal yang telah dilabel menggunakan Alexa fluor kit.

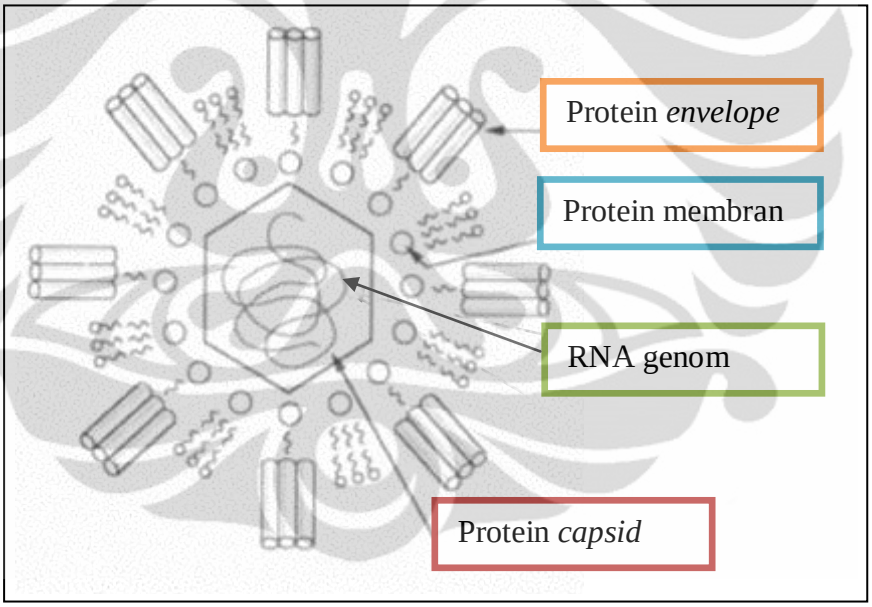
Uji imunofluoresensi yang akan dilakukan belum memeroleh kondisi optimum, seperti sel yang akan digunakan untuk visualisasi dan konsentrasi optimum untuk antibodi primer, antibodi sekunder yang dilabel FITC, dan antibodi yang dilabel Alexa Fluor. Oleh sebab itu penelitian bertujuan untuk mengoptimasi uji imunofluoresensi dan menguji sensitivitas serta spesifisitas uji imunofluoresensi. Diharapkan dengan uji imunofluoresensi yang telah dioptimasi dapat digunakan untuk menunjang diagnosis yang telah rutin dilakukan.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus Dengue

Virus dengue termasuk dalam *Arthropod Borne Virus* (Arbovirus) genus *Flavivirus* famili *Flaviviridae* yang memiliki *positive-single strand RNA genomes* (Henchal & Putnak 1990: 378; Kuno *dkk.* 1998:757; Voyles 2002: 31--32). Virion virus dengue dilindungi oleh nukleokapsid ikosahedral dengan ketebalan 10 nm dan *envelope* berdiameter 30 nm (Henchal & Putnak 1990: 378). Struktur virus dengue dapat dilihat pada Gambar 2.1(1).



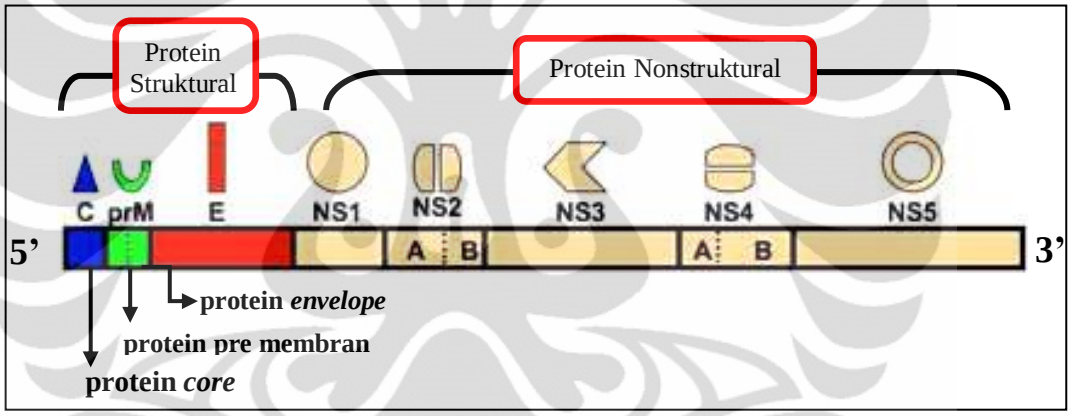
Gambar 2.1(1) Struktur virus dengue
[Sumber: Henchal&Putnak 1990: 378. "diterjemahkan sesuai aslinya"]

Ribonucleic acid (RNA) virus dengue terdiri atas *open reading frame* (ORF) tunggal yang diapit oleh *non-translated region* (NTR) pada ujung 5' dan 3'. *Nontranslated region* pada ujung 5' berukuran 100 pb dan pada ujung 3' berukuran 450 pb (Twiddy *dkk.* 2002: 1679). Protein struktural terdiri atas protein *core* atau nukleokapsid (C), protein *envelope* (E), dan protein pre membran (prM

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

atau PreM). Protein nonstruktural terdiri atas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, dan NS5. Urutan gen yang disandi adalah 5'-*C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5*-3'(Henchal & Putnak 1990: 378--379 & 381). Diagram susunan protein virus dengue, dapat dilihat pada Gambar 2.1 (2).

Virus dengue terdiri atas DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4 berdasarkan perbedaan antigenisitasnya. Infeksi oleh satu serotipe akan memberikan imunitas seumur hidup terhadap serotipe tersebut. Akan tetapi, imunitas yang diperoleh tidak mampu melindungi dari infeksi oleh serotipe berbeda (*cross-protective*). Oleh sebab itu, seseorang dapat terinfeksi virus dengue lebih dari satu kali oleh serotipe yang berbeda (Jessie *dkk*. 2004: 141; WHO 2009: 14).



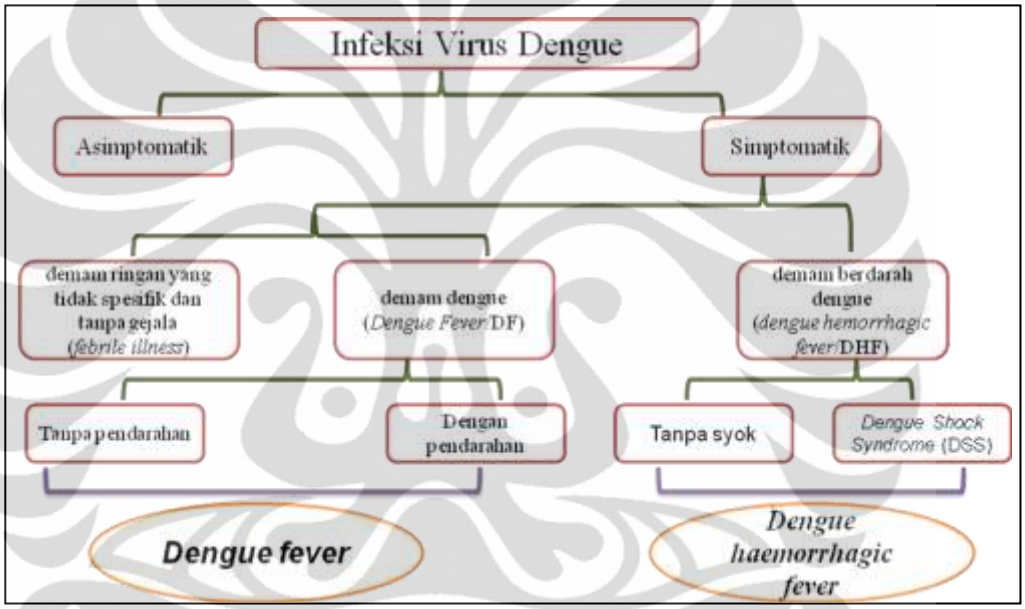
Gambar 2.1(2) Diagram poliprotein virus dengue
[Sumber: Tomlinson *dkk*. 2009: 4. "diterjemahkan sesuai aslinya"]

2.2 Manifestasi Klinis Infeksi Virus Dengue

Manifestasi klinis infeksi virus dengue, memiliki tingkat keparahan yang berbeda. Bentuk klinis dimulai dengan demam ringan yang tidak spesifik dan tanpa gejala (*febrile illness*). Manifestasi berikutnya yaitu demam dengue yang berlangsung selama 2--7 hari dengan suhu tubuh mencapai 38--40,5^{o}C (Halstead 1980: 4; Gubler 1998: 485--486).

Manifestasi klinis yang lebih parah yaitu demam berdarah dengue (DBD) atau *dengue hemorrhagic fever* (DHF). Penderita mengalami kebocoran plasma (*plasma leakage*) pada pembuluh kapiler yang mengakibatkan penurunan tekanan

darah (Halstead 1980: 26--27; Gubler 1998: 486). Penderita DBD/DHF apabila tidak diberikan terapi pengantian cairan, dapat menyebabkan sindrom renjatan dengue atau *dengue shock sydrome* (DSS). Penderita akan mengalami syok hipovolemia yaitu berkurangnya volume plasma darah. Penderita DSS akan mengalami kematian jika tidak ditangani secara cepat dan tepat (Gubler 1998: 486). Bentuk klinis yang terjadi akibat infeksi virus dengue dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Manifestasi klinis infeksi virus dengue
[Sumber: Chen *dkk*. 2009: 3. "diterjemahkan sesuai aslinya"]

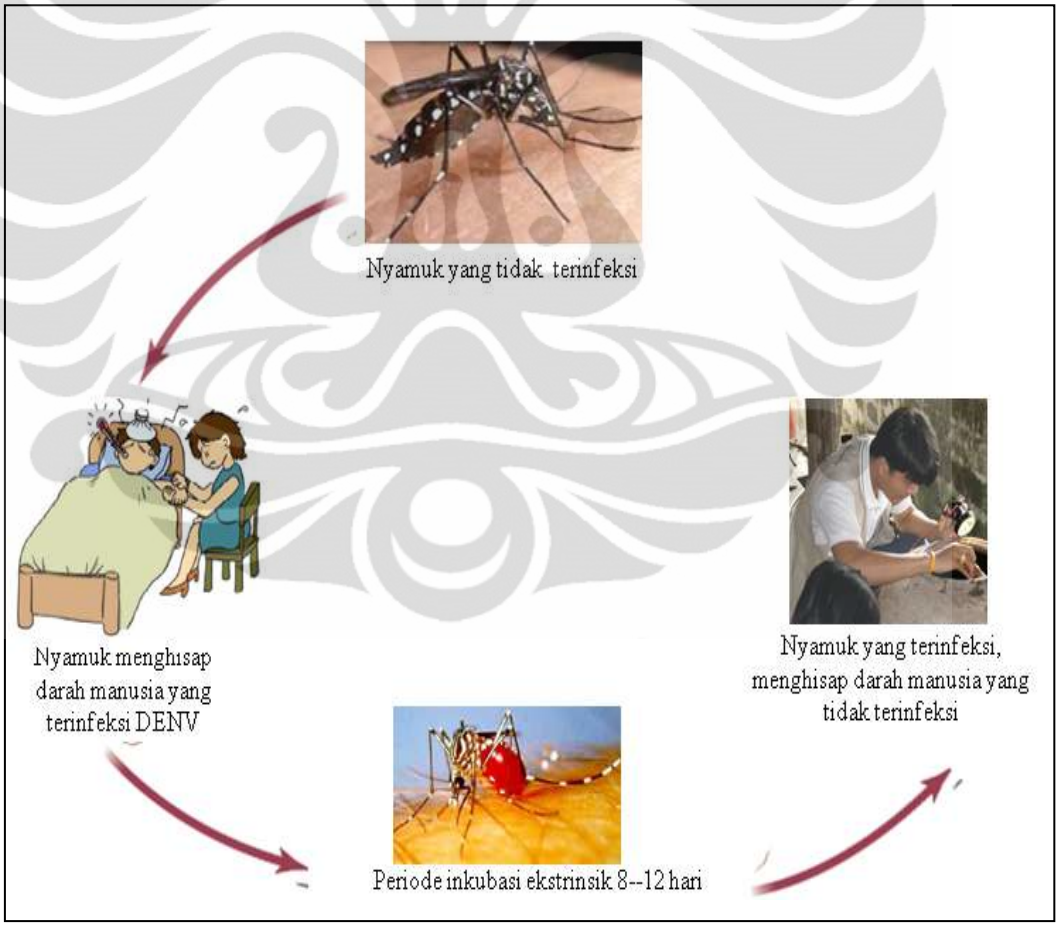
2.3 Transmisi dan Siklus Replikasi Virus Dengue

2.3.1 Transmisi virus dengue

Virus dengue ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* dan *Ae. albopictus* betina (Henchal & Putnak 1990: 377). Virus dengue masuk ke dalam tubuh manusia saat nyamuk *Aedes* betina mengeluarkan air liurnya. Virus yang masuk akan berkembang biak dalam sistem retikuloendotelial. Target utamanya adalah *antigen presenting cells* (APC) yang umumnya berupa makrofag jaringan.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

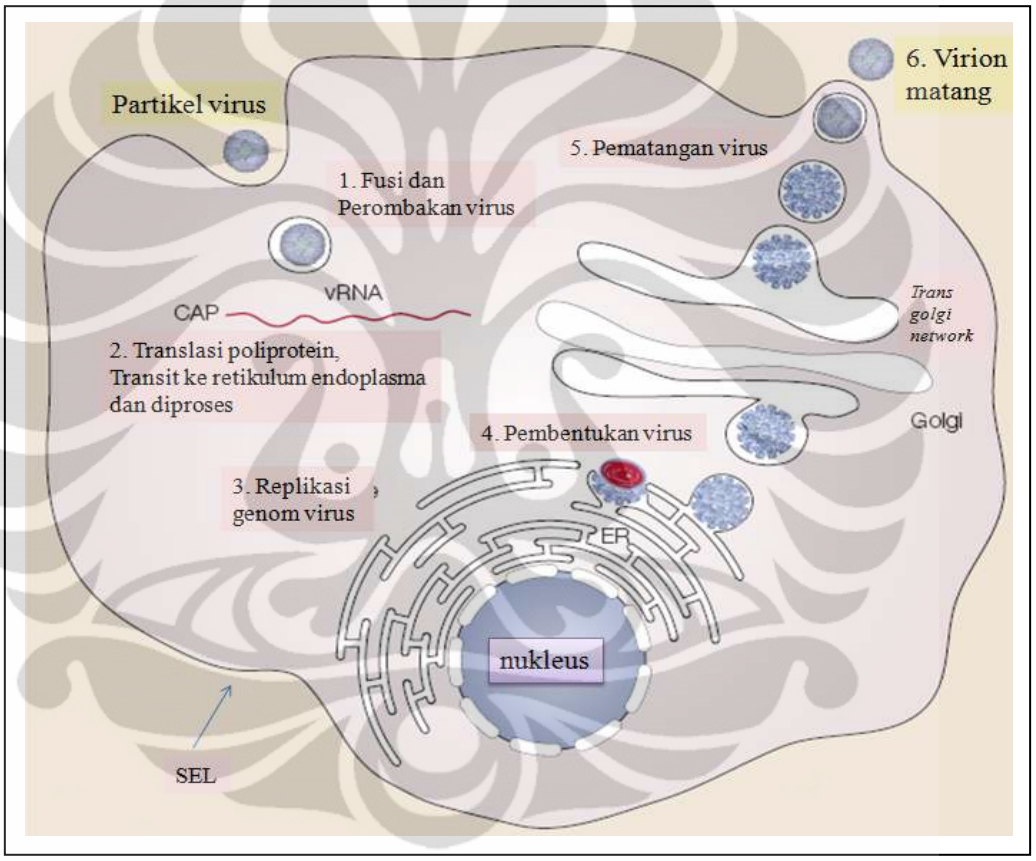
Setelah seseorang digigit oleh nyamuk yang terinfeksi, maka virus akan memasuki periode inkubasi selama 3--14 hari. Selama periode tersebut penderita mengalami demam dengan gejala nonspesifik (*undifferentiated febrile illness*) selama 2--10 hari. Selama periode tersebut virus bersikulasi pada darah perifer di dalam sel monosit/makrofag, sel limfosit B, dan sel limfosit T. Jika nyamuk *Aedes* lain mengigit penderita pada periode tersebut, maka nyamuk akan terinfeksi virus dengue. Virus dengue masuk bersamaan dengan darah yang dihisap. Virus tersebut akan berkembangbiak dan menyebar ke seluruh bagian tubuh nyamuk, dan sebagian besar berada di kelenjar liur (Gubler 1998: 485). Transmisi virus dengue dapat dilihat pada gambar 2.3.1.



Gambar 2.3.1. Transmisi virus dengue
[Sumber: Borty 2008: 21. "diterjemahkan dan dimodifikasi sesuai aslinya"]

2.3.2 Siklus replikasi virus dengue

Virus dengue mampu menginfeksi inangnya dengan cara memperbanyak diri atau melakukan replikasi. Virus dengue yang merupakan kelompok *Flavivirus* yang memiliki siklus hidup tertentu. Skema siklus replikasi virus dengue dapat dilihat pada Gambar 2.3.2



Gambar 2.3.2. Replikasi Virus dengue
[Sumber: Mukhopadhyay *dkk*. 2005: 14. "diterjemahkan sesuai aslinya"]

Replikasi virus dengue diawali dengan menempelnya virion pada reseptor sel inang. Partikel virus akan memasuki sel melalui perantara reseptor dengan cara endositosis. Hal tersebut mengakibatkan perubahan keasaman pada lingkungan. Akibatnya konformasi *envelope* berubah yang menyebabkan terjadi fusi antara virus dan membran sel serta lepasnya genom virus ke sitoplasma (Navaratnarajah *dkk*. 2008: 164). Genom virus kemudian mengalami translasi

oleh protease virus dan inang. Proses tersebut akan menghasilkan protein individu yang berfungsi untuk replikasi dan pengemasan virion. Replikasi genom virus berlangsung di membran intraseluler, sedangkan pembentukan virus berlangsung di membran retikulum endoplasma. Pembentukan dan pengemasan virus terjadi ketika protein struktural dan RNA yang baru, disintesis dari retikulum endoplasma dan keluar menuju lumen dengan cara pertunasan (*budding*). Partikel virus yang baru akan ditransportasi melalui *trans-golgi network* (TGN). Partikel virus tersebut akan matang dan keluar dari sel dengan cara eksositosis (Mukhopadhyay *dkk*. 2005: 14; Tomlinson *dkk*. 2009: 3--4).

2.4 Diagnosis Laboratorium Virus Dengue

Diagnosis laboratorium untuk infeksi virus dengue dapat dilakukan dengan deteksi terhadap virus, antigen virus, sekuen genom, dan antibodi. Metode yang sering digunakan di laboratorium yaitu, isolasi dan karakterisasi virus, deteksi sekuen genom dengan amplifikasi asam mukleat, dan deteksi antibodi spesifik dari virus dengue (Shu & Huang 2004: 642).

2.4.1 Isolasi dan identifikasi virus dengue

Isolasi virus dengue dilakukan dengan cara menginokulasi serum pasien yang terinfeksi virus dengue ke dalam sel. Sel yang digunakan dapat berasal dari nyamuk ataupun dari sel mamalia. Virus dengue akan mengalami amplifikasi di dalam sel yang terinfeksi. Virus tersebut dapat diidentifikasi menggunakan antibodi monoklonal yang spesifik terhadap masing-masing dari serotipe virus dengue (Buchy *dkk*. 2006: 2).

2.4.2 Deteksi antigen virus dengue

Deteksi antigen virus dengue dilakukan dengan menggunakan tes serologi. Tes serologi yang rutin digunakan untuk mendiagnosis infeksi virus dengue antara lain: *hemagglutination-inhibition* (HI), *complement fixation* (CF),

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

neutralization test (NT), dan *indirect immunoglobulin* G ELISA (IgG ELISA) (Gubler 1998: 488). Tes serologi memiliki kelemahan yaitu *cross-reactive* (reaksi silang) terhadap genus *Flavivirus* lainnya. Kelemahan tersebut terjadi apabila sampel yang diambil berasal dari daerah yang memiliki banyak penyebaran *Flavivirus* (Buchy *dkk.* 2006: 3).

2.4.3 Deteksi asam nukleat virus dengue

Deteksi asam nukleat virus dengue dilakukan dengan cara mengamplifikasi genom virus. Metode PCR yang digunakan untuk diagnosis infeksi virus dengue yaitu *Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). *Reverse-Transcription* PCR digunakan untuk memperbanyak *complementary* DNA (cDNA) dari RNA. Proses RT-PCR melibatkan enzim *reverse transcriptase* untuk menyalin RNA menjadi cDNA. Cetakan cDNA yang terbentuk kemudian akan diamplifikasi oleh DNA *polymerase* (Sambrook & Russell 2001a: 8.46).

Hasil amplifikasi genom virus dengue dengan RT-PCR, kemudian dideteksi dan dibedakan serotipenya dengan *seminested-multiplex* PCR. *Seminested-multiplex* PCR merupakan PCR dengan dua tahapan dan menggunakan lebih dari sepasang primer (*multiplex*). Metode tersebut mampu mengurangi waktu pengerjaan serta meminimalisir terjadinya kontaminasi dan dapat digunakan untuk sampel dalam jumlah yang banyak (Lanciotti *dkk.* 1992: 550).

Seminested-multiplex PCR merupakan PCR tahap kedua dengan menggunakan produk PCR pertama dan menggunakan lebih dari sepasang primer. Metode tersebut digunakan untuk memperbanyak fragmen spesifik dengan berbagai ukuran. Kombinasi primer yang digunakan berupa satu primer eksternal dan beberapa primer internal. Primer eksternal akan mengenali salah satu ujung gen. Primer internal akan mengenali daerah variabel di dalam gen yang spesifik pada setiap genotipe (Gouvea *dkk.* 1990: 278).

Primer dirancang dengan memerhatikan homologi primer dengan sekuen target, panjang dimer, dan komposisi basa guanin (G) dan sitosin (C). Panjang

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

dan komposisi basa G dan C memengaruhi penentuan temperatur optimum untuk *annealing primer*. Primer yang ideal untuk *multiplex* PCR memiliki panjang 18--30/lebih nukleutida serta komposisi G dan C sebesar 35--60%. Penggunaan kombinasi primer internal dan eksternal tersebutlah yang dikenal dengan *seminested* (Gouvea *dkk.* 1990: 278). Penggunaan primer lebih dari sepasang primer dalam satu reaksi disebut dengan *multiplex* (Sambrook & Russel 2001b: 8.107).

2.4.3.1 Visualisasi hasil amplifikasi RNA virus dengue

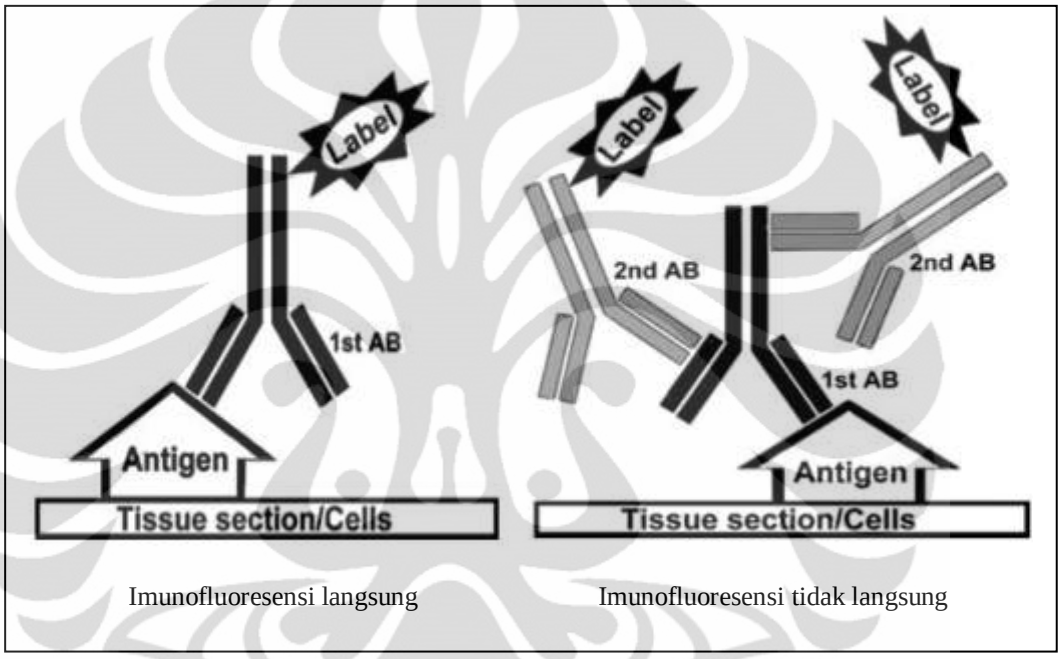
Virus dengue yang telah diamplifikasi, divisualisasikan menggunakan elektroforesis. Elektroforesis merupakan teknik memisahkan makromolekul (asam nukleat atau protein) dalam suatu medan listrik. Prinsip kerja elektroforesis yaitu pergerakan partikel-partikel yang bermuatan berdasarkan kecepatan migrasi partikel tersebut dalam suatu medan listrik. Partikel tersebut bergerak dari bermuatan negatif (anion) menuju kutub positif (anoda). Elektroforesis dapat menggunakan gel agarosa, poliakrilamid, atau agarosa-poliakrilamid (Brown 1999: 43).

2.5 Imunofluoresensi untuk Mendeteksi Virus Dengue

Imunofluoresensi merupakan metode pemeriksaan menggunakan antibodi yang telah terkonjugasi dengan molekul fluoresens dan dilihat di bawah mikroskop ultraviolet (UV). Metode tersebut menggunakan antibodi yang berikatan kovalen dengan molekul fluoresens. Ikatan antara antibodi dan molekul fluoresens tersebut berada pada bagian Fc antibodi (Baratawidjaja 2006: 494).

Terdapat dua jenis metode imunofluoresensi berdasarkan penambahan label fluoresens yang digunakan, yaitu langsung dan tidak langsung. Imunofluoresensi langsung menggunakan antibodi yang direaksikan dengan antigen pada jaringan. Antibodi primer yang digunakan telah dilabel oleh fluoresens (Buchwalow & Böcker 2010: 32). Imunofluoresensi tidak langsung menggunakan antibodi primer yang tidak dilabel yang kemudian dideteksi dengan

antibodi sekunder yang telah dilabel fluoresens. Metode tersebut lebih sering digunakan dibandingkan dengan imunofluoresensi langsung. Hal tersebut disebabkan metode imunofluoresensi tidak langsung lebih sensitif dibandingkan metode imunofluoresensi langsung (Buchwalow & Böcker 2010: 33 & 69). Perbedaan antara imunofluoresensi langsung dan tidak langsung, dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Metode imunofluoresensi
[Sumber: Buchwalow & Böcker 2010: 32--33.]

Imunofluoresensi dapat digunakan untuk mendeteksi dan membedakan serotipe virus dengue. Pendeteksian dilakukan menggunakan antibodi monoklonal yang spesifik terhadap serotipe virus dengue. Antibodi akan berikatan langsung dengan protein virus pada permukaan atau bagian dalam dari sel yang terinfeksi (Voyles 2002: 369).

Antibodi yang umum digunakan untuk mendeteksi serotipe virus dengue yaitu 4G2, 15F3, 3H5, 5D4, dan 1H10. Antibodi monoklonal 4G2 spesifik terhadap famili *Flavivirus*. Antibodi monoklonal 15F3 spesifik terhadap DENV serotipe 1, 3H5 spesifik terhadap DENV-2, 5D4 spesifik terhadap DENV-3, dan 1H10 spesifik terhadap DENV-4. Antibodi monoklonal 15F3, 3H5, dan 5D4

termasuk dalam imunoglobulin kelas 1 (IgG1), sedangkan 1H10 termasuk imunoglobulin kelas 3 (IgG3) (Henchal *dkk.* 1982: 833--845; Henchal *dkk.* 1983: 165).

Pendeteksian virus dengue dengan imunofluoresensi, umumnya menggunakan pewarnaan inti sel, yaitu DAPI *counter staining*. Pewarna tersebut akan memberikan warna biru yang kontras jika digabungkan dengan *probe* berwarna kuning, hijau, ataupun merah. DAPI akan mewarnai *double stranded* DNA yang akan berasosiasi dengan basa AT, dengan eksitasi dan emisi maksimum pada 358 nm dan 461 nm. DAPI juga dapat berikatan pada RNA yang akan menginterkalasi pada basa AU. Eksitasi dan emisi pada ikatan RNA yatu 500 nm dan 460 nm (Invitrogen 2006: 1).

2.6 Kultur Sel

Kultur sel merupakan teknik mengisolasi sel dan jaringan dari asalnya ke lingkungan yang sesuai, secara *in vitro* (Freshney 2005: 1; Ryan 2008: 1). Berdasarkan sel asalnya, kultur sel dibedakan menjadi *primary cell, finite cell lines, continuous cell lines, transformed cell lines*, dan hibridoma. *Primary cells* berasal dari jaringan hewan dewasa ataupun fetal, sedangkan *finite cell lines* berasal dari fetal. *Continuous cell lines* merupakan transformasi spontan dari *primary cells* ataupun *finite cell lines*. *Transformed cell lines* berasal dari sel tumor yang yang ditransformasikan secara spontan secara *in vitro* atau ditransformasikan dengan virus, sedangkan hibridoma merupakan fusi antara sel B dan sel mieloma (Barker 1998: 205--207).

Berdasarkan cara pertumbuhannya, kultur sel dapat diklasifikasikan menjadi *adherent cell* dan *suspension cell*. *Adherent cell* merupakan sel yang tumbuh secara monolayer dan mampu menempel pada lapisan kaca atau substrat plastik (Barker 1998: 208--209). *Suspension cell* merupakan sel yang tersuspensi dalam medium dan tidak melekat pada substrat (Ryan 2008: 3). Sel mampu melakukan proliferasi dan tumbuh tanpa harus menempel pada substrat (Barker 1998: 208--209).

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

Terdapat beberapa galur sel yang sering digunakan dalam isolasi virus dengue. Galur sel yang digunsksn dapat berasal dari sel serangga dan sel mamalia. Sel tersebut antara lain *baby hamster kidney* (BHK21), Vero, dan C6/36.

2.6.1 Sel *baby hamster kidney* (BHK21)

Sel BHK21 berasal dari ginjal bayi hamster (*Mesocricetus auratus*). Karakteristik lipid yang terkandung dalam sel tersebut telah diketahui dan terbukti dapat diinfeksi banyak kelompok virus, termasuk arbovirus (Guskey & Jenkin 1975: 433). Sel BHK21 juga sering digunakan untuk memproduksi vaksin (Beynon & Howe 2004: 25).

2.6.2 Sel Vero

Sel Vero berasal dari ginjal normal *adult African green monkey* (*Cercopithecus aethiops*). Sel Vero merupakan sel yang dikembangkan untuk tumbuh secara terus-menerus (Butler 2004: 25). Sel Vero dapat digunakan untuk menghasilkan vaksin, memelajari replikasi virus, proses transfeksi, dan *plaque assay*. Sel Vero merupakan sel yang sensitif terhadap infeksi beberapa virus, antara lain arbovirus, *Rubella, Simian denovirus*, poliovirus, dan virus influenza (Rebecca 2000: 2--3).

2.6.3 Sel C6/36

Sel C6/36 merupakan sel nyamuk yang paling sering digunakan dalam metodologi isolasi virus. Sel C6/36 merupakan sel larva nyamuk *Ae. albopictus*. *Cell line* tersebut mampu tumbuh dengan cepat, sensitif, dan ekonomis untuk digunakan dalam isolasi virus dengue (Gubler 1998: 490). Sel C6/36 banyak digunakan dalam isolasi virus karena memiliki sensitifitas yang tinggi dan pemeliharaan yang mudah. *Cell line* tersebut stabil dan memiliki pertumbuhan yang optimal pada suhu yang lebih rendah dibandingkan sel mamalia (Samuel & Tyagi 2006: 617--618).

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

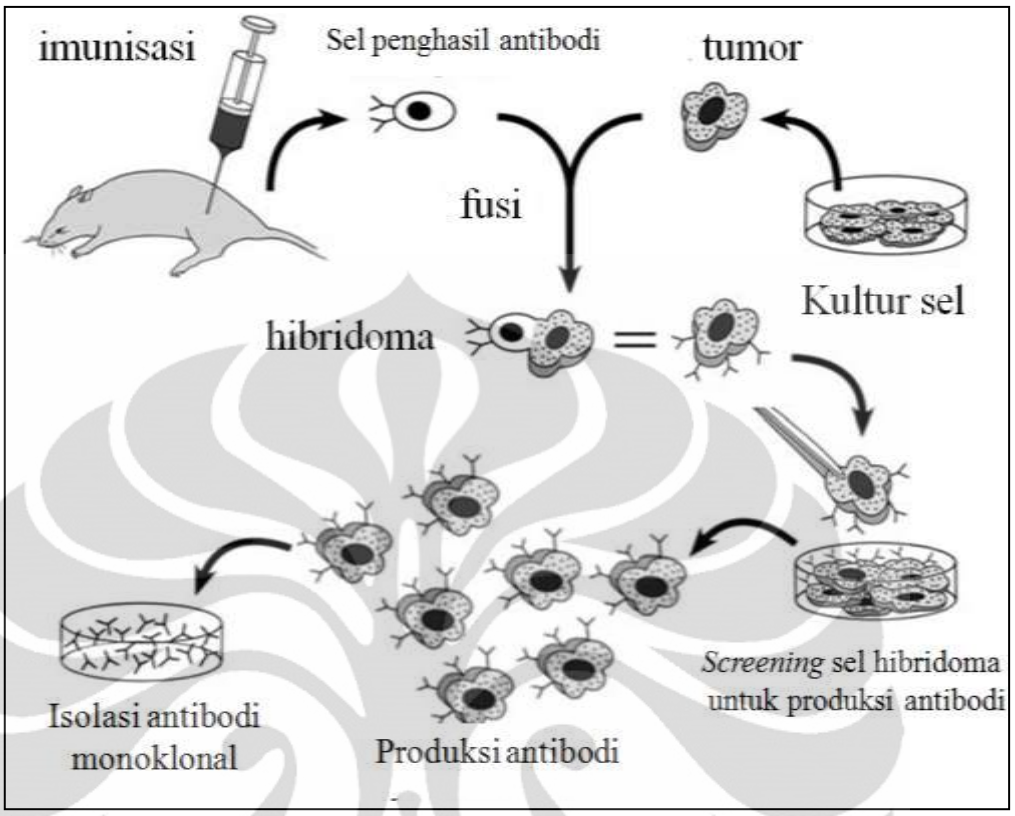
2.7 Antibodi Monoklonal

Antibodi atau imunoglobulin (Ig) merupakan glikoprotein yang digunakan oleh sistem imun untuk mengidentifikasi dan menetralisasi zat asing (antigen) yang masuk ke dalam tubuh (bakteri, virus, atau agen penginfeksi lainnya) (Buchwalow & Böcker 2010: 2). Antibodi terdiri atas 4 rantai polipeptida dasar, yaitu 2 *heavy chain* (rantai berat) dan 2 *light chain* (rantai ringan). Rantai polipeptida yang identik tersebut dihubungkan oleh ikatan disulfida. *Light chain* terdiri atas *kappa* dan *lamda*. *Light chain* tersebut terdiri atas 230 asam amino serta 5 jenis *heavy chain* yang tergantung pada 5 jenis imunoglobulin (IgM, IgG, IgE, IgA, dan IgD) (Baratawidjaja 2006: 74--75).

Antibodi monoklonal merupakan antibodi yang dihasilkan oleh satu sel. Antibodi dapat dihasilkan oleh sel hibridoma yang merupakan fusi antara sel tumor dan sel mamalia. Produksi antibodi dilakukan dengan mengimunisasi hewan uji menggunakan antigen tertentu. Sel dari tubuh hewan uji nantinya akan menghasilkan antibodi spesifik yang dihasilkan oleh sel limfosit B yang banyak terdapat pada limpa. Sel tersebut nantinya akan difusikan dengan sel kanker untuk membuat sel tersebut terus menerus memperbanyak diri (imortal). Sel hibridoma yang dihasilkan akan hidup terus menerus dan memproduksi antibodi yang homogen dan spesifik. Antibodi yang dihasilkan dapat digunakan untuk penelitian maupun diagnosis klinis (Baratawidjaja 2006: 507; Buchwalow & Böcker 2010: 4). Cara produksi antibodi monoklonal dapat dilihat pada Gambar 2.7.

Kemampuan sel hibridoma untuk menghasilkan antibodi secara terus-menerus, disebabkan keberadaan enzim HPRT (hipoksantin fosforibose transferase). Enzim HPRT memiliki peran penting dalam perkembangan sel hibridoma. Tahun 1980, Milstein (*lihat* Hasibuan & Sardi 1998: 149) menyatakan bahwa enzim HPRT yang dimiliki oleh sel hibridoma, berasal dari sel limfosit. Sel mieloma yang hidup terus-menerus tidak memiliki Enzim HPRT. Oleh sebab itu, enzim tersebut berperan penting ketika terjadi fusi antara sel mieloma dan sel limfosit. Enzim tersebut berperan dalam metabolisme asam nukleat agar sel hibridoma berkembang dan menghasilkan antibodi spesifik secara terus-menerus.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011



Gambar 2.7. Skema produksi antibodi monokonal
[Sumber: Buchwalow & Böcker 2010: 5. "diterjemahkan sesuai aslinya"]

2.8 Purifikasi Antibodi Menggunakan Protein G

Purifikasi antibodi dilakukan dengan menggunakan *affinity chromatography*. Purifikasi antibodi bertujuan untuk memurnikan molekul IgG. Prinsip dasar dari purifikasi antibodi adalah adsorpsi dan elusi. Antibodi yang akan dipurifikasi ditahan oleh kolom yang telah berisi matriks. Ikatan antara antibodi dan matriks akan dilepas oleh agen tertentu, misalnya kalium isotiosianat ataupun *buffer* dengan pH yang rendah (Sambrook & Russell 2001c: A9.35--A.927).

Purifikasi antibodi hasil kultur sel, dilakukan dengan menggunakan protein G. Protein G merupakan protein bakteri dari kelompok G *Streptococci* dan *Staphylococcus aureus* yang dapat mengikat IgG. Protein G yang tertanam dalam *sepharose*, dapat mengikat seluruh subkelas dari IgG dengan tingkat kapasitas

yang tinggi. Protein G yang tertanam pada *sepharose* akan mengikat molekul antibodi (IgG) pada sisi Fc. Ikatan tersebut dapat terjadi karena adanya interaksi biologi antara ligan dan molekul target berupa interaksi elektrostatik atau hidrofobik, ikatan *Van der Waals*, dan ikatan hidrogen (Amersham Biosciences 2002: 9).

Ikatan antara antibodi dan matriks dapat dielusi atau dilepaskan dengan cara mengubah pH. Perubahan pH dapat menyebabkan ikatan antara antibodi dengan matriks melemah (Sambrook & Russell 2001c: A9.35--A.927; Amersham Biosciences 2002: 9). Agen yang umum digunakan untuk melepas ikatan tersebut yaitu glisin dengan pH 2,7. Hal tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pH rendah (2,5--3,0) dapat digunakan untuk mengelusi ikatan antibodi dengan matriks (GE Healthcare 2005: 7).

2.9 Pengukuran Konsentrasi Antibodi dengan Metode Bradford

Bradford *protein assay* merupakan metode sederhana untuk menentukan konsentrasi protein suatu larutan. Metode tersebut pertama kali dijelaskan oleh Bradford pada tahun 1976. Metode Bradford menjadi pilihan banyak laboratorium untuk mengukur protein. Metode tersebut termasuk sederhana dan cepat untuk dilakukan serta sensitif terhadap jumlah protein yang sedikit (5--200 µg) (Bradford 1976: 248--250).

Metode Bradford menggunakan reagen pewarna *coomassie brilliant blue* G-250 berwarna kecoklatan, yang direaksikan dengan antibodi yang akan diukur. Pewarna tersebut akan bereaksi dengan antibodi dan menghasilkan warna biru. Perubahan warna terjadi akibat interaksi hidrofobik dan ionik yang menstabilkan bentuk anionik dari zat warna (Bradford 1976: 248--250).

2.10 Western *Blotting*

Western *blotting* digunakan untuk mengidentifikasi dan menguantitasi protein yang spesifik terhadap antigen tertentu. Komponen protein yang dipisahkan secara elektroporetik, akan ditransfer dari gel ke membran yang padat

misalnya nitroselulosa, yang kemudian akan dilabel dengan reagen yang spesifik terhadap bagian dari asam amino. Label yang digunakan merupakan antibodi yang bereaksi spesifik terhadap antigenik epitop dari protein target yang berikatan dengan membran padat (Sambrook & Russell 2001c: A 9.28).

Sampel pada Western *blotting*, sebelumnya dipisahkan dengan SDS-PAGE, kemudian ditransfer ke membran padat, yang kemudian akan diwarnai. Ikatan protein terhadap membran padat kemudian dideteksi dengan antibodi tertentu. Ikatan komplek antibodi-antigen tersebut dideteksi dengan *secondary immunological reagents* (misalnya enzim *horse radish peroxidase*, alkalin fosfatase) yang diikuti dengan autoradiografi, *chemiluminescence*, atau produksi enzimatik dengan pewarnaan presipitasi (Sambrook & Russell 2001c: A 9.28).

Sinyal pita yang dihasilkan pada percobaan merupakan hasil pemecahan substrat luminol oleh enzim *horse radish peroxidase* (HRP). Ikatan antibodi dan protein virus yang telah dilabel enzim HRP, akan dideteksi dengan substrat luminol yang ditambahkan ke membran. Hasil pemecahan luminol, berupa pendaran/*luminescence* yang sebanding dengan jumlah antibodi yang digunakan. Pendaran yang dihasilkan, ditangkap dengan menggunakan film X-ray. Waktu yang diperlukan untuk menangkap pendaran tersebut (*exposure*), berkisar antara beberapa menit sampai 30 menit (Sambrook & Russell 2001c: A8.55).

2.10.1 *Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) merupakan teknik elektroforesis untuk memisahkan molekul protein dengan menggunakan poliakrilamid sebagai matriksnya dan SDS sebagai detergen. *Sodium dodecyl sulphate* (SDS) merupakan detergen yang mampu mengubah protein dengan struktur kompleks menjadi struktur yang lebih sederhana. Hal tersebut dilakukan dengan cara merusak ikatan hidrogen yang terdapat pada protein dan memberikan muatan negatif pada protein yang terdenaturasi. Teknik SDS-PAGE bertujuan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Prinsip kerja SDS-PAGE berdasarkan atas pergerakan partikel-partikel yang

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

bermuatan dalam suatu medan listrik, dengan arah pergerakan partikel bermuatan negatif (anion) menuju kutub positif (anoda) (Sambrook & Russell 2001c: A8.40).

Terdapat dua tipe sistem *buffer* yang digunakan dalam elektroforesis gel protein, yaitu *continous system* yang hanya menggunakan satu *buffer* dan *discontinous system* yang menggunakan dua macam gel dengan masing-masing *buffer* yang berbeda. Protein yang dipisahkan dengan SDS-PAGE, akan diwarnai untuk visualisasi hasil. Pewarnaan yang umum digunakan yaitu *coomassie blue staining* dan *silver salt staining*. *Silver salt staining* memiliki sifat lebih sensitif, namun membutuhkan waktu proses yang lama. *Coomassie blue* lebih banyak digunakan untuk SDS-PAGE karena mampu mengikat protein secara spesifik dengan ikatan kovalen dan proses penanganan yang relatif cepat. (Sambrook & Russell 2001c: A8.40).

Protein dengan SDS-PAGE menggunakan larutan *separating gel* dan *resolving gel*. Larutan gel terdiri atas Tris-HCl, akrilamid, amonium persulfat (APS), TEMED, H_2O, dan 10% SDS. Tris-HCl berfungsi sebagai *buffer* atau larutan penyangga. Akrilamid berfungsi untuk memisahkan molekul yang bermigrasi sesuai dengan berat molekulnya. Amonium persulfat menginisiasi terjadinya polimerisasi dari monomer akrilamid menjadi poliakrilamid. TEMED berfungsi dalam untuk mengkatalis radikal bebas yang dihasilkan oleh APS. H_2O berfungsi sebagai pelarut.

2.11 *Plaque Assay* untuk Mengukur Titer Virus Dengue

Plaque assay merupakan metode standar yang digunakan untuk mengukur titer virus dengue. *Plaque assay* merupakan metode yang sederhana dan akurat dalam merepresentasikan viabilitas virus. *Plaque assay* memiliki prinsip kerja yaitu interaksi antara virus dengan sel inang (Voyles 2002: 24; Lambeth *dkk*. 2005: 3267).

Plaque assay dilakukan dengan cara menginokulasi virus pada sel dengan menggunakan beberapa serial dilusi. Virus akan bereproduksi dalam sel inang dan menginfeksi sel disekelilingnya. Akibatnya sel yang terinfeksi akan mati dan membentuk *plaque*. *Plaque* tersebutlah yang nantinya dihitung untuk mengetahui

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

titer virus (Voyles 2002: 23--24). Berikut merupakan rumus yang digunakan dalam menghitung titer virus dengue:

$$\text{Titer virus (PFU/ml)} = \frac{\text{jumlah } \textit{plaque} \text{ x faktor dilusi x 1000}}{\text{0,2 ml (volume inokulasi)}} \qquad (2.1)$$

(Mahy & Kangro1996: 38)

Titer virus akan dihitung dalam satuan *plaque form unit* (pfu). *Plaque* yang terbentuk dapat dihitung setelah penambahkan zat pewarna. Pewarna yang digunakan yaitu 1% kristal violet. Pewarna tersebut akan mewarnai sel hidup dengan warna ungu sehingga *plaque* yang terbentuk akan terlihat sebagai zona bening. Zona bening tersebutlah yang dihitung untuk melakukan pengukuran titer virus (Matrosovich *dkk*. 2006: 2).

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Lembaga Biologi Molekul Eijkman, Laboratorium Novartis-Eijkman-Hasanuddin Clinical Research Initiative (NEHCRI) Jakarta dari bulan September 2010 sampai Maret 2011.

3.2 Alat

Peralatan yang digunakan yaitu gelas Beaker [Schoot Duran], gelas ukur, timbangan [Kern], pH meter [Schott], *hot plate* dan *magnetic stirer* [Heidolph MR 3001 K], botol titrasi [Nalgene], lemari pendingin [Sharp], *cryovial tube* [NUNC], *biological safety cabinet class* II [Esco], *water bath* [Memmert], inkubator [Memmert & Sanyo], *motorized pipetor* [Bio-Rad], pipet serologi [Corning], tabung sentrifugasi [Falcon], rak tabung [Nalgene], mesin sentrifugasi [Sorval RT 6000D], T-25 dan T-75 *culture flask* [NUNC dan Falcon], mikroskop fase kontras CKX31 [Olympus], *Mr. frosty* [Nunc], tabung nitrogen cair [Nalgene], kotak penyimpanan [Nalgene], *hemocytometer improved* Neubauer, pipet mikro *multichannel* [Bio-Rad], botol reagen [Schott Duran], pipet tetes [BD Falcon], pipet mikro [Bio-Rad], tips kuning dan putih [Axygen], tabung mikrosentrigasi [Sorenson], mesin mikrosentrifugasi *benchtop* [Profuge 6K], vorteks [Heidolph], *thermal cycler* tipe 9700 [Applied Biosystems], tabung Erlenmeyer [Schoot Duran], *benchtop* PCR *hoodt* [Scie-Plas], *microwave oven* [Sharp], peralatan elektroforesis [Bio-Rad], Gel Doc 1000 [Bio-Rad], *econo-column* [Bio-Rad], pompa peristaltik [Gilson], *ring stand*, *syringe* tanpa jarum [Terumo], *syringe filter* 0,8 µm [Nalgene], tabung Amicon Ultra®-15 [Millipore], NanoDrop ND 1000 [Thermo-Fisher], spektrofotometri [Genesys 10UV], kuvet, SDS- PAGE *apparatus* [Bio-Rad], *rocking shaker* [Heidolph Duomax 1030], *thermoblock* NB-305 TB [N-Biotek], *trans blot semi dry* [Bio-Rad], *extra thick blot paper* [Bio-Rad], ECL *nitrocelulose membrane* [Bio-Rad], *x-ray film super*RX [Fuji medical],

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

6 *well plate culture plate* [NUNC], 24 *well culture plate* [NUNC], gelas penutup, gelas objek cat.no. 7105 [Sail brand], mikroskop fluoresensi [Nikon], dan pompa vakum [Millipore].

3.3 Bahan

3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan yaitu prototipe virus dengue D1-Hawaii (Hawaii Tahun 1944), D2-NGC (Nugini 1944), D3-H87 (Filipina 1956), D4-H241 (Filipina 1956) dan stok beku galur sel C6/36, BHK21, Vero76, serta sel hibridoma 4G2, 15F3, 3H5, 5D4, dan 1H10. Sampel merupakan koleksi dari Novartis Institute for Tropical Diseases (NITD). Sampel disimpan dalam tabung nitrogen cair dan pada suhu -80^{o} C untuk mempertahankan sampel tetap dalam keadaan beku. Krioprotektan yang digunakan untuk penyimpanan galur sel yaitu medium lengkap dan *dimethylsulfoxide* (DMSO) dengan perbandingan 9:1. Kriopreotektan yang digunakan untuk penyimpanan sel hibridoma menggunakan *fetal bovine serum* (FBS) yang difilter menggunakan *syring filter* 0,2 µm, dan *dimethylsulfoxide* (DMSO) dengan perbandingan 9,5:0,5.

3.3.2 Bahan kimia

1x 0,25% Tripsin-EDTA [Gibco], *dimethylsulfoxide* (DMSO) [Applichem], 1x *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,2 (tanpa Mg^{2+} dan Ca^{2+}) [Gibco], 1 M HCl [JT Baker], 1 M NaOH [Merck], 0,1 M DTT [Invitrogen], 10 mM dNTP *mix* [Invitrogen], primer D1-D2-TS1-TS2-TS3-DEN4 (10 pmol) [AIT Biotech], *nuclease-free water* [Invitrogen], 5x *first strand buffer* [Invitrogen], RNA*se out* [Invitrogen], *superscript* III RT [Invitrogen], 10x *buffer* [Roche], 25 mM $MgCl_2$ [Invitrogen], *Taq DNA polymerase* (5U/µl) [Roche], bubuk agarosa [Bio-Rad], etidium bromida [Sigma], DNA *ladder* 100 bp [Vivantis], *protein G sepharose 4 fast flow beads* Lot. No. 10015690 [GE Health care], 0,1 M Glisin [Bio-Rad], 1 M Tris pH 8,4 dan pH 8,8 [Invitrogen], *Bovine Serum Albumine*

(BSA) konsentrasi 125, 250, 500, 750, 1.000, 1.500 µg/ml [Bio-Rad], 30% *acrylamid mix* [Bio-Rad], 10% SDS [Bio-Rad], amonium persulfat [Bio-Rad], TEMED [Bio-Rad], 1,0 M Tris pH 6,8 [Bio-Rad], *loading buffer*, *comassie brilliant blue* R-250 [Bio-Rad], *benchmark prestained protein ladder* [Invitrogen], 1x Ponceau [Sigma], *tween* 20 [Sigma], *skim milk* [Sunlac], *Goat anti mouse IgG (Fab)-Horse radish peroxidase* (Sigma), larutan *developer* dan *fixer* [Fuji], ECL *reaction* [GE Health care], Triton X-100 [Sigma], formalin [Steris], *fluorescein isothiocyanate goat anti-mouse IgG* (FITC) (2 mg/ml) [Invitrogen], 300 nM DAPI *counterstaining reagent* [Invitrogen], *Prolong antifade* dan *Prolong Gold mounting medium* [Invitrogen], Alexa Fluor® 555 *Monoclonal antibody Labeling Kit* (A-20187) [Molecular Probes], etanol, *vesphene* [Steris], hepes [Gibco], *Aquacide* II [Merck Calbiochem], *aluminium foil* [Bagus], *wrap plastic* [Kim pak], tisu [Scott, Kimwipes, Kleenex], dan sarung tangan [Ansell].

3.3.3 Medium dan *buffer*

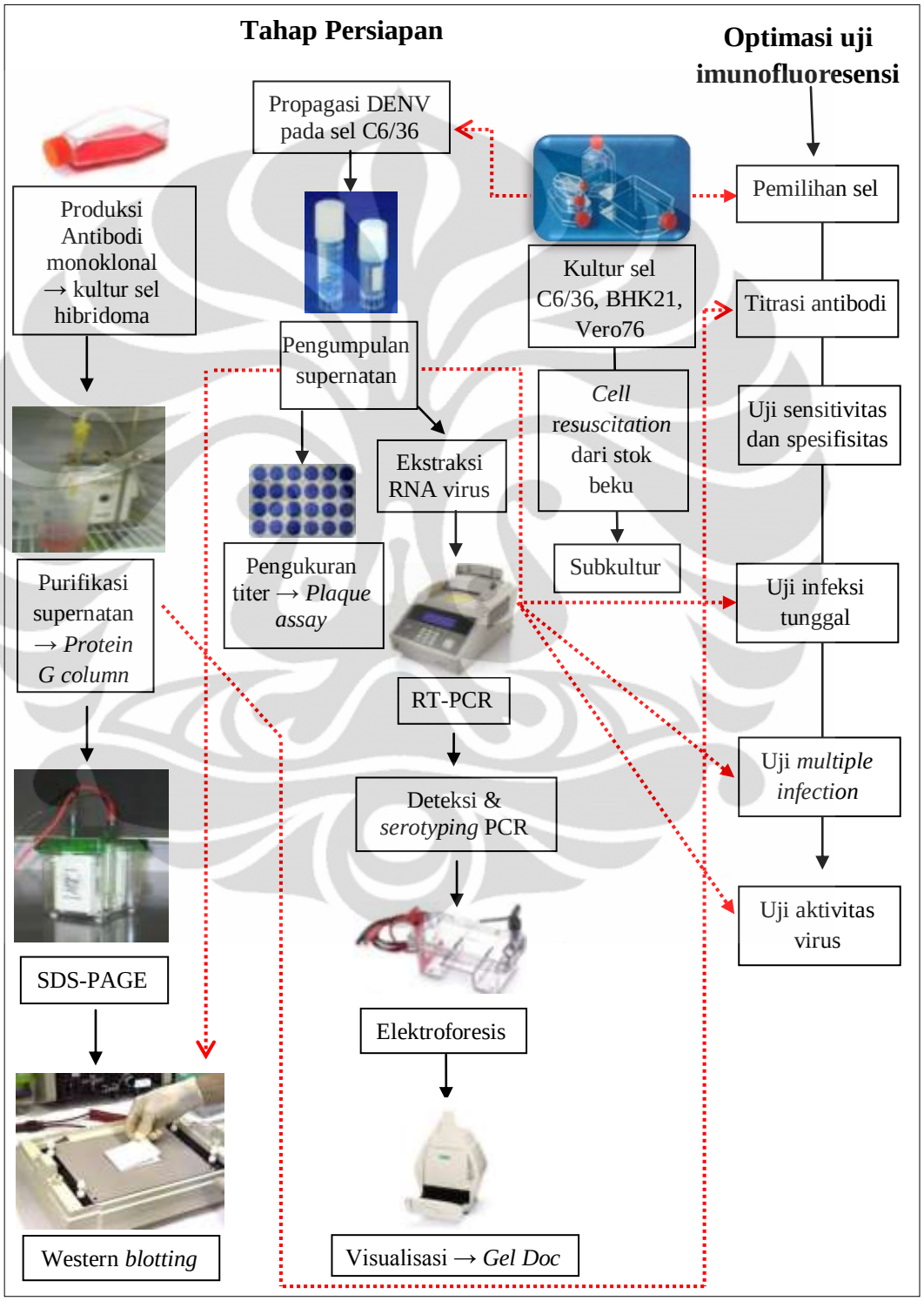
Medium yang digunakan dalam penelitian yaitu 1x Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 [Gibco] dan 1x *minimum essential media* (MEM) dengan suplementasi 2 mM L-glutamine, 10% *fetal bovine serum* (FBS) [Gibco] dan 1% penisilin/streptomisin (100 U/ml Penisilin, 100 µg/ml Streptomisin) [Gibco], dan *metyl-cellulose overlay* medium. *Buffer* yang digunakan yaitu 1X *tris base acid*-EDTA (TBE), 1x *phosphate-buffered saline* (PBS) pH 7,4, 1x Tris-*glycine electrophoresis buffer*, *methanol acetic acid solution*, *transfer buffer*, dan 1x *tris buffer saline* (TBS). Pembuatan *buffer* dan medium dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.4 Cara Kerja

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan. Tahapan awal penelitian yaitu memproduksi antibodi monoklonal dengan cara mengultur sel hibridoma. Tahap selanjutnya yaitu persiapan sel yang akan digunakan dengan menumbuhkan kembali galur sel C6/36, BHK21, dan Vero76 dari stok beku. Persiapan terakhir

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

yang dilakukan yaitu propagasi virus pada sel C6/36. Skema cara kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4. Skema cara kerja penelitian

3.4.1 Produksi antibodi monoklonal

Antibodi monoklonal diproduksi dengan mengultur sel hibridoma yang akan menghasilkan antibodi monoklonal spesifik. Sel hibridoma yang dipergunakan yaitu 4G2 (semua serotipe), 15F3 (anti DEN-1), 5D4 (anti DEN-2), 3H5 (anti DEN-3), dan 1H10 (anti DEN-4) (Henchal *dkk*. 1983: 165). Setiap sel ditumbuhkan dalam medium 1x RPMI 1640 dengan suplementasi 10% FBS dan 1% penisilin/streptomisin.

Stok beku sel hibridoma dari tabung nitrogen cair, dicairkan pada suhu 37^{o} C menggunakan *waterbath incubator*. Sel kemudian disuspensikan dalam tabung sentrifugasi yang telah berisi 10 ml medium kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, kemudian pelet disuspensi dengan 5 ml medium. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke T-25 *culture flask* dan dilabel dengan nama sel, *passage number*, tanggal, serta inisial. Sel diinkubasi pada suhu 37^{o} C dengan 5% CO_2.

Setiap harinya sel diperiksa. Jika sel telah memenuhi *flask*, maka beberapa flask dapat disatukan dalam *flask* yang lebih besar untuk memproduksi antibodi. Sel ditumbuhkan selama kurang lebih 30 hari, tanpa mengganti medium.

Sel dapat ditambahkan jika terdapat banyak sel yang gelap dan ukurannya mengecil. Penambahan sel dilakukan dengan cara mengumpulkan supernatan dari *culture flask* yang lebih kecil, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3.300 rpm. Supernatan dibuang dan pelet disuspensikan dengan medium pada *culture flask* tempat produksi antibodi. Suspensi sel kemudian dimasukan untuk produksi antibodi. Setelah 30 hari, supernatan dari kultur sel dikumpulkan dalam tabung sentrifugasi dan disimpan dalam suhu -20^{o} C kemudian supernatan sel siap untuk dipurifikasi.

3.4.1.1 Purifikasi antibodi

Purifikasi antibodi dilakukan berdasarkan metode dari GE Healthcare (2005: 1--6) menggunakan matriks *protein G sepharose 4 fast flow beads* dan *protein G column* (Parkhouse 1984: 298--299). Seluruh larutan yang digunakan

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

difiltrasi menggunakan filter berukuran 0,8 µm. Kolom dengan kapasitas volume 4 ml disiapkan dan disambungkan dengan pompa peristaltik. Kolom dicuci dengan menggunakan alkohol 70% dengan pengaturan kecepatan pompa 8,6 rpm.

Sebanyak 2 ml *beads* dimasukan ke dalam kolom. Kolom berisi *beads* dicuci dengan alkohol 70% dan ddH_2O, masing-masing sebanyak 20 ml pengaturan kecepatan pompa 8,6 rpm yang menghasilkan laju alir 3 ml/menit. Setelah pencucian selesai, sebanyak 40 ml 1x PBS pH 7,2 dialirkan ke dalam kolom dengan pengaturan kecepatan pompa 2,7 rpm (laju alir 1 ml/menit). . Supernatan kultur sel hibridoma kemudian dimasukkan ke dalam kolom dengan kecepatan 2,7 rpm. Sebanyak 80 ml 1x PBS pH 7,2 dialirkan dengan kecepatan 8,6 rpm.

Ikatan antibodi dengan *beads* kemudian dilepaskan dengan menggunakan 0,1 M glisin pH 2,7 dengan kecepatan 2,7 rpm. Setiap 1 ml tetesan eluat ditampung dalam tabung mikrosentrifugasi sebanyak 15 tabung. Setiap fraksi eluat kemudian ditambahkan 1M Tris pH 8 sebanyak 100 µl, kemudian dihomogenkan dengan cara divorteks. Kandungan protein (sebagai IgG) dalam masing-masing tabung, diukur pada panjang gelombang 280 nm menggunakan alat NanoDrop1000.

Fraksi eluat dengan konsentrasi tinggi kemudian dipindahkan ke dalam Amicon Ultra 100K MWCO. 1x PBS pH 7,4 ditambahkan sampai batas maksimal tabung (15 ml) untuk pertukaran *buffer*. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit. Tahap pertukaran *buffer* tersebut dilakukan sebanyak 2 kali. Larutan yang tertahan pada filter (*retentate*) kemudian diambil dan dipindahkan ke tabung mikrosentrifugasi. Larutan tersebut merupakan antibodi yang telah dipurifikasi dan terkonsentrasi dalam *buffer* PBS. Antibodi hasil purifikasi kemudian disimpan pada suhu -80^oC.

Kolom yang telah dialiri supernatan kultur sel hibridoma kemudian dicuci dengan menggunakan 0,1 M glisin sebanyak 80 ml dengan kecepatan 8,6 rpm. Pencucian dilakukan untuk memastikan kolom kembali bersih dan siap dipakai untuk purifikasi selanjutnya. Kolom kemudian dicuci dengan 40 ml 1x PBS pH 7,4; 20 ml ddH_2O; dan 20 ml etanol 70%. Kolom kemudian disimpan pada suhu 4^oC dan dapat digunakan kembali untuk purifikasi antibodi yang sama.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

3.4.1.2 Bradford *protein assay*

Konsentrasi antibodi yang telah dipurifikasi, diukur dengan menggunakan metode Bradford (1976: 250). Antibodi yang akan diukur , diencerkan sebanyak 10 kali. Sebagai larutan standar digunakan *bovine serum albumin* (BSA) dalam berbagai konsentrasi. Masing-masing antibodi dan larutan standar sebanyak 20 µl dicampurkan dengan *comassie briliant blue* sebanyak 1.000 µl. Campuran tersebut kemudian divorteks dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi larutan standar digunakan untuk membuat kurva standar sehingga didapat persamaan garis. Nilai absorbansi antibodi kemudian dimasukan ke dalam persamaan garis untuk mendapatkan konsentrasi antibodi.

3.4.1.3 *Sodium dedocyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)

Kemurnian hasil purifikasi protein dapat dianalisis dengan menggunakan metode *Sodium dedocyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) (Parkhouse 1984: 300). Mula-mula perangkat SDS-PAGE dibersihkan dan dipasang sesuai dengan petunjuk pemasangan. Larutan 10% *resolving gel* dibuat dan dimasukkan diantara celah *short plate* dan *spacer plate* hingga dua per tiga bagian. Metanol 5% ditambahkan hingga batas atas kaca dan gel dibiarkan mengeras. Setelah gel mengeras, metanol dibuang dan gel dicuci dengan ddH_2O. Larutan 5% *stacking gel* dimasukkan sampai batas atas kaca, kemudian *comb* dipasang dan gel didiamkan sampai mengeras. Gel yang telah mengeras diletakkan pada *electrode assembly* dengan posisi *short plate* menghadap ke arah dalam, selanjutnya dimasukkan ke dalam elektroforesis *tank* dan diisi dengan 1x *Tris-glycine electrophoresis buffer*.

Sebanyak 10 µl sampel dicampurkan dengan 2 µl 5x *loading buffer*, kemudian diinkubasi pada suhu 100^{o} C selama 3 menit dengan menggunakan alat *termo-block*. Sebanyak 10 µl marker protein serta 12 µl sampel dimasukkan ke dalam masing-masing *well* kemudian dilakukan *running gel* dengan voltase 80 V.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

Setelah seluruh sampel berada di batas antara *stacking gel* dan *resolving gel*, voltase kemudian dinaikkan menjadi 120 V dan dilakukan *running* sampai bromofenol biru mencapai batas bawah gel.

Gel kemudian diangkat dan direndam dalam *comassie blue* selama 30 menit. Gel kemudian dibilas dengan *destain buffer* (*methanol acetic solution*) dalam beberapa kali pengulangan sampai latar belakang gel bersih. Setelah latar belakang gel bersih, kemudian gel dicuci dengan menggunakan dH_2O untuk rehidrasi gel. Gel kemudian dikeringkan dan dimasukkan ke dalam *plastic wrap* dan hasil SDS-PAGE dapat dianalisis dan didokumentasikan.

3.4.1.4 Pelabelan antibodi

Antibodi dilabel dengan menggunakan Alexa Fluor®555 Monoclonal Antibody Labeling Kit (A-20187) [Molecular Probes]. Cara kerja dilakukan berdasarkan prosedur pada kit (Molecular Probes 2001: 1--3). Pelabelan dilakukan dengan mereaksikan 1 mg/ml antibodi yang telah dipurifikasi dengan bahan-bahan yang terdapat pada kit. Hasil akhir yang akan diperoleh yaitu antibodi yang telah terlabel dengan molekul fluoresens dalam *buffer* PBS pH 7,2 dengan 2 mM sodium azide. Antibodi disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya dengan suhu 4^o C atau -20^o C dan stabil untuk beberapa bulan.

3.4.2 Persiapan sel

Sel yang digunakan berupa galur sel yang telah dibekukan. Galur sel yang digunakan yaitu C6/36, BHK21, dan Vero76 dan merupakan koleksi dari Novartis Institute for Tropical Diseases (NITD). Kultur sel yang dilakukan merupakan hasil optimasi oleh laboratorium NEHCRI. Mula-mula stok beku galur sel dicairkan pada suhu 37^o C kemudian dipindahkan ke tabung sentrifus yang telah berisi 10 ml medium 1x RPMI 1640-10% FBS-1% penisilin/streptomisin. Sel disentrifugasi dengan kecepatan 1.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang. Supernatan dibuang kemudian pelet ditambahkan 5 ml medium dan dipipet naik turun sampai pelet tersuspensi. Suspensi sel dipindahkan ke T-25 *culture flask*

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

dan dilabel dengan nama sel, *passage number*, tanggal, serta inisial. Sel C6/36 disimpan pada inkubator dengan suhu 28^{o} C ditutup rapat, sedangkan sel BHK-21 dan Vero76 disimpan di inkubator 37^{o} C-5% CO_2 dengan tutup dibuka setengah. Sel setiap harinya dicek dan dilakukan subkultur jika sel telah monolayer.

3.4.2.1 Subkultur

Subkultur dilakukan, jika sel telah tumbuh memenuhi dasar *flask*. Seluruh medium pada *flask* dibuang, kemudian 5 ml 1x *phosphate buffered saline* (PBS) tanpa Mg^{2+} dan Ca^{2+} pH 7,2 ditambahkan ke dalam *flask* untuk mencuci seluruh permukaan *flask*. *Buffer* kemudian dibuang dan sebanyak 0,5 ml 1x 0,25% Tripsin-EDTA ditambahkan. Selama proses tripsinisasi, *flask* dapat diinkubasi pada suhu 37^{o} C untuk mempercepat lepasnya sel. Setelah terlihat *clear space* (ruang dimana sel telah terlepas dari dasar *flask*), sebagian dari tripsin dibuang. *Flask* kemudian dipukul perlahan di bagian tepi untuk mempercepat proses pelepasan sel, untuk sel Vero tidak dilakukan pemukulan pada *flask*.

Sebanyak 15 ml medium ditambahkan ke dalam *flask* kemudian dipipet naik turun sampai sel tersuspensi. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke T-75 *culture flask* dengan rasio 1:3. *Flask* diberi label dengan nama sel, *passage number*, tanggal, serta inisial dan kemudian disimpan dalam inkubator.

3.4.3 Propagasi Virus

Propagasi virus dengue dilakukan berdasarkan protokol yang dibuat oleh NITD. Virus dengue yang digunakan yaitu D1-Hawaii, D2-NGC, D3-H87, D4-H241. Virus-virus tersebut, merupakan koleksi dari Novartis Institute for Tropical Diseases (NITD). Mula-mula sel C6/36 disubkultur ke dalam 5 T-25 *culture flask* dan diinkubasi pada suhu 28^{o} C. Empat *flask* digunakan untuk infeksi virus (DEN1--4) dan 1 *flask* untuk kontrol sel yang tidak terinfeksi. Jika sel telah 90--100% memenuhi dasar *flask*, sel siap untuk diinfeksi virus.

Tabung sentrifugasi disiapkan untuk masing-masing virus. Setiap tabung dimasukkan 2 ml medium 1x RPMI dengan suplementasi 2% FBS dan 1%

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

penisilin/streptomisin. Stok beku virus, diambil dari suhu -80^{o} C dan dicairkan dalam *water bath*. Sebanyak 20 µl stok ditambahkan ke masing-masing tabung kemudian dihomogenisasi dengan vorteks. Sementara itu, medium pada masing-masing *flask* dibuang kemudian medium yang telah disuspensikan dengan virus dimasukkan ke dalam *flask*. *Flask* untuk kontrol ditambahkan medium tanpa virus, sebanyak 2.020 µl.

Masing-masing *flask* kemudian diinkubasi pada suhu 28^{o} C selama 1 jam. Setelah 1 jam, seluruh medium dibuang kemudian dicuci dengan 5 ml 1x PBS pH 7,2. Sebanyak 3 ml medium 1x RPMI - 2% FBS -1% penisilin/streptomisin ditambahkan ke dalam masing-masing *flask* dan diinkubasi pada suhu 28^{o} C.

Hari ke-7 inkubasi, virus dapat dipanen. Virus juga dapat dipanen setelah terbentuk *cytophatic effect* (CPE) atau perubahan morfologi (betuk dan ukuran) sel akibat terinfeksi virus. Seluruh medium pada masing-masing *flask* dipindahkan ke tabung sentrifugasi dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4.000 rpm pada suhu ruang. Masing-masing supernatan sel yang mengandung virus, diambil dan dipindahkan ke *cryovial tube* sebanyak 1,5 ml. Setiap *tube* diberi label nama sel, strain virus, *passage*, lama inkubasi, tanggal, dan inisial. *Flask* dapat ditambahkan medium kembali untuk dipanen pada hari ke-13. Virus yang telah dipanen kemudian disimpan pada suhu -80^{o} C.

3.4.3.1 *Plaque assay*

Supernatan virus yang telah dipropagasi, diukur titernya menggunakan *plaque assay* pada sel BHK21 (Morens *dkk*. 1985: 250--251). Sel BHK21 ditumbuhkan pada T-75 *culture flask*. Setelah sel terlihat memenuhi dasar *flask*, digunakan tripsin untuk melepaskan sel. Sel kemudian disuspensikan dalam 30 ml medium (1X RPMI-10% FBS-1% Pen/strep). Suspensi sel kemudian dimasukan sebanyak 600 µl ke dalam 24-*well plate* dan diinkubasi pada suhu 37^{o} C-5% CO_2 semalaman. Setelah sel tumbuh hampir memenuhi seluruh permukaan, maka sel siap untuk diinfeksi. Virus disiapkan dengan membuat pengenceran stok virus sebesar 10 kali secara bertahap, menggunakan medium 1X RPMI-2% FBS-1% penisilin/streptomisin. Medium pada masing-masing *well* dibuang kemudian

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

ditambahkan 200 µl virus yang telah didilusi, dengan dua kali pengulangan. *Plate* kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37^{o} C-5% CO_2 dan setiap 20 menit *plate* digoyang-goyangkan untuk mencegah sel mengalami kekeringan. Setelah 1 jam, seluruh medium dibuang dan diganti dengan 500 µl *overlay medium*. Komposisi *overlay medium* dapat dilihat pada Lampiran 1. Sel kemudian diinkubasi selama 6 hari pada suhu 37^{o} C-5% CO_2. Setelah 6 hari, sel difiksasi dengan 3,7% formaldehid selama 30 menit kemudian dicuci dibawah air mengalir. Sebanyak 200 µl 1% kristal violet ditambahkan ke dalam masing-masing *well* dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. *Plate* kemudian dicuci kembali dengan air mengalir dan dikeringkan, selanjutnya *plaque* yang terbentuk dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Titer virus (PFU/ml)} = \frac{\text{jumlah } \textit{plaque} \text{ x faktor dilusi x 1000}}{\text{0,2 ml (volume inokulasi)}} \qquad (3.1)$$

3.4.4 Western *blotting*

Spesifikasi antibodi monoklonal terhadap virus dengue, diketahui dengan menggunakan metode Western *blotting* (Sambrook & Russell 2001: A 9.28). Tahap awal yang dilakukan yaitu, supernatan kultur sel virus dengue diinaktifkan dengan memberikan sinar ultraviolet (UV) selama 30 menit. Protein virus dengue kemudian dipisahkan dengan mengunakan SDS-PAGE menggunakan 10% *resolving gel* dan 5% *stacking gel* pada tegangan 100 V.

Gel hasil SDS-PAGE kemudian direndam di dalam *transfer buffer*. Membran nitroselulosa diaktifkan dalam H_2O selama beberapa saat kemudian direndam dalam *transfer buffer* selama 10 menit. *Extra thick blot paper* disiapkan dan direndam dalam *transfer buffer.*

Transfer protein dilakukan menggunakan kemudian *trans blot semi dry*. Anoda platinum dari alat tersebut diusap dengan *transfer buffer*. *Extra thick blot paper* diletakkan didasar anoda, diikuti dengan membran. Gel hasil SDS-PAGE kemudian diletakan di atasnya diikuti dengan *Extra thick blot paper*. Katoda

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

kemudian dipasang dan dihubungkan dengan arus listrik. Transfer membran dilakukan selama 1 jam pada tegangan 15 V.

Membran hasil transfer direndam dalam pewarna Panceau untuk melihat pita yang telah dipindahkan. Pewarnaan dapat dihilangkan dengan melakukan *destaining* menggunakan 1x TBST (0,05% *Tween* 20 dalam 1x TBS). Membran kemudian direndam dalam 10 ml *blocking reagent* (5% *skim milk* dalam 1x TBST) selama 1 jam.

Membran dicuci dengan 1x TBST sebanyak 3 kali selama 10 menit. Masing-masing antibodi primer (antibodi monoklonal) disiapkan dalam *blocking reagent* dengan perbandingan 1:1.000 dan ditambahkan 10% *sodium azide*. antibodi primer kemudian ditambahkan ke membran sesuai serotipe virus dengue. Membran kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 4^{o} C.

Membran dicuci dengan 1x TBST selama 10 menit, dengan 3 kali pengulangan. Antibodi sekunder (*Goat Anti Mouse IgG* (Fab) *peroxidase*) disiapkan dalam *blocking reagent* dengan perbandingan 1: 2.000. Setiap membran kemudian ditambahkan Antibodi sekunder dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah 1 jam membran kemudian dicuci dengan 1x TBST selama 10 menit, dengan 3 kali pengulangan.

Membran kemudian dideteksi dengan *chemiluminescene*. Pengerjaan tahap tersebut, dilakukan dalam ruang gelap. Masing-masing membran dikeringkan dengan menggunakan tisu dan dimasukkan ke dalam *plastic bag* yang diletakan dalam *cassette*. *Enhanced chemiluminescene* (ECL) *reaction* disiapkan dengan menambahkan Part A dan Part B dengan perbandingan 1:3. *Enhanced chemiluminescene* (ECL) *reaction* kemudian ditambahkan ke atas membran dan diinkubasi selama 5 menit.

Membran kemudian dikeringkan dengan menggunakan tisu. *Developer solution*, *fixer solution*, dan air disiapkan dalam wadah yang berbeda. Kertas film diletakan diatas membran, kemudian dengan cepat ditutup dan didiamkan beberapa saat. Kertas film kemudian direndam bergantian di dalam *developer solution* kemudian *fixer solution* dan terakhir dicuci dalam air. Perendaman dilakukan selama 3 menit. Kertas film dikeringkan, kemudian hasil yang diperoleh dianalisis.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

3.4.5 Ektraksi RNA dari supernatan kultur sel virus dengue

Ekstraksi RNA virus menggunakan QIAamp® Viral Mini Kit [QIAGEN]. RNA virus diektraksi dari 140 µl supernatan kultur virus dengue. Cara kerja ekstraksi disesuaikan dengan prosedur pada kit (Qiagen 2007: 23--25). Isolasi RNA disimpan dalam 60 µl *buffe*r AVE dan digunakan sebagai *template* RT-PCR. Hasil ekstraksi RNA dapat disimpan pada suhu -20^{o} C atau -80^{o} C.

3.4.6 *Reverse transcription* PCR (RT-PCR)

Amplifikasi RNA dari supernatan kultur dengan menggunakan RT-PCR yang dikembangkan oleh Lanciotti *dkk.* dan Harris *dkk.* (Lanciotti *dkk*. 1992:546--547 & Harris *dkk*. 1998: 2635). Komponen PCR *mix* yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.4.6.

Tabel 3.4.6. Komponen *master mixture* RT-PCR

	Komponen	**Jumlah (µl)**
1	0.1 M DTT	1
	10 mM dNTP *mix*	1
	D2 primer	0.5
	RNA	6
	Nuclease-free water	6.5
2	5X *First Strand Buffer*	4
	RNA*se Out*	0.5
	Superscript III RT	0.5
	Total	20

Terdapat 2 macam komponen PCR *mix* pada RT-PCR. Setelah komponen pertama PCR *mix* dimasukan, kemudian disentrifus dan didenaturasi pada suhu 65^{o} C selama 5 menit. Setelah 5 menit, komponen PCR *mix* kedua ditambahkan dan tabung lalu divorteks. Tabung kemudian diletakkan kembali ke dalam mesin *thermal cycler*, lalu siklus dijalankan sesuai program. Siklus yang dijalankan yaitu 25^{o} C selama 5 menit, 42^{o} C selama 60 menit, 70^{o}C selama 15 menit, dan 4^{o}

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

C tak terhingga (~). Siklus yang digunakan merupakan hasil optimasi yang dilakukan oleh Laboratorium NEHCRI.

3.4.6.1 *Polymerase chain reaction* (PCR) untuk deteksi dan *typing* DENV

Amplifikasi hasil RT-PCR untuk deteksi dan *typing* virus dengue menggunakan metode yang dikembangkan oleh Lanciotti *dkk.* dan Harris *dkk.* (1992:546--547 & 1998: 2635). Amplifikasi pada PCR tahap kedua menggunakan primer D1 sebagai primer *forward* dan *type-specific*, yaitu TS1, TS2, TS3, dan DEN4. Primer DEN4 digunakan untuk mencegah struktur *hairpin* sehingga dapat meningkatkan jumlah produk amplifikasi virus dengue 4 (Harris *dkk*. 1998: 2635). Komponen PCR *mix* dapat dilihat pada Tabel 3.4.6.1.

Tabel 3.4.6.1. Komponen *master mixture* PCR untuk deteksi dan *typing* DENV

Komponen	**Jumlah (µl)**	
	Deteksi	***Typing***
10X *Roche Buffer*	2.5	2.5
10 mM dNTP *Mix*	0.5	0.5
cDNA (dilusi 100 kali)	2	2
Primer D1	0.3	0.5
Primer D2	0.3	-
Primer TS1	-	0.2
Primer TS2	-	0.2
Primer TS3	-	0.2
Primer DEN4	-	0.2
5 U/µl Taq DNA *polymerase*	0.15	0.15
Nuclease-free water	19.25	18.55
Total	**25**	**25**

Siklus yang digunakan untuk deteksi virus dengue sebanyak 40 siklus dengan suhu 95^{o} C selama 2 menit, 95^{o} C selama 30 detik, 60^{o} C selama 1 menit, 72^{o} C selama 1 menit 30 detik, 72^{o} C selama 10 menit, dan 4^{o} C tak terhingga (~). Siklus yang digunakan untuk *typing* virus dengue sebanyak 10 siklus dengan suhu

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

95^{o}C selama 2 menit, 95^{o} C selama 30 detik, 60^{o} C selama 1 menit, 72^{o} C selama 1 menit 30 detik, 72^{o} C selama 10 menit, dan 4^{o} C tak terhingga (~).

3.4.6.2 Elektroforesis hasil PCR untuk deteksi dan *typing* virus dengue

Hasil amplifikasi cDNA dielektroforesis berdasarkan Sambrook & Russell (2001b: 5.40--5.46). Gel yang digunakan yaitu agarosa dengan konsentrasi 2% dengan pewarnaan 0,5 µg/µl etidium bromida (EtBr). *Buffer* yang digunakan yaitu 1x *tris base acid*-EDTA (TBE). Sebanyak 15 µl sampel dicampurkan dengan 3 µl 5x *loading dye* di atas parafilm. Setiap sampel dan marka 100 bp dimasukkan ke dalam masing-masing *well*. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 120 V selama 1 jam. Hasil *running* elektroforesis kemudian divisualisasikan menggunakan Gel Doc.

3.4.7 Prosedur uji imunofluoresensi

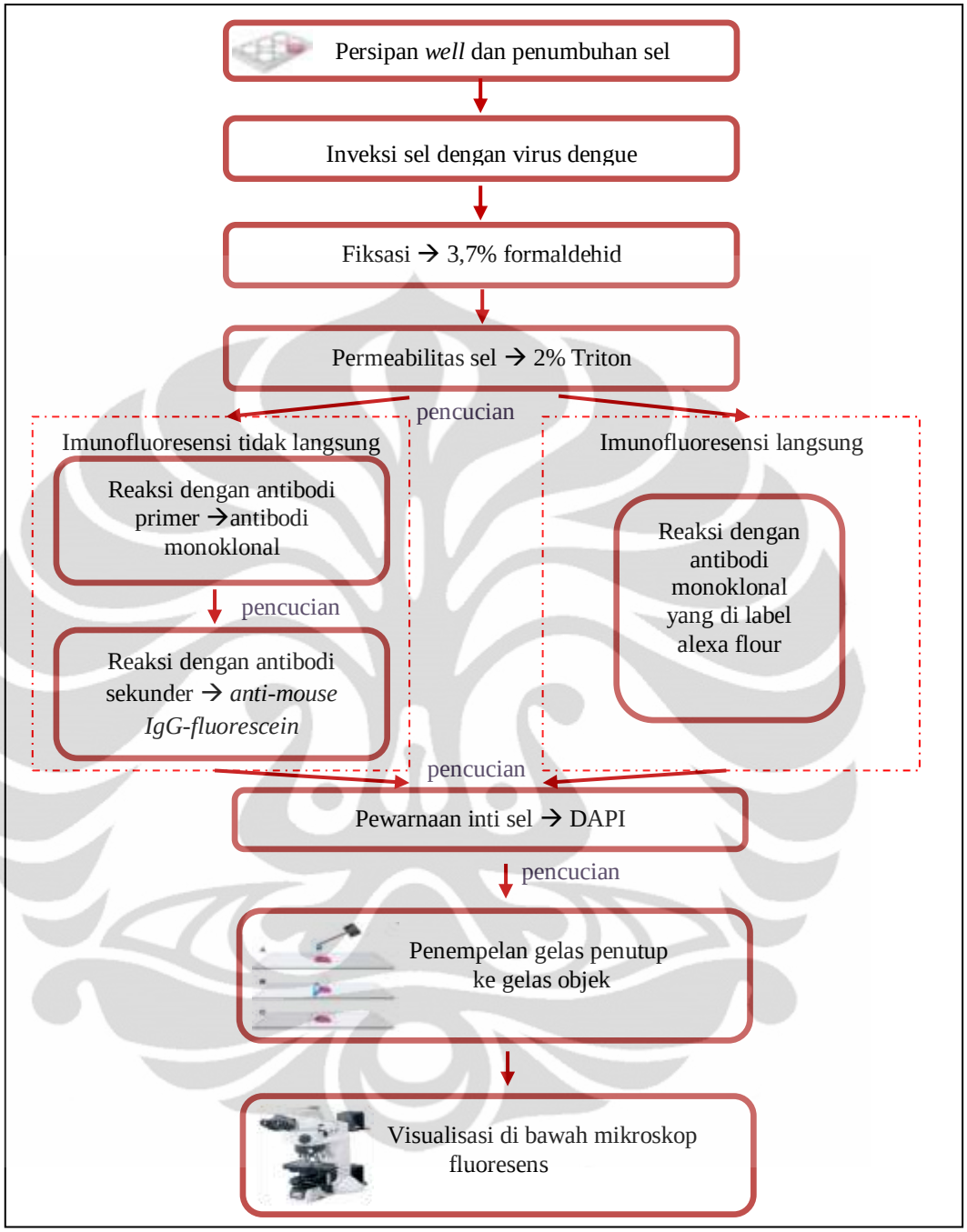
Metode imunofluoresensi dilakukan berdasarkan cara kerja Laboratorium NEHCRI. Uji imunofluoresensi yang digunakan yaitu langsung dan tidak langsung. Skema cara kerja uji imunofluoresensi dapat dilihat pada Gambar 3.4.7.

Mula-mula gelas penutup disterilisasi dengan etanol 70% dan dilewatkan di atas pembakar spiritus sampai kering. Gelas penutup kemudian diletakan pada masing-masing 6-*well culture plate* dan dicuci dengan1x PBS pH 7,2 sebanyak 2 ml untuk memastikan bersih dari etanol.

Sel yang telah ditumbuhkan pada *flask*, diambil dengan cara mensuspensikan dalam medium. Sel kemudian dihitung dengan hemositometer. Suspensi sel kemudian dimasukan ke dalam *well* sekitar 2 x 10^5 *cell/well* dalam 3 ml 1x RPMI-10% FBS-1% penisilin/streptomisin. Sel diinkubasi pada suhu dan kondisi yang sesuai selama 1 malam. Sel yang dimasukkan dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel} = \frac{\text{Jumlah sel yang dihitung} \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Jumlah kotak yang dihitung dalam } \textit{chamber}} \quad (3.2)$$

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011



Gambar 3.4.7. Tahapan kerja uji imunofluoresensi

Sel kemudian diinfeksi dengan virus dengue, jika 70--80% sel telah memenuhi gelas penutup. Medium dalam *well* kemudian dibuang menggunakan pompa vakum. Sebanyak 1 ml Virus (0,01 moi dalam 1x RPMI-2% FBS-1% penisilin/streptomisin) dimasukkan ke dalam *well* kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 1 jam. Medium kemudian dibuang dan diganti dengan 3 ml 1x

RPMI-2%FBS-1% penisilin/streptomisin) kemudian diinkubasi selama 3 hari. Perhitungan moi virus dengue yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 2.

Medium pada *well* kemudian dibuang dan gelas penutup dicuci dengan 1x PBS pH 7,4. Sel kemudian difiksasi dengan 1 ml 3,7% formaldehid (dalam 1x PBS pH 7,4) dan diinkubasi 10 menit pada suhu ruang. Larutan fiksasi dibuang kemudian 1 ml larutan permeabilisasi (2% triton dalam 1x PBS pH 7,4) ditambahkan ke masing-masing *well* dan diinkubasi selama 10 menit. Seluruh larutan dibuang dan setiap *well* dicuci dengan 2 ml *blocking buffer* (1x PBS pH 7,4-0,5% Tween 20-1% FBS) selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya dilakukan *blocking* dengan menambahkan 2 ml *blocking buffer* pada setiap *well* kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (28^{o} C).

Setelah dilakukan *blocking*, antibodi primer ditambahkan dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan pencucian selama 5 menit dalam 3 kali pengulangan. Antibodi sekunder selanjutnya ditambahkan sebanyak 300 µl dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan tanpa cahaya. Selanjutnya dilakukan pencucian kembali sebanyak 3 kali kemudian ditambahkan 300 nm DAPI *counterstaining reagen* sebanyak 300 µl dan diinkubasi selama 5 menit. Gelas penutup kemudian dicuci sebanyak 3 kali. Gelas penutup kemudian ditempel ke gelas objek menggunakan Prolong antifade *mounting medium*.

3.4.8 Optimasi uji imunofluoresensi

Optimasi yang dilakukan meliputi pemilihan sel untuk visualisasi, titrasi konsentrasi optimum untuk antibodi, uji sensitivitas dan spesifisitas, menguji aktivitas virus selama 7 hari, dan melakukan *multipe infection*. Antibodi yang digunakan berdasarkan atas penelitian Henchal *dkk*. dan Erik *dkk* (Henchal *dkk*. 1982: 831--832; Henchal *dkk*. 1983: 165).

3.4.8.1 Pemilihan sel

Tahap awal optimasi yaitu pemilihan sel terbaik untuk memvisualisasikan sel yang terinfeksi. *Well* yang telah berisi gelas penutup yang telah dibersihkan,

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

kemudian dimasukkan sel yang berbeda sebanyak $2x10^5$ *cell/well*. Sel yang digunakan yaitu Vero 76, BHK21, dan C6/36.

Pemilihan sel dilakukan dengan menggunakan uji imunofluoresensi tidak langsung. Sel yang telah ditumbuhkan, diinfeksi dengan virus dengue D3-H87 dan diinkubasi selama 3 hari. Virus dideteksi menggunakan antibodi monoklonal 4G2 sebagai antibodi primer. Ikatan antigen dengan antibodi dideteksi dengan antibodi sekunder yang dilabel FITC. Setelah dilakukan pelabelan, kemudian visualisasi dilakukan di bawah mikroskop ultra violet.

3.4.8.2 Optimasi konsentrasi antibodi

Optimasi konsentrasi antibodi dilakukan dengan menggunakan pengenceran bertingkat. Antibodi yang diencerkan yaitu antibodi sekunder yang dilabel oleh FITC untuk uji imunofluoresensi tidak langsung dan antibodi monoklonal yang telah dilabel Alexa fluor untuk uji imunofluoresensi langsung. Kedua antibodi diencerkan menggunakan *blocking buffer*.

Sel yang telah ditumbuhkan diinfeksi menggunakan virus dengan titer yang sama. Sel yang telah diinfeksi, diinkubasi selama 3 hari. Sel kemudian difiksasi dan diberikan larutan permeabilitas.

Virus akan dideteksi menggunakan uji imunofluoresensi langsung dan tidak langsung. Uji imunofuoresensi langsung menggunakan antibodi 4G2-alexa fluor. Konsentrasi antibodi yang digunakan yaitu 35 µg/ml, 14 µg/ml, 7 µg/ml, dan 0,7 µg/ml.

Uji imunofuoresensi tidak langsung menggunakan antibodi monoklonal 4G2 dan antibodi sekunder yang dilabel oleh FITC. Antibodi yang akan dilakukan titrasi yaitu antibodi sekunder. Konsentrasi antibodi yang digunakan yaitu 10 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, dan 0,5 µg/ml.

3.4.8.3 Uji sensitivitas dan uji spesifisitas

Uji sensitivitas dilakukan dengan mengencerkan virus yang digunakan untuk menginfeksi sel. Virus yang telah diketahui titernya, diencerkan mulai dari

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

10^3 PFU/ml, 10^2 PFU/ml, 10^1 PFU/ml, 10^0 PFU/ml, 10^{-1} PFU/ml, 10^{-2} PFU/ml, dan 10^{-3} PFU/ml. Uji sensitivitas dilakukan menggunakan uji imunofluresensi langsung dengan antibodi 4G2-Alexa fluor dengan konsentrasi yang sama. Sensitivitas untuk uji imunofluoresensi tidak langsung menggunakan antibodi monoklonal 4G2 dan antibodi sekunder yang dilabel FITC.

Uji spesifisitas dilakukan dengan mereaksikan masing-masing antibodi sesuai dengan serotipenya. Sel akan diinfeksi dengan keempat serotipe virus dengue. Antibodi yang digunakan yaitu antibodi monoklonal dan antibodi sekunder yang dilabel FITC untuk uji imunofluoresensi tidak langsung. Antibodi yang dilabel dengan Alexa fluor digunakan untuk imunofluoresensi langsung

3.4.8.4 Imunofluoresensi untuk *multiple infection*

Sel yang telah ditumbuhkan di atas gelas penutup, diinfeksi dengan 2 serotipe virus yang berbeda dengan moi yang sama. virus yang digunakan yaitu D1-Hawaii dan D2-NGC, D1-Hawaii dan D4-H241, D2-NGC dan D3-H87, D2-NGC dan D4-H241, dan D3-H87 dan D4-H241. Antibodi yang digunakan yaitu antibodi monoklonal, antibodi sekunder yang dilabel FITC, dan antibodi monoklonal yang dilabel Alexa fluor. Ketiga jenis antibodi tersebut digunakan dalam untuk mendeteksi virus yang berbeda.

Setiap gelas penutup difiksasi dan diberikan larutan permeabilitas dengan waktu inkubasi masing-masing 10 menit. Setelah pencucian, dilakukan *blocking*, dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.

Setelah 30 menit, seluruh larutan dibuang dan masing-masing *well* ditambahkan 300 µl antibodi primer (1:2.000) yaitu antibodi monoklonal yang spesifik terhadap masing-masing serotipe virus, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Seluruh larutan kemudian dibuang, dan *well* dicuci sebanyak 3 kali dengan 2 ml *blocking buffer* selama 5 menit. Setelah pencucian, antibodi primer yang dilabel Alexa fluor yang telah dilabel (1:100) ditambahkan ke masing-masing *well* sebanyak 300 µl, dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan keadaan gelap. Selama inkubasi, *plate* ditutup dengan menggunakan aluminium foil. Setelah 30 menit, masing-masing *well* dicuci

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

dengan 2 ml *blocking buffer* selama 5 menit dengan 3 kali pengulangan. FITC kemudian ditambahkan sebanyak 300 µl dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan kondisi gelap kemudian dilakukan pencucian.

Setelah 30 menit, masing-masing *well* dicuci dengan 2 ml *blocking buffer* selama 5 menit dengan 3 kali pengulangan. Setelah pencucian, 300 µl 300 nm DAPI *counterstaining reagen*, ditambahkan ke masing-masing *well* dan diinkubasi selama 5 menit. Setelah tahap tersebut, dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan 2 ml *blocking buffer* selama 5 menit. Setelah pencucian, gelas penutup kemudian ditempelkan ke gelas objek dengan menggunakan Prolong antifade *mounting medium*. Setelah seluruh gelas penutup ditempel pada gelas objek, kemudian dilihat dibawah mikroskop fluoresens.

3.4.8.5 Uji aktivitas virus

Uji aktivitas virus dilakukan dengan menginfeksi sel dengan virus dan diinkubasi selama 7 hari. Sel yang telah ditumbuhkan di atas gelas penutup, diinfeksi dengan virus D3-H87 pada titer yang sama. setiap harinya sel diproses dan supernatan inkubasi dikumpulkan untuk dikonfirmasi dengan RT-PCR. Uji aktivitas virus dilakukan dengan menggunakan uji imunofluoresensi langsung menggunakan antibodi 4G2-Alexa fluor.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

BAB 4
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Produksi dan Purifikasi Antibodi Monoklonal untuk Optimasi Uji Imunofluoresensi

Optimasi uji imunofluoresensi dilakukan dalam beberapa tahapan. Sebelum dilakukan optimasi, dilakukan beberapa persiapan. Persiapan diawali dengan produksi antibodi monoklonal. Persiapan berikutnya yaitu penumbuhan sel dengan mengultur sel C6/36, BHK21, dan Vero76. Persiapan terakhir yaitu melakukan propagasi virus dengue pada sel C6/36.

Produksi antibodi monoklonal dilakukan dengan mengultur sel hibridoma. Antibodi hasil produksi digunakan untuk uji imunofluoresensi jika telah dipurifikasi. Purifikasi dilakukan untuk memurnikan molekul IgG. Antibodi yang murni didapat dengan cara melakukan purifikasi menggunakan teknik kromatografi afinitas menggunakan kolom dan protein G yang tertanam dalam *sepharose*. Hasil akhir dari purifikasi yaitu antibodi yang terlarut dalam *buffer* PBS pH 7,4. Volume antibodi yang diperoleh kurang lebih 100 µl. Antibodi tersebut kemudian disimpan pada suhu suhu -80^{o} C untuk mencegah terjadinya kerusakan.

4.1.1 Pengukuran konsentrasi antibodi monoklonal dengan metode Bradford

Konsentrasi setiap antibodi hasil kultur sel hibridoma diukur menggunakan metode Bradford. Berdasarkan hasil pengukuran antibodi (Tabel 4.1.1(1)), diperoleh konsentrasi untuk setiap antibodi. Antibodi 4G2 hasil produksi kultur sel memiliki konsentrasi 6,9 mg/ml, 15F3 7,6 mg/ml, 3H5 8,3 mg/ml, 5D4 8,8 mg/ml, dan 1H10 11,6 mg/ml.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

Tabel 4.1.1(1) Konsentrasi antibodi monoklonal dengan pengukuran menggunakan metode Bradford

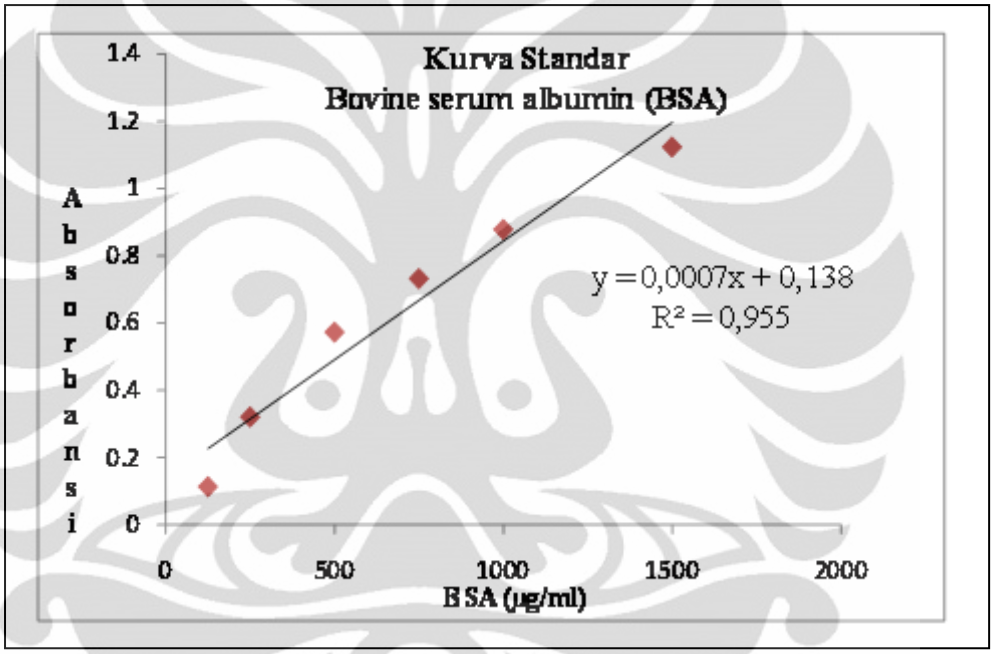
Antibodi monoklonal	Absorbansi (nm)	Konsentrasi antibodi (mg/ml)	Konsentrasi antibodi (µg/ml)
4G2	0,663	6,9	6.900
15F3	0,674	7,6	7.600
3H5	0,721	8,3	8.300
5D4	0,761	8,8	8.800
1H10	0,956	11,6	11.600

Konsentrasi antibodi dihitung dengan cara membandingkan nilai absorbansi sampel dengan kurva standar. Kurva standar dibentuk berdasarkan protein standar dengan berbagai konsentrasi. Protein standar yang digunakan yaitu *Bovine Serum Albumin* (BSA). Absorbansi protein standar BSA dapat dilihat pada Tabel 4.1.1(2).

Tabel 4.1.1(2) Absorbansi protein standar *bovine serum albumin*

Konsentrasi *Bovine Serum Albumin* (BSA) (µg/ml)	Absorbansi (nm)
0	0
125	0,114
250	0,321
500	0,573
750	0,732
1.000	0,878
1.500	1,123

Nilai absorbansi BSA pada Tabel 4.1.1(2) kemudian dibuat menjadi kurva standar dengan absorbansi sebagai nilai pada sumbu y (ordinat) dan konsentrasi sebagai nilai pada sumbu x (axis). Berdasarkan kurva standar pada Gambar 4.1.1, maka diperoleh persamaan garis y = 0,0007x + 0,138 dengan R^2 = 0,955. Nilai konsentrasi sampel didapat dengan cara memasukan nilai absorbansi sampel sebagai nilai y. Dari hasil perhitungan tersebut akan diperoleh nilai x yang merupakan konsentrasi protein dalam satuan µg/ml.



Gambar 4.1.1. Kurva standar *bovine serum albumin* (BSA)

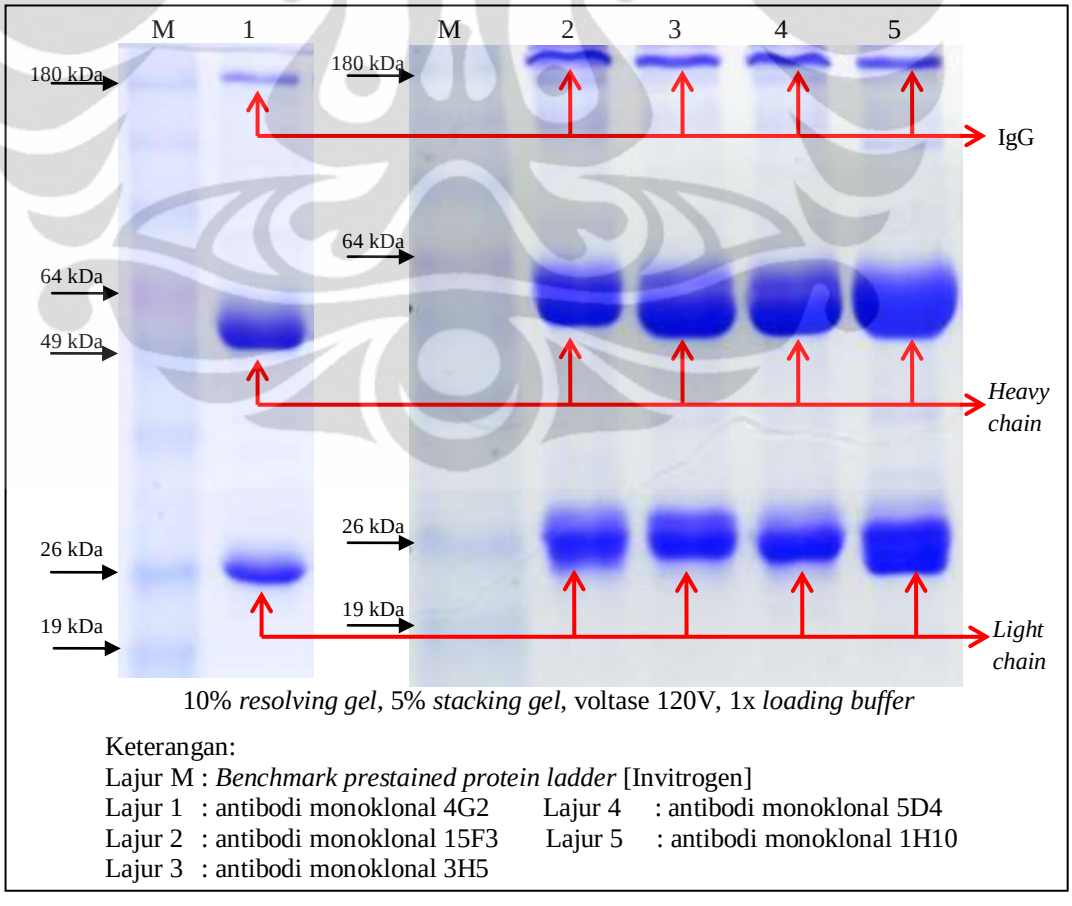
Sekresi antibodi oleh sel hibridoma dapat dipengaruhi oleh medium serta serum yang digunakan selama kultur sel. Menurut McCullough & Spear (1990: 152--153) salah satu medium yang baik digunakan untuk mengultur sel hibridoma adalah RPMI 1640. Oleh sebab itu, produksi antibodi pada penelitian menggunakan medium RPMI 1640.

Medium RPMI 1640 mengandung L-glutamin lebih banyak jika dibandingkan dengan medium lainnya, misalnya MEM. L-glutamin merupakan asam amino esensial yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel dan merupakan energi alternatif yang dibutuhkan sel untuk membelah secara terus-menerus. Oleh

sebab itu, sel hibridoma dapat bertahan hidup lebih lama. Selain medium, sekresi antibodi juga dipengaruhi penambahan serum. Serum digunakan sebagai suplemen yang dapat membantu sekresi antibodi oleh sel hibrdoma (McCullough & Spear 1990: 154--158; Mather & Roberts 1998: 163).

4.1.2 Separasi antibodi monoklonal dengan SDS-PAGE

Antibodi yang telah dipurifikasi dilakukan separasi untuk memastikan bersih dari pengotor. Berdasarkan hasil SDS-PAGE antibodi monoklonal yang telah dipurifikasi, terbentuk 3 buah pita. Pita teratas merupakan fragmen IgG yang tidak terdenaturasi. Pita kedua merupakan *heavy chain* dan pita ketiga merupakan *light chain*. Hasil purifikasi antibodi monoklonal dengan SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 4.1.2 (Lajur 1--5).



10% *resolving gel*, 5% *stacking gel*, voltase 120V, 1x *loading buffer*

Keterangan:
Lajur M : *Benchmark prestained protein ladder* [Invitrogen]
Lajur 1 : antibodi monoklonal 4G2
Lajur 2 : antibodi monoklonal 15F3
Lajur 3 : antibodi monoklonal 3H5
Lajur 4 : antibodi monoklonal 5D4
Lajur 5 : antibodi monoklonal 1H10

Gambar 4.1.2. Hasil SDS-PAGE Antibodi Monoklonal yang telah dipurifikasi

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

Berdasarkan Imgenex India (2000: 7) hasil separasi antibodi yang bebas pengotor diindikasikan dengan terbentuknya pita *heavy chain* dan *light chain*. Berdasarkan pernyatan tersebut antibodi monokonal hasil kultur sel hibridoma berhasil dipurifikasi dan bersih dari pengotor. Pita yang terbentuk dari separasi disebabkan adanya pemutusan ikatan disulfida pada antibodi. Ikatan disulfida antar polipeptida diputus oleh 2-merkaptoetanol yang terdapat di dalam *loading buffer* yang digunakan. Imgenex India (2007: 7) menyatakan bahwa pemutusan ikatan disulfida antibodi oleh 2-merkaptoetanol, akan mennyebabkan antibodi terpisah sesuai dengan berat molekulnya. Hasil pemutusan ikatan disulfida oleh 2-merkaptoetanol menghasilkan *heavy chain* (~50 kDa) dan *light chain* (~25 kDa).

4.1.3 Uji spesifisitas antibodi monoklonal terhadap virus dengue dengan metode Western *blotting*

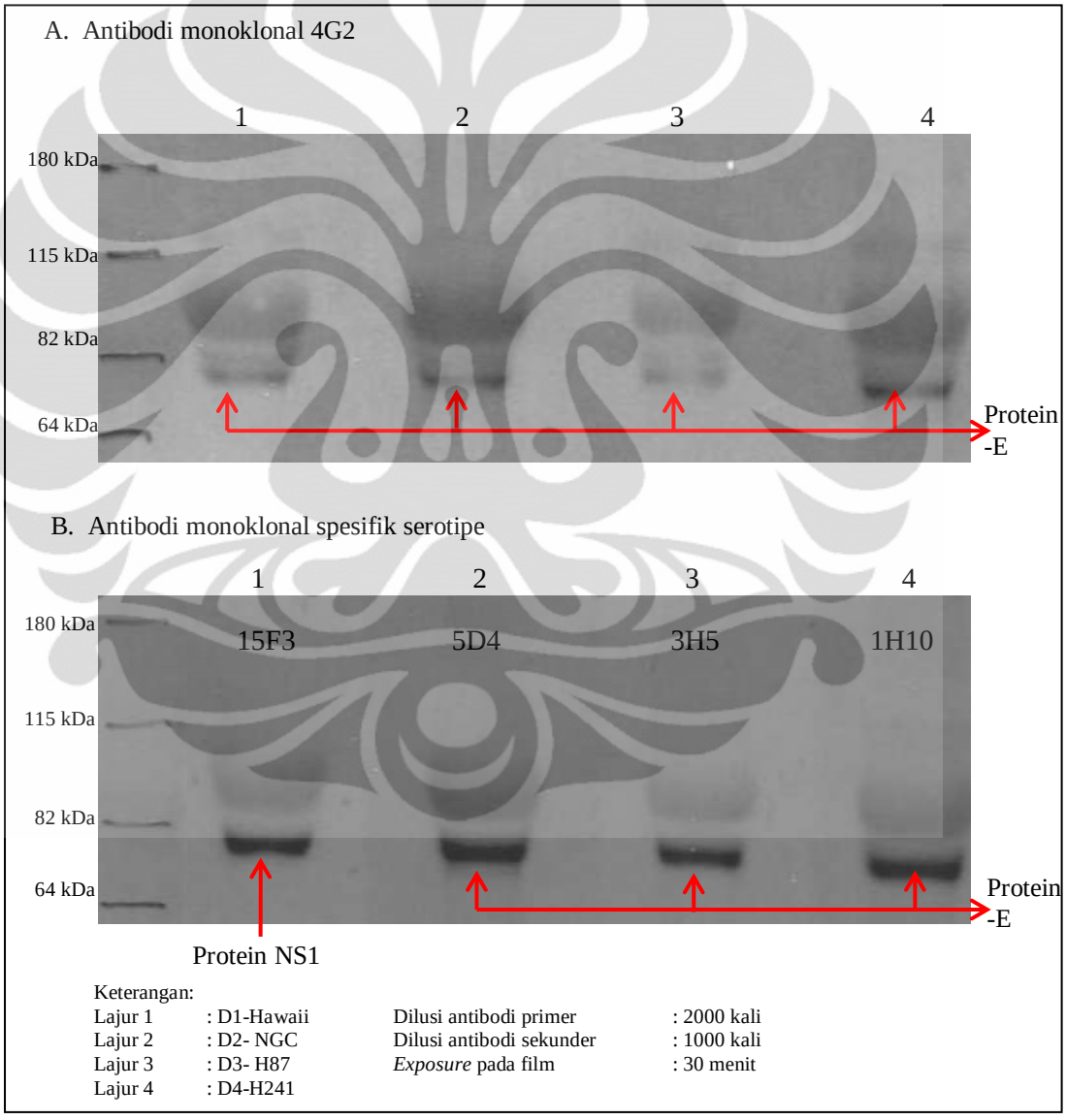
Spesifikasi antibodi yang telah dipurifikasi dapat diketahui dengan menggunakan metode Western *blotting*. Western *blotting* diawali dengan melakukan separasi protein virus dengue menggunakan metode SDS-PAGE. Protein virus dengue kemudian dideteksi dengan antibodi yang telah dipurifikasi.

Berdasarkan hasil yang didapat terbentuk pita pada masing-masing lajur untuk setiap serotipe virus. Keberadaan pita tersebut menandai bahwa antibodi yang diproduksi mampu mendeteksi protein virus dengue sesuai dengan serotipenya masing-masing. Hasil Western *blotting* supernatan virus dengue menggunakan antibodi monoklonal spesifik dapat dilihat pada Gambar 4.1.3 .

Antibodi hasil produksi antibodi memiliki perbedaan dalam mengenali protein virus dengue. Hasil Western *blotting* untuk antibodi 4G2, menunjukkan pita di keempat serotipe virus dengue. Sangiambut *dkk*. (2008: 1255) menyatakan bahwa antibodi 4G2 mampu mendeteksi protein E dari keempat serotipe virus dengue. Pita juga terbentuk pada antibodi yang spesifik terhadap serotipe virus dengue. Berdasarkan hasil pada Gambar 4.1.3 poin B, terlihat pita pada setiap lajur antibodi yang sesuai dengan serotipe virus dengue. Menurut Kao *dkk*. (2001: 3672--3673), antibodi 15F3 mampu mendeteksi protein NS1 dari virus dengue

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

serotipe 1. Antibodi 3H5 merupakan antibodi yang spesifik mendeteksi protein E dari virus dengue serotipe 2 (Kuwahara & Konishi 2010: 1561), sedangkan 5D4 spesifik mendeteksi protein E dari dengue 3 (Holman *dkk.* 2007: 183). Antibodi monoklonal 1H10 dapat mendeteksi D4-H241. Antibodi tersebut mendeteksi protein E dari virus dengue serotipe 4 (Anti E) (Salas-Benito & Angel 1997: 7248).



Gambar 4.1.3. Hasil Western *blotting* supernatan virus dengue menggunakan antibodi monoklonal hasil kultur sel hibridoma

Antibodi 4G2, 3H5, 5D4, dan 1H10 mampu mendeteksi protein E virus dengue. Protein E virus dengue berupa glikoprotein dan merupakan komponen protein utama pada permukaan virus. Protein E memiliki berat molekul sebesar 55--60 kDa. Dari kelima antibodi yang diproduksi, hanya antibodi 15F3 yang mampu mendeteksi protein NS1 virus dengue. Protein NS1 berupa glikoprotein dengan berat molekul 42--50 kDa (Chang 1997: 185--188).

Penelitian menggunakan konsentrasi antibodi yang cukup tinggi. Hal tersebut didasari atas ketebalan pita yang dihasilkan. Percobaan yang sebelumnya dilakukan oleh penulis menghasilkan pita dengan sinyal yang sangat tipis dengan menggunakan konsentrasi yang lebih rendah. Akan tetapi peningkatan konsentrasi yang dilakukan menyebabkan pita yang diharapkan terlihat jelas namun muncul pita yang tidak spesifik.

Terbentuknya pita yang tidak spesifik dapat dipengaruhi oleh konsentrasi antibodi primer atau antibodi sekunder yang digunakan. Abcam (2011: 1) menyatakan bahwa antibodi dengan konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan munculnya pita yang tidak spesifik. Selain pengaruh konsentrasi antibodi, pita yang tidak spesifik dapat pula disebabkan oleh antibodi primer yang tidak spesifik berikatan dengan antigen. Akan tetapi, intensitas sinyal pita tidak spesifik yang terbentuk dapat dikurangi. R&B System (2011: 1) menyatakan bahwa pita yang tidak spesifik dapat diminimalisir dengan menambah banyaknya pencucian.

4.2 Kultur Sel untuk Uji Imunofuoresensi

Penumbuhan galur sel merupakan bagian dari tahap persiapan dalam optimasi uji imunofluoresensi. Penelitian yang dilakukan menggunakan galur sel serangga dan mamalia. Galur sel serangga C6/36 (*Aedes albopictus*, larvae) digunakan untuk propagasi virus. Galur sel mamalia yang digunakan yaitu BHK21 (*Baby Hamster Kidney*, *Mesocricetus auratus*) dan Vero76 (*Cercopithecus aethiops*).

Hasil kultur sel pada T25 *culture flask* dapat menghasilkan $3x10^6$ sel sedangkan untuk T75 *culture flask* dapat menghasilkan 10^7 sel. Jumlah sel

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

tersebut diperoleh jika sel memenuhi dasar *flask* dalam 1 lapisan sel (monolayer). Setiap galur sel yang akan digunakan ditumbuhkan pada kondisi yang sesuai.

Kultur sel dipengaruhi beberapa faktor. Faktor yang memengaruhi yaitu medium serta suplemen yang digunakan. Penelitian yang dilakukan menggunakan medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 untuk sel C6/36 dan *minimum essential media* (MEM) untuk sel mamalia. Setiap medium ditambahkan dengan 10% *fetal bovine serum* (FBS) yang bertujuan untuk menyuplai *growth factor* serta nutrien yang dibutuhkan untuk proliferasi sel dan perlekatan sel (Freshney 2005: 115). Medium penelitian juga ditambahkan dengan antibiotik penisilin/streptomisin merupakan antibiotik yang digunakan untuk mencegah kontaminasi bakteri gram positif (penisilin) dan gram negatitif 9streptomisin) (Freshney 2005: 123).

Sel yang digunakan pada penelitian diinkubasi pada suhu yang berbeda. Freshney (2005: 118) menyatakan bahwa suhu optimal untuk kultur sel tergantung dari suhu tubuh dari sel tersebut berasal. Sel Vero76 dan BHK21 disimpan pada suhu 37^{o}C dengan 5% CO_2, karena merupakan sel mamalia berdarah panas. Sel C6/36 merupakan sel serangga berdarah dingin. Lynn (2002: 6) mengatakan bahwa sel serangga lebih memanfaatkan fosfat *buffer* dibandingkan dengan karbonat. Oleh sebab itu, selama penelitian sel C6/36 diinkubasi pada suhu 28^{o}C tanpa suplai CO_2.

Sel yang telah dikultur selama penelitian dibuat stok beku dengan menyimpan sel pada suhu -80^{o} C atau di dalam tabung nitrogen cair dan menggunakan krioprotektan *dimethylsulfoxide* (DMSO). Ryan (2004: 1--4) menyatakan bahwa DMSO merupakan krioprotektan terbaik karena tidak mengakibatkan kerusakan pada saat sel dicairkan kembali. Pembuatan stok beku bermanfaat untuk menyediakan sel cadangan jika terjadi hal-hal yang tidak diinginkan seperti kehabisan stok sel atau kontaminasi.

4.3 Propagasi Virus Dengue pada Sel C6/36

Virus dengue yang akan digunakan untuk uji imunofluoresensi dilakukan propagasi untuk memperbanyak stok virus. Propagasi merupakan salah satu tahap

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

persiapan dalam optimasi uji imunofluoresensi. Propagasi virus dengue dilakukan pada sel serangga C6/36. Hasil propagasi virus akan digunakan untuk menginfeksi sel pada uji imunofluoresensi.

Virus yang digunakan dalam penelitian yaitu prototipe virus dengue yang mewakili setiap serotipe. Prototipe virus yang digunakan yaitu D1-Hawaii, D2-NGC, D3-H87, dan D4-H241. Propagasi akan menghasilkan didapat supernatan kultur sel C6/36 yang mengandung virus dengue. Virus dengue yang terkandung dalam supernatan, merupakan virus yang masih aktif. Virus kemudian disimpan pada suhu -80^{o} C dan dapat digunakan untuk proses selanjutnya

Virus yang terkandung dalam supernatan akan dipanen pada hari ke-7 dan hari ke-9. Waktu inkubasi 7 hari dipilih karena merupakan waktu inkubasi minimum untuk virus bereplikasi (White 1987: 1222). Diharapkan pada kurun waktu tersebut, virus telah mampu menyesuaikan diri dan menghasilkan virus dalam jumlah maksimum. Panen juga dapat dilakukan jika telah terbentuk *cytopathic effect* (CPE), dimana sel mengalami perubahan struktur dan morfologi akibat terinfeksi virus.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, terbentuk CPE hanya pada D2-NGC. Hal tersebut disebabkan karena kemampuan infeksi virus tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan virus lainnya. Menurut Bakonyi *dkk*.(2005: 300), pembentukan CPE dipengaruhi oleh tipe dari sel inang yang digunakan, virus yang diinfeksi, serta waktu inkubasi.

Virus yang digunakan pada penelitian merupakan prototipe atau bentuk awal dari virus dengue. Prototipe digunakan sebagai standar referensi pada deteksi virus dengue. D1-Hawaii merupakan virus dengue pertama yang berhasil diisolasi pada tahun 1944. D2-NGC merupakan virus yang ditemukan di Papua Nugini pada tahun 1944 sedangkan D3-H87 dan D4-H241 ditemukan di Filipina tahun 1956 (Henchal *dkk*. 1982: 831).

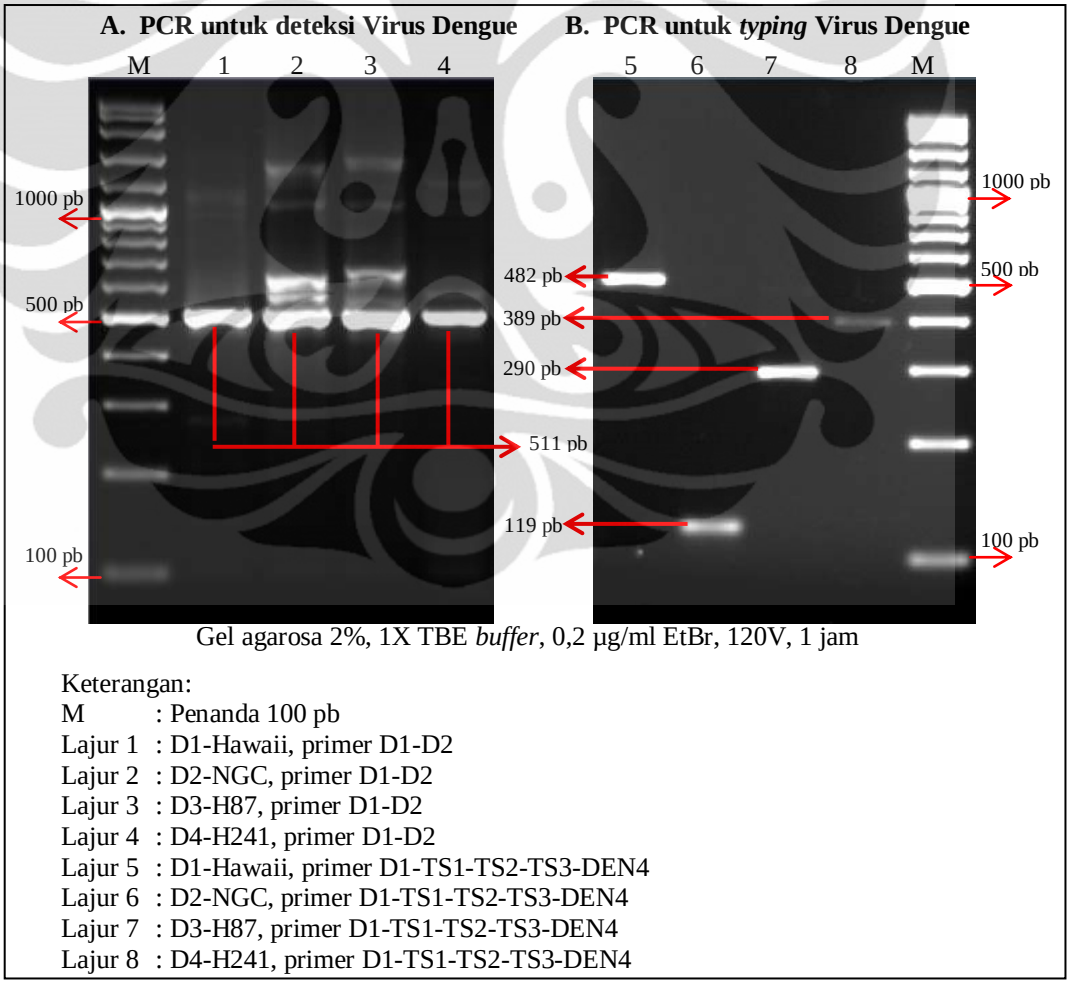
4.3.1 Deteksi dan penentuan serotipe virus dengue dengan RT-PCR

Virus hasil propagasi dikonfirmasi menggunakan RT-PCR dengan enzim SuperScript™ III *reverse transcriptase* [Invitrogen]. Enzim tersebut digunakan

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

untuk membentuk cDNA dari cetakan RNA virus dengue. cDNA akan digunakan sebagai cetakan untuk PCR tahap kedua menggunakan primer D1 dan D2. Hasil PCR tahap kedua, kemudian diamplifikasi menggunakan beberapa primer yang spesifik terhadap keempat serotipe virus dengue. Primer yang digunakan yaitu D1 dan *type-specific primers* TS1, TS2, TS3, dan DEN4.

Berdasarkan hasil ampilifikasi dihasilkan pita dengan ukuran 511 pb hasil PCR deteksi (Gambar 4.3.1. Lajur 1--4), sedangkan amplifikasi untuk *serotyping* virus dengue menghasilkan pita sesuai dengan primer yang digunakan (Gambar 4.3.1. Lajur 5--8). D1-Hawaii menghasilkan pita berukuran 482 pb, D2-NGC menghasilkan pita berukuran 119 pb, D3-H87 menghasilkan pita berukuran 290 pb, dan D4-H241 menghasilkan pita berukuran 382 pb.



Gel agarosa 2%, 1X TBE *buffer*, 0,2 µg/ml EtBr, 120V, 1 jam

Keterangan:
M : Penanda 100 pb
Lajur 1 : D1-Hawaii, primer D1-D2
Lajur 2 : D2-NGC, primer D1-D2
Lajur 3 : D3-H87, primer D1-D2
Lajur 4 : D4-H241, primer D1-D2
Lajur 5 : D1-Hawaii, primer D1-TS1-TS2-TS3-DEN4
Lajur 6 : D2-NGC, primer D1-TS1-TS2-TS3-DEN4
Lajur 7 : D3-H87, primer D1-TS1-TS2-TS3-DEN4
Lajur 8 : D4-H241, primer D1-TS1-TS2-TS3-DEN4

Gambar 4.3.1. Hasil amplifikasi PCR untuk deteksi dan penentuan serotipe virus dengue

Berdasarkan hasil visualisasi pada gel agarosa dapat disimpulkan bahwa virus dengue berhasil diamplifikasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa virus dengue terdapat pada supernatan kultur sel C6/36. Oleh sebab itu dapat disimpulkan bahwa propagasi virus berhasil dilakukan.

Penelitian menggunakan SuperScript™ III *reverse transcriptase* sebagai enzim *reverse transcriptase*. Enzim tersebut dipilih karena memiliki stabilitas termal yang tinggi yaitu mampu bekerja pada suhu 45--60^{o} C. Hal tersebut dapat meningkatkan spesifisitas dan menghasilkan cDNA *full-length* lebih banyak dibandingkan dengan *reverse transcriptase* lainnya (Invitrogen 2003:1).

4.3.2 Pengukuran titer virus dengue hasil propagasi menggunakan *plaque assay*

Titer virus dengue hasil propagasi diketahui menggunakan *plaque assay* dengan melakukan dilusi bertingkat. *Plaque assay* menggunakan sel BHK21. Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh titer virus untuk D1-Hawaii sekitar 8,75x10^{4} PFU/ml, D2-NGC 2,1x10^{6} PFU/ml, D3-H87 5,4x10^{5} PFU/ml, dan D4-H241 5,1x10^{4} PFU/ml.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, virus hasil propagasi memiliki perbedaan konsentrasi. Hal tersebut dapat terjadi karena titer virus pertama yang dipropagasi, memiliki konsentrasi berbeda. Titer virus hasil propagasi dipengaruhi oleh banyaknya stok awal virus yang digunakan untuk propagasi. Henchal & Putnak (1990: 384) mengatakan bahwa titer tertinggi yang dapat dicapai dari hasil propagasi virus dengue sekitar 10^{8}--10^{9} PFU/ml. Hasil dari *plaque assay* dapat dilihat pada Gambar 4.3.2.

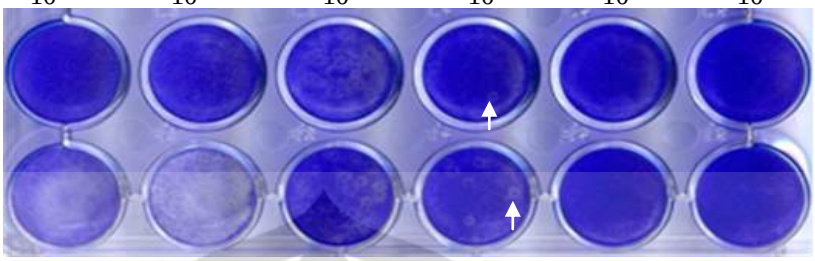
Titer virus (PFU/ml) dihitung berdasarkan *plaque* yang terbentuk pada setiap faktor pengenceran. Jumlah *plaque* yang terbentuk kemudian dimasukan ke dalam rumus untuk mendapatkan titer virus hasil propagasi. Rumus yang digunakan berdasarkan Mahy & Kangro (1996: 38). Rumus perhitungan titer virus yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$\text{Titer virus (PFU/ml)} = \frac{\text{Jumlah } \textit{plaque}}{\text{Faktor dilusi x volume inokulum (0,2 ml)}} \qquad (4.1)$$

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

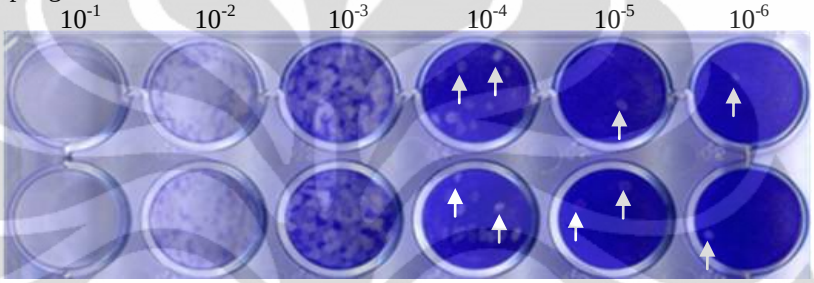
1. D1-Hawaii

Faktor pengenceran: 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}



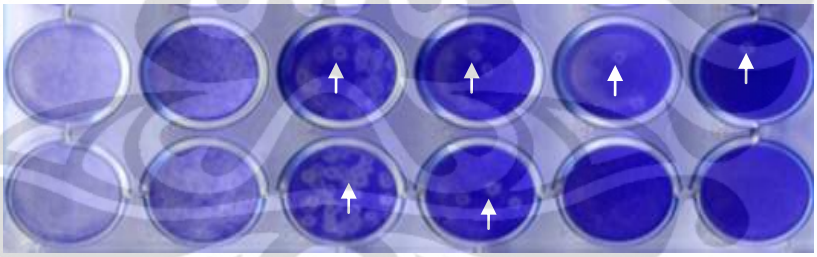
2. D2-NGC

Faktor pengenceran: 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}



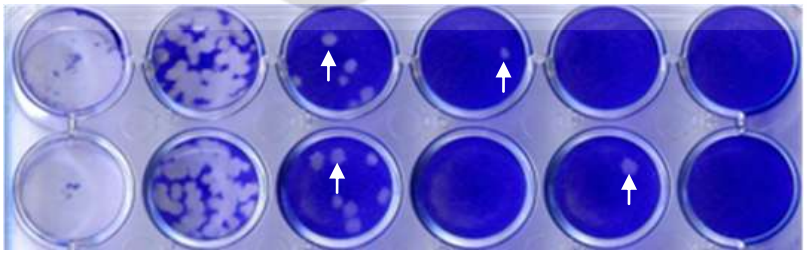
3. D3-H87

Faktor pengenceran: 10^{-1} 10^{-2} 10^{-} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}



4. D4-H241

Faktor pengenceran: 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}



Keterangan:
Sel yang digunakan : BHK21
Waktu dan suhu inkubasi : 6 hari pada suhu 37° C-5% CO_2
Fiksasi dan pewarnaan : 3,7% formaldehid, pewarnaan 1% kristal violet
Plaque yang terbentuk ditunjukkan oleh tanda panah

Gambar 4.3.2. Hasil pengukuran titer virus dengue menggunakan *plaque assay*

Plaque yang terbentuk pada D1-Hawaii dan D3-H87 tidak terlihat jelas. Hal tersebut diakibatkan banyak terdapat sel yang lepas. Lepasnya sel dapat diakibatkan kepadatan sel yang kurang saat sel akan diinfeksi. Menurut Butler (2005: 239), ruang antar sel yang terlalu besar dapat mengakibatkan *plaque* yang terbentuk tidak terlihat jelas. Hal tersebut dapat menyulitkan penghitungan jumlah *plaque* yang terbentuk. Plaque dapat terlihat jelas jika kepadatan sel berkisar antara 80--100%.

4.4 Optimasi Uji Imunofluoresensi

Optimasi dilakukan dengan menggunakan beberapa parameter. Parameter yang digunakan yaitu pemilihan sel terbaik untuk visualisasi, optimasi antibodi, uji sensitivitas dan spesifisitas antibodi, deteksi untuk *multipe infection*, dan uji aktivitas virus selama 7 hari. Hasil uji imunofluoresensi kemudian divisualisasi menggunakan mikroskop fluoresens.

Optimasi dilakukan menggunakan imunofluoresensi langsung dan tidak langsung. Imunofluoresensi langsung, menggunakan antibodi monokonal yang telah dilabel menggunakan Alexa Fluor® 555 *Monoclonal antibody Labeling Kit* (A-20187) yang memberikan pendaran merah saat mendeteksi virus. Imunofluoresensi tidak langsung menggunakan antibodi monoklonal sebagai antibodi primer dan *fluorescein isothiocyanate* (FITC)-*labelled goat anti-mouse IgG* sebagai antibodi sekunder. Sel yang terinfeksi akan menunjukkan pendaran berwarna hijau. Pendaran tersebut menunjukkan virus yang menginfeksi sel. Intensitas pendaran yang tinggi mengindikasikan semakin banyak virus yang menginfeksi sel. Inti sel akan ditunjukkan dengan pendaran biru. Warna biru dihasilkan akibat pewarnaan inti sel menggunakan DAPI.

Penelitian menggunakan 3,7% formaldehid sebagai agen untuk memfiksasi sel. Formaldehid dipilih karena tidak akan merusak struktur morfologi dari sel (Buchwalow & Böcker 2010 :20--21). Zat warna maupun antibodi yang digunakan, dapat memasuki sel dengan cara membuat sel lebih permeabel. 2% Triton digunakan untuk permeabilisasi membran sehingga suatu senyawa asing dapat larut masuk ke dalam membran (Roche 2005: 1).

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

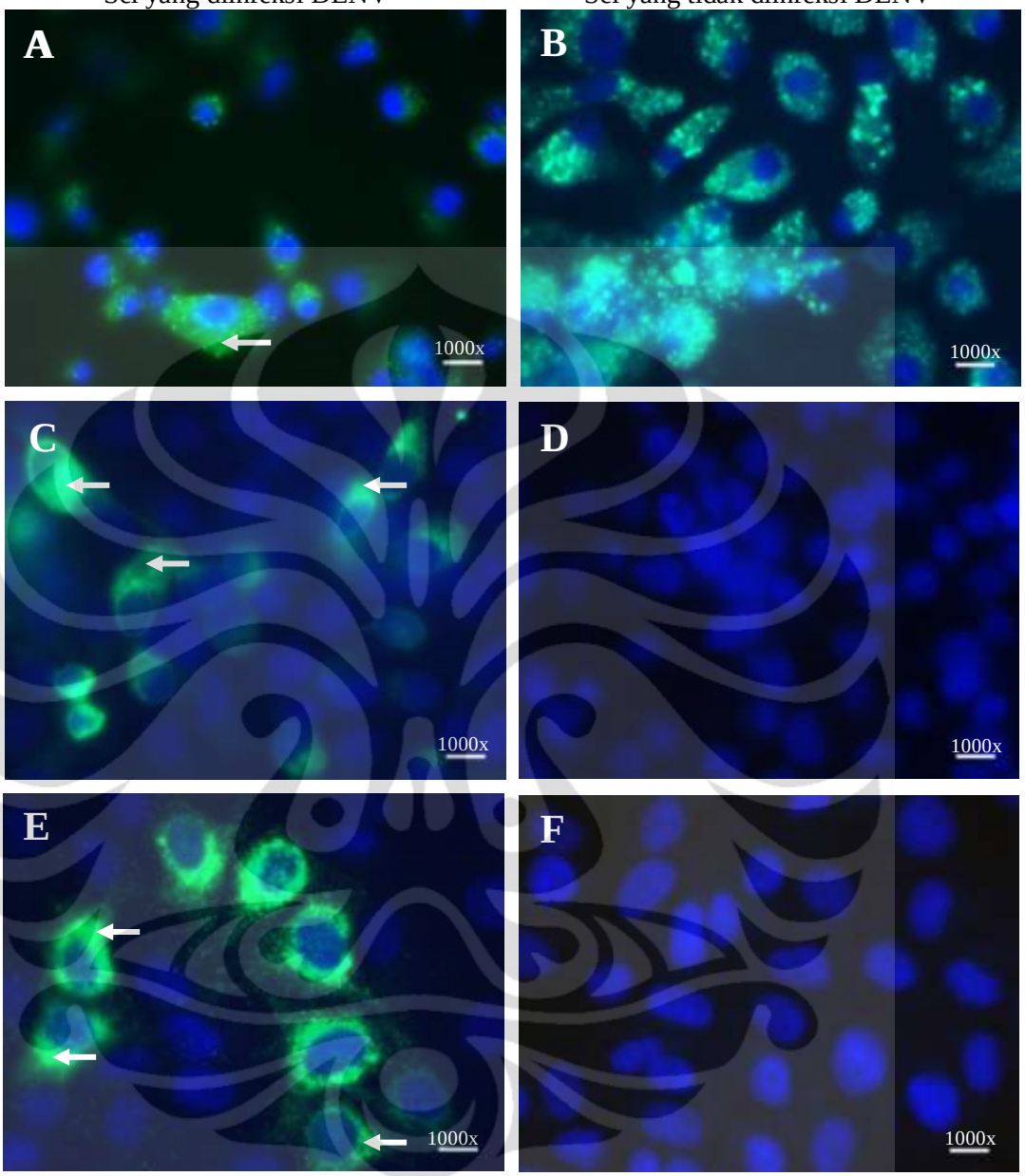
4.4.1 Hasil dan analisis pemilihan sel untuk uji imunofluoresensi

Pemilihan sel merupakan tahap awal dalam optimasi uji imunofluoresensi. Pemilihan sel diawali dengan menumbuhkan sel yang berbeda di atas gelas penutup. Setiap sel diinfeksi menggunakan virus D3-H87. Sebagai kontrol negatif digunakan sel yang tidak diinfeksi. Parameter pemilihan sel yaitu intensitas pendaran yang dihasilkan serta tidak terdapatnya autofluoresens.

Berdasarkan hasil yang diperoleh (Gambar 4.4.1 A--B), sel C6/36 tidak memberikan visualisasi yang baik. Sel tersebut berpendar saat diinfeksi dan tidak diinfeksi virus dengue. Visualisasi pada sel BHK21 dan Vero76 memberikan hasil yang baik (Gambar 4.4.1 C--F). Kedua sel tersebut berpendar saat virus yang menginfeksi sel terdeteksi oleh antibodi. Sel yang tidak diinfeksi tidak menunjukkan pendaran seperti pada sel C6/36. Hal tersebut menunjukkan bahwa sel BHK21 dan Vero76 tidak memiliki autofluoresens. Jika dilihat dari intensitas pendaran yang dihasilkan, sel Vero76 menunjukkan intensitas yang lebih tinggi dibandingkan pada sel BHK21. Oleh sebab itu sel Vero76 dipilih sebagai sel terbaik untuk visualisasi dan akan digunakan pada optimasi tahap selanjutnya.

Pendaran yang dihasilkan oleh sel C6/36 ketika tidak diinfeksi dapat terjadi akibat adanya autofluoresens atau fluoresens alami dari komponen suatu jaringan (Buchwalow & Böcker 2010: 41). Kemampuan autofluoresens pada sel dapat mengakibatkan kesulitan dalam melakukan identifikasi jika menggunakan mikroskop fluoresens. Selain itu, fluoresens alami yang dihasilkan dapat mengakibatkan salah pembacaan yang *false positive* atau positif palsu, yaitu hasil yang seharusnya negatif dibaca positif.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011



Keterangan: Imunofluoresensi tidak langsung pada beberapa galur sel, yaitu sel C6/36 (A, B), BHK21 (C,D), Vero76 (E,F). Gambar A, C, dan E merupakan sel yang diinfeksi virus dengue D3-H87 0,01 moi, sedangkan Gambar B, D, F sel yang tidak diinfeksi virus dengue. Protein virus dideteksi menggunakan antibodi monoklonal 4G2 dan antibodi sekunder *fluorescein isothiocyanate goat anti-mouse IgG* dengan pewarnaan inti sel menggunakan DAPI. Sel Vero76 merupakan sel terbaik dalam visualisasi imunofluoresensi. Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran hijau (tanda panah) dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru.
Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.4.1. Hasil optimasi infeksi virus dengue pada berbagai sel

Intensitas sinyal yang lebih tinggi pada sel Vero76 kemungkinan terjadi karena sel Vero76 tidak memproduksi interferon sebagai respon terhadap infeksi

virus. Akibatnya virus akan dengan mudah menginfeksi sel. Semakin banyak virus yang menginfeksi sel, akan sangat berpengaruh terhadap intensitas pendaran yang dihasilkan. Jika jumlah virus yang menginfeksi banyak, maka antibodi yang berikatan dengan virus juga semakin banyak. Hal tersebut menyebabkan intensitas pendaran semakin meningkat. Oleh sebab itu, sel Vero76 digunakan untuk tahap optimasi selanjutnya.

Interferon merupakan protein alami yang disintesis oleh sel-sel tubuh ketika diserang oleh virus, bakteri, dan parasit. Ketidakmampuan sel Vero untuk mensintesis interferon dapat diakibatkan tidak adanya gen struktural interferon yang fungsional, adanya molekul represor, atau kesalahan induser untuk berinteraksi dengan sel (Emeny & Morgan 1979: 247--248).

4.4.2 Titrasi antibodi sekunder untuk uji imunofluoresensi

Tahap optimasi selanjutnya yaitu optimasi konsentrasi antibodi. Optimasi untuk konsentrasi optimum diketahui dengan cara membuat serial dilusi. Dilusi terbaik ditandai dengan tidak adanya pendaran fluoresens nonspesifik (*non spesific background*) saat pembacaan di bawah mikroskop. pemilihan konsentrasi optimum juga berdasarkan atas intensitas pendaran yang tidak terlalu lemah dan tidak terlalu kuat. Penelitian yang dilakukan, hanya mendilusi antibodi sekunder untuk imunofluoresensi tidak langsung dan antibodi yang telah dilabel untuk imunofluoresensi langsung. Hal tersebut dikarenakan, antibodi primer yang digunakan telah dioptimasi sebelumnya.

4.4.2.1 Analisis titrasi antibodi sekunder untuk imunofluoresensi tidak langsung

Konsentrasi optimum untuk antibodi sekunder *fluorescein isothiocyanate* (FITC)-*labelled goat anti-mouse IgG* didapatkan dengan melakukan titrasi. Konsentrasi stok FITC-*labelled goat anti-mouse IgG* yaitu 2 mg/ml. Titrasi antibodi sekunder dilakukan dengan melakukan pengenceran dalam beberapa tingkatan. Pengenceran yang digunakan yaitu 200 (10 µg/ml), 500 (4 µg/ml), 1.000 (2 µg/ml), 2.000 (1 µg/ml), dan 4.000 (0,5 µg/ml) kali.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

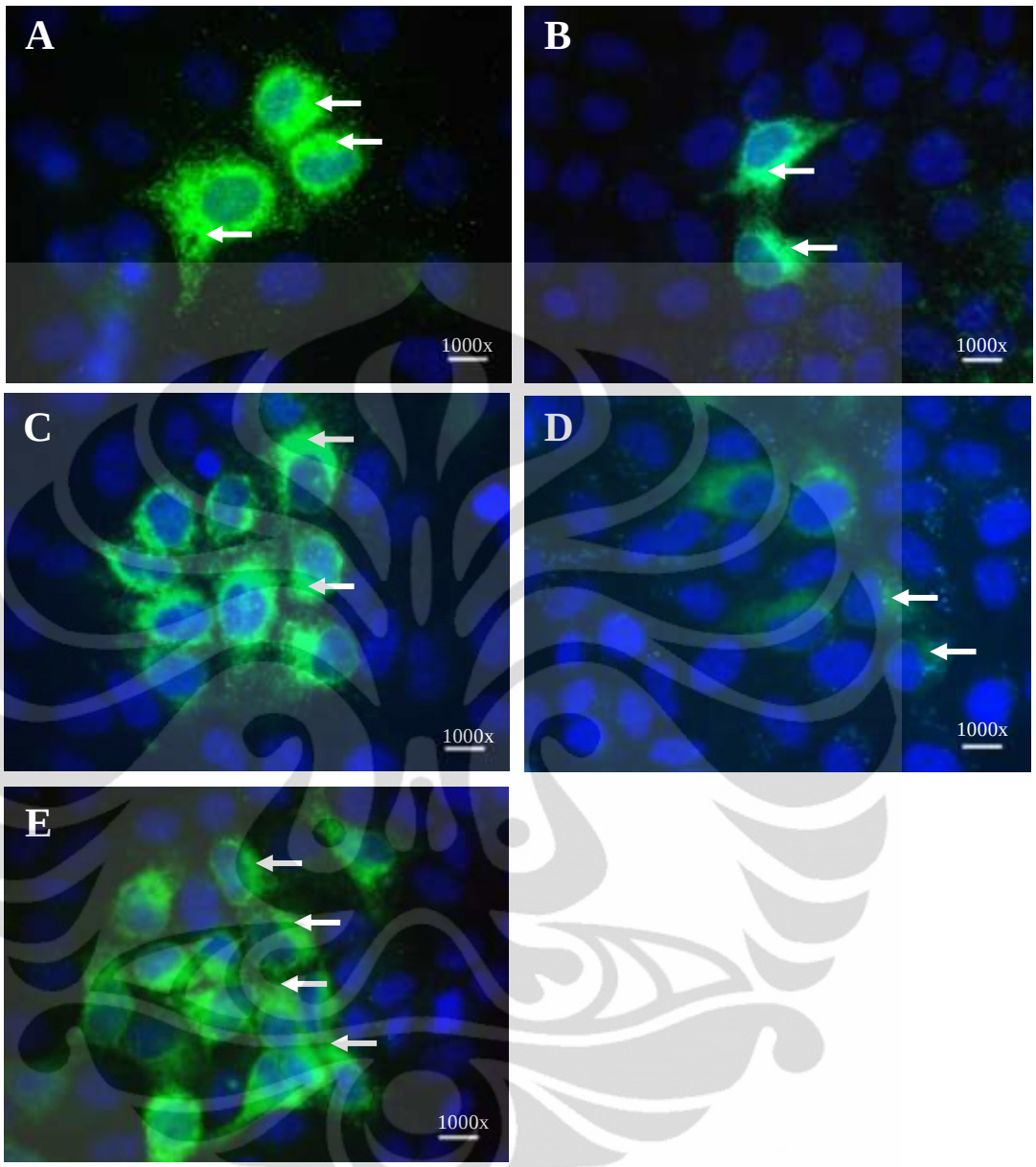
Berdasarkan hasil yang didapat (Gambar 4.4.2.1 A--E), intensitas pendaran yang dihasilkan menurun seiring semakin besarnya pengenceran. Intensitas terbesar ditunjukkan pada Gambar A dimana konsentrasi antibodi sekunder yang digunakan sebesar 10 µg/ml. Akan tetapi, sinyal terendah dihasilkan pada konsentrasi 1 µg/ml (Gambar D) bukan pada 0,5 µg/ml (Gambar E). Hal tersebut dapat dipengaruhi pada proses pengenceran.

Titrasi antibodi sekunder yang dilakukan, tidak memberikan hasil yang signifikan. *Non-spesific background* yang terbentuk pada masing-masing serial dilusi, tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Oleh sebab itu, pemilihan konsentrasi optimum untuk antibodi sekunder dilakukan dengan mengikuti saran penggunaan yang dianjurkan oleh Invitrogen. Invitrogen (2001: 1) menganjurkan untuk menggunakan dengan pengenceran sampai 1:500. Hal tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa konsentrasi antibodi sekunder yang dapat digunakan berkisar antara 5--10 µg/ml (Buchwalow & Böcker 2010: 38).

Penelitian menggunakan antibodi monoklonal hasil produksi kultur sel hibridoma sebagai antibodi primer. Antibodi primer tersebut akan mengikat antigen pada sisi Fab. Antibodi primer (monoklonal) akan mengikat protein virus dengue. Ikatan tersebut akan dideteksi oleh antibodi sekunder *anti-mouse IgG-fluorescein isothiocyanate* (FITC). Antibodi sekunder tersebut akan berikatan pada sisi Fc (*fragment crystallizable*) dari antibodi (Buchwalow & Böcker 2010: 3). Jika diliamati di bawah mikroskop fluoresens, maka ikatan antara antibodi dan virus akan menghasilkan pendaran hijau.

A*nti-mouse IgG* -FITC merupakan antibodi sekunder dalam bentuk IgG yang berasal dari tikus. Pemilihan antibodi sekunder didasari atas pengunaan antibodi primer. Antibodi primer yang digunakan pada penelitian merupakan antibodi kelas IgG. Oleh sebab itu antibodi sekunder yang digunakan juga dalam bentuk IgG. Antibodi sekunder dalam bentuk IgG sesuai untuk digunakan pada prosedur deteksi. Selain itu harganya jauh lebih murah jika dibandingkan dengan antibodi sekunder lainnya. Antibodi tersebut monovalen dan hanya berikatan pada sisi tunggal pengikatan antigen (Buchwalow & Böcker 2010: 36--37).

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011



Keterangan: Titrasi antibodi sekunder yang dilabel FITC (*fluorescein isothiocyanate goat anti-mouse IgG*) untuk uji imunofluoresensi tidak langsung. Sel yang digunakan yaitu Vero76 dan diinfeksi dengan D3-H87 0,01 moi dengan pewarnaan inti sel menggunakan DAPI. Antibodi sekunder dengan konsentrasi 10 µg/ml (A), 4 µg/ml (B), 2 µg/ml (C), 1 µg/ml (D), dan 0,5 µg/ml (E). Antibodi primer yang digunakan yaitu antibodi monoklonal 4G2. Konsentrasi 10 µg/ml (A) merupakan konsentrasi optimum untuk antibodi sekunder *anti-mouse* IgG-FITC. Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran hijau (tanda panah) dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru. Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.4.2.1. Hasil optimasi titrasi antibodi sekunder FITC

4.4.2.2 Analisis titrasi antibodi primer untuk uji imunofluoresensi langsung

Uji imunofluoresensi langsung merupakan uji imunofluoresensi menggunakan antibodi primer yang dilabel dengan molekul fluoresens. Antibodi yang akan dilabel yaitu antibodi monoklonal hasil kultur sel hibridoma. Pelabelan dilakukan dengan menggunakan Alexa Fluor® 555 *Monoclonal antibody Labeling Kit* (A-20187) yang akan menghasilkan pendaran berwarna merah. Prosedur pelabelan, mengikuti petunjuk yang terdapat pada kit.

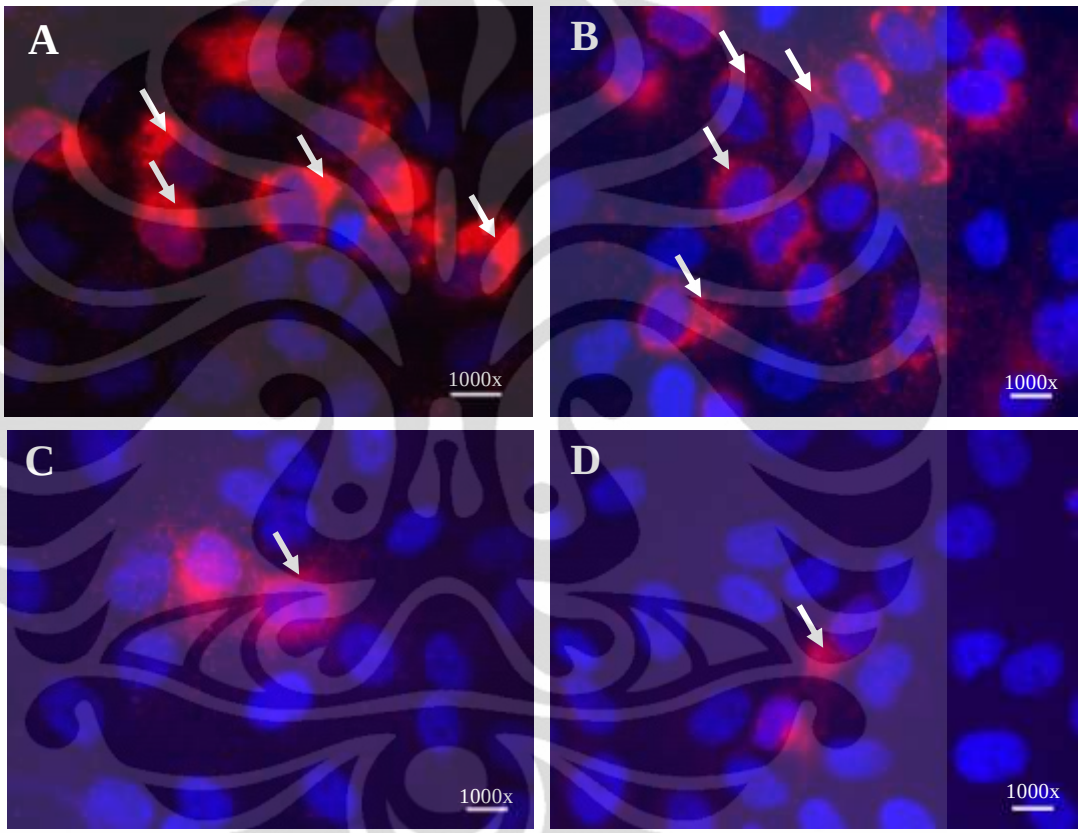
Konsentrasi antibodi optimum diperoleh dengan melakukan pengenceran. Pengenceran yang digunakan yaitu 20 (35 µg/ml), 50 (14 µg/ml), 100 (7 µg/ml), dan 1.000 (0,7 µg/ml) kali. Hasil yang diharapkan yaitu pendaran merah yang memberikan intensitas fluoresens terbaik. Hasil titrasi antibodi monoklonal yang dilabel Alexa Fluor dapat dilihat pada Gambar 4.4.2.2.

Berdasarkan hasil yang didapat (Gambar 4.4.2.2), pengenceran terendah menghasilkan intensitas pendaran yang terlalu tinggi (Gambar A). Hal tersebut dapat terjadi karena rendahnya tingkat pengenceran, sehingga antibodi yang berikatan dengan antigen virus semakin banyak. Intensitas pendaran akan berkurang seiring bertambahnya dilusi yang dilakukan. Pengenceran sampai dengan 1.000 kali (Gambar D), menunjukkan intensitas pendaran yang semakin lemah. Hal tersebut dapat terjadi karena antibodi terlalu encer, sehingga kandungan antibodi semakin sedikit dan menyebabkan berkurangnya antibodi yang berikatan dengan protein virus juga semakin sedikit.

Konsentrasi optimum untuk antibodi primer yaitu pengenceran 100 kali (konsentrasi 7 µg/ml). Konsentrasi tersebut dipilih sebagai konsentrasi optimum untuk antibodi primer-Alexa Fluor. Pemilihan didasari atas intensitas pendaran yang dihasilkan. Intensitas pada konsentrasi tersebut tidak terlalu tinggi ataupun terlalu rendah.

Metode imunofluoresensi langsung hanya menggunakan 1 buah antibodi, yaitu antibodi primer yang dilabel dengan molekul fluoresens. Penelitian menggunakan zat warna Alexa Fluor untuk melabel antibodi primer (antibodi monoklonal). Zat warna tersebut memiliki absobrsi serta emisi maksimum 555 nm dan 565 nm dan menghasilkan pendaran berwarna merah yang kontras dengan inti

sel yang berwarna biru. Alexa Fluor dipilih karena mampu melabel antibodi dengan jumlah 100 µg per reaksi. Selain itu Alexa Fluor mampu mencegah terjadinya pemudaran warna serta menghasilkan visualisasi yang lebih terang jika dibandingkan dengan pelabelan lainnya, contohnya Cy3™ (Moleculer Probes 2001: 1).



Keterangan: Titrasi antibodi primer untuk uji imunofluoresensi langsung. Antibodi primer yang digunakan yaitu antibodi monoklonal 4G2 yang dilabel dengan Alexa Fluor. Sel yang digunakan yaitu Vero76 dan diinfeksi dengan D3-H87 0,01 moi dengan pewarnaan inti sel menggunakan DAPI. Digunakan antibodi dengan konsentrasi 35 µg/ml (A), 14 µg/ml (B), 7 µg/ml (C), dan 0,7 µg/ml (D). Konsentrasi 7 µg/ml merupakan konsentrasi optimum untuk antibodi monoklonal yang dilabel Alexa Fluor . Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran merah (tanda panah) dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru. Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.4.2.2. Hasil titrasi antibodi monoklonal yang dilabel Alexa Fluor

Alexa Fluor® 555 *Monoclonal antibody Labeling Kit* dilengkapi dengan *reactive dye*, sodium bikarbonat, resin untuk purifikasi, *spin column*,dan *collection tube*. *Reactive dye* dari alexa kit, memiliki *succinimidyl ester moiety* yang bereaksi

secara efesien dengan amina primer dari protein, untuk membentuk ikatan antara *reactive dye* dengan protein yang stabil. Sebelum dilakukan pelabelan, antibodi harus disimpan dalam *buffer* yang bebas dari ion amonium atau amina primer agar tidak bereaksi dengan kelompok amina dari *reactive dye* yang terdapat pada kit. Hal tersebut bertujuan agar *reactive dye* hanya berikatan pada antibodi bukan pada *buffer*.

Pelabelan yang dilakukan sesuai dengan prosedur pada kit. Antibodi yang telah dilabel kemudian diukur konsentrasi pada panjang gelombang 280 nm dan 555 nm. Berdasarkan hasil pengukuran, diketahui bahwa antibodi monoklonal yang telah dilabel, memiliki konsentrasi 0,7 mg/ml (Molecular Probe 2001: 1--3). Antibodi yang telah dilabel, dapat bertahan untuk beberapa bulan jika disimpan pada suhu 4^{o} C . Namun, apabila disimpan pada suhu -20^{o} C, maka antibodi dapat bertahan untuk jangka waktu yang lebih lama.

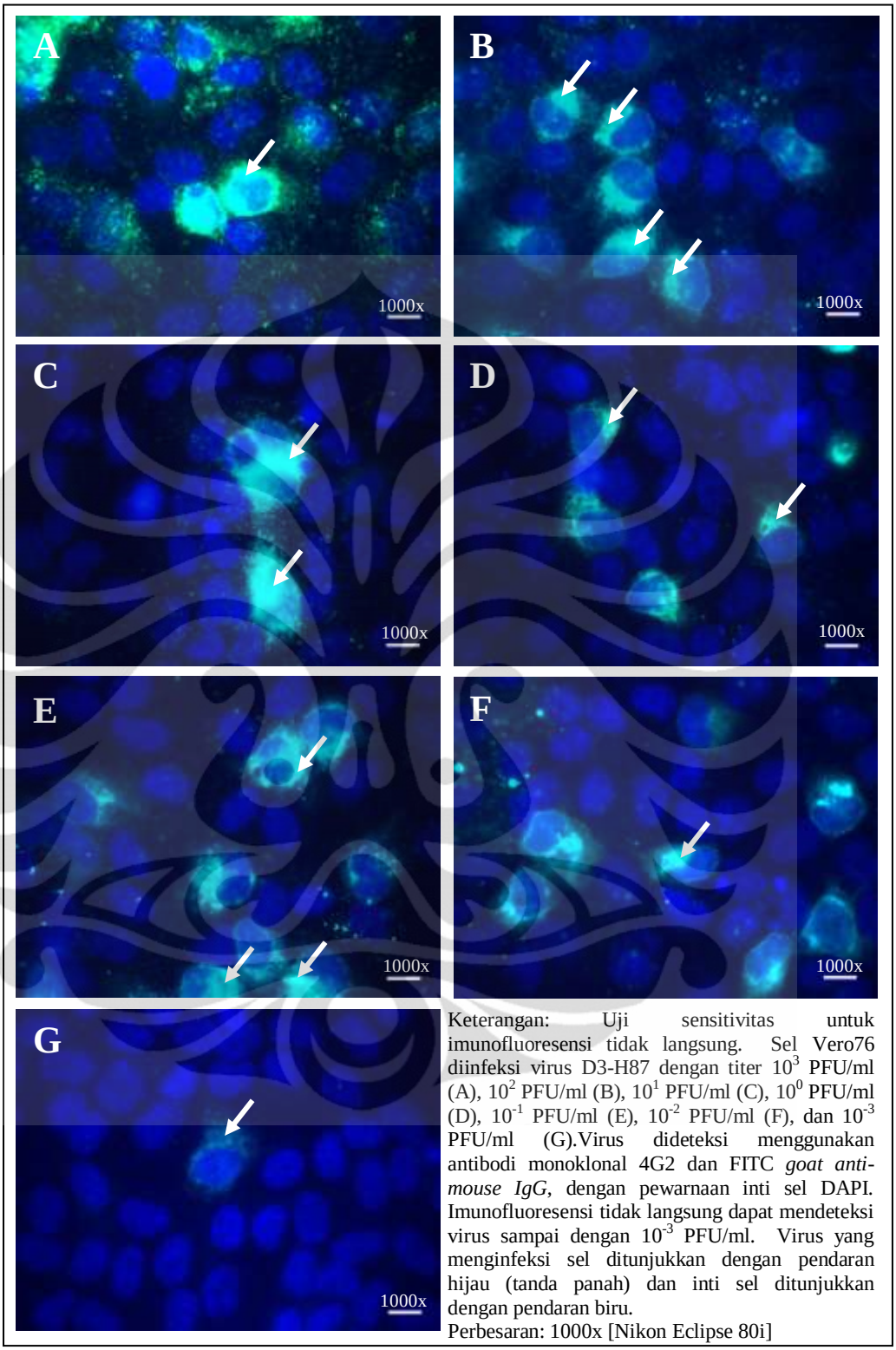
4.5 Uji sensitivitas Imunofluoresensi Langsung dan Tidak Langsung

Uji sensitivitas dilakukan pada imunofluoresensi langsung dan tidak langsung. Uji sensitivitas pada penelitian menggunakan virus D3-H87 dengan titer 10^{5} PFU/ml. Uji sensitivitas dilakukan dengan mendilusi konsentrasi virus secara bertingkat yaitu 10^{3}, 10^{2}, 10^{1}, 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}, dan 10^{-3} PFU/ml. Antibodi primer yang digunakan yaitu 4G2 untuk imunofluoresensi tidak langsung dan 4G2-Alexa Fluor untuk imunofluoresensi langsung.

Berdasarkan hasil yang diperoleh untuk imunofluoresensi tidak langsung (Gambar 4.5(1) A--G), intensitas pendaran semakin lemah seiring dengan berkurangnya titer virus. Intensitas pendaran yang semakin melemah, mengindikasikan virus yang bereplikasi pada sel memiliki titer yang rendah. Hal tersebut dapat terlihat pada Gambar 4.3.3(1) G, intensitas pendaran sangat lemah karena titer virus yang digunakan sebesar 10^{-3} PFU/ml.

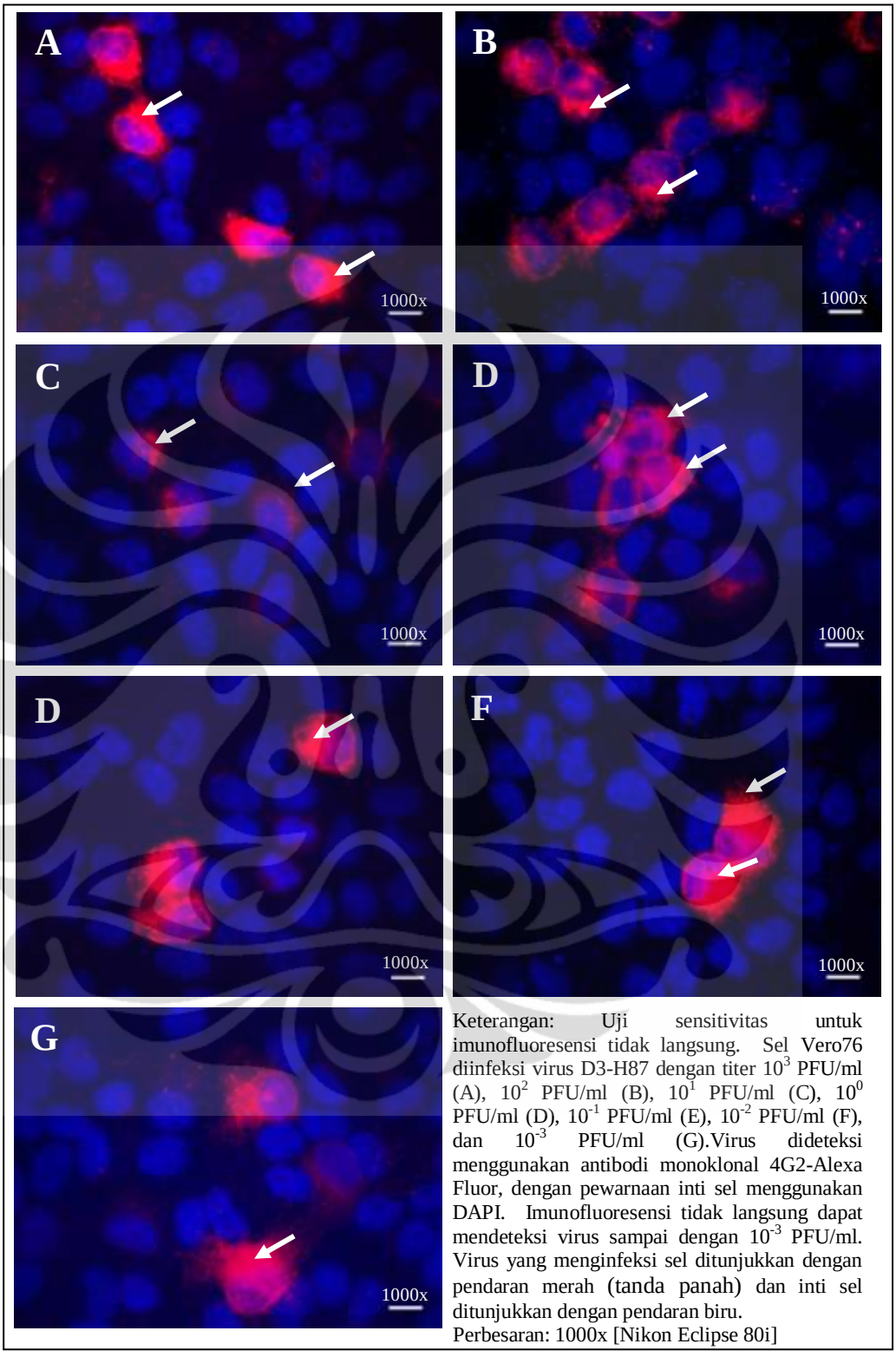
Begitu pula dengan uji imunofluoresensi langsung. Intensitas pendaran semakin melemah seiring berkurangnya titer yang digunakan (Gambar 4.5(2) A--G). Titer virus terendah (10^{-3} PFU/ml) memerlihatkan sinyal yang paling lemah dibandingkan dengan lainnya.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011



Keterangan: Uji sensitivitas untuk imunofluoresensi tidak langsung. Sel Vero76 diinfeksi virus D3-H87 dengan titer 10^3 PFU/ml (A), 10^2 PFU/ml (B), 10^1 PFU/ml (C), 10^0 PFU/ml (D), 10^{-1} PFU/ml (E), 10^{-2} PFU/ml (F), dan 10^{-3} PFU/ml (G).Virus dideteksi menggunakan antibodi monoklonal 4G2 dan FITC *goat anti-mouse IgG*, dengan pewarnaan inti sel DAPI. Imunofluoresensi tidak langsung dapat mendeteksi virus sampai dengan 10^{-3} PFU/ml. Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran hijau (tanda panah) dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru.
Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.5(1) Hasil uji sensitivitas uji imunofluoresensi tidak langsung dengan antibodi primer 4G2 dan antibodi sekunder FITC-*goat anti mouse* IgG



Keterangan: Uji sensitivitas untuk imunofluoresensi tidak langsung. Sel Vero76 diinfeksi virus D3-H87 dengan titer 10^3 PFU/ml (A), 10^2 PFU/ml (B), 10^1 PFU/ml (C), 10^0 PFU/ml (D), 10^{-1} PFU/ml (E), 10^{-2} PFU/ml (F), dan 10^{-3} PFU/ml (G).Virus dideteksi menggunakan antibodi monoklonal 4G2-Alexa Fluor, dengan pewarnaan inti sel menggunakan DAPI. Imunofluoresensi tidak langsung dapat mendeteksi virus sampai dengan 10^{-3} PFU/ml. Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran merah (tanda panah) dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru.
Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.5(2) Hasil uji sensitivitas uji imunofluoresensi langsung dengan 4G2-Alexa fluor

Berdasarkan hasil yang didapatkan, baik imunofluoresensi langsung maupun tidak langsung, mampu mendeteksi virus dengue sampai dengan 10^{-3} (0,01) PFU/ml. Kedua metode tersebut memiliki tingkat spesivisitas yang sama. Kao *dkk*. (2005: 5) meyatakan bahwa deteksi antigen dengan imunofluoresensi mampu mendeteksi 1--10 sel yang terinfeksi

Suatu metode yang baru dikembangkan, harus diuji spesifisitasnya serta sensitivitas. Secara analitik sensitivitas menunjukkan jumlah atau konsentrasi terendah dari suatu substansi dalam sampel yang dapat diukur secara akurat oleh suatu teknik. Secara diagnosis sensitivitas adalah persentase orang terkena penyakit yang dapat teridentifikasi positif melalui suatu teknik diagnosis (Saah & Hoover 1997: 91).

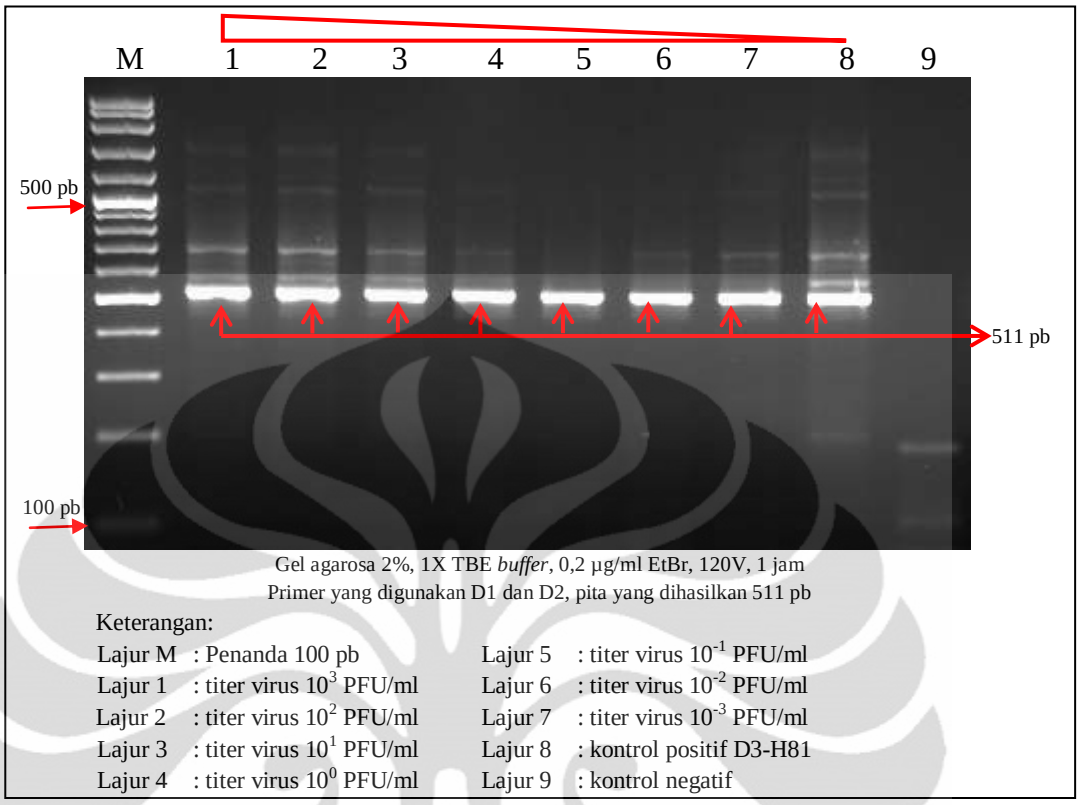
Uji sensitivitas yang dilakukan pada penelitian yaitu sensitivitas secara analitik dengan cara empiris, yaitu dengan melakukan dilusi bertingkat dari spesimen dengan konsentrasi substansi yang telah diketahui sebelumnya. Sensitivitas uji imunufluoresensi untuk deteksi virus dengue dapat diartikan sebagai jumlah atau konsentrasi virus terendah dalam sampel yang dapat dideteksi secara akurat melalui metode tersebut.

Supernatan dari uji sensitivitas dikumpulkan untuk dilakukan konfirmasi menggunakan RT-PCR serta PCR deteksi. Hasil yang diperoleh menunjukkan pita dengan ukuran 511 pb (Gambar 4.5(3)). Sinyal yang dihasilkan tidak memerlihatkan perbedaan intensitas sinyal yang signifikan.

Berdasarkan hasil uji sensitivitas, uji imunofluoresensi dan RT-PCR mampu mendeteksi virus sampai dengan 0,001 PFU/ml. Kao *dkk*. (2005: 3) deteksi asam nukleat dengan RT-PCR, mampu mendeteksi virus berkisar antara 1-1000 PFU/ml. Berdasarkan hasil tersebut, maka kedua metode tersebut memiliki tingkat sensitivitas yang sama.

Amplifikasi menggunakan kontrol positif serta kontrol negatif. Kontrol negatif tidak menunjukkan adanya pita yang terampllifikasi. Hal tersebut menunjukkan reaksi PCR yang dilakukan, bebas dari kontaminasi. Roux (1995: 5188) menyatakan bahwa kontrol negatif digunakan untuk melihat kesalahan akibat adanya kontaminasi, sehingga jika muncul pita yang tidak diharapkan, dapat dikonfirmasi pada kontrol negatif untuk mengetahui kesalahan yang terjadi.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011



Gel agarosa 2%, 1X TBE *buffer*, 0,2 µg/ml EtBr, 120V, 1 jam
Primer yang digunakan D1 dan D2, pita yang dihasilkan 511 pb

Keterangan:

Lajur M	: Penanda 100 pb	Lajur 5	: titer virus 10^{-1} PFU/ml
Lajur 1	: titer virus 10^{3} PFU/ml	Lajur 6	: titer virus 10^{-2} PFU/ml
Lajur 2	: titer virus 10^{2} PFU/ml	Lajur 7	: titer virus 10^{-3} PFU/ml
Lajur 3	: titer virus 10^{1} PFU/ml	Lajur 8	: kontrol positif D3-H81
Lajur 4	: titer virus 10^{0} PFU/ml	Lajur 9	: kontrol negatif

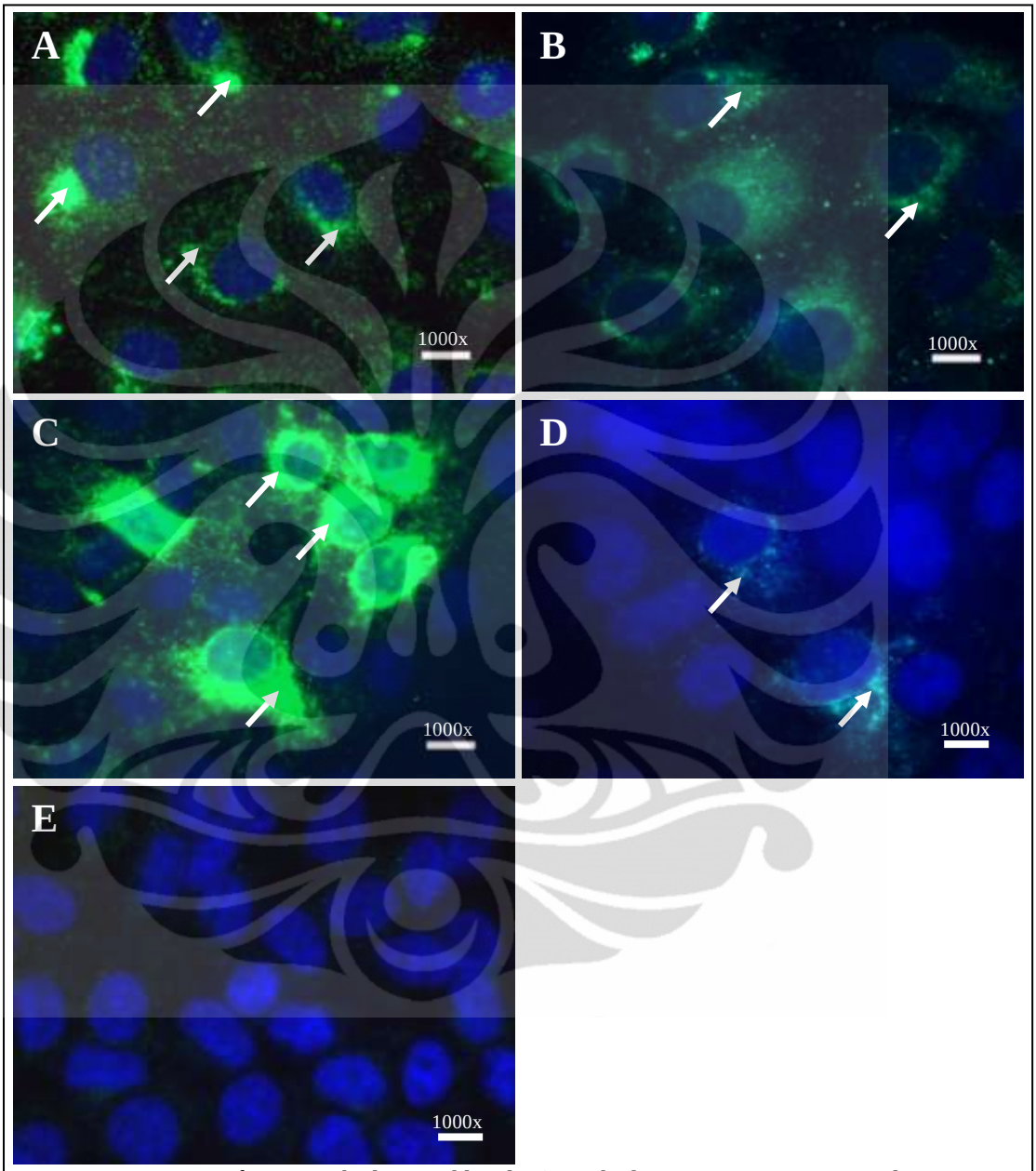
Gambar 4.5(3) Hasil RT-PCR supernatan uji sensitivitas imunofluoresensi

4.6 Uji spesifisitas Imunofluoresensi Langsung dan Tidak Langsung

Uji spesifisitas dilakukan dengan cara mereaksikan antibodi hasil produksi sesuai dengan serotipe virus dengue. Berdasarkan hasil uji spesifisitas 4G2 memberikan hasil positif untuk keempat serotipe virus, sebab 4G2 merupakan antibodi yang spesifik terhadap kelompok Flavivirus (Gambar 4.6 (1) dan 4.6(2)). Antibodi 4G2 spesifik mengenali protein E dari virus dengue. Sel yang positif terinfeksi, ditunjukkan dengan pendaran. Uji imunofluoresensi langsung menunjukkan pendaran hijau, sedangkan imunoflluoresensi tidak langsung berpendar merah.

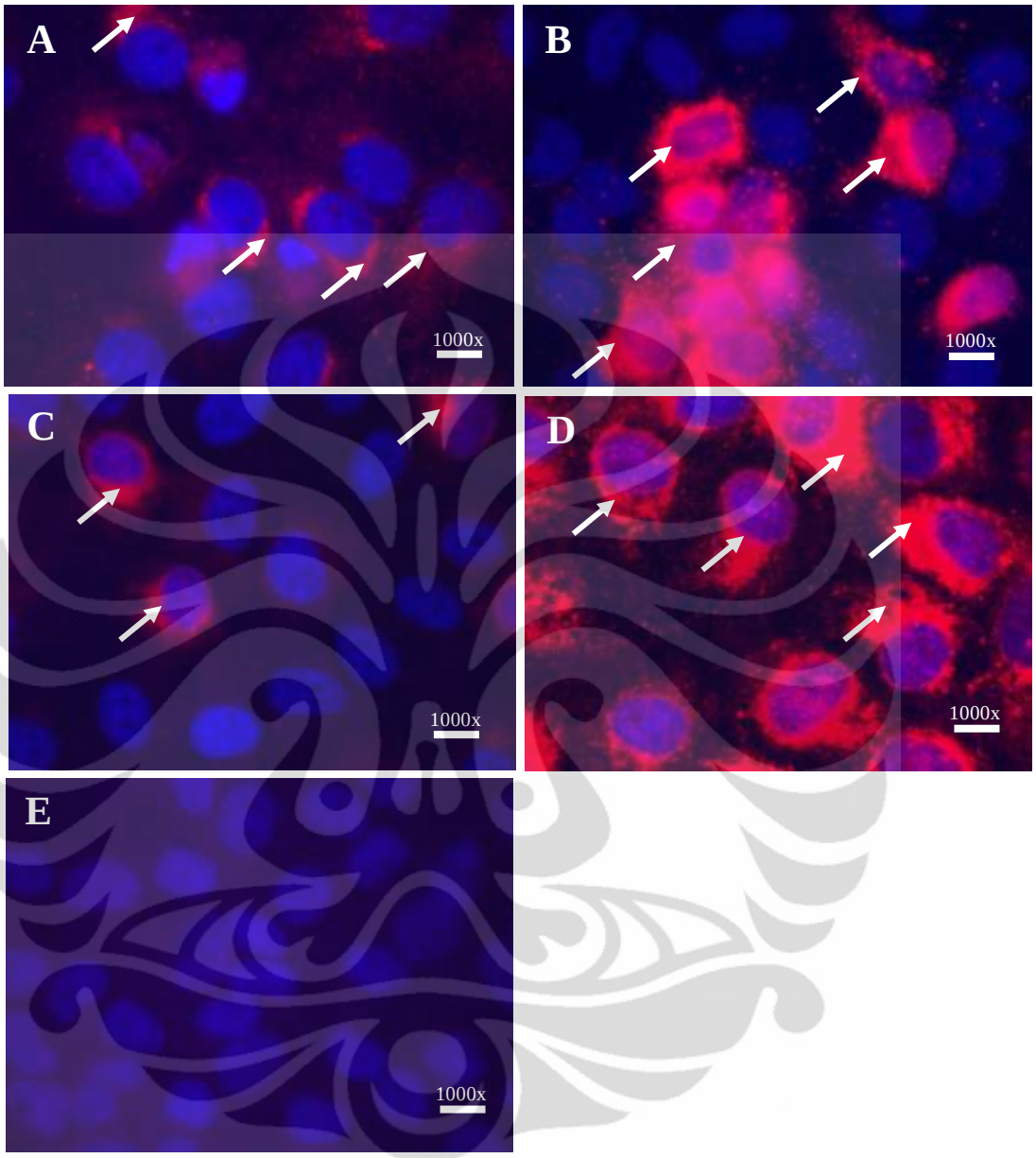
Spesifikasi 4G2 telah dilakukan menggunakan uji imunofluoresensi. Berdasarkan Henchal *dkk*. (1982: 833) antibodi 4G2 juga mampu mendeteksi empat serotipe virus dengue, dengan strain yang berbeda. Selain itu 4G2 mampu

mendeteksi kelompok arbovirus lainnya. Misalnya *Japanese encephalitis*, *west nile*, dan *yellow fever*.



Keterangan: Uji spesifisitas antibodi monoklonal 4G2 terhadap empat serotipe virus dengue, yaitu D1-Hawaii (A), D2-NGC (B), D3-H87 (C), D4-H241 (E), dan sel yang tidak diinfeksi virus. Uji spesifisitas dilakukan menggunakan imunofluoresensi tidak langsung. *Fluorescein isothiocyanate goat anti-mouse IgG* digunakan sebagai antibodi sekunder dengan pewarnaan inti sel menggunakan DAPI. Antibodi 4G2 mampu mendeteksi keempat serotipe menggunakan imunofluoresensi tidak langsung. Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran hijau(tanda panah) dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru. Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.6(1) Hasil uji spesifisitas antibodi monoklonal 4G2



Keterangan: Uji spesifisitas antibodi monoklonal 4G2 yang dilabel Alexa Fluor terhadap empat serotipe virus dengue, yaitu D1-Hawaii (A), D2-NGC (B), D3-H87 (C), D4-H241 (E), dan sel yang tidak diinfeksi virus. Uji sensitivitas dilakukan menggunakan imunofluoresensi langsung. Inti sel akan diwarnai oleh DAPI. Antibodi 4G2 mampu mendeteksi keempat serotipe menggunakan imunofluoresensi tidak langsung. Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran merah dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru.
Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.6(2) Hasil uji spesifisitas antibodi monoklonal 4G2-Alexa fluor

Uji spesifisitas antibodi spesifik untuk setiap serotipe virus dengue dapat dilihat pada Gambar 4.6(3--4). Berdasarkan hasil antibodi monoklonal mampu mendeteksi virus sesuai dengan serotipenya menggunakan imunofluoresensi

langsung dan tidak langsung. Antibodi 15F3 mampu mendeteksi DENV1, 3H5 mendeteksi DENV2, 5D4 mendeteksi DENV3, dan 1H10 mendeteksi DENV4.

Akan tetapi intensitas fluoresens yang dihasilkan antibodi 15F3 sangat lemah. Berdasarkan Gubler (*lihat* Kao 2001: 3676), antibodi 15F3 tidak mampu mendeteksi DENV1 tertentu. Oleh sebab itu, sebaiknya digunakan antibodi lain yang lebih baik, misalnya 1F1.

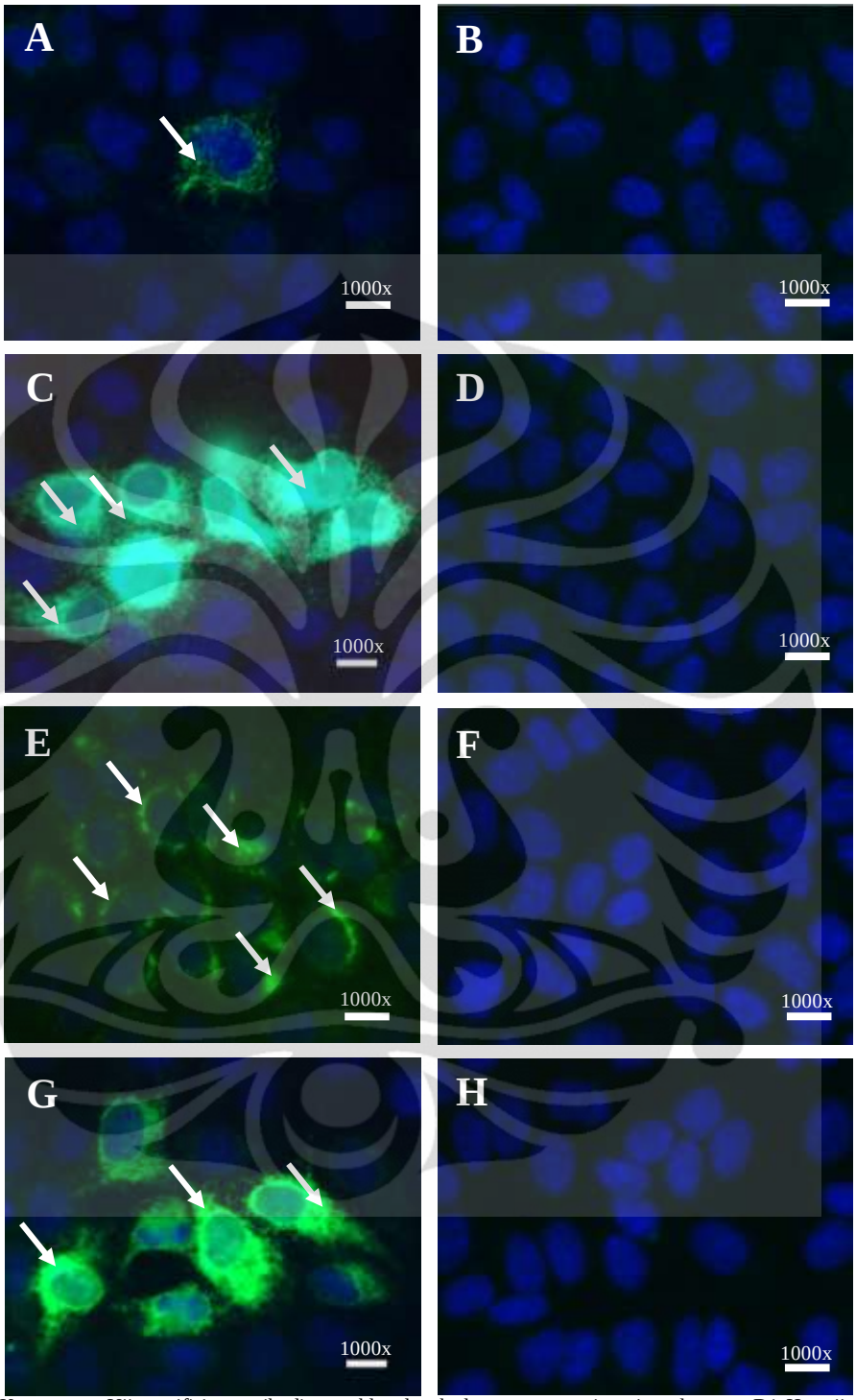
Lemahnya intensitas fluoresens dapat disebabkan karena kurang sensitifnya suatu antibodi terhadap virus atau antigen tertentu. Kurang efektifnya pelabelan yang antibodi dengan fluoropor, dapat pula menyebabkan lemahnya intensitas pendaran fluoresens. Setiap antibodi akan bereaksi dengan fluoropor pada tingkat yang berbeda-beda dan aktivitas biologi yang berbeda saat pelabelan dengan reagen. Hal tersebut dapat diatasi dengan melakukan pelabelan ulang dengan menambahkan waktu inkubasi pelabelan pada suhu 4^{o} C semalaman (Molecular Probe 2001: 1--3).

Intensitas pendaran yang dihasilkan setiap aantibodi berbeda. Menurut Mosadale *dkk*. (1996: 1049) perbedaan intensitas pendaran dapat disebabkan karena perbedaan konsentrasi antibodi primer yang digunakan. Penelitian yang dilakukan tidak menggunakan antibodi dalam konsentrasi yang seragam. Penilitan hanya menyamakan faktor pengenceran.

Pendaran pada antibodi 1H10 memiliki intensitas tertinggi. Hal tersebut disebabkan konsentrasi antibodi 1H10 paling tinggi jika dibandingkan dengan antibodi lainnya. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Mosadale *dkk*. (1996: 1049) yang menyatakan bahwa peningkatan intensitas pendaran berbanding lurus dengan konsentrasi antibodi primer yang digunakan.

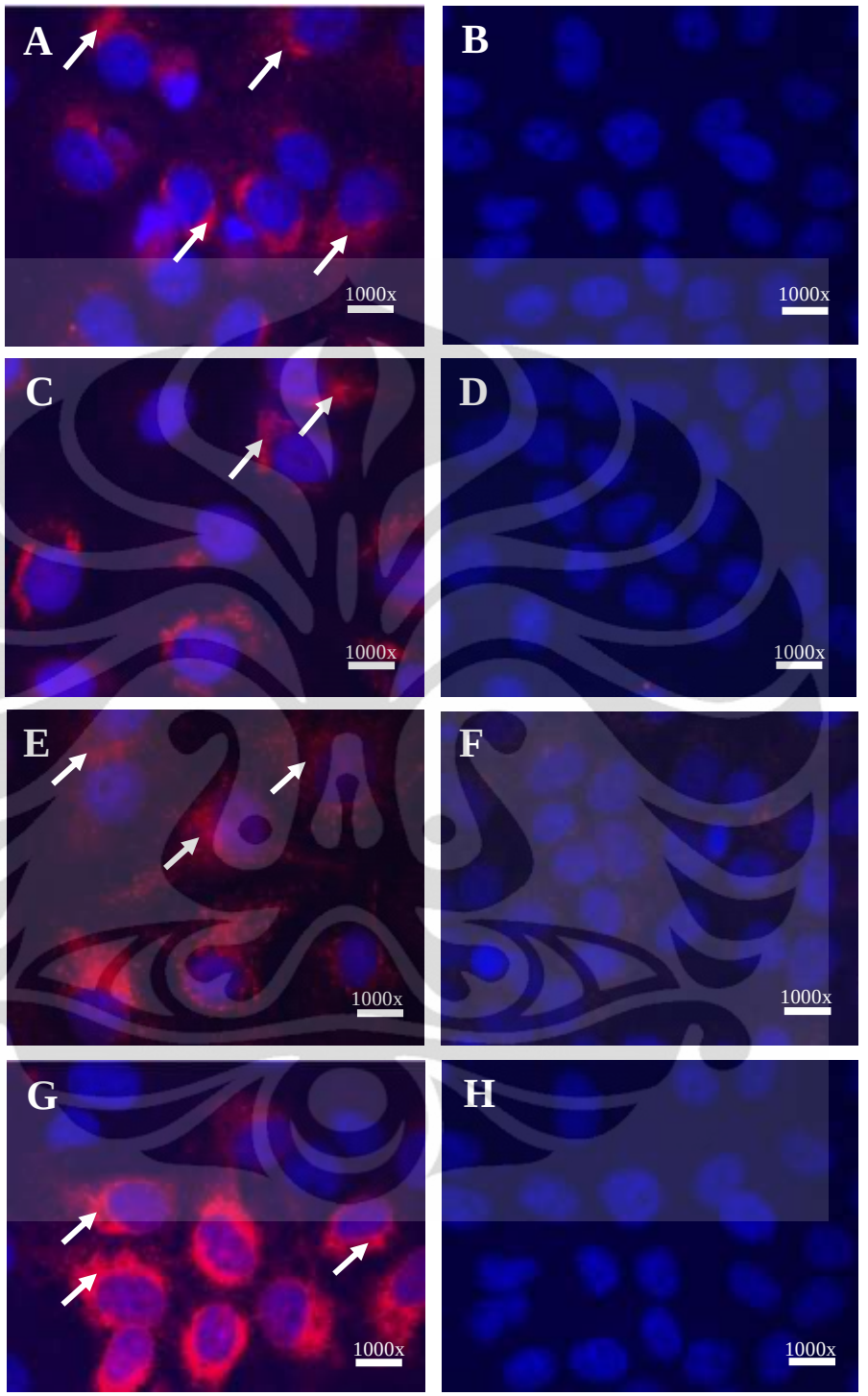
Uji spesifisitas pada penelitian dilakukan untuk imunofluoresensi langsung dan tidak langsung. Uji sensitivitas dilakukan dengan cara mereaksikan antibodi terhadap virus dengue sesuai dengan serotipenya. Uji spesifisitas dilakukan dengan menggunakan kontrol negatif untuk setiap antibodi. Kontrol negatif yang digunakan pada penelitian yaitu sel yang tidak diinfeksi dan direaksikan dengan antibodi. Berdasarkan hasil yang didapat, antibodi tidak mendeteksi adanya sel yang tidak terinfeksi. Hal tersebut ditunjukan dari tidak terdapatnya sel yang berpendar saat dilihat di bawah mikroskop UV.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011



Keterangan: Uji spesifisitas antibodi monoklonal terhadap empat serotipe virus dengue. D1-Hawaii dideteksi dengan antibodi 15F3 (A), D2-NGC dengan 3H5 (C), D3-H87 dengan 5D4 (E), D4-H241 dengan 1H10 (G), serta sel yang tidak diinfeksi virus (B,D,F,H). Uji spesifisitas dilakukan menggunakan imunofluoresensi tidak langsung. Inti sel akan diwarnai oleh DAPI. Seluruh antibodi monoklonal dapat mendeteksi virus dengue sesuai dengan serotipenya. Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran hijau (tanda panah) dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru. Perbesaran: 1000 [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.6(3) Hasil uji spesifisitas antibodi monoklonal spesifik menggunakan imunoflluoresensi tidak langsung



Keterangan: Uji spesifisitas antibodi monoklonal terhadap empat serotipe virus dengue. D1-Hawaii dideteksi dengan antibodi 15F3 (A), D2-NGC dengan 3H5 (C), D3-H87 dengan 5D4 (E), D4-H241 dengan 1H10 (G), serta sel yang tidak diinfeksi virus (B,D,F,H). Uji spesifisitas dilakukan menggunakan imunofluoresensi langsung. Inti sel akan diwarnai oleh DAPI. Seluruh antibodi monoklonal dapat mendeteksi virus dengue sesuai dengan serotipenya. Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran hijau(tanda panah) dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru. Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.6(4) Hasil uji sensitifitas antibodi monoklonal-Alexa fluor menggunakan imunoflluoresensi langsung

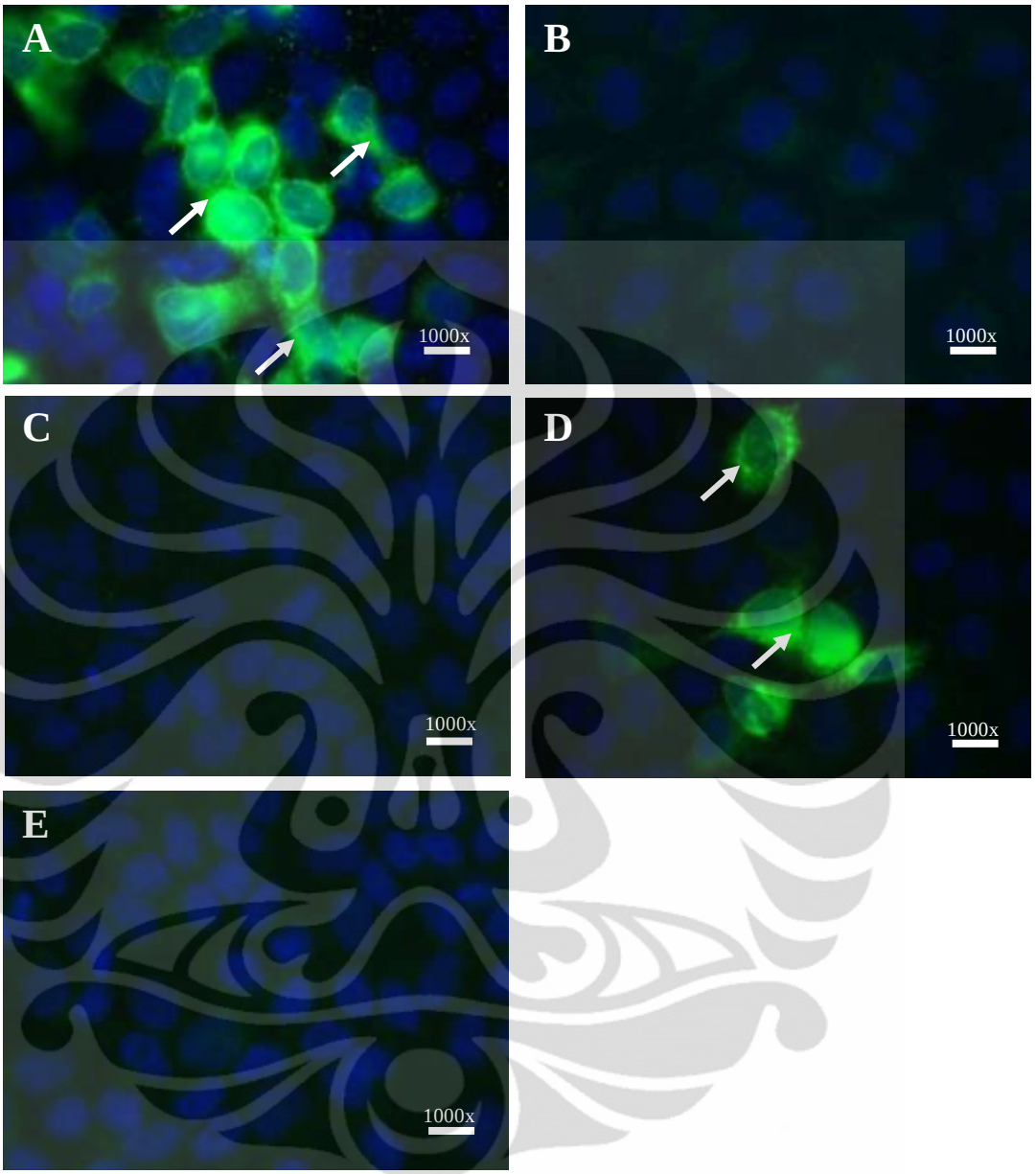
Uji spesifisitas juga dilakukan terhadap virus D3-H87 dengan mereaksikan menggunakan kelima antibodi. Hasil uji spesifisitas antibodi terhadap D3-H87 dapat dilihat padaGambar 4.6(5). Hasil menunjukkan bahwa virus D3-H87 hanya dideteksi oleh antibodi 4G2 dan 5D4 yang spesifik untuk mendeteksi protein E virus dengue serotipe 3 (Gambar A&D). Pendaran hanya dihasilkan pada kedua antibodi tersebut, sedangkan antibodi lainnya tidak mendeteksi virus dengue 3 yang menginfeksi sel. Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat *cross-reactivity* antibodi terhadap virus D3-H87.

Virus D3-H87 yang direksikan dengan antibodi 15F3, 3H5, dan 1H10 memberikan hasil yang negatif (Gambar B, C, & E). Antibodi tersebut bukanlah antibodi spesifik terhadap virus dengue serotipe 3. Hasil negatif dari uji sensitifitas merupakan negatif sesungguhnya (*true negative*) bukan negatif palsu (*false negative*). Hal tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa infeksi oleh satu serotipe akan memberikan imunitas seumur hidup terhadap serotipe tersebut. Akan tetapi, imunitas yang diperoleh tidak dapat melindungi dari infeksi oleh serotipe berbeda (*cross-protective*). Seseorang yang terinfeksi satu jenis virus dengue, dapat terinfeksi jenis lainnya (Jessie *dkk*. 2004: 141; WHO 2009: 14).

Spesifisitas antibodi terhadap virus D3-H87, sesuai dengan pernyataan Henchal *dkk*. (1982: 833) yang menyatakan bahwa, antibodi 5D4 spesifik mendeteksi virus dengue serotipe 3, misalnya H87 dan PR6. Antibodi tersebut tidak reaktif terhadap tiga serotipe lainnya. Henchal *dkk*. Juga menyatakan bahwa antibodi 5D4 tidak reaktif terhadap kelompok arbovirus lainnya, seperti *Japanese encephalitis* ataupun *west nile*.

Uji sensitifitas antibodi terhadap virus dengue serotipe lainnya, tidak dilakukan dalam penelitian. Hal tersebut disebabkan keterbatasan waktu penilitian. Pengujian terhadap serotipe lainnya bermanfaat untuk membuktikan ada atau tidaknya *cross reactivity* dari antibodi, terhadap serotipe yang berbeda.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011



Keterangan: Uji spesifisitas antibodi monoklonal 4G2 (A), 15F3 (B), 3H5 (C), 5D4 (D), dan 1H10 (E) untuk virus D3-H87. Uji spesifisitas menggunakan imunofluoresensi tidak langsung menggunakan galur sel Vero76. Antibodi sekunder yang digunakan *anti-mouse* IgG-FITC dengan pewarnaan inti sel menggunakan DAPI. Antibodi monoklonal 4G2 dan 3H5 dapat mendeteksi virus D3-H87. Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran hijau dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru.
Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.6(5) Hasil uji sensitifitas antibodi monoklonal untuk D3-H87

4.7 Analisis uji imunofluoresensi untuk *mutiple infection*

Penelitian imunofluoresensi untuk *multiple infection* dilakukan dengan menginfeksi sel menggunakan 2 virus dengue yang berbeda serotipe. Pendeteksian dilakukan dengan menggunakan tiga buah antibodi, yaitu antibodi primer monoklonal, antibodi sekunder yang dilabel FITC, dan antibodi primer monoklonal yang telah dilabel Alexa fluor. Tujuan percobaan yaitu untuk membuktikan uji imunofluoresensi dapat dilakukan untukmendeteksi infeksi lebih dari satu virus.

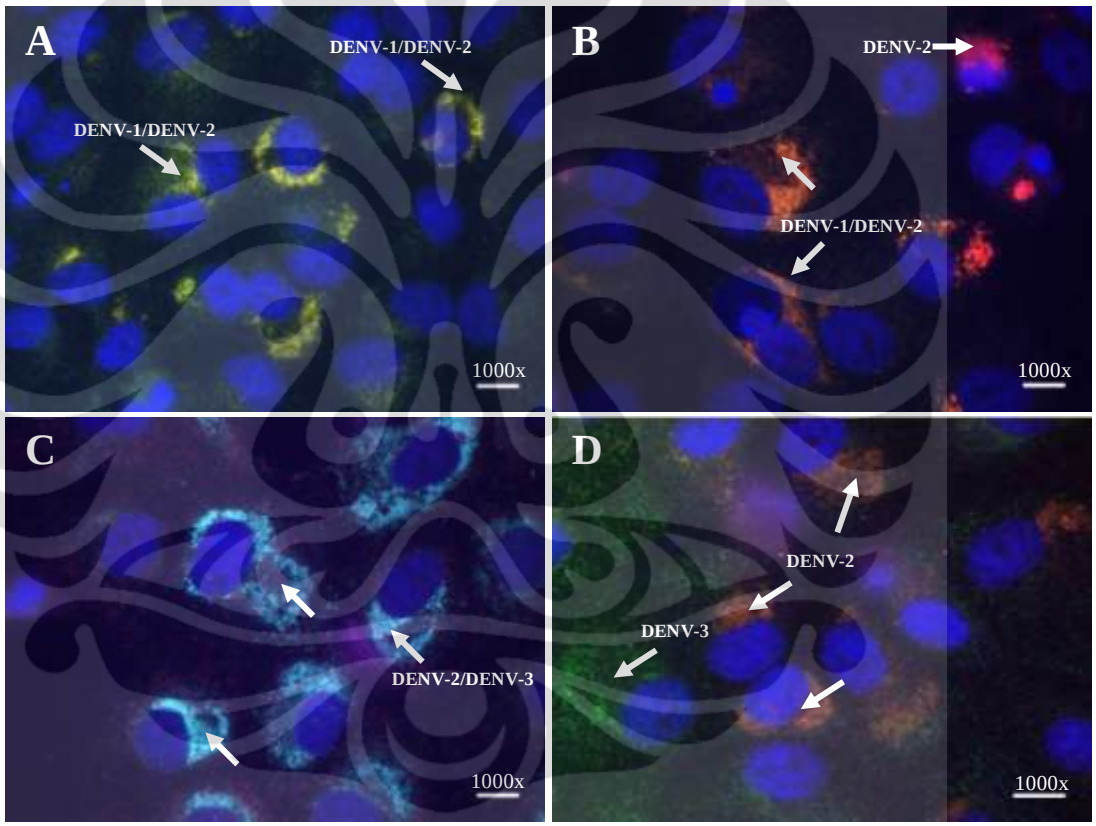
Berdasarkan hasil yang didapat, *multiple infection* D3-H87 dan D2-NGC (Gambar 4.7(1)-D) serta D2-NGC dan D4-H241 (Gambar 4.7(2)-G&H) dapat terdeteksi dengan baik. Setiap serotipe virus dapat dibedakan dengan jelas karena adanya perbedaan warna. Hal tersebut menunjukkan bahwa antibodi yang digunakan, spesifik berikatan pada protein virus sesuai dengan serotipenya.

Multiple infection D3-H87 dan D2-NGC (Gambar 4.7(1)-D) menunjukkan perbedaan intensitas pendaran hijau dan merah yang dihasilkan. Pendaran hijau menunjukkan D3, sedangkan D2 ditunjukkan dengan pendaran hijau. Intensitas pendaran merah lebih tinggi dibandingkan dengan pendaran hijau. Perbedaan tersebut menunjukkan bahwa D2 lebih banyak menginfeksi sel dibandingkan dengan D3. Hal tersebut dapat diakibatkan perbedaan titer yang digunakan saat menginfeksi sel. Titer virus yang digunakan saat menginfeksi tidak diseragamkan, untuk menyamakan dengan kondisi pada serum pasien.

Hasil *multiple infection* untuk D2-NGC dan D4-H241 (Gambar 4.7(2)-G&H) memberikan visualisasi yang baik. Masing-masing serotipe dapat dibedakan, walaupun menggunakan antibodi yang berbeda. Gambar 4.7(2)-G menunjukkan intensitas pendaran hijau (D2) lebih kuat dibandingkan pendaran merah (D4). Pendaran hijau juga lebih kuat pada penggunaan antibodi yang berbeda (Gambar 4.4.5(2)-H). Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh pengambilan foto saat pengamatan di bawah mikroskop. filter yang digunakan saat pengambilan gambar untuk FITC tidak sama dengan saat pengambilan gambar untuk Alexa fluor.

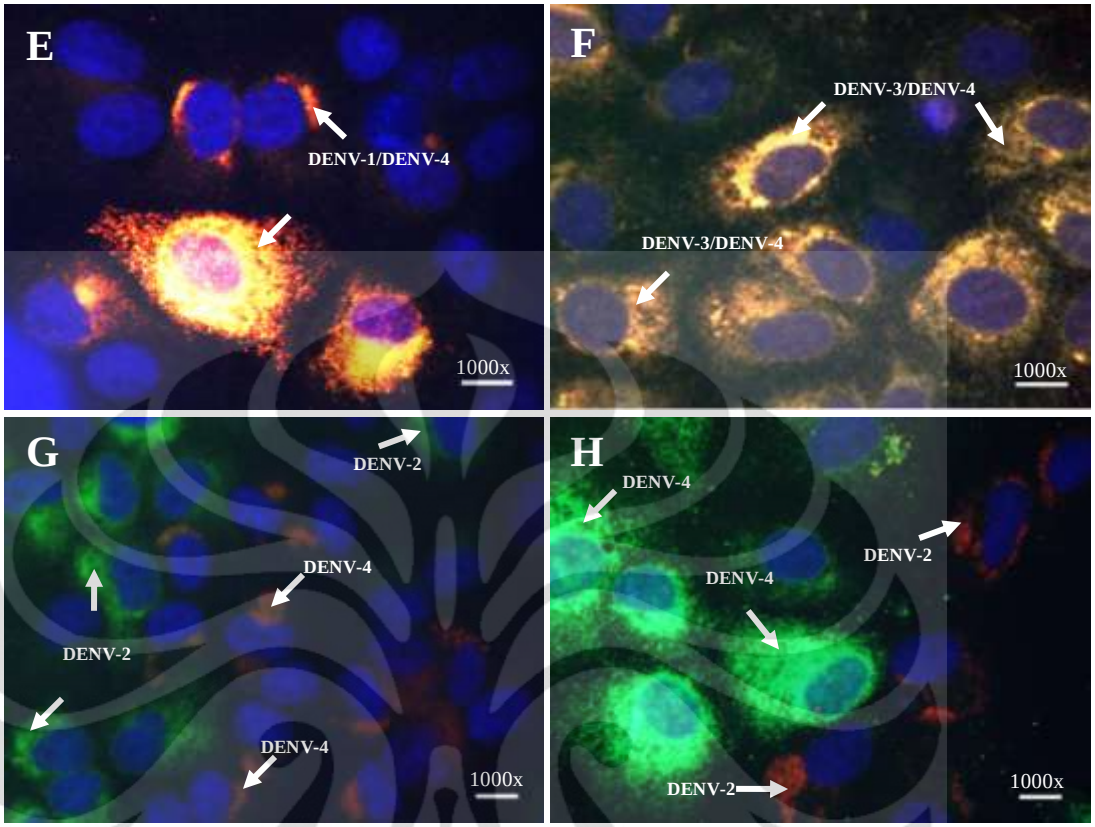
Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

Intensitas pendaran menggunakan antibodi primer dan sekunder jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan intensitas pendaran menggunakan antibodi primer yang dilabel. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Buchwalow & Böcker (2010: 33) bahwa tingkat sensitivitas uji imunofluoresensi tidak langsung lebih tinggi jika dibandingkan dengan imunofluoresensi langsung. Oleh sebab itu, imunofluoresensi langsung lebih sering digunakan.



Keterangan:
A) Virus : D1-Hawaii dan D2-NGC
Antibodi : Ab primer 15F3 Alexa fluor (D1); Ab primer 3H5 dan antibodi sekunder-FITC (D2)
B) Virus : D1-Hawaii dan D2-NGC
Antibodi : Ab primer 15F3 dan Ab sekunder-FITC (D1); Ab primer 3H5 Alexa fluor (D2)
C) Virus : D2-NGC dan D3-H87
Antibodi : Ab primer 3H5 dan Ab sekunder-FITC (D2); Ab primer 5D4 Alexa fluor (D3)
D) Virus : D2-NGC dan D3-H87
Antibodi : Ab primer 3H5 Alexa fluor (D2); Ab primer 5D4 dan Ab sekunder-FITC (D3)
Waktu inkubasi virus : 3 hari
Sel yang digunakan : Vero 76
Counter staining : DAPI Nucleic Acid Stain 300 nM
Mounting Medium : ProLong® antifade
Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]
Pendaran berwarna merah dan hijau menunjukkan virus yang menginfeksi sel
Pendaran berwarna biru menunjukkan inti sel

Gambar 4.7(1) Hasil Imunofluoresensi untuk *multiple infection*



Keterangan:
E) Virus : D1-Hawaii dan D4-H241
Antibodi : Ab primer 15F3 dan Ab sekunder-FITC (D1), Ab primer 1H10 Alexa fluor (D4)
F) Virus : D3-H87 dan D4-H241
Antibodi : Ab primer 5D4 dan Ab sekunder-FITC (D3); Ab 1H10 Alexa fluor (D4)
G) Virus : D2-NGC dan D4-H241
Antibodi : Ab primer 3H5 Alexa fluor (D2); Ab primer 1H10 dan Ab sekunder-FITC (D4)
H) Virus : D2-NGC dan D4-H241
Antibodi : Ab primer 3H5 dan Ab sekunder-FITC (D2); Ab primer 1H10 Alexa fluor (D4)
Waktu inkubasi virus : 3 hari
Sel yang digunakan : Vero 76
Counter staining : DAPI Nucleic Acid Stain 300 nM
Mounting Medium : ProLong® antifade
Perbesaran : 1000x [Nikon Eclipse 80i]
Pendaran berwarna merah dan hijau menunjukkan virus yang menginfeksi sel
Pendaran berwarna biru menunjukkan inti sel

Gambar 4.7(2) Hasil Imunofluoresensi untuk *multiple infection*

Sementara itu, hasil *multiple infection* lainnya tidak menunjukkan perbedaan warna pada masing-masing serotipe (Gambar 4.7(1--2)). Warna yang dihasilkan tercampur. Hal tersebut dapat disebabkan kedua virus yang digunakan, menginfeksi sel yang sama. Oleh sebab itu, antibodi monoklonal dan antibodi yang telah dilabel Alexa fluor, akan mengenali sel yang sama dan mengakibatkan pencampuran warna.

Deteksi dilakukan dengan menggunakan pewarnaan ganda, yaitu FITC dan Alexa fluor. Antibodi akan ditambahkan sesuai dengan prosedur pada uji infeksi tunggal. Urutan penambahan antibodi diawali dengan antibodi primer, antibodi primer yang dilabel Alexa fluor, kemudian antibodi sekunder yang dilabel FITC.

Urutan penambahan antibodi dilakukan berdasarkan percobaan ketika pra peneitian. Percobaan sebelumnya menambahkan antibodi sekunder yang dilabel FITC, sebelum antibodi primer Alexa fluor ditambahkan. Hasilnya virus tidak ada yang teridentifikasi. Hal tersebut dapat diakibatkan molekul FITC menghambat kerja dari Alexa fluor, sehingga tidak menghasilkan pendaran.

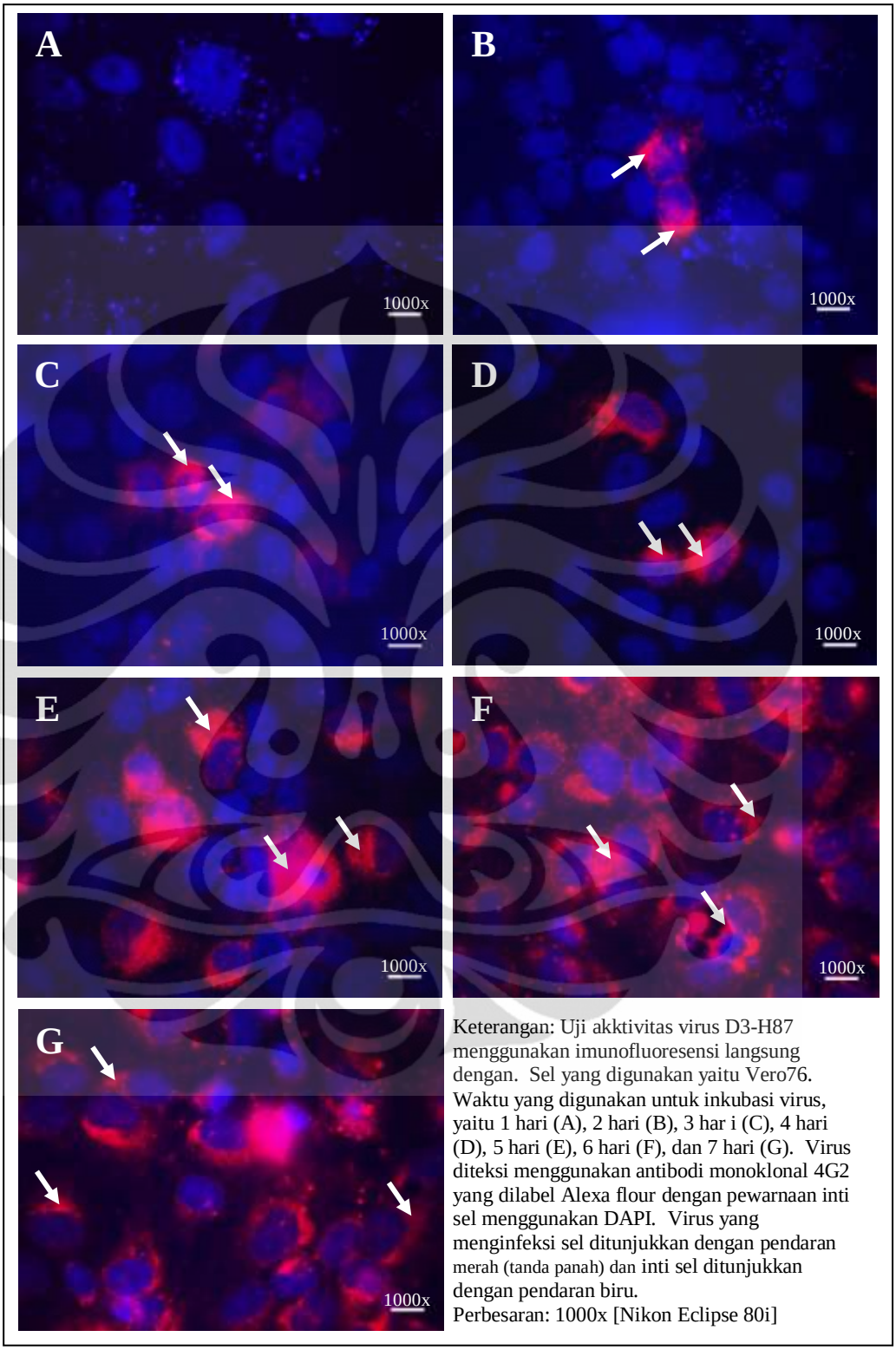
Percobaan menguji uji imunofluoresensi untuk *multiple-infection*, didasari atas perkembangan infeksi virus dengue yang meningkat. Saat ini banyak dilaporkan kasus infeksi bersamaan oleh serotipe virus yang berbeda. Imunofluoresensi yang merupakan metode *gold standard* dalam mendeteksi virus dengue, diharapkan mampu mendeteksi *multiple infection* untuk digunakan apabila terjadi epidemik.

4.8 Analisis aktivitas D3-H87

Virus D3-H87 menunjukkan aktivitas yang meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Percobaan dilakukan dengan menginkubasi virus dengue selama 7 hari, dan diproses setiap harinya. Percobaan dilakukan untuk melihat aktivitas virus pada sel. aktivitas virus dideteksi dengan menggunakan imunofluoresensi langsung dan antibodi primer 4G2 (anti E) yang di label Alexa fluor.

Berdasarkan hasil yang didapat (Gambar 4.8(1)), pada hari pertama aktivitas virus dalam menginfeksi sel masih sangat sedikit bahkan cenderung tidak ada. Aktivitas virus mulai terdeteksi seiring bertambahnya waktu inkubasi. Virus mulai terdeteksi dengan terlihatnya pendaran merah di sekitar inti sel. Akan tetapi sel yang terinfeksi masih sangat sedikit dan intensitas pendaran yang dihasilkan masih sangat lemah.

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011



Keterangan: Uji akktivitas virus D3-H87 menggunakan imunofluoresensi langsung dengan. Sel yang digunakan yaitu Vero76. Waktu yang digunakan untuk inkubasi virus, yaitu 1 hari (A), 2 hari (B), 3 har i (C), 4 hari (D), 5 hari (E), 6 hari (F), dan 7 hari (G). Virus diteksi menggunakan antibodi monoklonal 4G2 yang dilabel Alexa flour dengan pewarnaan inti sel menggunakan DAPI. Virus yang menginfeksi sel ditunjukkan dengan pendaran merah (tanda panah) dan inti sel ditunjukkan dengan pendaran biru.
Perbesaran: 1000x [Nikon Eclipse 80i]

Gambar 4.8(1). Hasil uji aktivitas virus dengue selama 7 hari

Aktivitas menginfeksi virus pada awal inkubasi masih belum terlihat. Hal tersebut dapat disebabkan partikel virus belum matang, sehingga tidak mampu menginfeksi sel. Qi *dkk.* (2008: 93) menyatakan partikel virus yang belum matang tersusun atas protein E dan prM, membran lipid, dan nukleokapsid. Partikel virus tersebut tidak dapat menginduksi fusi dengan sel inang, sehingga bersifat *non-infectious*. Oleh sebab itu, pada awal inkubasi virus dengue belum terdeteksi.

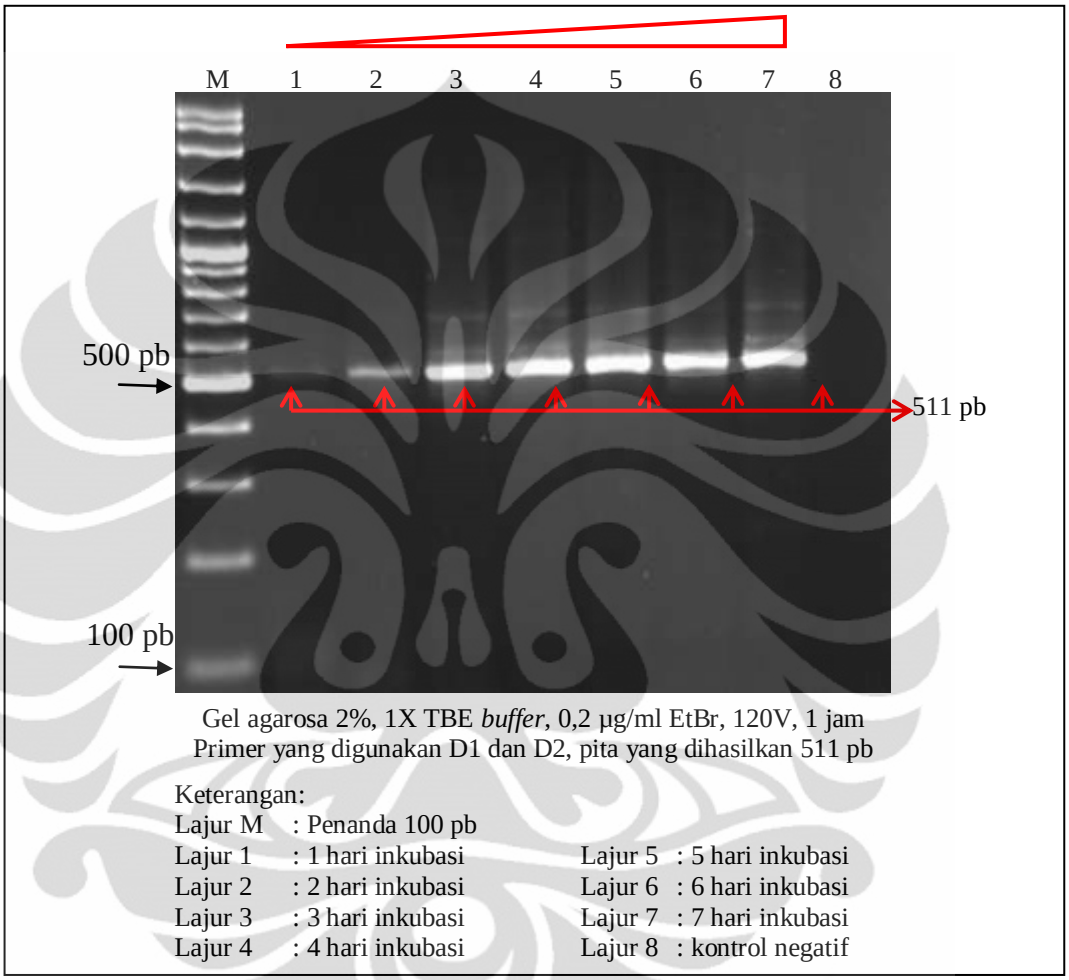
Seiring bertambahnya waktu inkubasi, aktivitas virus meningkat. Virus mulai memasuki fase eksponensial, yaitu fase dimana virus mengalami peningkatan aktivitas yang signifikan. Hal tersebut ditunjukkan mulai dari hari ke-2 sampai hari ke-5 (Gambar 4.8(1) B--E). Mukhopadhyay *dkk.* (2005: 14) menyatakan bahwa virus yang telah matang akan dilepaskan oleh sel inang melalui proses eksositosis, virus yang matang tersebut akan menginfeksi sel lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa seiring bertambahnya waktu inkubasi, maka virus yang matang semakin banyak, sehingga sel yang terinfeksi juga bertambah. Voyles (2002: 23) waktu yang diperlukan virus matang untuk dilepaskan dari sel, tergantung dari sel inang serta sifat dari virus itu sendiri.

Hari ke-6 dan ke-7 seluruh sel telah terinfeksi virus. Hal tersebut menunjukkan bahwa virus telah mengalami fase stasioner dimana kecepatan virus yang menginfeksi sel dan sel yang mati, memiliki kecepatan yang sama. jika dilakukan inkubasi lebih lama, maka virus akan mengalami penurunan aktivitas dan mengalami kematian.

Selama pengamatan 7 hari, supernatan uji imunofluoresensi dikumpulkan untuk dideteksi menggunakan RT-PCR. Berdasarkan hasil yang didapat, hasil amplifikasi supernatan hari pertama menunjukkan pita yang tipis serta sinyal yang lemah. Hal tersebut dapat diakibatkan virus yangteramplifikasi pada 1 hari inkubasi, masih sangat sedikit. Pita yang dihasilkan semakin tebal seiring dengan lamanya waktu inkubasi. Hasil tersebut sebanding dengan uji imunofluoresensi yang menunjukkan semakin banyaknya sel yang terinfeksi. Hasil amplifikasi RT-PCR dapat dilihat pada Gambar 4.8(2)

Kemampuan virus dengue untuk menginfeksi sel meningkat seiring bertambahnya waktu ikubasi. Hal tersebut ditunjukkan dengan pendaran merah

yang terbentuk karena antibodi mendeteksi virus yang menginfeksi sel. Hal tersebut sebanding dengan konfirmasi menggunakan RT-PCR. Pita yang terbentuk semakin tebal seiring lamanya inkubasi.



Gel agarosa 2%, 1X TBE *buffer*, 0,2 µg/ml EtBr, 120V, 1 jam
Primer yang digunakan D1 dan D2, pita yang dihasilkan 511 pb

Keterangan:

Lajur M	: Penanda 100 pb		
Lajur 1	: 1 hari inkubasi	Lajur 5	: 5 hari inkubasi
Lajur 2	: 2 hari inkubasi	Lajur 6	: 6 hari inkubasi
Lajur 3	: 3 hari inkubasi	Lajur 7	: 7 hari inkubasi
Lajur 4	: 4 hari inkubasi	Lajur 8	: kontrol negatif

Gambar 4.8(2) Deteksi supernatan uji aktivitas virus dengue dengan RT-PCR

Berdasarkan hasil optimasi uji imunofluoresensi, dapat disimpulkan bahwa optimasi uji imunofluoresensi untuk mendeteksi dan membedakan serotipe virus dapat digunakan untuk mengidentifikasi infeksi tunggal maupun *multiple infection*. Diharapkan dengan uji imunofluoresensi yang telah dioptimasi, dapat digunakan untuk menunjang diagnosis rutin dilakukan di Laboratorium dan dapat digunakan sebagai metode *gold standard* dalam deteksi virus dengue jika terjadi epidemik. Hal tersebut diharapkan mampu menurunkan angka kematian akibat seterlambatan ataupun salah penanganan pada pasien penderita dengue.

BAB 5
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Optiasi uji imunofluoresensi telah berhasil dilakukan.
2. Sel Vero76 merupakan galur sel terbaik untuk visualisasi deteksi dan penentuan serotipe virus dengue dengan uji imunofluoresensi.
3. Konsentrasi optimum untuk antibodi primer yaitu 4G2 3,5 µg/ml, 15F3 3,8 µg/ml, 3H5 4,1 µg/ml, 5D4 4,4 µg/ml, dan 1H10 µg/ml. Konsentrasi antibodi sekunder *fluorescein isothiocyanate*(FITC)-*labelled goat anti-mouse IgG* yaitu 10 µg/ml dan 7 µg/ml untuk antibodi yang dilabel Alexa fluor.
4. Hasil uji sensitivitas menunjukan bahwa uji imunofluresensi dapat mendeteksi virus dengue hingga 10^{-3} (0,001) PFU/ml.
5. Hasil uji spesifisitas menunjukkan setiap antibodi mampu mendeteksi virus dengue sesuai dengan serotipenya masing-masing. Tidak terdapat *cross reactivity* pada pendeteksian virus dengue D3-H87.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji imunofluoresensi terhadap sampel serum pasien
2. Perlu dilakukan uji imunofluoresensi pada galur sel serta virus lainnya dari kelompok *Flavivirus.*
3. Perlu dilakukan uji spesifitas antibodi terhadap virus dengue serotipe 1, 2, dan 4 serta kelompok *Flavivirus* lainnya

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

DAFTAR REFERENSI

Abcam. 2011. Western blot troubleshooting tips. 2011: 1 hlm. http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11352#8, 16 Mei 2011, pk. 16.25 WIB.

Amersham Biosciences. 2002. Affinity chromatography: Principles and methods. Amersham Biosciences, Buckinghamshire: 155 hlm.

Bakonyi, T., H.Lussy, H. Weissenböck, Á. Hornyák, & N. Nowotny. 2005. In vitro Host-cell susceptibility to usutu virus. *Emerging Infectious Diseases* **11**(2), 298--301.

Baratawidjaja, K.G. 2006. *Imunologi dasar*. Ed.ke-7. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta: xxxviii + 559 hlm.

Barker, K. 1998. *At the bench a laboratory navigator*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xiv + 460 hlm.

Beynon, R. & C. Howe. 2004. *Animal cell culture and technology*. Garland Science/BIOS Scientific Publishers, New York: x + 288 hlm.

Borty, C. 2008. *Deadly diseases and epidemics: Dengue fever and other hemorrhagic viruses*. Infobase Publishing, New York: 102 hlm.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72***:* 248-254.

Brown, T.A. 1999. *Genome*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford: xxviii + 472 hlm.

Buchwalow, I.B. & W. Böker. 2010. *Immunohistochemistry: Basic and method*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg: x + 150 hlm.

Buchy, P., S. Yoksan, R.W. Peeling, & E. Hunsperger. 2006. Laboratory test for the diagnosis of dengue virus infection. *Scientific Working Group*: 1--17.

Butler, M. 2004. *Animal cell culture and technology*. 2nd ed. Bios Scientific Publisher, New York: x + 288 hlm.

Chang, G.J. 1997. Molecular biology of dengue viruses. *Dalam:* Gubler, D.J. & G. Kuno (eds.). 1997. *Dengue and Dengue Hemorrbagic Fever.* CAB International, New York: 175--198.

Chen, K., H.T. Poham, & R. Sinto. 2009. Diagnosis dan terapi cairan pada demam berdarah dengue. *Medicinus* **22**(1): 3--7.

Emeny, J.M. & M.J. Morgan. 1979. Regulation of the interferon system: Evidence that vero cells have a genetic defect in interferon production. *Journal Genetics Virology* **43**: 247--252.

Freshney, A.I. 2005. *Culture of animal cell: a manual of basic technique*. 5th ed. John Wiley & Sons, Inc. : 560 hlm

GE Healthcare. 2005. *Protein G sepharose 4 flast flow*. GE Helthcare Bio-Sciences AB, Sweden: 10 hlm.

Gibbons, R.V. & D.W. Vaughn. 2002. Dengue: An escalating problem. *British Medical Journal* 324: 1563--1566.

Gouvea, V., R.I. Glass, P. Woods 87 niguchi, H.F. Clark, B. Forrester & Zhao-Yin Fang. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **28** (2): 276--282.

Gubler, D.J. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *TRENDS in Microbiology* **10**(2): 100--103.

Guskey, L.E. & H. M. Jenkin. 1975. Adaptation of BHK-21 cells to growth in shaker culture dan subsequent challenge by Japanese Encephalis virus. *American Society for Microbiology* (**30**)3: 433--438.

Halstead, S.B. 1980. Dengue haemorrhagic fever-a public health problem and field for research. *Buletin of the world Health Organization* **58**(1): 1--21.

Harris E, T.G. Roberts, L. Smith, J. Selle, L.D. Kramer, S. Valle, E. Sandoval, & A. Balmaseda. 1998. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **26**(9): 2634--2639.

Hasibuan, A.P.M. & S. Sadi. 1998. Pembuatan antibodi monoklonal terhadap *Salmonella typhimurium* dengan teknik hibridoma. Pene*litian dan Pengembangan Aplikasi lsotop dan Radiasi,* 147--151.

Henchal, E.A. & J.R. Putnak. 1990. Dengue virus. *Clinical Microbiology Reviews* **3**(4): 376--389.

Henchal, E.A., J.M. McCown, M.C. seguin, M.K. Gentry, & W.E. Brandt. 1983. Rapid detection of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* **32**(1): 164--169.

Henchal, E.A., M.K. Gentry, J.M. McCown, & W.E. Brandt. 1982. Dengue virus-spesific and flavivirus group determinations identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescense. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* **31**(4): 830--836.

Holman,D.H., D. Wang, K, Raviprakash, N.U. Raja, & M. Lou. 2007. Two complex, Adenovirus-based vaccines that together induce immune responses to all four dengue virus serotypes. *Clinical and Vaccine Immunology* **14**(2), 182--189.

Imgenex India. 2000. Antibody purificaton with SDS-PAGE analysis kit.Imginex India PVT. Ltd. Bhubaneswar: 7 hlm.

Invitrogen. 2001. *Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibodies*. Invitrogen coorporation, California: vi +6 hlm.

Invitrogen. 2003. *SuperScript™ III reverse transcriptase*. Invitrogen Coorporation, California: 4 hlm.

Invitrogen. 2006. *DAPI nucleic acid stain*. Molecular Probes, Inc, Paisley: 5 hlm.

Jessie, K., M.Y. Fong, S. Devi, S.K. Lam, & K.T. Wong. 2004. Localization of dengue virus in naturally infect human tissues, by immunohistochemistry an in situ hybridization. *The Journal of Infectious Diseases* 119: 1411--1418.

Kao, C.L., C.C. King, D.Y. Chao, H.L. Wu, & G.J.J. Chang. 2005. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *Journal Microbiology Immunology Infection* **38**: 5--16.

Kao, C.L., M.C. Wu, Y.H. Chiu, J.L. Lin, Y.C. Wu, Y.Y. Yueh, L.K. Chen, M.F. Shaio, & C.C. King. 2001. Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. *Journal of Clinical Microbiology* **39**(10): 3672--3677.

Kuno, G., C.B. Cropp, J. Wong-Lee, & D.J. Gubler. 1998. Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* **59**(5): 757--762.

Kuwahara M.& E. Konishi. 2010. Evaluation of extracellular subviral particles of dengue virus type 2 and Japanese Encephalitis virus produced by *Spodoptera frugiperda* cells for use as vaccine and diagnostic antigens. *Clinical and Vaccine Immunology* **17**(10), 182--189.

Lambeth, C. R., L. J. White, R. E. Johnston, & A. M. de Silva. 2005. Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *Journal of Clinical Microbiology* **43** (7): 3267--3272.

Lanciotti, R.S., C.H. Calisher, D.J. Bubler, G-J. Chang, & A.V. Vorndam. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses fro clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical Microbiology* **30**(3): 545--551.

Laroño-pino, M.A., C.B. Cropp, J.A. Farfán, A.V. Vorndam, E.M. Rodriguez-angulo, E.P. Rosado-Paredes, L.F. Flores-Flores, B.J. Beaty, & D.J.Gubler. 1999. American Society of Tropical Medicine and Hygiene **61**(5): 725--730.

Lubis, I. 1991. Pemberantasan jentik *Aedes* dalam penanggulangan demam berdarah. *Cermin Dunia Kedokteran* (69): 1--7.

Lynn, D.E. 2002. Methode for maintaining insect sell culture. *Journal of Insect Science* 2.9 , 1--6.

Mahy, B.W.J. & H.O. Kangro. 1996. Virology methods manual. Academic Press, San Diego: x + 374 hlm.

Mather, J.P. & P.E. Roberts. 1998. Intoduction of cell and tissue culture: Theory and technique. Plenum Press, New York: xv + 241 hlm.

McCullough, K.C. & R.E. Spear. 1990. Monoclonal antibodies in biology and biotechnology: Theoretical and practical aspects. Cambridge University Press, Cambridge: xi + 387 hlm.

Molecular Probes. 2001. Alexa fluor 555 monoclonal antibody labelling kit (A-20187). Molecular Probes Inc., United State: 3 hlm.

Morens, D.M., S.H. Halstead, P.M. Repik, R. Putvanata, & N. Raybourne. 1985. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by

semimicro methode in BHK-21 cell: Comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *Journal of Clinical Microbiology* **22**(2): 250--254.

Mosadale, D.E., J.C. Metcalfe, & D.J. Grainger. 1996. Optimization of immunofluorescence methods by quantitative image analysis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **44**(9): 1043--1050.

Mukhopadhyay, S., R.J. Kuhn, & M.G. Rossman. 2005. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nature Review: Microbiology* **3**: 13--22

Navaratnarajah C. K., R. Warrier, & R.J. Kuhn. 2008. Assembly of Envelope virions. *Dalam*: Mahy B.W.J & M.H.V.V. Regenmortel. 2010. *Desk encyclopedia of General virology*. Elsivier Ltd., San Diego: xvii + 644 hlm.

Parkhouse, R.M.E. 1984. Immunopurification. *British Medical Buletin* **40**(3): 297--301

Porter, K.R., T.J. Kochel, S.-J. Wu, K. Raviprakash, I. Philips, & C.G. Hayes. 1997. Protective efficacy of dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. *Archives of Virology* 143: 997--1003.

Qiagen. 2009. QIAamp® viral RNA mini handbook. 3rd ed. Qiagen Companies, (?): 43 hlm.

Qi, Rui-feng, L. Zhang, & Cheng-wu Chi. 2008. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin* **40** (2): 91--101.

R&D System. 2011. Troubleshooting guides: Western blot. 2011: 1 hlm. http://www.rndsystems.com/tsg_detail_objectname_western_blot.aspx#3, 16 Mei 2011, pk. 16.25 WIB.

Rebecca, S. 2000. History and characterization of the vero cell line. *The Vaccine and Related Biological Products Advisory Committee* **10**(5): 5695.

Roche. 2005. Triton X-100. September: 2 hlm. http://www.1332481a.pdf. 29 Juli 2010,pk. 15.00 WIB.

Roux, K.H. 1995. Optimation and troubleshooting in PCR. *Genome Research* **4**: 5185--5194.

Ryan, J.A. 2008. Introduction to animal cell culture. Corning Incorporated: 1--8.

Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001a. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Volume 2. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 8.1--14.53 + I.44 hlm.

Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001b. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Volume 2. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 8.1--14.53 + I.44 hlm.

Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001c. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Volume 3. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 15.1--18.136 + A1.1--A14.1 + R.22 + I.44 hlm.

Salas-Bonito, J.S. & R.S.D. Angel. 1997. Identification of two surface protein from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *Journal of Virology* **71**(10): 7246--7252.

Samuel, P.P. & B.K. Tyagi. 2006. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. *Indian Journal Medical Research* :615--628.

Shu, P.Y & J.H. Huang. 2004. Current advance in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnositic Laboratory Immunology* **11**(4): 642--650.

Soedarmo, S. P. 2004. Masalah demam berdarah dengue di Indonesia. Dalam: Hadinegoro, S. R. H. & H.I. Satari (eds.). 2004. *Demam berdarah dengue naskah lengkap pelatihan bagi pelatih dokter spesialis anak & dokter spesialis penyakit dalam: dalam tatalaksana kasus dbd*. Balai Penerbit FKUI, Jakarta: 1-13.

Suroso, T. 2004. Situasi epidemiologi dan program pemberantasan dbd di Indonesia. *Dalam*: Mustofa & L.S. Laksono (eds.). 2004. *Seminar kedokteran tropis kajian klb demam berdara dari biologi molekular sampai pemberantasannya*. Pusat Kedokteran Tropis Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta: 1--13.

Tomlinson, S.M., R.D. Malmstrom, & S.J. Watowich. 2009. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infectious Disorder-drug Target* **9**: 327--343.

Twiddy, S.S., C.H. Woelk, & E.C. Holmes. 2002. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *Journal of General Virology* **83**: 1679--1689.

Voyles, B.A. 2002. *The biology of viruses*. 2nd ed. McGraw-Hill Companies, Inc., New York: xv + 408 hlm.

Wang, W.K., D.Y. Chao, S.R. Lin, C.C. King, & S.C. Chang. 2003. Concurrent infection by two dengue virus serotype among dengue patients in Taiwan. *Journal Microbiology Immunology Infect* **36**: 89--95.

White, L.A. 1987. Susceptibility of Aedes albopictus C6/36 cells to viral infection. *American Society for Microbiology* **25**(7): 1221--1224.

World Health Organization (WHO). 2009. *Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control*. WHO Press, Switzerland: x + 147 hlm.

Lampiran 1. Pembuatan larutan, medium, dan *buffer* yang digunakan pada penelitian

No.	Nama Larutan, *buffer*, dan medium	Kompisisi dan cara pembuatan
1.	*Methanol: acetic solution*	500 ml metanol dicampurkan dengan 400 ml H_2O dan 100 ml *glacial acetic acid*
2.	1x RPMI	1 bungkus RPMI bubuk (10,4 g) dilarutkan dalam 1 l ddH_2O. 2 g sodium bikarbonat ditambahkan pada larutan. pH larutan diukur menggunakan pH meter sampai pH 7,2 dengan menambahkan 1 M NaOH atau 1 M HCl. Larutan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirer*. Larutan kemudian difilter menggunakan *filter cap*. Kemudian ditambahkan 10% FBS dan 1% Pen/strep. Medium dapat disimpan pada suhu 4^oC.
3.	Gel agarosa 2%	Sebanyak 2 g bubuk agarosa dilarutkan dengan 1x TBE hingga mencapai volume 100 ml.
4.	5x *Tris-glycine electrophoresis buffer*	15,1 g *Tris base* dicampurkan dengan 94 g glisin dan 50 ml 10% *stock solution of electrophoresis-grade* SDS. ddH_2O kemudian ditambahkan sampai volume 1 l. Larutan dapat disimpan pada suhu ruang (28^oC).
5.	10x *phospate buffered saline* PBS pH 7,4	80 g NaCl dicampurkan dengan 2 g KCl dan 2,4 g KH_2PO_4. ddH_2O kemudian ditambahkan sampai volume 1 l. Larutan dapat disimpan pada suhu ruang (28^oC).
6.	5x Tris Base EDTA (TBE) *buffer*	108 g *Tris base* dan 55 g *Boric acid* dilarutkan dalam 40 ml EDTA. ddH_2O kemudian ditambahkan sampai volume 1liter. Larutan kemudian disterilkan pada suhu 121° C, tekanan 1 atm, selama 15--20 menit. Larutan dapat disimpan pada suhu ruang (28^oC).

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

6.	5x *SDS-PAGE Loading Buffer*	625 µl bromofenol biru dicampur dengan 344,83 µl gliserol 87% dan 30 µl ddH_2O. Campuran kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirer*. Larutan dapat disimpan pada suhu -20^o C.
7.	0,5 M EDTA	93,05 g EDTA (BM= 372,2) dilarutkan dalam 500 ml ddH_2O. Larutan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan kemudian disterilkan pada suhu 121° C, tekanan 1 atm, selama 15--20 menit. Larutan dapat disimpan pada suhu ruang (28^o C).
8.	*Transfer buffer*	2,9 g *tris base* dicampurkan dengan 14,4 g glisin kemudian dilarutkan dengan 200 ml 20% metanol. ddH_2O kemudian ditambahkan sampai volume 1l. Larutan dapat disimpan pada suhu ruang (28^o C).
9.	1% *methyl-cellulose overlay medium* (2 % FBS)	500 ml 2x RPMI dicampurkan dengan 500 ml 2% *methyl celulose*. 20 ml *Fetal bovine serum* (FBS), 20 ml *Dimethylsulfoxide* (DMSO), 5 ml penisilin/streptomisin, 10 ml 7,5% $NaHCO_3$ dan 5 ml Hepes ditambahkan ke dalam larutan. Larutan kemudian dikocok dan disimpan pada suhu 20^o C.

[Sumber: Sambrook & Russell 2001a: A1.1--A2.12.]

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

Lampiran 2. Perhitungan *Multiplicity of Infection* (moi) Virus

Partikel virus yang dibutuhkan = banyaknya sel yang ditumbuhkan x moi

$$\text{Volume inokulum virus} = \frac{\text{partikel virus yang dibutuhkan}}{\text{Titer virus}}$$

1) Titer Virus D1-Hawaii = $8{,}75 \times 10^4$ PFU/ml

Banyak sel yang ditumbuhkan = 2×10^5 *cell*/*well*

Moi = 0.01

Partikel virus yang dibutuhkan = banyaknya sel yang ditumbuhkan x moi

$= 2 \times 10^5$ cell/*well* x 0,01

$= 2 \times 10^3$ PFU/*well*

$$\text{Volume inokulum virus} = \frac{\text{partikel virus yang dibutuhkan}}{\text{Titer virus}}$$

$$= \frac{2 \times 10^3 \text{ PFU/}\textit{well}}{8{,}75 \times 10^4 \text{ PFU/ml}}$$

$= 2{,}2 \times 10^{-2}$ ml/*well*

$= 22$ µl/*well*

Volume virus per *well* = 1 ml

Volume total = volume inokulum virus + medium

1000 µl = 22 + medium

Medium = 978 µl

2) Titer Virus D2-NGC = $2{,}1 \times 10^6$ PFU/ml

Banyak sel yang ditumbuhkan = 2×10^5 *cell*/*well*

Moi = 0,01

Partikel virus yang dibutuhkan = banyaknya sel yang ditumbuhkan x moi

$= 2 \times 10^5$ cell/*well* x 0,01

$= 2 \times 10^3$ PFU/*well*

$$\text{Volume inokulum virus} = \frac{\text{partikel virus yang dibutuhkan}}{\text{Titer virus}}$$

$$= \frac{2 \times 10^3 \text{ PFU/}\textit{well}}{2{,}1 \times 10^6 \text{ PFU/ml}}$$

$= 9{,}5 \times 10^{-4}$ ml/*well*

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011

= 0,95 µl/*well*

Volume virus per *well* = 1 ml

Volume total = volume inokulum virus + medium

1000 µl = 0,95 + medium

Medium = 999,05 µl

3) Titer Virus D3-H87 = $5,4x10^5$ PFU/ml

Banyak sel yang ditumbuhkan = $2x10^5$ *cell*/*well*

Moi = 0,01

Partikel virus yang dibutuhkan = banyaknya sel yang ditumbuhkan x moi

= $2x10^5$ cell/*well* x 0,01

= $2x10^3$ PFU/*well*

Volume inokulum virus = $\frac{\text{partikel virus yang dibutuhkan}}{\text{Titer virus}}$

= $\frac{2x10^3 \text{ PFU/}well}{5,4x10^5 \text{ PFU/ml}}$

= $3,7x10^{-3}$ ml/*well*

= 3,7 µl/*well*

Volume virus per *well* = 1 ml

Volume total = volume inokulum virus + medium

1000 µl = 3,7 + medium

Medium = 996,3 µl

4) Titer Virus D4-H241 = $5,1x10^4$ PFU/ml

Banyak sel yang ditumbuhkan = $2x10^5$ *cell*/*well*

Moi = 0,01

Partikel virus yang dibutuhkan = banyaknya sel yang ditumbuhkan x moi

= $2x10^5$ cell/*well* x 0.01

= $2x10^3$ PFU/*well*

Volume inokulum virus = $\frac{\text{partikel virus yang dibutuhkan}}{\text{Titer virus}}$

= $\frac{2x10^3 \text{ PFU/}well}{5,1x10^4 \text{ PFU/ml}}$

= $3,92x10^{-2}$ ml/*well*

= 39,2 µl/*well*

Volume virus per *well* = 1 ml

Volume total = volume inokulum virus + medium

1000 µl = 39,2 + medium

Medium = 960,8 µl

[Sumber: Mahy & Kangro1996: 38.]

Lampiran 3. Perhitungan Jumlah Sel untuk Uji Imunofluoresensi

$$\text{Jumlah sel} = \frac{\text{Jumlah sel yang dihitung} \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Jumlah kotak yang dihitung dalam } \textit{chamber}}$$

Dik: Pengenceran 10 kali

Jumlah kotak yang dihitung 10 kotak

Rata-rata sel pada sepuluh kotak 21 sel

$$\text{Jumlah sel} = \frac{21 \times 10^4 \times 10}{10} = 2{,}1 \times 10^5 \text{ sel/ml}$$

[Sumber: Sambrook & Russell 2001C: A8.6.--A8.7.]

Optimasi uji ..., Kresna Mutia, FMIPA UI, 2011